

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

**Das dermal-entzündliche Infiltrat in Arealen  
postinflammatorischer Hyperpigmentierung**

Masterarbeit  
im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von  
**Verena Rauchberger**

Hamburg  
am 14. Juni 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**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Das dermal-entzündliche Infiltrat in Arealen postinflammatorischer Hyperpigmentierung“ eigenständig, ohne unzulässige, fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Hamburg, den 14.06.2013

---

Verena Rauchberger

# Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ludger Kolbe und Herrn Dr. Christoph Smuda, die mir ermöglichten, meine Masterarbeit bei der Beiersdorf AG anzufertigen. Für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und hilfreiche Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit möchte ich mich herzlichst bei Herrn Dr. Christoph Smuda bedanken. Selbst in Zeiten interner Umstrukturierung konnte ich auf anregende Diskussionen und motivierende Worte zählen.

Bei Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich möchte ich mich sehr herzlich für die wissenschaftliche Begleitung seitens der HAW Hamburg und seine stets schnelle und hilfreiche Beantwortung meiner Fragen bedanken.

Mein weiterer Dank gilt speziell Frau Dr. Sonja Wessel, die mich nicht nur mit großer, fachlicher Kompetenz in die Mikroskopie und Bildauswertung eingeführt hat, sondern stets engagiert war, bei aufkommenden Fragen und Problemen Hilfestellung zu leisten.

Für die Hilfsbereitschaft und angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Ethnic Skin / Sun Care und auch bei jenen der Strukturforschung bedanken.

Ein großer Dank gebührt den Kolleginnen der Biometrie, Frau Juliane Lüttke und Frau Birthe Körbl, für die statistische Unterstützung.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Opa und meinem Freund für die bedingungslose Unterstützung und die Ermutigungen während des Studiums danken.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Struktur und Funktion der humanen Haut .....	1
1.2 Epidermale Melanozyten und das Pigmentierungssystem .....	3
1.3 Die dermo-epidermale Übergangszone .....	5
1.4 Dermale Zellen und ihre Rolle für Entzündungs- und Wundheilungsprozesse .....	6
1.5 Postinflammatorische Hyperpigmentierung .....	10
2 Zielsetzung .....	12
3 Materialien .....	13
3.1 Geräte .....	13
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	13
3.3 Chemikalien und Lösungen .....	14
3.4 Kits .....	14
3.5 Antikörper und Isotypenkontrollen .....	15
3.6 Software .....	18
4 Methoden .....	20
4.1 Gewinnung des Probenmaterials und Studiendesign .....	20
4.2 Histologie .....	21
4.2.1 Die Probenfixierung .....	21
4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung .....	22
4.2.3 Immunhistochemische Färbung nach der APAAP-Methode .....	25
4.2.4 Etablierung der Antikörper .....	28
4.3 Mikroskopie .....	30
4.3.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	30
4.3.2 Digitalisierter Scan der immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte .....	31
4.4 Bildanalytische Quantifizierung der digitalisierten Hautdünnschnitte .....	32
4.4.1 Vorbereitung und Bearbeitung im Panoramic Viewer® .....	32
4.4.2 Quantifizierung mit dem 3D-HISTECH Modul NuclearQuant® .....	34
4.4.3 Quantifizierung mit dem 3D-HISTECH Modul HistoQuant® .....	35
4.5 Auswertung und Statistik .....	36
5 Ergebnisse .....	38

---

5.1	Morphologische und histologische Analysen epidermaler Parameter in Saugblasen-induzierter PIH .....	38
5.1.1	Bisherige Erkenntnisse zur epidermalen Schichtdicke und zum Melaningehalt.....	38
5.1.2	Untersuchung der Proliferation durch Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 .....	40
5.1.3	Untersuchung der Melanozyten.....	42
5.2	Histologische Analyse der Integrität der Basalmembran in Saugblasen-induzierter PIH .....	52
5.3	Morphologische und histologische Analyse dermalen Parameter in Saugblasen-induzierter PIH .....	54
5.3.1	Untersuchung der Proliferation durch Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 .....	54
5.3.2	Untersuchung der Fibroblasten und Myofibroblasten .....	56
5.3.3	Untersuchung der Endothelzellen.....	61
5.3.4	Untersuchung des Immunzellstatus .....	64
6	Diskussion .....	74
6.1	Auswirkungen der Saugblasen-induzierten PIH auf die epidermale Morphologie und Basalmembran-Integrität .....	74
6.2	Mechanismen der Saugblasen-induzierten PIH.....	76
6.2.1	Hyperpigmentierung durch Veränderung epidermaler Melanozyten .....	76
6.2.2	Die Rolle dermalen Fibroblasten und Endothelzellen.....	79
6.2.3	Charakterisierung des dermal-entzündlichen Infiltrats.....	83
7	Zusammenfassung.....	87
8	Literaturverzeichnis.....	89
9	Anhang .....	97
9.1	Ergänzende Antikörperliste .....	97
9.2	Wertetabellen der Ergebnisse .....	99
9.2.1	Epidermale Parameter .....	99
9.2.2	Dermale Parameter .....	104
9.3	P-Werte.....	112

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	alpha-smooth muscle actin
AB	antibody
AKV	Antikörper-Verdünnungspuffer
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
BM	Basalmembran
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
Cy	Cyanine
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
<i>de novo</i>	von Neuem (Latein)
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DOPA	$\beta$ -3,4-Dihydroxyphenylalanin
<i>et al.</i>	und andere (Latein: <i>et alii</i> )
EPU	epidermal proliferative unit
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSP	fibroblast specific protein
HGF	hepatocyte growth factor
HMB	human melanoma black
HRP	histamine-releasing peptide
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
<i>in vitro</i>	im Glas (Latein)
<i>in vivo</i>	im Lebendigen (Latein)
IQR	interquartile range
LCA	leukocyte common antigen
MART-1	melanoma antigen recognized by T cells-1
MCAM	melanoma cell adhesion molecule
MISP	microscopic imaging segmentation profile
OT	Objektträger
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PBS	phosphate buffered saline
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1

PeR	PermaRot
PIH	postinflammatorische Hyperpigmentierung
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SB	Saugblasen
SCF	stem cell factor
s. o.	siehe oben
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(und 6)-isothiocyanate
TRP1	tyrosinase related protein 1
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
w/o	without

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Schematischer Aufbau der menschlichen Haut. ....	2
<b>Abbildung 1.2:</b> Schematische Darstellung der Melaninsynthese. ....	5
<b>Abbildung 4.1:</b> Darstellung der <i>in vivo</i> -Methode für das Ziehen von Saugblasen. ....	20
<b>Abbildung 4.2:</b> Schematische Darstellung der Zwei-Phasen-Methode der indirekten Immunmarkierung. ....	22
<b>Abbildung 4.3:</b> Geräteaufbau des Universalfärbeautomaten Dako Autostainer Plus Universal Staining System®. ....	24
<b>Abbildung 4.4:</b> Schematische Darstellung der indirekten Immunmarkierung mit der APAAP- Methode. ....	26
<b>Abbildung 4.5:</b> Panoramic MIDI®-Scanner. ....	32
<b>Abbildung 4.6:</b> Benutzeroberfläche des Panoramic Viewer®. ....	33
<b>Abbildung 4.7:</b> Ergebnisdarstellung eines exemplarischen, histologisch gefärbten Hautdünnschnittes innerhalb einer definierten ROI nach der Quantifizierung mit NuclearQuant®. ....	35
<b>Abbildung 4.8:</b> Auszüge aus dem Modul HistoQuant® anhand einer epidermalen Region eines exemplarischen Hautdünnschnittes. ....	36
<b>Abbildung 4.9:</b> Darstellung charakteristischer Merkmale eines Box-Whisker-Plots. ....	37
<b>Abbildung 5.1:</b> Exemplarische Darstellung von Hautdünnschnitten zur Identifizierung struktureller Veränderungen der Epidermis. ....	38
<b>Abbildung 5.2:</b> Grafische Darstellung der mittleren Epidermisdicke. ....	39
<b>Abbildung 5.3:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der Ki-67 positiven Zellen. ....	41
<b>Abbildung 5.4:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der HMB-45, MART-1, TRP-1 und c-Kit positiven Markierung. ....	44
<b>Abbildung 5.5:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der TRP1 positiven Markierung. ....	47
<b>Abbildung 5.6:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der c-Kit positiven Zellen. ....	50
<b>Abbildung 5.7:</b> Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Immunmarkierungen mit Laminin-5 an PIH- und Kontrollarealen und von einer Co-Färbung mit Laminin-5 und Kollagen Typ VII zur Untersuchung der Basalmembran-Integrität. ....	53
<b>Abbildung 5.8:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der Ki-67 positiven Zellen. ....	55
<b>Abbildung 5.9:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der FSP positiven Zellen. ....	57
<b>Abbildung 5.10:</b> Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Triple-Färbung von $\alpha$ - SMA, CD31 und Laminin-5 an PIH- und Kontrollarealen zur Identifizierung von Myofibroblasten. ....	60
<b>Abbildung 5.11:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der CD31 positiven Zellen. ....	62
<b>Abbildung 5.12:</b> Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Triple-Färbung von CD31, CD146 und Laminin-5 an einem PIH-Areal zur Charakterisierung des Endothels. ....	64

---

<b>Abbildung 5.13:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der CD45, CD68, CD14 und Mastzelltryptase positiven Zellen.....	67
<b>Abbildung 5.14:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der CD45 positiven Zellen.....	69
<b>Abbildung 5.15:</b> Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle mit co-lokalisierter c-Kit- und Mastzelltryptase-Markierung.....	71
<b>Abbildung 5.16:</b> Histologische und quantitative Ergebnisse der c-Kit positiven Zellen. ....	72

---

## Tabellenverzeichnis

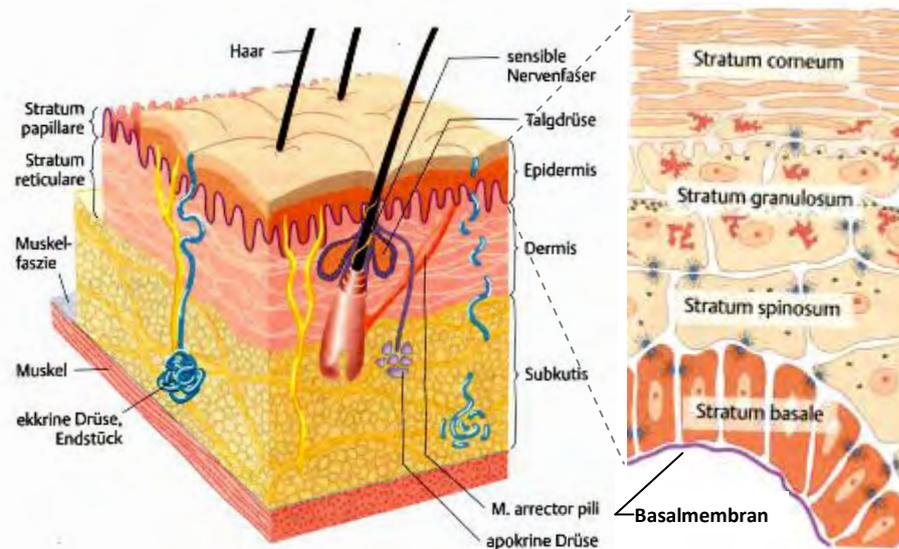
<b>Tabelle 3.1:</b> Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellernachweis.....	13
<b>Tabelle 3.2:</b> Übersicht der Verbrauchsmaterialien. ....	13
<b>Tabelle 3.3:</b> Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	14
<b>Tabelle 3.4:</b> Übersicht der verwendeten Kits. ....	14
<b>Tabelle 3.5:</b> Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	15
<b>Tabelle 3.6:</b> Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	16
<b>Tabelle 3.7:</b> Übersicht der verwendeten Isotypenkontrollen. ....	17
<b>Tabelle 3.8:</b> Übersicht der verwendeten Software.....	18
<b>Tabelle 4.1:</b> Programmierte Abfolge der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Dako Autostainer Plus®. .....	24
<b>Tabelle 4.2:</b> Programmierte Abfolge der immunhistochemischen Färbung mit dem Dako Autostainer Plus®.....	27
<b>Tabelle 9.1:</b> Übersicht etablierter Primärantikörper. ....	97

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur und Funktion der humanen Haut

Die Haut als größtes Organ des Menschen stellt eine physikalische Barriere und Abgrenzung zur Umwelt dar und hat eine Gesamtfläche von 1,5-2 m<sup>2</sup> und ein Gewicht von 3,5-10 kg (Moll *et al.* 2010, S. 3). Somit übertrifft die Haut das Gewicht jedes anderen Organs, unter Ausschluss von Muskel-, Knochen- und Fettgewebsmasse. Die wichtigste Funktion der Haut ist ihr Schutz gegen thermische, mechanische, chemische und mikrobielle Einflüsse (Tobin 2006). Hierbei wird zwischen passiven Funktionen wie dem Schutz vor Kälte, Hitze, UV-Strahlung, Druck, Reibung und Allergenen und den aktiven Funktionen wie der Abgabe von Schweiß und Talg, der Abwehr eingedrungener Keime, der Thermoregulation durch Durchblutung und der Berührungswahrnehmung unterschieden (Sterry 2011, S. 3). Dabei bietet das UV-absorbierende Pigmentierungssystem Schutz gegen UV-Strahlung und das komplexe immunregulatorische Netzwerk ermöglicht die Abwehr bzw. Bekämpfung fremder oder anormal exprimierter Komponente (Tobin 2006). Generell besteht die Haut aus den drei Schichten Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut oder subkutanes Fett- und Bindegewebe) (Sterry 2011, S. 4). Zur Haut zählen auch die integralen Bestandteile der verschiedensten Hautanhangsgebilde (Adnexe), wie Haarfollikel, Hautdrüsen und Nägel (Moll *et al.* 2010, S. 4). Im linken Bild der Abbildung 1.1 sind die drei Hautschichten mit ihren Adnexen dargestellt.

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das in mehreren Schichten unterteilt wird und abhängig von Lokalisation, Alter und Geschlecht zwischen 30 und 300 µm dick ist (Moll *et al.* 2010, S. 4) (siehe Abbildung 1.1). Die vier Epidermisschichten gliedern sich in das *Stratum basale* (Basalschicht), das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) und das *Stratum corneum* (Hornschicht).



**Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut.**

Dargestellt ist ein dreidimensionaler Querschnitt der Haut, der in die drei Schichten Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) untergliedert wird. Zusätzlich sind einige Hautanhangsgebilde wie ein Haarschaft, eine Talgdrüse und apokrine und ekkrine Drüsen zu erkennen, sowie die Verbindung der Subkutis mit dem darunterliegenden Muskel (linkes Bild). Die Dermis gliedert sich in zwei Strata, dem *Stratum papillare* und dem *Stratum reticulare*, während die Epidermis aus vier Zellschichten aufgebaut ist: dem *Stratum basale*, der innersten, über die Basalmembran an die Dermis grenzenden Zellschicht, dem *Stratum spinosum*, dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum* (rechtes Bild). (Quelle: in Anlehnung an Sterry 2011, S. 4-5)

Das *Stratum basale*, auch *Stratum germinativum* genannt, ist eine einzellige Schicht, die mit der darunter liegenden Basalmembran (BM) eine Barriere zwischen Epidermis und Dermis bildet. Hauptsächlich besteht diese Schicht aus basalen Keratinozyten mit stammzellähnlichen Eigenschaften, die für die Regeneration des Epithels essenziell sind. Zusätzlich finden sich in der Basalschicht Melanozyten und Merkel-Zellen, die beide der Neuralleiste entstammen. Merkel-Zellen sind über Interzellularbrücken (Desmosome) mit den benachbarten Keratinozyten verbunden und für die Übertragung des Berührungsempfindens verantwortlich (Costin und Hearing 2007; Sterry 2011, S. 5-6). Im *Stratum spinosum* sind große, polyklonale Keratinozyten mehrschichtig angeordnet und über Desmosome miteinander verbunden (Moll *et al.* 2010, S. 5). Ein weiterer Zelltyp dieser Schicht sind die dendritischen Langerhans-Zellen, die als wichtigste epidermale Zellen des Immunsystems bei der Antigenpräsentation von Bedeutung sind (Costin und Hearing 2007). Die Keratinozyten der darüberliegenden Schicht, des *Stratum granulosum*, sind deutlich abgeflacht und enthalten basophile Keratohyalingranula, welche wichtige Strukturproteine der Hornschicht produzieren (Moll *et al.* 2010, S. 5; Sterry 2011, S. 5). Die Keratinozyten flachen ab während sie von den sich teilenden Zellen, die unter ihnen liegen, kontinuierlich an die Hautoberfläche geschoben werden. Gleichzeitig nehmen Größe und Zahl der Granula zu, die Zellkerne degenerieren und die Zellen sterben (Costin und Hearing 2007). Die äußerste Zellschicht, das *Stratum corneum*, besteht aus 15-30 Schichten kernloser Hornzellen oder „Korneozyten“, die nicht lebensfähig aber biochemisch aktiv sind (Tobin 2006). Sie beinhalten Fibrillenbündel aus Keratin, sog. Tonofilamente, und eine amorphe Matrix (Moll *et al.*

2010, S. 5). Diese Eigenschaften machen die äußerste Hautschicht besonders widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse und reduzieren den transepidermalen Wasserverlust (Elias 2005).

Zwischen der Epidermis und der Subkutis liegt die 2-4 mm dicke Dermis, die auch Lederhaut genannt wird und Bestandteile des Gefäß-, Neural- und Lymphsystems sowie mehrere Anhangsgebilde, u. a. ekkrine Drüsen (z. B. Schweißdrüsen), apokrine Drüsen (z. B. Duftdrüsen), Talgdrüsen, Haarfollikel, Nägel und sensorische Nervenrezeptoren enthält (Costin und Hearing 2007; Tobin 2006). Sie wird in zwei Schichten unterteilt: dem *Stratum papillare* (papilläre Schicht) und dem *Stratum reticulare* (retikuläre Schicht) (Sterry 2011, S. 7). Das *Stratum papillare* stellt die obere dermale Schicht dar und erstreckt sich mit sog. Papillen in die Bereiche zwischen den epidermalen Reteleisten. In diesem Bereich der Dermis, welcher aus kollagenem Bindegewebe und elastischen Fasern besteht, befinden sich überwiegend Kapillaren, Venen und Lymphgefäße und der Großteil der dermalen Zellen. Ähnlich wie das *Stratum papillare* enthält das *Stratum reticulare* kollagenes Bindegewebe und Kollagenfasern, jedoch sind Letztere zahlreicher vorhanden und zu kräftigen, dichten Bündeln gepackt. Diese dermale Schicht beherbergt weniger Zellen und Blutgefäße als das *Stratum papillare* und ist der Ursprungsort von Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen (Moll *et al.* 2010, S. 6).

Die zellulären Bestandteile der dermalen Kompartimente sind primär Fibroblasten, die gemäß ihrer dermalen Lokalisation eine heterogene Zellpopulation bilden (Sorrell und Caplan 2004). Sie formen das extrazelluläre Bindegewebe (Matrix), welches aus kollagenen und elastischen Fasern besteht. Die Kollagenfasern begründen die mechanische Stabilität der Dermis und die elastischen Fasern aus Elastin und Fibrillin bedingen Festigkeit und Elastizität (Sterry 2011, S. 12-13). Zusätzlich beherbergt die Dermis Gefäßzellen, dendritische Zellen, Mastzellen und eine kurzlebige Population von Leukozyten wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten (Sorrell und Caplan 2004).

Die unter der Dermis liegende Subkutis besteht aus Bindegewebe und Fettzellen. Sie verbindet die Dermis mit der darunterliegenden Muskulatur und dient als Energiespeicher, Wärmeisolator und zum mechanischen Schutz (Sterry 2011, S. 7).

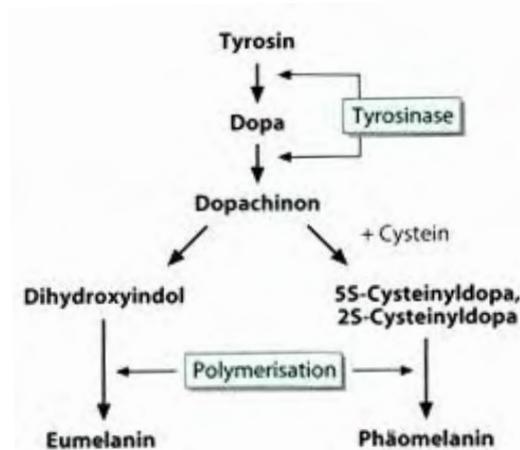
## 1.2 Epidermale Melanozyten und das Pigmentierungssystem

Melanozyten sind dendritische Zellen, die im *Stratum basale* der Epidermis bzw. des Haarfollikels direkt an der BM aufliegen (Fritsch 2004, S. 19). Im Allgemeinen bezieht sich der Begriff Melanozyten auf epidermale Melanozyten, da die dermalen Melanozyten bereits postnatal fast vollständig verschwunden sind (Costin und Hearing 2007). Von jedem Melanozyt gehen ca. 10-20 Dendriten aus, die den Kontakt mit etwa 30 Keratinozyten herstellen und die sog. epidermale Melanineinheit bilden. Melanozyten unterliegen einer trägen Zellteilung, weshalb nach einer Zerstörung des Hautgewebes die Repopularisierung nur sehr langsam erfolgt (Fritsch 2004, S. 19). Die Melanozyten tragen maßgeblich zu bestimmten Schutzfunktionen der Haut bei. Sie bieten ihr

Lichtschutz, aufgrund ihrer Fähigkeit UV-Strahlung zu absorbieren und beeinflussen die Wärmeregulation durch die Synthese von Melanin. Melanin trägt neben Carotinoiden und dem Hämoglobin wesentlich zur Pigmentierung bei (Lin und Fisher 2007). Die Menge an Melanin bzw. das Ausmaß der Pigmentierung äußert sich in sog. Phototypen der Haut (Fitzpatrick 1988). Die Biosynthese von Melanin erfolgt in den Melanosomen, welche Lysosom-ähnliche Organellen der Melanozyten darstellen und aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum entstehen. Die Melanosome als sekretorische Organellen ermöglichen den Transfer von Melanin - den Pigmenttransfer - aus den Melanozyten zu den sie umgebenden Keratinozyten (Fritsch 2004, S. 19; Raposo und Marks 2002). Bei ihrer Wanderung zu den Keratinozyten reifen die Melanosome heran und je nach Melaningehalt werden vier Stadien unterschieden: Das erste Reifungsstadium (I) entspricht der Organisation der Melanosomenmatrix. In der zweiten Phase (II) besitzen die Melanosome eine vollständig ausgebildete Proteinmatrix und sind entweder noch frei von Melanin oder haben dieses bereits gebildet. Im ersten Fall wird von Eumelanosomen gesprochen, die das braun-schwarze Eumelanin hervorbringen. Im zweiten Fall handelt es sich um Phäomelanosome, die rötlich-gelbes Phäomelanin produzieren (Lin und Fisher 2007; Slominski *et al.* 2004). Die dritte Stufe der Melanosomenreifung (III) beinhaltet die Einlagerung des Melanins in die Proteinmatrix und im letzten Schritt (IV) sind die Melanosome vollständig mit Melanin gefüllt (Slominski *et al.* 2004). Sowohl Eumelanosome als auch Phäomelanosome können in derselben Zelle auftreten, jedoch nicht innerhalb eines Reifungsprozesses (Inazu und Mishima 1993; Slominski *et al.* 2004). In den Melanosomen muss ein Umschalten zwischen der Produktion von Eumelanin und Phäomelanin, hervorgerufen durch extrazelluläre Signale, stattfinden (Øyehaug *et al.* 2002).

Eumelanin und Phäomelanin unterscheiden sich nicht nur in ihrer Farbe, sondern auch in Größe, Form und Packungsdichte ihrer Granula (Slominski *et al.* 2004). Die Bildung beider Arten, die Melanogenese genannt wird, unterliegt zunächst demselben Tyrosinase-abhängigen Syntheseweg. Dieser beginnt mit der Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu  $\beta$ -3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und der anschließenden Oxidation zu DOPACHINON (Fritsch 2004, S. 20; Land und Riley 2000). Die nachfolgenden Schritte, die ohne Enzymvermittlung durch die Tyrosinase ablaufen, sind unterschiedlich für Eumelanin und Phäomelanin. Ein Hauptweg, in dem die beiden Tyrosinase-assoziierten Proteine TRP1 („tyrosinase-related protein 1“) und TRP2 („tyrosinase-related protein 2“ oder DOPACHROMTAUTOMERASE) eine Rolle spielen, führt zur Bildung von Eumelanin (Lin und Fisher 2007). Hierbei wird DOPACHINON über LeukoDOPACHROM in das Zwischenprodukt DOPACHROM umgesetzt. Dieses wird über 5,6-Dihydroxyindol (DHI) zu Indol-5,6-Chinon konvertiert und endet nach einer Polymerisierung beim Eumelanin (Fritsch 2004, S. 20; Ito und Wakamatsu 2003). Der zweite mögliche Syntheseweg verläuft über die Reaktion von DOPACHINON mit Glutathion und/oder mit Cystein zu 5-S-CysteinylDOPA und 2-S-CysteinylDOPA, welche schließlich zu Phäomelanin oxidieren und polymerisieren (Fritsch 2004, S. 21). Eine schematische Darstellung der Melanogenese ist Abbildung 1.2 zu entnehmen.

Sobald die Melanosome in den Keratinozyten angelangt sind, werden sie dahingehend verteilt und positioniert, dass sie die Zellkerne schützen, die der UV-Strahlung ausgesetzt sind (Lin und Fisher 2007).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Melaninsynthese.**

Das Enzym Tyrosinase katalysiert die Hydroxylierung von Tyrosin zu DOPA ( $\beta$ -3,4-Dihydroxyphenylalanin) und dessen Oxidation zu DOPACHINON. Für die Bildung von Eumelanin wird DOPACHINON nach einigen Zwischenschritten zu Dihydroxyindol konvertiert und endet nach einem Polymerisationsschritt beim braun-schwarzen Eumelanin. Das Phäomelanin wird über einen separaten Weg gebildet, indem DOPACHINON mit Cystein zu zwei unterschiedlichen CysteinylDOPAs reagiert, welche schließlich zu Phäomelanin polymerisieren. (Quelle: Fritsch 2004, S. 20)

### 1.3 Die dermo-epidermale Übergangszone

Als Grenzzone zwischen Epidermis und Dermis liegt die BM, die den Durchlass von Molekülen einschränkt. Sie besteht aus der *Lamina fibroretikularis* und der Basallamina, welche sich aus der *Lamina lucida* und der *Lamina densa* zusammensetzt (Slominski und Wortsman 2000, S. 18; Briggaman und Wheeler 1975). Die Hauptbestandteile der Basallamina sind die Glykoproteine Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin und das Proteoglykan Perlecan (Alberts 2008, S. 1165). Die Ankerungsfilamente mit dem Hauptbestandteil Laminin-5 verbinden die *Lamina lucida* mit den Hemidesmosomen. Die BM ist mit der Dermis über die Verankerungsfibrillen des Kollagens Typ VII verbunden (Slominski und Wortsman 2000, S.18). Die Bildung wichtiger BM-Komponente wie Laminin, Kollagen Typ IV und Kollagen Typ VII erfolgt durch Fibroblasten und Keratinozyten (Lee und Cho 2005). Die BM-Komponente Laminin-5 ist entscheidend für den festen Zusammenhalt von Epidermis und Dermis an der dermo-epidermalen Übergangszone sowie für den Aufbau und die Regeneration der BM nach einer Verletzung. Die BM als wichtige, selektive Diffusionsbarriere muss eine intakte Einheit darstellen, um die Entwicklungsfähigkeit und das Überleben der Haut zu gewährleisten (Nishiyama *et al.* 2000).

## 1.4 Dermale Zellen und ihre Rolle für Entzündungs- und Wundheilungsprozesse

Die Wundheilung der Haut ist ein mehrstufiger Prozess, welcher die Aktivierung und Rekrutierung einer Reihe von epidermalen und dermalen Zelltypen voraussetzt (Rodero und Khosrotehrani 2010). Die den dermalen Zelltypen angehörigen Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen werden im Folgenden näher beschrieben.

### 1.4.1.1 Fibroblasten und Myofibroblasten

Fibroblasten übernehmen nicht nur eine wichtige Funktion in der Bindegewebsbildung bei der Organogenese, sondern sind auch als Teil der integrierten Biologie im ausgewachsenen Organismus an der Produktion und dem Umsatz von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen und Fibronectin beteiligt (Strutz *et al.* 1995; Darby und Hewitson 2007). Fibroblasten stellen in diversen Bindegeweben wie der Haut eine heterogene Zellpopulation dar, die anhand einer sternförmigen Morphologie mit verlängerten Zellfortsätzen und einer hohen biosynthetischen Aktivität identifiziert wird. Trotz zahlreicher *in vitro*-Studien ist bisher nur wenig über die Differenzierung der Fibroblasten *in vivo* bekannt (Darby und Hewitson 2007; Sappino *et al.* 1990). Aufgrund der allgemein schwachen Antigenität von Fibroblasten und der eher unspezifischen Natur seiner Antigene ist die erfolgreiche Identifizierung auf Basis immunhistochemischer Färbungen relativ beschränkt (Darby und Hewitson 2007). Zusätzlich zeigen Fibroblasten Varianzen im Expressionsmuster, die nicht nur von ihrer Lokalisation innerhalb des Gewebes, in welchem sie sich aufhalten, abhängen, sondern auch von ihrem anatomischen Ursprungsort (Rinn *et al.* 2006; Chang *et al.* 2002). Die Fibroblasten nehmen mit ihrem differenzierten Zelltyp, den Myofibroblasten, eine wichtige Rolle in der Wundheilung und in zahlreichen Krankheiten, welche mit einer Fibrose oder Narbenbildung einhergehen, ein. In der frühen Gewebereparatur sind die Fibroblasten, die in die Wunde einwandern, aktiv und undifferenziert. Bei der Dermis wird besonders von einer lokalen Rekrutierung der Fibroblasten aus intakter, benachbarter Haut zu den Arealen der Entzündung ausgegangen (Desmoulière *et al.* 1995). Mit fortschreitender Wundheilung treten die Myofibroblasten in Erscheinung (Darby und Hewitson 2007). Myofibroblasten sind mesenchymale Zellen, die die Eigenschaften von Fibroblasten und glatten Muskelzellen miteinander vereinen (Sappino *et al.* 1990). Die Differenzierung der Fibroblasten zu den Myofibroblasten wird als zweistufiger Prozess verstanden: Zunächst erwerben die Fibroblasten einen migratorischen Phänotyp mit kontraktilem Fibrillenbündeln als Antwort auf Veränderungen in der Zusammensetzung, der Organisation und der mechanischen Eigenschaft der EZM. Diese veränderten Fibroblasten werden auch Proto-Myofibroblasten genannt. Mit zunehmendem Stress in der EZM entwickeln sich die Proto-Myofibroblasten zu differenzierten Myofibroblasten (Hinz 2007). Diese kontrahieren mithilfe eines glattmuskulären Aktin-Myosin-Komplexes, der reich an „alpha-smooth

muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA) ist und dabei hilft, die Wundränder einander anzunähern. Myofibroblasten zeichnen sich im Weiteren durch einen sog. Fibronexus aus, der die intrazellulären Mikrofilamente sowohl mit anderen Myofibroblasten als auch mit der umliegenden EZM verbindet (Eyden 1993). Bei der Wundheilung ist die kontraktile Aktivität von Myofibroblasten beendet, wenn das Gewebe repariert ist, d. h. wenn die Expression von  $\alpha$ -SMA gesunken ist und die Myofibroblasten durch Apoptose verschwunden sind (Desmoulière *et al.* 1995). Eine eindeutige Identifizierung der Myofibroblasten ist schwierig, da es momentan kein identifiziertes, zytoskeletales Protein gibt, das eine zuverlässige Diskriminierung zwischen Myofibroblasten und anderen kontraktiven Zelltypen, wie z. B. den glatten Muskelzellen, erlaubt (Hinz 2007).

#### **1.4.1.2 Endothelzellen**

Endothelzellen sind Zellen, die das Innere der Blut- und Lymphgefäße auskleiden und somit eine selektive Barriere zwischen den intraluminalen Zellen und dem umliegenden Gewebe bilden. Die Vorläufer sind wie bei den hämatopoetischen Zellen multipotente Hämangioblasten. Endothelzellen übernehmen nicht nur Funktionen bei der vaskulären Permeabilität, sondern sind auch an der Homöostase der Gefäße und anderen Regulierungsprozessen wie Entzündung, Koagulation, Gefäßwachstum und Vasomotorik - den Spannungszuständen der glatten Gefäßmuskeln - beteiligt (Sumpio *et al.* 2002; Michiels 2003). In der Wundheilung kommen den Endothelzellen zwei Hauptfunktionen zu: Zum Einen koordinieren und regulieren sie die Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie die Leukozyten zum entzündeten bzw. verletzten Gewebe. Zum Anderen bilden sie während der Gewebereparatur neue Blutgefäße aus bestehenden Mikrogefäßen aus. Diese Ausbildung neuer Gefäßstrukturen wird Angiogenese genannt. In beiden Prozessen der Wundheilung sind die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von zentraler Bedeutung (Gillitzer und Goebeler 2001). Für die Stimulation und den Ablauf der Angiogenese sind außerdem noch der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor („vascular endothelial growth factor“, VEGF) und andere Wachstumsfaktoren aus dem Zielgewebe entscheidend (Alberts 2008, S. 1448). Als Signale für den Austritt von Immunzellen aus der Blutzirkulation und deren Rekrutierung ins verletzte Gewebe dienen Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche der Endothelzellen, wie z. B. das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 („intercellular adhesion molecule-1“, ICAM-1), das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 („vascular cell adhesion molecule-1“, VCAM-1), das Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 („platelet endothelial cell adhesion molecule-1“, PECAM-1 oder CD31) und E- und P-Selektin (Michiels 2003).

### 1.4.1.3 Immunzellen

Die Entzündung als adaptive Reaktion auf eine Infektion oder Verletzung des Gewebes löst die Rekrutierung von Leukozyten und Plasmaproteinen aus der Mikrozirkulation ins extravaskuläre Gewebe aus (Medzhitov 2008). Entzündungsreaktionen in der Haut werden von Interaktionen zahlreicher immunkompetenter Zellen und löslicher Entzündungsmediatoren in der Epidermis und der Dermis gesteuert. Die Dermis enthält die meisten Lymphozyten der Haut sowie zusätzlich aus den Blutgefäßen eingewanderte Leukozyten wie Gewebsmakrophagen und Mastzellen (Salmon *et al.* 1994).

Zu den Lymphozyten in der Haut und Komponenten des erworbenen Immunsystems zählen die T- und B-Zellen. Sie sind mobile Zellen, die aus dem Knochenmark stammen und sich erst danach in die Gruppen der T- und B-Zellen aufspalten. Sie reagieren direkt mit den Antigenen, sezernieren spezifische Mediatoren und speichern Informationen über Antigene. Die T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und tragen an ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor, der ein spezifisches Antigen erkennt. Die B-Lymphozyten werden von den T-Zellen stimuliert und differenzieren danach zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen des Immunsystems. Durch Letztere wird eine schnelle und starke Immunreaktion nach dem erneuten Eindringen der Antigene gewährleistet (Sterry 2011, S. 9; Moll *et al.* 2010, S. 19).

Die dendritischen Zellen, auch dermale Dendrozyten genannt, übernehmen im Wundheilungsvorgang eine zentrale Rolle. Sie entwickeln sich je nach Typ aus Monozyten oder Vorläufern der T-Zellen. Sie sind als heterogene Gruppe Antigen-präsentierender Leukozyten für die angeborene und erworbene Immunität wichtig (Zaba *et al.* 2009). Die dendritischen Zellen sind definiert als jene Zellen, die die Fähigkeit besitzen, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, die Antigene zu den sekundären lymphoiden Organen wie den Lymphknoten zu transportieren und T-Zellen zu stimulieren (Banchereau und Steinman 1998). Ihre dendritische Form ermöglicht ihnen diese Funktionen auszuführen (Larregina und Falo 2005). Sie sind speziell im *Stratum papillare*, häufig zusammen mit den Mastzellen, in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert (Monteiro *et al.* 2000). In nicht entzündeter Haut treten grundsätzlich zwei Zellpopulationen auf: die dermalen myeloiden und die dermalen plasmazytoiden Dendrozyten. Im Falle einer Entzündungsreaktion tritt eine zusätzliche Population von myeloiden Dendrozyten in Erscheinung (Zaba *et al.* 2009).

Granulozyten repräsentieren als Komponenten des angeborenen Immunsystems einen Großteil der Leukozyten. Die neutrophilen Granulozyten, auch Neutrophile genannt, machen 50 % der zirkulierenden Leukozyten aus und sind in der Lage Mikroorganismen bei akuten Entzündungsreaktionen zu phagozytieren und sie mithilfe von Enzymen und ihren Lysosomen zu vernichten. Eosinophile Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei Allergien und der Parasitenabwehr (Moll *et al.* 2010, S. 18).

Die zirkulierenden Monozyten des Blutes differenzieren nach Gewebeeinfiltration zu Makrophagen, welche auch Histiozyten genannt werden. Sie besitzen phagozytäre Fähigkeiten und können daher bakterielle Krankheitserreger und tote Zellen eliminieren (Moll *et al.* 2010, S. 18). Makrophagen gehören zu den Antigen-präsentierenden Immunzellen, da sie die Erreger nicht immer selbst bekämpfen können. Bei der Gewebeerletzung infiltrieren Neutrophile und Makrophagen die Wunde. Im Verlauf des Wundheilungsprozesses reduziert sich die Anzahl der Neutrophile, da sie von den Makrophagen abgebaut werden. Diese werden im weiteren Verlauf zum dominierenden, inflammatorischen Zelltyp (Brancato und Albina 2011). In der frühen Phase der Entzündung üben die Makrophagen proinflammatorische Funktionen aus wie die Antigenpräsentation, die Phagozytose und die Produktion inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren. In der proliferativen Phase stimulieren die Makrophagen die Gewebeerneuerung auf direkte und indirekte Weise. Letzteres beinhaltet die Wiederherstellung der EZM und die Neovaskularisierung, die durch Anregung der Fibroblasten und Endothelzellen erfolgt (Delavarya *et al.* 2011). Am Ende der Entzündungsreaktion sterben die Makrophagen ab oder wandern vom Ort der Entzündung zu den drainierenden Lymphknoten (Brancato und Albina 2011).

Mastzellen sind Immunzellen, die auch durch Nicht-Immunprozesse wie akutem Stress aktiviert werden können und an einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen des Nervensystems, der Haut, der Gelenke und auch des Verdauungs- und Herz-Lungen-Systems beteiligt sind (Theoharides und Cochrane 2004). Mastzellen sind spezielle, sekretorische Zellen, die von einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelllinie im Knochenmark gebildet werden und ubiquitär in den Bindegeweben und den Schleimhäuten des Körpers auftreten (Theoharides und Kalogeromitros 2006; Fritsch 2004, S. 33). Am meisten verbreitet sind sie in Regionen, die der Umwelt ausgesetzt sind, wie der Haut, den Atemwegen und dem Verdauungstrakt (Kim *et al.* 2013). In der Haut kommen Mastzellen v. a. im *Stratum papillare* der Dermis vor und sind besonders um Gefäße, Nerven und Hautanhangsgebilde lokalisiert. Ihr Anteil an dermalen Zellen beträgt 2-5 %. Sie sind immobil, langlebig, beinhalten zytoplasmatische Granula und infiltrieren die Haut über die Blutbahn. Ihre Reifung findet unter Einwirkung von Mediatoren benachbarter Zelltypen wie den Fibroblasten und den Keratinozyten statt. Beispiele solcher Mediatoren sind der Stammzellfaktor („stem cell factor“, SCF) und das Zytokin Interleukin-3 (IL-3) (Fritsch 2004, S. 33). Mastzellen beinhalten in ihren Granula eine Vielzahl präformierter Mediatoren wie Histamin, Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase und Heparin. Entzündungsmediatoren können auch *de novo* gebildet werden wie Lipidmediatoren (z. B. Prostaglandin D<sub>2</sub>), Sulfidleukotriene aus der Zellmembran und Zytokine (Payne und Kam 2004; Fritsch 2004, S. 34). Zytokine als Glykoproteine übernehmen entscheidende Funktionen in der Entwicklung, Differenzierung und Regulierung von Immunzellen (O'Shea *et al.* 2002). Auf der Zellmembran der Mastzellen befinden sich hochaffine IgE-Rezeptoren, die durch die Bindung richtiger Antigene aktiviert werden und eine Freisetzung der Mediatoren aus den Granula bewirken. Diese sog. Degranulation ist eine der Hauptfunktionen von Mastzellen und kann nicht nur von IgE-

abhängigen Immunmechanismen, sondern auch von unspezifischen Stimuli wie mechanische Reize, Hitze, bakterielle und nicht-bakterielle Toxine und von verschiedenen endogenen Mediatoren ausgelöst werden (Payne und Kam 2004). Kim *et al.* (2009) wies u. a. eine erhöhte Mastzellzahl und Tryptase-Expression bei hitzestimulierter oder mit UV-Licht bestrahlter Haut nach und konnte so den Einfluss der Mediatoren aktivierter Mastzellen auf eine chronische Entzündungsreaktion zeigen (Kim *et al.* 2013). Bei der Degranulation fusionieren die Granula mit der Zellmembran und schütten ihren Inhalt in den Interzellularraum aus (Fritsch 2004, S. 34). Die Freisetzung der Mediatoren hat regulatorische Funktionen bei allergischen und inflammatorischen Erkrankungen. Sie nimmt Einfluss sowohl auf die Angiogenese durch die Steigerung der Gefäßpermeabilität und die Kontraktion glatter Muskelfasern als auch auf die Wundheilung und Melanogenese durch das Anlocken weiterer Immunzellen (Fritsch 2004, S. 34; Schütt und Bröker 2006, S. 3; Theoharides und Kalogeromitros 2006).

## 1.5 Postinflammatorische Hyperpigmentierung

Die postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH) zählt zu eine der häufigsten Ursachen für eine Veränderung der normalen Hautfarbe, einer sog. Dyspigmentierung (Lacz *et al.* 2004). Andere häufige und ebenfalls erworbene Hyperpigmentierungen sind u. a. Melasma, eine während der Schwangerschaft und unter Einnahme oraler Hormonpräparate auftretende Pigmentierungsstörung, und der Altersfleck (*Lentigo Senilis*) (Plensdorf und Martinez 2009). Die PIH kann als Folge von Hautentzündungen wie entzündliche Dermatosen, Infektionen, Akne, Allergien und Reaktionen auf bestimmte Arzneimittel und chemische Peelings oder als Folge von mechanischen Verletzungen wie z. B. Verbrennungen auftreten (Eimpunth *et al.* 2012).

Der Pigmentüberschuss kann sich in Form von Flecken definiert oder diffus äußern und entweder auf kleine Regionen beschränkt sein oder weitläufig in Erscheinung treten (Ruiz-Maldonado und Orozco-Covarrubias 1997). Es wird vermutet, dass je nach Ursache und Schweregrad der Entzündung das Ausmaß der Hyperpigmentierung variiert (Eimpunth *et al.* 2012). Die Farbäußerung der PIH hängt von der Lokalisation des überschüssigen Melanins ab. Daher wird allgemein zwischen epidermaler Hypermelanose und einer damit assoziierten dunkelbraunen Fleckenbildung und dermalen Hypermelanose mit dem charakteristischen klinischen Erscheinungsbild grau-blauer Verfärbungen unterschieden (Lamel *et al.* 2013).

Die PIH tritt in allen Altersgruppen, geschlechtsunabhängig und bei allen Hauttypen auf, findet sich jedoch überwiegend in stärker pigmentierten Individuen mit Fitzpatrick Phototyp IV bis VI wieder. Dies betrifft speziell Asiaten, Afrikaner, Südamerikaner und amerikanische Ureinwohner (Lacz *et al.* 2004; Nordlund *et al.* 2008). Die PIH kann Monate oder Jahre lang bestehen bleiben (Plensdorf und Martinez 2009).

Auf zellulärer Ebene äußert sich die PIH durch eine Zunahme der Melaninproduktion und/oder durch eine abnormale Melaninverteilung. Es ist nicht bekannt, inwieweit Veränderungen der Melanozyten relevant sind. Diese sind bisher speziell bei exogen hervorgerufener PIH untersucht worden. So ist bekannt, dass z. B. bei der allergischen Kontaktdermatitis, ein möglicher Auslöser der PIH, die Anzahl an aktiven, epidermalen Melanozyten zunimmt. Ebenso nehmen die Zellkörpergröße der Melanozyten und die Länge ihrer Dendriten (Zytoplasma-Verzweigungen) zu (Imokawa und Kawai 1987; Papa und Kligman 1965). Des Weiteren stellte Burge *et al.* (1987) nach der histologischen Untersuchung von Narben, die durch Gefrierverletzungen an einem Meerschweinchenmodell hervorgerufen wurden, eine epidermale Hyperpigmentierung mit erhöhter Melanozytenzahl fest. Aus diesem Grund wies Lamel *et al.* (2013) darauf hin, dass die geringe Anzahl der bisherigen Studien, in denen die quantitativen Veränderungen in Melanozytendichte bei entzündlichen Hautprozessen evaluiert wurden, erweitert werden sollte.

