

Masterarbeit

Untersuchungen zum Mechanismus der exogenen Ochronose durch Hydrochinon

*Investigating the mechanism of Hydroquinone induced
exogenous Ochronosis*

Fakultät Life Sciences

Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Maren Merten

Matrikelnummer: XXXXXXXXXX

Hamburg, der 21.11.2018

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

Dr. Ludger Kolbe (Beiersdorf AG)

Diese Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor „*Photobiology*“ im Arbeitsbereich
„*Front End Innovation*“ der Beiersdorf AG in Hamburg

*„Wo kämen wir hin, wenn alle sagten,
wo kämen wir hin und keiner ginge,
um zu sehen, wohin wir kämen, wenn
wir gingen.“*

Kurt Marti

Danksagung

Einen sehr großen Dank möchte ich gegenüber Ludger Kolbe aussprechen, dem ich es zu verdanken habe diese wertvolle Erfahrung in diesem Labor sammeln zu dürfen und der für das Vorankommen des Projekts immer den richtigen Input gegeben hat.

Auch Oliver Ullrich möchte ich dafür danken, dass er bereits zum zweiten Mal eingewilligt hat, die Betreuung meiner Abschlussarbeit zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt auch Janine Störte, die mich für diese Position empfohlen und mich besonders auf persönlicher Seite unterstützt hat.

Tobias Mann möchte ich dafür danken, dass er bereits signifikante Vorarbeit für das Thema geleistet hat und der mir seinen Rat stets zur Verfügung gestellt hat.

Gudrun Weets und Kerstin Eggers bin ich für die nette Gesellschaft im Labor und die hervorragende

fachliche Kompetenz bei schwierigen Fragen im Laboralltag zu Dank verpflichtet.

Helge Schwengler danke ich für die Erkenntnis, dass sich älter werden im Job richtig lohnen kann.

Kimberly Nickel möchte ich dafür danken, dass sie mir fachlich, als auch materiell gerne ausgeholfen hat.

Marius Block danke ich herzlich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studieren ermöglicht haben und meinem Freund, der mich in jeder Hinsicht unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abstract	VII
Zusammenfassung	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Die menschliche Haut- Aufbau und Kollagensynthese	2
1.2. Endogene Ochronose in der Alkaptonurie	5
1.3. Das Hydrochinon-Paradoxon: Problematik der exogenen Ochronose	10
1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Materialien	16
2.1. Laborgeräte	16
2.1.1. Großgeräte	16
2.1.2. Kleingeräte	16
2.2. Verbrauchsmaterial	17
2.3. Chemikalien	18
2.4. Gebrauchslösungen und Medien	19
2.5. Antikörper	20
2.6. Primärzellen und Zelllinien	20
2.6.1. Primärzellen	20
2.6.2. Zelllinien	20
2.7. Software	21
3. Methoden	22
3.1. Zellkultur	22
3.1.1. Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen	22
3.1.2. Kultivierung und Passagieren von Zellen	22
3.1.3. Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter	23
3.2. UV-Bestrahlung	24
3.3. Induktion der Kollagensynthese bei primären humanen Fibroblasten und Sarkom-Zelllinien	25
3.3.1. Inkubation mit AA2P	25
3.3.2. Immunzytochemische Anfärbung von Kollagenfasern	25
3.4. Induktion ochronotischer Einlagerungen in dermalen Fibroblasten und Sarkom-Zelllinien	26
3.4.1. Inkubation der Zellen mit Homogentisinsäure und Hydrochinon	26
3.4.2. Anfärbung ochronotischer Pigmente in der Monolayer- Kultur	27
3.5. Induktion ochronotischer Pigmente in Kollagenmatrizen	28

3.5.1.	Erstellen einer 3D- Kollagenmatrix	28
3.5.2.	Inkubation der 3D- Kollagenmatrix mit HGA und Hydrochinon	28
3.6.	<i>In vitro</i> Assay zur Untersuchung der Oxidation von HGA und Hydrochinon	29
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Untersuchungen zur HGD in der Haut (Penneys' These)	31
4.2.	Untersuchung der Wirkungsweise von Tyrosinase und UV-Strahlung auf die Oxidation von Hydrochinon im Vergleich zu HGA (Katalytische Einflussfaktoren)	33
4.3.	Bindung von Hydrochinon an Kollagenfasern	37
4.3.1.	Induktion ochronotischer Pigmente in dermalen Fibroblasten durch HGA und Hydrochinon (zellbasiertes System)	38
4.3.2.	Induktion ochronotischer Pigmente in zellfreien Kollagen- Matrizen (zellfreies System)	47
5.	Diskussion und Ausblick.....	53
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis	59
6.1.	Fachliteratur	59
6.2.	Internetquellen	67
7.	Eidesstattliche Erklärung	68
8.	Anhang	69
8.1.	Induktion der Kollagensynthese in dermalen Fibroblasten und Sarkom-Zelllinien	69
8.2.	Einfluss von UV-Strahlung und Tyrosinase auf die Oxidation von Hydrochinon und HGA	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Schematischer Aufbau der drei Hauptschichten der Haut.....	3
Abbildung 1.2.	Kollagensynthese.....	4
Abbildung 1.3.	Endogene Ochronose (Histologisch).....	7
Abbildung 1.4.	Endogene Ochronose im Ohr, Auge und Gesicht.....	7
Abbildung 1.5.	Endogene Ochronose in der Haut	8
Abbildung 1.6.	Bindung von HGA und BQA an extrazelluläre Matrix- Komponenten ...	9
Abbildung 1.7.	Exogene Ochronose	11
Abbildung 1.8.	Exogene Ochronose in einer Vitiligo-Patientin	13
Abbildung 1.9.	Übersicht der geplanten Experimente zur Untersuchung des Mechanismus zur Entstehung exogener Ochronose durch Hydrochinon	14
Abbildung 3.1.	Prinzip der Zellzahlmessung im <i>NucleoCounter</i>	24
Abbildung 4.1.	Immunhistochemischer Nachweis der HGD.....	32
Abbildung 4.2.	Differenzspektrum von Hydrochinon und HGA nach Zugabe von Tyrosinase	35
Abbildung 4.3.	Kinetik der Entwicklung von BQ nach UVA-Bestrahlung von Hydrochinon.....	36
Abbildung 4.4.	Kinetik der Entwicklung von BQA nach UVA-Bestrahlung von HGA ..	37
Abbildung 4.5.	Kollagensynthese in BDF049, MG-63 und SaOS-2.....	40
Abbildung 4.6.	Anfärbung ochronotischer Pigmente von HDF nach Schmorl	42
Abbildung 4.7.	Digitale Vergrößerung der unbehandelten Kontrolle der angefärbten HDF	42
Abbildung 4.8.	Anfärbung ochronotischer Pigmente von Osteosarkom-Zellen nach Schmorl.....	43
Abbildung 4.9.	Digitale Vergrößerung der angefärbten Sarkom-Zellen.....	43
Abbildung 4.10.	Hintergrund der Schmorl-Färbung.....	44
Abbildung 4.11.	HDF BDF049 (7 Tage mit AA2P behandelt).....	45
Abbildung 4.12.	Sarkom-Zellen SaOS-2 (7 Tage mit AA2P behandelt).....	45
Abbildung 4.13.	Anfärbung von Melanin nach Schmorl als Kontrolle.....	46

Abbildung 4.14.	Makroskopische Pigmente in Kollagen-Gelen	49
Abbildung 4.15.	Kollagen-Gele mit Hydrochinon-haltigem Medium	49
Abbildung 4.16.	Kollagen-Gele mit HGA-haltigem Medium.....	50
Abbildung 4.17.	Vergleich ochronotischer Pigmente <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	51
Abbildung 4.18.	Mikroskopisch sichtbare Pigmente.....	52
Abbildung 4.19.	Makroskopisch sichtbare Pigmente bei 40facher und 200facher Vergrößerung.....	52
Abbildung 8.1.	Standardabweichungen der Messungen mit Tyrosinase	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.	Großgeräte.....	16
Tabelle 2.2.	Kleingeräte	16
Tabelle 2.3.	Verbrauchsmaterial	17
Tabelle 2.4.	Chemikalien	18
Tabelle 2.5.	Gebrauchslösungen und Medien	19
Tabelle 2.6.	Antikörper.....	20
Tabelle 2.7.	Primärzellen	20
Tabelle 3.1.	Protokoll der immunzytochemischen Anfärbung von Kollagenfasern	26
Tabelle 3.2.	Konzentrationen der Verdünnungsreihe von Hydrochinon und HGA zum Assay vor und nach Zugabe (50 µl) zum Well.....	29

Abkürzungsverzeichnis

AA2P	Ascorbinsäure 2-Phosphat-Sesquimagnesiumsalz Hydrat
BQ	Benzochinon
BQA	Benzochinon Essigsäure
BSA.....	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER.....	Endoplasmatisches Reticulum
Flow- Cyt	Durchflusszytometrie
HDF	Humane dermale Fibroblasten
HGA	Homogentisinsäure
HGD.....	Homogentisat- Dioxigenase
HQ.....	Hydrochinon
ICC	Immuncytochemistry
IHC	Immunhistochemistry
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PBSF	Phosphate buffered formol salin
PHQ	Polyhydrochinone
PJ	Propidium Jodid
RPKM	reads per kilobase per million mapped reads
WB.....	Westernblot

Abstract

The application of skin whitening compounds is deeply connected to severe adverse effects. Hydroquinone (HQ) is one of the most prominent whitening compounds that lead to the development of irreversible and disfiguring pigments of the skin, also known as exogenous ochronosis. Until now, the mechanism behind exogenous ochronosis is poorly understood. In order to prevent the occurrence of comparable side effects in new whitening compounds, the mentioned mechanism has to be better understood.

The objective of this master thesis was to find new approaches for the investigation of HQ inducing ochronotic pigments. An in vitro system was supposed to examine the ability of HQ to bind collagen fibers and therefore induce ochronosis. On one hand, a cell-based system was chosen in which fibroblasts were stimulated to produce collagen. On the other hand, a cell-free system, consisting of collagen gels, should simulate the connective tissue of the skin. Both systems were incubated with HQ or homogentisic acid (HGA) and checked for any development of ochronotic pigments. As oxidation seems to play a key role in the binding of HGA and HQ to collagen, the impact of potentially oxidizing factors on both compounds has been investigated. Regarding this, UV radiation and tyrosinase have been suspected to promote the induction of ochronosis.

The results obtained by the cell-based system did not meet the expectations. In the cell-free system, HQ and HGA induced ochronotic-like pigments that resemble the histological findings of ochronotic skin. A significant effect of UVA radiation or tyrosinase on the quantity or quality of such pigments could not be confirmed in this system. The oxidation experiments however, indicated that both UV radiation and tyrosinase have a direct impact of the formation of oxidation product in HQ and HGA samples.

The results obtained in this master thesis could provide a different perspective on the development of exogenous ochronosis and may encourage further investigations in the field.

Zusammenfassung

Die die Verwendung von Whitening-Wirkstoffen ist oft mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Das prominenteste Beispiel hierfür ist Hydrochinon, welches zu der Entstehung entstellender und irreversibler Pigmente in der Haut führt, die als exogene Ochronose bezeichnet werden. Der zugehörige Mechanismus wurde bis heute noch nicht aufgeklärt. Um jedoch auszuschließen, dass neue Whitening-Wirkstoffe keine derartigen Nebenwirkungen produzieren, muss der Mechanismus, der hinter der Entstehung exogener Ochronose steckt, besser verstanden sein.

Ziel dieser Arbeit war es neue Ansätze zur Untersuchung des gesuchten Mechanismus zu erarbeiten. Es sollte in einem *in vitro* System geprüft werden, ob Hydrochinon selbst in der Lage ist an Kollagen zu binden und so Ochronose zu induzieren. Zum einen wurde ein zellbasiertes System aus Fibroblasten gewählt, dass zur vermehrten Kollagensynthese angeregt wurde. Zum anderen wurden Kollagen-Gele angesetzt, die das Milieu des dermalen Bindegewebes nachstellen sollten. In beiden System sollten ochronotische Pigmente durch Inkubation mit Hydrochinon bzw. HGA als Kontrolle induziert werden. Da Oxidation anscheinend ein essentieller Prozess für die Bindung an Kollagen ist, wurde zudem der Einfluss bestimmter Faktoren auf die Oxidation von Hydrochinon bzw. HGA und auf die Entstehung ochronotischer Pigmente im Gel untersucht. Tyrosinase und UV-Strahlung stehen diesbezüglich stark in Verdacht Ochronose zu begünstigen.

Das zellbasierte System konnte nicht die erwarteten Ergebnisse erbringen. Im zellfreien *in vitro* System hingegen, konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit Hydrochinon Ochronose-ähnliche Pigmente induziert werden, die den histologischen Befunden exogener Ochronose ähneln. Einen signifikanten Effekt von UV-Strahlung oder Tyrosinase auf die Quantität oder Qualität der entstandenen Pigmente konnte dabei nicht festgestellt werden. Jedoch konnte in den Oxidationsversuchen bewiesen werden, dass sowohl UV-Strahlung, als auch Tyrosinase einen direkten Einfluss auf die Oxidation von Hydrochinon und HGA haben.

Die erzielten Ergebnisse könnte eine neue Sichtweise auf die Entstehung exogener Ochronose und einen Anreiz für weitere Forschung in diesem Bereich bieten.

1. Einleitung

Die Haut ist nicht nur eine Barriere, die empfindliche innere Strukturen des Körpers vor chemischen, physikalischen und bakteriellen Umwelteinflüssen schützt, sie ist seit der Neuzeit vor allem ein gesellschaftliches Statussymbol geworden.

Während eine sonnengebräunte Haut für den Europäer und Anglo-Amerikaner ein Zeichen für Wohlstand und Reisen ist, ist eine ebenmäßige weiße Haut in Ländern Asiens und Afrikas das Maß aller Dinge (Blay 2011; Mendoza 2015; Rusmadi, Ismail und Praveena 2015).

Die biologische Bedeutung der Pigmentierung der Haut beruht im einfachsten Sinne auf der Anpassung an erhöhte Sonnenexposition zum Schutz vor UV-Strahlung. Jedoch spielt gerade in der Kosmetik der soziologische Aspekt der Hautfarbe eine viel wichtigere Rolle. Helle Haut als Schönheitsmerkmal stammt aus dem elisabethanischen Zeitalter (Tate 2015) und hat sich mit der Kolonialisierung bis Afrika und Asien ausgebreitet. Bis heute gilt in vielen Ländern vor allem weiße Haut als Symbol für Erfolg und Überlegenheit (Hall 2008). So zeigt sich, dass Männer und Frauen in Asien und Afrika bis heute eine positivere Selbstwahrnehmung und zudem bessere Chance auf dem Arbeits- und Heiratsmarkt mit dem Gebrauch von hautaufhellenden Produkten verbinden (Peltzer und Pengpid 2017; Blay 2011).

Die Popularität des Skin-Whitenings wird vor allem durch den wachsenden Markt an hautaufhellenden Produkten deutlich. Dabei sind Frauen die Hauptzielgruppe (Mendoza 2015). In China, Malaysia, den Philippinen und Korea wurden 2004 rund 40 % Frauen ermittelt, die regelmäßig Skin-Whitener benutzen. In Nigeria waren es 77%, in Süd- Afrika 35 % und in Togo 59 % der Frauen, die täglich hautaufhellende Produkte verwendeten (WHO 2011). Im Gegensatz zum afrikanischen und asiatischen Markt stützt sich der Verkauf von Skin-Whitening Produkten in der Kaukasischen Gesellschaft hauptsächlich auf die Behandlung von Hautläsionen oder altersbedingten Pigmentflecken (Mendoza 2015).

Das größte Problem der Skin-Whitening Maschinerie sind die zahlreichen Nebenwirkungen, die mit der Verwendung von Whitening Produkten einhergehen. Der Großteil der hautaufhellenden, wirksamen Produkte, enthält toxische Inhaltsstoffe, die eine hemmende Wirkung auf die Melanin-Produktion haben (WHO 2011; Adebajo 2002). Einer, der am häufigsten verwendeten Wirkstoffe ist Hydrochinon, welcher als Goldstandard in der Behandlung von

Hyperpigmentierung gilt (Adebajo 2002; Tse 2010). Die gravierendste Nebenwirkung, die mit der langfristigen Behandlung mit Hydrochinon in Verbindung gebracht wird, ist die exogene Ochronose. Diese äußert sich durch das Auftreten von dunkelblauen Pigmenten im Bindegewebe der behandelten Stellen (Sharma und Rao 2014). Bis heute ist der Mechanismus, der hinter dem Auftreten ochronotischer Pigmente nach der langfristigen Verwendung von hydrochinonhaltigen Cremes auf der Haut steckt, kaum erforscht. Es gibt jedoch zwischen der klinischen Ausprägung der exogenen Ochronose und dem Erscheinungsbild der endogenen Ochronose im Rahmen der Alkaptonurie deutliche Parallelen, die in dieser Arbeit systematisch untersucht werden.

Kenntnisse über den genannten Mechanismus könnten die Erforschung neuer Whitening-Wirkstoffe, die sich in ihren chemischen Eigenschaften dem Hydrochinon ähneln voranbringen, da eine Einschätzung des Potentials exogene Ochronose zu induzieren, verbessert wird.

1.1. Die menschliche Haut- Aufbau und Kollagensynthese

Die Haut hat, je nach Individuum, eine Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m² und ein Gewicht von 3,5 bis 10 kg und stellt somit das größte menschliche Organ dar. Dem Organismus dient sie zur Regulierung seines Temperatur- und Flüssigkeitshaushaltes und zum Schutz vor äußeren Einflüssen wie Hitze, Kälte, mechanischen Reizen, Chemikalien, Infektionen und Sonnenstrahlung. Allgemein kann die Haut in drei große Schichten gegliedert werden: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut) (siehe Abbildung 1.1).

Die Epidermis ist ein vielschichtiges Plattenepithel, dessen Dicke vor allem von der Lokalisation, dem Alter und dem Geschlecht abhängig ist. Sie besteht zu 90 % aus Keratinozyten und unterliegt als Proliferationsgewebe ständiger Erneuerung. Im Ursprung der Epidermis, der Basalschicht (Stratum basale) differenzieren Stammzellen zu Keratinozyten aus, indem eine Tochterzelle in die suprabasale Schicht entlassen wird und die andere Tochterzelle als Stammzelle in der Basalschicht verbleibt (Barrandon und Green 1987; Lavker und Sun 1982). Im Laufe der Differenzierung durchwandern die Keratinozyten die vielen Schichten der Epidermis, bis sie nach der terminalen Differenzierung in der äußersten Hornschicht (Stratum corneum) als flache, kernlose Hornzellen abgeschilfert werden (Moll 2010).

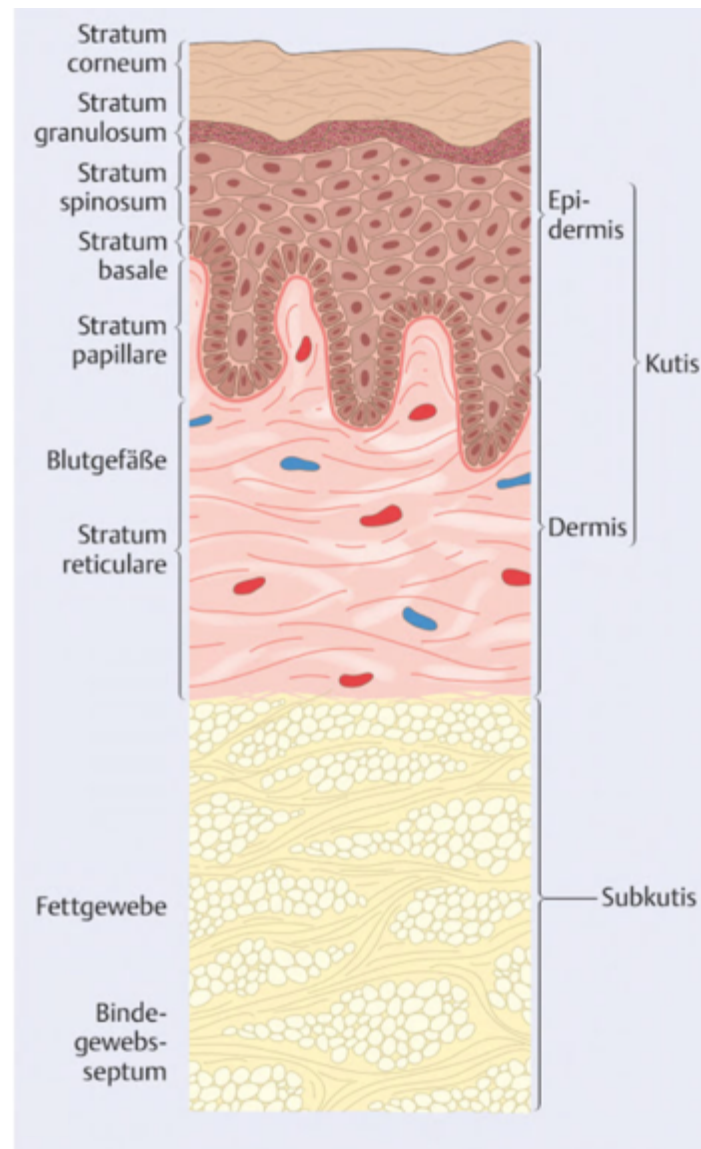


Abbildung 1.1. Schematischer Aufbau der drei Hauptschichten der Haut aufgeteilt in Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis stellt ein Plattenepithel aus vielen verschiedenen Schichten dar. Die Dermis besteht zum Großteil aus Bindegewebe (Kollagen) und lässt sich wiederum in die Papillarschicht (Stratum papillare) und die Retikularschicht (Stratum Reticulare) unterteilen. In der Subkutis befindet sich das Unterhautfettgewebe (Quelle: Moll 2010).

Neben den Keratinozyten befinden sich andere Zelltypen in der Epidermis. Darunter befinden sich die Langerhans-Zellen, die für die Immunreaktion verantwortlich sind und die Merkelzellen, die als Mechanorezeptoren Druck im umliegenden Gewebe detektieren. Ein weiterer wichtiger Zelltyp stellen die Melanozyten dar, die in der Basalschicht lokalisiert sind. Charakteristisch sind für sie ihre pigmentierten Organellen, die Melanosomen, die über die Vorstufe Tyrosin das Hautpigment Melanin synthetisieren und speichern. Durch die vesikelartigen Melanosomen wird das synthetisierte Melanin an benachbarte Keratinozyten

abgegeben, welches in der charakteristischen Pigmentierung der Haut resultiert und zudem den hauteigenen UV-Schutz unterstützt (Borovansky und Riley 2011).

Die Epidermis ist im Bereich der dermoepidermalen Junctionzone durch eine Verzahnung der epidermalen Reteleisten und der dermalen Papillen im Stratum papillare mit der Dermis verbunden (Sterry 2011). Im Vergleich zu tieferen Schichten der Dermis ist die Stratum papillare sehr zellreich. Vorzufinden sind dort verschiedene Immunzellen wie Mastzellen und Lymphozyten, Gewebemakrophagen, Langerhans- Zellen und vereinzelt Melanozyten (Moll 2010). Der Hauptzelltyp sind die Fibroblasten, die sich durch alle Schichten der Dermis ziehen und für die Synthese von Kollagen und Elastinfasern zuständig sind, der Grundsubstanz des dermalen Bindegewebes.

Die Synthese von Kollagen, in diesem Fall Kollagen Typ I, beginnt im Endoplasmatischen Reticulum (ER) innerhalb der Zelle (siehe Abbildung 1.2.) Während der Translation entstehen an den Ribosomen des rauhen ER zwei Arten von Kollagen-Polypeptidketten (alpha-1 und alpha-2). Die beiden Peptidketten, auch Prokollagen genannt, besitzen an den C- und N-terminalen Enden Propeptide, die für die spätere Zusammenlagerung der Fasern von Bedeutung sind.

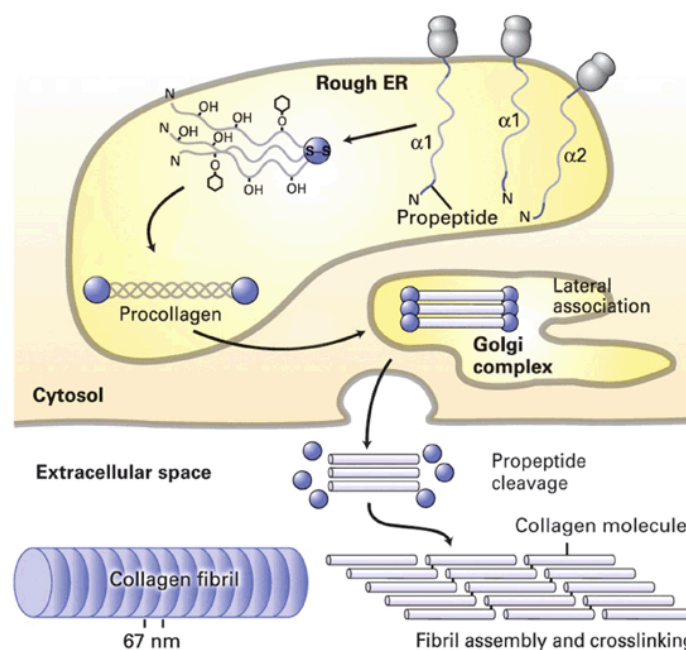


Abbildung 1.2. Kollagensynthese

Kollagen- Polypeptidketten (alpha-1 und alpagh-2) mit Erkennungssequenzen (Propeptide) am N-terminalen und C- terminalen Ende gelangen von den Ribosomen des ER in das Lumen. Dort werden sie hydroxyliert und lagern sich anschließend unter Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer

Tripelhelix (Prokollagen) zusammen. Das Prokollagen gelangt in den Golgi-Apparat und wird durch Exozytose aus der Zelle befördert. Extrazellulär werden die Propeptide des C-terminalen Endes gekappt, wodurch Tropokollagen entsteht. Mehrere Tropokollagen-Moleküle lagern sich zu Mikrofibrillen zusammen, die sich wiederum zu einer Kollagenfaser zusammenlagern (Quelle: Lodish *et al.*, 2000).

Im Lumen des ER werden die einzelnen Prolin- und Lysin-Resten der Polypeptidketten hydroxyliert. Das entstandene Hydroxyprolin bildet im späteren Verlauf Wasserstoffbrücken zwischen zwei Kollagen-Polypeptidketten aus und festigt somit die helikale Struktur des späteren Kollagenmoleküls. Hydroxylysin hingegen ist maßgeblich an der kovalenten Quervernetzung zwischen Kollagenmolekülen beteiligt. Vitamin C ist in diesem Schritt ein besonders wichtiger Co-Faktor für die beteiligten Enzyme Prolyl- und Lysylhydroxylase, weswegen Ascorbinsäure-Mangelkrankungen wie Skorbut immer mit der fehlerhaften Kollagenbiosynthese einhergehen (Pinnell 1982).

Im Anschluss folgt die Tripelhelixbildung durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den C-terminalen Propeptiden zweier alpha-1 und einer alpha-2 Polypeptidkette. Das entstandene Helixmolekül wird Prokollagen genannt. Das Prokollagen wird in den Golgiapparat überführt, wo es in Vesikeln verpackt und durch Exozytose aus der Zelle transportiert wird. Außerhalb der Zelle werden die Propeptide durch Peptidasen gekappt, wodurch wasserunlösliches Tropokollagen entsteht. Durch die Zusammenlagerung verschiedener Tropokollagene entstehen Mikrofibrillen. Mehrere dieser Mikrofibrillen formen Kollagenfasern.

1.2. Endogene Ochronose in der Alkaptonurie

Alkaptonurie ist eine seltene, aber dennoch ikonische Krankheit, die in Archibald Garrod's Croonian Lecture 1908 als demonstratives Beispiel für die Theorie angeborener Stoffwechselstörungen verwendet wurde und als eine der ersten pathologischen Beweise für die Prinzipien der rezessiven Mendel'schen Vererbung gilt (Mistry, Bukhari und Taylor 2013).

Die Krankheit wird durch ein Defizit des Enzyms Homogentisatdioxygenase (HGD) charakterisiert. Das Enzym HGD sorgt für den Abbau der Homogentisinsäure (HGA), einem Zwischenprodukt des Tyrosin- und Phenylalanin-Stoffwechsels (Zannoni, Seegmiller und La-Du 1962). Durch den Verlust der HGD-Aktivität kommt es zu einer Anreicherung von HGA im Blut und Urin (Bory, Bouliou und

Chantin 1990). Bis heute sind bereits 130 verschiedene Mutationen des Gens bekannt (Gallagher *et al.*, 2016).