Allgemein ist bei der epidermalen PIH bekannt, dass eine Zunahme der Melaninsynthese und des Melanintransfers zu den umliegenden Keratinozyten stattfindet. Auslöser hierfür ist die Entzündungsantwort in der Epidermis, bei der die Arachidonsäure eine entscheidende Rolle spielt, v. a. nach ihrer Oxidation zu Prostaglandinen und Leukotrienen (Lacz *et al.* 2004). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass diese Mediatoren humane, epidermale Melanozyten stimulieren und sie zu dendritischer Proliferation und Größenwachstum anregen (Tomita *et al.* 1992). Der zelluläre Mechanismus, der zu einer dermalen PIH führt, ist bisher kaum beschrieben, was zu verschiedenen Theorien bezüglich Einwanderung von Melanin in die Dermis führt. Einerseits könnte eine Zerstörung der epidermalen Basalzellschicht stattfinden, wodurch die entarteten, basalen Keratinozyten und Melanozyten mit ihrem Melanin in die Dermis gelangen und von Makrophagen phagozytiert werden. Andererseits könnten Melanosome durch die Dendriten der Melanozyten direkt in die Dermis eingeschleust werden. Eine weitere Theorie ist, dass Makrophagen in die Epidermis migrieren, wo sie Melanosome phagozytieren, um danach wieder in die Dermis zurückzukehren (Lacz *et al.* 2004; Masu und Seigi 1983).

Behandlungsmethoden sind in erster Linie die Heilung der zugrunde liegenden Entzündung und die Prävention weiterer Hyperpigmentierungen, z. B. durch Anwendung von Sonnencremes mit hohem Lichtschutzfaktor. Zur Behandlung werden topische, aufhellende Mittel eingesetzt wie z. B. Hydroquinone, Azelainsäure, Kojisäure, Süßholz-Extrakte und Retinoide. Auch chemische Peelings und die Lasertherapie zählen zu den Behandlungsmöglichkeiten (Callender *et al.* 2011). Obwohl einige therapeutische Alternativen für die epidermale PIH zur Verfügung stehen, dauert es oft Monate bis zu einer erfolgreichen Depigmentierung (Eimpunth *et al.* 2012). Außerdem ist die Inhibierung der Pigmentierung in den seltensten Fällen reversibel (Yamaguchi *et al.* 2007). Alternative Behandlungen, die einen besseren und langanhaltenden Erfolg garantieren, sind Ziel der kosmetischen Forschung.

## 2 Zielsetzung

Ein regelmäßiges Hautbild als Zeichen von Gesundheit und Jugend kann von unterschiedlichen Pigmentierungsstörungen unterbrochen werden. Mit der Anwendung von Aufhellungsprodukten ist es bisher möglich, Fehlpigmentierungen zu reduzieren. Dennoch bedarf es für optimale Behandlungsmethoden eines besseren Verständnisses grundlegender, molekularbiologischer Mechanismen.

Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung einer erworbenen Fehlpigmentierung, der sog. postinflammatorischen Hyperpigmentierung (PIH). Sie ist eine reaktive Hypermelanose, die durch eine zugrunde liegende Entzündungsreaktion in Erscheinung tritt. Obwohl die PIH kein medizinisches Problem darstellt, kann sie speziell bei exponierten Hautarealen zu einer psychischen Belastung für die Betroffenen werden. Es wurde eine interne *in vivo*-Studie an einem Probandenkollektiv durchgeführt, um in den anschließenden Untersuchungen der Hautproben Erkenntnisse über grundlegende Mechanismen der PIH zu erlangen. Diese sollten zukünftig Ansatzpunkte für die Vermeidung oder Behandlung einer solchen Fehlpigmentierung liefern. In der vorliegenden Arbeit wurden epidermale und dermale Veränderungen hinsichtlich des Zellstatus an Hautproben näher analysiert. Die immunhistologischen *ex vivo*-Untersuchungen umfassten die Identifizierung von Myofibroblasten und den Nachweis von möglichen Integritätsveränderungen der Basalmembran. Ein Hauptfokus lag in der quantitativen Erfassung der proliferativen Zellpopulation und verschiedener Zelltypen. Die Zellquantifizierung schloss die pigmentierungsrelevanten, epidermalen Melanozyten ein sowie Zellen des dermal-entzündlichen Infiltrats. Die Charakterisierung des Immunzellstatus baute auf internen Erkenntnissen der Beiersdorf AG auf. Weitere Untersuchungen umfassten die dermale Zellpopulation des Endothels und die Fibroblasten.

### 3 Materialien

#### 3.1 Geräte

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellernachweis.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
<b>Dako Autostainer Plus<sup>®</sup></b>	DakoCytomation (USA)
<b>Eindeckautomat</b> Leica CV5030	Leica, Wetzlar
<b>Eismaschine</b> ZBE 30-10	Ziegra-Eismaschinen, Iserhagen
<b>Etikettendrucker</b>	DakoCytomation (USA)
<b>Fluoreszenzmikroskop</b> Axiovert S100 mit AxioVision 4.6.3.0 Software	Zeiss, Göttingen
<b>Fluoreszenzmikroskop</b> Biozero <sup>®</sup> BZ8000	KEYENCE, Neu-Isenburg
<b>Konfokales Laserrastermikroskop (CLSM) SP5</b>	Leica, Mannheim
<b>Kryostat</b> Leica CM3050S	Leica, Wetzlar
<b>Kühlgerät</b> -80 °C Ultra Low Temperature Freezer	New Brunswick Scientific (USA)
<b>Kühlgerät</b> Kühlkombination -20 °C, +4 °C handelsübliches Gerät	
<b>Lichtmikroskop</b> CK2	Olympus, Japan
<b>Minischüttler</b> Vortex MS1	IKA, Staufen
<b>Panoramic MIDI<sup>®</sup> ehem. MIRAX<sup>®</sup>-Scanner</b>	Zeiss, Göttingen und 3DHISTECH , Budapest (Ungarn)
<b>Pipetten</b> Eppendorf Reference 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
<b>Reinstwasseranlage</b> Milli-Q academic	Millipore, Eschhorn
<b>Zentrifuge</b> mini Spin	Eppendorf, Hamburg
<b>Zentrifuge</b> Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<b>Zentrifuge</b> Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
<b>Deckgläschen</b>	Menzel-Gläser, Braunschweig
<b>Hydrophober Stift</b> , Elite PAP Pen	Bio Trend, Köln
<b>Kryoröhrchen</b> KryoVials <sup>™</sup> 2 ml	Nunc, Wiesbaden
<b>Messröhrchen</b> für Autostainer Plus	Dako Deutschland, Hamburg
<b>Mikroreaktionsgefäße</b> 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
<b>Objektträger</b> SuperFrost Ultra Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
<b>Pipettenspitzen</b> , gestopft	Eppendorf, Hamburg
<b>Stanze</b> für Explantate (4mm)	Stiefel, Offenbach
<b>Stahlklingen</b> (Kryostat)	Leica, Bensheim
<b>Steriles Biopsiebesteck</b> (Scheren, Pinzetten)	Aesculap, Hammacher

### 3.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
<b>4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI); 1:3000</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Aceton</b>	Merck, Darmstadt
<b>Antikörper-Verdünnungspuffer (AKV)</b>	DCS-Diagnostics, Hamburg
<b>BSA-Block</b>	Candor, Wangen
<b>Common Antibody (AB) Diluent (HK 156-5KE)</b>	Biogenex (USA)
<b>IHC Waschpuffer (20x), 2500 ml</b> TBS mit 0,05 % Tween 20, pH 7,6	DCS-Diagnostics, Hamburg
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b> w/o (1x)	PAA, Linz (Österreich)
<b>Eindeckmedium „Mounting Medium CV Ultra“</b>	Leica, Nussloch
<b>Ethanol, absolut</b>	Merck, Darmstadt
<b>Isopentan</b>	Merck, Darmstadt
<b>Kryo-Gel (Gefriereinbettmedium): TissueTek®</b>	Leica, Bensheim
<b>Levamisol Lösung</b>	Dako, Glostrup (Dänemark)
<b>Link-Diluent (HK 165-5KE)</b>	Biogenex (USA)
<b>Mayer's® Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 2</b>	Sigma-Aldrich, München
<b>Xylol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ziegennullserum</b>	Jackson, West Grove (USA)

### 3.4 Kits

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
<b>PermaRot-2-Komponenten-Kit</b> bestehend aus 3 ml PermaRot-Konzentrat 100 ml gebrauchsfertigen Substratpuffer 1 leere Flasche (7 ml mit Tropfeinsatz)	DCS Diagnostics, Hamburg
<b>DAB® Away-Kit (DAB</b> Chromogenentfernungssystem) bestehend aus 25 ml DAB AWAY 1 25 ml DAB AWAY 2 250 ml Decolorizer	Dako Deutschland, Hamburg
<b>Super Sensitive IHC Detection System (Link Label System)</b> bestehend aus den Verdünnungsmitteln MultiLink® (HK268) und Concentrated Alkaline Phosphatase Label® (konzentriertes Alkalische Phosphatase Label) (HK321)	BioGenex, Kalifornien (USA)

### 3.5 Antikörper und Isotypenkontrollen

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und deren etablierte Verdünnungen für die Methoden Immunfluoreszenz (IF) und Immunhistochemie (IHC) sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Alle übrigen Antikörper, die etabliert wurden, sind in einer weiteren Tabelle im

Anhang zu finden (vgl. Anhang 9.1).

**Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.**

<b>Bezeichnung Primärantikörper</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Verdünnung - auf Kryoschnitte etabliert</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr.</b>
anti-alpha smooth muscle Actin (anti- $\alpha$ SMA)	polyklonal	Kaninchen	IF	1:100	Abcam, Cambridge (UK)	ab5694
anti-alpha smooth muscle Actin (anti- $\alpha$ SMA), Klon 1A4	monoklonal	Maus	IF	1:500	Abcam, Cambridge (UK)	ab7917
anti-type IV Kollagen	polyklonal	Ziege	IF	1:200	Millipore, Kalifornien (USA)	AB769
anti-Human Kollagen IV, Klon CIV 22	monoklonal	Maus	IF	1:200	Dako, Glostrup (Dänemark)	M0785
anti-Kollagen VII, Klon LH7.2	monoklonal	Maus	IF	1:1000	Abcam, Cambridge (UK)	ab6312
anti-Kollagen VII	polyklonal	Kaninchen	IF	1:400	Abcam, Cambridge (UK)	ab93350
anti-Human CD14, Klon TÜK4	monoklonal	Maus	IF IHC	1:10 1:20	Dako, Glostrup (Dänemark)	M0825
anti-CD31, Klon EPR3094	monoklonal	Kaninchen	IF IHC	1:500 1:200	Abcam, Cambridge (UK)	ab76533
anti-CD31, Klon JC70A	monoklonal	Maus	IF IHC	1:400 1:200	Dako, Glostrup (Dänemark)	M0823
anti-CD45	polyclonal	Kaninchen	IF IHC	1:400 1:1500	Abcam, Cambridge (UK)	ab10599
anti-CD68, Klon KP1	monoklonal	Maus	IF IHC	1:200 1:600	Abcam, Cambridge (UK)	ab955
anti-Human	polyklonal	Kaninchen	IF	1:600	Dako,	A4502

CD117/c-Kit			IHC	1:1000	Glostrup (Dänemark)	
anti-Fibroblast Surface Protein (FSP), Klon 1B10	monoklonal	Maus	IF IHC	1:1000 1:2000	Abcam, Cambridge (UK)	ab11333
anti-Ki-67, Klon SP6	monoklonal	Kaninchen	IHC	1:300	Abcam, Cambridge (UK)	ab16667
anti-Laminin	polyklonal	Kaninchen	IF	1:200	Abcam, Cambridge (UK)	ab11575
anti-Laminin-5, Klon P3E4	monoklonal	Maus	IF	1:400	SantaCruz, Heidelberg	sc- 13587
anti-Mast Cell Tryptase, Klon AA1	monoklonal	Maus	IF IHC	1:200 1:8000	Abcam, Cambridge (UK)	ab2378
anti-Human MCAM/CD146	monoklonal	Maus	IF	1:500	R & D Systems, Abingdon (UK)	MAB93 2
anti-Melanoma (MART-1), Klon HMB45+ DT101+ BC199	monoklonal	Maus	IF IHC	1:600 1:200	Abcam, Cambridge (UK)	ab732
anti-TRP1, Klon TA99	monoklonal	Maus	IF IHC	1:1000 1:1000	Abcam, Cambridge (UK)	ab3312
anti-TRP1	polyklonal	Kaninchen	IF IHC	1:500 1:1000	Abcam, Cambridge (UK)	ab83774

Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.

Bezeichnung Sekundär- antikörper	Verdünnung	Spezies	Anregungs- -maximum [nm]	Emissions- -maximum [nm]	Hersteller	Bestell- nr.
Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG (H+L)	1:1000	Ziege	495	519	Invitrogen, Karlsruhe	A-11001
Alexa Fluor 488 anti- Kaninchen IgG (H+L)	1:1000	Ziege	495	519	Invitrogen, Karlsruhe	A-11034
Alexa Fluor 546 anti-Maus IgG (H+L)	1:1000	Ziege	556	573	Invitrogen, Karlsruhe	A-11003
Alexa Fluor 546 anti- Kaninchen IgG (H+L)	1:1000	Ziege	556	573	Invitrogen, Karlsruhe	A-11035

Alexa Fluor 647 anti-Maus IgG (H+L)	1:1000	Ziege	650	668	Invitrogen, Karlsruhe	A-21236
Alexa Fluor 647 anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:1000	Ziege	650	668	Invitrogen, Karlsruhe	A-21245
Alexa Fluor 647 anti-Ziege IgG (H+L)	1:1000	Esel	650	668	Invitrogen, Karlsruhe	A-21447
Cy5 anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:200	Ziege	649	670	Abcam, Cambridge (UK)	ab97077

Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Isotypenkontrollen.

Bezeichnung Isotypenkontrolle	Verdünnung	Spezie	Hersteller	Bestellnr.
IgG1	Einstellung auf die gleiche Maus-IgG1-Konzentration wie der Test-Antikörper	Maus	Dako, Glostrup (Dänemark)	X0931
IgG2a	s.o.	Maus	Dako, Glostrup (Dänemark)	X0943
Immunglobulin Fraktion (normal)	s.o.	Kaninchen	Dako, Glostrup (Dänemark)	X0903
Immunglobulin Fraktion (Solid-Phase Absorbed)	s.o.	Kaninchen	Dako, Glostrup (Dänemark)	X0936
FLEX <sup>®</sup> Negativkontrolle; Cocktail von Maus IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgM Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus <sup>®</sup> )	s.o.	Maus	Dako, Glostrup (Dänemark)	IS750
FLEX <sup>®</sup> Negativkontrolle; Immunglobulin-Fraktion aus Serum von nicht immunisierten Kaninchen, solid phase absorbed Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus <sup>®</sup> )	s.o.	Kaninchen	Dako, Glostrup (Dänemark)	IS600

### 3.6 Software

Tabelle 3.8: Übersicht der verwendeten Software.

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
<b>Citavi<sup>®</sup> Team 3.4.0</b>	Literaturverwaltung	Swiss Academic Software GmbH, Zürich (Schweiz)
<b>IHC AutoStan<sup>®</sup> am Dako Autostainer Plus Universal Staining System<sup>®</sup></b>	Zur Programmierung eines automatisierten Färbelaufs (IF oder IHC): - Erstellung und Bearbeitung von Protokollen - Eingabe von Objektträgerinformationen - Reagenzienverwaltung	Dako Deutschland, Hamburg
<b>GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 und 6</b>	Zur Erstellung wissenschaftlicher Grafiken und Durchführung statistischer Auswertungen	GraphPad Software, Inc., San Diego (USA)
<b>HistoQuant<sup>®</sup> 1.15</b>	Optionales Quantifizierungsmodul für den Panoramic Viewer <sup>®</sup> ; zur Segmentierung und Messung digitalisierter, histologischer Schnitte auf Objektträgern basierend auf den Farben der Zellkompartimente; ermöglicht Quantifizierung bezogen auf die Fläche	3DHISTECH Ltd., Budapest (Ungarn)
<b>ImageJ<sup>®</sup></b>	Quantifizierung des Melaningehalts	Wayne Rasband (NIH), Bethesda (USA)
<b>KEYENCE BZ-II<sup>®</sup> Viewer und Analyzer</b>	Digitalisierte Mikroskopie und Bildbearbeitungsprogramm	KEYENCE, Neu-Isenburg
<b>Microsoft Office<sup>®</sup> 2007</b>		Microsoft Corporation (USA)
<b>NuclearQuant<sup>®</sup> 1.15</b>	Optionales Quantifizierungsmodul für den Panoramic Viewer <sup>®</sup> Zur Detektion und Trennung markierter Zellkerne auf digitalisierten histologischen Schnitten; ermöglicht Quantifizierung bezogen auf die Anzahl der Zellkerne und zusätzlich Klassifizierung basierend auf der Intensität der IHC-Färbung	3DHISTECH, Budapest (Ungarn)
<b>Panoramic MIDI<sup>®</sup> (Panoramic Digital Slide Scanner)</b>	automatisierter Scanprozess (IF und IHC) und diesem vorausgehende, notwendige Einstellungen von Scaneigenschaften zur richtigen Digitalisierung und Archivierung histologischer Schnitte	3DHISTECH, Budapest (Ungarn)

---

<b>Panoramic Viewer® 1.15.2</b>	Hauptsoftware zur Bearbeitung und Visualisierung der digitalisierten, histologischen Schnitte durch die Panoramic MIDI®-Mikroskopie und zur Vorbereitung für Quantifizierungen	3DHISTECH, Budapest (Ungarn)
---------------------------------	--	------------------------------

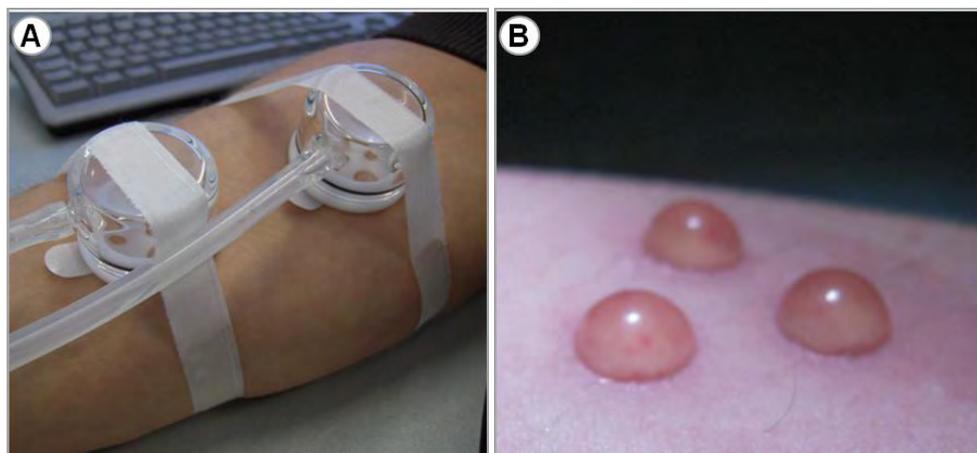
---

## 4 Methoden

### 4.1 Gewinnung des Probenmaterials und Studiendesign

Das Probenmaterial, an welchem die für die vorliegende Arbeit notwendigen Analysen vollzogen wurden, stammt aus einer durch die Beiersdorf AG initiierten und durchgeführten klinischen Studie. Diese *in vivo/ex vivo*-Studie zur Erforschung von Dyspigmentierungen humaner Haut am Beispiel der postinflammatorischen Hyperpigmentierung wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (Bearbeitungsnummer: PV3424) geprüft und zugelassen. Dabei wurde *in vivo* durch das Ziehen von Saugblasen (SB) eine postinflammatorische Hyperpigmentierung der Hautareale induziert. Die Saugblasenmethode, die in dieser Studie am unteren Rücken der Probanden angewandt wurde, basiert auf Anlegen eines geringen Unterdrucks. Dadurch bilden sich gleich große SB aus, die aus der abgelösten Epidermis und einen mit Saugblasenflüssigkeit gefüllten Hohlraum bestehen. Die Saugblasendächer wurden abgenommen und in den darauffolgenden Wochen konnte die Entnahmestelle auf natürliche Weise regenerieren, wobei sich nach und nach eine sichtbare Pigmentierung (Hyperpigmentierung) entwickelte.

Neben dem SB-Areal wurde jeweils ein weiteres, unbehandeltes Hautareal, welches als Kontrolle diente, zur Untersuchung herangezogen.



**Abbildung 4.1: Darstellung der *in vivo*-Methode für das Ziehen von Saugblasen.**

(A) Nach der Befestigung eines Drei-Loch-Saugblasentopfes am entsprechenden Hautareal des Probanden wird ein Unterdruck angelegt; (B) Nach Anlegen des Unterdrucks kommt es zur Saugblasenbildung mit abgelöster Epidermis und interstitieller Flüssigkeit. (Quelle: in Anlehnung an Smuda 2013)

In vier unterschiedlichen, zeitlichen Abständen nach dem Ziehen der SB wurden Gewebezyylinder in Form von Stanzbiopsien aus den SB-Arealen und den Referenzarealen entnommen und für anschließende Untersuchungen kryofixiert. Diese Stanzbiopsien wurden zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach der SB-Entnahme bei acht Probanden gewonnen. Bei acht weiteren erfolgte die Entnahme nach zwei, vier und 16 Wochen. In Kooperation mit dem Universitätsklinikum

Hamburg-Eppendorf wurden aus dem kryokonservierten Gewebe der Hautbiopsien 5 µm dicke Dünnschnitte angefertigt. Jeweils drei davon wurden auf einen Objektträger (OT) übertragen. Die Hautdünnschnitte wurden als Stufenschnitte angefertigt und wiesen innerhalb des Gewebes einen Abstand von ca. 30 µm zueinander auf. Sie sind Ausgangspunkt für jene Untersuchungen, die mögliche Ansatzpunkte zur Modulation und Behandlung der PIH liefern sollen.

## 4.2 Histologie

Die Histologie als Zweig der Anatomie, der sich mit den mikroskopischen Strukturen von Geweben beschäftigt, bietet die Möglichkeit, die Morphologie und Zusammensetzung des Gewebes durch die Entnahme von Biopsien zu untersuchen (Marieb und Hoehn 2007, G. 9). Eine Ergänzung zu den üblichen histologischen Methoden ist die Immunhistologie, welcher eine durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene Immuneinheit zugrunde liegt. Die „histologische Färbung“ deutet immer auf die Methode der Schnittfärbung hin, bei der ein Farbstoff direkt oder indirekt an Gewebestrukturen gebunden wird (Mulisch und Welsch 2010, S. 181).

### 4.2.1 Die Probenfixierung

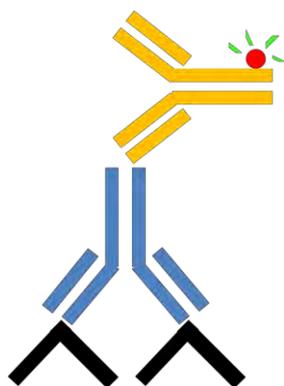
Als Fixierung des Probenmaterials bezeichnet man zum Einen das Einfrierverfahren des Gewebes, welches direkt nach Entnahme der Biopsie erfolgt, und zum Anderen die Vorbereitung der bereits angefertigten Gefrierdünnschnitte für nachfolgende, immunhistologische Färbemethoden.

In der PIH-Studie wurden die gestanzten Hautexplantate in Einbettmedium eingebettet, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Probenaufbereitung gelagert. Durch diese Gefrierfixierung, eine physikalische Fixierungsmethode, werden die Proben nahezu naturgetreu stabilisiert und eine Kristallisierung von Flüssigkeiten, die die Zellstruktur schädigen könnte, wird weitestgehend verhindert. Durch die Anwendung von chemischen Fixativen oder Gefrierschutzmitteln können die Gefrierergebnisse der Proben verbessert werden (Beiersdorf AG 2013). Vor der Schnittfärbung erfolgte zur Stabilisierung der Proteine eine weitere Fixierung, die Nachfixierung, für 10 min in Aceton. Dies verhindert eine Autolyse durch die Inaktivierung lysosomaler Enzyme und hemmt das Wachstum von Bakterien und Pilzen. Nichtsdestotrotz ist bei der weiteren Handhabung der Proben Vorsicht geboten, da die Entstehung von Artefakten während des Prozessierens durch die unvollständige Stabilisierung mit Aceton nicht vollständig ausgeschlossen werden kann (Boenisch 2001, S. 18-19). Gleichzeitig hat die milde chemische Fixierung mit Aceton den Vorteil, dass die Antigene ihre native Form zum Großteil beibehalten und der Antikörper das Protein erkennen kann (Murphy *et al.* 2009, S. 946). Somit muss ein Weg gefunden werden, mit dem die sich widersprechenden Ansprüche des Erhalts der Gewebemorphologie und des Erhalts der nativen

Proteinstruktur miteinander vereinbart werden können (Warford *et al.* 2004). Im Allgemeinen ist zu beachten, dass die Art der Fixierung und Vorbehandlung einen Einfluss auf die Färbung und Haltbarkeit der Probe hat (Mulisch und Welsch 2010, S. 181).

#### 4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunmarkierung steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, bei welchen unterschiedliche Markersubstanzen zum Einsatz kommen. Bei der Fluoreszenzmarkierung, die ein für diese Arbeit relevantes Detektionssystem darstellt, handelt es sich um eine indirekte Zwei-Schritt-Methode, in der ein Primärantikörper an das zu lokalisierende Antigen und ein gelabelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet (Luttmann *et al.* 2006, S. 166). Da der Primärantikörper in einer bestimmten Tierspezies produziert wurde, muss der Sekundärantikörper gegen diese Spezies gerichtet sein. Die Markierung des Sekundärantikörpers ist bei der IF ein Fluoreszenzfarbstoff, das sog. Fluorochrom oder Fluorophor. Durch die damit einhergehende Erhöhung der absoluten Anzahl an Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern pro Antigen-gebundenen Primärantikörper wird die Sensitivität des Nachweises gesteigert. Zusätzlich wird eine Mehrfachmarkierung durch die Kombination unterschiedlich konjugierter Sekundärantikörper ermöglicht (Mulisch und Welsch 2010, S. 396). Eine Darstellung der indirekten Immunmarkierung findet sich in Abbildung 4.2.



**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Zwei-Phasen-Methode der indirekten Immunmarkierung.**

Ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Sekundärantikörper bindet an den freien, antigenspezifischen Primärantikörper. Die Möglichkeit, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, ist gegeben, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt. In Schwarz wird das Antigen, in Blau der Primärantikörper und in Orange der Sekundärantikörper mit seinem gebundenen Fluorophor (rot) dargestellt. (Quelle: in Anlehnung an Boenisch 2001, S. 26)

Zum Großteil wurde die IF-Markierung aufgrund des großen Probenumfangs automatisiert mit dem Dako Autostainer Plus<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.1), einem programmierbaren Universalfärbeautomaten der Firma Dako, durchgeführt. Zur Ermittlung optimaler Antikörperkonzentrationen wurde die Färbung auch manuell vollzogen. Beide Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen können Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6 entnommen werden.

#### **4.2.2.1 Manuelle Probenfärbung**

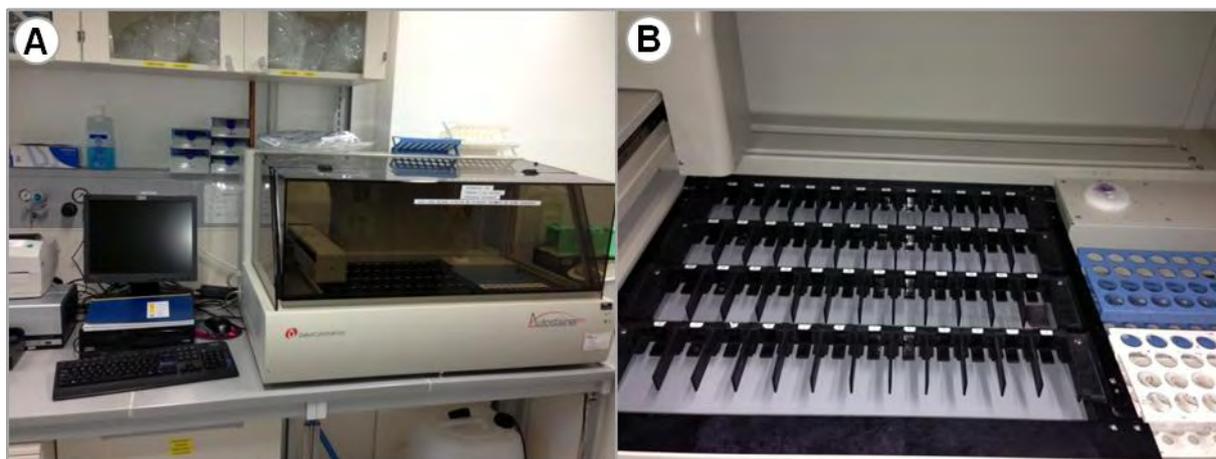
Nach der Fixierung wurden die Kryoschnitte in einer Feuchtkammer dreimal für jeweils 10 min in Phosphatpuffersalzlösung (PBS) gewaschen. Nach den Waschsritten und einer Umrandung der Proben mit einem Fettstift als Flüssigkeitsbarriere folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blocken. Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 1 % BSA in PBS oder in Antikörper-Verdünnungspuffer (AKV), einer gebrauchsfertigen Pufferlösung mit Detergens und einem Transportprotein, angesetzt. Die Hautdünnschnitte wurden damit bedeckt und für 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Diesem Vorgehen folgten erneut drei Waschschrirte mit PBS für je 10 min. Der Sekundärantikörper wurde bei lichtarmer Umgebung in einer Verdünnung von 1:1000 in AKV angesetzt, auf die Proben appliziert und für 1 h lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 min mit PBS gewaschen und 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), ein Fluoreszenzfarbstoff zur Zellkernfärbung, wurde in AKV 1:3000-1:5000 verdünnt. Der Inkubation mit DAPI für 1 min schlossen sich die drei letzten Waschschrirte an, in denen die OT für 10 min in einen Behälter mit PBS überführt wurden. Schließlich wurden die Proben kurz in vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) eingetaucht und über Nacht im Dunkeln zum Trocknen ausgelegt. Am nächsten Tag konnten sie mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen zwecks besserer Handhabung, Konservierung und Lagerung im Eindeckautomaten von Leica (siehe Tabelle 3.1) eingedeckt werden.

#### **4.2.2.2 Automatisierte Probenfärbung**

Bei einem großen Probenumfang wurde auf das automatisierte Prozessieren von Kryoschnitten mit dem Dako Autostainer Plus<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.1) als Ersatz für die manuelle Färbemethode zurückgegriffen. Gründe dafür waren nicht nur der relativ schnelle Durchsatz vieler Proben und die daraus resultierende Zeitersparnis, sondern v. a. die verbesserte Reproduzierbarkeit der Färbungen. Alle Proben konnten unter den exakt gleichen Bedingungen prozessiert werden. Dies ermöglichte den Vergleich der gefärbten Proben untereinander, was eine Grundvoraussetzung für die weitere Analyse und Interpretation des Expressionsprofils des Gewebes darstellte. Als Nachteile der automatisierten Färbemethode sind die Anschaffungskosten und die laufenden Kosten zu betrachten, denn Universalfärbeautomaten setzen für ihre richtige Handhabung die Verwendung speziell entwickelter Reagenzien voraus (Warford *et al.* 2004).

Der Färbeautomat wird auch als „offenes System“ bezeichnet, da Reagenzien und Protokolle unterschiedlichster Art verwendet werden können. Die OT befinden sich in horizontaler Position und die Reagenzien werden von teflonbeschichteten Pipetten bei RT auf die Gewebeschnitte appliziert (Boenisch 2001, S. 39). Die Eingaben unterschiedlicher Färbeprotokolle und die Programmierungen

des Färbelaufs können an einer angeschlossenen Computerstation vorgenommen werden. Somit ermöglichen der genannte Aufbau und die Software sowie die Anwendung der geeigneten Reagenzien die simultane und, falls erforderlich, unterschiedliche Färbung vieler Schnitte (DakoCytomation 2003). Der Dako Autostainer Plus<sup>®</sup> kann maximal 48 OT pro Färbelauf bearbeiten (siehe Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Geräteaufbau des Universalfärbeautomaten Dako Autostainer Plus Universal Staining System<sup>®</sup>.**

(A) Die technische Apparatur, in der die histologischen Schnitte mit den entsprechenden Reagenzien und Antikörpern bearbeitet werden, ist mit einer Computerstation verbunden. Diese ermöglicht die Programmierung des Färbelaufs, angefangen von der Eingabe des Färbeprotokolls (schrittweise Abfolge, Tropfvolumen und Inkubationszeit) bis hin zur Eingabe von Objektträgerinformationen und der Benennung der Reagenzien. (B) Im Innenraum des Dako Autostainer Plus<sup>®</sup> beträgt die maximale Kapazität der Ladestation (schwarz) pro Färbelauf 48 OT. Die OT können aufgrund ihres zuvor zugewiesenen Barcodes entweder willkürlich beladen werden oder in chronologischer Reihenfolge nach der Wegstrecke des Scanners. Dieser verfährt, beginnend in der vordersten Reihe, von rechts nach links und dann schlangenartig in die nächsten drei Reihen. Rechts neben der Ladestation befinden sich zwei Ständer. Der vordere (weiß) dient der Beladung der Färbereagenzien und der hintere (blau) der Beladung der Reinigungslösungen.

Bevor der Färbelauf gestartet werden konnte, musste über die Software IHC AutoStan<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.8) ein geeignetes Färbeprotokoll neu erstellt oder ein bereits gespeichertes geladen werden. Die allgemeine Version des Protokolls, welches für die IF-Färbung erstellt wurde, wird aus Tabelle 4.1 ersichtlich.

**Tabelle 4.1: Programmierte Abfolge der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Dako Autostainer Plus<sup>®</sup>.**

Abfolge	Reagenz	Dauer [min]
<b>I. Spülen</b>	PBS	-
<b>II. Blockieren</b>	AKV	20
<b>III. Spülen</b>	PBS	-
<b>IV. Vorbehandeln</b>	AKV	20
<b>V. Spülen</b>	PBS	-
<b>VI. Primärantikörper</b>	in entsprechender Verdünnung in AKV	60
<b>V. Spülen</b>	PBS	-

<b>VI. Waschen</b>	AKV	5
<b>VII. Spülen</b>	PBS	-
<b>VIII. Waschen</b>	AKV	5
<b>IX. Spülen</b>	PBS	-
<b>X. Sekundärantikörper</b>	In entsprechender Verdünnung in AKV	60
<b>XI. Spülen</b>	PBS	-
<b>XII. Waschen</b>	AKV	5
<b>XIII. Spülen</b>	PBS	-
<b>XIV. Kernfarbstoff</b>	DAPI in entsprechender Verdünnung in AKV	1
<b>XIII. Spülen</b>	PBS	-

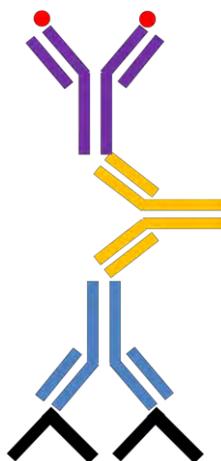
Das gewählte Tropfvolumen pro Reagenz, welches die Pipettiereinheit pro Hautdünnschnitt auftrug, wurde auf 100 µl eingestellt und war ausreichend, um den Schnitt komplett zu bedecken. Zusätzlich beinhaltete das Protokoll die Einstellung, dass dreimal pro OT auf diese Weise verfahren werden soll. Nachdem alle Einstellungen getroffen worden waren, wurde abhängig von der Anzahl der OT die Zeit des Färbelaufs automatisch berechnet, ebenso wie die Waschpuffermenge von PBS, die benötigte Menge von AKV für die Waschschritte und die Volumina der einzusetzenden Antikörper (DakoCytomation 2003). Bevor der Automat mit den OT beladen wurde, wurden die bereits in Aceton fixierten Schnitte mit Barcodes zur Probenidentifizierung versehen. Dem Färbeautomaten wurde eine ausreichende Menge an PBS bereitgestellt. Nachdem die vorgeschriebenen Volumina an AKV und Antikörper in den entsprechenden Reagenzröhrchen vorbereitet und in den Ständer im Innenraum gestellt worden waren, konnte der Färbeautomat mit den OT beladen werden. Nach Programmstart und dem Einscannen der OT wurde die Option zum Spülen der Pumpe mindestens einmal angewählt. Danach wurde der Färbelauf bis zum Ansetzen des Kernfarbstoffes automatisch ausgeführt. An dieser Stelle wurde der Lauf automatisch gestoppt und DAPI unter lichtarmen Bedingungen in AKV angesetzt. Nachdem die letzten Schritte des Laufs beendet waren, wurden die OT kurz in VE-Wasser überführt und für ca. eine halbe Stunde zum Trocknen ausgelegt. Danach konnten die gefärbten und getrockneten Hautdünnschnitte mit dem Eindeckautomaten eingedeckt und über Nacht unter einer lichtgeschützten Abdeckung zum Aushärten ausgelegt werden.

#### 4.2.3 Immunhistochemische Färbung nach der APAAP-Methode

Eine Alternative zur IF für den Nachweis eines Proteins in Gewebeschnitten stellt die IHC dar (Murphy *et al.* 2009, S. 944). Dabei wird ein vorgefertigter, löslicher Enzym-anti-Enzym Immunkomplex als Tertiärreagenz verwendet. Dieser Enzym-Immunkomplex ist notwendig, um ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umzuwandeln, dessen Ablagerungen im Mikroskop direkt zu beobachten sind (Murphy *et al.* 2009, S. 946; Boenisch 2001, S. 27). Die Färbeprozedur beinhaltet

einen unkonjugierten Primärantikörper, einen Sekundärantikörper als Brückenantikörper, den löslichen Enzym-Immunkomplex und die Substratlösung (Boenisch 2001, S. 27).

Die Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode zählt neben der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) Methode zu den Enzym-anti-Enzym Immunkomplex-Techniken, die sehr häufig eingesetzt werden (Luttmann *et al.* 2006, S. 168). Der APAAP-Komplex besteht aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem Antikörper (siehe Abbildung 4.4). Die alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung des verwendeten chromogenen Substrats, in diesem Fall PermaRot (PeR), sodass eine Rotfärbung resultiert. Aufgrund der größeren Anzahl an Enzymmolekülen je gebundenes Antigen kommt es zu einer Signalverstärkung, wodurch diese Methode ihre Eigenschaft der erhöhten Sensitivität erlangt und den Einsatz geringerer Mengen an Primärantikörper ermöglicht (Boenisch 2001, S. 27).



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der indirekten Immunmarkierung mit der APAAP-Methode.**

Der APAAP-Komplex, bestehend aus einem Antikörper (violett) und zwei Molekülen alkalischer Phosphatase (rot), reagiert mit dem Brückenantikörper (orange), der an den Antigen-gebundenen Primärantikörper (blau) bindet. Bei der Zugabe eines Chromogens, z. B. PermaRot, ergibt sich ein Spaltprodukt, das einen roten Farbniederschlag bewirkt. Der Antikörper im APAAP-Komplex (violett) muss aus derselben Spezies stammen wie der Primärantikörper (blau). (Quelle: in Anlehnung an Boenisch 2001, S. 26)

Da die APAAP-Methode in der vorliegenden Arbeit das einzige, angewandte Verfahren zur immunhistochemischen Färbung war, wird mit dem Begriff IHC ausschließlich diese Methode thematisiert.

Die IHC-Färbung wurde rein automatisiert und wie bei der IF-Markierung nach einem im IHC AutoStan<sup>®</sup> angefertigten Protokoll durchgeführt. Dieses kann Tabelle 4.2 entnommen werden.

Tabelle 4.2: Programmierte Abfolge der immunhistochemischen Färbung mit dem Dako Autostainer Plus®.

Abfolge	Reagenz	Dauer [min]
<b>I. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>II. Blockieren</b>	AKV	20
<b>III. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>IV. Vorbehandeln</b>	AKV	20
<b>V. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>VI. Primärantikörper</b>	in entsprechender Verdünnung in AKV	30
<b>V. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>VI. Sekundärreagenz</b>	Link-Diluent mit MultiLink®	20
<b>VII. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>VIII. Tertiärreagenz</b>	Common AB Diluent mit Conc. Label (Alkaline Phosphatase)	20
<b>IX. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>X. Chromogenansatz</b>	PeR-Konzentrat in Substratpuffer mit Levamisol	10
<b>XI. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-
<b>XII. Zusatzreagenz</b>	Mayer's Hämatoxylin-Lösung (Kernfärbung)	3 od. 5
<b>XIII. Spülen</b>	IHC Waschpuffer	-

Wie bereits in Kap. 4.2.2.2 beschrieben wurde, wurde ein Tropfvolumen von 100 µl pro Reagenz und die dreifache Ausführung pro OT gewählt. Ebenso wurde bis zum Ansetzen der Lösungen identisch zur IF-Färbung verfahren.

Für die Spülvorgänge wurde statt PBS ein 20-fach konzentrierter Waschpuffer mit VE-Wasser zu einem einfach konzentrierten verdünnt und eine ausreichende Menge für den Färbelauf sichergestellt. Identisch zur IF-Markierung wurden die Antikörper in der gewünschten Konzentration in AKV angesetzt. Des Weiteren wurden die bei 4 °C aufbewahrten Lösungen des Sekundär- und Tertiärreagenzes in angegebenen Volumina in den Reagenzröhrchen vorbereitet. Die Antikörperlösungen, die Reagenzien, sowie die fertig verfügbare Hämatoxylin-Lösung wurden in definierte Positionen des Dako Autostainer Plus® gestellt. Nach Beladung der OT und deren Benetzung mit Waschpuffer wurde der Lauf gestartet. Die eingesetzte Blockierlösung war auch in diesem Fall der AKV, der unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern und damit die unspezifische Hintergrundmarkierung reduzieren soll. Der Inkubation der Hautschnitte mit einem biotinylierten Sekundärreagenz, dem sog. MultiLink®-Antikörper von BioGenex (siehe Tabelle 3.4), folgte die Inkubation mit dem Tertiärreagenz. Dieses besteht aus vorverdünntem, mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin in PBS mit einem Transportprotein und bindet mit starker Affinität an die Biotinreste auf dem MultiLink®-Antikörper (Biogenex 2011, S. 42). Zum Chromogenansatz legte der Programmlauf automatisch eine Pause ein, in der PeR in einer

Verdünnung von 1:100 im entsprechenden Substratpuffer frisch angesetzt wurde. Auch hier gab das Programm die benötigte Gesamtmenge und die Position des Röhrchens vor. Dem PeR-Puffer-Gemisch wurde zusätzlich je 5 ml ein Tropfen Levamisol-Lösung beigefügt, welche zur Blockierung unspezifischer, endogener alkalischer Phosphatasen diente. Im restlichen Färbelauf wurde der gesamte Antikörper-Enzym-Komplex durch die Inkubation mit dem chromogenen Substrat sichtbar gemacht. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Dünnschnitte für 3-5 min mit Hämatoxylin inkubiert. Die Wahl längerer Inkubationszeiten begründete sich in diesem Fall insbesondere darin, dass für bessere Erfolge der nachfolgenden Quantifizierungsschritte eine stärkere Kernfärbung erforderlich war. Nach dem Ende des Programmlaufs wurden die OT in VE-Wasser gewaschen, um die verbleibende Substratreaktion zu stoppen. Für das Trockenlegen, Eindecken und Aushärten wurde genauso verfahren, wie in Kap.4.2.2.2 beschrieben wurde.

#### 4.2.4 Etablierung der Antikörper

Voraussetzung für eine gute Markierung ist das Einstellen optimaler Antikörperkonzentrationen (Mulisch und Welsch 2010, S. 405). Bei jeder Neubeschaffung von Antikörper, mindestens aber bei jeder neuen Charge, muss durch Tests eine optimale Verdünnung für den Einsatzbereich des Antikörpers gefunden werden (Luttmann *et al.* 2006, S. 174). Als beste und aussagekräftigste Verdünnung gilt jene, bei der positive Zellen klar und deutlich erkennbar gefärbt werden. Gleichzeitig soll der Hintergrund so wenig unspezifisch angefärbt sein wie möglich.

Mit Verdünnungsreihen wurde auch in der vorliegenden Arbeit vorgegangen. Mittels Orientierung an den Herstellerangaben, falls vorhanden, wurden Verdünnungen gewählt, die oberhalb und unterhalb von diesen lagen. Dies bedeutet, dass bei einer Herstellerangabe von z. B. 1:100 zusätzlich etwa drei größere Verdünnungen (z. B. 1:200, 1:500 und 1:1000) und eine kleinere (z. B. 1:50) getestet wurden. In den seltensten Fällen mussten für eine gute Immunmarkierung höhere Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden als angegeben. Um zu einem ausreichend starken Ergebnis zu gelangen, konnte meist stärker verdünnt werden als vom Hersteller empfohlen.

Vorausgesetzt, dass der angeschaffte Antikörper für beide Methoden einsetzbar war, mussten die Antikörperkonzentrationen durch jeweils verschiedene Verdünnungsreihen für die IF- und IHC-Färbung getrennt voneinander optimiert werden. Grund dafür ist der Unterschied in der Sensitivität der beiden Färbeverfahren.

Zur allgemeinen Orientierung gilt, dass monoklonale Antikörper in den Konzentrationen 1-10 µg/ml und polyklonale Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:500 eingesetzt werden können (Mulisch und Welsch 2010, S. 405). Dabei muss ein Kompromiss zwischen einer hohen Antikörperverdünnung, welche eine schwache Hintergrundfärbung aber auch ein schwächeres spezifisches Signal liefert, und einer niedrigen Antikörperverdünnung mit starkem Signal und einer häufig damit einhergehenden starken Hintergrundfärbung gefunden werden (Luttmann *et al.* 2006, S.

174). Andere Möglichkeiten zur Optimierung des Signals stellen die Gewebefixierung, die Umgebungstemperatur und die Inkubationsdauer des Primärantikörpers dar (Boenisch 2001, S. 9). Diese werden allerdings aus folgenden Gründen eher selten bis gar nicht variiert: Wie bereits in Kap. 4.2.1 erwähnt wurde, fordert die Gewebefixierung ebenso nach Kompromissen, da es passieren kann, dass sie einen teilweisen oder völligen Verlust der nativen Proteinstruktur mit sich bringt. Die Epitope sind somit nicht mehr für die Antikörper zugänglich (Warford *et al.* 2004). Durch eine erhöhte Temperatur (37 °C) kann die Inkubationszeit verkürzt werden, allerdings steigt damit das Risiko unspezifischer Wechselwirkungen. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen kann eine Inkubation bei 4 °C über einige Stunden stattfinden. Speziell Antikörper mit niedriger Affinität haben dann ausreichend Zeit an ihre Antigene zu binden. Automatisierte Färbungen erfolgen meistens bei RT, wobei eine ausreichende Feuchtigkeit der Gewebeschnitte während der Inkubation sichergestellt werden muss. Ebenso variabel ist die Inkubationsdauer. Da häufig eine zeitliche Limitierung gegeben ist bzw. ein hoher Probendurchsatz angestrebt wird, sind die Variationsmöglichkeiten beschränkt.

Boenisch (2001) empfiehlt für die Praxis, zuerst die Inkubationsdauer festzulegen und dann die optimale Antikörperverdünnung zu bestimmen. Auf diese Weise wurden die verwendeten Antikörper etabliert (vgl. Kap. 3.5 und Anhang 9.1).

Für die Optimierungsfärbungen wurden entweder kryofixierte Schnitte herangezogen, die für die nachstehenden, quantitativen Untersuchungen unbrauchbar waren, oder es wurden eigens Gefrierdünnschnitte aus Bauch- und Brusthaut am Kryostat Leica CM3050 angefertigt (siehe Tabelle 3.1). Für Letzteres wurden Stanzen aus frischen Hautproben gewonnen und in Isopentan als Kältevermittler eingetaucht und schockgefroren. Die schockgefrorenen Proben wurde entweder bei -80 °C gelagert und später zu Dünnschnitten verarbeitet oder sofort im Gefriereinbettmittel TissueTek<sup>®</sup> von Leica (siehe Tabelle 3.3) eingebettet und am Kryostat geschnitten. Das Einbetten erfolgte am Kryostat, wobei auf die richtige Ausrichtung der Probe sowie auf Luftbläschenbildung innerhalb des TissueTek<sup>®</sup> geachtet wurde. Geschnitten wurde bei einer optimalen Schneidetemperatur von -27 bis -25 °C. Gewebblock und Probenhalter wurden bereits vorher auf ca. -20 °C temperiert. Für das Schneiden wurde die Probe, die zuvor durch Entfernen von überflüssigem TissueTek<sup>®</sup> mit einem Skalpell freigelegt wurde, im Probenhalter im rechten Winkel zum Messer fixiert. Es wurden Einweg-Stahlklingen verwendet, welche bei einem Schneidewinkel von 3°-5° positioniert wurden. Die Schnittdicke wurde auf 4-5 µm eingestellt und nach dem Schneiden bei optimaler Schnittgeschwindigkeit konnten die Schnitte über den Schnittstrecker auf beschichtete SuperFrost Ultra Plus<sup>®</sup> Objektträger (siehe Tabelle 3.2) aufgenommen werden. Diese eignen sich besonders gut für weitere Präparationsschritte wie der Immunfärbung, da sie das Abschwimmen und den damit verbundenen Verlust der Schnitte durch eine elektrostatische Anziehung verhindern (Mulisch und Welsch 2010, S. 160). Danach wurden die Schnitte bei RT getrocknet und bei -20 °C bis zu ihrer Verwendung für die nächste Antikörper-Etablierung gelagert.

Nach der Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration wurde die Isotypenkontrolle zur Identifizierung möglicher unspezifischer Bindungen des Antikörper-Isotyps durchgeführt. Der Antikörper der Isotypenkontrolle besitzt dieselbe konstante Region der schweren Antikörperkette wie der spezifische Antikörper. Er ist jedoch gegen ein Antigen gerichtet, das von der zu untersuchenden Zellpopulation nicht exprimiert wird (Murphy *et al.* 2009, S. 1024). Eine solche Negativkontrolle wurde mit jedem Isotyp der verwendeten Antikörper durchgeführt (siehe Tabelle 3.7) und weder in IHC- noch in IF-Färbungen traten Signale auf.

## 4.3 Mikroskopie

### 4.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero<sup>®</sup> aus der Modellreihe BZ-8000 von KEYENCE (siehe Tabelle 3.1) wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Hautdünnschnitte strukturell untersucht und bildtechnisch aufgenommen. Es wurde das Expressionsprofil bestimmter Proteine auf den postinflammatorischen, hyperpigmentierten Hautproben im Vergleich zur Kontrolle analysiert.

Allgemein handelt es sich beim Biozero<sup>®</sup> BZ-8000 um ein invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrastmikroskop. Die Invertierung wurde speziell für die schnelle und komfortable Inspektion von lebenden Zellen konzipiert. Im Gegensatz zum Auflichtprinzip bestrahlt das Beleuchtungslicht die Probe von unten (KEYENCE Deutschland 2006).

Das Mikroskop ist voll motorisiert (X-Y-Z-Achse, Filterwechsler, optischer Zoom) und überträgt die Daten über eine FireWire-Schnittstelle auf einen Computer, über den das Fluoreszenzmikroskop gesteuert wird. Das Biozero<sup>®</sup> BZ-8000 bietet die drei Betrachtungsarten Hellfeld, Fluoreszenz und Phasenkontrast, zwischen denen mit einem Mausklick umgeschaltet werden kann. Die Betrachtung der Probe findet in einem integrierten Dunkelraum statt, sodass die fluoreszierende Probe durch äußeren Lichteinfluss nicht verblasst. Ebenso wird die Probe durch das automatische Schließen des Shutters für die Fluoreszenzanregung geschützt, sobald die Echtzeit-Betrachtung über den Bildschirm unterbrochen wird. Durch die Möglichkeit maximal vier Filtersysteme simultan einzusetzen, können Bilder, die mit unterschiedlichen Filtern erzeugt werden, am Bildschirm gleichzeitig angezeigt werden. Optional kann auch eine Überlagerung der Kanäle durchgeführt werden (Ruthenberg 2006).

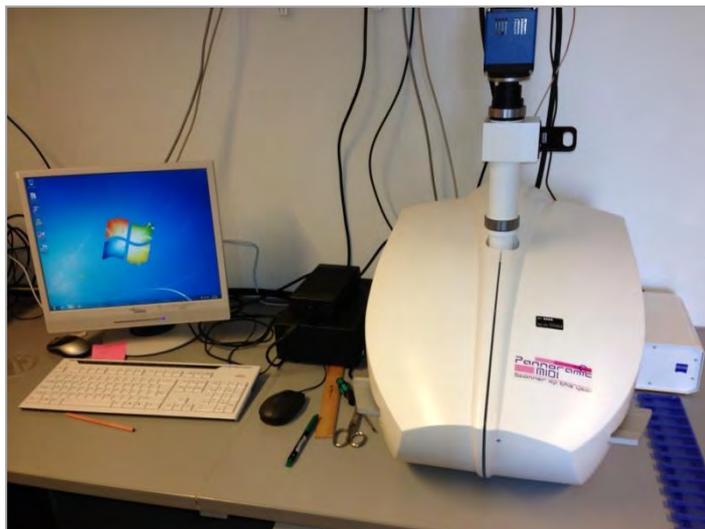
Im Anschluss zur Bildaufnahme wurden die Bilder mit dem Programm BZ-II Viewer<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.8) bearbeitet. Dabei konnten Unschärfen der Bilder effektiv beseitigt werden und Änderungen an den Farbstufen-, Sättigungs- sowie Helligkeitseinstellungen vorgenommen werden. Bei vorangegangener Mosaikaufnahme, einer kachelartigen Einzelaufnahme eines größeren Probenbereichs bzw. des gesamten Hautschnittes, konnten die Einzelbilder zu einem großen Bild zusammengefügt werden.

### 4.3.2 Digitalisierter Scan der immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte

Aufgrund des großen Probenumfangs wurden die immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte für weitere Analysen und Quantifizierungen mit dem Panoramic MIDI<sup>®</sup>-Scanner (siehe Tabelle 3.1) digitalisiert. Ein weiterer Grund neben der raschen Bildaufnahme der großen Probenmenge war die Notwendigkeit, hochaufgelöste Bilder des kompletten Schnittes aufzunehmen, um Quantifizierungen mit den 3DHISTECH-Modulen vornehmen zu können. Diese Module sind nur mit jenen Bildern kompatibel, die über den Panoramic Viewer<sup>®</sup>, der Bildbearbeitungssoftware des Panoramic MIDI<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.8), geladen und bearbeitet werden können.

Der Panoramic MIDI<sup>®</sup>-Scanner ist einer von drei für die Histologie entwickelten, automatisierten Systemplattformen des Unternehmens 3DHISTECH. Anstelle des Mikroskops wird die Probe hochaufgelöst eingescannt, digitalisiert und archiviert. Einen solchen Datensatz bezeichnet man als „Digital Slide“ (Carl Zeiss Jena GmbH 2004).

Der in Abbildung 4.5 dargestellte Panoramic MIDI<sup>®</sup>-Scanner verfügt über einen horizontalen Scan-Mechanismus, der in einem Arbeitsgang ohne Benutzereingriff bis zu 12 OT verarbeiten kann. Er bietet die Möglichkeit, einen kompletten OT zu digitalisieren und nicht nur bestimmte Bereiche eines histologischen Schnittes (Leong und McGee 2001). Die Digitalisierung eines OT dauert je nach Einstellung ca. 20-45 min. Da in den meisten Fällen nur bestimmte Abschnitte eines OT gescannt werden müssen, erfolgt die Digitalisierung schneller. Für die drei histologischen Schnitte je OT betrug die Scandauer zwischen 10 und 20 min. Der Panoramic MIDI<sup>®</sup> bietet neben dem Hellfeld-Scan die Option fluoreszenzmikroskopische Scans anzufertigen. Er verfügt über einen Autofokus sowohl für grobe als auch für feine Fokussierungen, über eine 16-bit Kamera, eine LED-Lampe und einen Multibandfilter für den Fluoreszenz-Scan (DAPI, FITC, TRITC, Cy5). Der Scanprozess unterteilt sich in zwei Phasen: dem „Focus Map“, wo der Fokus an verschiedenen Stellen des einzuscannenden Bereichs überprüft wird und dem „Scanning“. Der Scan erfolgt immer bei 40-facher Vergrößerung.



**Abbildung 4.5: Panoramic MIDI®-Scanner.**

Der Panoramic MIDI®-Scanner als virtuelles Mikroskopsystem bietet die Möglichkeit bis zu 12 OT in einem Scanprozess automatisiert zu digitalisieren. Er besteht aus drei Komponenten, dem „Digital Slide-Scanner“ (rechts im Bild), dem Server mit entsprechender Software zum Speichern und Bereitstellen der Bilder und dem virtuellen Mikroskop auf dem Bildschirm des Benutzers mit der Visualisierungssoftware Panoramic Viewer® (Computerstation links im Bild). Zum Einscannen der Proben verfügt der Scanner sowohl über eine Hellfeld- als auch über eine Fluoreszenz-Option.

Für den Scan der immunhistochemisch gefärbten Proben wurden zunächst die für den Scanprozess wichtigen Parameter im manuellen Modus eingestellt. Hierbei wurde an dem ersten OT ein sog. Probenschwellenwert gewählt, damit der Scanner lediglich die Hautdünnschnitte und nicht den gesamten OT abscannt. Nach der Optimierung der Einstellungen an einem OT wurde in den automatisierten Modus gewechselt, das gespeicherte, benutzerdefinierte Profil wurde geladen und die übrigen maximal 11 OT dieses Laufs wurden automatisch eingescannt. Falls der automatisierte Modus von Beginn an gewählt wird, also ohne vorherige Profilerstellung, so bestimmt der Panoramic MIDI® die Fokuswerte selbständig, ebenso wie die Expositionszeit im Falle des Fluoreszenz-Scans. Hierbei kommt es allerdings zu einer starken Zunahme der Scandauer.

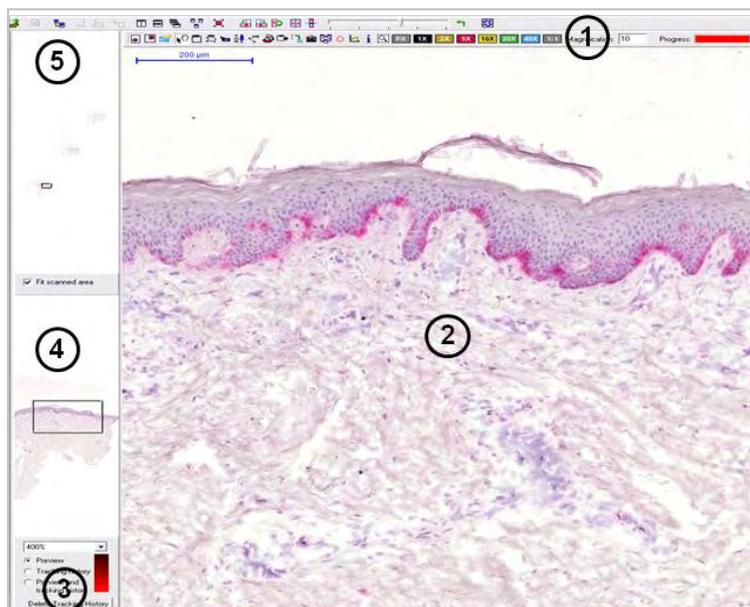
## 4.4 Bildanalytische Quantifizierung der digitalisierten Hautdünnschnitte

### 4.4.1 Vorbereitung und Bearbeitung im Panoramic Viewer®

Der Panoramic Viewer® in der Version 1.15.2 ist die Software, die zur Darstellung und bildtechnischen Bearbeitung der eingescannten Hautdünnschnitte verwendet wurde (siehe Tabelle 3.8). Voraussetzung für die anschließende Quantifizierung war die entsprechende Vorbereitung der digitalisierten OT im Panoramic Viewer®.

Allgemein dient der Panoramic Viewer® zur Ansicht von virtuellen OT, die von den 3DHISTECH Produkten SCAN®, MIDI® und DESK® digitalisiert worden sind. Er erlaubt das einfache Navigieren

innerhalb eines virtuellen OT, das schnelle Durchsuchen der Proben und das Markieren von Regionen. Einen Überblick über die Benutzeroberfläche mit ihren Funktionsbereichen gibt Abbildung 4.6.



**Abbildung 4.6: Benutzeroberfläche des Panoramic Viewer®.**

Die Fenster der Benutzeroberfläche unterteilen sich in verschiedene Funktionsbereiche: die Symbolleiste (1), den exemplarischen, virtuellen OT (2), das Bedienfeld der Positionsverfolgung (3), das variable Übersichtsbild (4) und das Gesamtübersichtsbild (5). Optional lässt sich auch der Funktionsbereich „Lupe“ anwählen. (Quelle: in Anlehnung an Carl Zeiss MicroImaging GmbH 2008, S. 13-14)

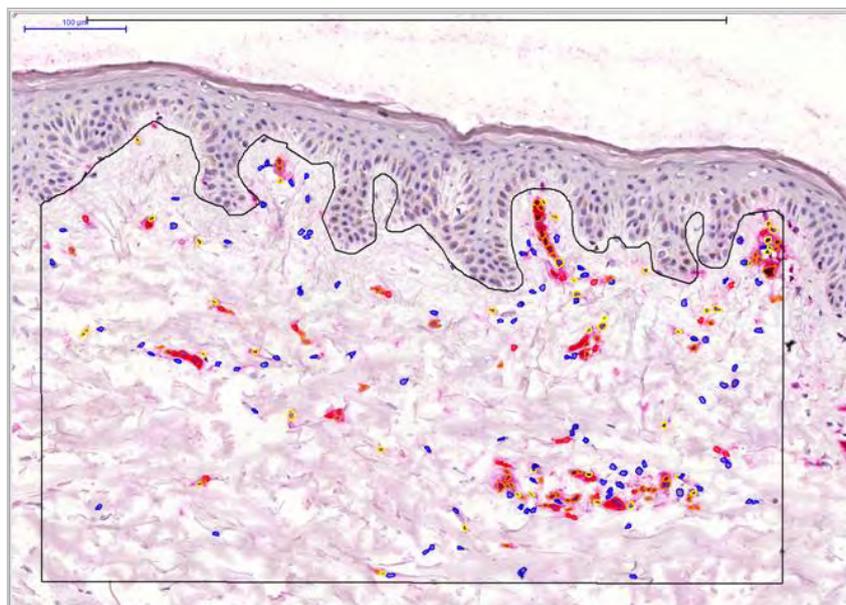
Um bestimmte Bereiche im virtuellen OT zu markieren, können sog. „regions of interest“ (ROI) gelegt werden. Diese können mit Kommentierungen definiert werden. Um solche Kommentierungen zu kreieren und zu editieren, muss die ausgewählte Region im virtuellen OT freihändig oder anhand von Funktionen, mit denen Rechtecke oder Polygone gezeichnet werden, markiert worden sein. Auch Punktmarkierungen sind möglich oder das Abmessen von Abständen durch Messmarken (Carl Zeiss MicroImaging GmbH 2008, S. 32-33). Mithilfe dieser Messmarken wurde als Vorbereitung des OT für die Quantifizierung epidermaler Parameter die Epidermislänge abgemessen. Die Abmessung erfolgte bei Betrachtung des Hautquerschnittes gemäß Abbildung 4.6 an der Grenze der beiden oberen, epidermalen Schichten, dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum*. Danach wurde freihändig eine ROI gelegt, die die gesamte Epidermis unterhalb der Messmarken einschloss. Für die Quantifizierung dermalen Parameter wurden ebenfalls freihändig mehrere ROI gezeichnet, die bestimmte, charakteristische Regionen in der Dermis einschlossen.

Neben dem Hellfeldmodus zum Bearbeiten immunhistochemischer Hautdünnschnitte bietet der Panoramic Viewer® auch den Fluoreszenzmodus. Dieser ermöglicht die Darstellung aller digitalisierten Kanäle, inklusive deren Überlagerung. Den Bildern der verschiedenen Kanäle können noch nachträglich andere Farben zugewiesen werden.

#### 4.4.2 Quantifizierung mit dem 3D-HISTECH Modul NuclearQuant®

Das optionale Modul NuclearQuant® 1.15 von 3DHISTECH (siehe Tabelle 3.8) zur Detektion von Zellen und zur Segmentierung von Zellkompartimenten in digitalisierten Hellfeldproben wurde für den Großteil der Quantifizierungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, herangezogen. Mit NuclearQuant® wurden die epidermalen und dermalen Zellen basierend auf deren unterschiedliche immunhistochemische Färbereaktion und -intensität detektiert und klassifiziert.

Für eine richtige Anwendung von NuclearQuant® zur Analyse von Zellkernen mussten korrekte, auf den virtuellen OT abgestimmte Einstellungen vorgenommen werden. Daher wurde für jeden zu analysierenden Parameter ein eigenes Profil erstellt. Zum Einen musste dafür eine Farbauswahl getroffen werden, anhand derer Zellen als positiv (immunhistochemisch markiert) und negativ (unmarkiert) detektiert werden konnten. Zum Anderen mussten Pixelintensitäten der markierten Zellen eingestellt werden. Diese ermöglichten eine Klassifizierung der Zellen in schwach, mittel und stark positiv. Das Abstimmen des Farbtons erforderte genaueste Überprüfung aller gefärbten Schnitte, welche hinsichtlich desselben Parameters quantifiziert wurden. Gründe dafür waren vorhandene Unterschiede in der Probenqualität und eine häufig damit einhergehenden Varianz in der Färbequalität der Dünnschnitte, obwohl diese unter denselben Bedingungen prozessiert worden waren. Weitere Parameter, die noch eingestellt werden mussten, betrafen die Zellkerne wie die Variationsbreite des Zellkernradius, die Grenzwerte für Zellkernfläche und Zellkernzirkularität und die Weichheit der zu identifizierenden Zellkernumrandung. Nachdem alle für den Algorithmus notwendigen Einstellungen vorgenommen und in einer „microscopic imaging segmentation profile“-Datei (MISP-Datei) gespeichert worden waren, wurde der digitalisierte OT mit den definierten ROI geladen (3DHISTECH 2011b, S. 7). Pro OT wurden zwei bis drei ROI quantitativ ausgewertet. Je nach Probenumfang konnten entweder jeder Schnitt einzeln oder mehrere Schnitte durch einen Batch-Modus kombiniert ausgewertet werden. Letzteres wurde für jene OT gewählt, die hinsichtlich des gleichen Parameters getestet wurden und daher mit derselben Profileinstellung analysiert werden mussten. Die gewählte Art der Messungsergebnisse, die in einer separaten Microsoft Excel®-Datei ausgelesen wurde, war sowohl objektspezifisch (z. B. Gesamtzellzahl; Anzahl positiver und negativer Zellen) als auch feldspezifisch (z. B. Gesamtfläche der ROI; Gesamtfläche der markierten Objekte) (3DHISTECH 2011b, S. 15). Die in Microsoft Excel® ausgelesenen Werte konnten je quantifizierten Hautdünnschnitt mittels einer Anzeigefunktion im Panoramic Viewer® visualisiert und qualitativ überprüft werden (siehe Abbildung 4.7). Die großen Datenmengen in den ausgelesenen Wertetabellen wurden im weiteren Verlauf bearbeitet und die Ergebnisse aller Probanden wurden pro Areal (SB oder Kontrolle) und pro Zeitpunkt zusammengefasst. Alle weiteren Berechnungen zur grafischen Darstellung der Daten wurden ebenfalls mit Microsoft Excel® durchgeführt.



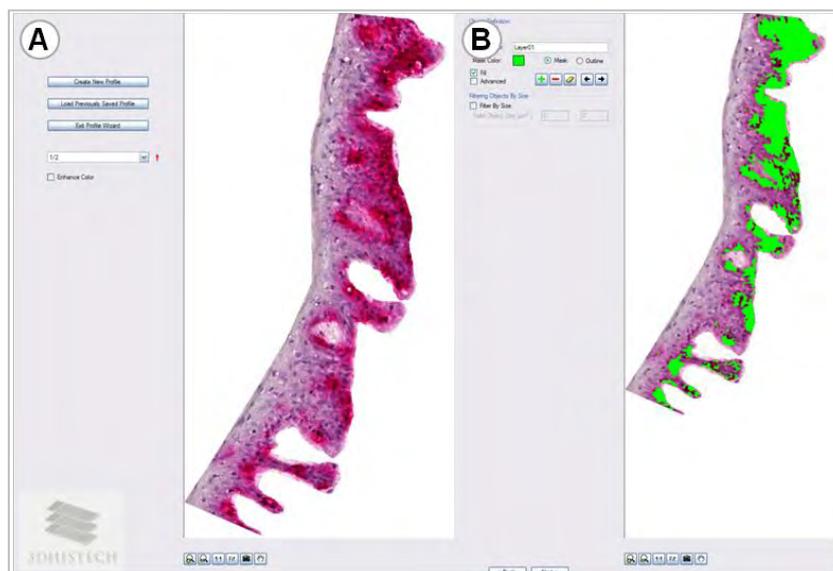
**Abbildung 4.7:** Ergebnisdarstellung eines exemplarischen, histologisch gefärbten Hautdünnschnittes innerhalb einer definierten ROI nach der Quantifizierung mit NuclearQuant®.

Der mit der APAAP-Methode gefärbte und mit Panoramic MIDI® digitalisierte Hautdünnschnitt wurde nach entsprechenden Einstellungen mittels NuclearQuant®, einem Modul des Panoramic Viewer®, auf Farbreaktionen um die Zellkerne geprüft. Die Ergebnisse der quantitativ ermittelten Zahlen ließen sich optisch auf dem Hautdünnschnitt visualisieren. Dabei wurde zwischen den negativen Objekten bzw. Zellkernen in Blau und den positiven Objekten in den übrigen Farben unterschieden. Die Farbabstufung der positiven Objekte bezieht sich auf die Intensität der Markierung, indem Gelb eine schwache, Orange eine mittelstarke und Rot eine starke Markierung repräsentiert. Für die weitere Analyse und Darstellung wurde die Grundgesamtheit aller positiv markierten Objekte betrachtet. Der mit einer schwarzen Linie umrandete Bereich des Hautdünnschnittes stellt eine ROI dar, in der die Quantifizierung stattfand. Sie ragt ca. 300 µm tief ins *Stratum papillare* hinein. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

#### 4.4.3 Quantifizierung mit dem 3D-HISTECH Modul HistoQuant®

HistoQuant® 1.15 (siehe Tabelle 3.8) ist wie NuclearQuant® ein optionales Quantifizierungsmodul des Panoramic Viewer®, allerdings basiert es auf Farbinformationen (3DHISTECH 2011a, S. 9). Anwendung in der vorliegenden Arbeit fand es bei der Detektion und Messung positiver Flächenanteile von Hautdünnschnitten, die mit Antikörper gegen Melanozyten-spezifische Immunkellmarker gefärbt wurden. So konnten quantitative Daten erhoben werden, obwohl eine zum Teil großflächige und diffuse Färbung stattgefunden hatte, die nicht immer einzelnen Zellkernen zugeordnet werden konnte. Aus diesem Grund wurde von der Quantifizierung mit NuclearQuant® abgesehen. Mit HistoQuant® war in allen Punkten genauso zu verfahren wie bei der Quantifizierung mit NuclearQuant® (vgl. Kap. 4.4.2) mit Ausnahme der Algorithmen, die über einen anderen Profilerstellungsassistenten zu definieren waren. Dabei wurde zunächst eine passende Auflösung gewählt, danach wurden Parameter für die Zielobjekte festgelegt und ein eventueller Größenausschluss sowie eine Objektrennung vorgenommen. Schließlich wurden die zu analysierenden objekt- und feldspezifischen Parameter bestimmt. Die Auswahl der Auflösung und die Adjustierung der zu markierenden Fläche sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Wie bei NuclearQuant® folgte nach dem Start der Analyse der gewählten OT die Ausgabe einer Microsoft Excel®-Datei. Die

Ergebnisse konnten über die Panoramic Viewer®-Oberfläche mittels der Funktion „Measurement Visualization“ visualisiert werden. Auch hier galt für die vorausgesetzte Vergleichbarkeit der Zeitpunkte, Areale und Probanden die Verwendung desselben Profils je Parameteranalyse.



**Abbildung 4.8:** Auszüge aus dem Modul HistoQuant® anhand einer epidermalen Region eines exemplarischen Hautdünnschnittes.

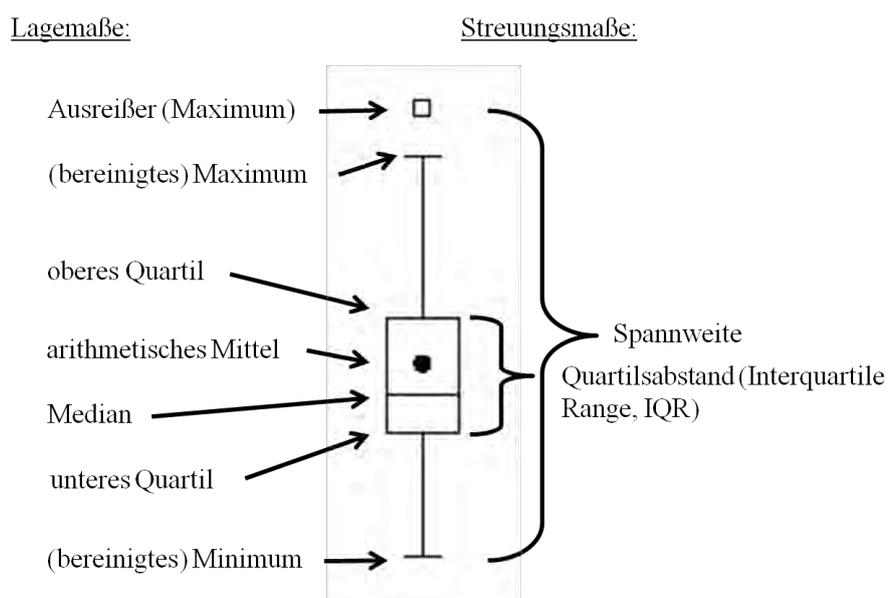
(A) Nach der Auswahl und Markierung einer gewünschten ROI wurde der Ausschnitt in HistoQuant® angezeigt und ließ sich bezüglich seiner Auflösung bearbeiten. Die Analysedauer des Moduls bis zur Ausgabe der Ergebnisse ist kürzer, je geringer die Auflösung ist. (B) Simultan zur Definition der zu markierenden Objekte wie Benennung, Farbzurordnung zum Objekttyp (z. B. Zellkerne), Größenausschluss und den erweiterten Einstellungsmöglichkeiten der Farbtonerkennung und der Objektgröße wurde eine Vorschau der definierten Bereiche gezeigt.

## 4.5 Auswertung und Statistik

Für die graphische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse und deren statistische Auswertung wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism® 5 und 6 verwendet (siehe Tabelle 3.8). Anzumerken sei, dass die Analyse der Ergebnisse explorativ ist. Für die Berechnung vorhandener Signifikanzen, die ab einer Stichprobenzahl von fünf oder sechs als statistisch valide betrachtet werden kann, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Voraussetzung für diese Wahl ist das Auftreten zwei gepaarter bzw. verbundener, aber voneinander unabhängiger Stichproben (Bärlocher 2008, S. 76). Dies bezieht sich in der vorliegenden Arbeit auf den Vergleich von Saugblasen-induzierten, hyperpigmentierten Arealen (SB-Arealen) und Kontrollarealen mehrerer Probanden zu bestimmten Zeitpunkten. SB-Areal und Kontrollareal stammten jeweils von demselben Probanden. Dabei wurde angenommen, dass keine Normalverteilung der Datensätze vorliegt. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bringt die Unterschiede der gepaarten Stichproben ohne Berücksichtigung des Vorzeichens in eine Rangordnung und verringert dadurch den Einfluss von Ausreißern (Extremwerte) (Bärlocher 2008, S. 79). Bei der Darstellung diente der Median als Kenngröße zur Beschreibung der

Lage (Lagemaß), da er die Zentraltendenzen der vorhandenen Datensätze robuster als das arithmetische Mittel, welches umgangssprachlich auch als Durchschnitt bezeichnet wird, wiedergibt. Ebenso wurde eine Kenngröße zur Beschreibung der Streuung (Streuungsmaß) gewählt, die für die nichtparametrische Darstellung geeignet ist. Zur statistischen Darstellung dieser Lage- und Streuungsmaße wird in der vorliegenden Arbeit der Box-Whisker-Plot herangezogen, dessen Merkmale in Abbildung 4.9 genauer beschrieben werden. Ein typisches Merkmal ist die Box, die den Quartilsabstand („interquartile range“, IQR) angibt, bei welcher es sich um die Differenz zwischen dem oberen Quartil ( $Q_{75}$ ) und dem unteren Quartil ( $Q_{25}$ ) handelt (Luttmann *et al.* 2006, S. 242). Wird vom oberen Quartil ausgegangen, so sind 25 % der Werte größer und 75 % der Werte kleiner. Beim unteren Quartil verhält es sich genau umgekehrt. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde bei den vorhandenen Datensätzen zweiseitig eingesetzt, d. h. die Abweichungen nach oben und nach unten wurden auf gleiche Weise berücksichtigt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt ( $p\text{-Wert} \leq 0,05$ ).

Eine andere Darstellungsform der Ergebnisse waren Microsoft Excel®-Grafiken, die mithilfe von Pivot-Tabellen erstellt wurden.



**Abbildung 4.9: Darstellung charakteristischer Merkmale eines Box-Whisker-Plots.**

Beim Box-Whisker Plot, kurz Boxplot, wird eine Box um den Wertebereich gelegt, in dem sich die mittleren 50 % aller Werte des Datensatzes befinden. Das obere Ende der Box, auch oberes Quartil genannt, steht für den Wert, der von 75 % aller Werte unter- und von 25 % aller Werte überschritten wird. Beim unteren Ende der Box, dem unteren Quartil, verhält es sich genau umgekehrt. Der gesamte Bereich der Box wird auch Quartilsabstand („interquartile range“, IQR) genannt und kennzeichnet die Differenz zwischen dem oberen und dem unteren Quartil. Innerhalb der IQR befinden sich die Lokationsmaße Median und arithmetisches Mittel. Der Median ist der mittlere Wert einer geordneten Reihe von Werten und im Gegensatz zum arithmetischen Mittel ist er robust gegen Ausreißer. Lagemaße der Abweichung sind nicht nur Maximum und Minimum, sondern auch deren „bereinigte“ Version. „Bereinigt“ bedeutet, dass es sich um den größten bzw. kleinsten Wert handelt, der nicht mehr als  $1,5 \cdot \text{IQR}$  über dem oberen bzw. unter dem unteren Quartil liegt. Alle Werte darüber (Maximum) oder darunter (Minimum) werden als Ausreißer oder Extremwerte bezeichnet (Bärlocher 2008, S. 79). (Quelle: in Anlehnung an Rauscher 2012)

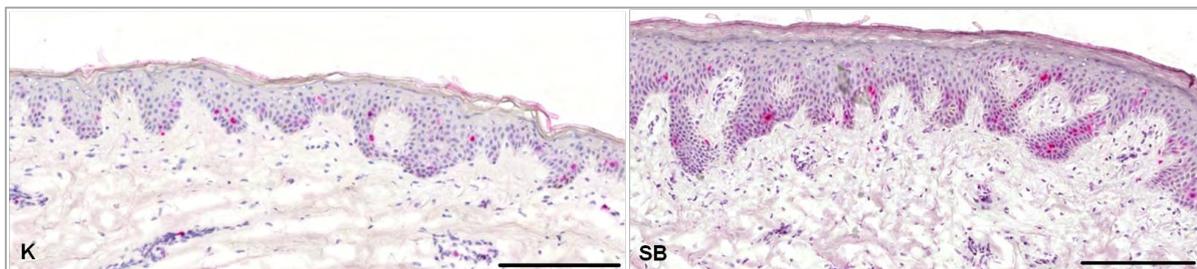
## 5 Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die histologischen und quantitativen Ergebnisse zur Untersuchung der epidermalen Melanozyten in Saugblasen-induzierten, hyperpigmentierten Arealen beschrieben. Davor werden kurz die bisherigen, internen Erkenntnisse der Beiersdorf AG über den Melaningehalt und die morphologischen Veränderungen der Epidermis in hyperpigmentierter Haut vorgestellt. Dem ersten Abschnitt schließt sich die Untersuchung der Integrität der BM in der dermo-epidermalen Übergangszone an. Im Anschluss wird ein Fokus auf die Charakterisierung des dermalen Infiltrats bei der hyperpigmentierten Haut gelegt. Hierbei wird auf Fibroblasten und Myofibroblasten und die Zelltypen des Endothels näher eingegangen. Abschließend wird der Immunzellstatus beleuchtet.

### 5.1 Morphologische und histologische Analysen epidermaler Parameter in Saugblasen-induzierter PIH

#### 5.1.1 Bisherige Erkenntnisse zur epidermalen Schichtdicke und zum Melaningehalt

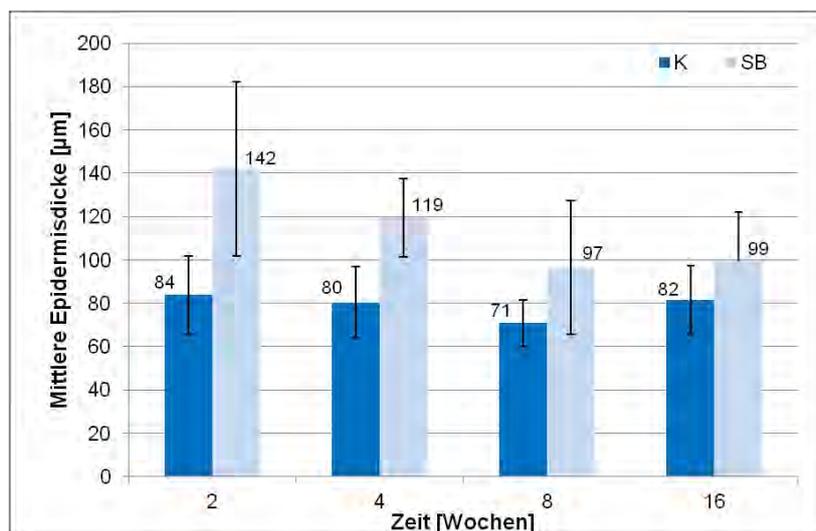
Anhand bisheriger Untersuchungen durch die Beiersdorf AG ist bekannt, dass ein epidermales Dickenwachstum in den Hautproben der SB-Areale verglichen mit den Kontrollarealen auftritt. Diese Zunahme der Epidermisdicke ist auf ein vermehrtes Zellwachstum, eine sog. Hyperplasie, zurückzuführen. Gleichzeitig tritt eine Verlängerung und stärkere Verzahnung der Reteleisten, den Fortsätzen der Epidermis in die Dermis, in Erscheinung. Ebenso wurde eine stärkere Ausprägung (Verdickung) des *Stratum corneum* beobachtet. Diese Merkmale sind in Abbildung 5.1 anhand exemplarischer Hautdünnschnitte dargestellt.



**Abbildung 5.1: Exemplarische Darstellung von Hautdünnschnitten zur Identifizierung struktureller Veränderungen der Epidermis.**

Anhand der Untersuchungen 5 µm dicker, gefärbter Gefrierdünnschnitte aus Hautstanzen, welche Probanden der PIH-Studie zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen entnommen worden waren, wurde eine Verdickung der Epidermis im Saugblasen-Areal (SB) gegenüber dem Kontrollareal (K) identifiziert. Zusätzlich ragten die Reteleisten tiefer in die Dermis hinein und das *Stratum corneum* war stärker ausgeprägt. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine epidermale Dickenzunahme an einem Probanden zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen und ist repräsentativ für die Ergebnisse 15 weiterer Probanden. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200 µm)

Die Hyperplasie und die damit einhergehende Verlängerung der Reteleisten sind besonders stark zum frühesten Zeitpunkt, also zwei Wochen nach der SB-Entnahme, ausgeprägt. Sie lassen sich auch noch nach 16 Wochen beobachten. Mittels bildanalytischer Auswertung histologischer Proben von 16 Probanden konnte gezeigt werden, dass zwei Wochen nach dem Ziehen der SB die Epidermisdicke um den Faktor 1,7 erhöht ist (siehe Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2: Grafische Darstellung der mittleren Epidermisdicke.**

Zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen wurde die mittlere Epidermisdicke an 5 µm dicken Gefrierdünnanschnitten aus Hautstanzen von 16 Probanden (n = 16) der PIH-Studie gemessen. Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind dem Balkendiagramm zu entnehmen. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollarealen (K) ist in den Saugblasen-Arealen (SB) zu allen Zeitpunkten eine Dickenzunahme der Epidermis zu beobachten. Zwei Wochen nach dem Ziehen der Saugblasen tritt eine fast doppelt so dicke Epidermis in Erscheinung, die im Verlauf der weiteren Wochen nur sehr langsam, aber kontinuierlich in ihrer Dicke abnimmt. (Quelle: in Anlehnung an Wessel 2012)

In internen Arbeiten der Beiersdorf AG wurde anhand Fontana Masson gefärbter Hautdünnanschnitte der Melaningehalt und die Melaninverteilung in den Schichten der Epidermis bestimmt. Eine relative Quantifizierung mit der Software ImageJ<sup>®</sup> (siehe Tabelle 3.8) ergab eine Zunahme der Melaninmenge nach dem Ziehen der SB um den Faktor 2-4. In den Wochen nach der SB-Entnahme nahm der Melaningehalt und somit die Bildung größerer Pigmentaggregate stetig zu. Mit dem konfokalen Laserrastermikroskop wurde die Melaninverteilung visualisiert und eine Spreitung ins *Stratum spinosum* und auch ins *Stratum granulosum* identifiziert. Die Melaninspreitung nahm mit dem Fortschreiten der Zeit bis zur Normalisierung des Zustandes ab (Wessel 2012).

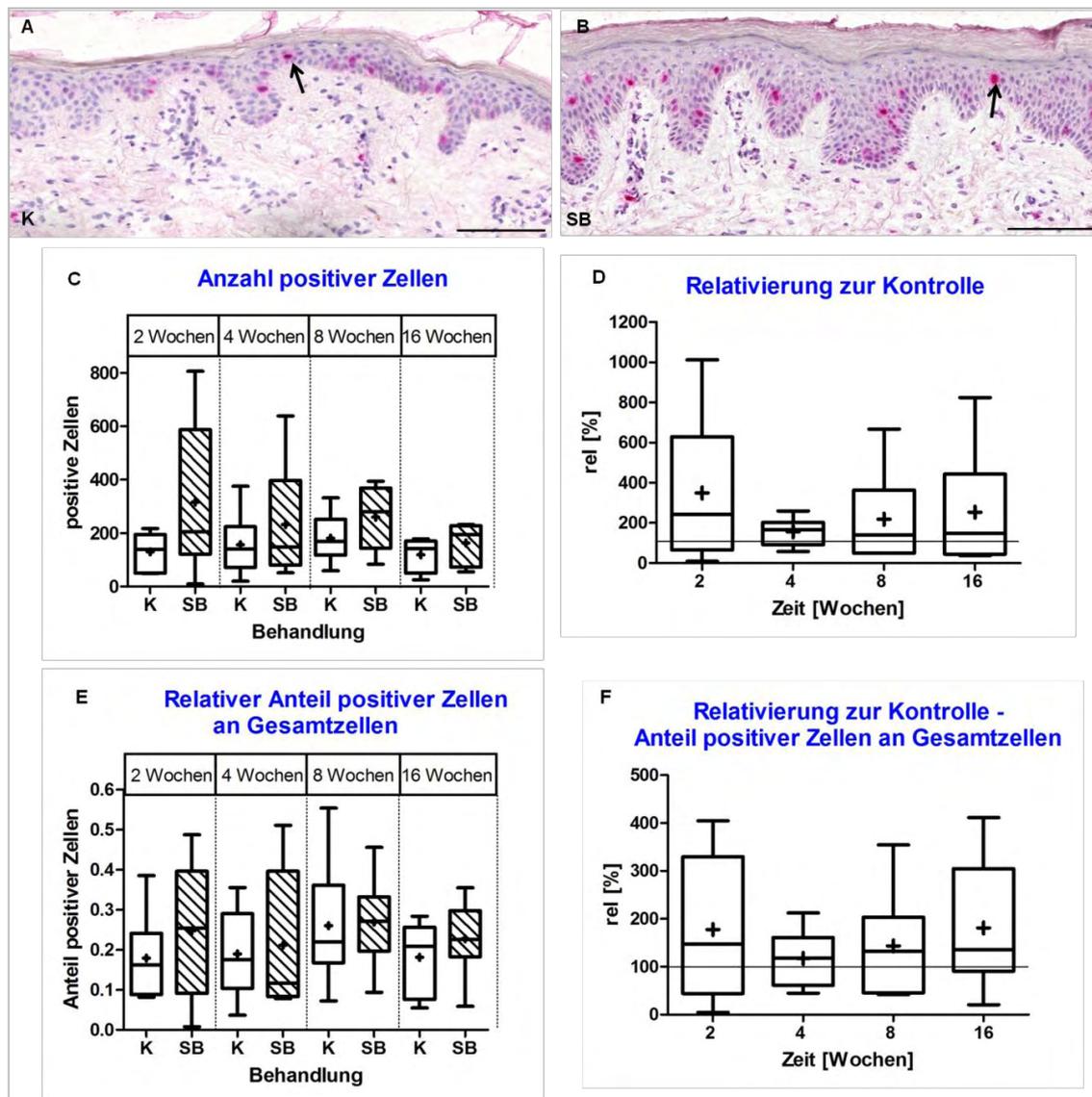
### 5.1.2 Untersuchung der Proliferation durch Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67

Um einen möglichen Beitrag der Zellproliferation an den morphologischen Veränderungen der Epidermis belegen zu können, wurde die Expression des Proteins Ki-67 untersucht. Dazu wurden Hautdünnschnitte mit einem monoklonalen anti-Ki-67 Antikörper in der Verdünnung 1:300 immunhistochemisch gefärbt (siehe Tabelle 3.5). Ki-67 ist ein nukleäres Protein, welches mit der Zellproliferation korreliert (Sawhney und Hall 1992). Da es in verschiedenen Phasen des Zellzyklus in Erscheinung tritt, akkumuliert Ki-67 von der G1-Phase bis zur Mitose, wo es die höchste Konzentration erreicht, und fällt direkt danach, in der G0-Phase, auf ein minimales Level zurück (Kayaselcuk *et al.* 2003). Die Ki-67 Färbung kann als zuverlässige Methode für die exakte Bestimmung des proliferierenden, neoplastischen Anteils der Zellpopulation angesehen werden (Reda *et al.* 2001).