Die Verbreitung der Krankheit wird in den meisten ethnischen Gruppen auf 1 zu 100.000 bis 250.000 geschätzt (Gallagher *et al.*, 2016). Es gibt jedoch einige Populationen in der Dominikanischen Republik oder in Teilen der Slowakei, in denen die Häufigkeit der Fälle mit mehr als 1 Patient auf 19.000 Menschen deutlich größer ist (Zatkova 2011). Während das erhöhte Aufkommen von Alkaptonurie in der Dominikanischen Republik auf einen kleinen Genpool zurückgeführt werden kann (Gründereffekt), ist die erhöhte Inzidenzrate in der Slowakei mit 12 unterschiedlichen bekannten Mutationen überraschend (Gallagher, Ranganath und Zatkova 2013). Auch in Deutschland konnte in Gebieten des Schwarzwaldes eine überdurchschnittliche Anzahl an Familien mit Alkaptonurie vermeldet werden (Anthony, Arnold und Kern 2018). Es wird jedoch gerade in Entwicklungsländern von einer hohen Anzahl nicht diagnostizierter Fälle von Alkaptonurie ausgegangen (Gallagher *et al.*, 2016).

Die Akkumulation von HGA hat mit der Zeit signifikante Auswirkungen auf den Organismus, sodass Alkaptonurie in drei klinische Hauptmerkmale unterteilt werden kann: Homogentisinsäure Azidurie, Ochronose und Osteoarthropathie (Mistry, Bukhari und Taylor 2013). Die Merkmale treten je nach Lebensabschnitt auf. Die vermehrte Ausscheidung der HGA in Form von schwarzem Urin wird dabei am frühesten deutlich und kann bereits vor dem ersten Lebensjahr beobachtet werden (Al-Sarayreh *et al.*, 2014, Barconi *et al.*, 2015). Die Verfärbung des Urins beruht auf der Oxidation der HGA und dessen Umwandlung in Benzochinon Essigsäure (BQA), welches Polymere formt, die als melaninähnliche Pigmente sichtbar werden (Martin und Batkoff 1987). HGA- Polymere sind in der Lage sich im Bindegewebe zu manifestieren und werden im Schnitt ab dem dritten Lebensjahrzehnt als Ochronose sichtbar (Craide *et al.*, 2014). Der Begriff Ochronose beruht auf dem Erscheinungsbild der ockerfarbenen Pigmente im Bindegewebe histologischer Schnitte (siehe Abbildung 1.3.).

Besonders häufig entwickelt sich eine Verfärbung des Knorpelgewebes der Ohrmuschel oder der Sklera des Auges (Craide *et al.*, 2014) (siehe Abbildung 1.4.). Vereinzelt wurde von Fällen berichtet, bei denen Ochronose in Arealen des Gesichts auftaucht (Anthony, Arnold und Kern 2018; Arora, Sodhi und Kapoor 2017).

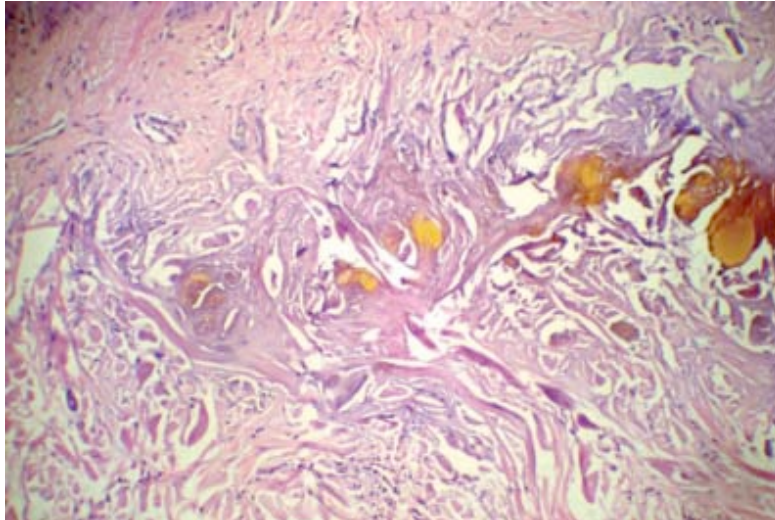


Abbildung 1.3. Endogene Ochronose (Histologisch)

Histologischer Schnitt ochronotischer Pigmente der Haut eines Alkaptonurie Patienten. Die ockerfarbenen Pigmente verleihen der Ochronose ihren Namen (Quelle: Craide *et al.*, 2014).



Abbildung 1.4. Endogene Ochronose im Ohr, Auge und Gesicht

Ochronose einer ca. 70 Jahre alten Alkaptonurie Patientin dem Schwarzwald. **Links:** Bläulich graue Verfärbung im Gesicht und der Sklera. **Rechts:** Ablagerung ochronotischer Pigmente im Knorpelgewebe der Ohrmuschel (Quelle: Anthony, Arnold und Kern 2018).

HGA ist zudem auch in Körperflüssigkeiten wie Schweiß präsent, was zu einer Verfärbung der Haut führen kann. Besonders betroffen sind die Achselhöhlen und das Jochbein, aber auch die Handinnenflächen und Fußsohlen (Craide *et al.*, 2014). (siehe Abbildung 1.5.). Daneben sind zudem ab dem 40. Lebensjahr das Skelettale System wie Gelenke des Knies, Schultern und der Hüfte, sowie das

Kardiovaskuläre System betroffen, welches die Verkalkung wichtiger Hauptadern zur Folge hat (Craide *et al.*, 2014; Mistry, Bukhari und Taylor 2013).



Abbildung 1.5. Endogene Ochronose in der Haut

Links: Einlagerung ochronotischer Pigmente im dermalen Bindegewebe der Handinnenflächen einer 60 Jahre alten Alkaptonurie Patientin (Quelle: Arora, Sodhi und Kapoor 2017).

Rechts: Ochronotische Papillen der Handinnenflächen einer Alkaptonurie Patientin aus einer Roma Kolonie (Quelle: Thomas *et al.*, 2011).

Die Einlagerung ochronotischer Pigmente in das Bindegewebe ist mit der Schädigung und Versteifung der extrazellulären Matrix verbunden, was zu signifikanten pathologischen Veränderungen des Gewebes führt (Gallagher *et al.*, 2016). Der Mechanismus, der hinter der Anlagerung von HGA an extrazelluläre Matrixkomponenten steckt, ist bis heute noch nicht bekannt. Einige Annahmen stützen sich darauf, dass BQA bzw. dessen Polymere kovalent an Kollagenfasern binden und über die Zeit die gezeigten Pigment-Einlagerungen produzieren (Braconi *et al.*, 2015; Gallagher *et al.*, 2016). Da die Ausprägung der endogenen Ochronose in den Individuen sehr unterschiedlich ist, gibt es einige *in vitro* Studien, die sich mit den Bedingungen unter denen HGA in der Lage ist an Kollagen zu binden auseinandersetzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von HGA an Kollagen ein reversibler Prozess ist, der stark vom pH des umgebenen Milieus abhängt. Die Umwandlung von Kollagen in seine oxidierte Form BQA begünstigt hingegen eine irreversible pH-unabhängige Bindung an Kollagen und ist vermutlich der grundlegende Mechanismus für die Verfärbung des Bindegewebes (Barconi *et al.*, 2015; Milch 1961) (siehe Abbildung 1.6). Faktoren, die *in vitro* die Umwandlung von HGA in seinen Chinon-Metaboliten begünstigen sind bereits untersucht worden. Darunter konnten zum Beispiel Eisen (FeSO_4),

Wasserstoffperoxid und NaOH (pH Drift) als Katalysatoren identifiziert werden (Martin und Batkoff 1987; Vercruyssen, Taylor and Knight 2017).

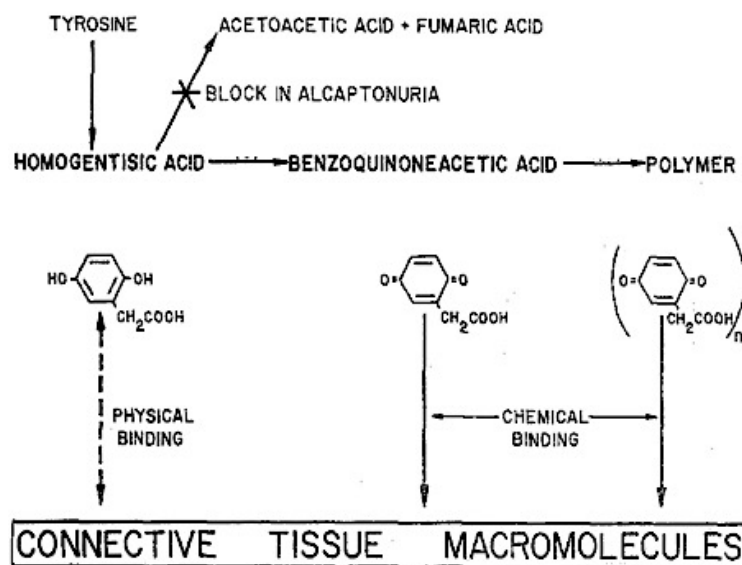


Abbildung 1.6. Bindung von HGA und BQA an extrazelluläre Matrix- Komponenten
 HGA als Zwischenprodukt des Tyrosin Abbaus wird in der Alkaptonurie durch den Defekt der HGD geblockt. HGA gelangt durch Körperflüssigkeiten in das Körpergewebe, wo sie akkumuliert und durch Oxidation in BQA überführt wird. BQA- Moleküle lagern sich zu Polymeren zusammen in denen sie, im Gegensatz zur HGA, irreversibel an Komponenten des Bindegewebes binden (Quelle: Roberts *et al.*, 2015).

Die Einlagerung ochronotischer Pigmente *in vivo* dauert mehrere Jahrzehnte. Tinti *et al.*, 2011 konnten in einem *in vitro* Modell mit Sarkom-Zelllinien jedoch zeigen, dass die Einlagerung von ochronotischen Pigmenten in einer Monolayer-Kultur bereits in wenigen Tagen möglich ist. Der Grund für die beschleunigte Entstehung von Ochronose unter *in vitro* Bedingungen könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass die extrazelluläre Matrix unter *in vitro* Bedingungen weniger strukturiert vorliegt, als in einem *in vivo* System, wo die extrazellulären Matrixkomponenten in einer hoch organisierten Struktur angeordnet sind. Die Qualität des Bindegewebes, die richtige Anordnung von Faserproteinen, Proteoglycanen und Glykosaminoglykanen scheinen somit eine entscheidene Rolle im Schutz vor der Entstehung von Ochronose zu spielen (Gallagher *et al.*, 2016). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Oxidation von HGA zu oxidativen Stress führt, im Zuge dessen Radikale generiert werden, die das umliegende Gewebe schädigen können (Barconi *et al.*, 2015). Dabei konnte vor allem der degradierende Effekt dieser Reaktion auf Hyaluronsäure beobachtet werden (Martin und Batkoff 1987). Der Angriff auf die Hyaluronsäure als Rückgrat des

Kollagens führt zur Schädigung von Kollagenfasern, was wiederum zu einer erleichterten Anlagerung von HGA führen könnte und somit eine Teufelsspirale begünstigen würde (Gallagher *et al.*, 2016).

Eine andere These besagt, dass Tyrosinase Einfluss auf die Polymerisierung von HGA haben kann. Das Enzym Tyrosinase als Polyphenol Oxidase ist im gesamten Organismus vorhanden und ist dafür bekannt zur Färbung von Gewebe in vielen Organismen, wie zum Beispiel der Produktion von Melanin, beizutragen. Das Enzym zeigt in Säugetierzellen eine geringe Spezifität, was die Vermutung nahelegt, dass HGA als mögliches Substrat dient (Taylor, Kammath und Bleakley 2016).

1.3. Das Hydrochinon-Paradoxon: Problematik der exogenen Ochronose

Hydrochinon ist eine phenolische Substanz, die auch als 1,4 Hydroxybenzol bekannt ist. Sie ist in der Lage den Melaninstoffwechsel aktiv zu behindern, was bisher mit der Inhibition enzymatischer Oxidation von Tyrosin- und Phenol-Oxidase in Verbindung gebracht wurde. Jedoch konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Hydrochinon zwar inhibierend auf Pilz-Tyrosinase wirkt, aber kaum inhibierende Eigenschaften gegenüber humaner Tyrosinase besitzt. Ein anderer Mechanismus für die Inhibition der Melaninsynthese durch Hydrochinon könnte allerdings auf seine cytotoxischen Eigenschaften in Bezug auf Melanozyten zurückzuführen sein (Mann *et al.*, 2018).

Hydrochinon wird aufgrund der genannten Eigenschaften als Wirkstoff in der Behandlung von Melasma, Hypermelanose, Altersflecken und pigmentierten Arealen von Vitiligo-Patienten verwendet (Ribas *et al.*, 2010; Draelos 2006). Die Anwendung von Hydrochinon erfolgt topisch als Creme und wird üblicherweise in Konzentrationen zwischen 2 und 4 % Hydrochinon angewendet (Raab, *et al.*, 2014). Die höchste freiverkäufliche Hydrochinon-Konzentration in den USA liegt bei 2%, während Formulierungen bei ärztlicher Behandlung üblicherweise mit 4% verschrieben werden. Grundsätzlich gelten Cremes mit Hydrochinon, unabhängig von der Konzentration, als instabil, da der Wirkstoff sehr schnell oxidiert und somit unwirksam wird, was durch eine braune Verfärbung des Präparats sichtbar wird (Draelos 2006).

Die langfristige Verwendung von Hydrochinon kann zu der Entstehung exogener Ochronose führen, die bei histologischer Betrachtung der endogenen Ochronose der Alkaptonurie ähnlich ist. Wie bei der endogenen Ochronose äußert sich die exogene Ochronose durch ockerfarbene Pigmente im histologischen Schnitt des Bindegewebes der Dermis und wird makroskopisch ebenfalls als bläulich- braune Verfärbung der Haut sichtbar (siehe Abbildung 1.7) (Simmons *et al.*, 2015).

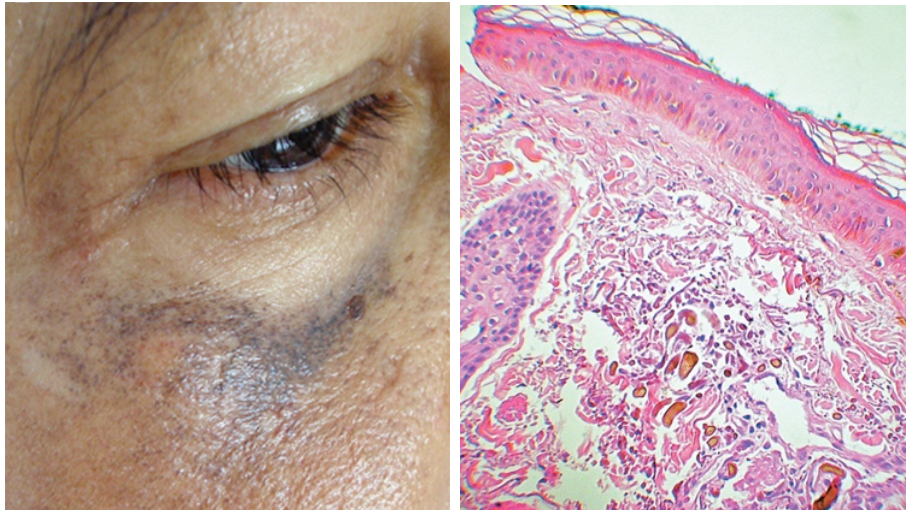


Abbildung 1.7. Exogene Ochronose

Links: Darstellung exogener Ochronose als hyperpigmentierte Papillen am Wangenbereich (Quelle: Simmons *et al.*, 2015).

Rechts: Histologischer Schnitt einer ochronotischen Läsion. Deutlich erkennbar sind die Bananenförmigen ochronotischen Pigmente in der Papillar-Schicht der Dermis (Quelle: Charlín *et al.*, 2008).

Pigmente der exogenen Ochronose manifestieren sich besonders in sonnenexponierten Arealen (O'Donoghue, Lynfield und Derbes 1983). Dabei sind oftmals auf symmetrische Weise die ossären Gesichtsbereiche (Jordaan und Niekerk 1991) und die zygomatiche Region betroffen (O'Donoghue, Lynfield und Derbes 1983). Zu sehen sind eine braungraue oder schwarzbraune Macula, die häufig in Verbindung mit Kaviar ähnlichen, hyperchromatischen Papillen in Erscheinung treten (Findlay, Morrison und Simson 1975).

Das Auftreten von exogener Ochronose in den vereinigten Staaten, wo Hydrochinon als Goldstandard zur Behandlung von Hyperpigmentierung gilt, scheint die Zahl der ermittelten Fälle exogener Ochronose relativ gering. Es wurden rund 37 Fälle zwischen 1983 und 2014 aufgezeichnet. Jedoch brachte eine Untersuchung des Department of Health and Human Services mithilfe von 2080 amerikanischen Dermatologen eine Gesamtzahl von 512 Verdachtsfällen zu Tage,

von denen 130 Fälle pathologisch konfirmiert werden konnten (Simmons *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu den USA, in denen das Auftreten exogener Ochronose in der Dermatologie eher ein marginales Problem zu sein scheint, existieren in Afrika deutlich mehr Fälle dieser entstellenden Hautläsion (Bhattar *et al.*, 2015; Adebajo 2002). Diese Diskrepanz hängt am wahrscheinlichsten mit der Tatsache zusammen, dass gerade in den Ländern Afrikas verschreibungspflichtige Konzentrationen ohne Aufsicht eines Dermatologen zu bekommen sind und angewendet werden (Simmons *et al.*, 2015). Zudem wurde bereits von Fällen berichtet, die schon bei niedrigen, nicht verschreibungspflichtigen Konzentrationen Hydrochinon (2 %) exogene Ochronose entwickelten (Mishra *et al.*, 2013; Ribas *et al.*, 2010). All dies führt dazu, dass die globale Inzidenz von exogener Ochronose nur schlecht abschätzbar ist und aufgrund des freien Verkaufs von Hydrochinon tendenziell zunimmt (Sharma und Rao 2014; Simmons *et al.*, 2015).

Der genaue Wirkmechanismus der exogenen Ochronose ist bis heute nicht bekannt. Cullison, Abele und O'Quinn veröffentlichten 1983 die These, dass Hydrochinon im Zuge der Oxidation zu Chinin umgewandelt wird und hydroxylierte Indole formt, die der Vorstufe von Melanin ähneln (Cullison, Abele und O'Quinn 1983).

Engasser implizierte 1984 auf Basis von *in vitro* Daten mit schwarzer Goldfisch-Haut, dass Hydrochinon zwar in niedrigeren Konzentrationen (0,9 mM) die Melaninproduktion hemmt, bei höheren Konzentrationen (4,5 mM) stimulierend auf die Melaninsynthese wirken kann, sodass es lokal zu einer Hyperpigmentierung kommt (Engasser 1984).

Die jedoch populärste These ist die von Penneys aus dem Jahre 1985, die aus einem Letter to the Editor hervorgeht. Es wird beschrieben, dass Hydrochinon aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu HGA in der Lage ist HGD zu blockieren, wodurch es, ähnlich zur Alkaptonurie, zu einer lokalen Akkumulation der HGA und somit zu der Entstehung ochronotischer Pigmente im dermalen Bindegewebe kommt (Penneys 1985; Bhattar *et al.*, 2015).

Ein besonderer Fall hat gezeigt, dass Melanozyten bei der Entstehung von ochronotischen Pigmenten eine vermeintlich entscheidene Rolle spielen. Eine Vitiligo-Patientin, die pigmentierte und nicht-pigmentierte Areale in der Haut mit Hydrochinon behandelte, zeigte nach bereits einem Jahr die typische Ausprägung einer exogenen Ochronose. Dabei manifestierten sich die ochronotischen Pigmente

ausschließlich in Hautarealen, die eine normale Melanozyten- Verteilung aufwies (siehe Abbildung 1.8.) Nicht pigmentierte und Melanozyten freie Hautareale enthielten nur sehr geringe Mengen ochronotischer Fasern (Hull und Procter 1990).

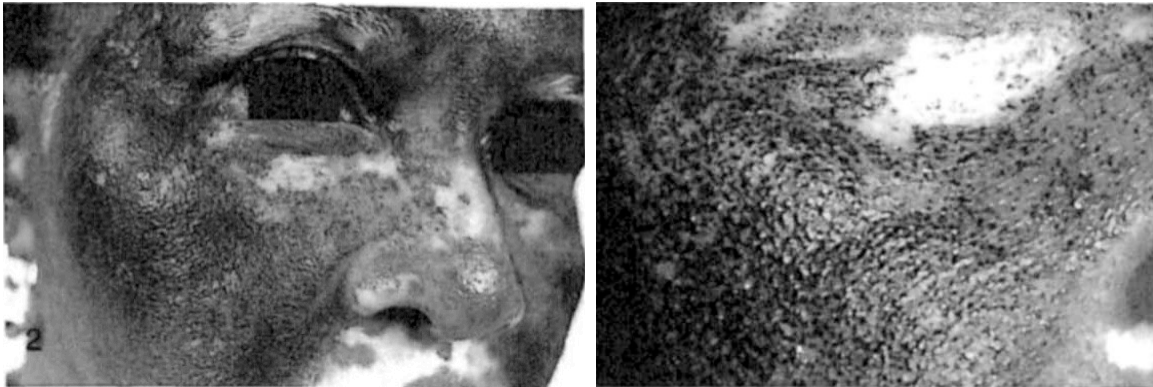


Abbildung 1.8. Exogene Ochronose in einer Vitiligo-Patientin

Links: Verteilung von Vitiligo und exogener Ochronose im Gesicht einer Patientin, die über zwei Jahre ihr Gesicht mit Hydrochinon behandelt hat.

Rechts: Nahaufnahme des Gesichts. Normal pigmentierte Areale weisen Kaviar- ähnliche Papillen auf, während die Vitiligo- Areale, die keine Melanozyten enthalten unauffällig sind (Quelle: Hull und Procter 1990).

1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Mit dem weltweiten Gebrauch von Hydrochinon als Skin-Whitening-Produkt ist und bleibt die exogene Ochronose eine der häufigsten Nebenwirkungen. Bis heute sind sich die Dermatologen einig, dass ein wirkungsvolles Produkt zur Behandlung von Pigmentflecken oder Melasma immer mit derartig entstellenden Nebenwirkungen verbunden ist. Durch die Tatsache, dass die genaue Wirkweise von Hydrochinon bei der Entstehung von Ochronose noch nicht genau verstanden ist, macht es schwierig neue und wirkungsvolle Produkte auf den Markt zu bringen und diese auf ähnliche Nebenwirkungen zu testen. Ziel dieser Arbeit soll es sein, neue Ansätze für die experimentelle Untersuchung des Mechanismus der Entstehung von Hydrochinon induzierter exogener Ochronose zu erarbeiten (siehe Abbildung 1.9).

Dabei soll zunächst die Hypothese von Penneys 1985 experimentell überprüft werden, da die Inhibition von HGD durch Hydrochinon bis jetzt noch nicht bewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.).

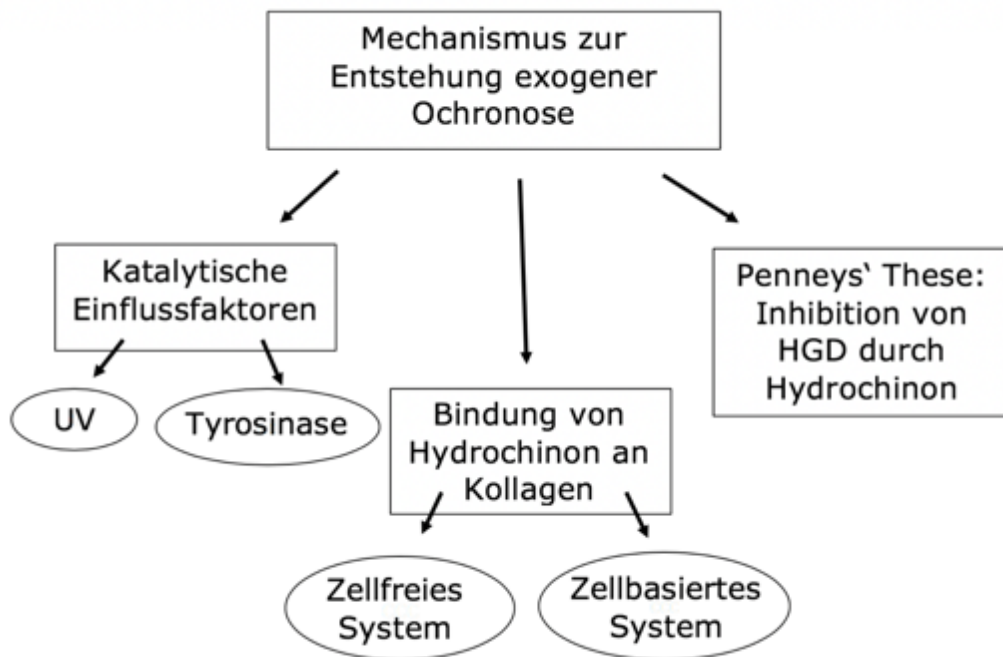


Abbildung 1.9. Übersicht der geplanten Experimente zur Untersuchung des Mechanismus zur Entstehung exogener Ochronose durch Hydrochinon

Außerdem sollen systematisch Schnittpunkte des Mechanismus der Entstehung endogener und exogener Ochronose untersucht werden, da sich beide Ausprägungen histologisch sehr ähnlich sind. Es steht vor allem die Tatsache im Vordergrund, dass HGA in seiner oxidierten Form an Kollagenfasern bindet und somit für die Entstehung ockerfarbener Pigmente in der Dermis verantwortlich sein kann. Ein *in vitro* Test soll prüfen, ob Hydrochinon aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zur HGA selbst in der Lage ist an Kollagen zu binden. Es werden dafür ein zellbasiertes (siehe Abschnitt 4.3.1.) und ein zellfreies System (siehe Abschnitt 4.3.2.) erarbeitet, um den Einfluss zellulärer Aktivität zu ermitteln.

Die Entstehung von Ochronose dauert *in vivo* mehrere Jahrzehnte. Zur experimentellen Beobachtung des Mechanismus der Entstehung von Ochronose soll die Induktion ochronotischer Pigmente *in vitro* deutlich schneller ablaufen. Deshalb sollen jene Faktoren untersucht werden, die bekannt dafür sind, oder unter Verdacht stehen die Oxidation und damit die Bindung von HGA an Kollagen zu katalysieren. Die Oxidation von Hydrochinon soll unter dem Einfluss derselben Faktoren untersucht und mit dem Verhalten von HGA verglichen werden. Für diese Untersuchungen wird es nötig sein, einen photometrischen Assay zu etablieren, der die Entstehung des Oxidationsproduktes beider Wirkstoffe erfasst und zu

quantifiziert. Parallel dazu sollen die untersuchten Faktoren dem zellbasierten und zellfreien Assay zugeführt und deren Einfluss auf die Entstehung ochronotischer Pigmente beobachtet werden.