Zur Quantifizierung des proliferativen Zellanteils in SB- und Referenzarealen wurden Hautproben von sechs Probanden gefärbt. Ein klares, zellkernspezifisches Färbeergebnis konnte in allen untersuchten Gefrierdünnschnitten erreicht werden, was die Quantifizierung mit dem Software-Modul NuclearQuant<sup>®</sup> von 3DHISTECH (vgl. Kap. 4.4.2) vereinfachte und eine realitätsnahe, quantitative Darstellung des visuellen Expressionsmusters ermöglichte. Die Vergleichbarkeit der Quantifizierungsergebnisse wurde durch ihre Normierung auf 1 mm Epidermislänge gewährleistet (vgl. Kap. 4.4.1). Des Weiteren wurde die Gesamtheit aller positiven Zellen betrachtet.

Sowohl ein Ausschnitt des histologischen Färbeergebnisses als auch die Quantifizierungsergebnisse der Ki-67 positiven Zellen sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

Allgemein ließ sich eine tendenziell häufigere Markierung in Hautarealen einer induzierten PIH beobachten (siehe Abbildung 5.3 A und B). Diese Tendenz kann auch aus den Relativierungen der positiven Zellzahlen zur Referenz und den Relativierungen der Anteile positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zur Referenz abgelesen werden (siehe Abbildung 5.3 D und F). Die Werte übersteigen hier zu allen Zeitpunkten das Kontrollniveau. Statistisch konnte zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz bei den Vergleichen von SB- und Kontrollarealen gezeigt werden (vgl. Anhang 9.3). Ursache hierfür ist vermutlich die größere Streuung der Werte in den SB-Arealen, was durch eine größere IQR und längere Spannbreite zu erkennen ist. Eine Annäherung oder beinahe Übereinstimmung von arithmetischem Mittel und Median ist zu allen Zeitpunkten gegeben, was ein Hinweis darauf ist, dass eine symmetrische Verteilung vorliegt. Ein Vergleich der beiden Lagemaße liefert daher Hinweise auf die Form der zugrunde liegenden Verteilung. Die Zunahme der Ki-67 positiven Zellen in den Arealen einer induzierten PIH, relativiert zur Kontrolle, beträgt maximal 143 %. Dies lässt sich zum frühesten Zeitpunkt, zwei Wochen nach dem Ziehen der SB, beobachten (siehe Abbildung 5.3 D).



**Abbildung 5.3: Histologische und quantitative Ergebnisse der Ki-67 positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:300)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich Ki-67 positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-Ki-67 sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) überwiegend im *Stratum basale* ein positives Ergebnis. Exemplarisch wird mit Pfeilen darauf hingewiesen. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit der Software NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm Epidermislänge wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil Ki-67 positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellen durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm Epidermislänge Ki-67 positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $rel = Anteil\ positiver\ Zellen\ SB / Anteil\ positiver\ Zellen\ K * 100$ ) (F). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Arealen ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

Im weiteren Verlauf nimmt die Anzahl proliferierender Zellen stetig ab, erreicht jedoch nicht das Kontrollniveau bis zum Studienende. So ist zum letzten Zeitpunkt der Untersuchung die Anzahl Ki-67 positiver Zellen gegenüber der Kontrolle noch um ca. 49 % erhöht. Wird der positive Zellanteil an der Gesamtzellzahl zur Kontrolle relativiert, ist ebenfalls zum frühesten Zeitpunkt der höchste Anstieg zu verzeichnen. Der Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen im SB-Areal liegt hierbei nur noch um maximal 56 % über jenem im Kontrollareal. Diese geringere Zunahme bei Betrachtung des Anteils positiver Zellen an der Gesamtzellzahl deckt sich mit der allgemeinen Beobachtung einer in SB-Arealen vorhandenen Hyperplasie, also einer vermehrten Zellzahl in der Epidermis. Daher bedeutet ein höherer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen im SB-Areal, dass trotz der Zunahme der Gesamtzellzahl die positive Zellzahl um mehr als den Faktor der Gesamtzellzahl-Erhöhung angestiegen ist. Aus dem Grund, dass ein Vergleich beider Betrachtungsweisen und das Einbeziehen der Gesamtzellzahl für weitere Interpretationen von Bedeutung sein könnten, werden beide Darstellungsvarianten gezeigt. Dies gilt auch für die nachfolgenden Kapiteln.

### **5.1.3 Untersuchung der Melanozyten**

Da die Hyperpigmentierung möglicherweise auf ein erhöhtes Vorkommen von Melanozyten, den pigmentproduzierenden Zellen, zurückzuführen ist, wurden IHC-Färbungen an den Gewebeschnitten mit unterschiedlichen Melanozyten-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dabei wurden drei Marker in Kombination (Triple-Antikörper-Cocktail) und auch einzeln eingesetzt. Die Anwendung einer Antikörperkombination hatte zum Ziel, die Gesamtheit aller Melanozyten zu erfassen. Die Einzelmarkierungen sollen zeigen, inwieweit die Ergebnisse mit jenen der Kombinationsfärbung übereinstimmen und ob sich bei beiden Vorgehensweisen eine ähnliche Tendenz über den beobachteten Zeitraum abzeichnet.

#### ***5.1.3.1 Nachweis von MART-1, TRP1 und c-Kit positiver Markierung anhand einer Markerkombination***

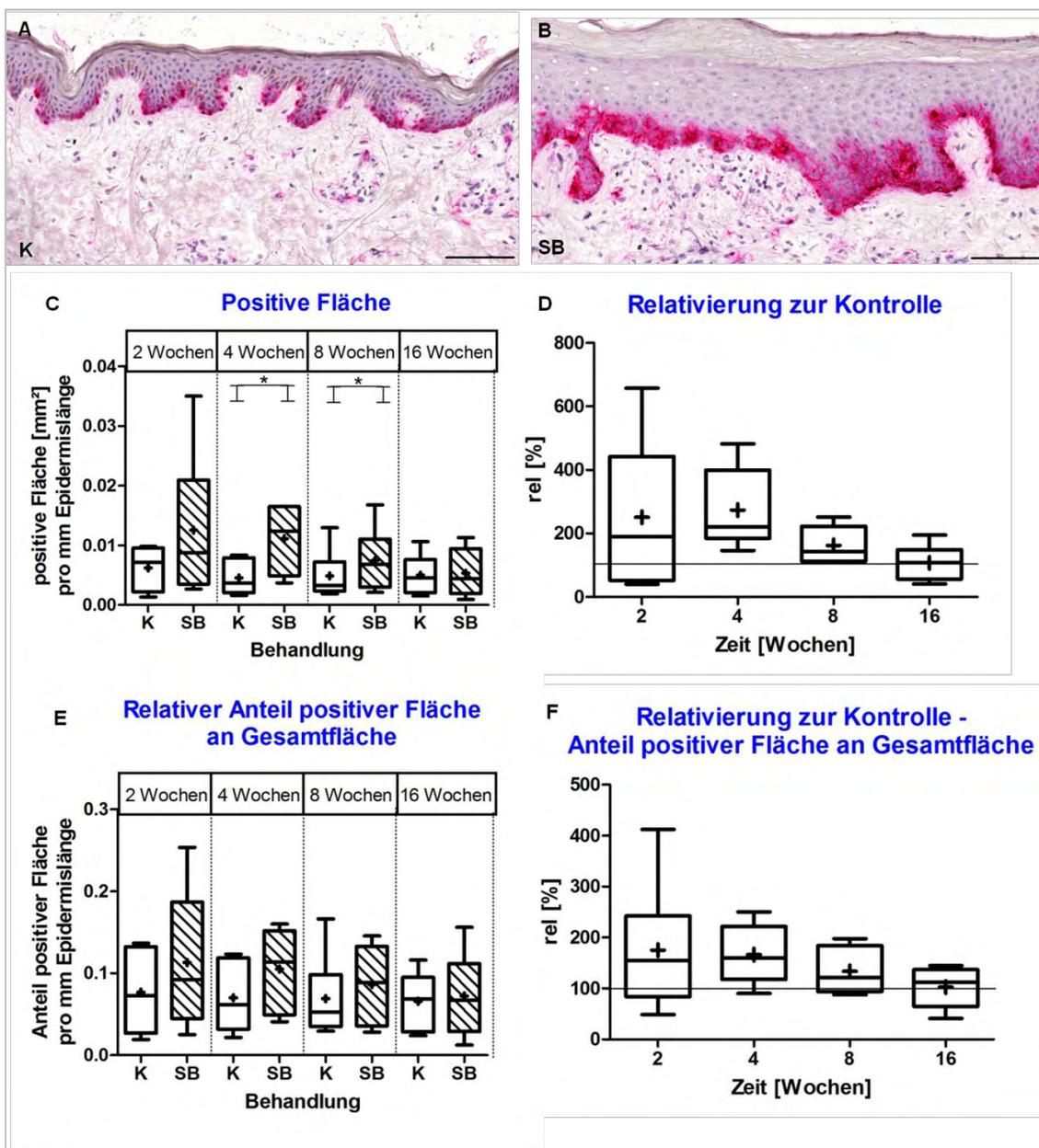
Für die immunpositive Melanozytenmarkierung wurde ein Antikörper-Cocktail eingesetzt, bestehend aus monoklonalem anti-Melanoma Antikörper, monoklonalem anti-TRP1 Antikörper und polyklonalem anti-CD117/c-Kit Antikörper (vgl. Kap. 3.5). Der anti-Melanoma Antikörper ist seinerseits ein Cocktail aus Antikörperklonen, die gegen die Epitope HMB-45 („human melanoma black-45“) und MART-1 („melanoma antigen recognized by T cells-1“), auch bekannt als Melan-A, gerichtet sind. Der Antikörperklon HMB-45 färbt das zytoplasmatisch lokalisierte Antigen gp100 in Melanozyten und malignen Melanomen an. Da es gegen ein prämelanosomes Glykoprotein gerichtet ist, ist es Melanosomen-spezifisch und ruhende Melanozyten bleiben in der Regel immunnegativ. Anti-MART-1 ist in diesem Fall ein Cocktail der Klone DT101 und BC199 und erkennt das Antigen

MART-1, ein in Melanozyten vorhandenes transmembranes Protein. Es wird ebenfalls in malignen Melanomen exprimiert (Abcam Inc. 2012; Fetsch *et al.* 1999). Der anti-TRP1 Antikörper oder anti-Mel-5 (Klon) ist gegen TRP1, ein Glykoprotein in der Melanosomemembran, gerichtet. Es ist in der Melaninpolymerisation involviert und in den melanosomalen Entwicklungsphasen III und IV aktiv (Bhawan 1997). Der dritte Antikörper war anti-CD117/c-Kit, der zum Nachweis des transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptors c-Kit verwendet wurde. Dieser wird u. a. in Melanozyten exprimiert und nimmt zusammen mit seinem Liganden, dem Stammzellfaktor („stem cell factor“, SCF), in Hinblick auf Melanozyten eine wichtige Rolle in der Migration, dem Wachstum und der Differenzierung von embryonalen Melanoblasten ein. In reifen Zellen trägt er zu deren Überleben während der Melanogenese bei (Botchkareva *et al.* 2001; Mayer und Green 1968; Mintz und Russell 1957). Zusätzlich ist bekannt, dass er bei diversen Tumoren als Protoonkogen fungiert (Botchkareva *et al.* 2001; El-Sheikh *et al.* 2009).

Die Antikörper wurden in den Verdünnungen 1:1000 (anti-TRP1 und anti-CD117/c-Kit) und 1:200 (anti-Melanoma) eingesetzt (siehe Tabelle 3.5).

Für die Auswertung der Melanozytenmarkierung wurde das Quantifizierungsmodul HistoQuant<sup>®</sup> von 3DHISTECH (vgl. Kap. 4.4.3) statt NuclearQuant<sup>®</sup> aus folgenden, die Morphologie betreffenden Gründen gewählt: Obwohl die IHC-Färbungen zur Markierung der Melanozyten unter exakt denselben Bedingungen durchgeführt wurden, waren die Färbeintensitäten der Zellkerne in den histologischen Hautdünnschnitten zwischen den einzelnen Probanden, Arealen und Zeitpunkten zum Teil inhomogen. Außerdem kam es vor, dass Zellkerne in der Epidermis fehlten und somit leere, zellkerngroße Löcher zurückblieben. Die Ursache der herausgelösten Zellkerne konnte speziell auf das Schneiden der Proben bei einer Schnittdicke von lediglich 5 µm zurückgeführt werden. Zusätzlich resultierte aufgrund der Adressierung verschiedener melanosomaler Proteine und der Tatsache, dass sich manche Melanosome entlang der Melanozytendendriten zu den Keratinozyten bewegen, eine relativ großflächige Markierung. Diese war nicht mehr eindeutig einzelnen Zellkernen zuzuordnen. Obwohl HistoQuant<sup>®</sup> keine absoluten Zellzahlen liefert, gibt die Auswertung ein Abbild darüber, ob immunpositive Reaktionsunterschiede zwischen hyperpigmentierter Haut und normaler Umgebungshaut bestehen.

In Abbildung 5.4 sind sowohl ein Ausschnitt des histologischen Färbeergebnisses als auch die Quantifizierungsergebnisse der HMB-45, MART-1, TRP1 und c-Kit positiv markierten Flächen über den gesamten Studienzeitraum von 16 Wochen dargestellt. Für die Berechnungen wurden die quantitativen Ergebnisse auf 1 mm Epidermislänge normiert (vgl. Kap. 4.4.1).



**Abbildung 5.4: Histologische und quantitative Ergebnisse der HMB-45, MART-1, TRP-1 und c-Kit positiven Markierung.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnungen: anti-Melanoma 1:200; anti-TRP1 1:1000; anti CD117/c-Kit 1:1000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich einer Melanozyten-positiven Markierung an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit der melanozytären Antikörperkombination sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Eine stärkere, immunpositive Reaktion lässt sich im SB-Areal (B) verglichen mit dem Kontrollareal (A) ablesen. Zu erkennen ist in B eine Basalschicht-lokalisierete, fast durchgängige Rotfärbung im Gegensatz zu definiert markierten Regionen in A. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit der Software HistoQuant<sup>®</sup> und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm Epidermislänge wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil der Melanozyten-positiven Fläche an der Gesamtfläche (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt in Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Flächenergebnisse werden in absoluten Werten in mm<sup>2</sup> in C ausgedrückt und für D wurden die positiven Flächen in den SB-Arealen zu den positiven Flächen in den Kontrollarealen relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 %

repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten Flächenwerte der SB-Areale (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die positiv markierte Fläche in den SB-Arealen größer als jene in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten relativen Flächenanteile an der Gesamtfläche erfolgte durch Division der positiven Fläche durch die Gesamtfläche. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent von der epidermalen Fläche pro mm Epidermislänge positiv war. Auch der Anteil an der Gesamtfläche wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Fläche von SB} / \text{Anteil positiver Fläche von K} * 100$ ) (F). Bei den Vergleichen von SB- und Kontrollarealen ohne Berücksichtigung der Gesamtfläche wurden zu den Zeitpunkten vier und acht Wochen nach der SB-Entnahme signifikante Unterschiede berechnet ( $p = 0,0313$ ) (C). Das Signifikanzniveau der Unterschiede wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

Qualitativ war besonders zu den ersten beiden Zeitpunkten eine stärkere Färbeintensität in den SB-Arealen als in den Kontrollarealen zu verzeichnen (siehe Abbildung 5.4 A und B). Zum Zeitpunkt 16 Wochen nach dem Ziehen der SB war visuell kein Unterschied mehr zwischen SB- und Kontrollarealen zu erkennen.

Diese Beobachtung deckt sich mit den erhobenen Quantifizierungsdaten, die eine Abnahme der Positivmarkierung nach 16 Wochen auf Niveau des unbehandelten Areals zeigen. Die Ergebnisse dokumentieren im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der positiven Flächenmarkierung im SB-Areal von 90 % (siehe Abbildung 5.4 D). Ein signifikanter Unterschied im Vergleich von hyperpigmentierter und normaler Haut ergibt sich zum zweiten und dritten Untersuchungszeitpunkt nach der SB-Entnahme ( $p = 0,0313$ ), nicht aber zum ersten (siehe Abbildung 5.4 C; vgl. Anhang 9.3). Dies könnte auf die größere Streuung der aus den SB-Arealen ermittelten Werte zurückzuführen sein. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt erreichen die beiden Lageparameter Median und Mittelwert bei der Relativierung der im SB-Areal markierten Fläche zur Kontrolle ihren höchsten Wert. Der Median des Datensatzes liegt zu diesem Zeitpunkt um 121 % über dem Kontrollniveau (siehe Abbildung 5.4 C).

Durch die auftretende Verdickung der Epidermis in Hautarealen nach der SB-Entnahme wird deutlich, dass den Ergebnissen der positiven Flächenanteile an der Gesamtfläche (siehe Abbildung 5.4 E und F) nicht dieselbe Gewichtung für Interpretationen zukommen sollte wie der positiven Fläche ohne Berücksichtigung der Gesamtfläche (siehe Abbildung 5.4 C und D). Die Dicke der Epidermis ist für die Quantifizierung der lediglich im *Stratum basale* lokalisierten Melanozyten nicht entscheidend. Trotz fehlender Signifikanzen zwischen behandelten und unbehandelten Arealen zeigen die Ergebnisse der positiven Flächenanteile in Abbildung 5.4 E und F einen ähnlichen Verlauf über die Wochen wie die Ergebnisse in Abbildung 5.4 C und D. Die relativierten Flächenanteile liegen wie in Abbildung 5.4 D zu den ersten drei Zeitpunkten über dem Kontrollniveau und fallen nach 16 Wochen auf dieses zurück. Der erhobene Datensatz zeigt auch in diesem Fall nach zwei Wochen die größte Streuung. Ebenso wurde zum Zeitpunkt vier Wochen nach dem Ziehen der SB beim Vergleich der beiden Areale der geringste p-Wert von 0,0625 ermittelt (siehe Abbildung 5.4 F; vgl. Anhang 9.3).

Zusammenfassend wurde zwei und vier Wochen nach der SB-Entnahme eine Verdoppelung des histologischen Melanozyten-Expressionsprofils mit der Kombination von drei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen.

### 5.1.3.2 Nachweis von TRP1 positiver Markierung

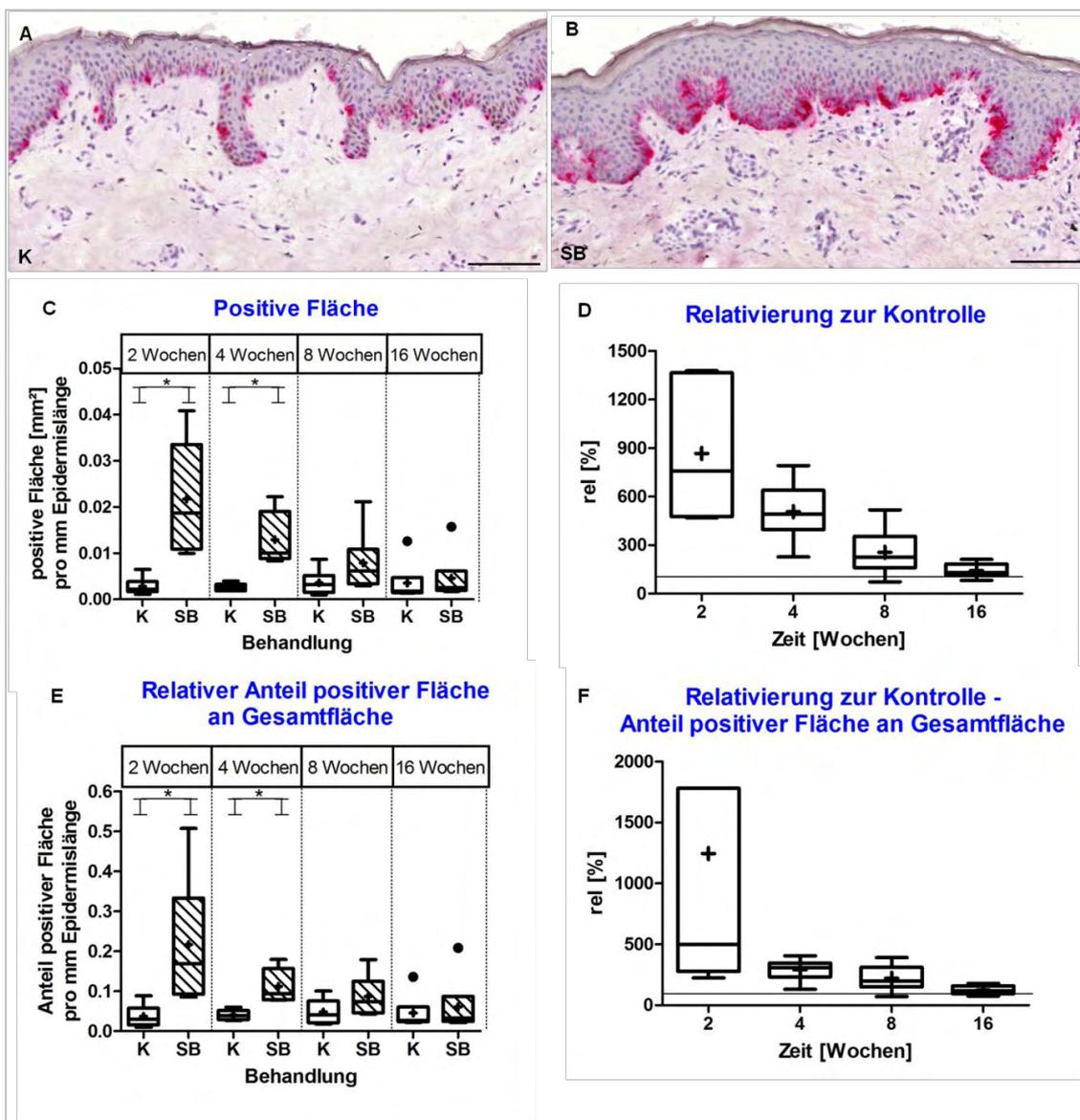
Anti-TRP1 wurde von Dean *et al.* (2002) als einer der zuverlässigsten Melanozytenmarker beschrieben. Eine hochsensitive Färbung konnte in dieser Arbeit mit den Ergebnissen der APAAP-Methode und der IF bestätigt werden, was den Einsatz des Antikörpers in einer sehr geringen Konzentration ermöglichte. Es wird vermutet, dass durch die Identifikation von TRP1 aktive Melanozyten nachgewiesen werden, da das Protein auf der melanozytären Fähigkeit zur Melanogenese und daher auf der Melanozytenaktivität beruht (Dean *et al.* 2002).

Für die Auswertung wurde das Quantifizierungsmodul HistoQuant<sup>®</sup> (vgl. Kap. 4.4.3) aus denselben Gründen, wie in Kap. 5.1.3.1 beschrieben wurde, herangezogen. Gründe waren z. B. eine zum Teil undeutliche Hämatoxylin-Kernfärbung oder eine diffuse Markierung, die nicht einzelnen Zellkernen zuzuordnen war. Überwiegend wurde jedoch aus Gründen der Vergleichbarkeit auf die Methode der Flächenquantifizierung zurückgegriffen. Daher war die eingesetzte Verdünnung von anti-TRP1 (siehe Tabelle 3.5) identisch zu jener in der Kombinationsfärbung (1:1000), ebenso wie die untersuchten Zeitpunkte.

Aus Abbildung 5.5 sind sowohl ein Ausschnitt des histologischen Färbeergebnisses als auch die Quantifizierungsergebnisse der TRP1 positiv markierten Fläche über den gesamten Studienzeitraum von 16 Wochen zu entnehmen. Um eine Verbindung zu den Ergebnissen der Antikörper-Kombinationsfärbung herstellen zu können (vgl. Kap. 5.1.3.1), wurden in beiden Analysen die Proben derselben sechs Probanden herangezogen. Die Ergebnisse wurden analog zur Kombinationsfärbung auf 1 mm Epidermislänge normiert (vgl. Kap. 4.4.1).

Die Beobachtungen an den immunhistologisch gefärbten Hautdünnschnitten deckten sich mit den Quantifizierungsdaten in der Hinsicht, dass zwei Wochen (siehe Abbildung 5.5 A und B) und vier Wochen nach dem Ziehen der SB stärkere Färbeintensitäten zu erkennen waren als zu den letzten beiden Zeitpunkten. Auch 16 Wochen nach der SB-Entnahme war visuell kein Unterschied mehr zwischen SB- und Kontrollarealen zu verzeichnen.

Eine Signifikanz des Vergleichs von SB- und Kontrollarealen wurde für die ersten beiden Zeitpunkte berechnet ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.5 C; vgl. Anhang 9.3). Hierbei zeigt sich direkt zwei Wochen nach der SB-Entnahme ein extrem hoher Anstieg an positiver Fläche in SB-induzierter, hyperpigmentierter Haut mit einer 7,5-fachen Zunahme gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 5.5 D). Auch zum zweiten Zeitpunkt ist die positive Flächenmarkierung noch um das 4-fache erhöht. Auffallend ist, dass die Datensätze der Kontrollareale besonders geringen Schwankungen unterliegen und sich daher die positiv markierten Flächen über die Zeitpunkte hinweg auf einem Niveau von  $0,0024 \pm 0,0006 \text{ mm}^2$  befinden (siehe Abbildung 5.5 C). Dagegen weisen die Daten der SB-Areale bis auf den letzten Zeitpunkt eine größere Schwankungsbreite auf, speziell zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der SB-Entnahme.



**Abbildung 5.5: Histologische und quantitative Ergebnisse der TRP1 positiven Markierung.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:1000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich einer Melanozyten-positiven Markierung an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-TRP1 sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Eine stärkere, immunpositive Reaktion lässt sich im SB-Areal (B) verglichen mit dem Kontrollareal (A) ablesen. Zu erkennen ist in B eine Basalschicht-lokalisierete Rotfärbung, die eher diffus um mehrere Zellkerne lokalisiert ist, im Gegensatz zu vereinzelten und definierten Markierungen in A. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit der Software HistoQuant<sup>®</sup> und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm Epidermislänge wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil der Melanozyten-positiven Fläche an der Gesamtfläche (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt in Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Extremwerte werden als gefüllter Punkt dargestellt und sind nicht mit der Box verbunden. Die Flächenergebnisse werden in absoluten Werten in mm<sup>2</sup> in C ausgedrückt und für D wurden die positiven Flächen in den SB-Arealen zu den positiven Flächen in den Kontrollarealen relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten Flächenwerte der SB-Areale (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die positiv markierte Fläche in den SB-Arealen größer ist als die positiv markierte Fläche in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten relativen Flächenanteile an der Gesamtfläche erfolgte durch Division

der positiven Fläche durch die Gesamtfläche. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent von der epidermalen Fläche pro mm Epidermislänge positiv war. Auch der Anteil an der Gesamtfläche wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Fläche von SB} / \text{Anteil positiver Fläche von K} * 100$ ) (F). Bei den Vergleichen der hyperpigmentierten und unbehandelten Areale ergibt sich sowohl bei den absoluten Flächenwerten (C) als auch bei den zur Gesamtfläche relativierten Flächenanteilen (E) zum ersten und zweiten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0313$ ). Das Signifikanzniveau der Unterschiede wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

16 Wochen nach der SB-Entnahme liegen die Werte der TRP1 positiven Flächen von SB- und Kontrollarealen auf demselben Niveau und zeigen eine Übereinstimmung darin, dass sie kaum streuen, sondern dass sie sich in einem kleinen IQR befinden. Aufgrund der geringen Unterschiede in den Kontrollwerten kann die Vermutung angestellt werden, dass eine sehr gute Ausgangssituation gegeben ist (siehe Abbildung 5.5 C und E). Daher könnte die zu beobachtende Schwankungsbreite der SB-Areale Probanden-abhängig sein und als normal eingestuft werden. Die Datensätze der TRP1 positiven Flächen in SB- und Kontrollarealen weisen jeweils einen Extremwert auf (siehe Abbildung 5.5 C und E).

Die Ergebnisse des positiven Flächenanteils an der Gesamtfläche spiegeln den eben beschriebenen Verlauf und die Datenstreuung wider und zeigen ebenfalls zu den ersten beiden Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen den SB- und Kontrollarealen ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.5 E; vgl. Anhang 9.3). Ebenso liegen alle Werte nach der Relativierung zur Kontrolle über dem Kontrollniveau und eine Zunahme nach zwei Wochen im Vergleich zur Kontrolle wird auch hier deutlich (siehe Abbildung 5.5 F). Zu diesem Zeitpunkt ist die Streuung am größten und Median und arithmetisches Mittel liegen um das ca. 1,5-fache auseinander. Trotzdem weist bei Betrachtung des Medians (vgl. Kap. 4.5) der Vergleich der hyperpigmentierten Haut zur Kontrolle eine Signifikanz auf und es ist eine Zunahme von 400 % gegenüber der Kontrolle zu vermerken.

Zusammenfassend bestätigt sich die Tendenz des Ergebnisverlaufs mit dem der Antikörperkombination (vgl. Kap. 5.1.3.1). Bei beiden erfolgt eine Zunahme der Positivmarkierung zu den ersten Zeitpunkten und zum Zeitpunkt vier Wochen nach der SB-Entnahme wurde für beide eine Signifikanz zwischen den Vergleichsarealen errechnet ( $p = 0,0313$ ) (vgl. Anhang 9.3). Die größte Streuung der Datensätze tritt nach zwei Wochen auf. Zum letzten Zeitpunkt gibt es bei beiden Vorgehensweisen der Melanozytenmarkierung keine Unterschiede in den Ergebnissen, da eine Annäherung zwischen den Arealen stattfindet. Trotzdem liegt die positive Fläche der SB-Areale weiterhin um 12–30 % und die relativen Flächenanteile an der Gesamtfläche um 8–19 % über dem Kontrollniveau (siehe Abbildung 5.5 D und F).

Da sich die Erhöhung der Melanozytenzahl aus den ermittelten, positiv markierten Flächen jedoch kaum erschließen lässt, wird im nächsten Abschnitt mit einem weiteren Marker die Zellzahl der Melanozyten quantitativ ermittelt.

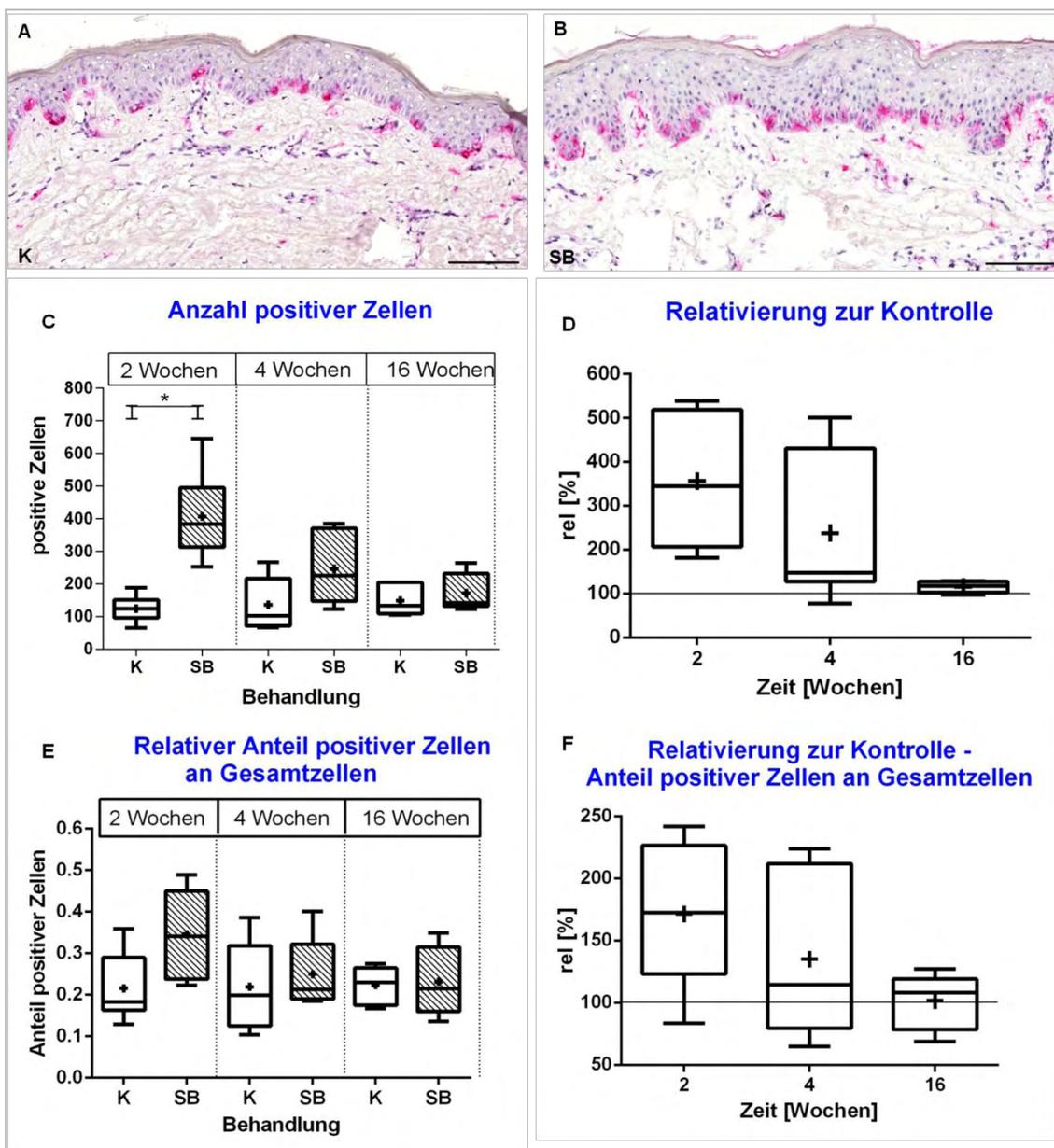
### 5.1.3.3 Nachweis von c-Kit positiven Zellen

Der c-Kit-Rezeptor und sein Ligand SCF wurden in Veröffentlichungen mehrmals mit der Stimulierung der Aktivität von Melanozyten in Verbindung gebracht. Kang *et al.* (2006) wies immunhistochemisch eine erhöhte Expression von c-Kit in der Epidermis bei Hyperpigmentierungen in Melasma nach. Der c-Kit-Rezeptor stellt somit ein weiteres Zielprotein für die Identifizierung von Melanozyten in der vorliegenden Arbeit dar.

Der polyklonale Antikörper anti-CD117/c-Kit wurde für den immunhistochemischen Nachweis c-Kit-positiver Zellen in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt (siehe Tabelle 3.5), identisch zu seiner Verwendung in der bereits beschriebenen Antikörper-Kombinationsfärbung (vgl. Kap. 5.1.3.1). Obwohl polyklonale Antikörper oft für unspezifische Färbereaktionen bekannt sind, ergab sich mit anti-CD117/c-Kit ein eindeutiges, spezifisches Färbeergebnis, weshalb die Quantifizierung mit dem Modul NuclearQuant<sup>®</sup> (vgl. Kap. 4.4.2) durchgeführt wurde. Es wurden die Zeitpunkte zwei, vier und 16 Wochen nach dem Ziehen der SB untersucht. Die Zellzahlergebnisse in der Epidermis wurden ebenso wie die Flächenanteile auf 1 mm Epidermislänge normiert (vgl. Kap. 4.4.1). In Abbildung 5.6 sind sowohl exemplarische Ausschnittsaufnahmen des histologischen Färbeergebnisses als auch die Quantifizierungsergebnisse der c-Kit positiven Zellen dargestellt.

Melanozyten-spezifisch tritt die Markierung c-Kit positiver Zellen im *Stratum basale* der Epidermis auf. Ausschließlich zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Ziehen der SB war eine häufigere Markierung in Hautarealen einer induzierten PIH verglichen mit der Kontrollhaut zu beobachten.

Auch der Vergleich beider Areale zu den jeweiligen Zeitpunkten zeigt lediglich nach zwei Wochen einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,0313 (siehe Abbildung 5.6 C; vgl. Anhang 9.3). Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Anstieg der positiven Zellzahl in den SB-Arealen um das 3,5-fache verglichen mit der Kontrolle ermittelt. Vier Wochen nach der SB-Entnahme ist ein deutlicher Rückgang c-Kit positiver Zellen zu vermerken, allerdings befindet sich die Zellzahl in der hyperpigmentierten Haut immer noch auf einem höheren Niveau als in der Referenz. Entnommen werden kann dies Abbildung 5.6 D, welche bei genauer Betrachtung eine geringe Abweichung unterhalb des Kontrollniveaus zum zweiten Untersuchungszeitpunkt aufweist. Dies bedeutet, dass die positive Zellzahl eines SB-Areals von mindestens einem der sechs Probanden unter der positiven Zellzahl des entsprechenden Kontrollareals liegt. Nach 16 Wochen nähert sich die Anzahl c-Kit positiver Zellen in den SB-Arealen stark dem Niveau der Kontrolle an und liegt nur noch um 17 % erhöht.



**Abbildung 5.6: Histologische und quantitative Ergebnisse der c-Kit positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:1000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich epidermaler, c-Kit positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-CD117/c-Kit sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Auf den ersten Blick ist ein Unterschied in der Häufigkeit einer c-Kit positiven Zellmarkierung zwischen SB-Areal (B) und Kontrollareal (A) kaum wahrnehmbar, allerdings lässt sich bei detaillierter Betrachtung des *Stratum basale* ein erhöhtes Auftreten c-Kit positiver Zellen im SB-Areal erkennen. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm Epidermislänge wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil c-Kit positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E

---

dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm Epidermislänge c-Kit positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Arealen ist für die absoluten Zellzahlen (C) zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der SB-Entnahme signifikant ( $p = 0,0313$ ) und wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

Anteilig an der Gesamtzellzahl zeigt der Verlauf der c-Kit positiven Zellen über die Zeit eine ähnlich abnehmende Tendenz wie jener der absoluten Werte (siehe Abbildung 5.6 C und E). Die Beobachtung, dass die Anzahl positiver Zellen relativiert zur Gesamtzellzahl in den SB-Arealen keine signifikante Zunahme im Vergleich zu den Kontrollarealen aufweist, deckt sich mit den bereits beschriebenen Untersuchungsergebnissen epidermaler Parameter, wo eine Hyperplasie in den SB-Arealen deutlich wird (vgl. Kap. 5.1.1 und 5.1.2). Dennoch beträgt zum ersten Untersuchungszeitpunkt die Zunahme des Anteils c-Kit positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in hyperpigmentierten Hautarealen gegenüber der Umgebungshaut 73 %. Ein deutlicher Rückgang auf 14 % zeichnet sich nach vier Wochen ab. Nach 16 Wochen wird nur noch eine 8 %ige Erhöhung gegenüber der Kontrolle erreicht (siehe Abbildung 5.6 F).

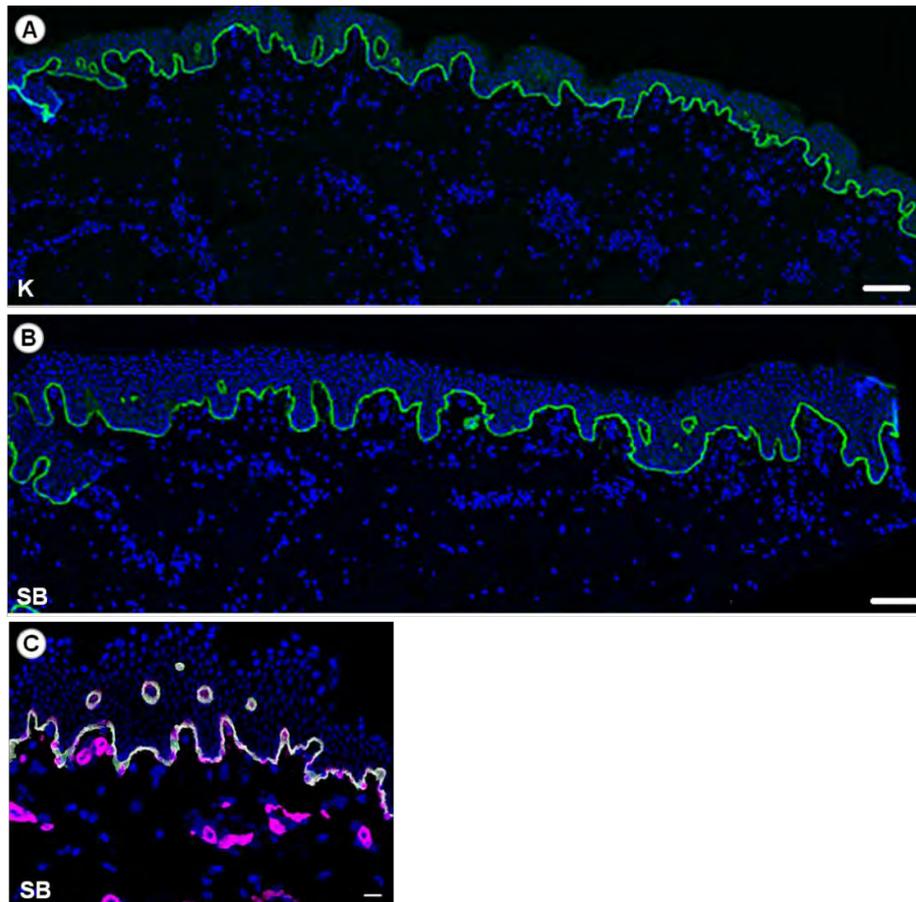
Die Ergebnisse zeigen, dass die PIH mit einem Anstieg der Melanozytenzahl in den ersten Wochen nach der Induktion einhergeht.

## 5.2 Histologische Analyse der Integrität der Basalmembran in Saugblasen-induzierter PIH

Da Epidermis und Dermis durch das Ziehen von SB voneinander getrennt werden, war das Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchung festzustellen, ob trotz der zum frühesten Untersuchungszeitpunkt (zwei Wochen nach der SB-Entnahme) komplett wiederhergestellten, epidermalen Schicht ein Integritätsverlust der BM zu beobachten ist. Wie Koivukangas (2004) beschrieb, wird durch das Ziehen von SB die Epidermis von der Dermis oberhalb der *Lamina densa*, die zusammen mit der *Lamina lucida* die Basallamina bildet, abgelöst. Dadurch bleibt die BM nur teilweise intakt und nach einigen Stunden der epidermalen Zellproliferation beginnen die Zellen ihre Migration zur BM. Gleichzeitig findet die Synthese der BM-Komponenten statt (Leivo *et al.* 2000).

Inwieweit dieser Prozess nach zwei Wochen abgeschlossen ist und ob sich eine mögliche Veränderung in der Integrität der BM anhand fluoreszenzmikroskopischer Analysen (vgl. Kap. 4.2.2 und 4.3.1) zeigen lässt, galt es mit mehreren BM-spezifischen Antikörpern herauszufinden. Dafür wurden sowohl Einzel- als auch Doppelfärbungen mit den Antikörpern Maus anti-Kollagen Typ IV, Kaninchen anti-Kollagen Typ IV, Maus anti-Kollagen Typ VII, Kaninchen anti-Kollagen Typ VII, Kaninchen anti-Laminin und Maus anti-Laminin-5 durchgeführt (siehe Tabelle 3.5). Es wurden damit verschiedene Komponenten der BM adressiert. Für die Saugblasenmethode wurde z. B. der Erhalt von Kollagen Typ IV beschrieben, da die Trennung der epidermalen Schicht noch oberhalb der *Lamina densa* erfolgt (Koivukangas 2004, S. 34). Im Gegensatz dazu wurden manche Laminine wie Laminin-5, das wichtigste Ankerungsfilament der *Lamina lucida*, nach dem Ziehen von SB sowohl in der Basalzellschicht der abgelösten Epidermis als auch im verbliebenen Blasenboden gefunden (Koivukangas 2004, S. 18, 34; Leivo *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurde spezifisch die Expression von Laminin-5 untersucht. Exemplarische Aufnahmen der Laminin-5-Markierungen eines SB-Areals und eines Kontrollareals sind in Abbildung 5.7 einander gegenübergestellt. Kollagen Typ VII, welches unmittelbar unterhalb der *Lamina densa* lokalisiert und ein struktureller Hauptbestandteil der Verankerungsfibrillen ist, wurde an einer größeren Stichprobenanzahl untersucht (n = 6) (Keene *et al.* 1987). Doppelfärbungen wurden mit der Antikörperkombination Laminin-5 - Kollagen Typ VII (siehe Abbildung 5.7) und Laminin-1 - Kollagen Typ VII durchgeführt. Eine Markierung mit Antikörper aus drei verschiedenen Spezies ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung von Laminin-5, Kollagen Typ IV und Kollagen Typ VII. Eine effiziente Überlagerungsdarstellung der drei Fluoreszenzkanäle gestaltete sich als schwierig und die Markierung zeigte ein identisches Resultat zu der Kombinationsfärbung mit Laminin-5 und Kollagen Typ VII. Die Fluoreszenzanalyse wurde überwiegend an Gefrierschnitten aus gestanzten Proben zwei Wochen nach der SB-Entnahme durchgeführt, da ein Integritätsverlust der BM zu diesem Zeitpunkt als am wahrscheinlichsten angesehen wurde. Die Betrachtung der Fluoreszenzmarkierung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Biozero® BZ-8000 (vgl. Kap. 4.3.1) unter einer 4-fachen Überblicksvergrößerung und zusätzlich unter

einer 20-fachen oder 40-fachen Vergrößerung, um eine durchgängige Markierung der BM wahrnehmen zu können. In keiner der untersuchten Proben wurde ein Unterschied zwischen Kontrolle und dem Areal der induzierten PIH beobachtet und zu keinem der untersuchten Zeitpunkte wurden unter Verwendung der oben genannten Antikörper charakteristische Veränderungen der BM identifiziert.



**Abbildung 5.7: Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Immunmarkierungen mit Laminin-5 an PIH- und Kontrollarealen und von einer Co-Färbung mit Laminin-5 und Kollagen Typ VII zur Untersuchung der Basalmembran-Integrität.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnungen: Laminin-5 und Kollagen Typ VII 1:400; DAPI 1:3000)

5  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierdünnschnitte aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs ( $n = 6$ ) aus der PIH-Studie, in welcher Saugblasen gezogen und eine PIH induziert wurde, wurden mit dem monoklonalen Antikörper Maus anti-Laminin-5 einzeln (A und B) und in Co-Färbung mit dem polyklonalen Antikörper Kaninchen anti-Kollagen Typ VII (C) markiert.

Zur fluoreszenzbasierten Visualisierung von Laminin-5 in SB- und Kontrollarealen wurde der Sekundäntikörper Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus (TRITC-Filter) eingesetzt und das Signal in Grün dargestellt (A und B). Bei der Doppelmarkierung wurden die Sekundäntikörper Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus (FITC-Filter) zur Darstellung von Laminin-5 (pink) und Alexa Fluor 546 Ziege anti-Kaninchen zur Darstellung von Kollagen Typ VII (grün) verwendet (C). Die Überlagerung beider Signale ist in Gelb wahrnehmbar (C). Die Zellkerne wurden mit DAPI fluoreszenzmarkiert und werden in Blau dargestellt. Keines der Immunfluoreszenzerggebnisse ließ auf einen stellenweisen Durchbruch der Basalmembran zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen schließen. (A und B: Vergrößerung: 4-fach; Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ ; C: Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ )

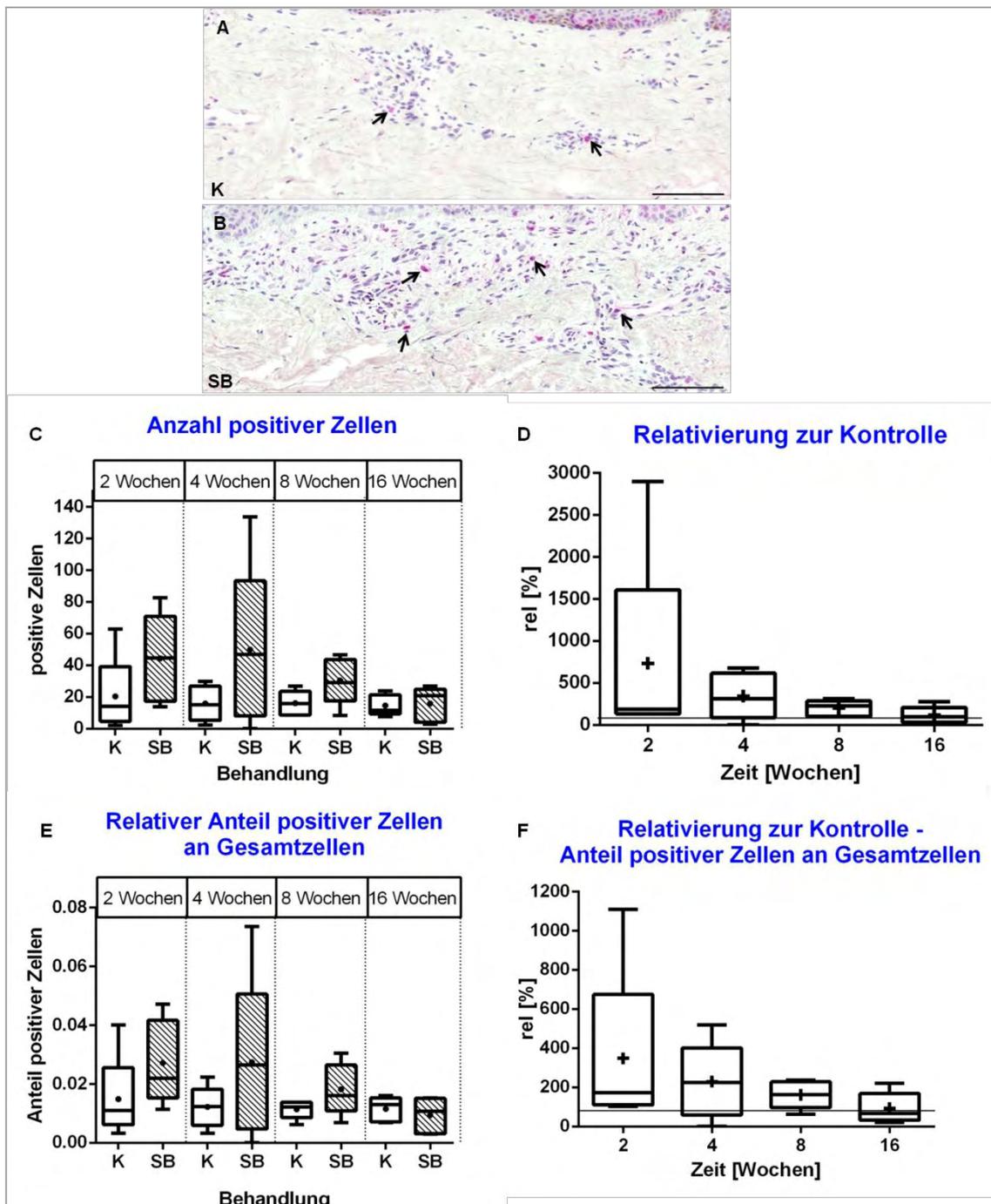
## 5.3 Morphologische und histologische Analyse dermalen Parameter in Saugblasen-induzierter PIH

### 5.3.1 Untersuchung der Proliferation durch Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67

Auch zur Quantifizierung des proliferierenden Anteils der Zellpopulation in der Dermis wurde anti-Ki-67 als Marker herangezogen. Ausgehend von der BM wurden bis zu einer Distanz von ca. 500 µm dermale Bereiche für die Quantifizierung gewählt. Grund dafür ist das Vorkommen der meisten Zellen, Kapillaren, Venen und Lymphgefäße in der obersten Schicht der Dermis, dem *Stratum papillare*. In Abbildung 5.8 werden die Färbeergebnisse exemplarischer Hautdünnschnitte und die Quantifizierungsergebnisse einer Stichprobenanzahl aus fünf Probanden gezeigt. Die Zellzahlen wurden auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche normiert.

Die immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte zeigten eine vermehrte immunpositive Reaktion mit anti-Ki-67 im Bereich des hyperpigmentierten Areals zu den Zeitpunkten zwei Wochen (siehe Abbildung 5.8 A und B) und vier Wochen nach dem Ziehen der SB. Auch eine deutlich erhöhte Gesamtzellzahl in den SB-Arealen verglichen mit der Referenz konnte beobachtet werden.

Die Darstellungen der Ergebnisse in Abbildung 5.8 machen die große Streuung der quantifizierten Zellzahlen zu den ersten beiden Zeitpunkten deutlich. Ab acht Wochen nach der SB-Entnahme ist keine starke Streuung der Werte mehr vorhanden und eine Erhöhung der Ki-67 positiven Zellen in den SB-Arealen ist weiterhin zu dokumentieren. Ein signifikanter Unterschied wurde für keinen der Zeitpunkte berechnet (vgl. Anhang 9.3). Auffallend ist, dass bei Vergleich der Verläufe der absoluten, positiven Zellzahlen über die Zeit und des Anteils positiver Zellen an den Gesamtzellen über die Zeit eine ähnliche Tendenz auszumachen ist (siehe Abbildung 5.8 C und E). Werden die Ergebnisse der SB-Areale auf die Ergebnisse der Kontrollareale relativiert, zeigt sich zum ersten Zeitpunkt die größte Streuung der Werte (siehe Abbildung 5.8 D und F). Zum zweiten Zeitpunkt wird sowohl bei der Anzahl Ki-67 positiver Zellen als auch beim Anteil Ki-67 positiver Zellen an den Gesamtzellen die höchste Zunahme im Vergleich zur Kontrolle dokumentiert. Diese beträgt für die absolute Zellzahl 212 % und für den Anteil an der Gesamtzellzahl 125 %. Letzteres bedeutet, dass sich trotz des Anstiegs der Gesamtzellzahl in den SB-Arealen der Anteil proliferierender Zellen allgemein deutlich erhöht hat mit Ausnahme des letzten Zeitpunktes, wo der Anteil Ki-67 positiver Zellen an den Gesamtzellen mit dem Kontrollniveau übereinstimmt (siehe Abbildung 5.8 F). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt wird die Basislinie erreicht, d. h. 16 Wochen nach dem Ziehen der SB ist keine erhöhte proliferative Aktivität mehr vorhanden.



**Abbildung 5.8: Histologische und quantitative Ergebnisse der Ki-67 positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde (Antikörperverdünnung: 1:300))

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich Ki-67 positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-Ki-67 sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Exemplarisch wird mit Pfeilen darauf hingewiesen. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm<sup>2</sup> dermale Fläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil Ki-67 positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und der Punkt bzw. das Kreuz das arithmetische Mittel. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse

werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $\text{rel} = \text{SB} / \text{K} * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro  $\text{mm}^2$  Dermisfläche Ki-67 positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Der Unterschied zwischen den Arealen ist zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 5$ ).

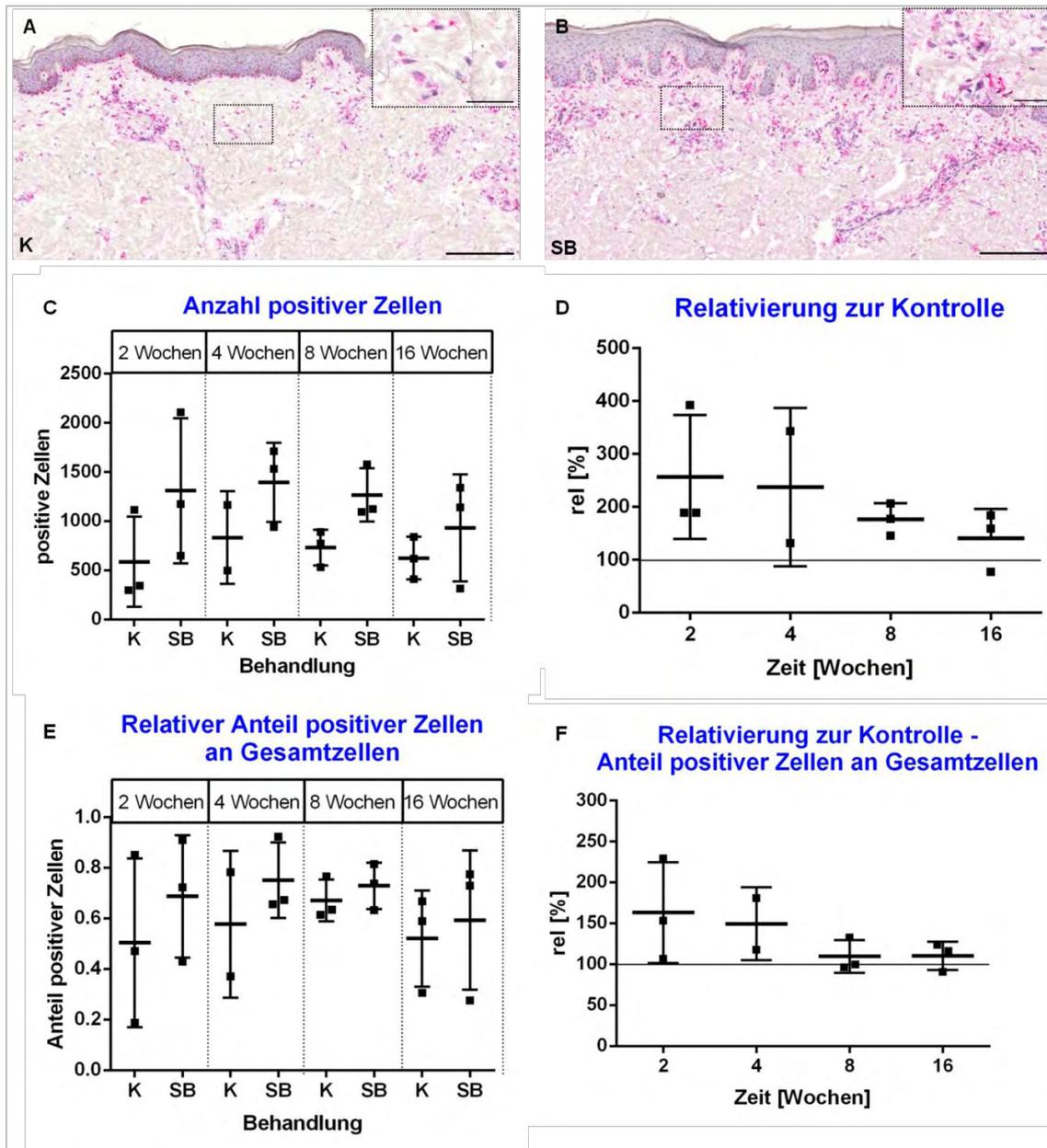
Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund der großen Streuung der Werte, speziell zwei Wochen nach der SB-Entnahme, eine klare Aussage über die Zunahme dermalen, Ki-67 positiver Zellen in postinflammatorischer, hyperpigmentierter Haut verglichen mit der Umgebungshaut nur schwer zu treffen ist. Es lässt sich jedoch eine tendenzielle Erhöhung zu den ersten beiden Zeitpunkten ablesen, was auf eine veränderte proliferative Aktivität der dermalen Zellen in der PIH schließen lässt. Um welche Zelltypen es sich dabei genau handeln könnte, wurde auch näher untersucht und wird in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

### 5.3.2 Untersuchung der Fibroblasten und Myofibroblasten

Inwieweit Fibroblasten am Prozess der PIH beteiligt sind, soll in diesem Abschnitt näher beleuchtet werden. Sie wurden bisher kaum im Zusammenhang mit der Hyperpigmentierung beschrieben. Allerdings zeigen neueste Studien, dass möglicherweise Fibroblasten-stämmige, für die Melaninbildung wichtige Wachstumsfaktoren, sog. „fibroblast-derived melanogenic growth factors“, durch das Zusammenspiel mesenchymaler Zellen und Epithelzellen an der Veränderung der Melanozytenfunktion und somit an der Hyperpigmentierung beteiligt sein könnten (Cardinali *et al.* 2012; Kovacs *et al.* 2010).

Einerseits wurde das Vorkommen von Fibroblasten in postinflammatorischer, hyperpigmentierter Haut von drei Probanden untersucht. Der Grund für die Analyse war die Vermutung, dass Fibroblasten durch Chemotaxis oder Haptotaxis in die Gegenden wandern, wo eine Entzündung auftritt oder direkt am Ort der Verletzung aus parenchymalen Epithel gebildet werden (Agelli und Wahl 1986; Strutz *et al.* 1995). Dazu wurden Hautdünnschnitte zu allen Zeitpunkten der Stanzbiopsie-Entnahme nach dem Ziehen der SB mit einem Fibroblasten-spezifischen Marker immunhistochemisch gefärbt und die positiven Zellzahlen wurden quantitativ ausgewertet. Hierfür wurde der monoklonale Antikörper Maus anti-Fibroblast Surface Protein, auch FSP genannt, verwendet.

In Abbildung 5.9 werden die Färberegebnisse exemplarischer Hautdünnschnitte mit dem Antikörper anti-FSP in einer Verdünnung von 1:2000 gezeigt (siehe Tabelle 3.5). Außerdem werden quantifizierte Werte, die auf  $1 \text{ mm}^2$  Dermisfläche normiert wurden, mittels Streudiagramme dargestellt.



**Abbildung 5.9: Histologische und quantitative Ergebnisse der FSP positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:2000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich dermalen, FSP positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-FSP sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. FSP positive Zellen treten vermehrt in B auf. Eine jeweils exemplarische, vergrößerte Region der Färberegebnisse wird in A und B in der rechten, oberen Bildecke gezeigt. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200 µm; Vergrößerung der Kleinaufnahmen: 40-fach; Maßstabsbalken: 50 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil FSP positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisse werden in Streudiagramme dargestellt. Da es sich um drei erhobene Datensätze handelt, wird als Lagemaß das arithmetische Mittel (gekennzeichnet durch eine Querlinie) und als Streuungsmaß die Standardabweichung (gekennzeichnet durch beidseitige Fehlerindikatoren) gewählt. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in

den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Signifikanzen hinsichtlich des Unterschiedes zwischen den Arealen wurden aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht berechnet. Aus den Daten lässt sich eine Zunahme FSP positiver Zellen in hyperpigmentierter Haut verglichen mit der Umgebungshaut zu den ersten beiden Zeitpunkten ablesen.

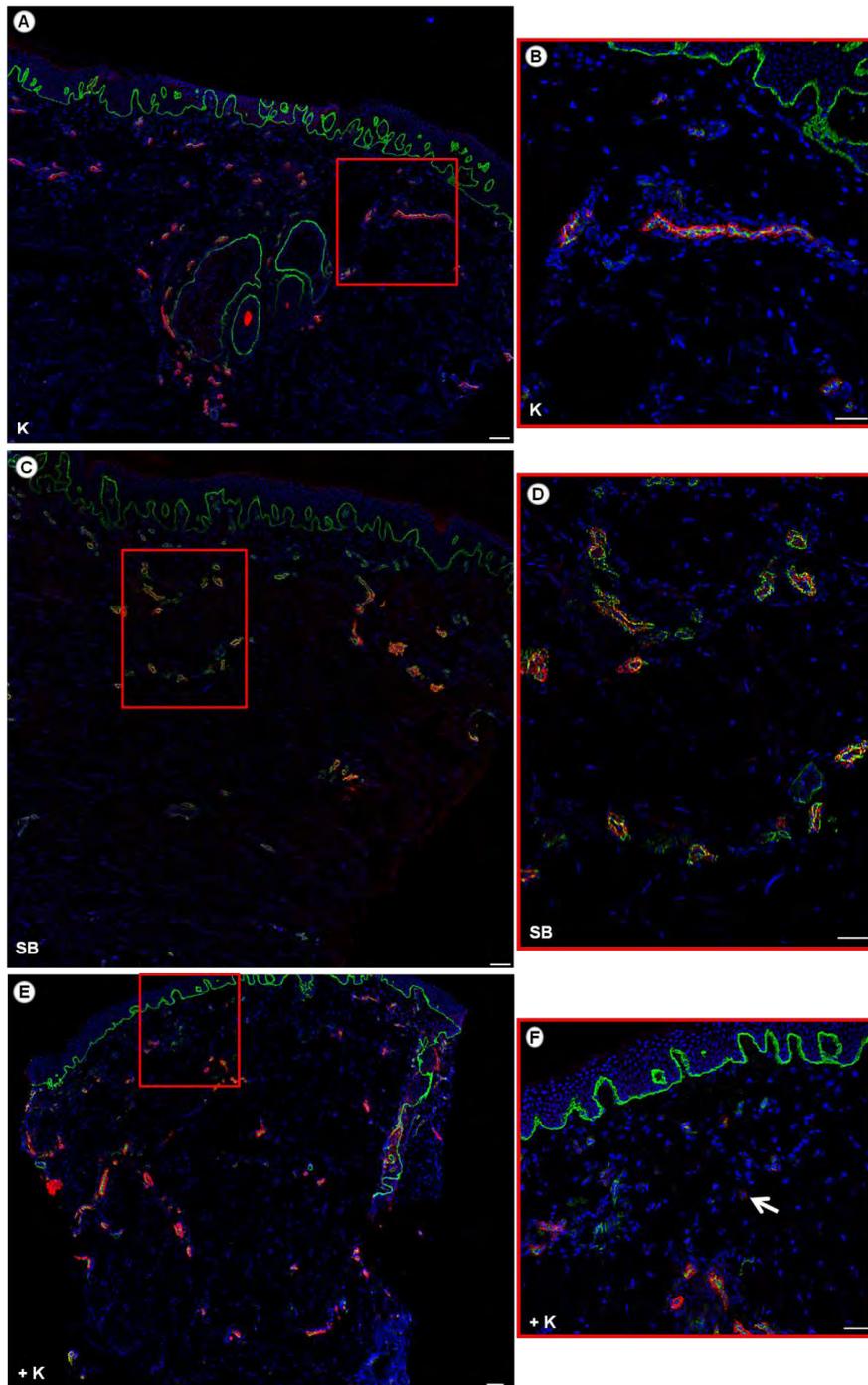
Eine verstärkte FSP-Positivfärbung wiesen die SB-Areale zu den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten auf (siehe Abbildung 5.9 A und B).

Zu diesen Zeitpunkten zeigen auch die Quantifizierungsergebnisse anhand der Mittelwerte die größte Zunahme an FSP positiven Zellen in den SB-Arealen gegenüber den Kontrollarealen. Zwei Wochen nach dem Ziehen der SB werden ca. 2,5-mal so viele FSP positive Zellen im hyperpigmentierten Areal verglichen mit der Kontrolle identifiziert (siehe Abbildung 5.9 D). In absoluten Zahlen ausgedrückt sind das  $1309,28 \pm 602,00$  positive Zellen/mm<sup>2</sup> im SB-Areal und  $586,52 \pm 375,08$  Zellen/mm<sup>2</sup> im Kontrollareal (siehe Abbildung 5.9 C). Anteilig an den Gesamtzellen sind zu diesem Zeitpunkt in der hyperpigmentierten Haut ca. 1,6-mal so viele FSP positive Zellen vorhanden wie in der Kontrolle (siehe Abbildung 5.9 F). Dies bedeutet, dass trotz des identifizierten Anstiegs der Gesamtzellzahl in der hyperpigmentierten Haut, speziell in den ersten Wochen nach der SB-Entnahme, der Anteil FSP positiver Zellen in den SB-Arealen ein Niveau erreicht, das 60 % über dem der Kontrolle liegt. Anzumerken sei, dass zu den ersten beiden Zeitpunkten bei Betrachtung der zur Kontrolle relativierten Werte auch die Standardabweichungen am größten sind, welche mit den Wochen abnehmen (siehe Abbildung 5.9 D und F). Die mittlere FSP positive Zellzahl in den Arealen einer PIH nähert sich im Verlauf der Wochen dem Kontrollniveau stark an, ohne es jedoch zu erreichen. Sie liegt nach 16 Wochen ca. 40 % (siehe Abbildung 5.9 D) bzw. ca. 10 % (siehe Abbildung 5.9 F) über diesem.

Andererseits wurde das Auftreten der differenzierten Form der Fibroblasten, den sog. Myofibroblasten, untersucht. Sie stellen eine Zwischenform der Fibroblasten und der glatten Muskelzellen dar und sind Schlüsselfiguren in der Rekonstruktion von Bindegewebe bei der Wund- und Narbenheilung. Sie weisen eine kontraktile Aktivität auf, die mithilfe eines glattmuskulären Aktin-Myosin-Komplexes zustande kommt und exprimieren daher  $\alpha$ -SMA (Hinz 2007).  $\alpha$ -SMA wurde in dieser Arbeit als Marker zur Identifizierung von Myofibroblasten in Hautarealen der PIH eingesetzt. Zu untersuchen galt es, inwieweit das Auftreten von Myofibroblasten und deren Rolle im Wundheilungsprozess noch zwei Wochen nach dem Ziehen der SB relevant ist. Vereinzelt wurden auch Proben zum Zeitpunkt vier Wochen nach der SB-Entnahme untersucht. Das Vorkommen von Myofibroblasten zu einem späteren Zeitpunkt wurde ausgeschlossen, da sie ihre kontraktile Aktivität nur während der akuten Wundheilungsphase zeigen und danach die Expression von  $\alpha$ -SMA sinkt. Folglich verschwinden die Myofibroblasten durch Apoptose (Desmoulière *et al.* 1995). Mit der Verwendung von anti- $\alpha$ -SMA als alleiniger Marker kann nicht zwischen Myofibroblasten und glatten Muskelzellen unterschieden werden. Dies und die Tatsache, dass bisher kein zytoskeletales Protein identifiziert wurde, das eine zuverlässige Diskriminierung zwischen beiden Zelltypen erlaubt, machten

eine Doppelfärbung mit dem Marker anti-CD31 notwendig. Dieser Antikörper gegen das Adhäsionsmolekül CD31 ermöglicht eine Markierung von Endothelzellen. Da speziell reifes Endothel von glatten Gefäßmuskelzellen umgeben ist, exprimiert es in der Regel  $\alpha$ -SMA. Die Co-Färbung mit beiden Antikörpern aus unterschiedlichen Spezies ermöglicht somit eine Diskriminierung zwischen einer  $\alpha$ -SMA positiven Markierung, die im äußeren Ring des Endothels lokalisiert ist, und jener, bei der es sich um Gefäß-unabhängige Zellen und somit um Myofibroblasten handeln könnte.

Die IF-Analyse mit der Antikörperkombination Maus anti-CD31 (1:400) und Kaninchen anti- $\alpha$ -SMA (1:100) wurde an den Hautdünnschnitten von fünf Probanden durchgeführt (siehe Tabelle 3.5). Dabei mussten für ein starkes und eindeutiges Färberesultat mehrere Optimierungen vorgenommen werden. So wurden Variationen in den Antikörperkonzentrationen der Primärantikörper und der Sekundärantikörper vorgenommen. Eine zum Teil schwache Endothelfärbung blieb trotz der Optimierungen in einigen Proben erhalten. Aufgrund der spezifischen Färbung von  $\alpha$ -SMA und der modernen Visualisierungstechnik mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero<sup>®</sup> BZ-8000 (vgl. Kap. 4.3.1) war es möglich, Einzel- und Doppelmarkierungen voneinander zu unterscheiden. In Abbildung 5.10 sind Auszüge aus den IF-Untersuchungen der SB- und Kontrollareale eines Probanden dargestellt. Neben der Analyse beider Hautareale des ersten Zeitpunktes der Stanzbiopsie-Entnahme wurde als Positivkontrolle eine Hautprobe aus einer internen Studie der Beiersdorf AG herangezogen. Die in dieser Studie mit einem Fraxel-Laser behandelten Hautareale sollten mit großer Wahrscheinlichkeit Myofibroblasten aufweisen. Ein vereinzelt Auftreten konnte identifiziert werden, allerdings betrug die Anzahl pro Hautschnitt maximal 1-2  $\alpha$ -SMA positive und CD31 negative Zellen. Bei den Untersuchungen der Proben aus der PIH-Studie zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der SB-Entnahme konnte in den SB- und Kontrollarealen kein einziger Myofibroblast nachgewiesen werden. Auffallend war jedoch ein erhöhtes Auftreten von  $\alpha$ -SMA positiven und CD31 positiven Zellen in Form von mikrovaskulären Blutgefäßen im *Stratum papillare* hyperpigmentierter Areale.



**Abbildung 5.10: Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Triple-Färbung von  $\alpha$ -SMA, CD31 und Laminin-5 an PIH- und Kontrollarealen zur Identifizierung von Myofibroblasten.**

(K = „Negativkontrolle“; + K = „Positivkontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnungen: anti- $\alpha$ -SMA 1:100; anti-CD31 und anti-Laminin-5 1:400; DAPI 1:3000)

5  $\mu$ m dicke Gefrierdünnschnitte aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs (n = 5) aus der PIH-Studie, in welcher Saugblasen gezogen und eine PIH induziert wurde, wurden mit den monoklonalen Antikörpern Maus anti-CD31 (grün) und Maus anti-Laminin-5 (grün) und dem polyklonalen Antikörper Kaninchen anti- $\alpha$ -SMA (rot) co-gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Zur fluoreszenzbasierten Visualisierung wurden die Sekundärintikörper Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus (TRITC-Filter) und Alexa Fluor 647 Ziege anti-Kaninchen (Cy5-Filter) eingesetzt. A, C und E zeigen Mosaikaufnahmen, d. h. eine Aneinanderreihung mehrerer großflächig aufgenommener Bilder. A und B stellen ein Kontrollareal und C und D ein PIH-Areal eines Probanden zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Ziehen der Saugblasen dar. B, D und F sind jeweils Vergrößerungsaufnahmen der rot markierten Rechtecke in A, C und E. E und F zeigen eine aus einer Fraxel-Laser-Studie herangezogene Positivkontrolle. Zur übersichtlicheren Betrachtung des Hautdünnschnittes und zur Erkennung der Basalmembran wurde Laminin-5 immunmarkiert.  $\alpha$ -SMA positive und CD31 negative Zellen waren in der Positivkontrolle kaum nachzuweisen. Die vergrößerte Darstellung in F zeigt eine solche Zelle, bei welcher es sich um einen Myofibroblasten handeln könnte. Es wird mit einem weißen Pfeil darauf hingewiesen. In den SB-Arealen und den

Negativkontrollen wurde kein einziger Myofibroblast identifiziert. B zeigt ein angeschnittenes, reifes Gefäß, in dessen Inneren die Endothelzellen (grün) und perivaskulär die Muskelzellen (rot) lokalisiert sind. Im SB-Areal (C) tritt eine größere Anzahl an mikrovaskulären Blutgefäßen auf als in der Kontrolle (A), insbesondere im *Stratum papillare*. (Vergrößerung der Mosaikaufnahmen (A, C und E): 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm; Vergrößerung (B, D und F): 20-fach; Maßstabsbalken: 50 µm)

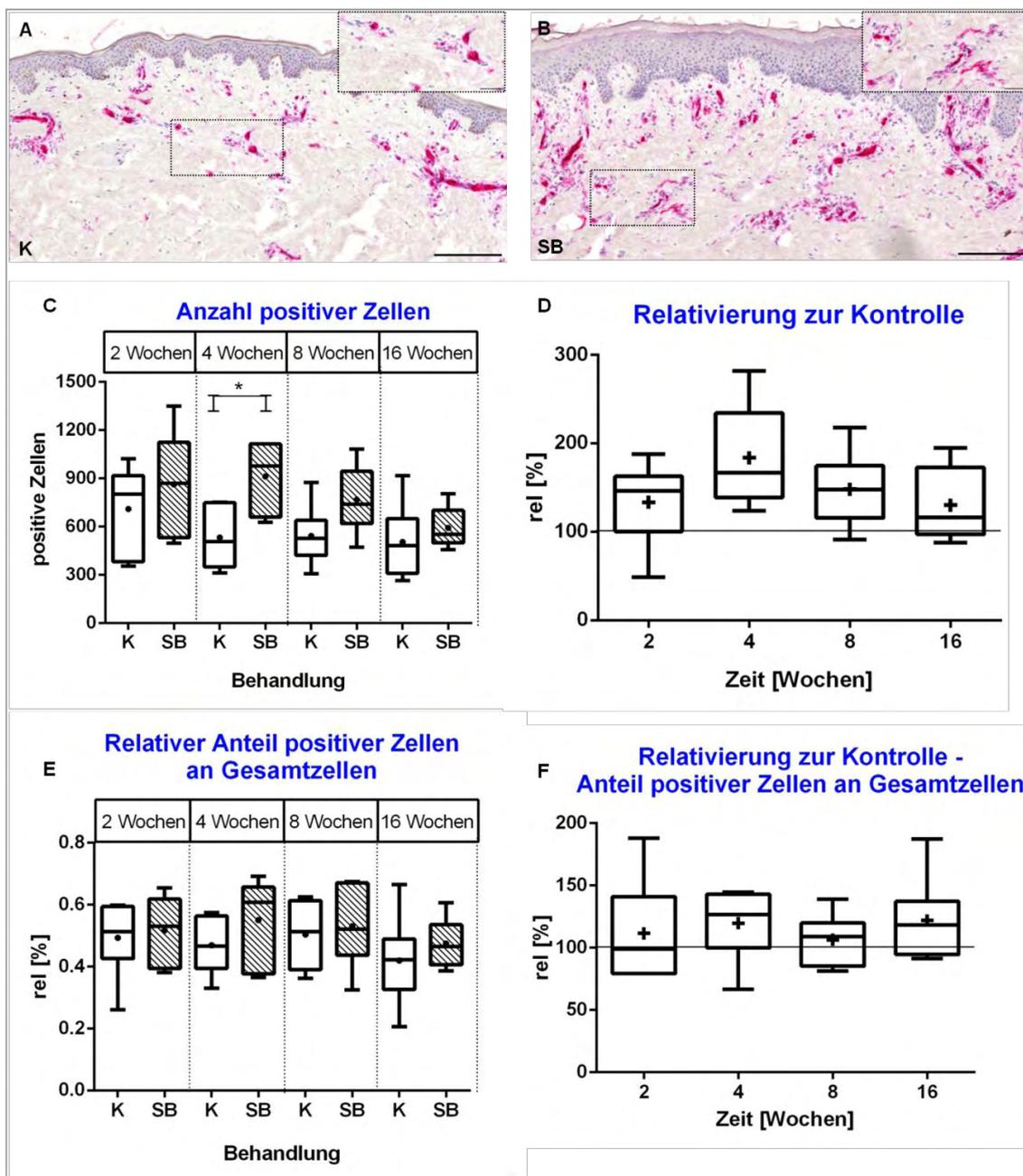
### 5.3.3 Untersuchung der Endothelzellen

Gemäß der Erkenntnisse der IF-Analysen in Kap. 5.3.2 sollte eine Veränderung an dermalen Blutgefäßen bei der PIH näher untersucht werden. Eine Zunahme an Endothelzellen im *Stratum papillare* hyperpigmentierter Areale konnte exemplarisch beobachtet werden. Diese Beobachtung und eine allgemeine Vergrößerung der Gefäßzellen wurde auch von Iriyama *et al.* (2011) bei der Dyspigmentierung des *Lentigo senilis*, des Altersflecks, beschrieben.

Für eine Markierung der Endothelzellen zur anschließenden Quantifizierung wurde ein Antikörper gegen CD31 (PECAM-1) verwendet. CD31 wird auf frühen und reifen Endothelzellen stark exprimiert und gilt als spezifischster und sensitivster Endothelzellmarker (Luttmann *et al.* 2006).

In Abbildung 5.11 werden die Färbeargebnisse mit dem monoklonalen Antikörper Maus anti-CD31 in einer Verdünnung von 1:200 an exemplarischen Hautdünnschnitten gezeigt (siehe Tabelle 3.5). Zusätzlich sind die quantifizierten Daten, die aus sechs Probanden gewonnen und auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche normiert wurden, dargestellt.

Für den Zeitpunkt vier Wochen nach dem Ziehen der SB ergab sich eine signifikant höhere Zellzahl im SB-Areal verglichen mit der Referenz ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.11 C; vgl. Anhang 9.3). Die vorliegenden Auswertungen dokumentieren eine Erhöhung von 66,8 %. Zwei Wochen nach der SB-Entnahme wurde eine Erhöhung von 46 % im Vergleich zur Kontrolle berechnet (siehe Abbildung 5.11 D). Morphologisch konnte anhand der immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte lediglich eine vermehrte Positivmarkierung zu beiden Zeitpunkten beobachtet werden ohne weitere Unterschiede in den Färbeintensitäten festzustellen. Werden die absoluten Zellzahlen auf die Gesamtzellzahl bezogen, besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Arealen (siehe Abbildung 5.11 E; vgl. Anhang 9.3). Zum ersten Zeitpunkt ist keine Erhöhung des Anteils CD31 positiver Zellen an den Gesamtzellen zu dokumentieren. Auffallend ist, dass vier Wochen nach dem Ziehen der SB der Anteil positiver Zellen in hyperpigmentierter Haut das Kontrollniveau um 26 % übersteigt (siehe Abbildung 5.11 F). Der Unterschied in der Höhe der positiven Zellzahlen und der auf die Gesamtzellzahl relativierten positiven Zellzahlen findet sich darin begründet, dass die Beobachtungen und Quantifizierungen eine größere Gesamtzellzahl im SB-Areal zeigten. Somit kann für die Zunahme der CD31 positiven Zellen gegenüber der Kontrolle unter Berücksichtigung der Zunahme der Gesamtzellzahl keine Signifikanz verzeichnet werden (siehe Abbildung 5.11 E; vgl. Anhang 9.3). Zum letzten untersuchten Zeitpunkt liegen sowohl die positiven Zellzahlen als auch deren Anteile an den Gesamtzellen im Areal der PIH noch um 16–18 % über dem Kontrollniveau (siehe Abbildung 5.11 D und F).



**Abbildung 5.11: Histologische und quantitative Ergebnisse der CD31 positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:200)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich CD31 positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-CD31 sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. CD31 positive Immunreaktionen treten vermehrt im SB-Areal (B) auf. Eine jeweils exemplarische Region der Färbegergebnisse wird in A und B in der rechten, oberen Bildecke vergrößert gezeigt. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200 µm; Vergrößerung der Kleinaufnahmen: 40-fach; Maßstabsbalken: 50 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm<sup>2</sup> dermale Fläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil CD31 positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und der Punkt bzw. das Kreuz das arithmetische Mittel. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten

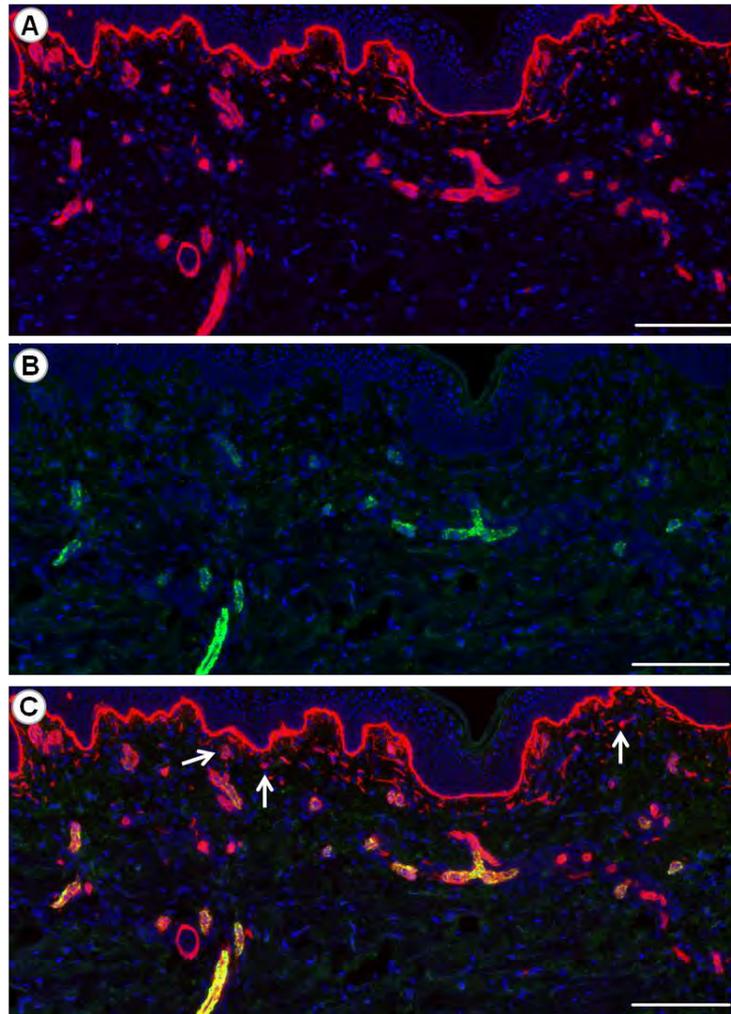
relativiert ( $\text{rel} = \text{SB} / \text{K} * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> Dermisfläche CD31 positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Der Unterschied zwischen den Arealen ist vier Wochen nach der SB-Entnahme signifikant ( $p = 0,0313$ ) und wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Zunahme an CD31 positiven Zellen in hyperpigmentierter Haut stattfindet, die vier Wochen nach der SB-Entnahme ihr Maximum erreicht (siehe Abbildung 5.11 C). Die Zunahme der Gesamtzellzahl in epidermaler Nähe wird häufig im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion - die PIH eingeschlossen - beschrieben und als dermales Infiltrat bezeichnet. Da das dermale Infiltrat auf eine Erhöhung einer Vielzahl verschiedener Zelltypen schließen lässt, ist bei der Analyse der CD31 positiven Zellen besonders die allgemeine Betrachtung einer Zellzahlzunahme wichtig.

Da das Zelladhäsionsmolekül CD146 („melanoma cell adhesion molecule“, MCAM) u. a. auf Endothelzellen exprimiert wird, wurde es im Zusammenhang mit der Quantifizierung von Endothelzellen bei der PIH näher untersucht. Anhand der Doppelfärbung gegen die Oberflächenmarker CD146 und CD31 können mikrovaskuläre Blutgefäße nachgewiesen werden. Daher wurde für eine erweiterte Analyse der Expression von Gefäßzellen in SB- und Kontrollarealen mit den monoklonalen Antikörpern Kaninchen anti-CD31 und Maus anti-Human MCAM/CD146 (siehe Tabelle 3.5) eine Co-Färbung mittels IF an Hautproben von drei Probanden durchgeführt (siehe Abbildung 5.12).

Die Co-Lokalisation von CD146 und CD31 weist auf Endothelzellen hin, da diese beide Oberflächenmarker tragen (Li *et al.* 2003). Bei den CD146 positiven Zellen, die zusammen mit den CD31 positiven Zellen auftreten, handelt es sich um perivaskuläre Zellen, welche auch Perizyten genannt werden und für die Gefäßneubildung wichtig sind (Dellavalle *et al.* 2007). Bei den CD146 positiven Zellen, die z. B. entlang der BM lokalisiert sind, könnte es sich um mesenchymale Progenitorzellen handeln (Sorrentino *et al.* 2008).

Die bereits quantitativ ermittelten Ergebnisse bezüglich eines tendenziell verstärkten Auftretens von Endothelzellen in Arealen einer induzierten PIH und deren Lokalisation im Bereich der oberen 300-500 µm der Dermis konnten mit der IF-Analyse bestätigt werden. Aussagen über quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten können anhand der IF-Bilder nicht getroffen werden, da sich die Resultate der Positivmarkierungen kaum voneinander unterscheiden. Eine Co-Lokalisation der Markierungen von CD146 und CD31 war in allen Proben zu beobachten. Zusätzlich traten Einzelmarkierungen mit dem Progenitorzellmarker CD146 einerseits entlang der BM und andererseits um die Gefäße, also perivaskulär, auf (siehe Abbildung 5.12).



**Abbildung 5.12: Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Triple-Färbung von CD31, CD146 und Laminin-5 an einem PIH-Areal zur Charakterisierung des Endothels.**

(Antikörperverdünnungen: anti-CD31 1:500; anti-CD146/MCAM 1:500; anti-Laminin-5 1:400; DAPI 1:3000)

5  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierdünnschnitte aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs ( $n = 6$ ) aus der PIH-Studie, in welcher Saugblasen gezogen und eine PIH induziert wurde, wurden mit den monoklonalen Antikörpern Kaninchen anti-CD31 (grün), Maus anti-CD146 (rot) und Maus anti-Laminin-5 (rot) co-gefärbt. Zur übersichtlicheren Betrachtung des Hautdünnschnittes und zur Erkennung der Basalmembran wurde Laminin-5 immunmarkiert. Die fluoreszenzbasierte Visualisierung wurde anhand der Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus (TRITC-Filter) und Alexa Fluor 647 Ziege anti-Kaninchen (Cy5-Filter) möglich. A zeigt das Färberegebnis der CD146-Markierung und B jenes der CD31-Markierung. In der Darstellung der überlagerten Fluoreszenzkanäle in C wird eine Vielzahl von CD146 positiven Zellen in der Nähe der Basalmembran (mit weißen Pfeilen wird exemplarisch darauf hingewiesen) und eine perivaskuläre Lokalisation von CD146 positiven Zellen ersichtlich. Die Aufnahme beschränkt sich auf das *Stratum papillare* und den oberen Bereich des *Stratum reticulare*, da dort der Großteil der mikrovaskulären Blutgefäße lokalisiert ist. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ )

### 5.3.4 Untersuchung des Immunzellstatus

Die Beobachtung eines dermal-entzündlichen Infiltrats in der SB-induzierten PIH erfolgte bereits in vorangegangenen, internen Arbeiten der Beiersdorf AG. Dabei wurden immunhistochemische Färbungen zur Untersuchung von Immunzellen gegen CD45, ein allgemeines Oberflächenantigen für Leukozyten, durchgeführt. Die Ergebnisse der zusätzlichen Markierung von Monozyten/Makrophagen mit einem spezifischen Marker gegen das Oberflächenprotein CD14 ließen vermuten, dass CD45 nicht

auf allen Immunzellen des dermalen Infiltrats exprimiert wird und eine weitere Charakterisierung notwendig ist. Die Vorgehensweise zur Erfassung der Gesamtheit der Immunzellen in der Dermis ist identisch zu jener der Melanozytenmarkierung in Kapitel 5.1.3. Es wurde mit einem Antikörper-Cocktail aus vier Antikörpern versucht, die Mehrheit aller Immunzellen zu markieren und die Ergebnisse mit der Immunzellmarkierung eines einzelnen Antikörpers gegen CD45 in Korrelation zu setzen. Zusätzlich wurden die Mastzellen als wichtige Entzündungsmediatoren quantitativ untersucht, um die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen anhand eines alternativen Mastzellmarkers zu untermauern.