2. Materialien

2.1. Laborgeräte

2.1.1. Großgeräte

Tabelle 2.1. Großgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller (Bezugsquelle)
Autoklav	D-65	Systec (Linden)
Brutschrank	HeraCell 240 Heracell 150i	Heraeus (Hanau) Thermofischer Scientific (USA)
Gefrierschrank		Liebherr ProfiLine (Schweiz)
Kühlschrank		Liebherr ProfiLine (Schweiz)
Sterilwerkbank	HeraSafe	Kendro Laboratory (Hamburg)
Stickstofftank	LABS-40	Worthington Industries (USA)
Ultrazentrifuge	Sorvall RC5B	Thermofisher Scientific (USA)
UV- Quelle	Psorisan 900	Dr. Hönle (Gräfeling)
UV- Spektral Radiometer	ILT1700 Research Radiometer	International Light Technologies (USA)
Zentrifuge	Megaguge 1.0	Heraeus (Hanau)

2.1.2. Kleingeräte

Tabelle 2.2. Kleingeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller (Bezugsquelle)
Dispenser	D3000 Digital Dispenser	HP (USA)
Eismaschine		Ziegra Eismaschinen (Isernhagen)
Feinwaage	XP205 Delta Range	Metler Toledo (USA)
Ionisationsgebläse	Stat-Fan YIB01	Sartorius (Göttingen)
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
	Observer. Z1	Zeiss (Oberkochen)
	BZ-9000	Keyence (Japan)
	Evos XL	Thermofisher Scientific (USA)
Photometer	Infinite M1000 Pro	Tecan (Schweiz)

Pipetten	Reference Transferpipette 8 electronic	Eppendorf (Hamburg) Brand (Wertheim)
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Sauger	Vacusace Comfort	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Ultraschallbad	Sonorex Super	Bandelin (Berlin)
Vortexer	Mini Vortexer	VWR (USA)
Waage	3713 MP	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	TW2	Julabo (Seelbach)
NucleoCounter	NC-100	ChemoMetec (Dänemark)
Einfrierbox	CoolCell™ LX Freezing Container	Sigma Aldrich (Darmstadt)
Orbitalschüttler	Standard Analog Shaker	VWR (USA)

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3. Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller	Bezugsquelle
Deckgläser (25 x 75 x 1,0 mm)	ThermoFisher Scientific	USA
Falcon Röhrchen	Greiner	Österreich
Multi well Platten (12er, 24er, 96er)	Greiner	Österreich
Nunc Thermanox Plastic Coverslip Round (13 mm)	ThermoFisher Scientific	USA
Pipetten (5ml, 10 ml, 25ml, 50ml)	Greiner	Österreich
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Nucleo Casette™	ChemoMetec	Dänemark
Spritzen (10 ml)	B Braun	Melsungen

Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius	Göttingen
UV-Mikrotiterplatten	Corning	USA

2.3. Chemikalien

Tabelle 2.4. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Bezugsquelle
Aqua dest.	Invitrogen	USA
Ascorbinsäure 2-Phosphat- Sesquimagnesiumsalz Hydrat	Sigma- Aldrich	USA
Bovine Serum Albumin	Sigma- Aldrich	USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies	USA
DAPI	Sigma-Aldrich	USA
DMEM- Medium	Thermofisher Scientific	USA
DPX	Sigma- Aldrich	USA
EDTA/Trypsin (0,25% / 0,02%)	Merck Millipore	USA
Eisen (II)-Sulfat heptahydrat	Sigma- Aldrich	USA
Eisen (III)-Chlorid	Sigma- Aldrich	USA
FCS	Sigma- Aldrich	USA
Formalin-Lösung	Sigma- Aldrich	USA
GlutaMAX™ (100x)	Thermofisher Scientific	USA
Hank's-Lösung (10x)	Thermofisher Scientific	USA
Homogentisinsäure	Sigma- Aldrich	USA
Hydrochinon	Sigma- Aldrich	USA
Kaliumhexacyanidoferrat (III)	Sigma- Aldrich	USA
Methanol	Merck Millipore	USA
Natronlauge, 1N	Bernd Kraft GmbH	Duisburg
Nuclear Fast Red solution	Sigma- Aldrich	USA
PBS	Capricorn Scientific	Ebsdorfergrund

Penicillin/ Streptomycin	Thermofisher Scientific	USA
Rattenschwanzkollagen (3,5 mg/ml)	Merck Millipore	USA
Salzsäure (2 N)	Bernd Kraft GmbH	Duisburg

2.4. Gebrauchslösungen und Medien

Tabelle 2.5. Gebrauchslösungen und Medien

Medium/ Lösung	Ansatz
Blockierungslösung	1 g BSA in 100 ml PBS lösen, bei 4°C lagern
Einfriermedium	36,25 ml DMEM- Medium, 3,75 ml DMSO und 10 ml FCS mischen
Eisen (II)-Sulfat- Lösung- Stock (50 mM)	69,50 mg in 5 ml Medium lösen
Eisen (III)-Chlorid – Lösung (1%) Kaliumhexacyanidoferrat (III)-Lösung (1%)	1g Fe ₃ Cl in 100 ml ddH ₂ O lösen 0,5 g Kaliumhexacyanidoferrat (III) in 50 ml ddH ₂ O lösen
Kultivierungsmedium	50 ml FCS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin, 5 ml GlutaMAX™ 100x in 500 ml DMEM- Medium lösen, bei 4°C lagern
PBSF (10 %)	10 ml Formalin-Lösung in 100 ml PBS lösen, pH auf 7,0 einstellen, bei 4 °C lagern
Schmorl-Reagenz	75 ml Eisen (III)- Chlorid - Lösung (1%) mit 10 ml Kaliumhexacyanidoferrat (III)- Lösung (1%) und 15 ml ddH ₂ O mischen
Stopp-Lösung	500 ml PBS mit 50 ml FCS mischen
Supplementiertes Kultivierungsmedium (1 mM AA2P)	73,39 mg AA2P in 250 ml Medium lösen und sterilfiltriere

2.5. Antikörper

Tabelle 2.6. Antikörper

Antikörper	Klonalität	Verwendung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Anti-Collagen I antibody [COL-1]	monoklonal	ICC, IHC, ELISA, WB	Maus	1:5000	Abcam	ab90395
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	polyklonal	ICC, IHC, Flow-Cyt, ELISA	Ziege	1:1000	Abcam	ab150113

2.6. Primärzellen und Zelllinien

2.6.1. Primärzellen

Als Primärzellen wurden humane adulte Fibroblasten verschiedener Spender verwendet (siehe unten). Die Zellen wurden aus Hautproben bei der Beiersdorf AG isoliert und tiefgefroren. Alle Spender wurden bis Passage 10 kultiviert.

Tabelle 2.7. Primärzellen

Spenderbezeichnung	Zelltyp	Alter	Einfrierdatum
BDF 049	Fibroblasten	36 Jahre	24.04.2008
BDF 077	Fibroblasten	67 Jahre	29.03.2018
BDF 196	Fibroblasten	24 Jahre	02.02.2010
BDF 149	Melanozyten	35 Jahre	20.10.2014

2.6.2. Zelllinien

Bei den verwendeten Osteosarkom-Zelllinien handelt es sich um SaOs-2 und MG-63, welche von *Sigma-Aldrich* erstanden wurden. Saos-2 wurden aus dem primären Osteosarkom eines 11-jährigen, kaukasischen Mädchens 1973 isoliert. MG-63 stammt aus dem Osteosarkom eines kaukasischen, 14-jährigen Spenders. Beide Zelllinien wurden maximal 10 weitere Passagen kultiviert.

2.7. Software

Zur Berechnung der Daten wird Microsoft Excel verwendet, die Darstellung erfolgt jedoch mit der Open-Source-Software SciDAVis (<https://sourceforge.net/projects/scidavis/>). Die Bilder der Immunfluoreszenzfärbung und der Schmorl-Färbung werden mithilfe von Photoshop CS2 bearbeitet.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Alle Schritte bezüglich der Handhabung von zu kultivierenden Zellen wurden im Zellkulturlabor des Labors für Photobiologie durchgeführt. Die Arbeit wurde in einer Sterilwerkbank mit laminarer Strömung und unter Verwendung von sterilem Material ausgeführt.

3.1.1. Inkulturnahme und Kryokonservierung von Zellen

Zellen werden zur Lagerung im Cryotank bei -196°C aufbewahrt. Zur Inkulturnahme neuer Zellen wird die gewünschte Anzahl an Vials aus dem Cryotank entnommen und zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wird sofort in eine 175 cm^2 Zellkulturflasche mit 30 ml Kulturmedium überführt. Die Zellen werden anschließend im Brutschrank bei 37°C und 7 % CO_2 -Gehalt kultiviert. 24 h nach dem Auftauen werden Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 30 ml Kulturmedium versorgt.

Zum Einfrieren der Zellen bekommen diese am Vortag einen Medienwechsel. Am Tag des Einfrierens werden die Zellen nach Protokoll abgelöst (siehe Abschnitt 3.2.2), ausgezählt (siehe Abschnitt 3.2.3) und für 6 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird das Medium abgenommen und das Zellpellet mit Einfriermedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wird die Zellsuspension mit jeweils 1 Mio. Zellen pro Vial auf beschriftete Cryovials verteilt. Die Vials werden in einer vorgekühlten Einfrierbox (*CoolCell™ LX Freezing Container* von *Sigma Aldrich*) für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren, bevor sie in den Cryotank bei -196°C überführt werden.

3.1.2. Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle Zellen und Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C und 7 % CO_2 bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zum Erhalt der Zellen werden diese in 175 cm^2 Kulturflaschen mit 30 ml Kulturmedium ausgesät und erhalten alle drei Tage frisches Medium. Bei Erreichen von 80 bis 90 % Konfluenz werden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und für 4 bis 5 min (Fibroblasten/ Sarkom-Zelllinien) bzw. 2 min (Melanozyten) mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die

abgelösten Zellen werden in ein Falcon Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium (Fibroblasten/ Sarkom- Zelllinien) bzw. Stopp-Lösung (Melanozyten) überführt. Verbleibende Zellen werden nochmals mit 10 ml Kulturmedium aus der Flasche gespült. Die entstandene Zellsuspension wird anschließend für 6 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in einem definierten Volumen Kulturmedium resuspendiert. Das Volumen an Kulturmedium richtet sich dabei nach der Art der Aussaat.

Für die Aussaat in Kulturflaschen werden die Zellen in Verhältnis 1:2 bis 1:3 (Fibroblasten/ Melanozyten) bzw. 1:3 bis 1:4 (Sarkom-Zelllinien) gesplittet. Im Verhältnis 1:2 werden die Zellen dafür in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und 1 ml der Zellsuspension anschließend in eine Zellkulturflasche mit 25 ml Medium gegeben. Für die Aussaat in 24- Well- oder 96- Well-Platten werden die Zellen zuvor ausgezählt (siehe Abschnitt 3.1.3) und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt.

3.1.3. Zellzahlbestimmung mittels NucleoCounter

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit dem *NucleoCounter* der Firma *ChemoMetec*. Von der Zellsuspension werden dafür nach dem Ablösen 50 µl entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Suspension werden danach 50 µl Reagenz A100 (Lysispuffer) hinzugegeben und gevortext. Nach anschließender Zugabe von 50 µl Reagenz B (Stabilisierungspuffer) und erneutem durchmischen, wird die Zellsuspension mit der vorhergesehenen Küvette (*NucleoCassette™*) aufgenommen und in den Strahlengang des NucleoCounters eingesetzt.

Innerhalb der Kassette befindet sich Propidiumjodid (PJ) welches in der Lage ist die Zellkerne mit bereits poröser Membran anzufärben und somit für den *NucleoCounter* detektierbar zu machen (siehe Abbildung 3.1). Durch die vorherige Zugabe des Reagenz A100 wird die Zellmembran lysiert, sodass PJ in die Zellen eindringen und an den Zellkern binden kann. Durch Reagenz B wird die Zelllyse unterbrochen und die Zellstruktur bleibt intakt. Ohne Vorbehandlung ist es zudem möglich ausschließlich tote Zellen zu detektieren und im Zusammenhang der Gesamtzellzahl die Viabilität zu ermitteln (siehe Abbildung 3.1).

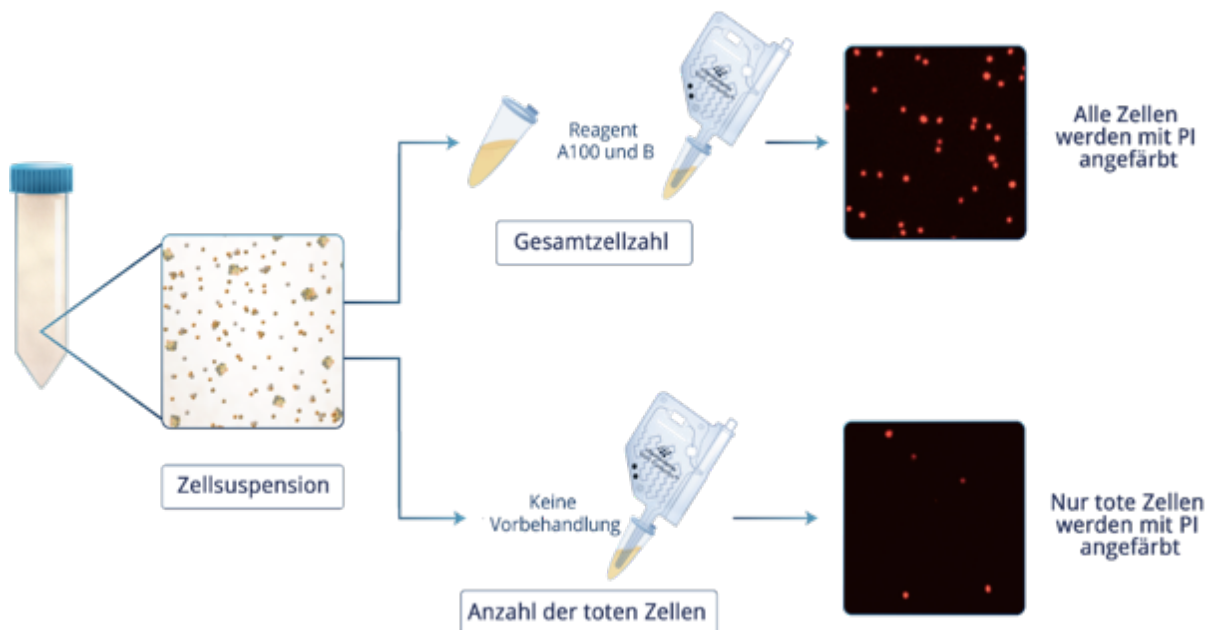


Abbildung 3.1. Prinzip der Zellzahlmessung im *NucleoCounter*

Durch Vorbehandlung mit Reagenz A100 und B können lebendige Zellen durch Anfärbung mit PI detektiert werden. Ohne Vorbehandlung ist die Anfärbung toter Zellen mit PI möglich. (Quelle: ChemoMetec 2018)

3.2. UV-Bestrahlung

Bestrahlung mit UV soll die Oxidation der Wirkstoffe HGA und Hydrochinon beschleunigen. Um sich nahe den physiologischen Bedingungen zu bewegen, wird mit UVA bestrahlt, da UVA als einzige UV-Strahlung in der Lage ist bis in den Wirkort, der Dermis, vorzudringen.

Für die Bestrahlung wird die zu bestrahlende Platte unter der UVA-Quelle platziert. Als Quelle wurde der Psorisan 900 der Dr. Hönle AG verwendet. Vor jeder Bestrahlung wird mit einem UV-Radiometer die Bestrahlungsintensität in W/cm^2 gemessen und anschließend mithilfe der gewünschten Bestrahlungsdosis von $5 \text{ J}/\text{cm}^2$ die Bestrahlungszeit in s errechnet.

Zunächst wird der Deckel von der Zellkulturplatte entfernt und durch eine zuvor desinfizierte spezielle UV-durchlässige Glasplatte ersetzt, um das Potential möglicher Kontaminationen zu reduzieren. Die Glasplatte wird vor der Messung der Bestrahlungsintensität auf die Messsonde gelegt, um die Absorption der Strahlung durch das Glas in die Bestrahlungszeit einzuberechnen.

3.3. Induktion der Kollagensynthese bei primären humanen Fibroblasten und Sarkom-Zelllinien

Das verwendete Protokoll beruht auf der Arbeit von Lutz *et al.*, 2012, in dem die Kollagensynthese humaner dermaler Fibroblasten (HDF) durch die Supplementierung mit Ascorbinsäure 2-Phosphat-Sesquimagnesiumsalz Hydrat (AA2P) induziert wurde. AA2P ist ein Vitamin C-Derivat, welches im Gegensatz zu anderen Derivaten unter Kultivierungsbedingungen über mehrere Tage stabil ist. Damit die maximale Wirkung des Derivats für die Kultivierungsbedingungen ausgenutzt wird, wird das supplementierte Medium zu jedem Mediumwechsel frisch angesetzt.

3.3.1. Inkubation mit AA2P

Für die Induktion der Kollagensynthese bei humanen dermalen Fibroblasten werden Zellen von drei verschiedenen Spendern verwendet. Die kultivierten Zellen werden nach Protokoll abgelöst (siehe Abschnitt 3.1.2) und in eine 24-Well Platte mit 2×10^4 Zellen pro Well überführt. Die Wells werden zuvor mit runden, sterilen Deckgläschen (13 mm Durchmesser) ausgelegt.

Zur Bestimmung einer geeigneten AA2P-Konzentration, werden drei verschiedene Konzentrationen (1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM) und eine nicht supplementierte Negativkontrolle in Doppelbestimmung angesetzt. Die Zellen werden anschließend für 3 bis 7 Tage kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt alle drei Tage.

3.3.2. Immunzytochemische Anfärbung von Kollagenfasern

Zur Untersuchung der Qualität und Quantität der synthetisierten Kollagenfasern, werden die Fibroblasten nach der Inkubation mit AA2P immunzytochemisch angefärbt.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen, wenn nicht anders beschrieben, mit 1 ml der entsprechenden Lösung und auf einem Orbitalschüttler.

Tabelle 3.1. Protokoll der immunzytochemischen Anfärbung von Kollagenfasern

Schritt	Dauer (Reagenz)
Waschen	1 x 5 min (PBS)
Fixierung	10 min bei -20 °C (Methanol)
Waschen	3 x 5 min (PBS)
Blocken unspezifischer Bindungsstellen	1 h (PBS + 1% BSA)
1. Antikörper (ab90395); 1:5000; 0,35 ml	1 h (PBS + 1% BSA)
Waschen	3 x 5 min (PBS)
2. Antikörper (ab150113); 1:1000; 0,35 ml	1 h im Dunkeln (PBS + 1 % BSA)
Waschen	3 x 5 min (PBS)
Anfärbung der Zellkerne	5 min im Dunkeln (DAPI, 300 nM)
Waschen	2 x 5 min (PBS)

Nach dem letzten Waschschrift werden die Deckgläschen aus den Wells genommen und auf einen Objektträger mit Einbettmedium (*Dako Fluorescence Mounting Medium*) gebracht. Die bestückten Objektträger werden zum Trocknen im Kühlschrank und unter Ausschluss von Licht gelagert. Anschließend wird die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.4. Induktion ochronotischer Einlagerungen in dermalen Fibroblasten und Sarkom- Zelllinien

3.4.1. Inkubation der Zellen mit Homogentisinsäure und Hydrochinon

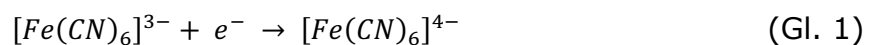
Durch die Inkubation der Zellen-Monolayerkultur mit HGA soll das Modell zur Untersuchung endogener Ochronose von Tinti *et al.*, 2011 repliziert werden. Dafür werden, die von Tiniti *et al.*, 2011 verwendeten Sarkom- Zelllinien (MG-63 und SaOS-2) mit HGA für mehrere Tage inkubiert bis sich ochronotische Pigmente gebildet haben. Um das Modell an die Fragestellung zur exogenen Ochronose anzupassen, soll das Modell zunächst auf dermale Fibroblasten übertragen und die Zugabe von HGA durch Hydrochinon ersetzt werden.

Für die Inkubation der Zellkultur mit den Wirkstoffen HGA und Hydrochinon werden Zellen zunächst in AA2P- supplementierten Medium in 24-Well-Platten mit 13 mm sterilen Coverslips bei einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Nach 4 bzw. 7 Tagen Inkubation in AA2P wird das Medium nach kurzem Waschen mit PBS ausgetauscht. Das neue Medium wird dafür mit der entsprechenden Konzentration an Wirkstoff supplementiert. Für jeden Wirkstoff werden Duplikate in verschiedenen Konzentrationen (0 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM) angesetzt. Pro Well werden jeweils 1 ml Medium mit Wirkstoff zugegeben.

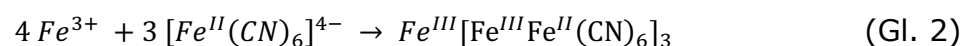
Pro Spender wird eine Platte angesetzt, von denen jede für mindestens 10 Tage im Brutschrank inkubiert wird. Das Medium wird alle 3 Tage erneuert. Alle verwendeten Medien mit Wirkstoffzugabe werden am Tag des Mediumwechsels frisch angesetzt, damit die Bedingungen, wie die Oxidation der Wirkstoffe, nach jedem Wechsel gleich sind.

3.4.2. Anfärbung ochronotischer Pigmente in der Monolayer- Kultur

Die Anfärbung ochronotischer Pigmente, die durch HGA induziert werden, konnten in der Vergangenheit erfolgreich mit der Schmorl-Färbung sichtbar gemacht werden (Tinti *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012). Die Schmorl- Färbung wird unter anderem zur Melanin-Anfärbung verwendet und besteht aus der Mischung einer 1 % Eisen (III)- Chlorid-Lösung und einer 1 % Kaliumhexacyanidoferrat (III)- Lösung. Melanin ist in der Lage die dreiwertigen Anionen des Kaliumhexacyanidoferrats zu vierwertigen Anionen zu reduzieren (siehe Gl. 1).



In dieser Form gehen diese bei Anwesenheit von dreiwertigen Eisenionen einen unlöslichen, blauen Komplex ein, der auch „Prussian Blue“ genannt wird (siehe Gl. 2).



Für die Anfärbung werden die zuvor kultivierten und mit Wirkstoff inkubierten Zellen (siehe 3.4.1) drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 30 min mit 10 % PBSF fixiert und nochmals drei Mal mit ddH₂O gewaschen.

Das Schmorl-Reagenz wird frisch angesetzt und für 5 min zu den Zellen gegeben. Danach wird nochmals drei Mal mit ddH₂O gewaschen, bis das restliche Reagenz vollständig entfernt worden ist. Die Zellkerne werden mit Nuclear Fast Red für 5 min (Sarkom-Zelllinien) bzw. 10 min (Fibroblasten) gegengefärbt. Es wird nochmals einmal mit ddH₂O gewaschen und für jeweils 5 min mit absolutem Ethanol (96% / 100%) in aufsteigender Reihe dehydriert. Die Coverslips werden der Well-Platte entnommen und mit DPX auf Objektträger übertragen. Die Auswertung wird unter dem Lichtmikroskop vorgenommen.

3.5. Induktion ochronotischer Pigmente in Kollagenmatrizen

3.5.1. Erstellen einer 3D- Kollagenmatrix

Dreidimensionale Kollagenmatrizen sollen mithilfe von Rattenschwanzkollagen (Kollagen Typ I) hergestellt und anschließend mit Wirkstoff behandelt werden. Das Hauptziel der Herstellung eines Kollagengels ist das, in Essigsäure gelöste Kollagen, in eine physiologische Salzkonzentration und einem physiologischen pH-Wert zu bringen. Beides ist eine Voraussetzung für die Vernetzung der Kollagenfasern.

Alle Schritte, die den Umgang mit nicht geliertem Gel beinhalten werden auf Eis durchgeführt. Zudem wird unter der Sterilwerkbank mit ausschließlicher Verwendung steriler Materialien gearbeitet.

Zunächst werden 9 Teile (70 ml) einer Kollagenlösung mit 3,5 mg/ml Kollagen-Gehalt mit einem Teil (7,8 ml) 10fach konzentrierter Hanks Lösung vermischt. Anschließend wird mit 1 M Natronlauge sehr vorsichtig auf pH 7 eingestellt.

Das dickflüssige Gel wird in eine 12- Well- Platte überführt, wobei jeweils 700 µl Gel in einem Well verteilt werden. Nach ca. 2 h im Brutschrank bei 37°C ist das Gel geliert und kann bis zur Behandlung mit Wirkstoff in PBS mit 5 % Penicillin/Streptomycin gelagert werden.

3.5.2. Inkubation der 3D- Kollagenmatrix mit HGA und Hydrochinon

Für die Inkubation der Gele mit Wirkstoff werden zunächst jeweils 5 mM Stocks mit HGA und Hydrochinon in PBS mit 5 % Penicillin/Streptomycin angesetzt und auf pH 7 eingestellt. Die Stocks werden zu Konzentrationen von 0 µM, 50 µM, 500 µM und 5000 µM verdünnt und auf die Gele gegeben. Nach Zugabe der Wirkstoffe

werden die Gele für drei bis vier Wochen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Gele wird alle 3 bis 4 Tage mit 5 J/cm² UVA bestrahlt, einem anderen Teil wird Tyrosinase zugesetzt. Die verwendete Tyrosinase stammt aus dem Vorrat des Labors und wurde zuvor um den Faktor 25 verdünnt.

Von allen Gelen werden Duplikate angesetzt, die gleichbehandelt werden. Nach der Inkubationszeit werden die Gele 3 Mal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mikroskopiert und fotografiert.

3.6. *In vitro* Assay zur Untersuchung der Oxidation von HGA und Hydrochinon

Die Oxidation von HGA kann durch einen Wellenlängenscan im UV-Bereich zwischen 230 und 330 nm durchgeführt werden. Das Oxidationsprodukt Benzochinon Essigsäure zeigt dabei einen charakteristischen Peak bei 250 nm, während der Peak für nicht oxidiertes HGA bei 290 nm liegt (Roberts *et al.*, 2015; Tokuhara *et al.*, 2018).

Zur Untersuchung der Oxidationsprodukte von Hydrochinon und HGA wird zunächst eine Konzentrationsreihe der beiden zu untersuchenden Wirkstoffe angesetzt (siehe Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2. Konzentrationen der Verdünnungsreihe von Hydrochinon und HGA zum Assay vor und nach Zugabe (50 µl) zum Well.

Konzentration <u>vor</u> Zugabe zum Well	Konzentration <u>nach</u> Zugabe zum Well
1300,0 µM	250,0 µM
650,0 µM	125,0 µM
325,0 µM	62,5 µM
162,5 µM	31,3 µM
81,3 µM	15,6 µM
40,6 µM	7,8 µM
20,3 µM	3,9 µM
0,0 µM	0,0 µM

Auf einer 96-Well-Platte werden jeweils 200 µl PBS pro Well vorgelegt. Anschließend werden jeweils 50 µl in den unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe in 6facher Bestimmung auf die Platte gegeben.

Die Platte wird unverzüglich nach Zugabe der Wirkstoffe vermessen. Die Messung erfolgt im Wellenlängenbereich zwischen 230 und 330 nm im Abstand von 1 nm bei einer Temperatur von 37°C. Direkt nach der Messung ($t = 0\text{h}$) wird die Platte mit 5 J/cm^2 UVA bestrahlt (siehe Abschnitt 3.2.) und anschließend wieder im Brutschrank gelagert. Im Abstand von jeweils 1 h wird die Platte wie beschrieben vermessen. Für die entstehende Kinetik werden Messpunkte für 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 und 48 h aufgenommen. Nach jeweils 2 h und 4 h wird die Platte nochmals mit 5 J/cm^2 UVA bestrahlt.

Neben HGA bzw. Hydrochinon werden dem Assay unter anderem Tyrosinase in den Verdünnungen 1:25; 1:125 und 1:625 zugesetzt, um den Einfluss dieser auf die Oxidation der Wirkstoffe zu beobachten. Tyrosinase wird in den Verdünnungen 1:25; 1:125 und 1:625 eingesetzt. Es werden hierbei $150\text{ }\mu\text{l}$ PBS auf der Platte vorgelegt und anschließend $50\text{ }\mu\text{l}$ Tyrosinase in den angebenen Verdünnungen und in dreifacher Bestimmung zugegeben. Kurz vor der Messung werden $50\text{ }\mu\text{l}$ HGA bzw. Hydrochinon in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Die Messungen erfolgen zum Zeitpunkt $t = 0\text{ h}$ und $t = 24\text{ h}$ mit denselben Parametern wie oben beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur HGD in der Haut (Penneys' These)

Bei näherer Betrachtung der gängigen These von Penney zur Hydrochinon induzierten, exogenen Ochronose ist fraglich, ob die Aktivität der HGD als elementares Glied im Abbau der Aminosäure Tyrosin in der Haut notwendig ist. Tyrosin, welches aus Phenylalanin synthetisiert wird, dient beispielsweise als Vorstufe von Neurotransmittern wie Dopamin, Epinephrin (Adrenalin) und Norepinephrin, Schilddrüsenhormonen, aber auch Melanin. Zudem ist es eine wichtige Komponente in vielen körpereigenen Polypeptiden und Proteinen. Innerhalb des Körpers liegt Tyrosin allerdings nur in geringen Konzentrationen vor, was auf die starke Metabolisierung der Aminosäure zurückgeführt werden kann (Human Metabolome Database). Der Abbau nicht metabolisiertem Tyrosins findet vor allem in den Zellen der Nieren und der Leber statt, wo es enzymatisch in HGA und anschließend durch die HGD zu 4-Maleylacetoacetat umgewandelt wird. Da die Tyrosinase der Melanozyten in der Haut Tyrosin zur Melanin-Synthese verwendet, ist ein Überschuss an Tyrosin in der Dermis oder Epidermis unwahrscheinlich.

Proteindatenbanken wie The Human Protein Atlas oder The Genotype-Tissue Expression Portal (GTEx) enthalten Expressionsdaten und histologische Nachweise des Enzyms HGD in unterschiedlichen Gewebearten. Die Expressionsdaten des GTEx Projekts zeigten bei 119 untersuchten Leberproben einen RPKM (reads per kilobase per million mapped reads)-Wert von 115, während die Testung von 250 Hautproben einen RPKM-Wert von 0,5 ergab (The Genotype-Tissue Expression Portal). Der RPKM-Wert ist ein normierter Wert, der als Maß für die Expression eines Transkripts dient. Die Expressionswerte des GTEx Projekts zeigen daher sehr deutlich, dass HGD nicht in der Haut exprimiert wird.

Daneben wurden durch eine andere, unabhängige Methode des Human Protein Atlas ähnliche Erkenntnisse erbracht. Die immunhistologische Anfärbung von Haut- und Leberschnitten verschiedener Individuen zeigen eine eindeutige Übereinstimmung mit den Expressionsdaten. In Abbildung 4.1. sind exemplarisch zwei dieser Schnitte aus Haut und Leber gegenübergestellt. HGD wurde in diesem Fall mit einem Anti-HGD-Antikörper und Horseradish-Peroxidase braun angefärbt. Während in den Hepatozyten des Lebergewebes eine große Menge HGD vorhanden ist, konnte diese in der Dermis und Epidermis nicht nachgewiesen werden.

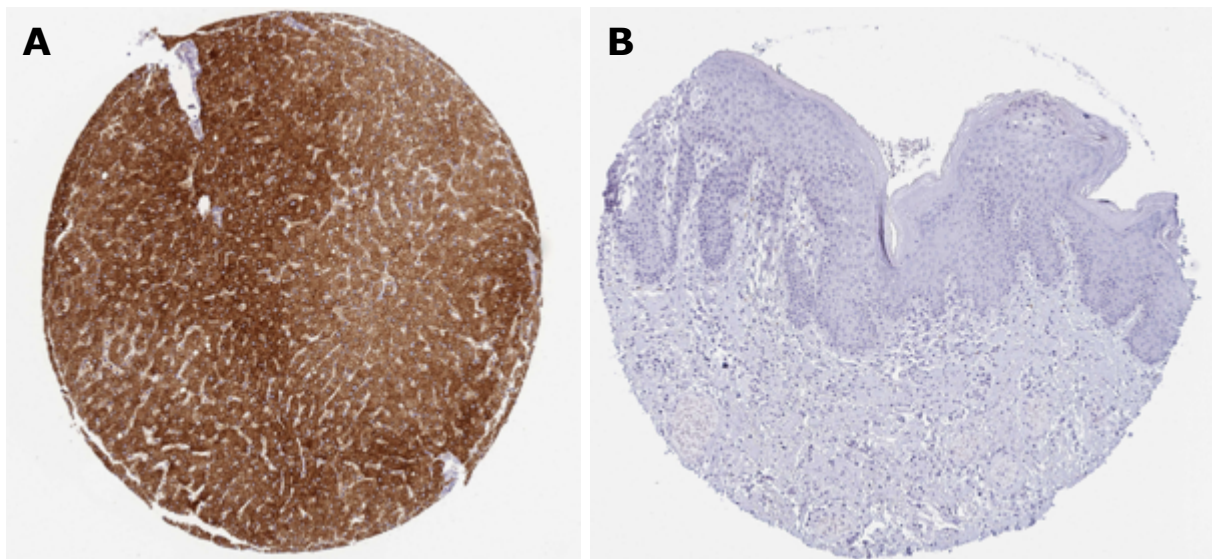


Abbildung 4.1. Immunhistochemischer Nachweis der HGD in Lebergewebe (**A**) und Haut (**B**). Zellen, die HGD enthalten sind mit einem Anti-HGD-Antikörper und Horseradish-Peroxidase braun angefärbt. Gegenfärbung erfolgte vermutlich mit einer Hämatoxylin-Eosin - Färbung. Es ist deutlich zu erkennen, dass Hepatozyten des Lebergewebes große Mengen an HGD exprimieren, während in der Haut kein HGD exprimiert wird (Quelle: The Human Protein Atlas).

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass HGD keine Rolle in der Hydrochinon bedingten Entstehung exogener Ochronose spielen kann. Da davon ausgegangen werden kann, dass Hydrochinon in den topisch applizierten Konzentrationen hauptsächlich in der Haut verfügbar ist, kann eine Interaktion von HGD mit Hydrochinon weitestgehend ausgeschlossen werden.

Weitere Experimente konzentrieren sich daher auf die Untersuchung möglicher Gemeinsamkeiten der Entstehung HGA induzierter, endogener Ochronose und Hydrochinon induzierter, exogener Ochronose. Eine naheliegende Vermutung ist, dass Hydrochinon, wie HGA, an Kollagenfasern bindet.

4.2. Untersuchung der Wirkungsweise von Tyrosinase und UV-Strahlung auf die Oxidation von Hydrochinon im Vergleich zu HGA (Katalytische Einflussfaktoren)

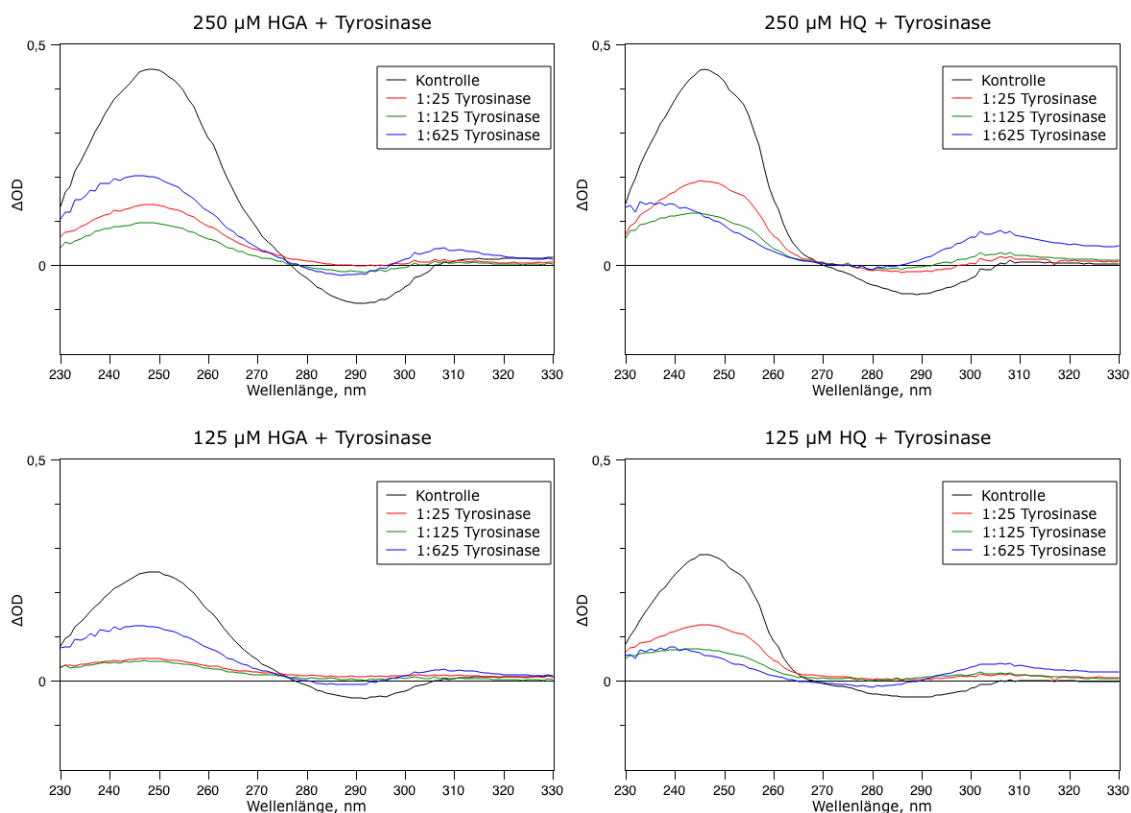
Das Auftreten exogener Ochronose nach dem Gebrauch von Hydrochinon ist ein relativ sporadisches Ereignis. Jedoch gibt es einige Indizien dafür, dass bestimmte Einflussfaktoren die Entstehung ochronotischer Pigmente begünstigen. So tritt exogene Ochronose vor allem in sonnenexponierten Arealen auf (O'Donoghue, Lynfield und Derbes 1983). Dadurch liegt der Schluss nahe, dass Licht im allgemeinen und UV-Strahlung im Besonderen eine katalytische Wirkung auf die Prozesse der Manifestation von Hydrochinon im Bindegewebe haben könnte.

Auch Tyrosinase wird als maßgeblicher Einflussfaktor verdächtigt, da gezeigt werden konnte, dass die Aktivität von Melanozyten bei der Entwicklung von Ochronose notwendig zu sein scheint (Hall 2008).

Es ist bekannt, dass die Bindung von HGA an Kollagenfasern ein reversibler Prozess ist, der stark vom pH des umgebenden Milieus abhängt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Oxidation von HGA in seine Chinon-Form BQA die Polymerisation von HGA und die irreversible Bindung an Kollagenfasern zulässt (Barconi *et al.*, 2015; Milch 1961). Hydrochinonpolymere (Polyhydrochinone = PHQ) entstehen durch die Zusammenlagerung von Hydrochinon-Molekülen mit deren Oxidationsprodukt Benzochinon (BQ) (Furlani, Russo und Cataldo 1989). Die Entwicklung dieser Polymere wird bei höheren Ausgangskonzentrationen an Hydrochinon, ähnlich zur HGA, durch eine Braunfärbung der Lösung sichtbar (Zhang *et al.*, 2012). Oxidation scheint aufgrund der bestehenden Erkenntnisse die Grundlage für die Polymerisation und damit Entstehung brauner Pigmente zu sein.

Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluss von UV-Strahlung und der Anwesenheit von Tyrosinase auf die Oxidation von Hydrochinon zu untersuchen. Dabei soll das Oxidationsprodukt BQ nach Zugabe der Tyrosinase bzw. nach UV-Bestrahlung photometrisch ermittelt werden. Es konnte bereits experimentell nachgewiesen werden, dass BQ bei 246 nm absorbiert, während Hydrochinon bei 289 nm ein Absorptionsmaximum besitzt (Cheng *et al.*, 2016). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Ähnlichkeit der Wirkungsweise von HGA und Hydrochinon bei der Entstehung von Ochronose liegt, wurden alle Experimente mit Hydrochinon parallel mit HGA durchgeführt.

Tyrosinase wurde in drei unterschiedlichen Verdünnungen vorgelegt. Photometrische Messungen wurden jeweils direkt nach der Zugabe von Hydrochinon bzw. HGA (t_{0h}) und nach 24 h Inkubation mit den Wirkstoffen (t_{24h}) durchgeführt. Aus den beiden ermittelten Spektren wurde ein Differenzspektrum ($t_{24h} - t_{0h}$) berechnet, um die Zunahme des Oxidationsproduktes BQ bei 246 nm und die Abnahme des Ausgangsproduktes Hydrochinon bei 289 nm zu beobachten. Bei HGA konnte der Peak des Oxidationsproduktes bei 249 nm nachgewiesen werden, während HGA selbst bei 290 nm absorbiert (siehe Abbildung 4.2.). Alle gemessenen Proben wurden auf der 96Well-Platte als Tripletten angesetzt und anschließend zum Mittelwert verrechnet. Die angegebenen Messpunkte und Kurven sind aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten und deren Mittelwerte entstanden. Die jeweiligen Standardabweichungen für jeden Messpunkt können dem Anhang (siehe 8.2., Abbildung 8.1.) entnommen werden.



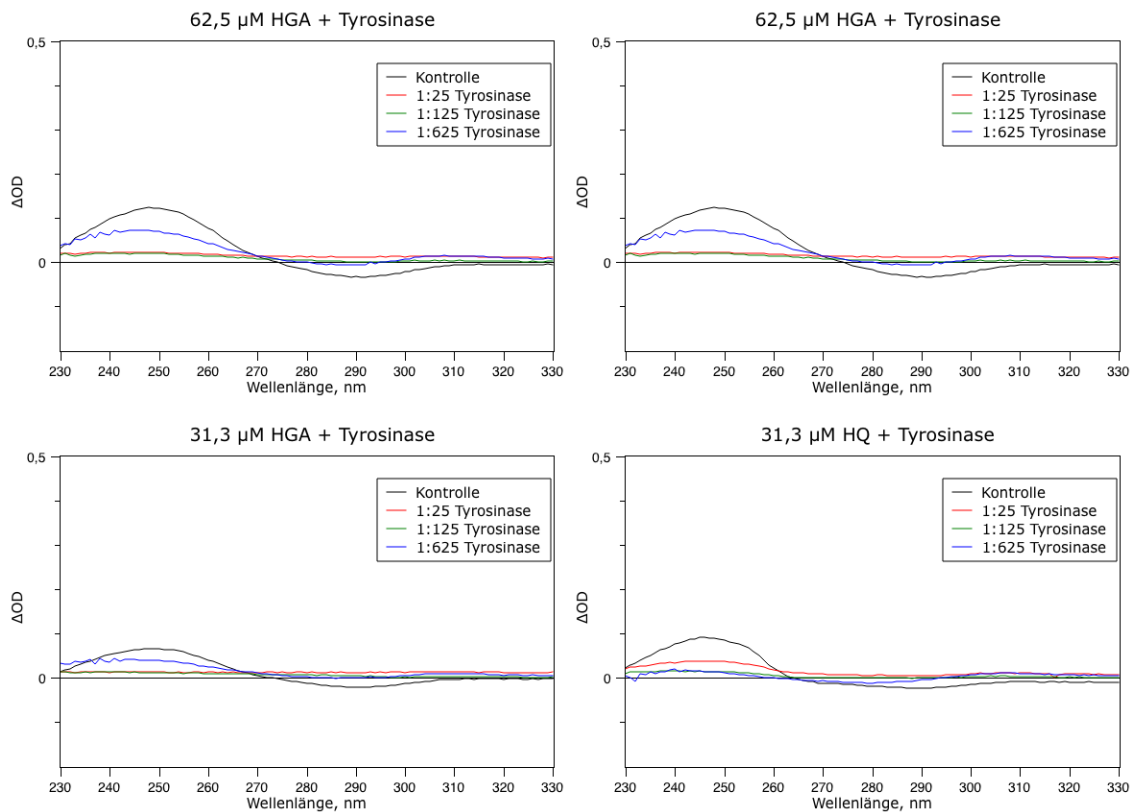


Abbildung 4.2. Differenzspektrum von Hydrochinon und HGA nach Zugabe von Tyrosinase. Dargestellt ist die Differenz der Spektren von nach 24h (t_{24h}) und direkt nach Zugabe (t_{0h}) der Tyrosinase. Die Kurven setzen sich aus den Mittelwerten dreier unabhängigen Einzelmessungen zusammen.

Anhand der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass Tyrosinase die Entstehung des Oxidationsproduktes von Hydrochinon beeinflusst. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle ist bei den Proben, denen Tyrosinase zugesetzt wurde, weniger BQ bei 246 nm nachweisbar. Auch ist die Abnahme der Absorption von Hydrochinon bei 289 nm in der Kontrolle höher, als bei den Proben mit Tyrosinase. Die geringste Verdünnung der Tyrosinase (1:25) bewirkt eine größere Zunahme von BQ, als höhere Verdünnungen von 1:125 oder 1: 625. Diese Effekte sind auch bei HGA zu beobachten, jedoch scheint hier mit steigender Verdünnung der Tyrosinase das Oxidationsprodukt BQA zuzunehmen.

Besonders bei den höheren Konzentrationen (250 und 125 μM) ist ein Anstieg der Absorptionskurve in den Proben mit Tyrosinase ab 300 nm sichtbar. Der beobachtete Anstieg ist vor allem bei der stärksten Verdünnung 1:625 sichtbar. In allen verwendeten Konzentrationen von Hydrochinon und HGA konnten die beobachteten Effekte reproduziert werden.

Um den Einfluss von UVA-Strahlung auf die Entwicklung von BQ bzw. BQA beobachten zu können, wurde eine Kinetik über 6 h mit einer Endpunktbestimmung bei 24 h aufgenommen. Dabei wurde zu jedem Messzeitpunkt ein Absorptionsscan durchgeführt. Jeweils nach t_{0h} , t_{2h} und t_{4h} (nach der Messung) wurde mit 5 J/cm^2 UVA bestrahlt. Dargestellt sind die Absorptionswerte, die zu den jeweiligen Zeitpunkten bei 246 nm (Hydrochinon) bzw. 249 nm (HGA) ermittelt wurden. Die in Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4 dargestellten Kinetiken wurden mit einer Hydrochinon- bzw. HGA-Konzentration von $250 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt. Auch hier setzen sich alle Messpunkte aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Messungen zusammen. Die Kurven wurden Offset bereinigt, indem von allen Werten der Kinetik der t_{0h} -Wert abgezogen wurde. Alle Original Werte können dem Anhang entnommen werden (siehe Abschnitt 8.2.).

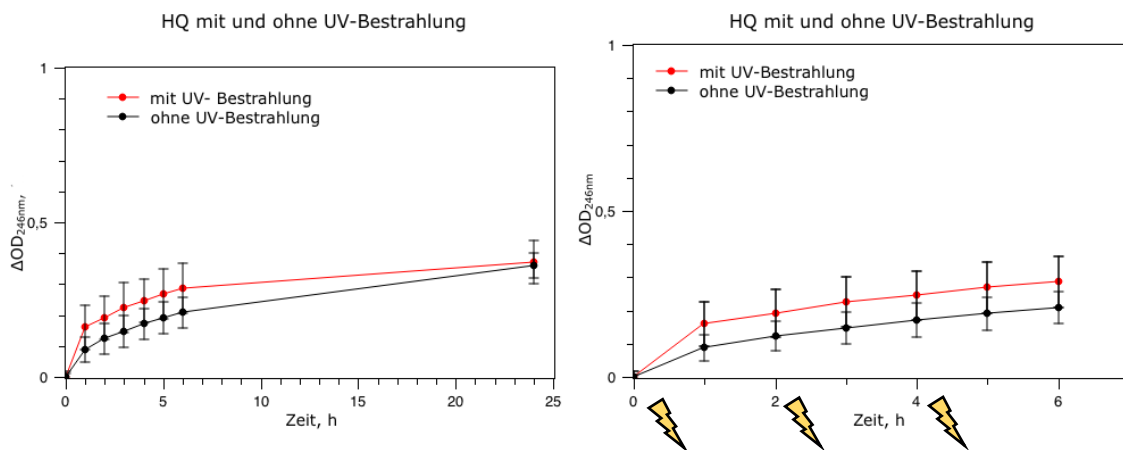


Abbildung 4.3. Kinetik der Entwicklung von BQ nach UVA-Bestrahlung von Hydrochinon. Dargestellt ist $250 \text{ }\mu\text{M}$ Hydrochinon (HQ) in PBS, welches mit UVA-Bestrahlung und ohne Bestrahlung behandelt wurde. Die Messpunkte entsprechen den Absorptionswerten bei 246 nm, die in den ersten 6 h stündlich und 24 h nach Wirkstoffzugabe aufgenommen wurden. Bestrahlt wurde mit 5 J/cm^2 UVA jeweils 0 h, 2 h und 4 h nach Zugabe von Wirkstoff. In Abbildung B sind die Werte aus Abbildung A im Bereich der ersten 6 h und unter Kennzeichnung der Bestrahlungsdosen (Blitze) dargestellt. Alle Kurven wurden zuvor Offset-bereinigt.

Anhand der Messungen mit Hydrochinon fällt auf, dass UVA-Strahlung zunächst einen fördernden Effekt auf die Entwicklung des Oxidationsproduktes BQ zu haben scheint (siehe Abbildung 4.4.). Bei genauerer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass die Differenz zwischen den Kurven auf Unterschieden der BQA-Absorption nach 1 h zurückzuführen ist. Innerhalb der Zeitspanne von 1 h bis 6 h verlaufen beide Messkurven parallel, bis sie sich nach 24 h einem identischen Endpunkt

angenähert haben. Die UVA-abhängigen Effekte scheinen sich in diesem Falle daher nur innerhalb der ersten Stunde abzuspielen. Eine zu- oder Abnahme von BQ kann nach den anderen Bestrahlungseinheiten nicht beobachtet werden.

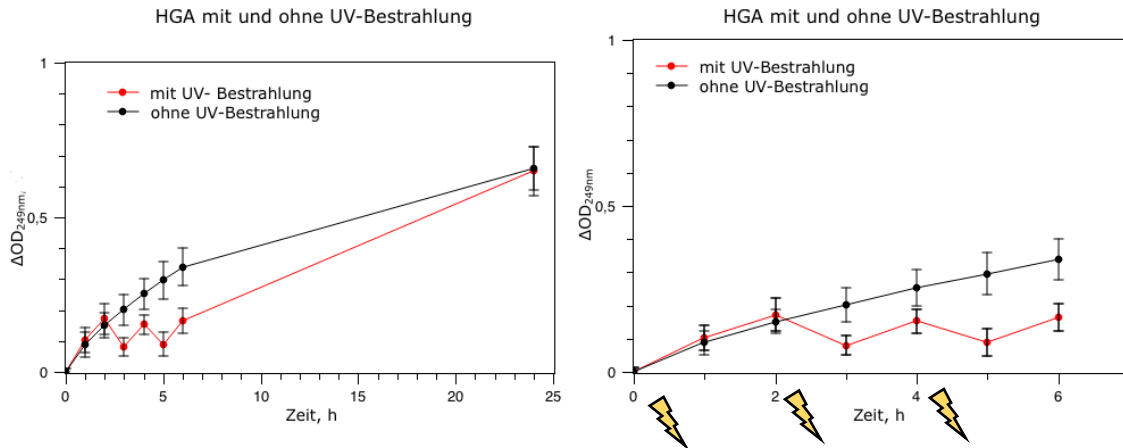


Abbildung 4.4. Kinetik der Entwicklung von BQA nach UVA-Bestrahlung von HGA
Dargestellt ist 250 μM HGA in PBS, welches mit UVA-Bestrahlung und ohne Bestrahlung behandelt wurde. Die Messpunkte entsprechen den Absorptionswerten bei 246 nm, die in den ersten 6 h stündlich und 24 h nach Wirkstoffzugabe aufgenommen wurden. Bestrahlt wurde mit 5 J/cm^2 UVA jeweils 0 h, 2 h und 4 h nach Zugabe von Wirkstoff. In Abbildung **B** sind die Werte aus Abbildung **A** im Bereich der ersten 6 h und unter Kennzeichnung der Bestrahlungsdosen (Blitze) dargestellt. Alle Kurven wurden zuvor Offset-bereinigt.

Im Vergleich zu Hydrochinon scheint UVA-Strahlung einen teilweise inhibierenden Effekt auf die Oxidation von HGA bzw. auf die Entwicklung des zugehörigen Oxidationsproduktes BQA zu haben (siehe Abbildung 4.4.). Jeweils zum Zeitpunkt 3 h und 5 h, d.h. nach den Bestrahlungsdosen ist der Absorptionswert von BQA deutlich niedriger, als vor der Bestrahlung zum Zeitpunkt 2 h und 4 h. Dieser Effekt kann jedoch nicht nach der ersten Bestrahlungseinheit bei 0 h beobachtet werden. Auch fällt auf, dass der UVA-induzierte Effekt reproduzierbar ist, d.h. die Werte nach der Bestrahlung immer um einen identischen Wert fallen und wieder steigen. Auch hier nähern sich bei t_{24h} beide Kurven einem gemeinsamen Endwert an.

4.3. Bindung von Hydrochinon an Kollagenfasern

Für die Untersuchung des Mechanismus der Entstehung exogener Ochronose in der Dermis durch Hydrochinon ist vor allem die Untersuchung der Wechselwirkung

von Hydrochinon mit der dermalen, extrazellulären Matrix in Form von Kollagen Typ I von Bedeutung.

Um den Einfluss zellulärer Aktivität auf die Bindung an Kollagen zu untersuchen, wurden zwei *in vitro* Systeme entwickelt. Ein System stützt sich auf die Untersuchungen von Tinti *et al.*, 2011, die eine Monolayerkultur in HGA-haltigen Medium inkubiert und somit ochronotische Pigmente induziert haben.

Das zellfreie System stellt ein Gel aus Rattenschwanzkollagen dar, welches der extrazellulären Matrix des Bindegewebes nachempfunden sein soll und ebenfalls mit wirkstoffhaltigem Medium inkubiert wurde.

Da durch die zuvor beschriebenen Versuche gezeigt werden konnte, wie sich Tyrosinase und UV-Strahlung auf die Oxidation von Hydrochinon ausgewirkt hat, soll nun dessen Bindung unter Exposition der genannten Einflüsse untersucht werden. Es ist zu beobachten, ob die Effekte, die im photometrischen *in vitro* Test beobachtet werden konnten, mit den Ergebnissen aus den Kollagen-Bindungsversuchen in Relation zu stellen sind.

Da HGA bekanntermaßen an Kollagen binden kann, wurden alle Versuche parallel mit HGA als Positiv-Kontrolle durchgeführt.

4.3.1. Induktion ochronotischer Pigmente in dermalen Fibroblasten durch HGA und Hydrochinon (zellbasiertes System)

Tinti *et al.*, 2011 konnten in einer zellulären Monolayerkultur erfolgreich endogene Ochronose induzieren. Dafür wurden in den Versuchen tumorogene Sarkom-Zelllinien verwendet, die dafür bekannt sind große Mengen extrazelluläre Matrix in Form von Kollagen Typ I zu produzieren (Pautke *et al.*, 2004). Diese wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen in HGA inkubiert, sodass am Ende der Inkubationszeit deutlich intra- und interzelluläre Pigmente nachgewiesen werden konnten. Das Modell diene dazu die Auswirkungen der Alkaptonurie auf Gelenke zu untersuchen.

In diesem Versuch soll es um die Induktion von Ochronose in dermalen Bindegeweben gehen. Deshalb ist das Ziel dieses Versuchs, die Replikation der Ergebnisse von Tinti *et al.*, 2011 mit den, im Paper verwendeten Sarkom-Zelllinien und die Übertragung des Protokolls auf dermale Fibroblasten.

Um eine optimale Ausgangslage für die Anlagerung von HGA und Hydrochinon zu schaffen, wurde zunächst die Kollagensynthese in den verwendeten Zelllinien (Sarkom-Zelllinien und HDF) durch die Verwendung von Ascorbinsäure (Vitamin C)

in Gang gesetzt. Vitamin C als wichtiger Co-Faktor in der Kollagensynthese (siehe Abschnitt 1.1) wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich in der Kollagensynthese von Fibroblasten eingesetzt (Boyera, Galey und Bernard 1998; Lutz *et al.*, 2012). Da Ascorbinsäure als Antioxidationsmittel jedoch die Oxidation von HGA zu BQA unterbindet (Mistry, Bukhari und Taylor 2013) und somit ebenfalls inhibierend auf die Entstehung Hydrochinon induzierter Ochronose wirken kann, musste die Inkubation mit Ascorbinsäure (in diesem Fall Ascorbinsäure 2-Phosphat-Sesquimagnesiumsalz Hydrat= AA2P) getrennt von der Inkubation mit HGA bzw. Hydrochinon stattfinden. Deshalb wurde zunächst eine effektive Inkubationszeit für die Induktion von Kollagen in den verwendeten Zellen bestimmt.

In Vorversuchen wurde die Konzentration AA2P ermittelt, bei der möglichst viel Kollagen synthetisiert wurde ohne das Zellwachstum zu hemmen (siehe Abschnitt 8.1 a). Zudem wurde ein möglichst kurzer Inkubationszeitraum bestimmt, in dem ausreichend Kollagen synthetisiert wird (Daten im Anhang, siehe Abschnitt 8.1 b). Für den Versuch wurden Zellen des Spenders BDF049 als Repräsentant aller drei HDF-Spender und die Sarkom-Zelllinien MG-63 und SaOS-2 verwendet. Das synthetisierte Kollagen Typ I wurde immunzytochemisch sichtbar gemacht (siehe Abbildung 4.5.).

Die primäre Fibroblastenzelllinie BDF049 produzierte im betrachteten Zeitraum deutlich mehr Kollagen als MG-63 und SaOS-2. Nach 4 Tagen sind in BDF049 und MG-63 bereits eine dünne Kollagenmatrix sichtbar, während in SaOS-2 kein Kollagen nachgewiesen werden konnte. Nach 7 Tagen wurden besonders bei BDF049, aber auch bei MG-63 die vermehrten Quervernetzungen zwischen den Kollagenfasern und eine deutliche Verdichtung der Matrix erkennbar. Bei SaOS-2 bildeten sich erst nach 7 Tagen Kollagenfasern aus, die jedoch nicht so dicht sind, wie in den anderen Zelllinien.