#### **5.3.4.1 Nachweis von CD45, CD68, CD14 und Mastzelltryptase positiven Zellen anhand einer Markerkombination**

Für die immunhistochemische Markierung von Immunzellen wurde ein Antikörper-Cocktail eingesetzt, bestehend aus polyklonalem anti-CD45, monoklonalem anti-CD68, monoklonalem anti-CD14 und monoklonalem anti-Mastzelltryptase Antikörper (siehe Tabelle 3.5).

CD45, auch „leukocyte common antigen“ (LCA) genannt, ist eine hämatopoetisch-spezifische, membranlokalisierte Tyrosinphosphatase, die in mehreren Isoformen existiert. Die Expression verschiedener CD45-Isoformen ist zelltypspezifisch und hängt vom Differenzierungsgrad und Aktivierungsstatus der Zellen ab. Dieses Glykoprotein ist für eine effiziente Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion von B- und T-Zellen wichtig (Tchilian und Beverley 2006). Da es häufig als Marker für hämatopoetische Stammzellen außer Erythrozyten und Thrombozyten dient, wird der Antikörper anti-CD45 in dieser Arbeit zur Markierung verschiedener Leukozytenpopulationen eingesetzt.

Zur spezifischen Markierung von Monozyten und Makrophagen wurden die Antikörper anti-CD68 und anti-CD14 verwendet. CD68, ein Mitglied der lysosomal- oder endosomal-assoziierten Membranglykoprotein-Familie wird von menschlichen Monozyten und Gewebsmakrophagen stark exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde anti-CD68, wie auch in Untersuchungen der Altersfleckbedingten Hyperpigmentierung von Ünver *et al.* (2006), als Makrophagenmarker eingesetzt und diente zur Ergänzung der Markierung mittels anti-CD14. Dieser ist ebenfalls ein Monozyten-/Makrophagenmarker, reagiert aber neben perivaskulären Makrophagen und Langerhans-Zellen hauptsächlich mit peripheren Blutmonozyten (Dako 2004). CD14 wird auf der Oberfläche zur Erkennung von Endotoxinen exprimiert. Daher wird der Antikörper gegen CD14 auch Lipopolysaccharid-Rezeptor genannt.

Die zusätzliche Verwendung von anti-Mastzelltryptase sollte Mastzellen markieren, die eine weitere, zu den Leukozyten gehörende und für das Immunsystem wichtige Gruppe an Blutzellen darstellen. Der Antikörper reagiert ausschließlich mit Mastzellen, da die humane Mastzelltryptase als bedeutender Marker der Mastzellaktivierung und als wichtiger Entzündungsmediator gilt. Sie wird

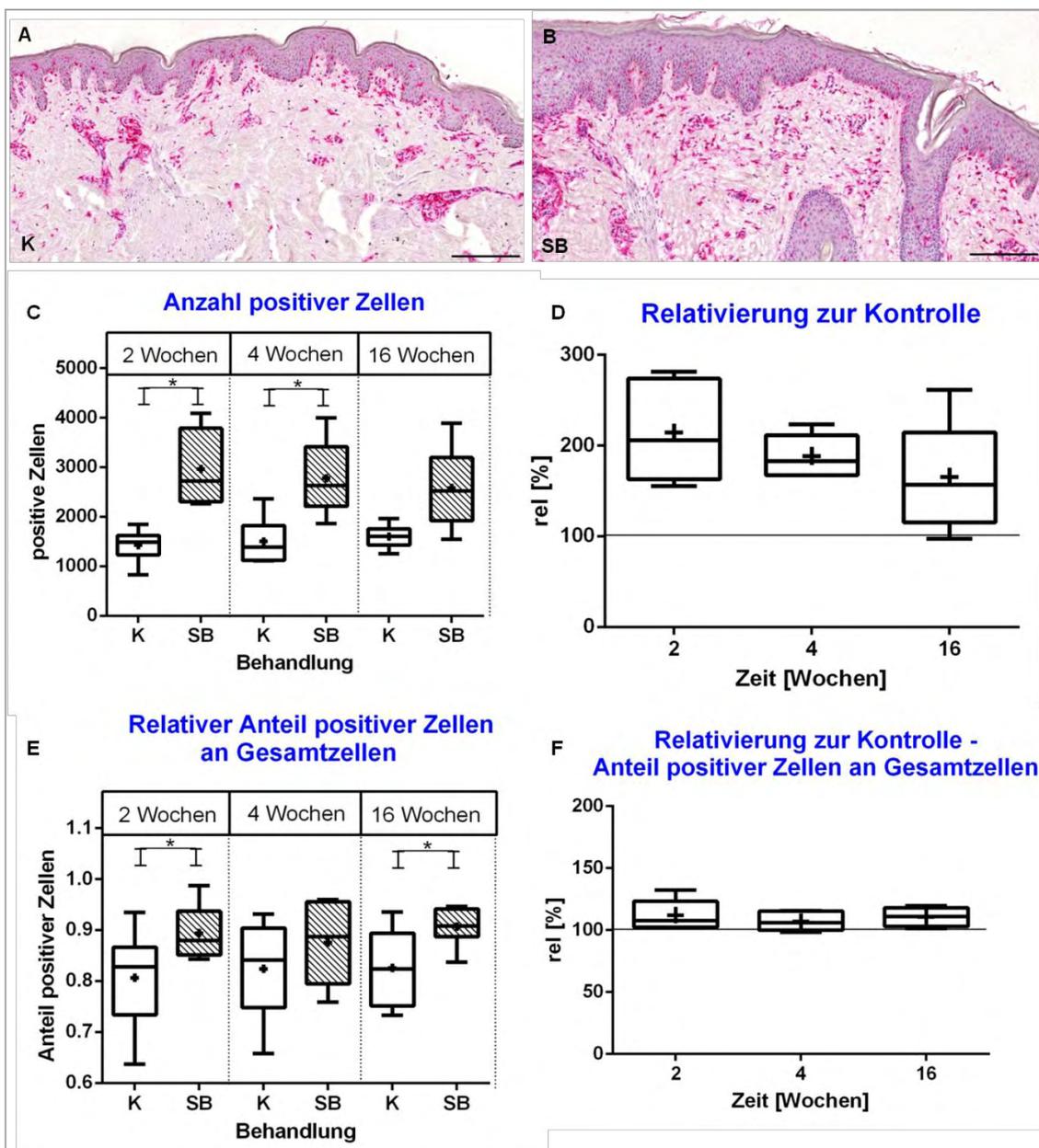
über die Mastzelldegranulation mit einer Reihe anderer Mediatoren extrazellulär freigesetzt. Die Mastzelltryptase übernimmt eine entscheidende Rolle in inflammatorischen und akuten, allergischen Reaktionen. Die erhöhte Freisetzung von Mastzelltryptase wird von Antigenen mit membrangebundenen IgE-Immunglobulinen ausgelöst, da diese die IgE-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche binden (Payne und Kam 2004).

Die Antikörper wurden in den Verdünnungen 1:1500 für anti-CD45, 1:600 für anti-CD68, 1:20 für anti-CD14 und 1:400 für anti-Mastzelltryptase eingesetzt (siehe Tabelle 3.5).

In Abbildung 5.13 werden die Färbeergebnisse mit den vier in Kombination eingesetzten Antikörpern an exemplarischen Hautdünnschnitten gezeigt. Zusätzlich sind die quantifizierten Daten aus sechs Probanden zu drei Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Die Quantifizierungsergebnisse wurden auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche normiert.

Qualitativ zeigte sich durch die Verwendung der Antikörperkombination eine intensive Rotfärbung aller Schnitte. Jedoch war, wie auch aus Abbildung 5.13 A und B ersichtlich wird, ein Unterschied in der Färbeintensität zwischen SB- und Kontrollarealen wahrnehmbar. Anhand der erhobenen Daten konnte der deutliche Anstieg an positiven Zellen in den SB-Arealen bestätigt werden. Zwei und vier Wochen nach dem Ziehen der SB wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Arealen errechnet ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.13 C; vgl. Anhang 9.3). Nach zwei Wochen ist die Anzahl an CD45, CD68, CD14 und Mastzelltryptase positiven Zellen im SB-Areal doppelt so groß wie in der Referenz. Nach vier Wochen liegt sie noch 82 % über dem Kontrollniveau und nach 16 Wochen ist sie trotz eines zu verzeichnenden Rückgangs immer noch um 56 % erhöht (siehe Abbildung 5.13 D). Die geringe Streuung der Kontrolldatensätze und die Tatsache, dass sie sich auf fast identischem Niveau befinden, weisen auf eine stabile Quantifizierung hin (siehe Abbildung 5.13 C).

Signifikante Zunahmen in den SB-Arealen finden sich auch bei Betrachtung der Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl wieder ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.13 E; vgl. Anhang 9.3). Eine signifikante Erhöhung lässt sich zum ersten und letzten Untersuchungszeitpunkt nach der SB-Entnahme dokumentieren. Anders als bei Betrachtung der absoluten Zellzahl konnte vier Wochen nach dem Ziehen der SB kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (vgl. Anhang 9.3). Eine Zunahme der Anteile positiver Zellen an den Gesamtzellen in hyperpigmentierter Haut, die in Abbildung 5.13 F durch die Relativierung zur Kontrolle prozentual dargestellt wird, ist nur geringfügig zu dokumentieren. Der zu verzeichnende Anstieg liegt zwischen 5 und 10 %. Dies bedeutet, dass die positiven Zellen in den SB-Arealen gegenüber den Kontrollarealen um geringfügig mehr als denselben Faktor angestiegen sind wie die Gesamtzellzahl. Auch gibt es zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten kaum Unterschiede. Somit finden sich selbst noch am Studienende im SB-Areal mehr positive Zellen anteilig zu den Gesamtzellen als im Kontrollareal.



**Abbildung 5.13: Histologische und quantitative Ergebnisse der CD45, CD68, CD14 und Mastzelltryptase positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnungen: anti-CD45 1:1500; anti-CD68 1:600; anti-CD14 1:20; anti-Mastzelltryptase 1:4000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich des dermal-entzündlichen Infiltrats an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit der Antikörperkombination sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Immunpositive Reaktionen treten verstärkt im SB-Areal (B) auf. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm<sup>2</sup> dermale Fläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil CD45, CD68, CD14 und Mastzelltryptase positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine

Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> Dermisfläche positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Die absolute Zellzahl war zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der SB-Entnahme im SB-Areal signifikant erhöht ( $p = 0,0313$ ). Anteilig zur Gesamtzellzahl wurde eine Signifikanz nach zwei und 16 Wochen dokumentiert ( $p = 0,0313$ ). Das Signifikanzniveau der Unterschiede wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

### 5.3.4.2 Nachweis von CD45 positiven Zellen

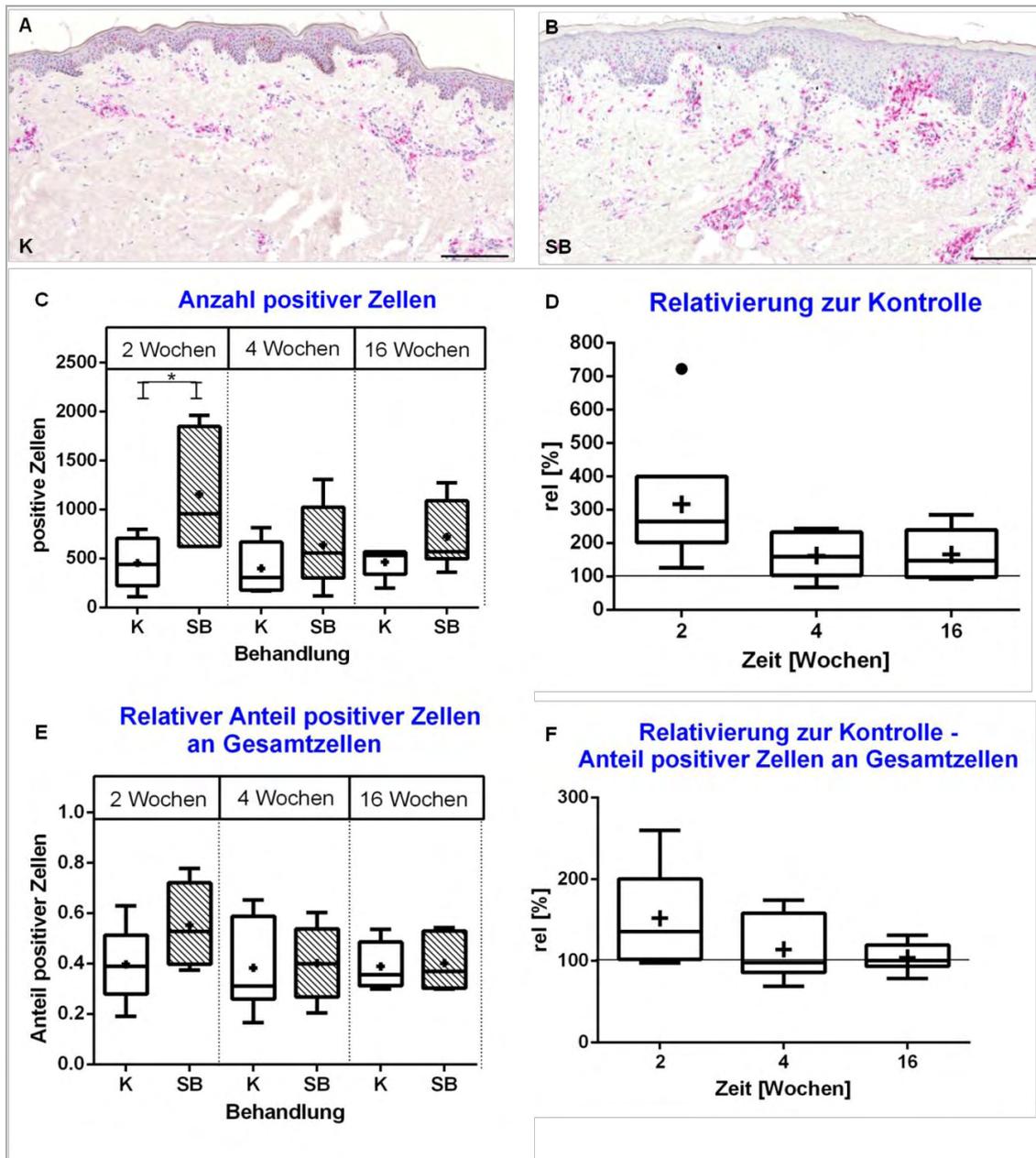
Die quantitative Untersuchung von Immunzellen, welche den Oberflächenmarker CD45 exprimieren, diente als Vergleich zur Immunzellzahl, die mit der in Kap. 5.3.4.1 beschriebenen Antikörperkombination detektiert wurde.

In Abbildung 5.14 werden einerseits die Färbeergebnisse mit dem polyklonalen Antikörper Kaninchen anti-CD45 in einer Verdünnung von 1:1500 an exemplarischen Hautdünnschnitten dargestellt. Andererseits können daraus die quantifizierten Daten, die aus sechs Probanden gewonnen und auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche normiert wurden, entnommen werden.

Qualitativ betrachtet ergibt sich mit der Einzelfärbung gegen CD45 eine schwächere immunpositive Färbung als mit der Antikörperkombination zur Markierung der Gesamtheit an Immunzellen. Dennoch lässt sich im SB-Areal vorwiegend zum ersten Untersuchungszeitpunkt eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl und gleichzeitig der positiv markierten Zellen gegenüber der Kontrolle beobachten (siehe Abbildung 5.14 A und B). Die positiven Zellen befinden sich zum Großteil in direkter Epidermisnähe bzw. im Bereich des *Stratum papillare*. In den tieferen Schichten der Dermis geht die Anfärbung gänzlich verloren.

Die vorliegenden, quantitativen Ergebnisse dokumentieren einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0313$ ) zwischen SB- und Kontrollarealen zum Untersuchungszeitpunkt zwei Wochen nach der SB-Entnahme (siehe Abbildung 5.14 C; vgl. Anhang 9.3). Verglichen mit der Referenz wurde eine Zunahme der Anzahl positiver Zellen um das ca. 1,6-fache berechnet. In diesem Datensatz tritt auch ein Extremwert auf, der um mehr als das 6-fache über dem Kontrollniveau liegt (siehe Abbildung 5.14 D). Im Verlauf der Wochen geht die Zellzahl langsam zurück und liegt nach vier Wochen um 59 % und am Studienende um weiterhin 47 % über dem Kontrollniveau.

Der relative Anteil CD45 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl ist im SB-Areal zum ersten Untersuchungszeitpunkt ebenfalls deutlich erhöht, allerdings ist die Erhöhung aufgrund der Streuung der Datenpunkte nicht signifikant (siehe Abbildung 5.14 E; vgl. Anhang 9.3). Relativiert auf die Referenz beträgt die Zunahme des Anteils positiver Zellen im SB-Areal zum Zeitpunkt zwei Wochen nach Induktion der PIH ca. 36 % (siehe Abbildung 5.14 F). Nach weiteren zwei Wochen ist keine Zunahme mehr zu verzeichnen und die Anteile beider Areale befinden sich auf einem Niveau. Der Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen im SB-Areal ist somit identisch zu jenem im Kontrollareal.



**Abbildung 5.14: Histologische und quantitative Ergebnisse der CD45 positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:1500)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich des dermal-entzündlichen Infiltrats an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-CD45 sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. CD45-immunpositive Reaktionen treten verstärkt im SB-Areal (B) auf. (Vergrößerung: 10-fach; Maßstabsbalken: 200 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm<sup>2</sup> dermale Fläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil CD45 positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Extremwerte werden als gefüllter Punkt dargestellt und sind nicht mit der Box verbunden. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen

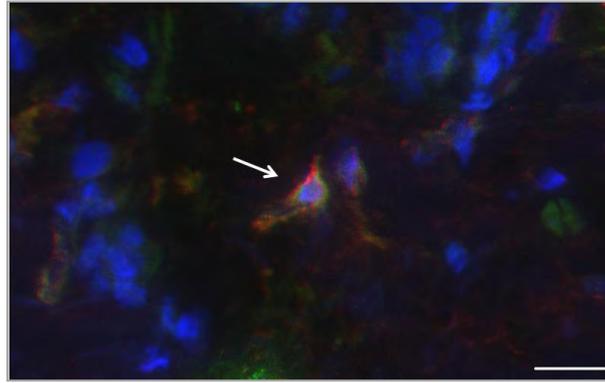
größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> Dermisfläche CD45 positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \frac{\text{Anteil positiver Zellen SB}}{\text{Anteil positiver Zellen K}} * 100$ ) (F). Der Unterschied in absoluter Zellzahl zwischen SB- und Kontrollarealen war zwei Wochen nach der SB-Entnahme signifikant ( $p = 0,0313$ ). Das Signifikanzniveau wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der Markierung gegen CD45 weniger Immunzellen als mit der Kombinationsmarkierung erfasst wurden (vgl. Kap. 5.3.4.1).

### 5.3.4.3 Nachweis von c-Kit positiven Zellen

Zur genaueren Beschreibung des dermal-entzündlichen Infiltrats wurde die Mastzellpopulation in der PIH näher charakterisiert. Mehrfach wird in der Literatur die Mastzelle im Zusammenhang mit Entzündungen und der Wundheilung beschrieben (Janssens *et al.* 2005; Theoharides und Cochrane 2004; Zoog *et al.* 2009). In internen Arbeiten der Beiersdorf AG wurden Gefrierdünnschnitte aus der PIH-Studie bereits gegen die Mastzell-spezifische Tryptase immungefärbt. Dabei wurde in den SB-Arealen eine Erhöhung der Mastzellzahl nach vier, acht und 16 Wochen detektiert. Das Mastzellinfiltrat wurde in der vorliegenden Arbeit durch Adressierung eines weiteren Mastzell-spezifischen Proteins auf eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit jenen der Mastzelltryptase-Färbung näher untersucht. Dafür wurde der Oberflächenmarker CD117 bzw. c-Kit herangezogen, der mit seinem Liganden SCF nicht nur eine essenzielle Rolle in der Stimulierung epidermaler Melanozyten einnimmt, sondern auch zur Proliferation dermalen Mastzellen beiträgt (Kang *et al.* 2006). Das Zellmembran-lokalisierte Protein c-Kit ist ein Mitglied der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Signalwege, die durch den c-Kit-Rezeptor vermittelt werden, können maßgeblich die Mastzell-sekretorischen Mechanismen beeinflussen und auch die Migration und Entwicklung von Mastzellen regulieren. Interaktionen zwischen c-Kit und seinem Ligand beeinflussen alle entscheidenden Aspekte der Mastzellbiologie (Galli *et al.* 1993).

Für den Nachweis, dass mit dem Antikörper anti-CD117/c-Kit in der Dermis lediglich Mastzellen markiert werden, wurde anhand einiger Probeschnitte eine Doppelfärbung mittels IF gegen Mastzelltryptase und c-Kit durchgeführt. Die nachfolgende Identifizierung einer co-lokalisierten Markierung bestätigte, dass c-Kit auf Mastzellen exprimiert wird. Eine solche Doppelmarkierung wird anhand einer exemplarischen Mastzelltryptase- und c-Kit-positiven Zelle in Abbildung 5.15 gezeigt.



**Abbildung 5.15: Exemplarische, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle mit co-lokalisierter c-Kit- und Mastzelltryptase-Markierung.**

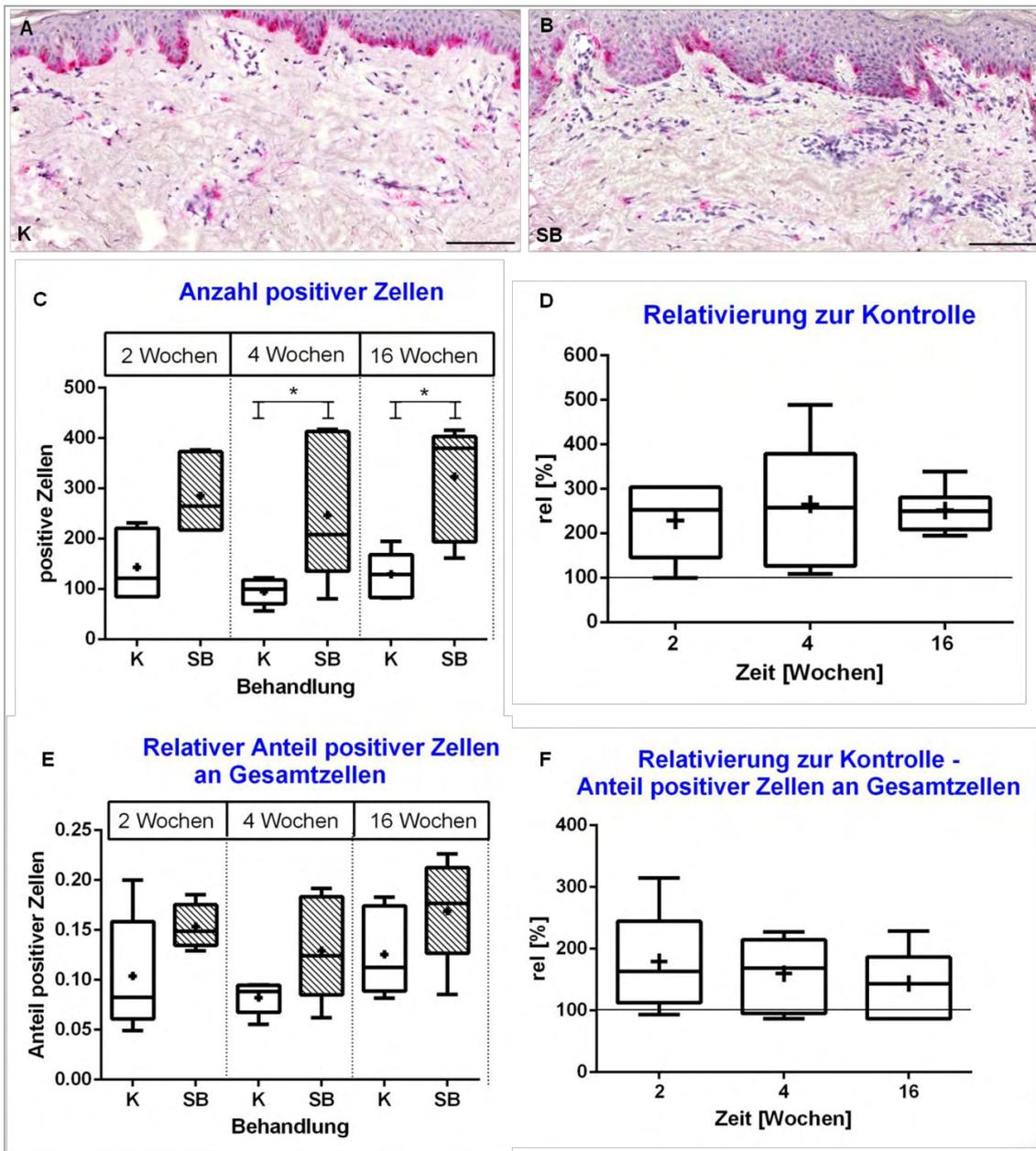
(Antikörperverdünnungen: anti-Mastzelltryptase 1:4000; anti-CD117/c-Kit 1:100; DAPI 1:3000)

Ein 5 µm dicker, exemplarischer Gefrierdünnschnitt eines Probanden aus der PIH-Studie, in der Saugblasen gezogen und eine PIH induziert wurde, wurde mit dem monoklonalen Antikörper Maus anti-Mastzelltryptase (grün) und dem polyklonalen Antikörper Kaninchen anti-CD117/c-Kit (rot) co-gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Zur fluoreszenzbasierten Visualisierung wurden die Sekundärantikörper Alexa Fluor 546 Ziege anti-Maus (TRITC-Filter) und Alexa Fluor 647 Ziege anti-Kaninchen (Cy5-Filter) eingesetzt. Der weiße Pfeil deutet exemplarisch auf eine Mastzelle hin, welche anhand einer Co-Lokalisation von c-Kit und Mastzelltryptase charakterisiert wird. (Vergrößerung: 70-fach; Maßstabsbalken: 20 µm)

In Abbildung 5.16 werden die Färberegebnisse mit dem Antikörper anti-CD117/c-Kit an exemplarischen Hautdünnschnitten gezeigt. Zusätzlich sind die quantifizierten Daten aus sechs Probanden zu drei Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Die Quantifizierungsergebnisse wurden auf 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche normiert.

Bei Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Hautdünnschnitte treten c-Kit-Positivmarkierungen, unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt, vermehrt in den SB-Arealen auf. Auffallend gegenüber anderen untersuchten und bereits beschriebenen Zelltypen ist, dass c-Kit positive Zellen relativ homogen in der Dermis verteilt sind (siehe Abbildung 5.16 A und B).

Die quantifizierten Daten dokumentieren die Zunahme c-Kit positiver Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten. Der Unterschied zwischen SB- und Kontrollarealen zeigt eine Signifikanz nach vier und nach 16 Wochen nach der SB-Entnahme, also zu den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten ( $p = 0,0313$ ) (siehe Abbildung 5.16 C; vgl. Anhang 9.3). Die Zunahme der positiven Zellzahl in hyperpigmentierter Haut ist gegenüber der Referenz über die gesamte Studiendauer um mehr als den Faktor zwei erhöht. So beträgt die Zunahme c-Kit positiver Zellen in den SB-Arealen gegenüber den Kontrollarealen 150-158 % (siehe Abbildung 5.16 D). Zum Zeitpunkt vier Wochen nach der SB-Entnahme wird der größte Anstieg von 158 % dokumentiert. Ein ähnliches Bild zeigen die berechneten, relativen Anteile der positiven Zellen an den Gesamtzellen, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen den Arealen (siehe Abbildung 5.16 E). Auch hier wird zu allen Untersuchungszeitpunkten eine Zunahme der relativen Anteile in den SB-Arealen beobachtet. Diese Zunahme lässt sich aus den zur Kontrolle relativierten Daten ablesen. So macht Abbildung 5.16 F deutlich, dass anteilig zur Gesamtzellzahl die c-Kit positiven Zellen zwischen 43 und 68 % über dem Kontrollniveau liegen. Auch hier tritt die größte Zunahme von 68 % zum zweiten Untersuchungszeitpunkt auf.



**Abbildung 5.16: Histologische und quantitative Ergebnisse der c-Kit positiven Zellen.**

(K = „Kontrolle“; SB = „Saugblase“ und steht für ein Areal, wo eine Saugblase gezogen und eine PIH induziert wurde; Antikörperverdünnung: 1:1000)

Es wurden histologische Untersuchungen hinsichtlich c-Kit positiver Zellen an 5 µm dicken Gefrierdünnschnitten aus Hautstanzen eines Probandenkollektivs aus der PIH-Studie durchgeführt. Je Proband wurden zwei Areale (K und SB) zu den Zeitpunkten zwei, vier und 16 Wochen nach dem Ziehen von Saugblasen näher untersucht. Die dargestellten Hautausschnitte (A und B) stammen von einem Probanden zwei Wochen nach der SB-Entnahme. Qualitativ zeigt die IHC-Färbung mit anti-CD117/c-Kit sowohl in gesunder Kontrollhaut (A) als auch in PIH-Arealen (B) ein positives Ergebnis. Immunpositive Reaktionen sind vermehrt im SB-Areal zu beobachten. (Vergrößerung: 20-fach; Maßstabsbalken: 100 µm)

Nach der Quantifizierung der gefärbten Dünnschnitte mit NuclearQuant® und der Normierung der Ergebnisse auf 1 mm² dermale Fläche wurden vier unterschiedliche Ergebnisdarstellungen gewählt. Einerseits geben sie die experimentell erhobenen Originaldaten in zwei Darstellungsvarianten wieder (C und D). Andererseits zeigen sie relativierte Daten bezogen auf den Anteil c-Kit positiver Zellen an den Gesamtzellen (E und F).

Die Ergebnisdarstellung erfolgt mit Boxplots, welche in ihrer Box die mittleren 50 % der Ergebnismenge beinhalten. Die Querlinie in der Box repräsentiert den Median der Verteilung und das arithmetische Mittel ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. Die „Whiskers“ oder Antennen der zweiseitigen Streuung verbinden die Werte von 5 bis 95 % anteilig zur Ergebnismenge mit der Box. Minimum und Maximum werden mit einer Querlinie am Ende der „Whiskers“ gekennzeichnet. Die Ergebnisse werden in absoluten Werten in C ausgedrückt und für D wurden die absoluten SB-Werte zu den absoluten Kontrollwerten relativiert ( $rel = SB / K * 100$ ). Die horizontale Linie bei 100 % repräsentiert das Kontrollniveau, eine Basislinie für die zur Kontrolle relativierten SB-Werte (D). Liegen Werte oberhalb der Basislinie, so ist die Anzahl positiver Zellen in den SB-Arealen größer als die Anzahl positiver Zellen in den Kontrollarealen. Die Berechnung der in E

dargestellten Anteile der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl erfolgte durch Division der positiven Zellzahl durch die Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie viel Prozent der Gesamtzellzahl pro mm<sup>2</sup> Dermisfläche c-Kit positiv war. Auch der Anteil an den Gesamtzellen wurde zur Kontrolle relativiert ( $\text{rel} = \text{Anteil positiver Zellen SB} / \text{Anteil positiver Zellen K} * 100$ ) (F). Vier und 16 Wochen nach der SB-Entnahme wurde eine signifikante Erhöhung c-Kit positiver Zellen in hyperpigmentierter Haut berechnet ( $p = 0,0313$ ). Das Signifikanzniveau wird mit einem Stern gekennzeichnet (\*:  $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test;  $n = 6$ ).

## 6 Diskussion

*In vivo* sind eine Vielzahl von Stimuli als potenzielle, exogene Auslöser für eine PIH beschrieben, u. a. Schürf- und Kratzwunden, eingewachsene Barthaare, Insektenstiche, Medikamente und Trauma (Ortonne und Bissett 2008). Durch das Ziehen von SB wird eine Schädigung der Haut induziert, die zu einer Entzündung und Pigmentierungsreaktion führt. Aus diesem Grund wurde dieses Modell für die Untersuchungen pigmentierungsrelevanter Veränderungen bei der PIH herangezogen.

Über genaue physiologische Mechanismen, die zur Ausbildung einer PIH führen, ist bisher nur wenig bekannt, weshalb es Ziel dieser Analysen war, die an der PIH beteiligten, intrinsischen Faktoren und deren Zusammenspiel aufzuklären. Die Untersuchung der Zellpopulationen, die potenziell am Pigmentierungs- und Entzündungsgeschehen beteiligt sein könnten, kann wichtige Hinweise über die im Einzelnen daran beteiligten Signaltransduktionswege liefern.

### 6.1 Auswirkungen der Saugblasen-induzierten PIH auf die epidermale Morphologie und Basalmembran-Integrität

Die sichtbaren Veränderungen der postinflammatorischen, hyperpigmentierten Haut schließen v. a. eine Verdickung der gesamten Epidermis inklusive des *Stratum corneum*s und eine Verlängerung der Reteleisten ein (vgl. Kap. 5.1.1). Anhand der Untersuchungen histologischer Proben von 16 Probanden wurde eine durchschnittliche, mittlere Epidermisdicke zum ersten Untersuchungszeitpunkt (zwei Wochen nach dem Ziehen von SB) von  $142 \pm 40 \mu\text{m}$  im SB-Areal ermittelt. Die Zunahme gegenüber der Kontrolle betrug somit ca.  $60 \mu\text{m}$ . Eine kontinuierliche Abnahme wurde im weiteren Verlauf beobachtet, jedoch wurde das Kontrollniveau 16 Wochen nach der SB-Entnahme noch nicht erreicht. Mit der Verdickung geht die Ausbildung verlängerter, epidermaler Reteleisten einher, die bereits als typisches Charakteristikum im Zusammenhang mit einer anderen Form der Hyperpigmentierung, dem Altersfleck, beschrieben wurde (Noblesse *et al.* 2006). Da die Hypothese nahe liegt, dass die epidermale Hyperplasie, d. h. die Zunahme der Zellzahl, und die Verlängerung der Reteleisten auf eine Hyperproliferation zurückzuführen ist, wurde die Anzahl proliferierender Zellen in Proben von sechs Probanden mithilfe immunhistochemischer Färbungen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 ermittelt (vgl. Kap. 5.1.2). Zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Ziehen der SB konnte die doppelte Anzahl epidermaler Zellen und eine erhöhte Proliferationsrate dokumentiert werden. Obwohl die Zahl proliferierender Zellen sich um ca. 143 % erhöht hat, konnte keine signifikante Zunahme in den PIH-Arealen im Vergleich zur Umgebungshaut verzeichnet werden ( $p \geq 0,05$ ) (siehe Abbildung 5.3 C und D). Trotz einer Verdoppelung der Gesamtzellzahl hat ein Zuwachs teilungsaktiver Zellen von anteilig 56 % zur Gesamtzellzahl stattgefunden (siehe Abbildung 5.3 F). Dazu trägt vermutlich neben der durch die Hyperplasie bedingten, erhöhten Proliferation der

Keratinocyten eine gesteigerte, proliferative Aktivität der Melanozyten bei, worauf im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird. Die vorhandene Streuung der erhobenen Daten kann auf individuelle Schwankungen im Probandenkollektiv und nicht auf technische Fehler bei der Quantifizierung zurückgeführt werden, da die Immunfärbungen gegen Ki-67 klare, Zellkern-begrenzte Ergebnisse lieferten. Trotz fehlender Signifikanzen ist anhand der Analysen davon auszugehen, dass eine Hyperproliferation in der PIH stattfindet. Aufgrund fehlender Signifikanzen konnte dies jedoch nicht bewiesen werden. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt legen verschiedene Beobachtungen wie die Verdoppelung der Zellzahl und die verdickten, verlängerten Reteleisten die Vermutung nahe, dass bereits während der Entstehung der Entzündung, also direkt nach dem Ziehen der SB, eine vermehrte Teilung von transient amplifizierenden Zellen und/oder Stammzellen stattgefunden hat. Diese beiden Zellpopulationen ergeben zusammen die epidermale, proliferierende Einheit („epidermal proliferative unit“, EPU), welche die Produktion der Keratinocyten in der Epidermis steuert (Allen und Potten 1974; Ghazizadeh und Taichman 2001). Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen eines erhöhten, mindestens aber konstanten Proliferationsstatus in der PIH wurde in den hyperpigmentierten Arealen von Altersflecken eine verminderte Proliferationsrate ermittelt (Aoki *et al.* 2007). Es ist davon auszugehen, dass nach der Saugblasen-basierten Induktion einer PIH die epidermale Homöostase gestört ist. Eine zugrunde liegende Hyperproliferation könnte mit weiteren Analysen wie jene der Expression von Hyperproliferation-assoziierten Keratinen (K16 und K17) bestätigt werden. Es ist bereits bekannt, dass in der Haut bei verschiedenen Krankheitsbildern oder auch bei der Wundheilung die epidermale Differenzierung variiert, was sich u. a. in der Keratinexpression widerspiegelt (Fuchs und Green 1980). Ebenso könnte eine Hyperplasie auch auf die vermehrte Abschilferung der Hautzellen zurückzuführen sein, was in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht wurde.

Mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden wurde zunächst überprüft, ob die BM zum ersten Zeitpunkt der Hautexplantation nach dem Ziehen von SB noch beeinträchtigt ist und Schäden hinsichtlich ihrer Integrität auftreten (vgl. Kap. 5.2). Die Charakterisierung einer unterbrochenen, nicht intakten BM erfolgte bisher bei Melasma, einer erworbenen, häufig hormonell bedingten Hypermelanose und stand im Zusammenhang mit der Entwicklung einer epidermalen Hyperpigmentierung (Kang 2012; Lee *et al.* 2012). Lee *et al.* (2012) dokumentierte u. a. eine signifikante Reduktion der Expression von Kollagen Typ IV in läsionaler Haut. Im Zusammenhang mit der Saugblasenmethode wurde wiederum eine Beeinträchtigung des wichtigsten Ankerungsfilaments Laminin-5 beschrieben, da eine Abtrennung der *Lamina lucida* von der *Lamina densa* erfolgt (Koivukangas 2004, S. 18, 34; Leivo *et al.* 2000). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben keine Veränderungen in der Expression der BM-Komponenten Laminin-1, Laminin-5, Kollagen Typ IV und Kollagen Typ VII zwischen SB- und Kontrollarealen. Auch strukturelle Veränderungen der BM konnten zu den untersuchten Zeitpunkten von zwei und vier Wochen nach der SB-Entnahme nicht identifiziert werden. Ein besonderes Augenmerk wurde auf Laminin-5 gelegt, da es beim Aufbau der BM eine entscheidende Rolle spielt. Laut Tsunenaga *et al.* (1998) stimuliert es

basale Keratinozyten zur Sekretion von BM-Material und beschleunigt somit die Bildung der hemidesmosomalen Strukturen der *Lamina densa*. Die von Koivukangas (2004) beschriebene Beschädigung der BM durch die Saugblasenmethode konnte somit in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, allerdings könnten Veränderungen in Form und Integrität zu einem früheren Zeitpunkt zu beobachten sein. Die Migration der Zellen und gleichzeitige Synthese der BM-Komponenten findet vermutlich schon in den ersten Stunden nach der Schädigung der Haut statt (Koivukangas 2004, S. 34; Leivo *et al.* 2000). Es ist somit unklar, ob durchbrochene BM-Strukturen bei der PIH auftreten und Einfluss auf die epidermale Hyperpigmentierung nehmen. Bei Melasma existiert die Vermutung, dass die strukturelle Beschädigung der BM das Zusammenspiel von dermalen Strukturen und epidermalen Melanozyten verändert. Ein Netzwerk von dermalen Zellinteraktionen könnte Melanozyten stimulieren und zu einer epidermalen Hyperpigmentierung führen (Kang 2012). Diese Hypothese stellten auch Slominski und Wortsman (2000) auf, die bei einer zerstörten BM eine veränderte humorale und neuronale Signalübertragung zwischen Epidermis und Dermis in Betracht zogen. Zytokine und andere Mediatoren aus der Dermis könnten somit die Epidermis leichter erreichen. Derzeit gibt es jedoch keine weiteren Ergebnisse, die diese Hypothese mit entsprechenden Daten belegen könnten.

## **6.2 Mechanismen der Saugblasen-induzierten PIH**

### **6.2.1 Hyperpigmentierung durch Veränderung epidermaler Melanozyten**

Neben der Melaninmenge und der Melaninverteilung in der PIH, die bereits intern untersucht wurden, sind v. a. die Melanozytenanzahl und -aktivität wichtige Merkmale zur Charakterisierung einer Pigmentierungsreaktion. Aus diesem Grund wurde die Melanozytendichte in der hyperpigmentierten Haut im Vergleich zur normalen Haut untersucht. Damit die Vergleichbarkeit der Daten gewährleistet wird, wurden alle quantifizierten Ergebnisse der Epidermis auf eine einheitliche Länge des *Stratum granulosum* normiert. Mit der Analyse der Melanozytenaktivität bzw. Melanozytenzahl wurde nur einer der drei wesentlichen Schritte betrachtet, die an der Ausbildung einer Hyperpigmentierung beteiligt sind. Die beiden nachfolgenden Prozesse, die postuliert werden, schließen die Synthese und Aktivierung von Tyrosinase zur Melaninproduktion und den Transfer der Melanosome zu den Keratinozyten ein (Murase *et al.* 2009). Da bereits eine erhöhte Melaninbildung gemessen wurde und somit von einem erhöhten Transfer der Melanosome zu den Keratinozyten ausgegangen werden kann, dient die Evaluierung der Melanozytendichte zur näheren Charakterisierung der epidermalen Veränderungen in der PIH. Bisher gibt es nur wenige Studien, in denen quantitative Daten zur Melanozytendichte in entzündlichen Hautzuständen erhoben wurden (Lamel *et al.* 2013). Einer der frühesten Hinweise in der Literatur kam von Snell (1962), der einen Anstieg an Melanozyten nach mechanischer Hautirritation zeigen konnte.

Im Allgemeinen zeigten die Quantifizierungsergebnisse der vorliegenden Arbeit ein höheres Expressionsprofil der melanozytären und melanosomalen Proteine in hyperpigmentierter Haut (vgl. Kap. 5.1.3.1 und 5.1.3.2). Die SB-induzierte PIH scheint speziell in den ersten Wochen eine Aktivierung epidermaler Melanozyten auszulösen und zu einer erhöhten Melanozytenzahl zu führen. Beide Markierungsmethoden, zum Einen die Kombination mehrerer Melanozytenmarker und zum Anderen die Anwendung eines Antikörpers gegen das mit der Melanogenese assoziierte Protein TRP1, ergaben eine Zunahme der Positivmarkierung in den ersten Wochen nach dem Ziehen von SB. Zum Zeitpunkt vier Wochen nach der SB-Entnahme war der Anstieg in den PIH-Arealen bei beiden Markierungen gegenüber normaler Haut signifikant erhöht (siehe Abbildung 5.4 C und Abbildung 5.5 C). Zusätzlich wies die Einzelmarkierung gegen TRP1 zum ersten Untersuchungszeitpunkt einen signifikanten Anstieg um das 7,5-fache in hyperpigmentierter Haut verglichen mit der Kontrolle auf (siehe Abbildung 5.5 D). Da nach Dean *et al.* (2002) die TRP1 positiven Melanozyten in gewissen Grenzen als melanogenetisch aktiv betrachtet werden können, liegt die Vermutung nahe, dass speziell zu frühen Zeitpunkten nach der Induktion einer PIH die aktiven Melanozyten in ihrer Anzahl ansteigen. Vermutlich ist dieser Anstieg schon viel früher als zwei Wochen nach der SB-Entnahme zu verzeichnen. Aufgrund der fehlenden Biopsie-Entnahme zu einem früheren Zeitpunkt als zwei Wochen nach Induktion der PIH können dazu keine weiteren Aussagen getroffen werden. Der Verlauf der quantifizierten Daten in den darauffolgenden Wochen war bei beiden Vorgehensweisen der Melanozytenmarkierung identisch, denn die Flächenergebnisse in SB- und Kontrollarealen nähern sich bis zum letzten Zeitpunkt einander an. Eine komplette Übereinstimmung der hyperpigmentierten Areale mit dem Kontrollniveau wurde jedoch nicht erreicht und so lag die positive Fläche der SB-Areale weiterhin 12-30 % über dem Kontrollniveau (siehe Abbildung 5.4 D und Abbildung 5.5 D). Daraus lässt sich ableiten, dass der größte Einfluss auf epidermale Melanozyten in der PIH in den ersten vier Wochen nach dem Eintreten des Entzündungsgeschehens stattfindet. Die allgemein größere Streuung der Werte in den SB-Arealen verglichen zu den Kontrollarealen wird weniger auf Quantifizierungsfehler zurückgeführt als vielmehr auf individuelle Unterschiede auf der Pigmentierungsebene der Probanden und deren unterschiedliche Reaktionen auf eine SB-induzierte PIH. Um die Streuung zu reduzieren, müsste der Stichprobenumfang der hier beschriebenen explorativen Statistik erweitert werden.