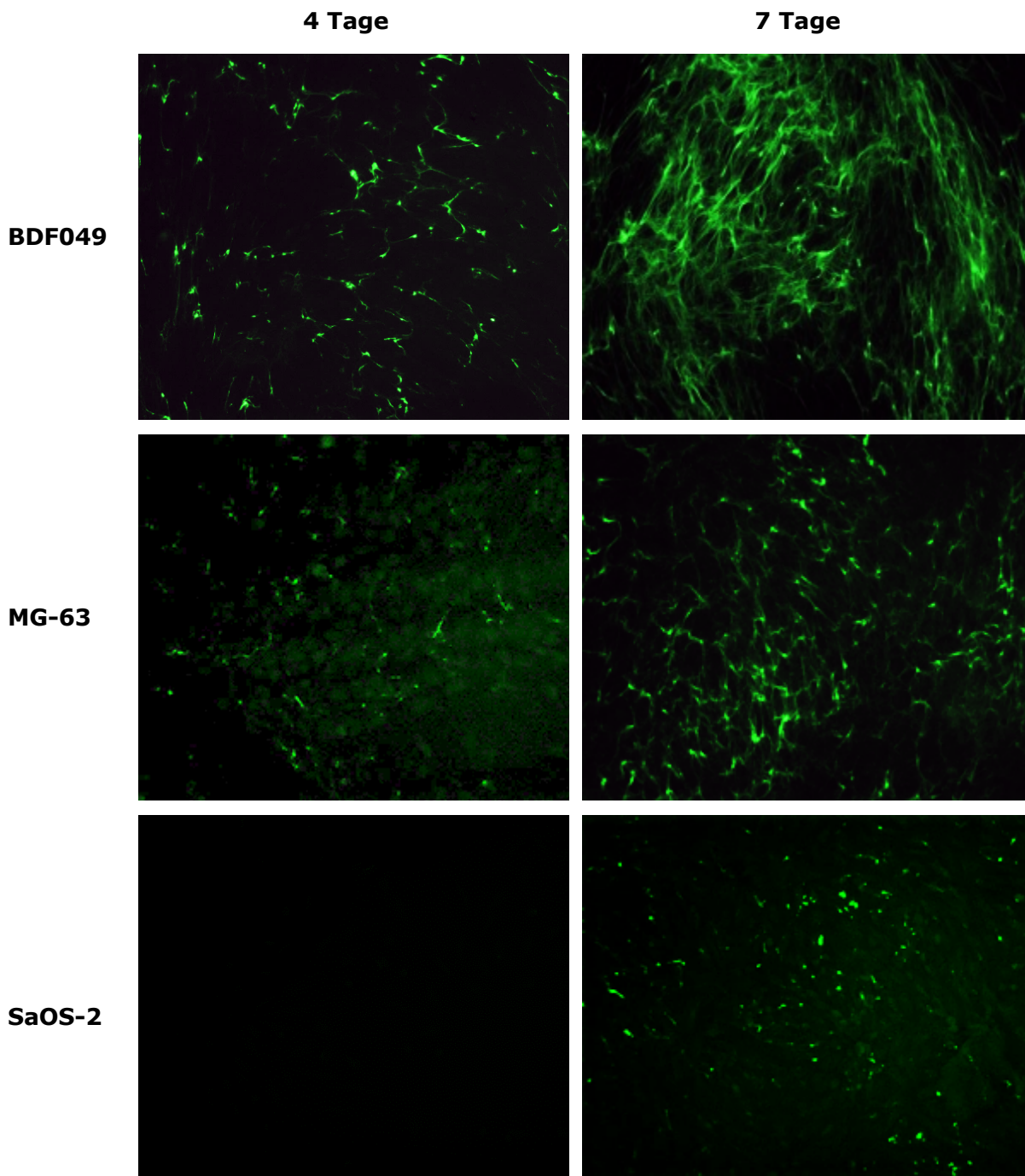


Abbildung 4.5. Kollagensynthese in BDF049, MG-63 und SaOS-2

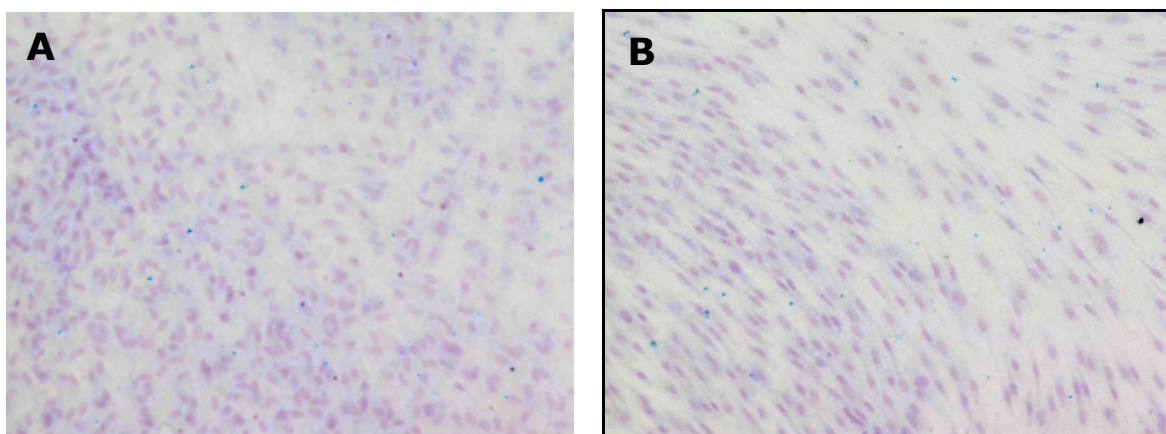
Die Abbildung zeigt die immunzytochemisch angefärbten HDF (BDF049) und Sarkom-Zellen (Sa-OS2 und MG-63), die zuvor über 4 und 7 Tage mit 1 mM AA2P inkubiert wurden. In grün sind die angefärbten Kollagenfasern zu sehen. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Observer Z1 bei 200facher Vergrößerung aufgenommen. Jede Abbildung stellt einen repräsentativen Ausschnitt eines von zwei Duplikaten dar.

Ausgehend von der Datenlage aus den Kollagen-Vorversuchen wurde eine Inkubationsdauer mit AA2P von 4 Tagen gewählt, da bei den Fibroblasten BDF049 nach dieser Zeit bereits signifikante Mengen Kollagen gebildet wurden.

Die Anfärbung ochronotischer Pigmente mit dem Schmorl-Reagenz beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit zum Melanin. Hydrochinon ähnelt in seiner Struktur sehr stark der HGA und ist dafür bekannt histologisch identische ochronotische Einlagerungen im Gewebe hervorzurufen. Es wird daher davon ausgegangen, dass eine Anfärbung von Hydrochinon induzierter Ochronose ebenfalls möglich sein sollte (Tinti *et al.*, 2011). Die Färbung wird dazu eingesetzt, den Kontrast der ochronotischen Pigmente zur Umgebung anzuheben und somit besser sichtbar zu machen.

Nach der viertägigen Inkubation mit AA2P wurde das Medium durch wirkstoffhaltiges Medium ersetzt. Die Zellen wurden zunächst mit 200, 100 und 50 μM HGA über weitere 10 bis 14 Tage im Brutschrank gelagert. Parallel dazu wurden Zellen ohne vorherige AA2P-Inkubation mit Wirkstoff behandelt. Als Negativkontrolle wurden zu jedem Experiment Zellen ohne die Zugabe von Wirkstoff mitbehandelt. Alle Bilder wurden mit dem Keyence BZ-9000 bei 200facher Vergrößerung aufgenommen.

Anhand Abbildung 4.6. ist zu erkennen, dass mit der angewandten Methode in den HDF keine ochronotischen Pigmente induziert werden konnten. Zu sehen sind blau gefärbte Areale, die sowohl in den behandelten Proben, als auch in den unbehandelten Kontrollen auftreten. In der Vergrößerung lassen sich, anhand der eingefügten Pfeile, die Ähnlichkeiten der blauen Färbung in Kontrolle und der behandelten Probe (200 μM HGA) erkennen (siehe Abbildung 4.7.). Es kann daher geschlossen werden, dass es sich hierbei eher um Artefakte, als angefärbte, ochronotische Pigmente handelt.



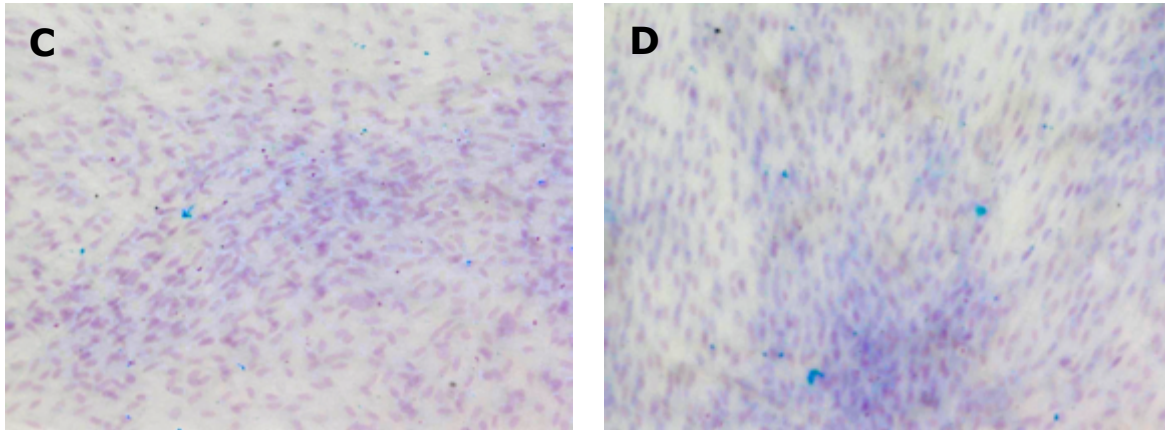


Abbildung 4.6. Anfärbung ochronotischer Pigmente von HDF nach Schmorl
Abgebildet sind nach Schmorl angefärbte dermale Fibroblasten vom Spender BDF049 nach 10 Tagen Inkubation mit HGA (200fache Vergrößerung). Jede Abbildung stellt einen repräsentativen Ausschnitt eines von zwei Duplikaten dar. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Nuclear Fast Red. Abgebildet sind unbehandelte Kontrollen (**A**), und mit 50 µM (**B**), 100 µM (**C**) und 200 µM (**D**) behandelte Zellen.

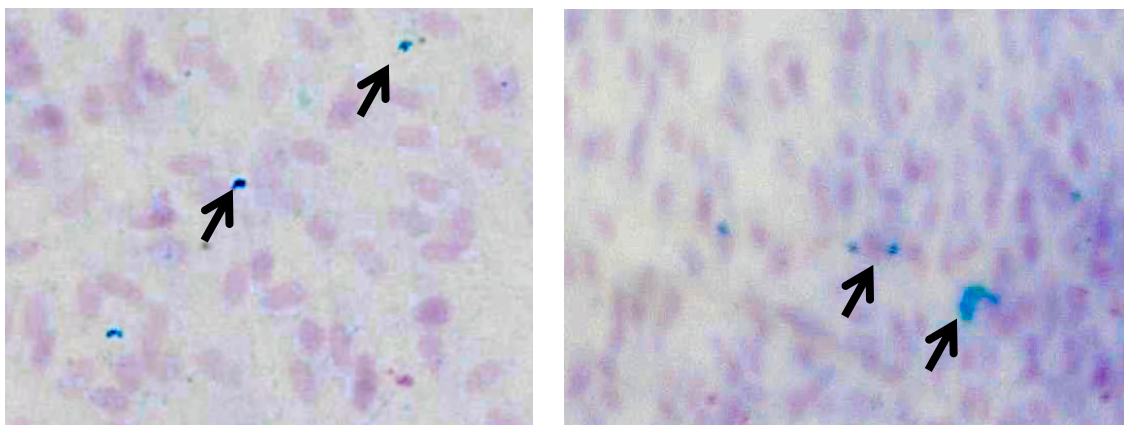


Abbildung 4.7. Digitale Vergrößerung der unehandelten Kontrolle der angefärbten HDF
Links: Die Vergrößerung der Kontrolle (Abbildung 4.6.), die nicht mit HGA behandelt wurde, zeigt deutlich die vorhandenen blauen Färbungen (siehe Pfeil). **Rechts:** Blaufärbung in der, mit 200 µM HGA behandelten Probe (siehe Pfeil), ähneln den Artefakten in der Kontrolle.

Die Sarkom-Zellen, die bereits erfolgreich von Tinti *et al.*, 2011 mit dem Protokoll angefärbt werden konnten, haben in diesem Experiment ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse erbringen können. Auch hier sind sowohl in den behandelten Proben, als auch in der Kontrolle, unspezifische Blaufärbungen zu sehen (siehe Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9.). Zudem scheint die Färbung in den Krebszellen deutlich stärker zu sein, was durch den tumorigenen Phänotyp und die damit einhergehende erhöhte Zelldichte begründet ist.

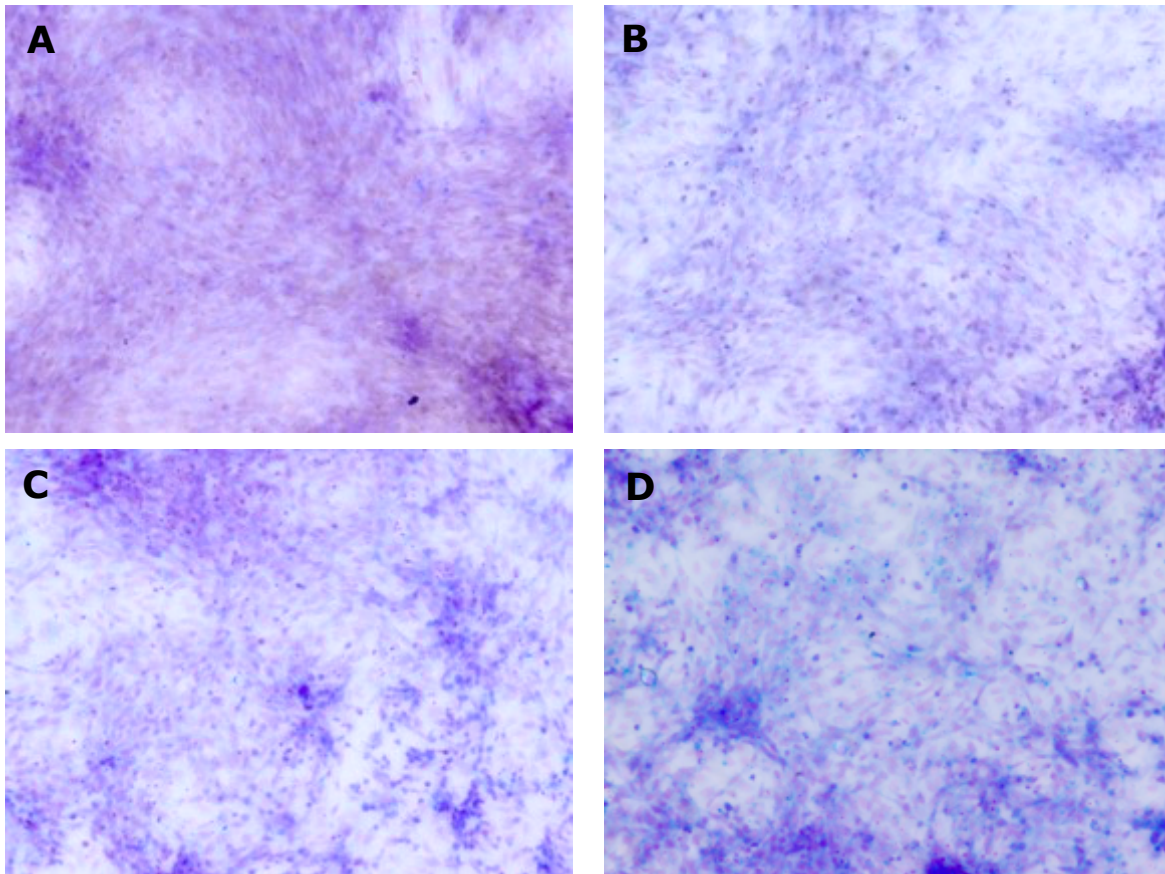


Abbildung 4.8. Anfärbung ochronotischer Pigmente von Osteosarkom-Zellen nach Schmorl. Abgebildet sind nach Schmorl angefärbte Osteosarkom Zellen der Zelllinie SaOS-2 nach 10 Tagen Inkubation mit HGA (200fache Vergrößerung). Jede Abbildung stellt einen repräsentativen Ausschnitt eines von zwei Duplikaten dar. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Nuclear Fast Red. Abgebildet sind unbehandelte Kontrollen (**A**), und mit 50 µM (**B**), 100 µM (**C**) und 200 µM (**D**) behandelte Zellen.

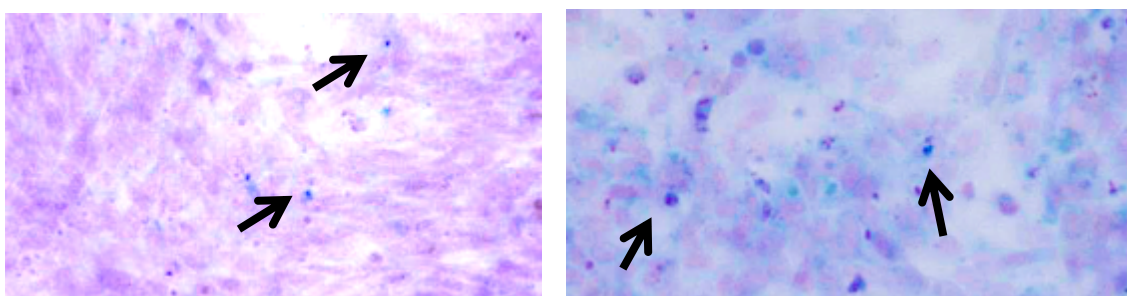


Abbildung 4.9. Digitale Vergrößerung der angefärbten Sarkom-Zellen

Links: Die Vergrößerung der Kontrolle (Abbildung 4.8.), die nicht mit HGA behandelt wurde, zeigt deutlich die vorhandenen blauen Färbungen (siehe Pfeil). **Rechts:** Blaufärbung in der, mit 200 µM HGA behandelten Probe (siehe Pfeil), ähneln den Artefakten in der Kontrolle.

Um die geringe Spezifität der Schmorl-Färbung in diesem Experiment darzustellen, wurden die Zellen ohne anschließende Färbung mit Nuclear Fast Red mikroskopiert, da dies den starken blauen Hintergrund der Schmorl-Färbung

maskiert. Abbildung 4.10. zeigt, dass Teile der extrazellulären Matrix das Kaliumhexacyanidoferrats zu reduzieren scheinen, da Großteile der Zellen Blau gefärbt sind. Die Tatsache, dass auch hier sowohl die Kontrollen, als auch die behandelten Proben betroffen sind, unterstützt diese Annahme.

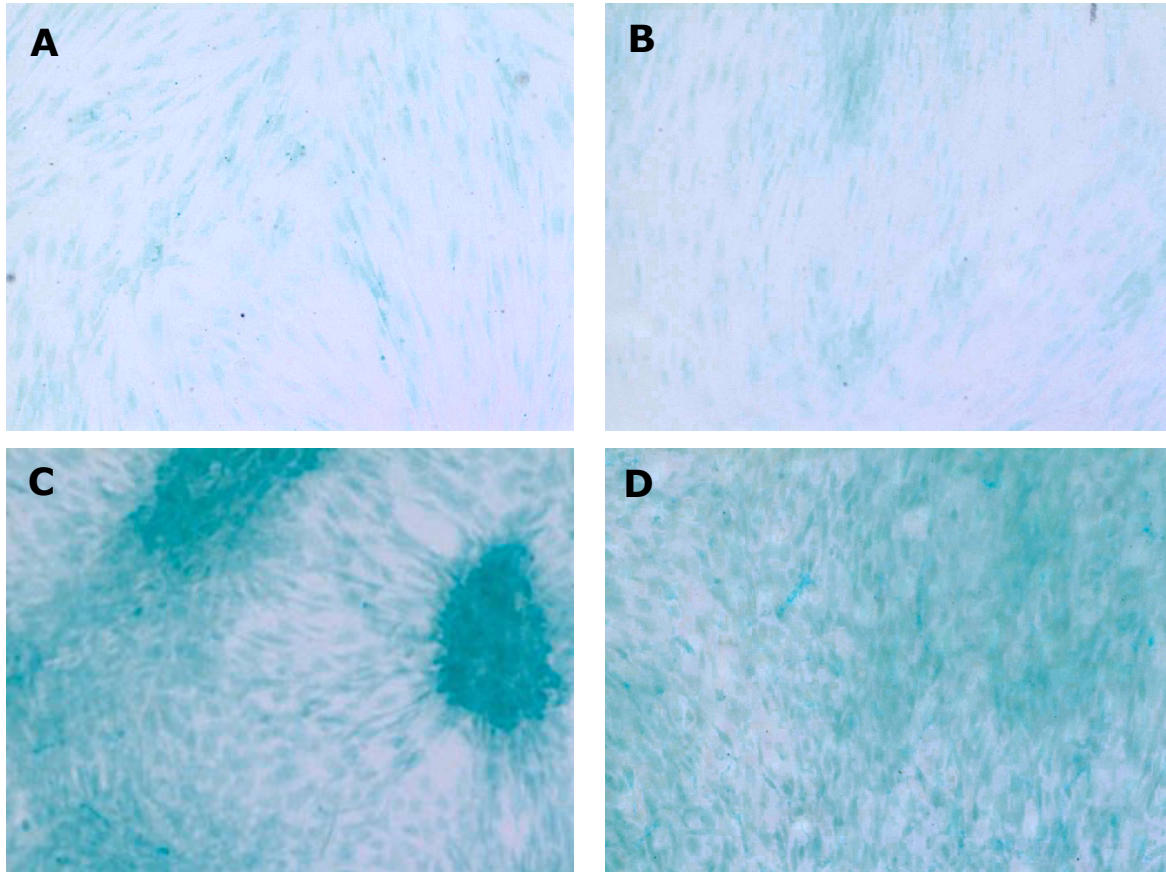


Abbildung 4.10. Hintergrund der Schmorl-Färbung

Abgebildet sind nach Schmorl angefärbte HDF BDF077 (**A, B**) und Sarkom-Zellen MG-63 (**C, D**) bei 200facher Vergrößerung. Um nur die Komponenten zu zeigen, die durch das Schmorl-Reagenz angefärbt wurden, wurde keine Gegenfärbung mit Nuklear Fast Red durchgeführt. Die Kontrollen (**A, C**) sind den, mit 200 µM HGA behandelten Zellen (**B, D**) gegenübergestellt.

Um auszuschließen, dass das Ausbleiben ochronotischer Pigmente durch einen Mangel an Kollagen begründet ist, wurden Proben über 7 Tage mit AA2P behandelt und anschließend über 10 Tage mit HGA inkubiert. In den HDF, die nachweislich nach 7 Tagen große Mengen Kollagen produzieren (siehe Abbildung 4.5.), konnte nach 7 Tagen Kollagen-Induktion und anschließender Inkubation mit HGA über 14 Tage keine ochronotischen Pigmente nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.11.). Auch in SaOS-2 war mit derselben Prozedur kein Unterschied zwischen Kontrolle und behandelter Probe zuerkennen (siehe Abbildung 4.12.). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass mangelndes Kollagen das Problem ist.

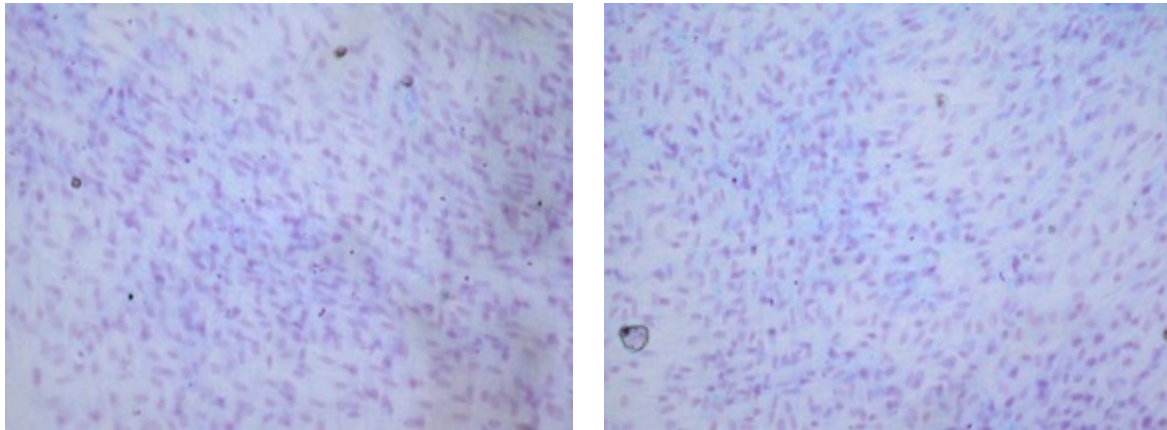


Abbildung 4.11. HDF BDF049 (7 Tage mit AA2P behandelt)

Links: Kontrolle (7 Tage mit AA2P behandelt, anschließend 14 Tage normales Medium).

Rechts: Probe (7 Tage mit AA2P behandelt, schließend weiter 14 Tage mit 200 µM HGA behandelt)

Alle Aufnahmen wurden bei 200facher Vergrößerung gemacht.

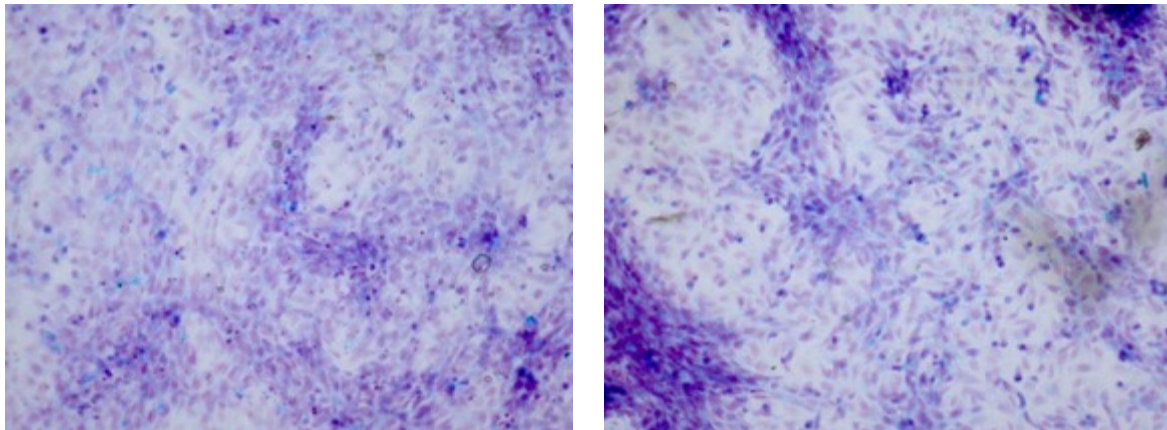


Abbildung 4.12. Sarkom-Zellen SaOS-2 (7 Tage mit AA2P behandelt)

Links: Kontrolle (7 Tage mit AA2P behandelt, anschließend 14 Tage normales Medium).

Rechts: Probe (7 Tage mit AA2P behandelt, schließend weiter 14 Tage mit 200 µM HGA behandelt)

Alle Aufnahmen wurden bei 200facher Vergrößerung gemacht.

Um Fehler in der Methode auszuschließen, wurden unbehandelte Melanozyten mit dem Protokoll angefärbt (siehe Abbildung 4.13.). Das angewendete Färbeprotokoll diente ursprünglich dem Nachweis von Melanin, sodass eine kontrastreiche Blaufärbung der Melanozyten zu erwarten wäre.

Die Abbildungen zeigen sehr deutlich die reduzierende Wirkung des Melanins auf das Hexacyanidoferrat im Schmorl-Reagenz und den daraus entstehenden blauen Farbkomplex. Anhand dieses Versuchs konnte gezeigt werden, dass das Protokoll prinzipiell funktioniert.

Da die Diskrepanz zwischen den erwarteten und den erarbeiteten Ergebnissen so groß war, wurden weitere Experimente dieser Methode mit Hydrochinon eingestellt.

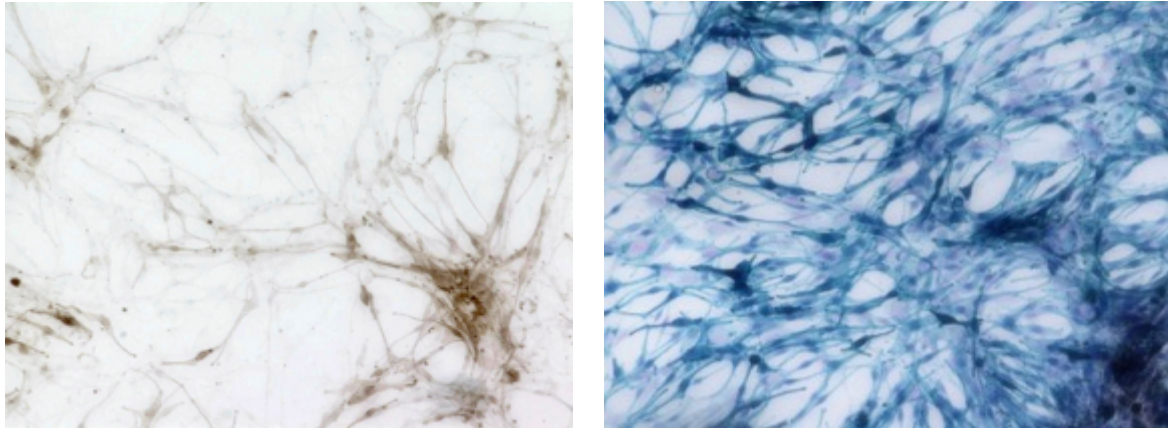


Abbildung 4.13. Anfärbung von Melanin nach Schmorl als Kontrolle
Anfärbung von Melanin in unbehandelten Melanozyten (BDF149) mit dem verwendeten Protokoll zur Schmorl Färbung BDF049 (aufgenommen bei 200facher Vergrößerung). **Links:** Fixierte Melanozyten ohne Färbung. **Rechts:** mit dem Schmorl Reagenz und Nuclear Fast Red angefärbte Melanozyten..

4.3.2. Induktion ochronotischer Pigmente in zellfreien Kollagen-Matrizen (zellfreies System)

Ochronotische Pigmente der Haut manifestieren sich besonders am und im Kollagen des dermalen Bindegewebes. Da das dermale Bindegewebe hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht, war es sinnvoll ein System zu wählen, welches den Gegebenheiten der Dermis in dieser Hinsicht am nächsten kommt. Als möglichst simple Methode bieten sich daher Kollagen-Gele aus Rattenschwanzkollagen an. Diese können ohne viel Aufwand hergestellt und unter sterilen Bedingungen inkubiert werden. Die Gele wurden über drei Wochen mit HGA- bzw. Hydrochinonhaltigem PBS im Brutschrank inkubiert. Einige Gele wurden zusätzlich mit Tyrosinase oder UVA-Strahlung behandelt. Aus zeitlichen Gründen (der langen Inkubationszeit) konnte dieses Experiment nur ein Mal durchgeführt werden.