Trotz der Untersuchungen mit melanozytären Markern lässt sich aus den positiven Markierungen nicht eindeutig ein Anstieg der Melanozytenzahl ableiten, da die Markierungen ebenso auf eine Zunahme in der Größe der Melanozyten oder der melanosomalen Komplexen zurückzuführen sein könnten. So hat auch Ünver *et al.* (2006) diese auftretenden Größenveränderungen und die Elongation der Melanozytendendriten in hyperpigmentierten Arealen des Altersflecks nachgewiesen. Zusätzlich ist es anhand immunhistochemischer Färbungen von melanosomalen Proteinen wie TRP1 schwierig, Rückschlüsse auf die exakte Anzahl von Melanozyten zu ziehen, da sich Melanosome auch entlang der Dendriten zu den Keratinozyten bewegen bzw. aus den Melanozyten ausgeschleust und von den

Keratinocyten aufgenommen werden. Die Veränderung in quantitativer Melanozytenzahl wurde daher mit anti-CD117/c-Kit, einem bereits in der Markerkombination eingesetzten Antikörper, quantitativ ermittelt (vgl. Kap. 5.3.4.3). Eine der ersten Dokumentationen der Expression des c-Kit-Rezeptors in menschlichen, adulten Melanozyten geht auf Matsuda *et al.* (1993) zurück. Die funktionelle Abhängigkeit des Rezeptors von der Stimulation durch seinen Liganden ist naheliegend und wurde von Costa *et al.* (1996) durch die Beobachtung einer Zunahme des epidermalen Melaningehalts und der Melanozytenzahl nach subkutaner Injektion des c-Kit-Liganden SCF untermauert. SCF zählt zu einem Netzwerk verschiedener, zellulär synthetisierter und sekretierter Moleküle, welche die Aktivität der Melanozyten in der Epidermis regulieren. Diese Moleküle stammen sowohl von Zellen aus der Epidermis als auch der Dermis. Zusammen mit den Entzündungsmediatoren Interleukin-1 und Endothelin-1 scheint SCF eine wichtige Rolle in der Melanozytenstimulation in inflammatorischer, hyperpigmentierter Haut zu spielen (Sriwiriyanont *et al.* 2006; Ünver *et al.* 2006). Bei den IHC-Färbungen gegen den c-Kit-Rezeptor wurde daher eine stärkere Expression auf eine erhöhte Melanozytenstimulierung durch SCF zurückgeführt. Wie wichtig die c-Kit/SCF-Interaktionen für das Überleben der Melanozyten sind, wurde bereits in einer Arbeitsgruppe anhand eines Mausmodells gezeigt, in welchem durch Verabreichung eines c-Kit-blockierenden Antikörpers die Melanozyten in Apoptose übergingen (Ito *et al.* 1999).

Die Quantifizierungsdaten c-Kit positiver Zellen legen nahe, dass ein epidermales Trauma, wie das Ziehen von SB, mit einem Anstieg an Melanozyten einhergeht. Eine signifikante Zunahme konnte zwei Wochen nach der SB-Entnahme verzeichnet werden, wo 250 % mehr Melanozyten in der hyperpigmentierten Haut als in der Kontrollhaut detektiert wurden (siehe Abbildung 5.6 D). Vergleichbare Beobachtungen einer erhöhten positiven Immunreaktion von c-Kit in der Epidermis erfolgten bei Melasma. Die Ergebnisse von Kang *et al.* (2006) deuten darauf hin, dass nicht nur die Anzahl sondern auch die Menge an c-Kit, die pro Zelle exprimiert wird, zunimmt. Aufgrund seiner Untersuchungen ging er davon aus, dass eine erhöhte Produktion von SCF über einen SCF/c-Kit-induzierten Signalweg an der Aktivierung von Melanozyten beteiligt ist und zu deren vermehrten Proliferation und Melanogenese führt. Auch Botchkareva *et al.* (2001) konnte anhand von Haarfollikelmelanozyten zeigen, dass eine Überexpression von SCF und c-Kit zu einer Zunahme der Melanozytenzahl, der proliferativen Aktivität und auch der TRP1 Expression führt.

Der Verlauf der quantifizierten, c-Kit positiven Zellzahl über den gesamten Studienzeitraum gab eine ähnliche Tendenz wieder wie jener der Flächenquantifizierungen und zeigte einen deutlichen Rückgang in Melanozytenaktivität und Melanozytenzahl zwischen der achten und 16. Woche nach der SB-Entnahme (siehe Abbildung 5.6). Bei den aufgeführten Ergebnissen ist nicht auszuschließen, dass einige Melanozyten mit dem gewählten Nachweis der c-Kit-Expression nicht erfasst werden konnten.

Zusammengefasst gehen die Ergebnisse mit der bereits erkannten Erhöhung des epidermalen Melaningehalts zu den späteren Untersuchungszeitpunkten einher (vgl. Kap. 5.1.1). In diesem Sinne

könnte die zu Beginn erhöhte Melanozytenaktivität und damit verbundene Zunahme der Melanogenese zu einer größeren Melaninmenge und der sichtbaren Ausprägung der Hyperpigmentierung im Verlauf der Studie führen. Ob die Hyperpigmentierung zusätzlich auf einer vermehrten Melanogenese pro Melanozyt, einen eingeschränkten Melanintransport in den epidermalen Schichten oder aber einer verminderten Melanindegradation beruht, ist weiterhin unklar.

Der Ursprung aller Signale, welche zu einer Zellzahlerhöhung von Melanozyten beitragen, ist weitestgehend noch nicht geklärt. In der Literatur wird häufig der Dermis und seinen Zellen eine entscheidende Rolle hinsichtlich des melanogenen, parakrinen Netzwerkes von Signalmolekülen, welches zu einer epidermalen Hyperpigmentierung führt, zugesprochen (Yamaguchi *et al.* 2007; Imokawa 2004; Archambault *et al.* 1995; Hedley *et al.* 2002; Okazaki *et al.* 2003). Dies lassen auch die vorliegenden Ergebnisse mit dem Oberflächenprotein c-Kit vermuten, da dessen Ligand SCF meistens dermalen Ursprungs ist und laut Grabbe *et al.* (1994) von Fibroblasten und Endothelzellen oder den Keratinozyten in der Epidermis produziert werden kann.

## 6.2.2 Die Rolle dermalen Fibroblasten und Endothelzellen

Die Dermis als komplexes System, das viele verschiedene Zelltypen beherbergt, wird in der Literatur immer häufiger im Zusammenhang mit der Stimulierung epidermaler Melanozyten beschrieben (Archambault *et al.* 1995; Imokawa 2004). Imokawa (2004) identifizierte parakrine Zytokinnetzwerke zwischen Melanozyten und anderen Hautzellen, insbesondere den Keratinozyten und Fibroblasten, die die Melanozytenaktivität regulieren. Die Fibroblasten und die von ihnen sekretierten Faktoren fanden in der Literatur bereits mehrmals Erwähnung hinsichtlich ihres Einflusses an der Entstehung von Hyperpigmentierungen, u. a. bei den Café-au-lait-Flecken oder den hyperpigmentierten Folgeerscheinungen des gutartigen Hauttumors Dermatofibrom (Imokawa 2004; Okazaki *et al.* 2003). Ob Unterschiede in der Fibroblastendichte bei der PIH und bei gesunder Haut auftreten, wurde in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert (vgl. Kap. 5.3.2). Das Protein, welches für die Fibroblastenmarkierung herangezogen wurde, war FSP. Dieses wird von Zellen mesenchymalen Ursprungs oder mit Fibroblasten-ähnlichem Phänotyp exprimiert. Obwohl es mit der morphogenen Umwandlung von Fibroblasten in Verbindung gebracht und von Strutz *et al.* (1995) als spezifischer Fibroblastenmarker beschrieben wurde, ist eine komplette Differenzierung zwischen mesenchymalen Stammzellen und Fibroblasten damit nicht möglich, da Fibroblasten eine Vielzahl an Phänotypen aufweisen (Alt *et al.* 2011; Werner *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass lediglich Fibroblasten immunhistologisch markiert und anschließend quantifiziert wurden. Anhand von drei Probanden konnte die größte Anzahl an Fibroblasten zum ersten Untersuchungszeitpunkt detektiert werden (siehe Abbildung 5.9 C und D). Dabei handelte es sich um mehr als eine Verdoppelung der Anzahl an Fibroblasten in hyperpigmentierter Haut verglichen mit der Kontrollhaut. Auch anteilig zur Gesamtzellzahl konnte eine Erhöhung des Vorkommens an

Fibroblasten von 60 % ausgehend vom Kontrollniveau verzeichnet werden. Damit zeigt sich, dass trotz Zunahme der dermalen Gesamtzellzahl in postinflammatorischer, hyperpigmentierter Haut anteilig mehr Fibroblasten auftreten als in der Kontrolle. Zum letzten Untersuchungszeitpunkt war in der hyperpigmentierten Haut der Anteil der Fibroblasten an den Gesamtzellen auf 10 % über dem Kontrollniveau gefallen. Diese abnehmende Tendenz an FSP positiven Zellen im Verlauf der Studiendauer könnte anhand eines größeren Stichprobenumfangs mit statistischem Bezug weiter untersucht werden. Dennoch vermitteln die Quantifizierungsergebnisse den Eindruck, dass eine Stimulation der Proliferation und/oder der Einwanderung von Fibroblasten aus benachbarten Hautregionen nach dem Ziehen von SB stattfand. Kang (2012) dokumentierte eine ähnliche Beobachtung und eine signifikante Zunahme der Anzahl an Fibroblasten in der Dermis bei Melasma. Durch die Gewebeverletzung beim Ziehen von SB ist davon auszugehen, dass es zunächst zu einer Entzündungsreaktion kommt und danach die weiteren Phasen eines Wundheilungsprozesses eintreten. Die Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt könnte Aufschluss darüber geben, in welcher Phase der Wundheilung ein markanter Anstieg der Fibroblasten auftritt. In der Literatur wird die Migration von Fibroblasten in Gegenden der Entzündung bzw. die Differenzierung von Fibroblasten aus parenchymalen Epithel am Ort der Verletzung häufig in der proliferativen Phase der Gewebereparatur beschrieben, welche etwa drei Tage nach akuter Verletzung einsetzt und bis zu zwei Wochen lang andauert (Velnar *et al.* 2009; Strutz *et al.* 1995; Agelli und Wahl 1986). Das erhöhte Vorkommen von Fibroblasten in hyperpigmentierter Haut legt die Vermutung nahe, dass mit einer größeren Ansammlung dieser Zellen eine vermehrte Ausschüttung von Fibroblasten-spezifischen Faktoren einhergeht. Diese sind v. a. der melanogene - der Melanogenese-stimulierende - Stammzellefaktor SCF und der Hepatozytenwachstumsfaktor („hepatocyte growth factor“, HGF). Beide Faktoren diffundieren Richtung Epidermis und sind für ihre stimulierende Wirkung auf epidermale Melanozyten bekannt (Okazaki *et al.* 2003). Der Mechanismus wurde bereits im Zusammenhang mit der Hyperpigmentierung beim Dermatofibrom beschrieben (Imokawa 2004).

Im Zuge der Charakterisierung von Fibroblasten bei der PIH und dem zugrunde liegenden Wundheilungsprozess, welcher der Hyperpigmentierung vorausgeht, war die Identifizierung von Myofibroblasten ebenfalls zu berücksichtigen. Da diese als wichtige Schlüsselfiguren bei der physiologischen Rekonstruktion von Gewebe und der Wundkontraktion zumeist am Ende des Reparaturprozesses auftreten, war anzunehmen, dass sie zum ersten Untersuchungszeitpunkt noch nachzuweisen sind. Mit der Methode der Co-Färbung von  $\alpha$ SMA und CD31 konnte anhand der IF-Analysen kein Myofibroblast identifiziert werden (siehe Abbildung 5.10). Die Differenzierung der Fibroblasten zu ihrem Myofibroblastenphänotyp erfolgt ca. eine Woche nach der Verletzung, wenn sich genügend EZM angesammelt hat (Velnar *et al.* 2009). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwei Wochen nach der SB-Entnahme Myofibroblasten im Hautgewebe nicht mehr auftreten. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass der Reparaturprozess zu diesem Zeitpunkt bereits vollzogen ist und die Myofibroblasten über den Weg der Apoptose eliminiert wurden. Da zusätzlich keine eindeutige

Nachweismethode für Myofibroblasten existiert und sie unterschiedliche Zytoskelettproteine exprimieren, ist trotz des Negativergebnisses in der vorliegenden Arbeit ihr Vorkommen in postinflammatorischer, hyperpigmentierter Haut nicht auszuschließen (Touhami *et al.* 2005). Neben dem richtigen Zeitpunkt könnte der Schweregrad der Gewebeerletzung bzw. der Entzündungsreaktion für die Identifizierung entscheidend sein. Dieser könnte das Vorkommen von Myofibroblasten hinsichtlich Dauer und Zellzahl beeinflussen.

Die Veränderungen der mikrovaskulären Blutgefäße in der PIH wurden anhand der Endothelfärbung in den IF-Analysen der Myofibroblasten bereits beobachtet und später mithilfe der IHC näher charakterisiert (vgl. Kap. 5.3.3). Dazu eignete sich am besten die Markierung des Endothelspezifischen Adhäsionsmoleküls CD31 oder PECAM-1, welches stabilisierende Funktionen im ruhenden Endothel übernimmt und im Falle eines angiogenen Stimulus für die Gefäßneubildung mobilisierend auf aktive Endothelzellen wirkt (Dejana 2004; Cao *et al.* 2009). Neben einer verstärkten Gefäßbildung wurde eine Zunahme in der Gefäßgröße (Angiogenese) in der hyperpigmentierten Haut beobachtet. Die höhere Kapillarisation fand im *Stratum papillare* und im oberen Bereich des *Stratum reticulare* statt. Die Quantifizierung ergab vier Wochen nach dem Ziehen von SB eine signifikante Zunahme an Endothelzellen mit einem Anstieg von 67 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine identische Beobachtung der Blutgefäße machte Iriyama *et al.* (2011) in seinen Studien an CD31-gefärbten Hautdünnschnitten aus Altersfleckarealen. Eine Neovaskularisierung und Angiogenese im adulten Gewebe spricht für einen pathologischen Mechanismus oder aber einen regenerativen Prozess wie der Wundheilung (Velnar *et al.* 2009; Singer und Clark 1999; Gillitzer und Goebeler 2001). Bei der PIH sind daher die Merkmale einer Veränderung des Endothels mit der zugrunde liegenden Entzündungsreaktion zu assoziieren. Die Endothelzellen bilden bei der Wundreparatur nicht nur neue Blutgefäße aus, sondern vermitteln und regulieren die Migration von Leukozyten aus dem intraluminalen Bereich ins Gewebe (Gillitzer und Goebeler 2001). Dieses Ereignis infiltrierender Zellen konnte anhand einer erhöhten Anzahl an Immunzellen bei der postinflammatorischen, hyperpigmentierten Haut bestätigt werden (vgl. Kap. 5.3.4). Auf dieses dermal-entzündliche Infiltrat wird im nachfolgenden Kapitel 6.2.3 näher eingegangen. Ein wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit den Immunzellen, der hier bereits Erwähnung finden sollte, ist die bei der Gewebeerneuerung eintretende Neovaskularisierung, die auf direkte und indirekte Weise von den Makrophagen stimuliert wird. Die indirekte Weise schließt ihre Anregung von Fibroblasten und Endothelzellen ein (Delavarya *et al.* 2011). Dies könnte die in dieser Arbeit identifizierte, zeitliche Verschiebung der signifikanten Immunzell- und Endothelzellzunahme erklären (siehe Abbildung 5.11 C und Abbildung 5.14 C). Ferner zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit den von Gillitzer und Goebeler (2001) beschriebenen Effekt des Rückgangs der Gefäßbildung nach der Wundheilung. 16 Wochen nach dem Ziehen von SB war eine Reduktion der Endothelzellen in der hyperpigmentierten Haut auf ein Niveau von 16 % über dem der Kontrolle zu verzeichnen.

Aufgrund der interendothelialen Zellkontakte war eine eindeutige, abgegrenzte Markierung der Endothelzellen nicht möglich, was auch die Schwankungen der quantifizierten Zellzahlen erklären könnte (siehe Abbildung 5.11 C und E). Aus diesem Grund kann eine bereits signifikante Zunahme an Endothelzellen zwischen SB- und Kontrollarealen zum ersten Untersuchungszeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Der Effekt der Zunahme an mikrovaskulären Gefäßen in der PIH war nach zwei und nach vier Wochen v. a. optisch wahrnehmbar und wurde deshalb mit der Endothel-assoziierten CD146-Markierung zur Erkennung perivaskulärer Zellen abgesichert (vgl. Kap. 5.3.3). Diese konnten mittels simultaner IF-Markierung von CD31 perivaskulär zu und in Co-Lokalisation mit den Endothelzellen identifiziert werden (siehe Abbildung 5.12). Sie waren ebenfalls in der hyperpigmentierten Haut zahlreich vertreten. Der Bereich der Blutgefäße wird in der Literatur auch als Nische für Progenitorzellen beschrieben. Somit können CD146 positive Zellen nicht nur perivaskuläre Zellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen darstellen, sondern auch mesenchymale Stammzellen bzw. Vorläuferzellen, die zu Zelltypen wie Osteoblasten, Adipozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen differenzieren können (Crisan *et al.* 2008; Sorrentino *et al.* 2008). Ein adipogener oder osteogener Differenzierungsprozess ist innerhalb der perivaskulären Nische in der Dermis nicht zu erwarten, allerdings könnte es sich um Vorläuferzellen des Endothels handeln, wenn man von ihrer Lokalisation ausgeht. Bisher sind deren Herkunft und Eigenschaften, welche eine eindeutige Identifizierung ermöglichen, nicht endgültig charakterisiert (Khakoo und Finkel 2005). Die Co-Färbung beider Endothelzellmarker ermöglichte es zusätzlich, CD146 positive Zellen ohne colokalisierte CD31-Markierung zu identifizieren. Dabei wurden CD146 positive Zellen lediglich im *Stratum papillare* und besonders in der Nähe der BM nachgewiesen. Sollte es sich dabei um dermale Stammzellen handeln, wäre es anhand der Studien von Li *et al.* (2010) denkbar, dass die Zellen in den Bereich der basalen Epidermis migrieren und dort zu Melanozyten differenzieren können. Zumindest könnten sie ein wichtiger Bestandteil des melanogenen, parakrinen Netzwerkes zwischen epidermalen und dermalen Zellen sein.

Die Zunahme an Fibroblasten und Endothelzellen lässt auf eine höhere proliferative Aktivität der dermalen Zellen in den ersten Tagen und Wochen nach der Induktion einer PIH schließen. Inwieweit der proliferative Zellanteil auch noch nach der zweiten Woche nach der SB-Entnahme auf zellulärer Ebene durch die Expression von Ki-67 detektierbar war, wurde näher untersucht (vgl. Kap. 5.3.1). Bei Betrachtung des allgemeinen, proliferativen Zustandes der dermalen Zellen konnte ein mehr als doppelter Anstieg von Ki-67 positiven Zellen nach zwei und vier Wochen nach dem Ziehen der SB ermittelt werden (siehe Abbildung 5.8 D). Bis auf den letzten Zeitpunkt, zu dem die Anzahl der proliferativen Zellen in SB- und Kontrollarealen übereinstimmten, wurde quantitativ eine höhere proliferative Zellaktivität in der hyperpigmentierten Haut ermittelt. Obwohl eine allgemeine Zunahme der dermalen Gesamtzellzahl in den SB-Arealen zu verzeichnen war, nahm der Anteil der proliferierenden Zellen an der Gesamtzellzahl zu. Diese Zunahme erreichte nach vier Wochen ihr Maximum mit einem Anstieg von 125 % über dem Kontrollniveau. Trotz der Erhöhung der Anzahl

Ki-67 positiver Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz beim Vergleich von SB- und Kontrollarealen errechnet werden. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Streuung der erhobenen Daten, speziell zum ersten Untersuchungszeitpunkt, zurückzuführen. Ursachen der Streuung lassen sich nur schwer ergründen, allerdings ist es denkbar, dass aufgrund der Unterschiede in der Qualität der Hautdünnschnitte ein unterschiedliches Färbeergebnis in Bezug auf Färbeintensität erzielt wurde. Gründe der Qualitätsunterschiede sind spekulativ und könnten Beeinträchtigungen beim Schneideverfahren und eventuell auftretende, zu einem Strukturverlust führende Gefrierschäden (Einlagerung von Eiskristallen) sein. Kryoschnitte sind im Gegensatz zu Paraffinschnitten bekannt für den besseren Erhalt von antigenen Bindungsstellen, aber auch für einen schlechteren Erhalt der Struktur des Hautdünnschnittes (Neundörfer und Heuß 2007, S. 20).

Die Untersuchungszeitpunkte mit der höchsten, detektierten Zellproliferation stimmen mit den Zeitpunkten überein, zu denen die Quantifizierung der Fibroblasten und Endothelzellen die größten Zellzahlen lieferten. Diese Erkenntnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Teilungsrate, d. h. einem vermehrten Auftreten verschiedener Zellpopulationen im Verlauf des Wundheilungsprozesses, und der Entwicklung einer PIH hin.

### **6.2.3 Charakterisierung des dermal-entzündlichen Infiltrats**

Wie bereits in Kap. 6.2.2 erwähnt wurde, ergaben interne Untersuchungen der Beiersdorf AG eine Zunahme der Gesamt- und Immunzellzahl in dermalen, hyperpigmentierten Hautarealen über einen Zeitraum von mehreren Wochen nach der Induktion der PIH. Die Einflüsse der residenten Zelltypen der Haut wie Fibroblasten und Endothelzellen auf die Zunahme der Gesamtzellzahl wurden dabei diskutiert. Ein zusätzlicher Fokus dieser Arbeit war die erweiterte Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen über den Verlauf der Wochen mithilfe der Immunhistochemie und der quantitativen Datenerhebung.

Da die Ausbildung einer Entzündungsreaktion als Ursache der Hyperpigmentierung angesehen wird, ist ein näheres Verständnis der komplexen, entzündlichen Hautprozesse und ihre Auswirkung auf Art und Schweregrad einer Dyspigmentierung notwendig (Davis und Callender 2010; Eimpunth *et al.* 2012; Lamel *et al.* 2013; Callender *et al.* 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht neben der singulären Markierung der Mastzellen die gesamte Immunzellpopulation zu erfassen. Grund hierfür ist das Einwandern verschiedenster Immunzellen aus dem Blutstrom ins verletzte Gewebe. Diese sind in den unterschiedlichsten Wundheilungsphasen an der Gewebereparatur beteiligt (Gillitzer und Goebeler 2001). Wie vorangegangene Studien zeigten, wiesen die postinflammatorischen, hyperpigmentierten Areale zu allen Untersuchungszeitpunkten jeweils eine Erhöhung der Anzahl CD45 und CD14 positiver Zellen auf. Ob CD45 als allgemeiner Leukozytenmarker alle Immunzellen, darunter T- und B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, im dermalen Infiltrat erfasst, wurde in dieser

Arbeit anhand eines Vergleichs mit der Immunzellzahl, welche über eine Markerkombination detektiert wurde, untersucht (Murphy *et al.* 2009).

CD45 positive Zellen waren zum ersten Untersuchungszeitpunkt signifikant um das 2,5-fache gegenüber der Kontrolle erhöht und fielen bis zur 16. Woche nach der SB-Entnahme auf ein 47 %iges Niveau über dem der Kontrolle zurück (siehe Abbildung 5.14 C und D). Bei den relativen Anteilen an den Gesamtzellen war zu diesem Zeitpunkt keine Erhöhung mehr zu verzeichnen (siehe Abbildung 5.14 E und F). Die Kombinationsmarkierung ergab signifikante Unterschiede zwischen den SB- und Kontrollarealen und eine über den gesamten Untersuchungszeitraum konstante Erhöhung der Immunzellen von ca. 10 % in hyperpigmentierten Arealen gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 5.13. D und F).

Somit zeigten die Ergebnisse einerseits, dass die bereits intern ermittelte Zunahme der Anzahl CD45 positiver Zellen zwei Wochen nach der SB-Entnahme reproduziert und mit statistischer Signifikanz bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 5.14 C). Andererseits konnte gezeigt werden, dass mit der Markierung gegen CD45 weniger Immunzellen als mit der Kombinationsmarkierung erfasst wurden. Dies lässt sich aus den errechneten, prozentualen Anteilen der CD45 positiven Zellen an den Gesamtzellen ablesen (siehe Abbildung 5.13 F und Abbildung 5.14 F). Hierbei wird deutlich, dass die Immunzellen, die mit der Antikörperkombination markiert wurden, einen 30 % größeren Anteil an den Gesamtzellen besitzen als die CD45 positiven Immunzellen. Ferner ist die Zunahme des relativen Anteils CD45 positiver Immunzellen an den Gesamtzellen zum ersten Untersuchungszeitpunkt prozentual größer als die der Immunzellen der Kombinationsmarkierung (siehe Abbildung 5.13 F und Abbildung 5.14 F). Dies könnte bedeuten, dass die CD45 positiven Zellen zwei Wochen nach der SB-Entnahme, eventuell auch schon früher, zu der beobachteten und detektierten Zunahme der Gesamtzellzahl und somit wesentlich zum dermal-entzündlichen Infiltrat beitragen. Ein Punkt, der bei der Interpretation Beachtung finden sollte, ist der Einfluss einer Markerkombination in der IHC auf eine mögliche Signalverstärkung der enzymatischen Reaktionen. Eine intensivere Färbung konnte bei der Kombinationsmarkierung identifiziert werden. Inwieweit diese jedoch auf eine erhöhte Unspezifität der Antikörperbindungen zurückzuführen ist und daher die quantitative Auswertung beeinträchtigte, konnte nicht geklärt werden.

Der größte Teil der identifizierten, immunpositiven Zellen wird auf Lymphozyten wie B- und T-Zellen, auf dendritische Zellen und auf Mastzellen zurückgeführt, welche laut Gillitzer und Goebeler (2001) nach 14 Tagen der Wundheilung die dominierende Untergruppe von Leukozyten repräsentieren. In dieser Wundheilungsphase, die in der vorliegenden Arbeit den frühesten Untersuchungszeitpunkt darstellt, werden keine Neutrophile mehr erwartet, da diese sofort am Beginn der Entzündungsreaktion (am ersten Tag) ins Gewebe einwandern und 50 % aller Zellen repräsentieren (Gillitzer und Goebeler 2001). Auch bei den Monozyten und Makrophagen wird von einer reduzierten Population nach 14 Tage ausgegangen, da sie in der frühen Phase die Wunde kolonisieren. Sie treten somit direkt nach den Granulozyten als häufigste Blutzellpopulation auf.

Neben ihrer immunitären Rolle sind sie vermutlich an der Aktivierung anderer Zelltypen beteiligt (Rodero und Khosrotehrani 2010; Clark 1996, S. 115).

Die Mastzellen als wichtige Zellpopulation der Immunzellen wurden getrennt von der Immunzell-Gesamtheit näher untersucht. In der Literatur wird ihnen nicht nur eine tragende Rolle bei allergischen Reaktionen, sondern allgemein bei der erworbenen und angeborenen Immunität zugesprochen (Harvima und Nilsson 2011).

Die immunhistochemische Markierung der Mastzellen wurde mit dem Mastzell-Rezeptor c-Kit durchgeführt, da er mehrfach von anderen Arbeitsgruppen zur Identifizierung von Mastzellen verwendet wurde und eine Alternative zur Mastzelltryptase darstellt (Kang *et al.* 2006; Janssens *et al.* 2005). Zur Absicherung der Antikörperspezifität gegenüber Mastzellen wurde noch vor der reproduzierten, quantitativen Analyse der c-Kit-Färbungen eine Co-Lokalisation von Mastzelltryptase und c-Kit mittels IF nachgewiesen (siehe Abbildung 5.15). Wie sich anhand der quantifizierten Zellzahlen zeigte, waren die Mastzellen in der hyperpigmentierten Haut über den Untersuchungszeitraum um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Umgebungshaut erhöht, mit auftretenden Signifikanzen zu den Zeitpunkten vier und 16 Wochen nach der SB-Entnahme (siehe Abbildung 5.16 C). Die größte Zunahme der Mastzellpopulation von 158 %, ausgehend vom Kontrollniveau, wurde nach vier Wochen erreicht (siehe Abbildung 5.16 D).

Ein Anstieg der Mastzellpopulation wird mehrfach im Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen wie Migräne, Arthritis und der Multiplen Sklerose, mit chronischen Hautentzündungen wie Psoriasis, mit der Wundheilung und auch mit Formen der Dyspigmentierung wie Melasma und Café-au-Lait-Flecken berichtet (Theoharides und Cochrane 2004; Harvima und Nilsson 2011; Huttunen *et al.* 2002; Hernández-Barrera *et al.* 2008; Okazaki *et al.* 2003). Aktuelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass einer der grundlegenden Mechanismen für die rasche Ansammlung von Mastzellen in pathophysiologischen Zuständen die Migration und Rekrutierung der reifen Mastzellen ist. Außerdem behalten die Mastzellen trotz ihres hochdifferenzierten Status ein erhebliches Proliferationspotenzial bei (Molderings 2010; Trautmann *et al.* 2000). Dies würde in der vorliegenden Arbeit für eine erhöhte Proliferation der Mastzellen und deren verstärkte Rekrutierung aus den Blutgefäßen sprechen und folglich auch dafür, dass die Mastzellen einen entscheidenden Anteil am dermal-entzündlichen Infiltrat der PIH bilden. Von den Mastzellen wird eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und anderen löslichen Mediatoren freigesetzt, die nicht nur für ihr Überleben und die Differenzierung wichtig sind, sondern vermutlich auch Einfluss auf die regulatorischen Prozesse anderer Zellen, wie den Fibroblasten, und somit auch auf die Pigmentierung nehmen können (Molderings 2010). Umgekehrt haben auch die Fibroblasten mit ihrer Sezernierung von SCF eine Auswirkung auf die Mastzellen. SCF kann als einer der wichtigsten Faktoren der humanen Fibroblasten die Proliferation der Mastzellen direkt beeinflussen (Molderings 2010). Welche Bedeutung SCF für das Überleben und die Aktivität von Melanozyten haben könnte, fand bereits in Kap. 6.2.1 Erwähnung. Wie Studien zu den Café-au-lait-Flecken zeigten, könnte dem SCF eine

---

tragende Rolle in der Ausbildung einer epidermalen Hyperpigmentierung zukommen (Okazaki *et al.* 2003). Aufgrund des eben beschriebenen Abhängigkeitsverhältnisses zwischen Fibroblasten und Mastzellen hinsichtlich ihrer gegenseitigen Stimulation ist es naheliegend, dass eine Erhöhung der Fibroblastenpopulation mit einer Erhöhung der Mastzellpopulation einhergeht und *vice versa*. Diese Zunahme beider Populationen konnte in der vorliegenden Arbeit bei der Ausbildung einer PIH detektiert werden (vgl. Kap. 5.3.2 und 5.3.3). Auch in der Wundheilung wurde ein gegenseitiger Einfluss von Mastzellen und Fibroblasten beschrieben (Trautmann *et al.* 2000). Dabei tragen die Mastzellen mit ihren Entzündungsmediatoren bedeutend zur Regeneration des Gewebes bei und stimulieren die Fibroblastenproliferation. Neben den Fibroblasten wird von den Mastzellen auch die Gefäßbildung entscheidend beeinflusst. Metcalfe *et al.* (1997) dokumentierte hierbei die Auswirkungen der aus den Granula freigesetzten Mediatoren auf Proliferation, Wachstum und Funktion der Endothelzellen. Zusätzlich haben sekretierte Proteasen der Mastzellen möglicherweise einen Einfluss auf Plasmaproteine wie Albumin. Diese produzieren „histamin releasing peptides“ (HRP), welche in der Entzündungsreaktion eine gesteigerte Aktivierung von Mastzellen verursachen und somit proinflammatorisch wirken (Cochrane *et al.* 2003).

Neben SCF sind für das Überleben und die Differenzierung von Mastzellen auch andere Zytokine wie z. B. Interleukin-4, Interleukin-6 und Interleukin-10 wichtig (Molderings 2010). Ebenso tragen Zytokine anderer Immunzellpopulationen sowie weitere Entzündungsmediatoren, wie Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane, in einem komplizierten Netzwerk an parakrinen Vorgängen zur Entstehung einer Hyperpigmentierung bei. Die daran beteiligten Signalmoleküle sowie die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher kaum bekannt, mit Ausnahme einiger weniger identifizierter, melanogener Faktoren (Rigopoulos *et al.* 2007).

Weitere Untersuchungen mit dem Fokus auf Entzündungsmediatoren und deren Einfluss auf die Ausbildung einer Entzündungsreaktion mit anschließender Hyperpigmentierung können zu einem besseren Verständnis des komplexen, physiologischen Mechanismus der PIH führen und damit neue, vielversprechende Ansätze für die Modulation von Dyspigmentierungen liefern. So könnte anhand eines *in vitro*-Versuchsmodells der Melaningehalt und somit die Wirkung unterschiedlicher, mit Entzündungsmediatoren angereicherter Medien, auf Melanozyten untersucht werden. Histologisch könnte neben einer Erhöhung des Stichprobenumfangs der bereits untersuchten Parameter die Expression verschiedener, pigmentierungsrelevanter Signalmoleküle wie SCF, Interleukine und Prostaglandine analysiert werden.

## 7 Zusammenfassung

Die postinflammatorische Hyperpigmentierung (PIH), eine als Folge von Hautentzündungen oder mechanischen Verletzungen auftretende Dyspigmentierung, bedingt häufig eine psychische Belastung der Betroffenen. Um das Verständnis der PIH zu erweitern und optimale Behandlungsmethoden entwickeln zu können, ist es Ziel der Kosmetikindustrie, die für die Ausbildung einer PIH verantwortlichen, physiologischen Mechanismen zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Eigenschaften der postinflammatorischen, hyperpigmentierten Haut untersucht, wobei ein Schwerpunkt auf der Analyse epidermaler und dermaler Veränderungen lag. Hierbei stand die quantitative Untersuchung verschiedener Zellpopulationen im Mittelpunkt. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde durch das Ziehen von Saugblasen (SB) an einem Probandenkollektiv eine lokale Entzündungsreaktion mit begleitender Ausbildung einer Hyperpigmentierung hervorgerufen. Die über einen Zeitraum von 16 Wochen entnommenen Stanzbiopsien wurden mit den Methoden der Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie im Vergleich zur Umgebungshaut untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die morphologische Verdickung der Epidermis und die Verlängerung der Reteleisten nach Induktion einer PIH auf eine Hyperproliferation epidermaler Zellen zurückzuführen war. Neben der für die Hyperplasie ausschlaggebenden, erhöhten Proliferation der Keratinozyten konnte eine gesteigerte Expression der Melanozyten anhand einer Oberflächenmarkerkombination nachgewiesen werden. Die Expression war mit Ausnahme des letzten Untersuchungszeitpunktes erhöht. Sie zeigte besonders für TRP1 positive und daher melanogenetisch aktive Melanozyten eine signifikante Zunahme zum ersten Untersuchungszeitpunkt. Diese wurde auch bei der quantitativen Analyse c-Kit positiver Melanozyten dokumentiert. Wie bereits in einigen Veröffentlichungen beschrieben wurde, sind die Interaktionen zwischen dem c-Kit-Rezeptor und seinem Liganden, dem Stammzellfaktor (SCF), wichtig für das Überleben und die Stimulierung von Melanozyten. Diese Aktivierung epidermaler Melanozyten und die dadurch verstärkte Melanin-Biosynthese zu Beginn der Entwicklung einer PIH gehen mit dem bereits von der Beiersdorf AG identifizierten Anstieg des Melaningehalts und der sichtbaren Ausprägung der Hyperpigmentierung gegen Ende des Studienzeitraumes einher. Mithilfe von Immunfluoreszenz-Analysen war kein Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Hyperpigmentierung und eines Integritätsverlusts der Basalmembran zu den untersuchten Zeitpunkten nachzuweisen.

In weiteren Untersuchungen von Zellpopulationen, die potenziell am Entzündungs- und Pigmentierungsgeschehen beteiligt sein könnten, wurde ein Fokus auf die Dermis gelegt. Dermale Zellen und ihr parakrines Zytokinnetzwerk werden häufig im Zusammenhang mit der Stimulierung epidermaler Melanozyten beschrieben. Die Gewebeverletzung und die resultierende Entzündungsreaktion, die zur Ausprägung einer PIH führen, spiegeln anhand der histologischen Analysen die für den Wundheilungsprozess typischen Veränderungen dermaler Zellen wider. So

deutete die Quantifizierung der Fibroblasten auf eine stimulierte Proliferation und vermehrte Einwanderung von Fibroblasten aus benachbarten Hautregionen hin. Die zur physiologischen Rekonstruktion von Gewebe wichtige, differenzierte Form der Fibroblasten, die Myofibroblasten, konnten zu den untersuchten Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden. Ferner wurde eine mit der Entzündungsreaktion assoziierte Veränderung des Endothels hinsichtlich einer Vergrößerung und verstärkten Ausbildung dokumentiert. Grund hierfür ist die Endothelzell-vermittelte Regulierung von Leukozyten aus dem intraluminalen Bereich. Auch die Markierung CD146 positiver, perivaskulärer Zellen bestätigte die erhöhte Neovaskularisierung nach zwei und vier Wochen nach dem Ziehen der SB und den Rückgang der Gefäßbildung nach 16 Wochen. Zusätzlich wurde in den PIH-Arealen eine Zunahme der CD146 positiven Zellen entlang der Basalmembran identifiziert. Diese Progenitorzellen könnten ebenfalls Einfluss auf die Pigmentierung nehmen, indem sie in die Epidermis migrieren und zu Melanozyten differenzieren. Dies müsste mit weiteren Experimenten untersucht werden. Das dermal-entzündliche Infiltrat konnte mittels einer Markerkombination quantitativ vollständig wiedergegeben werden. Es wurde damit ein 30 % höherer Anteil an den Gesamtzellen als mit der Leukozytenmarkierung gegen CD45 detektiert. Die Berechnungen ergaben, dass neben den Fibroblasten die Immunzellen an der Zunahme der Gesamtzellzahl beteiligt waren. Eine zu den Untersuchungszeitpunkten dominierende Untergruppe der Immunzellen waren die Mastzellen, die getrennt von der Immunzell-Gesamtheit untersucht wurden. Im Vergleich zur Umgebungshaut wurde mit der Expressionsanalyse des von den Mastzellen exprimierten c-Kit-Rezeptors eine signifikante Zunahme der Population vier Wochen nach der SB-Entnahme nachgewiesen. Daraus kann eine verstärkte Rekrutierung aus der Blutzirkulation und somit aus der zu diesem Zeitpunkt vergrößerten, zahlreich vorhandenen mikrovaskulären Gefäßen geschlussfolgert werden. Zusätzlich wird von einer gegenseitigen Stimulation von Mastzellen und Fibroblasten durch ihre freigesetzten Mediatoren ausgegangen.

Anhand der Ergebnisse können Rückschlüsse auf einige zelluläre Interaktionen bei der PIH gezogen werden. Um den komplexen, physiologischen Mechanismus der PIH weiter aufzuklären, ist neben einer Erhöhung des Stichprobenumfangs eine Untersuchung der von den dermalen Zellen, insbesondere von den Mastzellen, sezernierten Entzündungsmediatoren wie den Prostaglandinen notwendig. Als weiterer Ansatzpunkt für ein besseres Verständnis des parakrinen Signalnetzwerkes könnte ein *in vitro*-Modell etabliert werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- 3DHISTECH (2011a):** HistoQuant 1.15 User's Guide.
- 3DHISTECH (2011b):** NuclearQuant 1.15 User's Guide.
- Abcam Inc. (2012):** Product Datasheet: Anti-Melanoma antibody [HMB45 + DT101 + BC199] (ab732).
- Agelli, M.; Wahl, S. M. (1986):** Cytokines and fibrosis. In: *Clinical and Experimental Rheumatology* 4, S. 379-388.
- Alberts, B. (Hg.) (2008):** Molecular biology of the cell. 5. Aufl. New York: Garland Science.
- Allen, T. D.; Potten, C. S. (1974):** Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. In: *Journal of Cell Science* 15 (2), S. 291-319.
- Alt, E.; Yan, Y.; Gehmert, S.; Song, Y.-H.; Altman, A.; Gehmert, S. et al. (2011):** Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. In: *Biology of the Cell* 103 (4), S. 197-208.
- Aoki, H.; Moro, O.; Tagami, H.; Kishimoto, J. (2007):** Gene expression profiling analysis of solar lentigo in relation to immunohistochemical characteristics. In: *British Journal of Dermatology* 156 (6), S. 1214-1223.
- Archambault, M.; Yaar, M.; Gilchrest, B. A. (1995):** Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 104 (5), S. 859-867.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998):** Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245-252.
- Bärlocher, F. (2008):** Biostatistik. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme.
- Beiersdorf AG (2013):** Standard Operating Procedure (SOP). Probenfixierung und Probenvorbereitung, S. 1-3.
- Bhawan, J. (1997):** Mel-5: A novel antibody for differential diagnosis of epidermal pigmented lesions of the skin in paraffin-embedded sections. In: *Melanoma Research* 7 (1), S. 43-48.
- Biogenex (2011):** Super Sensitive IHC Detection Systems. Instruction Manual, S. 1-109.
- Boenisch, T. (2001):** Immunochemical Staining Methods. DakoCytomation's Handbook. 3. Aufl. Unter Mitarbeit von Key, M.; Stead, A. J. F.; Stead, R. H.; Harvey, R.; Atwood, K. N.
- Botchkareva, N. V.; Khlgatian, M.; Jack, L. B.; Botchkarev, V. A.; Gilchrest, B. A. (2001):** SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. In: *The FASEB Journal* 15 (3), S. 645-658.
- Brancato, S. K.; Albina, J. E. (2011):** Wound macrophages as key regulators of repair. Origin, phenotype, and function. In: *The American Journal of Pathology* 178 (1), S. 19-25.
- Briggaman, R. A.; Wheeler, C. E. (1975):** The epidermal-dermal junction. In: *Journal of Investigative Dermatology* 65 (1), S. 71-84.
- Burge, S. M.; Jones, R. L.; Millard, P. R.; Dawber, R. P. (1987):** Pigment change and melanocyte distribution in guinea pig skin after cutaneous freeze injury. In: *Journal of Investigative Dermatology* 88, S. 136-140.
- Callender, V. D.; St. Surin-Lord, S.; Davis, E. C.; Maclin, M. (2011):** Postinflammatory hyperpigmentation. Etiologic and therapeutic considerations. In: *American Journal of Clinical Dermatology* 12 (2), S. 87-99.

- Cao, G.; Fehrenbach, M. L.; Williams, J. T.; Finklestein, J. M.; Zhu, J.-X.; DeLisser, H. M. (2009):** Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. In: *The American Journal of Pathology* 175 (2), S. 903-915.
- Cardinali, G.; Kovacs, D.; Picardo, M. (2012):** Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: Lessons from solar lentigo. In: *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 139 (3), S. 96-101.
- Carl Zeiss Jena GmbH (2004):** Das neue Sehen in der Pathologie: MIRAX SCAN – eine voll automatisierte Systemlösung für das klinische Labor. Göttingen. Online verfügbar unter <http://www.zeiss.de/C1256A770030BCE0/WebViewAllID/130E49079005F319C1256F58003D2481>, zuletzt geprüft am 12.06.2013.
- Carl Zeiss MicroImaging GmbH (2008):** Mirax Viewer-Bedienungsanleitung. Jena, 01.10.2008.
- Chang, H. Y.; Chi, J.-T.; Dudoit, S.; Bondret, C.; Rijn, Matt van de; Botstein, D.; Brown, P. O. (2002):** Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. In: *PNAS* 99 (20), S. 12877-12882.
- Clark, R. A. F. (Hg.) (1996):** The molecular and cellular biology of wound repair. Macrophage involvement in repair, remodeling and fibrosis. 2. Aufl. New York: Plenum Press.
- Cochrane, D. E.; Carraway, R. E.; Miller, L. A.; Feldberg, R. S.; Bernheim, H. (2003):** Histamine releasing peptide (HRP) has proinflammatory effects and is present at sites of inflammation. In: *Biochemical Pharmacology* 66 (2), S. 331-342.
- Costa, J. J.; Demetri, G. D.; Harrist, T. J.; Dvorak, A. M.; Hayes, D. F.; Merica, E. A. et al. (1996):** Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. In: *The Journal of Experimental Medicine* 183 (6), S. 2681-2686.
- Costin, G.-E.; Hearing, V. J. (2007):** Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. In: *The FASEB Journal* 21 (4), S. 976-994.
- Crisan, M.; Yap, S.; Casteilla, L.; Chen, C. W.; Corselli, M.; Park, T. S. et al. (2008):** A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. In: *Cell Stem Cell* 3 (3), S. 201-313.
- Dako (2004):** Product Datasheet: Monoclonal Mouse Anti-Human CD14 [TÜK4] M 0825. Glostrup (Dänemark).
- DakoCytomation (2003):** Dako Autostainer Plus Universal Staining System® User's Guide. 4.0.
- Darby, I. A.; Hewitson, T. D. (2007):** Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. In: *International Review of Cytology* 257, S. 143-179.
- Davis, E. C.; Callender, V. D. (2010):** Postinflammatory hyperpigmentation. A review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. In: *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 3 (7), S. 20-31.
- Dean, N. R.; Brennan, J.; Haynes, J.; Goddard, C.; Cooter, R. D. (2002):** Immunohistochemical labeling of normal melanocytes. In: *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 10 (3), S. 199-204.
- Dejana, E. (2004):** Endothelial cell-cell junctions: Happy together. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 261-270.
- Delavarya, B. M.; Van der Veer, W. M.; Van Egmond, M.; Niessen, F. B.; Beelen, R. H. J. (2011):** Macrophages in skin injury and repair. In: *Immunobiology* 216 (7), S. 753-762.
- Dellavalle, A.; Sampaolesi, M.; Tonlorenzi, R.; Tagliafico, E. Sacchetti B.; Perani, L.; Innocenzi, A. et al. (2007):** Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. In: *Nature Cell Biology* 9 (3), S. 255-267.