Ziel dieses Experiments war es herauszufinden, ob

- a) Hydrochinon im Vergleich zu HGA, dazu in der Lage ist ochronotische Pigmente in den Kollagen-Fasern des Gels zu induzieren,
- b) Unterschiede in der Qualität und Quantität der induzierten Pigmente durch den Einsatz von UV-Strahlung bzw. Tyrosinase zu erkennen sind.

Bei Betrachtung der Gele fiel zunächst auf, dass sich bei den höheren HGA- und Hydrochinon-Konzentrationen sowohl das Medium, als auch die Gele in ihrer Gesamtheit bräunlich verfärbt haben. Dies spricht zunächst dafür, dass die Fasern der Gele gegenüber dem oxidierten Polymeren der Wirkstoffe eine gewisse Bindungsaffinität aufweisen (siehe Abbildung 4.15. und Abbildung 4.16.).

Makroskopisch konnten vor allem in den Proben, die jeweils mit 5000 μM HGA bzw. Hydrochinon behandelt wurden, größere Pigmente mit bloßem Auge beobachtet werden. Obwohl die Gele erst nach 25 Tagen gewaschen und fotografiert wurden, war ein Teil dieser Pigmente bereits nach etwa 12 Tagen sichtbar (keine Abbildung hierzu vorhanden). In den Proben, die mit 0, 50 μM und 500 μM Wirkstoff behandelt wurden, konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt Pigmente beobachtet werden. Besonders bei Hydrochinon fällt auf, dass die zuvor beschriebenen, makroskopischen Pigmente in den bestrahlten Gelen etwas dunkler zu sein scheinen (siehe Abbildung 4.14.). Das erkennbare Pigment des HGA behandelten, bestrahlten Gels ist im Vergleich zu den Pigmenten im unbestrahlten Gel deutlich

größer. Die Gele, die mit Wirkstoff und Tyrosinase inkubiert wurden, unterscheiden sich in dieser Hinsicht kaum von den Gelen, die nur mit Wirkstoff behandelt wurden.

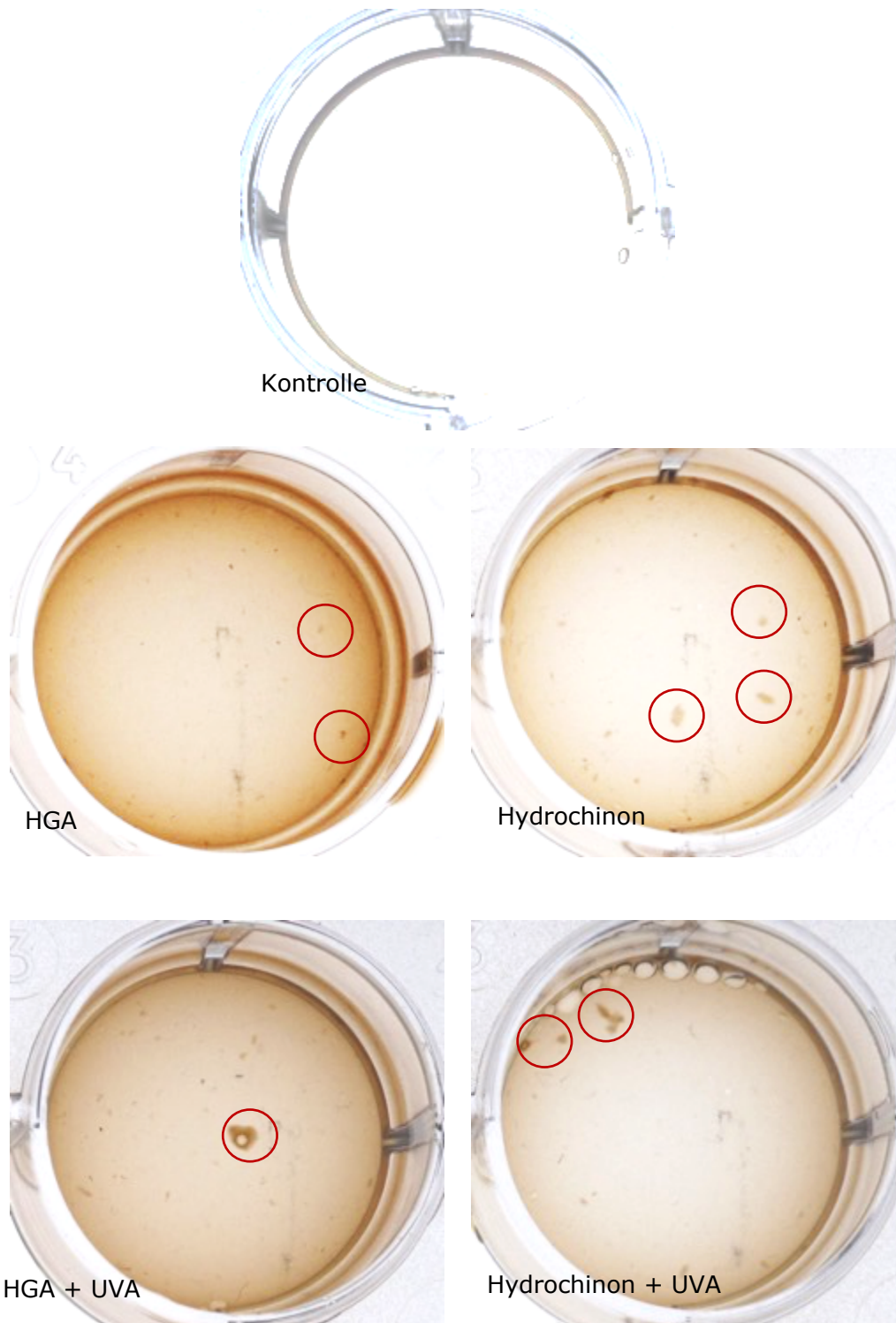




Abbildung 4.14. Makroskopische Pigmente in Kollagen-Gelen

Vergrößerungen der Gele, die nicht oder mit jeweils 5000 μM HGA bzw. Hydrochinon behandelt wurden. In Rot eingekreist sind Pigmente im Kollagen-Gel zu erkennen. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera über einem Leuchttisch aufgenommen.

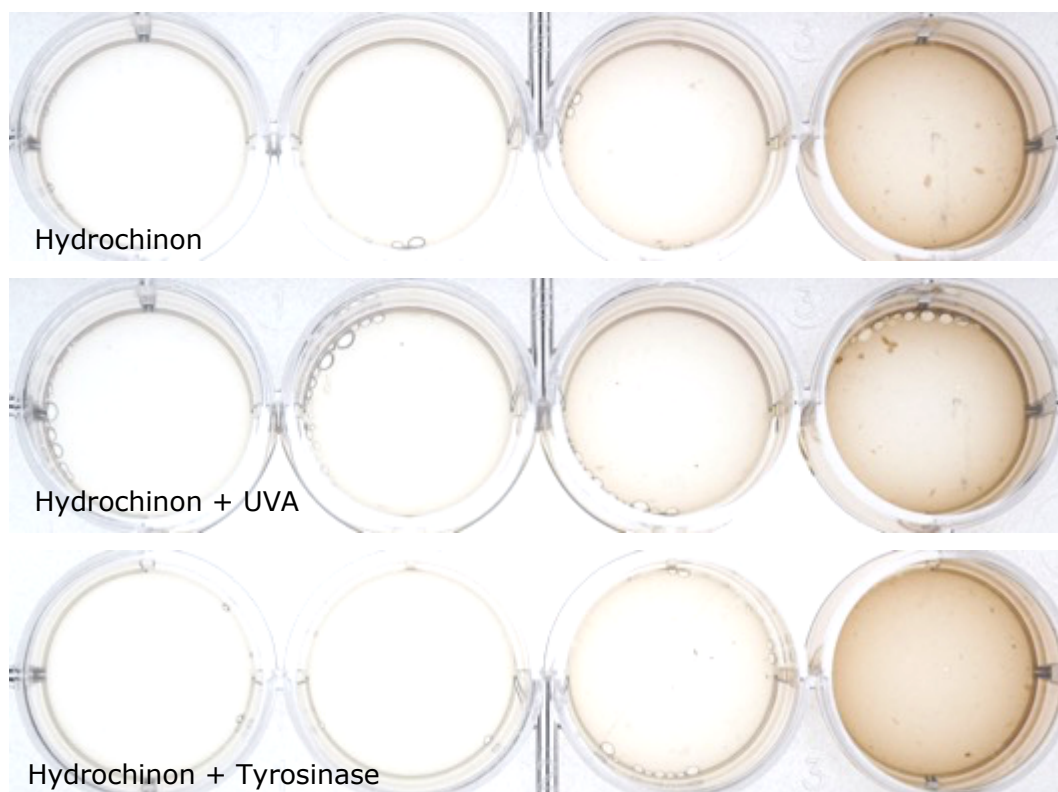


Abbildung 4.15. Kollagen-Gele mit Hydrochinon-haltigem Medium

Kollagengele nach 25 Tagen Inkubation mit Hydrochinon (**Oben**) Hydrochinon + UVA (**Mitte**) und Hydrochinon + Tyrosinase (**Unten**). Es wurden Konzentrationen von 0, 50, 500 und 5000 μM (von links nach rechts) eingesetzt. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera über einem Leuchttisch aufgenommen.

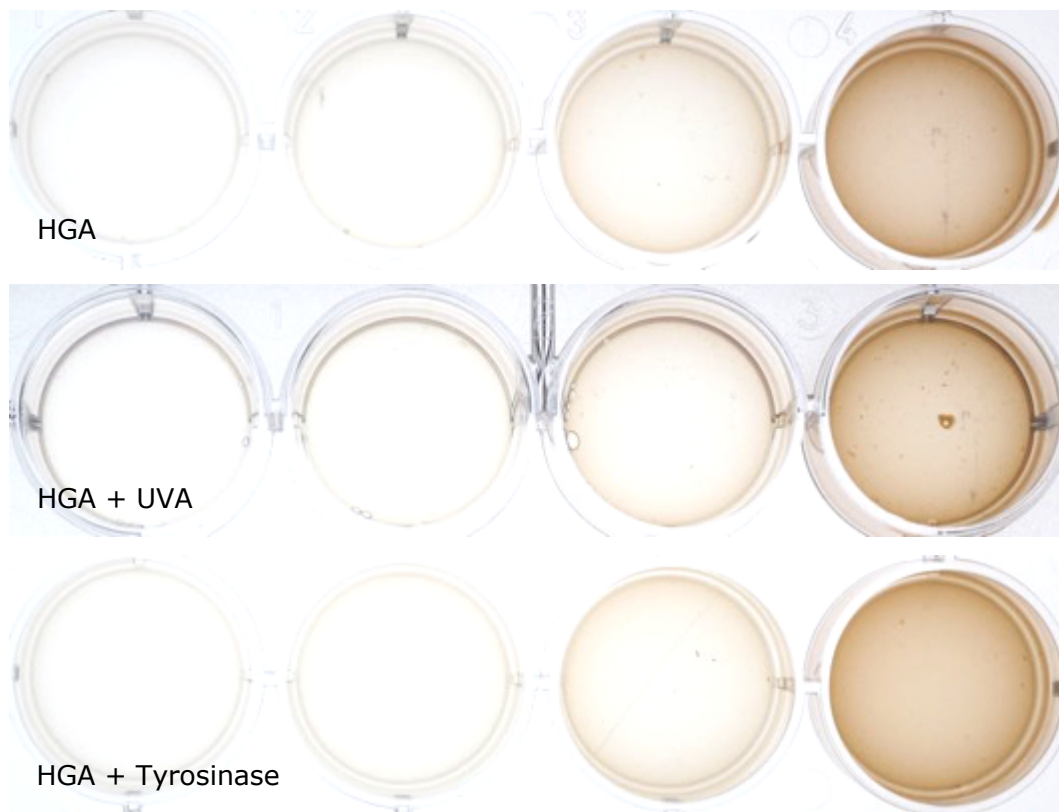


Abbildung 4.16. Kollagen-Gele mit HGA-haltigem Medium

Kollagengele nach 25 Tagen Inkubation mit HGA (**Oben**) HGA + UVA (**Mitte**) und HGA + Tyrosinase (**Unten**). Es wurden Konzentrationen von 0, 50, 500 und 5000 μM (von links nach rechts) eingesetzt. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera über einem Leuchttisch aufgenommen.

Mikroskopisch sind andere Pigmente zu erkennen, die mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind, jedoch den ochronotischen Pigmenten der histologischen Schnitte von Hydrochinon behandelte Haut relativ ähnlich sehen (siehe Abbildung 4.17.). Diese Pigmente treten in diesem *in vitro* Versuch eher unregelmäßig und vereinzelt auf. In Gelen, die mit mindestens 5000 μM Hydrochinon bzw. HGA behandelt wurden, konnten solche Pigmente in unterschiedlichen Formen nachgewiesen werden. Die HGA und Hydrochinon induzierten Pigmente ähneln sich dabei sehr stark im Erscheinungsbild. Alle Pigmente haben eine bräunliche Farbe und weisen zum Teil unscharfe, ausgefranste Konturen auf (siehe Abbildung 4.18.).

Die makroskopisch erkennbaren Pigmente unterscheiden sich unter dem Mikroskop von den mikroskopisch sichtbaren Pigmenten (siehe Abbildung 4.19.). Sie scheinen eine geringere Dichte zu haben und erstrecken sich über ein großes Areal statt einzelner Fasern. Zudem zeigen sie kaum Ähnlichkeiten zu den histologischen Befunden aus den Case Reports exogener Ochronose bzw. Alkaptonurie.

Hinsichtlich der Quantität der beobachteten Pigmentierungen, konnte zudem kein Unterschied zwischen den Gelen, die Tyrosinase oder UV-Strahlung ausgesetzt wurden und denen, die nur mit Wirkstoff allein behandelt wurden, festgestellt werden.

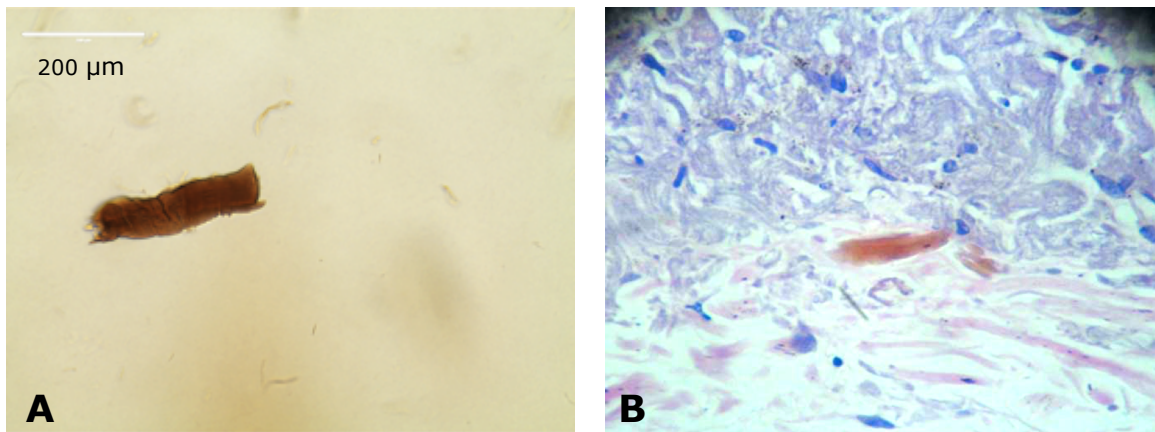
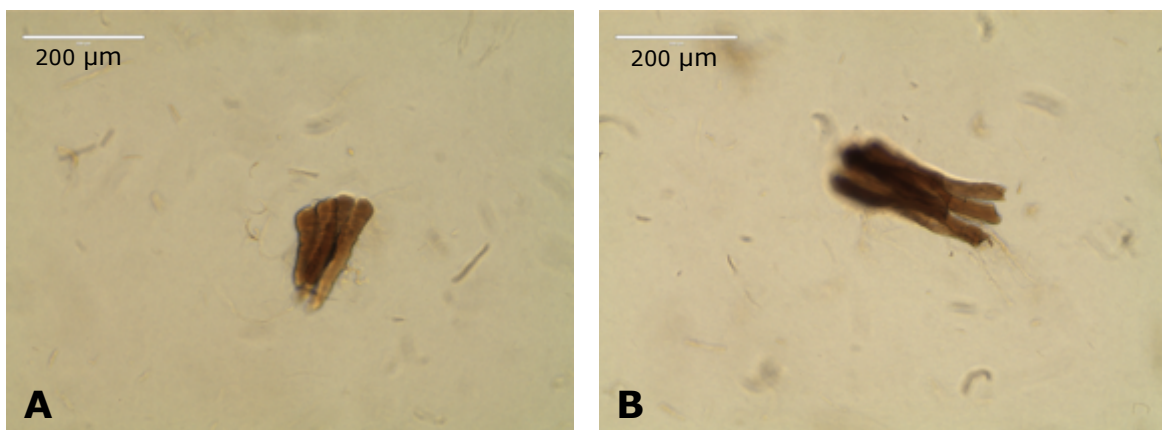


Abbildung 4.17. Vergleich ochronotischer Pigmente *in vitro* und *in vivo*

Dargestellt ist ein mikroskopisch erkennbares Pigment eines Gels (**A**), das über 25 Tage mit 5000 µM Hydrochinon inkubiert wurde. (Aufgenommen mit dem Evos XL bei 200facher Vergrößerung). Das Pigment ist länglich mit intensiver Braunfärbung. Im Vergleich dazu ist ein Hydrochinon induziertes ochronotisches Pigment (**B**) aus einem histologischen Schnitt zu sehen (Quelle: Martins *et al.*, 2012).



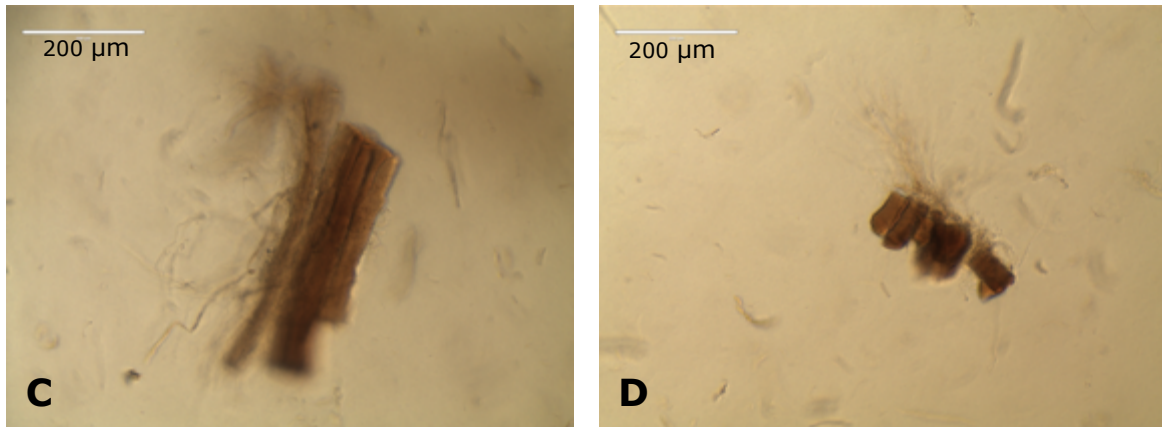


Abbildung 4.18. Mikroskopisch sichtbare Pigmente

Darstellung verschiedener mikroskopisch sichtbarer Pigmente, aufgenommen mit dem Evos XL bei 200facher Vergrößerung. Die Gele, in denen die Pigmente identifiziert wurden, sind mit 5000 µM HGA (**A, B**) und Hydrochinon (**C, D**) inkubiert worden.

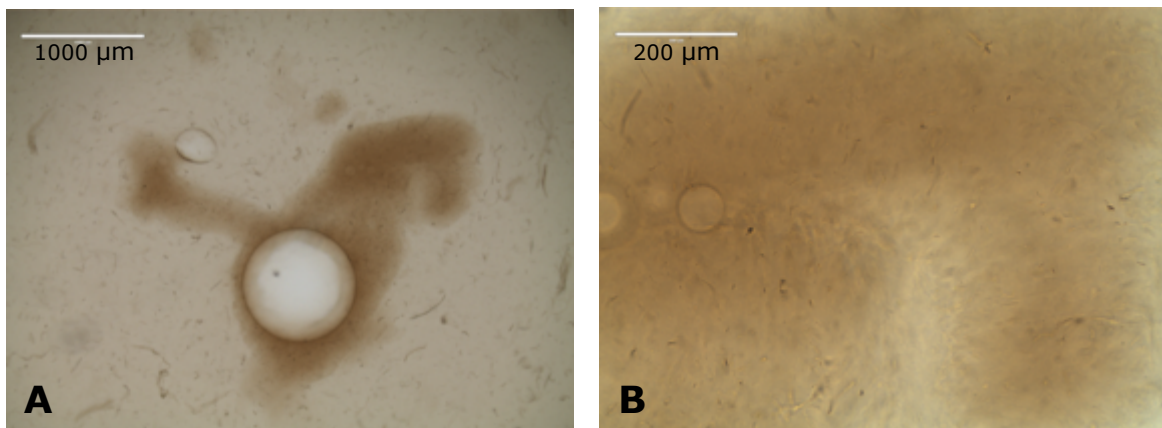


Abbildung 4.19. Makroskopisch sichtbare Pigmente bei 40facher und 200facher Vergrößerung

Dargestellt ist ein makroskopisches Pigment bei 40facher (**A**) und 200facher Vergrößerung (**B**). Das Gel, auf dem sich das Pigment befindet wurde 25 Tage mit 5000 µM HGA inkubiert und alle drei Tage mit UVA bestrahlt. Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Evos XL.

5. Diskussion und Ausblick

Das Verständnis der Entstehung exogener Ochronose könnte für die Entwicklung neuer Whitening-Wirkstoffe, die chemische Ähnlichkeit zu Hydrochinon haben, von großer Bedeutung sein. Bisher gibt es jedoch keine veröffentlichten, experimentellen Untersuchungen zu diesem Mechanismus. Ziel dieser Arbeit war es daher einen Ansatz für die Erforschung des Mechanismus Hydrochinon induzierter exogener Ochronose zu erarbeiten.

Penneys These zur Entstehung exogener Ochronose durch Hydrochinon die besagt, dass Hydrochinon das Enzym HGD hemmt, wodurch es zur Entstehung ochronotischer Pigmente im Bindegewebe durch HGD kommt, konnte in dieser Arbeit widerlegt werden. Es war daher notwendig einen neuen Mechanismus zu unterbreiten, auf dessen Grundlage zielführende Experimente durchgeführt werden konnten. HGA und Hydrochinon induzieren ähnliche Pigmente und weisen zudem in ihrer chemischen Struktur starke Ähnlichkeiten auf. Es liegt somit nahe, dass die Induktion von Ochronose durch Hydrochinon einem ähnlichen Mechanismus unterliegt, wie die Induktion durch HGA, von dem man weiß, dass es direkt an Kollagen bindet.

Das Protokoll zu den Oxidationsversuchen hat prinzipiell funktioniert, da durch die Autooxidation von Hydrochinon ein charakteristischer Peak bei 246 nm zu erkennen war, während Hydrochinon selbst einen Peak bei 289 nm zeigt. Die gemessenen Absorptionsscans stimmen stark mit den Studien zur Oxidation von Hydrochinon in dem Paper von Cheng *et al.*, 2016 überein. Auch die Scans von HGD zeigen Übereinstimmung mit veröffentlichten Untersuchungen zur Entwicklung von BQA (Tokuhara *et al.*, 2018).

Die Analyse des Einflusses von UV-Strahlung und Tyrosinase hat gezeigt, dass Hydrochinon und HGA teilweise gleich aber auch sehr unterschiedlich auf die untersuchten Faktoren reagieren.

UVA-bedingte Effekte konnten bei Hydrochinon nur innerhalb der ersten Stunde bzw. nach der ersten Bestrahlungsdosis beobachtet werden. Dort konnte durch die Bestrahlung mehr Oxidationsprodukt gemessen werden als ohne. Bei HGA hingegen konnte nach jeder Bestrahlungseinheit eine reproduzierbare Abnahme und erneute Regeneration des Oxidationsproduktes beobachtet werden. Es scheint

daher so, als ob UVA-Strahlung BQ in ein anderes Produkt umwandelt, das bei 246 nm nicht mehr nachweisbar ist. Ohne Strahlung wird diese jedoch wieder zu BQ oxidiert, sodass nach einer langen Bestrahlungsfreien Einheit in bestrahlter und nicht bestrahlter Probe eine identische Menge Oxidationsprodukt vorliegt.

Im Vergleich dazu konnte Tyrosinase in Hydrochinon und HGA identische Effekte erzielen. Der Vergleich von Kontrolle und Tyrosin haltigen Proben hat gezeigt, dass durch die Anwesenheit von Tyrosinase innerhalb der beobachteten 24 h weniger Oxidationsprodukt nachweisbar ist. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die phenolischen Wirkstoffe als Substrat für die Tyrosinase wirken und in ein anderes Produkt umgewandelt werden, dass bei den charakteristischen Wellenlängen des Oxidationsproduktes nicht mehr messbar ist. Der Anstieg der Absorptionskurve ab 300 nm, der in den Tyrosinase-haltigen Proben beobachtet wurde, könnte durch die Tatsache begründet sein, dass BQ und BQA nur ein Zwischenprodukt der Autooxidation von Hydrochinon und HGA sind. Da im Verlauf der Reaktion optisch sichtbare und farbliche Polymere zu sehen sind, liegt die Vermutung nahe, dass diese in Form eines Peaks im VIS-Bereich zu messen sind.

Insgesamt ist zu erkennen, dass hinsichtlich der Tyrosinase, die dafür bekannt ist phenolische Stoffe zu oxidieren, bei beiden Wirkstoffen ein Effekt auf die Entwicklung des Oxidationsproduktes erzielt wurde. Dies kann auf ihre chemische Ähnlichkeit zurückzuführen sein, wenn davon ausgegangen wird, dass beide Stoffe an das aktive Zentrum des Enzyms binden können. Mann *et al.*, 2018 konnten bereits zeigen, dass Hydrochinon Tyrosinase inhibiert und somit in der Lage ist an das aktive Zentrum zu binden. Allerdings konnte erst bei einer Konzentration von 5000 μM eine Inhibition des Enzyms um 50 % festgestellt werden. In diesem Versuch konnten Effekte jedoch bereits bei 250 μM beobachtet werden. Es wäre möglich, dass in diesem Versuch geringere Konzentrationen ausreichen, da kein natürliches Substrat der Tyrosinase mit höherer Bindungsaffinität eingesetzt wurde und Hydrochinon nicht um die Bindungsplätze in der Tyrosinase konkurrieren musste.

Im Hinblick auf UVA-Strahlung reagieren beide Wirkstoffe jedoch vollkommen gegensätzlich, was darauf hindeutet, dass der Essigsäurerest, welcher die HGA vom Hydrochinon unterscheidet, einen Einfluss auf die UV-Absorption des Moleküls hat.

Der Versuch, das zellbasierte System zur Induktion von Ochronose von Tinti *et al.*, 2011 auf dermale Fibroblasten zu übertragen und zu replizieren, hat nicht die erwarteten Ergebnisse erbracht.

Mit dem Nachweis des Kollagens in den behandelten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Kollagensynthese in den HDF bereits nach 4 Tagen erfolgreich war, während die Sarkom-Zellen hingegen etwa 7 Tage brauchten, um signifikant nachweisbare Mengen Kollagen zu synthetisieren. Mit der verwendeten Methode konnte dennoch die von Pautke *et al.*, 2004 beschriebene, natürliche Kollagensynthese der Sarkom-Zelllinien, nicht nachgewiesen werden, da auch die angefärbten Kontrollen dieser Zelllinien kein Kollagen aufwiesen (Daten im Anhang, siehe Abschnitt 8.1.).

Ausgehend von der Datenlage aus den Kollagen-Vorversuchen wurde zunächst eine Inkubationsdauer mit AA2P von 4 Tagen gewählt, da bei dem verwendeten HDF Spendern bereits nach dieser Zeit signifikante Mengen Kollagen nachgewiesen wurden.

Die Inkubation der Zellen über 4 Tage mit AA2P und anschließender Inkubation mit HGA über 10 Tage brachte keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tinti *et al.*, 2011. Weder in den Sarkom-Zelllinien, noch in den HDF konnte Ochronose eindeutig induziert und nachgewiesen werden.

Zu erwarten wäre die Abbildung von tiefblau angefärbten Pigmenten, die sich deutlich von den rot angefärbten Zellkernen absetzen, wie es bei Tinti *et al.*, 2011 zu sehen ist. Weder in den Sarkom-Zelllinien, noch in den HDF konnten solche Pigmente in Abhängigkeit der angewendeten HGA-Konzentration identifiziert werden. Zu sehen waren jedoch einige Artefakte, die sowohl in unbehandelten, als auch behandelten Proben vorkamen. Die größte Limitation dieses Versuches stellte dabei die unspezifische Reduktion des Kaliumhexacyanidoferrats dar. Dies konnte vor allem dadurch gezeigt werden, dass bereits extrazelluläre Matrixkomponenten eine leicht reduzierende Wirkung auf das Schmorl-Reagenz hatten.

Auch konnte ausgeschlossen werden, dass ein Mangel an Kollagen als Angriffsfläche für HGA ein Grund für das Ausbleiben ochronotischer Pigmente ist, da auch eine längere Vorinkubation mit Vitamin C keine eindeutigeren Ergebnisse erbrachte.

Eine Kontrollfärbung von Melanozyten hat hingegen zeigt, dass das angewendete Protokoll prinzipiell funktioniert. Das bräunliche Melanin, welches ohne Färbung nur schwach zu erkennen ist, wird durch die Färbung deutlich sichtbar gemacht.

Auch wird ersichtlich wie sehr der Kontrast durch die Anfärbung angehoben wird. Die Stärke des Kontrastes, wie sie mit dem Melanin in den Melanozyten erzielt wurde, konnte weder in den Fibroblasten, noch in den Sarkom-Zellen beobachtet werden. Weitere Versuche mit Hydrochinon wurden daher eingestellt.

Dieses System wurde zum einen durch die geringe Spezifität der Färbung und zum anderen durch die starke Einschränkung der Wirkstoff-Konzentrationen im Hinblick auf die Zellviabilität limitiert. Der Einsatz eines Systems, welches nicht von Zellaktivität abhängig ist und durch den Einsatz hoher Wirkstoff-Konzentrationen keine Anfärbung benötigt, war hier von großem Vorteil.

Kollagen-Gele waren sehr einfach in der Herstellung und konnten mit sehr viel höheren HGA- und Hydrochinon-Konzentrationen behandelt werden, als im zellbasierten System. Da die Anzahl und Intensität der Pigmente sehr wahrscheinlich von der Quantität des Wirkstoffes und deren Polymere abhängig sind, wurde hier eher von einer erfolgreichen Induktion ochronotischer Pigmente ausgegangen.

In den Gelen konnten nach 25 Tagen Inkubation mit HGA bzw. Hydrochinon bei einer Konzentration von 5000 μM makroskopisch und mikroskopisch sichtbare Pigmente beobachtet werden.

Bei Betrachtung der makroskopischen Pigmente fällt auf, dass die Pigmente in den Gelen, die mit UVA bestrahlt wurden, teilweise dunkler oder größer zu sein schienen. Ein Vergleich dieser Befunde mit den parallel gelaufenen Oxidationsversuchen (siehe Abschnitt 4.2.) sind hier irrelevant, da gezeigt werden konnte, dass UVA bedingte Effekte nur innerhalb weniger Stunden zu sehen sind und die Gele jedoch nur alle drei Tage bestrahlt wurden. Hinsichtlich der Quantität gibt es keine Unterschiede. Einen sichtbaren Unterschied zwischen Gelen, die mit und ohne Tyrosinase behandelt wurden, ließ sich nicht erkennen. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die Aktivität des Enzyms über den langen Inkubationszeitraum nicht aufrechterhalten werden konnte.

Die bedeutenderen Pigmente sind nur unter dem Mikroskop sichtbar. Hier wird deutlich, dass Hydrochinon und HGA in diesem Versuch in der Lage waren, sich in den Kollagen-Fasern des Gels zu manifestieren. Die mikroskopisch erkennbaren Pigmente haben eine deutliche Ähnlichkeit zu den histologischen Befunden der endogenen und exogenen Ochronose. Ähnlich wie in den Case Reports beschrieben, sind die Pigmente bananenförmig (Bhattar *et al.*, 2015) oder Konfetti-ähnlich (Simmons *et al.*, 2015) im Gel zu vorzufinden. Das

Erscheinungsbild der einzelnen betroffenen Fasern passt mit den Beschreibungen von Findlay, Morrison und Simson 1975 zusammen, die ihre *in vivo* Befunde als unregelmäßige und zerfranste ochronotische Einlagerungen beschrieben. Auch sind HGA- und Hydrochinon induzierte Pigmente, wie es *in vivo* der Fall ist, optisch nicht zu unterscheiden. Bezüglich der Quantität und Qualität der mikroskopischen Pigmente, können zwischen den UVA-bestrahlten, unbestrahlten und mit Tyrosinase behandelten Gelen keine markanten Unterschiede festgestellt werden. Das Problem an diesem Versuch war vor allem die Tatsache, dass aufgrund der begrenzten Zeit und der langen Inkubationszeit der Gele nur ein Experiment durchgeführt werden konnte und eine Replikation der Ergebnisse deswegen nicht möglich war. Zudem konnte nur bei der höchsten angewendeten Konzentration Ochronose-ähnliche Pigmente beobachtet werden, die zudem in dem Gel nur vereinzelt auftraten.

Im Hinblick auf das primäre Ziel, der Erarbeitung eines Ansatzes zur Untersuchung des Mechanismus exogener Ochronose, konnte diese Arbeit mehrere Ansätze bieten, auf dessen Grundlage ein Fortschreiten der Untersuchungen zur Entwicklung exogener Ochronose möglich ist. Dafür ist es jedoch notwendig eine Vielzahl an Verbesserungen und Weiterentwicklungen der erarbeiteten Protokolle vorzunehmen.

Die dargestellten Experimente mit Rattenschwanzkollagen konnten eine Idee dafür vermitteln, dass Hydrochinon das Potential hat *in vitro* an Kollagen zu binden und Ochronose-ähnliche Pigmente zu induzieren. Der Versuch müsste jedoch repliziert werden, um diese Vermutung zu stützen. Außerdem sollten höhere Konzentrationen an Hydrochinon eingesetzt werden, sodass dichter verteilte Pigmente entstehen und eventuell ein Dosis-Effekt beobachtet werden kann. Im Hinblick auf den Zusammenhang der UVA- und Tyrosinase-bedingten Oxidation von Hydrochinon und der Induktion ochronotischer Pigmente in den Gelen konnte in dieser Arbeit keine Relation aufgezeigt werden.

Die katalytischen Effekte der UVA-Strahlung auf die Oxidation von Hydrochinon könnten eine Erklärung für die bevorzugte Entstehung exogener Ochronose in sonnenexponierten Arealen sein. Da vor allem UVA-induzierte Effekte nur innerhalb von 24 h zu beobachten sind, müsste die Bestrahlung und Hydrochinon-Zugabe in den Kollagen-Gelen jeden Tag wiederholt werden. Dies würde den

realistischen Bedingungen zudem näherkommen, da Hydrochinon haltige Cremes täglich appliziert werden und die Patienten oft täglich der Sonne ausgesetzt sind. Anders als erwartet, konnte Tyrosinase keinen relevanten Effekt erzielen. Eine regelmäßige Zugabe des frischen Enzyms könnte die Wahrscheinlichkeit vergrößern, signifikante Effekte zu beobachten. Innerhalb der photometrischen Oxidationsversuche hat das Enzym einen eindeutigen Einfluss auf die Oxidation von Hydrochinon und HGA. Es sollte die Entwicklung des Oxidationsproduktes zusätzlich im VIS-Bereich gemessen werden, da das Oxidationsprodukt in polymerisierter Form farbig wird, d.h. im sichtbaren Bereich absorbiert. Es ist aufzuklären, ob der BQ-Peak durch die Polymerisierung nach Zugabe von Tyrosinase innerhalb von 24 h in den VIS-Bereich verschoben wird.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

6.1. Fachliteratur

Adebajo, S. B. 2002. „An epidemiological survey of the use of cosmetic skin lightening cosmetics among traders in Lagos, Nigeria.“ *West African journal of medicine*.

Al-Sarayreh, S. A., I. N. Al-Tarawneh M. S. Al-Sbou, E. M. Albatayneh, J. M. Al-Shuneigat, und Y. M. Al-saraireh. 2014. „Measurements of Homogentisic Acid levels in Alkaptonuria Patients Using an Optimized and Validated Gas Chromatography Method/Mass Spectrometry.“ *Jordan Journal of Biological Sciences* 3(7); 195- 198.

Amaya, A. A., K. T. Brzezinski, N. Farrington, und G. R. Moran. 2004. „Kinetic analysis of human homogentisate 1,2-dioxygenase.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421; 135–142.

Anthony, E., A. W. Arnold, und J. S. Kern. 2018. „Bluish grey pigmentation.“ *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 16(9);1149-1151.

Arora, G., A. K. Harith M. N. Sodhi, und C. Kapoor. 2017. „A case of 'blue skin' and 'dark urine'.“ *Medical Journal Armed Forces India*.

Barconi, D., L. Milucci, G. Bernardini, und A. Santucci. 2015. „Oxidative Stress and mechanism of alkaptonuria .“ *Free Radical Biology and Medicine* 88; 70-80.

Barrandon, Y., und H. Green. 1987. „Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication.“ *Proceedings of the National Academy* 84(8);2302–2306.

Bhattar, Prachi A, Vijay P Zavar, Kiran V Godse, Sharmila P Patil, Nitin J Nadkarni, und Manjyot M Gautam. 2015. „Exogenous Ochronosis.“ *Indian Journal of Dermatology* 60(6); 537–543.

- Blay, Y. Amgborale. 2011. „Skin Bleaching and Global White Supremacy: By Way of Introduction.“ *The Journal of Pan African Studies*, 4(4); 4–46.
- Borovansky, J., und P. A. Riley. 2011. *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Structure, Physiological and Pathological Functions*. John Wiley & Sons.
- Bory, C., R. Boulieu, und C. Chantin. 1990. „Diagnosis of alcaptonuria: rapid analysis of homogentisic acid by HPLC.“ *Clinica Chimicu Actu* 189; 7-12.
- Boyera, N., I. Galey, und B. A. Bernard. 1998. „Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts.“ *International Journal of Cosmetic Science* 20; 151–158.
- Braconi, D., L. Millucci, G. Bernardini, und A. Santucci. 2015. „Oxidative stress and mechanisms of ochronosis in alkaptonuria.“ *Free Radical Biology and Medicine* 70-80.
- Charlín, R., C. B. Barcaui, B. K. Kac, D. Soares, R Rabello-Fonseca, und L. Azulay-Abulafia. 2008. „Hydroquinone- induced Exogenous Ochronosis: A resport of four cases and usefulness of dermoscopy.“ *International Journal of Dermatology* 47; 19- 23.
- Cheng, C., Y. Chan, Y. Tzou, K. Chen, und Y. Liu. 2016. „Spectroscopic Investigations of the Oxidative Polymerization of Hydroquinone in the Presence of Hexavalent Chromium.“ *Journal of Spectroscopy*.
- Colzato, L. S., L. Steenbergen, R. Sellaro, A. K. Stock, L. Arning, und C. Beste. 2016. „Effects of l-Tyrosine on working memory and inhibitory control are determined by DRD2 genotypes: A randomized controlled trial.“ *Cortex* 82;217-224.
- Craide, F. H., J. Fonseca, P. Mariano, N. Fernandez, C. Castro, und Y. Mene. 2014. „Alkaptonuria – Case report.“ *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(5); 799-801.

- Cullison, D., D. C. Abele, und J. L. O'Quinn. 1983. „Localized exogenous Ochronosis.“ *Journal of the American Acadamey of Dermatology* 8; 882-9.
- Dogliotti, M., und M. Leibowitz. 1979. „Granulomatous ochronosis – A cosmetic-induced skin disorder in blacks.“ *South African Medical Journal* 56; 757–60.
- Draelos, Z. D. 2006. „Topicals for Facial Hyperpigmentation.“ *Cosmetic Dermatology*.
- Draelos, Z. D., S. Raab, M. Yatskayer, und N. Chen. 2014. „A Method for Maintaining the Clinical Results of 4% Hydroquinone and 0.025% Tretinoin With a Cosmeceutical Formulation.“ *Journal of Drugs in Dermatology* 4; 386-90.
- Engasser, P. G. 1984. „Ochronosis caused by bleaching creams.“ *Journal of the American Academy of Dermatolofy* 10; 1072–3.
- Findlay, G. H., J. G. Morrison, und I. W. Simson. 1975. „Exogenous ochronosis and pigmented colloid milium from hydroquinone bleaching creams .“ *British Journal of Dermatology* 93; 613–22.
- Furlani, A., M.V. Russo, und F. Cataldo. 1989. „Oxidative polymerization of p-benzoquinone and hydroquinone. Conductivity of doped and undoped polymerization products.“ *Synthetic Metals* 29(1); 507-510.
- Gallagher, J. A., J. P. Dillon, N. Sireau, O. Timmis, und L. R. Ranganath. 2016. „Alkaptonuria: An example of a “fundamental disease”—A rare disease with important lessons for more common disorders.“ *Seminars in Cell & Developmental Biology* , 52; 53–57.
- Gallagher, J.A, L. R. Ranganath, und A. Zatkova. 2013. „Alkaptonuria.“ In *Brenner’s Encyclopedia of Genetics*, von Stanley Maloy und Kelly Hughes, 71-75. San Diego: Academic Press.

- Hall, R. E. 2008. *Racism in the 21st Century: An Empirical Analysis of Skin Color*. New York: Springer Science and Business Media.
- Helliwell, T. R., J. A. Gallagher, und L. Ranganath. 2008. „Alkaptonuria – a review of surgical and autopsy pathology.“ *Histopathology* 53; 503- 512.
- Hull, P. R., und Peter Robert Procter. 1990. „The melanocyte: An essential link in hydroquinoneinduced ochronosis.“ *Journal of the American Academy of Dermatology* 22 (3); 529- 531.
- Jordaan, H. F., und D. J. Van Niekerk. 1991. „Transepidermal elimination in exogenous ochronosis. A report of two cases.“ *American Journal of Dermatopathology* 13; 418 -424.
- Knox, E., und S. W. Edwards. 1954. „Homogentisate Oxidase of Liver.“ *Journal of Biological Chemistry*, 216; 479-488.
- Lavker, R. M., und T. T. Sun. 1982. „Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations.“ *Science (NewYork,N.Y.)* 215 (4537); 1239–1241.
- Lutz, V. Sattler, M., S. Gallinat, H. Wenck, R. Poertner, und F. Fischer. 2012. „Impact of collagen crosslinking on the second harmonic generation signal and the fluorescence lifetime of collagen autofluorescence.“ *Skin Research and Technology*, 18(2); 168-79.
- Madkour, T. M. 1997. „Chemistry of Polymerization Products of p-Benzoquinone. C NMR and Molecular Dynamics Study.“ *Polymer Journal* 29(8); 670-677.
- Mann, T., W. Gerwat, J. Batzer, K. Eggers, C. Scherner, H. Wenck, F. Stäb, V. J. Hearing, Kl. Röhm, und L. Kolbe. 2018. „Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase.“ *Journal of Investigative Dermatology*.

- Martin, J. P, und B. Batkoff. 1987. „Homogentisic acid autoxidation and oxygen radical generation: implications for the etiology of alkaptonuric arthritis.“ *Free Radical Biology & Medicine*, 3(4); 241-50.
- Martins, Vi., A. Sousa, N. Portela, C. Tigre, F. Gonçalves, und R. Castro. 2012. „Exogenous ochronosis: case report and literature review.“ *Anais Brasileiros de Dermatologia* 87(4);633-6.
- Mendoza, R. L. 2015. „A Game-Theoretic Model of Marketing Skin.“ *Health Marketing Quarterly*, 32(4); 367-381.
- Milch, R. A. 1961. „Studies of Alcaptonuria : Binding of Homogentisic Acid Solutions to Hide Powder Collagen.“ *Experimental Biology and Medicine* 106; 68-70.
- Mishra, S. N., . S. Dhurat, D. J. Deshpande, und C. S. Nayak. 2013. „Diagnostic utility of dermatoscopy in hydroquinone-induced exogenous ochronosis.“ *International Journal of Dermatology* 52; 413–417.
- Mistry, J. B., M. Bukhari, und A. M. Taylor. 2013. „Alkaptonuria.“ *Rare Diseases*.
- Moll, I. 2010. *Duale Reihe Dermatologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- O'Donoghue, M. N., Y. L. Lynfield, und V. Derbes. 1983. „Ochronosis due to hydroquinone.“ *Journal of the American Academy of Dermatology* 8; 123.
- Pautke, C., M. Schieker, T. Tischer, A. Kolk, P. Neth, W. Mutschler, und S. Milz. 2004. „Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts.“ *Anticancer Research* 24; 3743-3748.
- Peltzer, K. Pengpid, S. 2017. „Knowledge about, attitude toward, and practice of skin lightening products use and its social correlates among university students in five Association of Southeast Asian Nations (ASEAN) countries.“ *International Journal of Dermatology*, 56; 277–283.

- Penneys, N. S. 1985. „Ochronosislike pigmentation from hydroquinone bleaching creams.“ *Archives of Dermatology* 121; 1239- 40.
- Pinnell, S. R. 1982. „Regulation of Collagen Synthesis.“ *The Journal of Investigative Dermatology* 79; 73-76.
- Ribas J., Schettini A. P., und Cavalcante M. de S. 2010. „Exogenous ochronosis hydroquinone induced: a report of four cases.“ *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85(5);699–703.
- Roberts, N.B., S.A. Curtis, A.M. Milan, und L.R. Ranganath. 2015. „The Pigment in Alkaptonuria Relationship to Melanin and Other Coloured Substances: A Review of Metabolism, Composition and Chemical Analysis.“ *JIMD Reports*.
- Rusmadi, S., und S. Ismail. 2015. „Preliminary Study on the Skin Lightening Practice and Health Symptoms among Female Students in Malaysia.“ *Journal of Environmental and Public Health*.
- Schmidt, S. R., C. R. Müller, und W. Kress. 1995. „Murine liver homogentisate 1,2-dioxygenase Purification to homogeneity and novel biochemical properties.“ *European Journal of Biochemistry*, 228; 425-430.
- Schomburg D., Schomburg I. 2006. *Homogentisate 1,2-dioxygenase*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Sharma, S., und R. Rao. 2014. „Exogenous Ochronosis masquerading refractory melasma.“ *Our Dermatol Online*, 5(4); 398-400.
- Simmons, B. J., R. D. Griffith, F. N. Bray, L. A. Falto-Aizpurua, und K. Nouri. 2015. „Exogenous Ochronosis: A Comprehensive Review of the Diagnosis, Epidemiology, Causes, and Treatments.“ *American Journal of Clinical Dermatology* 16; 205–212.
- Sterry, W. 2011. *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Thieme Georg Verlag.

- Tate, S. A. 2015. *Skin Bleaching in Black Atlantic Zones- Shade Shifters*. Palgrave Macmillan.
- Taylor, A. M, V. Kammath, und A. Bleakley. 2016. „Tyrosinase, could it be a missing link in ochronosis in alkaptonuria?“ *Medical Hypotheses* 91; 77-80.
- Taylor, A.M., A.J. Preston, N.K. Paulk, H. Sutherland, C.M. Keenan, P.J.M. Wilson, B. Wlodarski. 2012. „Ochronosis in a murine model of alkaptonuria is synonymous to that in the human condition.“ *Osteoarthritis and Cartilage*, 20; 880-886.
- Thomas, M., J. Jebaraj, M. Thomas, und R. George. 2011. „Acral pigmentation in alkaptonuria resembling degenerative collagenous plaques of the hands: a report of five cases.“ *Journal of the American Academy of Dermatology* 65(2); 45-46.
- Tinti, L., A. M. Taylor, A. Santucci, und B. Wlodarski. 2011. „Development of an in vitro model to investigate joint ochronosis in alkaptonuria.“ *Rheumatology*, 50; 271–277.
- Tokuhara, Y., K. Shukuya, M. Tanaka, K. Sogabe, Y. Ejima, S. Hosokawa, H. Ohsaki. 2018. „Absorbance measurements of oxidation of homogentisic acid accelerated by the addition of alkaline solution with sodium hypochlorite pentahydrate.“ *Scientific Reports* 8:11364.
- Tse, T. W. 2010. „Hydroquinone for skin lightening: Safety profile, duration of use and when should we stop?“ *Journal of Dermatological Treatment*, 21; 272–275.
- Zannoni, V. G., J. G. Seegmiller, und B. N. La-Du. 1962. „Nature of the Defect in Alcaptonuria.“ *Nature* 193; 952–953.
- Zatkova, A. 2011. „An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU).“ *Journal of INherited Metabolic Disease* 34(6); 1127-36.

Zhang, A. J., Y. Guan, Z. Li, Y. Zhang, und J. Zhu. 2012. „Oxidative polymerization of hydroquinone using deoxycholic acid supramolecular template.“ *Science China Chemistry* 55; 830.

6.2. Internetquellen

ChemoMetec. n.d. *ChemoMetec.de*. Accessed Juli 12, 2018.
<https://chemometec.de/zellzaehlgeraete/nc-100-nucleocounter/>.

Human Metabolome Database (HMDB). n.d. Accessed Oktober 09, 2018.
<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000158>.

PubChem Open Chemistry Database. n.d. Accessed September 09, 2018.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-tyrosine#section=Top>.

The Genotype-Tissue Expression Portal. n.d. Accessed Oktober 09, 2018.
<https://gtexportal.org/home/>.

The Human Protein Atlas. n.d. Accessed Oktober 09, 2018.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000113924-HGD/tissue>.

Vercruyse, K. P., A. M. Taylor, and J. Knight. 2017. "Fe²⁺/H₂O₂-mediated oxidation of homogentisic acid indicates the production of ochronotic and non-ochronotic pigments. Implications in Alkaptonuria and beyond." *bioRxiv*. Accessed September 18, 2018. <https://doi.org/10.1101/223099>.

WHO. 2011. *Preventing disease through health environments: Mercury in skin lightening products*. Accessed Septmeber 06, 2018.
http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury_.

7. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Untersuchungen zum Mechanismus der exogenen Ochronose durch Hydrochinon*“ eigenständig, ohne unzulässige, fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Hamburg, den 21.11.18

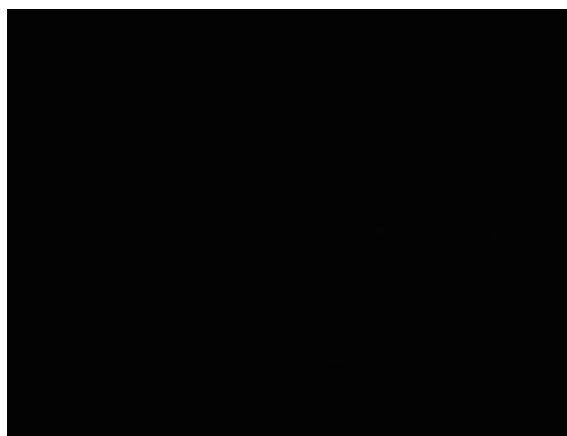
Maren Merten

8. Anhang

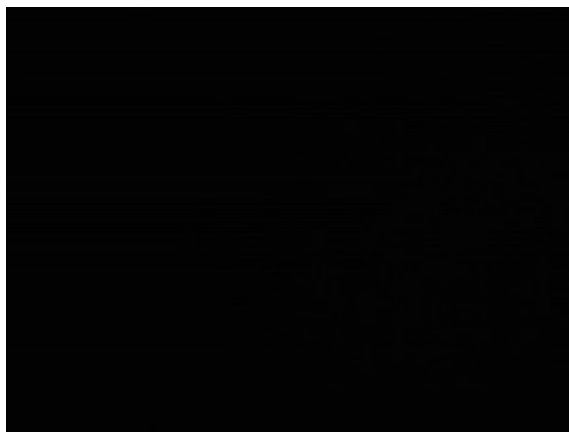
8.1. Induktion der Kollagensynthese in dermalen Fibroblasten und Sarkom-Zelllinien

- a) Induktion der Kollagensynthese mit 0,01 mM, 0,1 mM und 1mM AA2P (nach 3 und 7 Tagen Inkubationszeit). Alle Abbildungen wurden bei 200facher Vergrößerung aufgenommen.

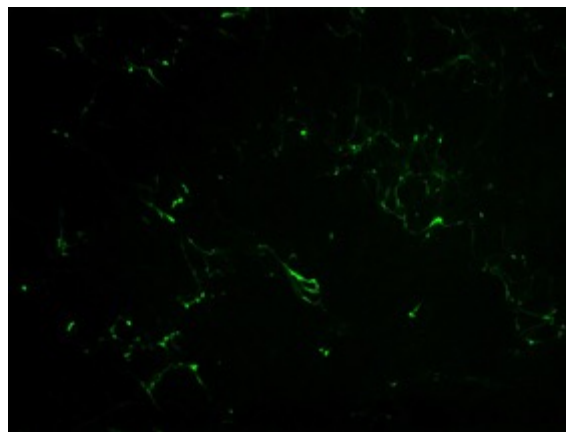
BDF049



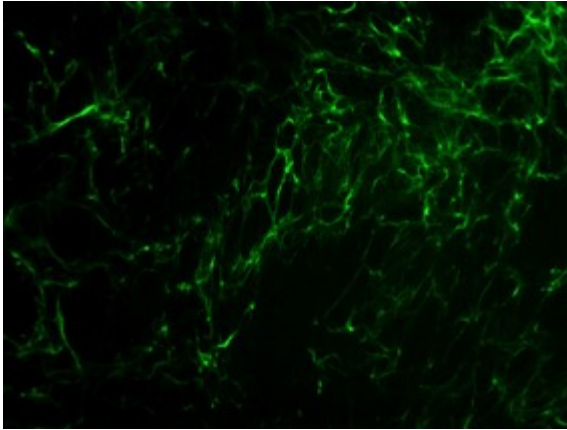
Kontrolle



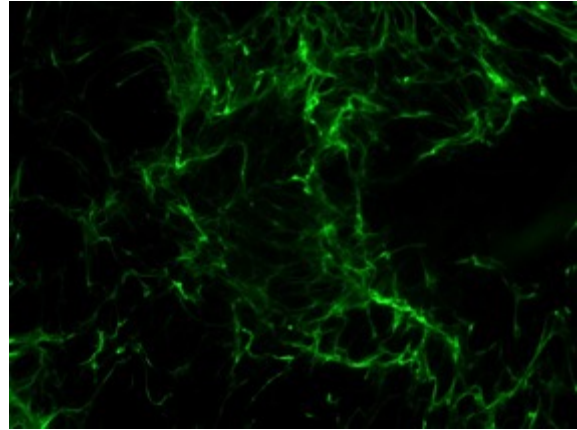
0,01 mM AA2P (3 Tage)



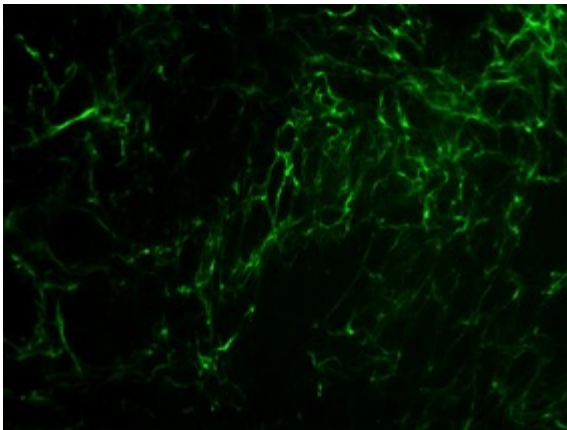
0,01 mM AA2P (7 Tage)



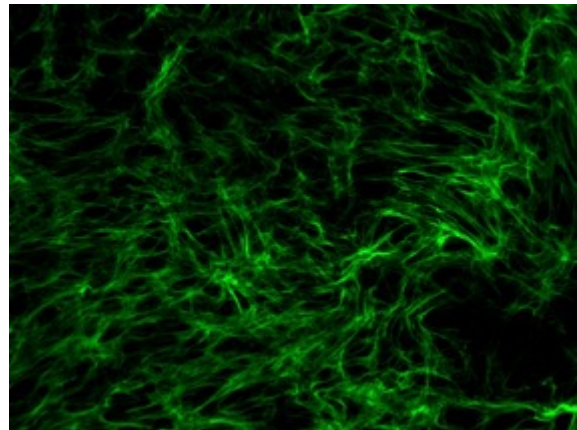
0,1 mM AA2P (3 Tage)



0,1 mM AA2P (7 Tage)



1 mM AA2P (3 Tage)



1 mM AA2P (7 Tage)