- Desmoulière, A.; Redard, M.; Darby, I.; Gabbiani, G. (1995):** Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. In: *American Journal of Pathology* 146 (1), S. 56-66.
- Eimpunth, S.; Wanitphadeedecha, R.; Manuskiatti, W. (2012):** A focused review on acne-induced and aesthetic procedure-related postinflammatory hyperpigmentation in Asians. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 27 (Suppl.1), S. 7-18.
- Elias, P. M. (2005):** Stratum corneum defensive functions: an integrated view. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 125 (2), S. 183-200.
- El-Sheikh, S. M.; El-Sheikh, S. M.; El-Morsy, I. H. (2009):** Detection of c-kit (CD117) and HER-2/neu in oral and cutaneous malignant melanomas. In: *Journal of Egyptian Women's Dermatologic Society* 6 (2), S. 66-73.
- Eyden, B. P. (1993):** Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. In: *Ultrastructural Pathology* 17 (6), S. 611-622.
- Fetsch, P. A.; Marincola, F. M.; Filie, A.; Hijazi, Y. M.; Kleiner, D. E.; Abati, A. (1999):** Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART-1): The advent of a preferred immunocytochemical antibody for the diagnosis of metastatic malignant melanoma with fine-needle aspiration. In: *Cancer* 87 (1), S. 37-42.
- Fitzpatrick, T. B. (1988):** The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. In: *Archives of Dermatology* 124 (6), S. 869-871.
- Fritsch, P. (Hg.) (2004):** Dermatologie, Venerologie. Grundlagen - Klinik - Atlas ; 2. Aufl. Berlin [u. a.]: Springer.
- Fuchs, E.; Green, H. (1980):** Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. In: *Cell* 19 (4), S. 1033-1042.
- Galli, S. J.; Tsai, M.; Wershil, B. K. (1993):** The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. In: *American Journal of Pathology* 142 (4), S. 965-974.
- Ghazizadeh, S.; Taichman, L. B. (2001):** Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: A lineage analysis of adult mouse skin. In: *The EMBO Journal* 20 (6), S. 1215-1222.
- Gillitzer, R.; Goebeler, M. (2001):** Chemokines in cutaneous wound healing. In: *Journal of Leukocyte Biology* 69 (4), S. 513-521.
- Grabbe, J.; Welker, P.; Dippel, E.; Czarnetzki, B. M. (1994):** Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. In: *Archives of Dermatological Research* (287), S. 78-84.
- Harvima, I. T.; Nilsson, G. (2011):** Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. In: *Acta Dermato-Venereologica* 91 (6), S. 644-650.
- Hedley, S. J.; Layton, C.; Heaton, M.; Chakrabarty, K. H.; Dawson, R. A.; Gawkrödger, D. J.; MacNeil, S. (2002):** Fibroblasts play a regulatory role in the control of pigmentation in reconstructed human skin from skin types I and II. In: *Pigment Cell Research* 15 (1), S. 49-56.
- Hernández-Barrera, 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. In: *Clinical and Experimental Dermatology* 33 (3), S. 305-308.
- Hinz, B. (2007):** Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. In: *Journal of Investigative Dermatology* 127 (3), S. 526-537.
- Huttunen, M.; Naukkarinen, A.; Horsmanheimo, M.; Harvima, I. T. (2002):** Transient production of stem cell factor in dermal cells but increasing expression of Kit receptor in mast cells during normal wound healing. In: *Archives of Dermatological Research* 294 (7), S. 324-330.

- Imokawa, G. (2004):** Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. In: *Pigment Cell Research* 17 (2), S. 96-110.
- Imokawa, G.; Kawai, M. (1987):** Differential hypermelanosis induced by allergic contact dermatitis. In: *Journal of Investigative Dermatology* 89 (6), S. 540-546.
- Inazu, M.; Mishima, Y. (1993):** Detection of eumelanogenic and pheomelanogenic melanosomes in the same normal human melanocyte. In: *Journal of Investigative Dermatology* 100 (2 Suppl), S. 172S-175S.
- Iriyama, S.; Ono, T.; Aoki, H.; Amano, S. (2011):** Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal-epidermal junction. In: *Journal of Dermatological Science* 64 (3), S. 223-228.
- Ito, M.; Kawa, Y.; Ono, H.; Okura, M.; Baba, T.; Kubota, Y. et al. (1999):** Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors. In: *Journal of Investigative Dermatology* 112, S. 796-801.
- Ito, S.; Wakamatsu, K. (2003):** Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. In: *Pigment Cell Research* 16 (5), S. 523-531.
- Janssens, A. S.; Heide, R.; Den Hollander, J. C.; Mulder, P. G.; Tank, B.; Oranje, A. P. (2005):** Mast cell distribution in normal adult skin. In: *Journal of Clinical Pathology* 58 (3), S. 285-289.
- Kang, H. Y. (2012):** Melasma and aspects of pigmentary disorders in Asians. In: *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 139 (3), S. 92-95.
- Kang, H. Y.; Hwang, J. S.; Lee, J. Y.; Ahn, J. H.; Kim, J.-Y.; Lee, E.-S.; Kang, W. H. (2006):** The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. In: *British Journal of Dermatology* 154 (6), S. 1094-1099.
- Kayaselcuk, F.; Polat, A.; Kilinc, F.; Güvel, S.; Tuncer, I. (2003):** p53, Fas (APO 1) and Ki-67 immunostaining in testicular germ-cell tumors and correlation with pathologic stage, tumor size, necrosis and vascular invasion. In: *Turkish Journal of Cancer* 33 (3), S. 137-143.
- Keene, D. R.; Sakai, L. Y.; Lunstrum, G. P.; Morris, N. P.; Burgeson, R. E. (1987):** Type VII Collagen forms an extended network of anchoring fibrils. In: *The Journal of Cell Biology* 104, S. 611-621.
- KEYENCE Deutschland (2006):** KEYENCE BZ-8000 Bedienungsanleitung.
- Khakoo, A. Y.; Finkel, T. (2005):** Endothelial progenitor cells. In: *Annual Review of Medicine* 56, S. 79-101.
- Kim, M.-S.; Kim, Y. K.; Lee, D. H.; Seo, J. E.; Cho, K. H.; Eun, H. C.; Chung, J. H. (2009):** Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. In: *British Journal of Dermatology* 160 (2), S. 393-402.
- Kim, M.-S.; Lee, D. H.; Lee, C.-W.; Kim, Y. K.; Lee, J. M.; Shin, Y. C. et al. (2013):** Mast cell stabilizer, ketotifen, prevents UV-induced wrinkle formation. In: *Journal of Investigative Dermatology* 133 (4), S. 1104-1107.
- Koivukangas, V. (2004):** Wound healing in a suction blister model. An experimental study with special reference to healing in patients with diabetes and patients with obstructive jaundice. University of Oulu, Oulu (Finland).
- Kovacs, D.; Cardinali, G.; Aspite, N.; Cota, C.; Luzi, F.; Bellei, B. et al. (2010):** Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. In: *British Journal of Dermatology* 163 (5), S. 1020-1027.
- Lacz, N. L.; Vafaie, J.; Kihiczak, N. I.; Schwartz, R. A. (2004):** Postinflammatory hyperpigmentation: A common but troubling condition. In: *International Journal of Dermatology* 43 (5), S. 362-365.

- Lamel, S. A.; Rahvar, M.; Maibach, H. I. (2013):** Postinflammatory hyperpigmentation secondary to external insult: An overview of the quantitative analysis of pigmentation. In: *Cutaneous and Ocular Toxicology* 32 (1), S. 67-71.
- Land, E. J.; Riley, P. A. (2000):** Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. In: *Pigment Cell Research* 13 (4), S. 273-277.
- Larregina, A. T.; Falo, L. D. (2005):** Changing paradigms in cutaneous immunology: Adapting with dendritic cells. In: *Journal of Investigative Dermatology* 124 (1), S. 1-12.
- Lee, D. J.; Park, K. C.; Ortonne, J. P.; Kang, H. Y. (2012):** Pendulous melanocytes: A characteristic feature of melasma and how it may occur. In: *British Journal of Dermatology* 166 (3), S. 684-686.
- Lee, D. Y.; Cho, K. H. (2005):** The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. In: *Archives of Dermatological Research* 296 (7), S. 296-302.
- Leivo, T.; Kiistala, U.; Vesterinen, M.; Owaribe, K.; Burgeson, R. E.; Virtanen, I.; Oikarinen, A. (2000):** Re-epithelialization rate and protein expression in the suction-induced wound model: Comparison between intact blisters, open wounds and calcipotriol-pretreated open wounds. In: *British Journal of Dermatology* 142 (5), S. 991-1002.
- Leong, F. J. W.-M.; McGee, J. O.'D. (2001):** Automated complete slide digitization: A medium for simultaneous viewing by multiple pathologists. In: *The Journal of Pathology* 195 (4), S. 508-514.
- Li, L.; Fukunaga-Kalabis, M.; Yu, H.; Xu, X.; Kong, J.; Lee, J. T.; Herlyn M. (2010):** Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. In: *Journal of Cell Science* 123 (Pt 6), S. 853-860.
- Lin, J. Y.; Fisher, D. E. (2007):** Melanocyte biology and skin pigmentation. In: *Nature* 445 (7130), S. 843-850.
- Li, Q.; Yu, Y.; Bischoff, J.; Mulliken, J. B.; Olsen, B. R. (2003):** Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. In: *Journal of Pathology* 201 (2), S. 296-302.
- Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (Hg.) (2006):** Der Experimentator Immunologie. 2. Aufl. München: Spektrum Akademischer Verlag als Imprint der Elsevier GmbH.
- Marieb, E. N.; Hoehn, K. (Hg.) (2007):** Human Anatomy & Physiology. 7. Aufl. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Masu, S.; Seigi, M. (1983):** Pigmentary incontinence in fixed drug eruptions. In: *Journal of American Academy of Dermatology* 8 (4), S. 525-532.
- Matsuda, R.; Takahashi, T.; Nakamura, S.; Sekido, Y.; Nishida, K.; Seto, M. et al. (1993):** Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. In: *American Journal of Pathology* 142 (1), S. 339-364.
- Mayer, T. C.; Green, M. C. (1968):** An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and S1 loci in mice. In: *Developmental Biology* 18 (1), S. 62-75.
- Medzhitov, R. (2008):** Origin and physiological roles of inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 428-435.
- Metcalf, D. D.; Baram, D.; Mekori, Y. A. (1997):** Mast cells. In: *Physiological Reviews* 77 (4), S. 1033-1079.
- Michiels, C. (2003):** Endothelial cell functions. In: *Journal of Cellular Physiology* 196 (3), S. 430-443.

- Mintz, B.; Russell, E. S. (1957):** Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. In: *Journal of Experimental Zoology* 134 (2), S. 207-237.
- Molderings, G. J. (2010):** Mast cell function in physiology and pathophysiology. In: *Biotrend Reviews* (5), S. 1-12.
- Moll, I.; Jung, E. G.; Augustin, M. (Hg.) (2010):** Dermatologie. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Monteiro, M. R.; Murphy, E. E.; Galaria, N. A.; Whitaker-Menezes, D.; Murphy, G. F. (2000):** Cytological alterations in dermal dendrocytes in vitro: evidence for transformation to a non-dendritic phenotype. In: *British Journal of Dermatology* 143 (1), S. 84-90.
- Mulisch, M.; Welsch, U. (Hg.) (2010):** Romeis Mikroskopische Technik. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Murase, D.; Hachiya, A.; Amano, Y.; Ohuchi, A.; Kitahara, T.; Takema, Y. (2009):** The essential role of p53 in hyperpigmentation of the skin via regulation of paracrine melanogenic cytokine receptor signaling. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (7), S. 4343-4353.
- Murphy, K. M.; Travers, P.; Walport, M. (Hg.) (2009):** Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Neundörfer, B.; Heuß, D. (Hg.) (2007):** Polyneuropathien. Stuttgart: Thieme.
- Nishiyama, T.; Amano, S.; Tsunenaga, M.; Kadoya, K.; Takeda, A.; Adachi, E.; Burgeson, R. E. (2000):** The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. In: *Journal of Dermatological Science* 24 (1), S. 51-59.
- Noblesse, E.; Nizard, C.; Cario-André, M.; Lepreux, S.; Pain, C.; Schnebert, S. et al. (2006):** Skin ultrastructure in senile lentigo. In: *Skin pharmacology and physiology* 19 (2), S. 95-100.
- Nordlund, J. J.; Boissy, R. E.; Hearing, V. J.; King, R. A.; Oetting, W. S.; Ortonne, J.-P. (Hg.) (2008):** The Pigmentary System. Topical Treatment in The Pigmentary Disorders. 2. Aufl.: John Wiley and Sons, Inc.
- Okazaki, M.; Yoshimura, K.; Suzuki, Y.; Uchida, G.; Kitano, Y.; Harii, K.; Imokawa, G. (2003):** The mechanism of epidermal hyperpigmentation in café-au-lait macules of neurofibromatosis type 1 (von Recklinghausen's disease) may be associated with dermal fibroblast-derived stem cell factor and hepatocyte growth factor. In: *British Journal of Dermatology* 148 (4), S. 689-697.
- Ortonne, J.-P.; Bissett, D. L. (2008):** Latest insights into skin hyperpigmentation. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 13 (1), S. 10-14.
- O'Shea, J. J.; Ma, A.; Lipsky, P. (2002):** Cytokines and autoimmunity. In: *Nature Reviews. Immunology* 2 (1), S. 37-45.
- Øyehaug, L.; Plahte, E.; Vage, D. I.; Omholt, S. W. (2002):** The regulatory basis of melanogenic switching. In: *Journal of Theoretical Biology* 215 (4), S. 449-468.
- Papa, C. M.; Kligman, A. M. (1965):** The behavior of melanocytes in inflammation. In: *Journal of Investigative Dermatology* 45 (6), S. 465-473.
- Payne, V.; Kam, P. C. A. (2004):** Mast cell tryptase: A review of its physiology and clinical significance. In: *Anaesthesia* 59 (7), S. 695-703.
- Plensdorf, S.; Martinez, J. (2009):** Common pigmentation disorders. In: *American Family Physician* 79 (2), S. 109-116.
- Raposo, G.; Marks, M. S. (2002):** The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. In: *Traffic* 3 (4), S. 237-248.
- Rauscher, C. (2012):** Box-Plot Schulung. Beiersdorf AG. Biometrie, 19.03.2012.

- Reda, M.; Zickri, M.; Refaat, N.; El-Sherif, H. (2001):** A comparative study of the proliferative markers in different proliferative skin conditions compared to normal human skin. In: *Egyptian Journal of Surgery* 20 (4), S. 754-767.
- Rigopoulos, D.; Gregoriou, S.; Katsambas, A. (2007):** Hyperpigmentation and melasma. In: *Journal of Cosmetic Dermatology* 6 (3), S. 195-202.
- Rinn, J. L.; Bondre, C.; Gladstone, H. B.; Brown, P. O.; Chang, H. Y. (2006):** Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. In: *PLoS Genetics* 2 (7), S. e119.
- Rodero, M. P.; Khosrotehrani, K. (2010):** Skin wound healing modulation by macrophages. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 3 (7), S. 643-653.
- Ruiz-Maldonado, R.; Orozco-Covarrubias, M. de la L. (1997):** Postinflammatory hypopigmentation and hyperpigmentation. In: *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 16 (1), S. 36-43.
- Ruthenberg, R. (2006):** Universelles Fluoreszenzmikroskop. Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop für zahlreiche Anwendungen. In: *BIOspektrum* 12, S. 638-639.
- Salmon, J. K.; Armstrong, C. A.; Ansel, J. C. (1994):** The skin as an immune organ. In: *The Western Journal of Medicine* 160 (2), S. 146-152.
- Sappino, A. P.; Schürch, W.; Gabbiani, G. (1990):** Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. In: *Laboratory Investigation* 63 (2), S. 144-161.
- Sawhney, N.; Hall, P. A. (1992):** Ki-67 structure, function and new antibodies. In: *Journal of Pathology* 168, S. 161-162.
- Schütt, C.; Bröker, B. (Hg.) (2006):** Grundwissen Immunologie. 1. Aufl. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Singer, A. J.; Clark, R. A. F. (1999):** Cutaneous wound healing. In: *The New England Journal of Medicine* 341 (10), S. 738-746.
- Slominski, A.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J. (2004):** Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. In: *Physiological Reviews* 84 (4), S. 1155-1228.
- Slominski, A.; Wortsman, J. (2000):** Neuroendocrinology of the skin. In: *Endocrine Reviews* 21 (5), S. 457-487.
- Smuda, C. (2013):** Saugblasenmethode. Hamburg, 23.05.2013. E-Mail an Verena Rauchberger.
- Snell, R. S. (1962):** A study of the effect of chronic irritation on melanogenesis in the skin. In: *British Journal of Experimental Pathology* 43 (6), S. 581-586.
- Sorrell, J. M.; Caplan, A. I. (2004):** Fibroblast heterogeneity: More than skin deep. In: *Journal of Cell Science* 117 (5), S. 667-675.
- Sorrentino, A.; Ferracin, M.; Castelli, G.; Biffoni, M.; Tomaselli, G.; Baiocchi, M. et al. (2008):** Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. In: *Experimental Hematology* 36 (8), S. 1035-1046.
- Sriwiriyanont, P.; Ohuchi, A.; Hachiya, A.; Visscher, M. O.; Boissy, R. E. (2006):** Interaction between stem cell factor and endothelin-1: Effects on melanogenesis in human skin xenografts. In: *Laboratory Investigation* 86 (11), S. 1115-1125.
- Sterry, Wolfram (Hg.) (2011):** Kurzlehrbuch Dermatologie. Stuttgart: Thieme.
- Strutz, F.; Okada, H.; Lo, C. W.; Danoff, T.; Carone, R. L. (1995):** Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. In: *The Journal of Cell Biology* 130 (2), S. 393-405.

- Sumpio, B. E.; Riley, K. T.; Dardik, A. (2002):** Cells in focus: Endothelial cell. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (12), S. 1508-1512.
- Tchilian, E. Z.; Beverley, P. C.L (2006):** Altered CD45 expression and disease. In: *TRENDS in Immunology* 27 (3), S. 146-153.
- Theoharides, T. C.; Kalogeromitros, D. (2006):** The critical role of mast cells in allergy and inflammation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088, S. 78-99.
- Theoharides, T. C.; Cochrane, D. E. (2004):** Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. In: *Journal of Neuroimmunology* 146 (1-2), S. 1-12.
- Tobin, D. J. (2006):** Biochemistry of human skin-our brain on the outside. In: *Chemical Society Reviews* 35 (1), S. 52-67.
- Tomita, Y.; Maeda, K.; Tagami, H. (1992):** Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: Possible role in postinflammatory pigmentation. In: *Pigment Cell Research* 5 (5 Pt 2), S. 357-361.
- Touhami, A.; Di Pascuale, M. A.; Kawatika, T.; Del Valle, M; Rosa, R. H. Jr.; Dubovy, S.; Tseng, S. C. (2005):** Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia. In: *British Journal of Ophthalmology* 89 (3), S. 269-274.
- Trautmann, A.; Toksoy, A.; Engelhardt, E.; Bröcker, E. B.; Gillitzer, R. (2000):** Mast cell involvement in normal human skin wound healing: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. In: *The Journal of Pathology* 190 (1), S. 100-106.
- Tsunenaga, M.; Adachi, E.; Amano, S.; Burgeson, R. E.; Nishiyama, T. (1998):** Laminin 5 can promote assembly of the lamina densa in the skin equivalent model. In: *Matrix Biology* 17 (8-9), S. 603-613.
- Ünver, N.; Freyschmidt-Paul, P.; Hörster, S.; Wenck, H.; Stäb, F.; Blatt, T.; Elsässer, H.-P. (2006):** Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. In: *British Journal of Dermatology* 155, S. 119-128.
- Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. (2009):** The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. In: *The Journal of International Medical Research* 37 (5), S. 1528-1542.
- Warford, A.; Howat, W.; McCafferty, J. (2004):** Expression profiling by high-throughput immunohistochemistry. In: *Journal of Immunological Methods* 290 (1-2), S. 81-92.
- Werner, S.; Krieg, T.; Smola, H. (2007):** Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. In: *Journal of Investigative Dermatology* 127 (5), S. 998-1008.
- Wessel, S. (2012):** Mikroskopische Methoden der Melaninbestimmung. Beiersdorf AG, 2012.
- Yamaguchi, Y.; Brenner, M.; Hearing, V. J. (2007):** The regulation of skin pigmentation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (38), S. 27557-27561.
- Zaba, L. C.; Krueger, J. G.; Lowes, M. A. (2009):** Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. In: *Journal of Investigative Dermatology* 129 (2), S. 302-308.
- Zoog, S. J.; Itano, A.; Trueblood, E.; Pacheco, E.; Zhou, L.; Zhang, X. et al. (2009):** Antagonists of CD117 (cKit) signaling inhibit mast cell accumulation in healing skin wounds. In: *Cytometry Part A* 75A, S. 189-198.

## 9 Anhang

### 9.1 Ergänzende Antikörperliste

Tabelle 9.1: Übersicht etablierter Primärantikörper.

Bezeichnung Primär- Antikörper	Klonalität	Spezies	Ver- wendung	Verdünnung - auf Kryoschnitte etabliert	Hersteller	Bestell- nr.
anti-Human AASS, ID (Alpha- aminoadipic Semialdehyde Synthase, Mitochondrial, LKR/SDH)	polyklonal	Kaninchen	IHC	1:20	Biomol, Hamburg	A0001- 98
anti-Kollagen 3, Klon FH-7A	monoklonal	Maus	IF	1:600	Abcam, Cambridge (UK)	ab6310
anti-CD1a, Klon CD1a007	monoklonal	Maus	IF IHC	1:50 1:50	Abcam, Cambridge (UK)	ab708
anti-CD11c, Klon EP1347Y	monoklonal	Kaninchen	IF IHC	1:300 1:300	Abcam, Cambridge (UK)	ab52632
anti-CD45	monoklonal	Maus	IF	1:500	Acris, Herford	AM0565 5PU-N
anti-CD62E (E- Selectin)	polyclonal	Kaninchen	IF	1:100	Abcam, Cambridge (UK)	ab18981
anti-CD68, Klon C-18	polyklonal	Ziege	IF IHC	negativ negativ in allen getesteten Konzentrat- ionen	SantaCruz, Heidelberg	sc-7082
anti-CD86, Klon EP1158Y	monoklonal	Kaninchen	IF IHC	1:300 1:800	Abcam, Cambridge (UK)	ab53004
anti-CD146, Klon P1H12	monoklonal	Maus	IF IHC	1:800 1:2000	Abcam, Cambridge (UK)	ab24577
anti-c-Kit	polyklonal	Kaninchen	IF	negativ in allen getesteten Konzentrat- ionen	Abcam, Cambridge (UK)	ab5506
anti-CPS1, Klon ab2	polyclonal	Kaninchen	IHC	1:100	Sigma- Aldrich, Seelze	AV4569 0- 100UG
anti-ICAM1,	monoklonal	Maus	IF	1:500	Abcam,	ab2213

Klon MEM-111					Cambridge (UK)	
anti-Interneixin, alpha, Klon 11E242	monoklonal	Maus	IHC	1:4000	Biomol, Hamburg	I8442-74C
anti-Keratin 1	polyklonal	Kaninchen	IF	1:1000	Covance, München	PRB-149P
anti-KRT5/KRT14 (Keratin 5), Klon 16.4	monoklonal	Maus	IF	1:500	Abnova, Heidelberg	MAB1984
anti-MCAM/CD146	polyklonal	Ziege	IF	1:100	R&D Systems, Abingdon (UK)	AF932
anti-MEL-5, Klon Ta99	monoklonal	Maus	IF	1:500	Covance, München	SIG-38150-1000
anti-Melan-A, Klon C-20	polyklonal	Ziege	IF	Negativ in allen getesteten Konzentrationen	SantaCruz, Heidelberg	sc-8106
anti-Metabotropic Glutamate Receptor 5	polyklonal	Kaninchen	IHC	1:100	Abcam, Cambridge (UK)	ab27190
anti-NMDAR1, Klon Ab-890	polyklonal	Kaninchen	IHC	1:500	AAT Bioquest, Kalifornien (USA)	#8B0692
anti-Paxillin, Klon 5H11	monoklonal	Maus	IHC	1:100	Millipore, Kalifornien (USA)	NM_002859
anti-Tyrosinase, Klon T311	monoklonal	Maus	IHC	1:50	Abcam, Cambridge (UK)	ab738
anti-Vimentin, Klon 3B4	monoklonal	Maus	IF	1:4000	Dako, Glostrup (Dänemark)	M7020

## 9.2 Wertetabellen der Ergebnisse

### 9.2.1 Epidermale Parameter

#### Ki-67 positive Zellen

##### a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm Epidermlänge)

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13121	217,05	222,73	375,62	638,96	224,5	348,93	136,49	232,33
13250	160,48	806,24	124,98	203,28	59,12	394,34	167,92	77,79
14487	116	9,34	155,34	89,75	166,99	209,73	145,64	54,92
18306	50,82	514,45	19,74	51,27	137,19	360,09	24,93	205,53
2889	187,55	158,56	173,03	317,01	331,57	163,23	178,02	226,46
7430	48,22	185,31	88,91	91,38	169,33	83,88	58,21	183,96

##### b) Relativierung zur Kontrolle

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
13121	102,61	170,11	155,43	170,22
13250	502,40	162,64	667,00	46,33
14487	8,05	57,77	125,59	37,71
18306	1012,29	259,68	262,48	824,47
2889	84,54	183,21	49,23	127,21
7430	384,29	102,77	49,54	316,01

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm Epidermislänge)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13121	0,3854	0,2191	0,3552	0,5107	0,2970	0,4559	0,2191	0,2785
13250	0,1598	0,4871	0,1354	0,1385	0,0722	0,2557	0,1983	0,2261
14487	0,1648	0,0078	0,2147	0,0960	0,2266	0,2878	0,2837	0,0587
18306	0,0904	0,3661	0,0369	0,0784	0,2127	0,2912	0,0547	0,2249
2889	0,1934	0,2887	0,2687	0,3581	0,5538	0,2310	0,2470	0,3547
7430	0,0818	0,1189	0,1262	0,0849	0,1999	0,0938	0,0832	0,2238

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
13121	56,84	143,78	153,47	127,11
13250	304,80	102,30	354,33	114,01
14487	4,70	44,73	127,02	20,67
18306	404,72	212,44	136,87	411,49
2889	149,23	133,28	41,71	143,58
7430	145,31	67,29	46,92	269,09

**MART-1, TRP1 und c-Kit positive Fläche****a) Positive Fläche in mm<sup>2</sup> (Bezug: 1 mm Epidermislänge)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13250	0,0013	0,0027	0,0016	0,0037	0,0019	0,0021	0,0015	0,0029
14487	0,0025	0,0162	0,0022	0,0105	0,0029	0,0033	0,0023	0,0009
2889	0,0068	0,0038	0,0036	0,0053	0,0025	0,0053	0,0037	0,0023
3258	0,0075	0,0136	0,0083	0,0165	0,0036	0,0091	0,0054	0,0060
7430	0,0095	0,0350	0,0078	0,0165	0,0130	0,0168	0,0106	0,0113
9951	0,0098	0,0039	0,0038	0,0143	0,0053	0,0083	0,0066	0,0088

**b) Relativierung zur Kontrolle**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13250	55,97	146,32	212,43	61,62
14487	199,47	231,15	111,96	194,89
2889	657,78	482,07	112,67	41,29
3258	181,56	197,48	251,49	109,71
7430	370,31	211,28	129,55	106,22
9951	40,26	372,22	155,22	133,69

**c) Relativer Anteil positiver Fläche an der Gesamtfläche (Bezug: 1 mm Epidermislänge)**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>		<b>4 Wochen</b>		<b>8 Wochen</b>		<b>16 Wochen</b>	
	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>
13250	0,0535	0,0513	0,0576	0,0521	0,0405	0,0728	0,0532	0,0388
14487	0,0192	0,0251	0,0216	0,0409	0,0294	0,0282	0,0238	0,0344
2889	0,0293	0,1209	0,0351	0,0879	0,0369	0,0383	0,0300	0,0123
3258	0,0924	0,1646	0,1234	0,1602	0,0651	0,1286	0,0880	0,0962
7430	0,1366	0,2535	0,1174	0,1491	0,1664	0,1457	0,1162	0,1561
9951	0,1310	0,0636	0,0660	0,1400	0,0758	0,1045	0,0845	0,0971

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Fläche an der Gesamtfläche**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13250	95,99	90,32	179,65	72,94
14487	131,06	189,57	95,82	144,63
2889	412,17	250,39	103,89	41,13
3258	178,21	129,77	197,65	109,28
7430	185,58	127,03	87,57	134,29
9951	48,52	212,08	137,89	115,01

**TRP1 positive Fläche****a) Positive Fläche in mm<sup>2</sup> (Bezug: 1 mm Epidermlänge)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13250	0,0011	0,0100	0,0040	0,0090	0,0017	0,0035	0,0015	0,0026
14487	0,0024	0,0112	0,0019	0,0098	0,0025	0,0074	0,0021	0,0017
2889	0,0019	0,0255	0,0030	0,0180	0,0040	0,0030	0,0020	0,0025
3258	0,0020	0,0119	0,0018	0,0083	0,0010	0,0050	0,0014	0,0029
7430	0,0030	0,0408	0,0028	0,0222	0,0087	0,0211	0,0126	0,0157
9951	0,0065	0,0311	0,0022	0,0103	0,0039	0,0074	0,0015	0,0020

**b) Relativierung zur Kontrolle**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
13250	916,49	227,03	206,84	174,37
14487	468,79	519,15	300,41	82,03
2889	1360,63	589,52	73,65	125,16
3258	600,32	451,92	518,09	211,74
7430	1378,60	791,37	243,23	124,74
9951	479,16	463,52	189,26	135,22

**c) Relativer Anteil positiver Fläche an der Gesamtfläche (Bezug: 1 mm Epidermlänge)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13250	0,0179	0,0953	0,0599	0,0785	0,0219	0,0429	0,0245	0,0294
14487	0,0290	0,0853	0,0265	0,0826	0,0275	0,0781	0,0279	0,0211
2889	0,0094	0,5070	0,0492	0,1486	0,0665	0,0468	0,0349	0,0353
3258	0,0296	0,1380	0,0293	0,0779	0,0175	0,0683	0,0259	0,0463
7430	0,0468	0,2744	0,0442	0,1795	0,1005	0,1789	0,1355	0,2081
9951	0,0885	0,1986	0,0321	0,1049	0,0527	0,1067	0,0215	0,0254

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Fläche an der Gesamtfläche**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13250	533,41	130,90	196,42	119,75
14487	294,10	312,06	284,13	75,64
2889	5371,63	301,71	70,28	101,30
3258	466,04	266,16	390,39	178,33
7430	585,72	406,39	178,13	153,57
9951	224,51	326,35	202,34	118,22

**c-Kit positive Zellen****a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm Epidermislänge)**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>		<b>4 Wochen</b>		<b>16 Wochen</b>	
	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>
13250	64,99	332,71	122,55	179,33	204,8	264,05
14487	105,91	362,68	82,1	122,67	105,39	134,1
2889	188,11	402,91	266,4	384,11	205,31	221,81
3258	128,17	445,13	73,27	366,45	110,96	140,44
7430	138,6	252,23	200,78	156,27	140,01	145,25
9951	119,76	645,38	66,53	271,29	126,94	123,6

**b) Relativierung zur Kontrolle**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13250	511,96	146,34	128,93
14487	342,44	149,41	127,24
2889	214,19	144,19	108,04
3258	347,31	500,11	126,56
7430	181,99	77,83	103,74
9951	538,89	407,76	97,37

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm Epidermislänge)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB
13250	0,1287	0,2423	0,2493	0,2107	0,2740	0,3481
14487	0,1743	0,2737	0,1473	0,1841	0,1778	0,1784
2889	0,3585	0,4881	0,3858	0,4007	0,2609	0,3035
3258	0,1839	0,4072	0,1319	0,2952	0,2156	0,2508
7430	0,2665	0,2227	0,2950	0,1916	0,2430	0,1670
9951	0,1806	0,4366	0,1030	0,2142	0,1662	0,1359

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	16 Wochen
13250	188,29	84,49	127,03
14487	156,99	125,02	100,34
2889	136,15	103,87	116,34
3258	221,40	223,77	116,33
7430	83,57	64,94	68,72
9951	241,79	207,99	81,74

## 9.2.2 Dermale Parameter

### Ki-67 positive Zellen

**a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13121	62,87	82,56	29,76	53,11	15,82	40,93	7,56	20,94
14487	7,40	13,81	15,02	46,89	26,79	29,07	18,82	26,77
18306	14,18	44,66	8,35	0,00	8,71	8,32	24,00	23,20
2889	15,51	20,96	24,07	133,60	20,36	46,52	11,41	2,81
7430	2,05	59,41	2,39	16,22	8,55	26,83	11,71	5,21

**b) Relativierung zur Kontrolle**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13121	131,32	178,46	258,70	277,11
14487	186,59	312,29	108,54	142,23
18306	314,85	0,00	95,50	96,69
2889	135,16	555,09	228,48	24,61
7430	2899,338	677,84	313,87	44,48

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>		<b>4 Wochen</b>		<b>8 Wochen</b>		<b>16 Wochen</b>	
	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>
13121	0,0400	0,0472	0,0223	0,0264	0,0123	0,0161	0,0069	0,0152
14487	0,0110	0,0114	0,0123	0,0276	0,0138	0,0225	0,0131	0,0150
18306	0,0091	0,0219	0,0086	0,0000	0,0109	0,0069	0,0160	0,0108
2889	0,0111	0,0192	0,0142	0,0735	0,0138	0,0304	0,0145	0,0030
7430	0,0033	0,0362	0,0033	0,0094	0,0063	0,0148	0,0073	0,0033

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13121	117,82	118,37	131,23	221,39
14487	103,64	225,08	162,40	114,64
18306	240,32	0,00	63,76	67,22
2889	172,47	519,53	219,77	20,43
7430	1108,59	283,30	236,65	44,45

**FSP positive Zellen****a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
18306	1116,35	2104,91	1165,61	1531,13	531,22	1095,08	620,44	1139,60
3258	343,59	649,11	498,58	1709,16	774,57	1123,47	408,67	315,53
7430	299,62	1173,82		940,18	888,87	1577,12	841,06	1338,32

**b) Relativierung zur Kontrolle**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
18306	188,55	131,36	206,15	183,67
3258	188,92	342,81	145,04	77,21
7430	391,77		177,43	159,12

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
18306	0,8510	0,9090	0,7821	0,9228	0,6344	0,6330	0,5889	0,7284
3258	0,1877	0,4299	0,3716	0,6725	0,7657	0,7379	0,3053	0,2766
7430	0,4716	0,7223		0,6563	0,6136	0,8146	0,6669	0,7748

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
18306	106,81	117,98	99,78	123,68
3258	229,06	180,97	96,37	90,60
7430	153,16		132,75	116,19

**CD31 positive Zellen****a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13250	391,66	735,06	362,08	670,83	514,12	470,38	454,62	456,18
18306	352,80	544,53	504,73	625,30	560,02	897,70	915,01	803,99
2889	1020,58	496,29	510,19	1112,53	873,12	1080,17	560,88	565,49
3258	881,93	1348,81	747,35	1075,24	458,82	672,55	506,93	666,62
7430	752,40	1047,89	311,19	877,15	306,58	667,45	324,92	537,69
9951	850,44	1000,75	750,59	1112,65	540,37	804,43	262,67	511,88

**b) Relativierung zur Kontrolle**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	16 Wochen
13250	187,68	185,27	91,49	100,34
18306	154,35	123,89	160,30	87,87
2889	48,63	218,06	123,71	100,82
3258	152,94	143,87	146,58	131,50
7430	139,27	281,87	217,71	165,48
9951	117,67	148,24	148,87	194,88

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB	K	SB
13250	0,2608	0,4900	0,3294	0,3651	0,3995	0,3241	0,4309	0,4118
18306	0,4804	0,3802	0,5594	0,6306	0,6088	0,6736	0,6643	0,6060
2889	0,5043	0,3990	0,4163	0,5851	0,6247	0,6683	0,4290	0,5113
3258	0,5979	0,6056	0,4789	0,6917	0,5493	0,4743	0,4156	0,5006
7430	0,5220	0,6536	0,4525	0,6443	0,3627	0,5030	0,3660	0,4291
9951	0,5923	0,5695	0,5737	0,3811	0,4754	0,5388	0,2066	0,3865

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>8 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
13250	187,86	110,82	81,15	95,57
18306	79,14	112,73	110,64	91,22
2889	79,12	140,54	106,97	119,19
3258	101,28	144,43	86,35	120,44
7430	125,21	142,37	138,69	117,23
9951	96,15	66,43	113,34	187,10

**CD45, CD68, CD14, Mastzelltryptase positive Zellen****a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>		<b>4 Wochen</b>		<b>16 Wochen</b>	
	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>
14342	825,07	2320,05	1114,07	1864,46	1588,55	1544,73
14723	1359,18	3683,28	2362,58	3996,21	1622,91	2964,41
17399	1519,19	2890,34	1643,18	2745,05	1488,05	3884,50
17910	1543,59	2554,13	1122,80	2325,77	1253,04	2491,29
5908	1845,37	4084,81	1644,21	3221,49	1687,83	2049,11
8313	1458,79	2262,35	1125,13	2512,71	1961,48	2558,58

**b) Relativierung zur Kontrolle**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
14342	281,19	167,36	97,24
14723	270,99	169,15	182,66
17399	190,25	167,06	261,05
17910	165,47	207,14	198,82
5908	221,35	195,93	121,40
8313	155,08	223,33	130,44

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB
14342	0,6374	0,8431	0,6578	0,7586	0,7327	0,8370
14723	0,8207	0,8969	0,9315	0,9599	0,8774	0,9400
17399	0,8441	0,8615	0,8049	0,8069	0,7575	0,9055
17910	0,7664	0,9203	0,7778	0,8969	0,7697	0,9041
5908	0,9343	0,9875	0,8769	0,9543	0,8798	0,9100
8313	0,8348	0,8536	0,8950	0,8774	0,9358	0,9458

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	16 Wochen
14342	132,28	115,34	114,24
14723	109,29	103,05	107,13
17399	102,06	100,25	119,53
17910	120,08	115,31	117,47
5908	105,69	108,82	103,43
8313	102,25	98,04	101,07

**CD45 positive Zellen**
**a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB
14342	493,08	622,36	170,41	390,95	570,81	567,36
14723	674,87	1961,56	812,76	1305,46	566,84	1271,81
17910	383,41	1120,77	381,89	930,97	515,40	543,77
5908	797,94	1808,00	619,52	718,80	545,76	1028,71
18306	261,73	625,53	180,22	120,58	389,01	359,11
7430	110,10	795,38	232,34	365,18	198,80	566,27

**b) Relativierung zur Kontrolle**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
14342	126,2186	229,4213	99,39605
14723	290,6586	160,6199	224,3701
17910	292,3193	243,7809	105,5048
5908	226,5841	116,0253	188,4895
18306	238,9985	66,9095	92,31458
7430	722,4089	157,172	284,8444

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>		<b>4 Wochen</b>		<b>16 Wochen</b>	
	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>	<b>K</b>	<b>SB</b>
14342	0,3621	0,3745	0,1660	0,2895	0,3234	0,3247
14723	0,4744	0,7018	0,6531	0,6023	0,4691	0,5424
17910	0,3084	0,5562	0,3260	0,4983	0,3881	0,3036
5908	0,6295	0,7767	0,5664	0,5162	0,5357	0,5256
18306	0,4164	0,4052	0,2953	0,2034	0,2986	0,2984
7430	0,1916	0,4976	0,2897	0,3000	0,3163	0,4145

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
14342	103,44	174,41	100,40
14723	147,95	92,21	115,63
17910	180,32	152,89	78,23
5908	123,39	91,14	98,12
18306	97,31	68,88	99,95
7430	259,69	103,55	131,06

**c-Kit positive Zellen****a) Anzahl positiver Zellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB
14342	89,91	273,25	116,18	242,69	143,87	375,47
14723	84,29	217,58	74,69	80,73	113,32	384,15
17399	216,99	216,69	84,10	411,16	194,68	415,14
17910	231,14	371,39	56,22	172,63	82,27	204,79
5908	152,86	376,57	122,14	417,08	159,13	398,46
8313	84,49	256,03	115,15	153,46	83,15	161,57

**b) Relativierung zur Kontrolle**

Proband	2 Wochen	4 Wochen	16 Wochen
14342	303,89	208,89	260,99
14723	258,14	108,09	338,98
17399	99,86	488,90	213,25
17910	160,68	307,10	248,91
5908	246,34	341,47	250,41
8313	303,05	133,27	194,32

**c) Relativer Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen (Bezug: 1 mm<sup>2</sup> Dermisfläche)**

Proband	2 Wochen		4 Wochen		16 Wochen	
	K	SB	K	SB	K	SB
14342	0,0491	0,1544	0,0945	0,1327	0,1263	0,2050
14723	0,0732	0,1288	0,0714	0,0618	0,0910	0,2079
17399	0,0910	0,1363	0,0842	0,1913	0,1826	0,2259
17910	0,1997	0,1853	0,0551	0,1155	0,0816	0,1403
5908	0,1444	0,1716	0,0920	0,1806	0,1713	0,1477
8313	0,0646	0,1426	0,0948	0,0925	0,0985	0,0851

**d) Relativierung zur Kontrolle – Anteil positiver Zellen an den Gesamtzellen**

<b>Proband</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>4 Wochen</b>	<b>16 Wochen</b>
14342	314,28	140,44	162,35
14723	175,83	86,58	228,41
17399	149,72	227,26	123,71
17910	92,78	209,63	171,93
5908	118,84	196,39	86,25
8313	220,67	97,61	86,33

**9.3 P-Werte**

<b>Ki-67 Epidermis</b>	<b>p-Werte</b>
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,3125
4 Wochen	0,1563
8 Wochen	0,4375
16 Wochen	0,3125
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	
2 Wochen	0,5625
4 Wochen	0,5625
8 Wochen	0,8438
16 Wochen	0,4375
<b>MART-1, TRP1, c-Kit</b>	<b>p-Werte</b>
Positive Fläche	
2 Wochen	0,3125
4 Wochen	0,0313
8 Wochen	0,0313
16 Wochen	0,5625
Relativer Anteil positiver Fläche an Gesamtfläche	
2 Wochen	0,2188
4 Wochen	0,0625
8 Wochen	0,2188
16 Wochen	0,8438
<b>TRP1</b>	<b>p-Werte</b>
Positive Fläche	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0313
8 Wochen	0,0625
16 Wochen	0,0625
Relativer Anteil positiver Fläche an Gesamtfläche	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0313
8 Wochen	0,0625

16 Wochen	0,2188
<b>c-Kit Epidermis</b>	p-Werte
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0938
16 Wochen	0,0635
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	p-Werte
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,5625
16 Wochen	0,6875
<b>CD31</b>	p-Werte
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,4375
4 Wochen	0,0313
8 Wochen	0,0625
16 Wochen	0,1563
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	
2 Wochen	0,8438
4 Wochen	0,3125
8 Wochen	0,8438
16 Wochen	0,1563
<b>Ki-67 Dermis</b>	p-Werte
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,1250
8 Wochen	0,1250
16 Wochen	1
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,3125
8 Wochen	0,1875
16 Wochen	0,6250
<b>CD45, CD68, CD14, Mastzelltryptase</b>	p-Werte
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0313
16 Wochen	0,0625
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0938
16 Wochen	0,0313
<b>CD45</b>	p-Werte
Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,0313
4 Wochen	0,0625
16 Wochen	0,2188
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	p-Werte
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,8438
16 Wochen	0,8438
<b>c-Kit Dermis</b>	p-Werte

---

Anzahl positiver Zellen	
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,0313
16 Wochen	0,0313
Relativer Anteil positiver Zellen an Gesamtzellen	
2 Wochen	0,0625
4 Wochen	0,1563
16 Wochen	0,1563