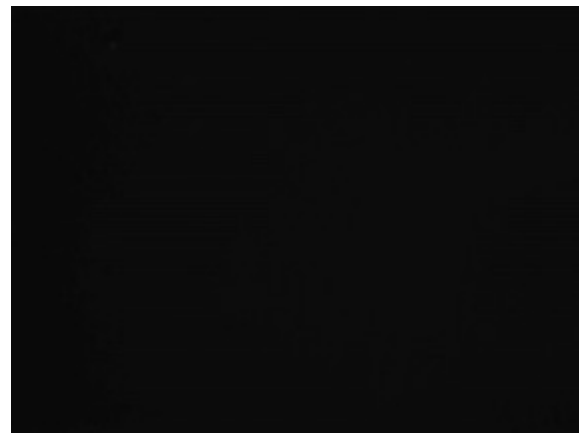
BDF077



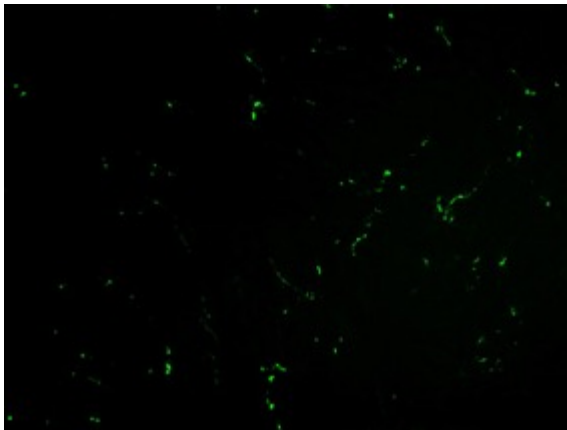
Kontrolle



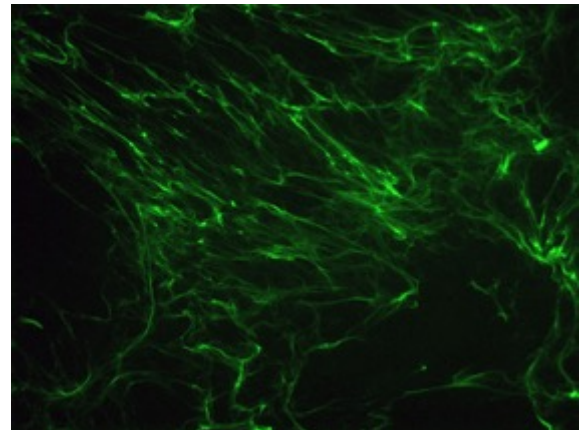
0,01 mM AA2P (3 Tage)



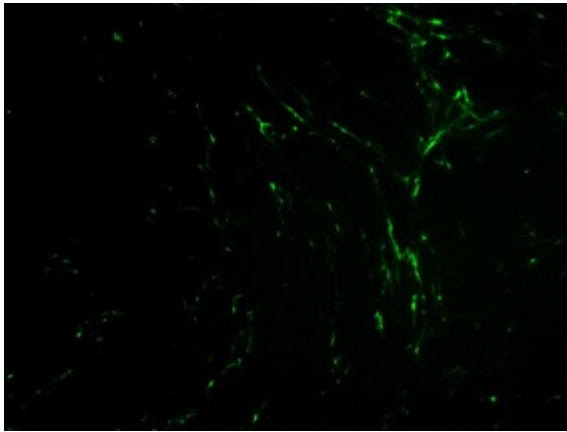
0,01 mM AA2P (7 Tage)



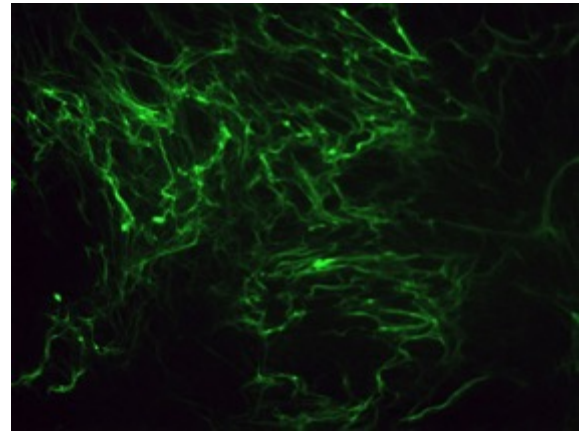
0,1 mM AA2P (3 Tage)



0,1 mM AA2P (7 Tage)

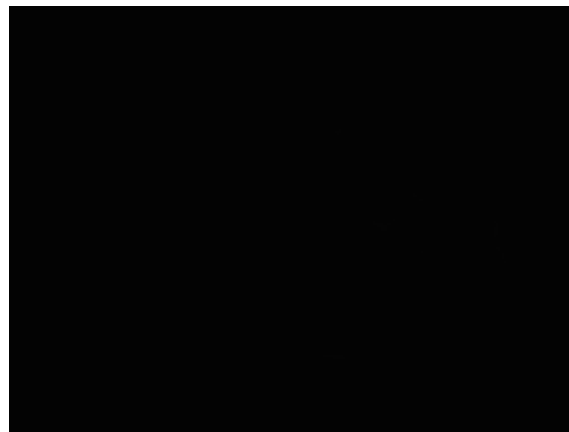


1 mM AA2P (3 Tage)

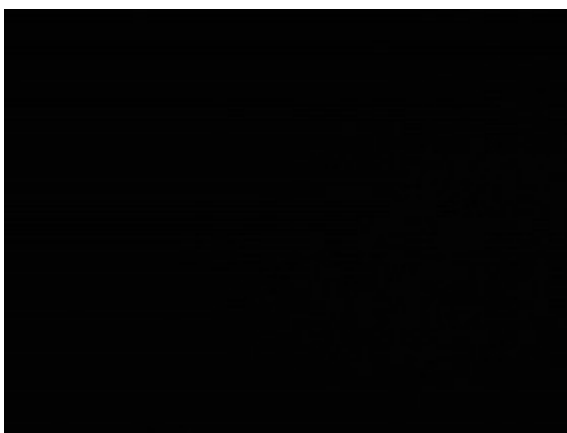


1 mM AA2P (7 Tage)

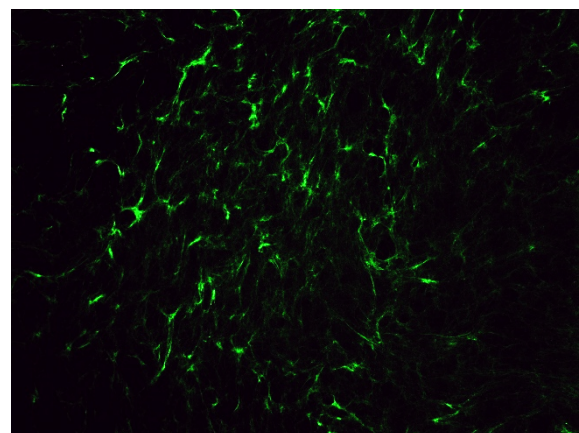
MG-63



Kontrolle



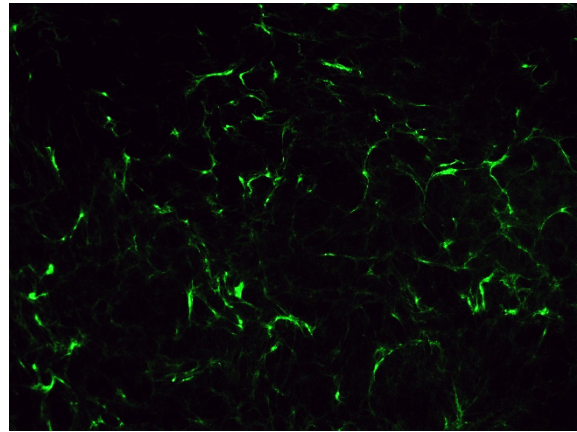
0,01 mM AA2P (3 Tage)



0,01 mM AA2P (7 Tage)



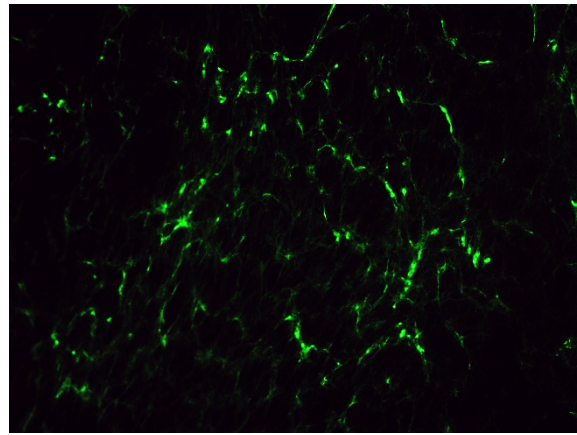
0,1 mM AA2P (3 Tage)



0,1 mM AA2P (7 Tage)



1 mM AA2P (3 Tage)



1 mM AA2P (7 Tage)

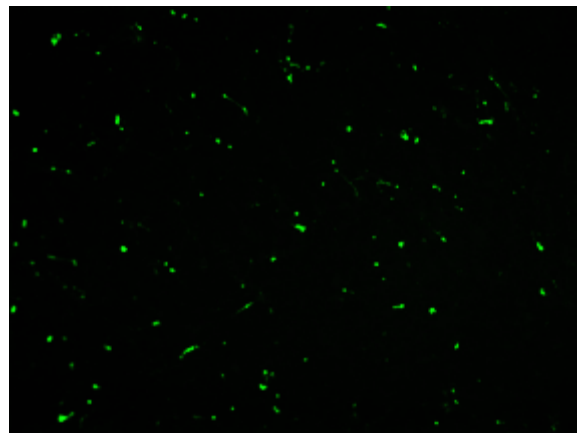
SaOS-2



Kontrolle



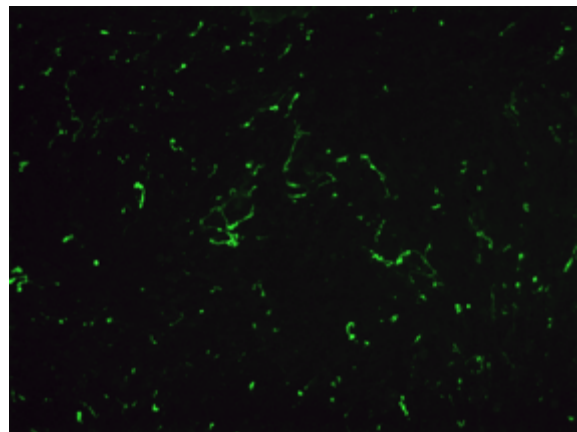
0,01 mM AA2P (3 Tage)



0,01 mM AA2P (7 Tage)



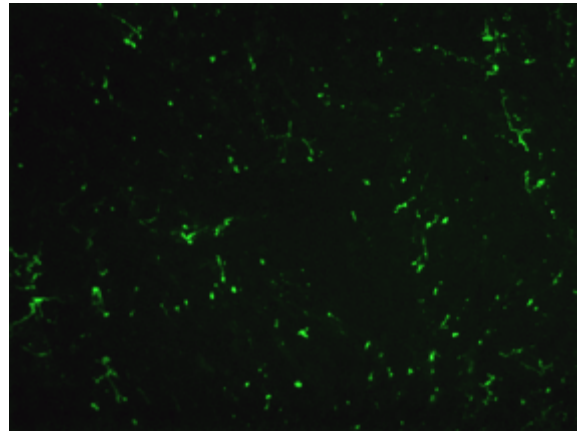
0,1 mM AA2P (3 Tage)



0,1 mM AA2P (7 Tage)



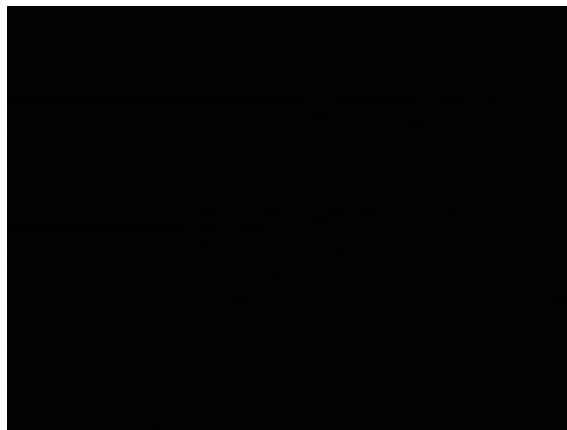
1 mM AA2P (3 Tage)



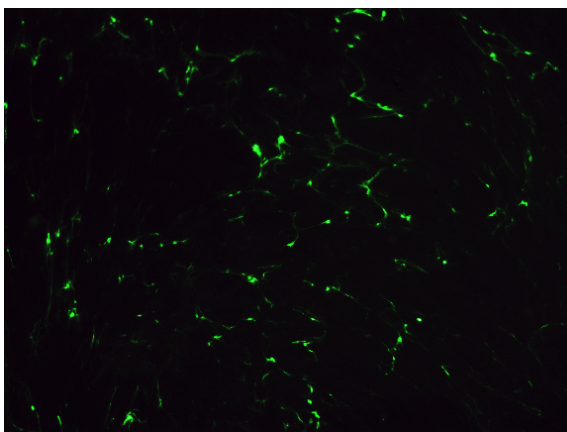
1 mM AA2P (7 Tage)

b) Induktion der Kollagensynthese zwischen 4 und 7 Tagen mit 1mM AA2P.
Alle Abbildungen wurden bei 200facher Vergrößerung aufgenommen.

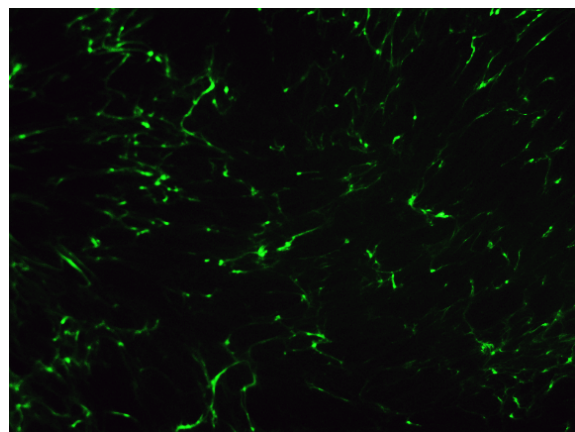
BDF049



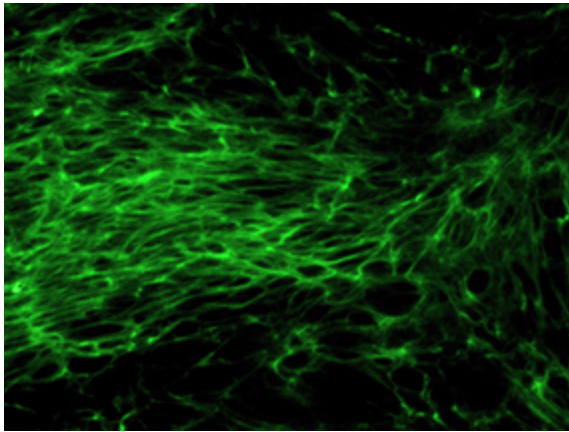
Kontrolle



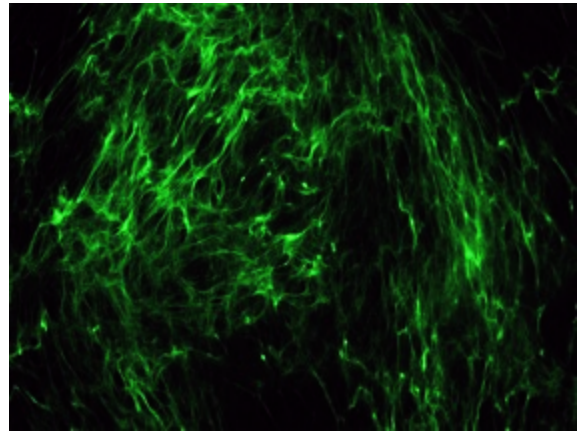
4 Tage



5 Tage

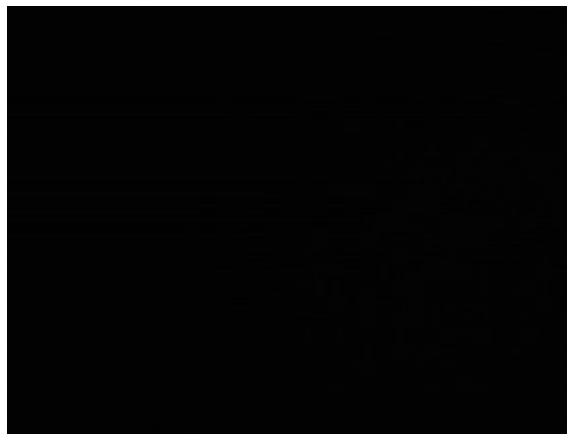


6 Tage

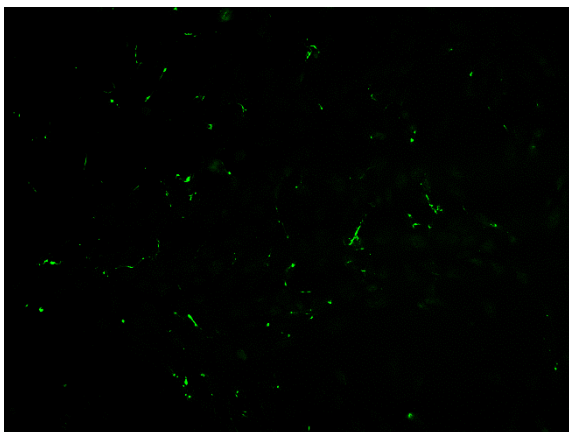


7 Tage

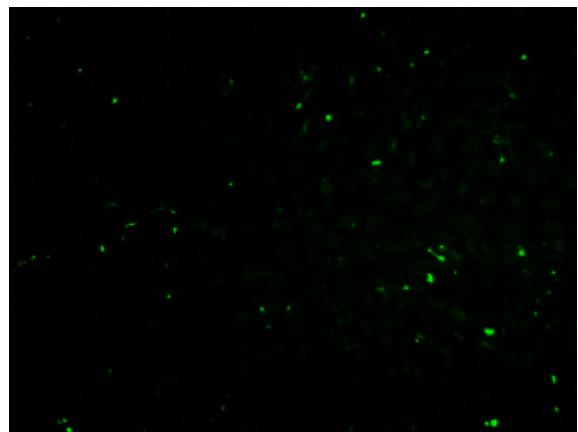
MG-63



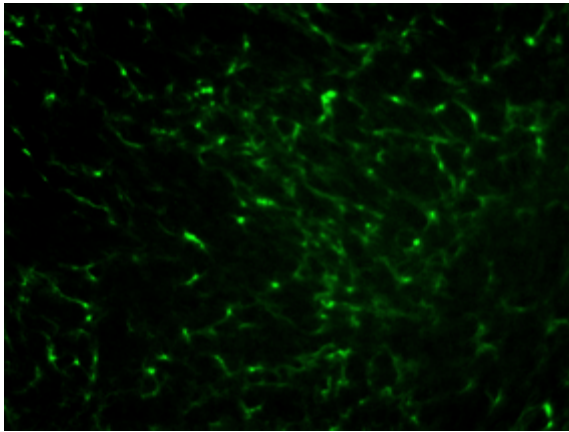
Kontrolle



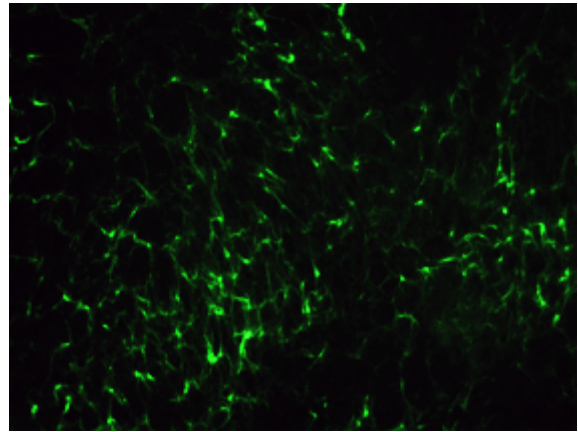
4 Tage



5 Tage

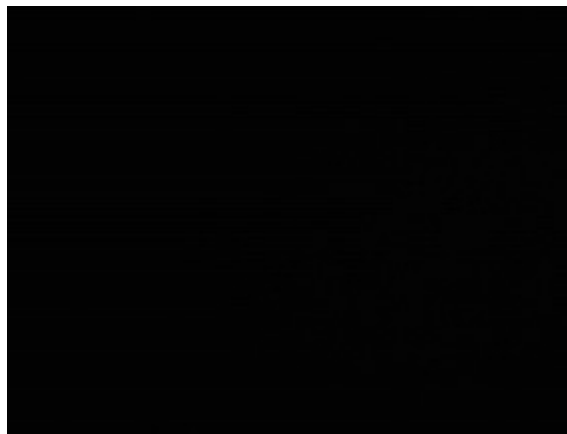


6 Tage

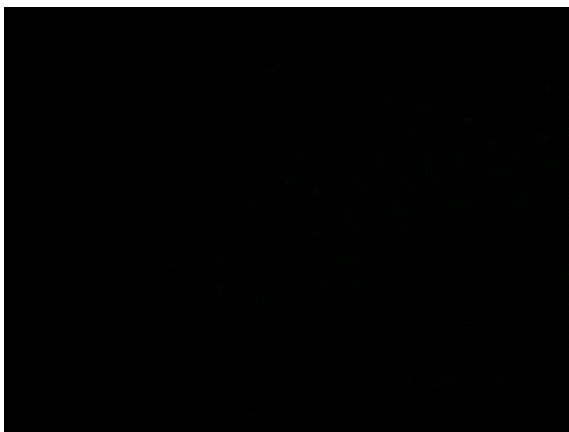


7 Tage

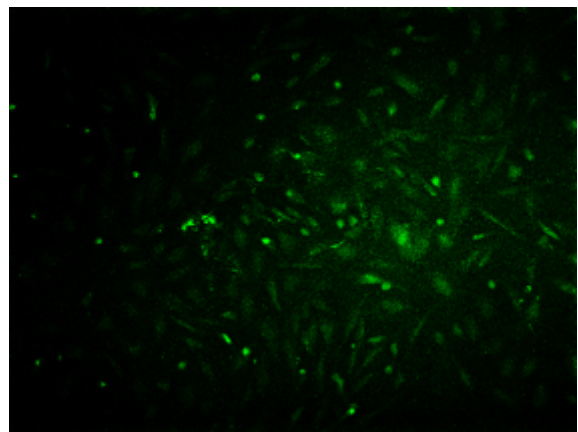
SaOS-2



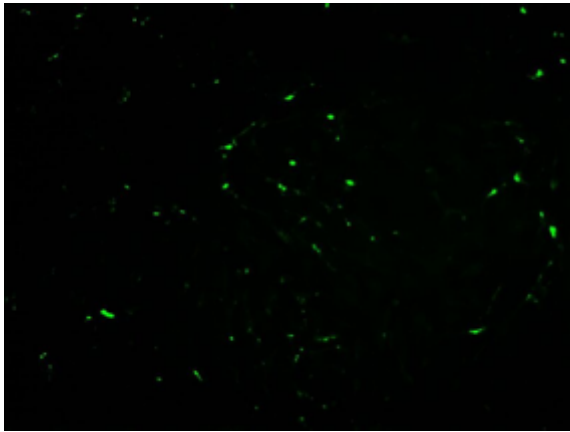
Kontrolle



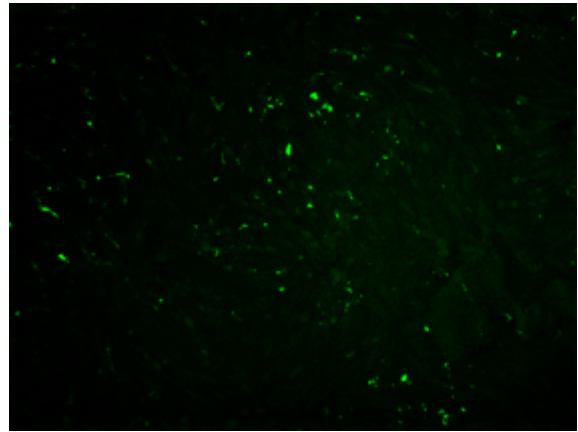
4 Tage



5 Tage



6 Tage



7 Tage

8.2. Einfluss von UV-Strahlung und Tyrosinase auf die Oxidation von Hydrochinon und HGA

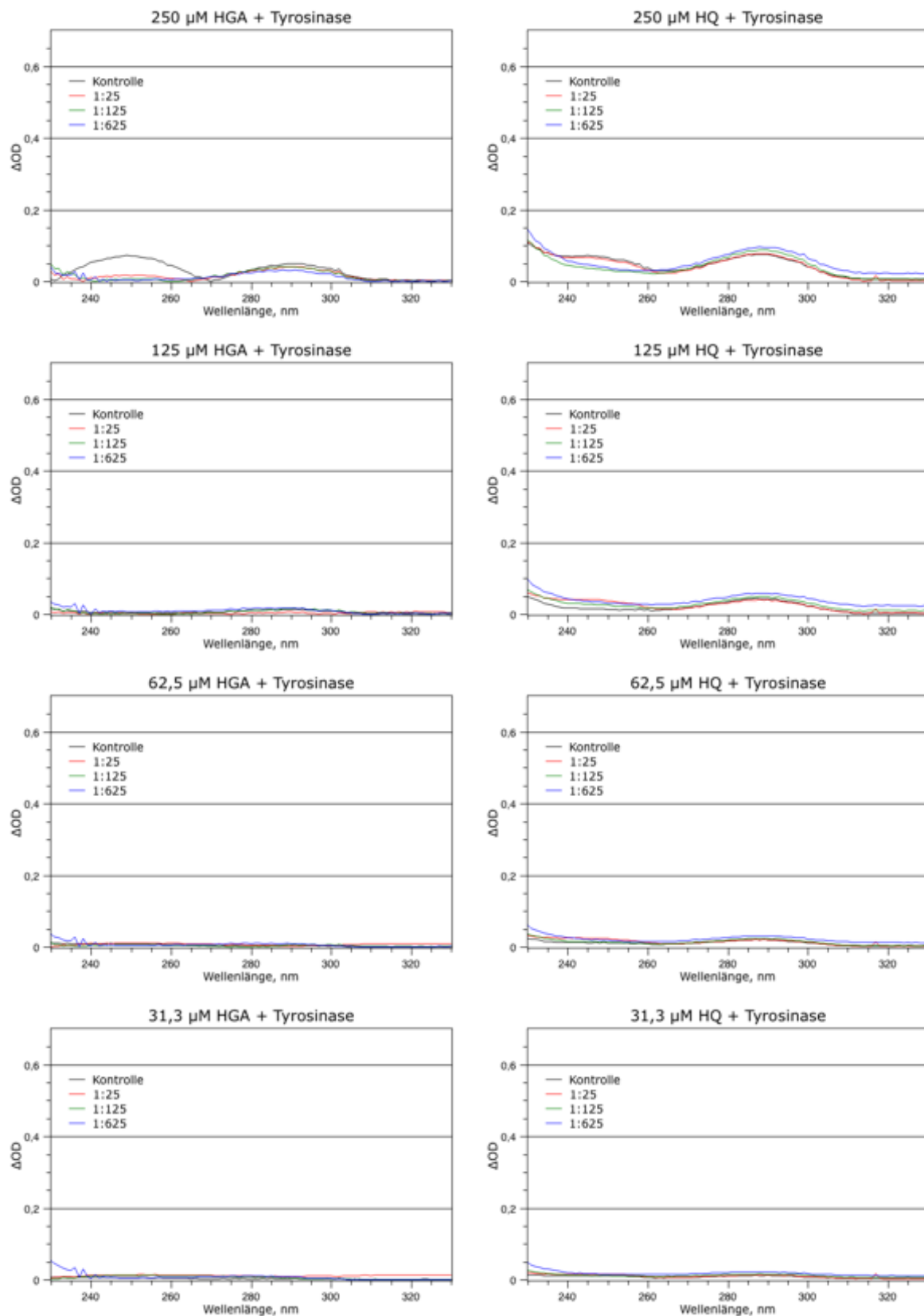


Abbildung 8.1.

Standardabweichungen der Messungen mit Tyrosinase

Tabelle 8.2. Absorptionswerte und Standardabweichungen der Kinetik der BQ- und BQA-Entwicklung mit und ohne UV-Bestrahlung

Zeit, h	Hydrochinon (246 nm)		HGA (249 nm)	
	mit UV	ohne UV	mit UV	ohne UV
0	0,095 ± 0,017	0,094 ± 0,008	0,097 ± 0,014	0,090 ± 0,009
1	0,254 ± 0,066	0,182 ± 0,040	0,201 ± 0,037	0,178 ± 0,036
2	0,286 ± 0,071	0,218 ± 0,045	0,269 ± 0,049	0,242 ± 0,037
3	0,320 ± 0,075	0,241 ± 0,047	0,177 ± 0,030	0,291 ± 0,051
4	0,339 ± 0,075	0,265 ± 0,050	0,251 ± 0,035	0,343 ± 0,054
5	0,364 ± 0,078	0,285 ± 0,049	0,187 ± 0,041	0,386 ± 0,062
6	0,381 ± 0,076	0,303 ± 0,049	0,263 ± 0,014	0,429 ± 0,009
24	0,465 ± 0,072	0,453 ± 0,041	0,746 ± 0,037	0,747 ± 0,036

Tabelle 8.3. Offset-bereinigte Absorptionswerte der Kinetik der BQ- und BQA-Entwicklung mit und ohne UV-Bestrahlung

Zeit, h	Hydrochinon (246 nm)		HGA (249 nm)	
	mit UV	ohne UV	mit UV	ohne UV
0	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,160	0,088	0,103	0,088
2	0,192	0,124	0,172	0,152
3	0,225	0,147	0,080	0,201
4	0,245	0,171	0,153	0,253
5	0,269	0,191	0,090	0,296
6	0,286	0,209	0,165	0,339
24	0,371	0,359	0,649	0,657