
Charakterisierung
fremdstoffmetabolisierender Enzyme in 3D-
Vollhautmodellen im Vergleich zu
Humanhaut *ex vivo*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
LISA GROHMANN
aus Berlin

Berlin, 2016

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Weindl

in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie
des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin im Zeitraum von Januar
2012 bis August 2015 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl
Institut für Pharmazie, Pharmakologie und Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber
Institut für Pharmazie, Pharmazeutische und Medizinische
Chemie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2+4
14195 Berlin

Tag der Disputation: 09. Mai 2016

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günther Weindl für die Vergabe dieses sehr interessanten Promotionsthemas sowie für seine kontinuierliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Egal ob meine Fragen inhaltlicher, laborpraktischer oder organisatorischer Natur waren, er nahm sich stets die Zeit für ein persönliches Gespräch. Bedanken möchte ich mich darüber hinaus für seine Unterstützung bei der Teilnahme und Präsentation meiner Forschungsergebnisse auf internationalen Konferenzen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wolber möchte ich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Auch bei Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting möchte ich mich für viele inhaltlich anregende Diskussionen im kleinen oder großen Kreis bedanken.

Ich danke Frau Prof. Dr. Maria Kristina Parr und Herrn Jan Joseph (Pharmazeutische Chemie) sowie Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann und Herrn Daniel Becker (Medizinische Chemie) herzlich für ihre Hilfe bei Analytik-Fragen sowie ihre aktive Unterstützung bei der Strukturaufklärung unerwarteter Reaktionsprodukte.

Unseren Kooperationspartnern Frau Prof. Dr. Nan Ma und Frau Ruth Hesse vom Institut für Biomaterialforschung (Biokompatibilität) des Helmholtz Zentrum Geesthacht in Teltow danke ich für die Durchführung der LDH-Quantifizierung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei unseren kooperierenden Arztpraxen sowie Herrn Dr. med. Uwe von Fritschen, Chefarzt der Klinik für Plastische und Ästhetische Chirurgie des HELIOS Klinikums Emil von Behring Berlin-Zehlendorf, für die Versorgung mit Hautbiopsien und spannende Einblicke in den OP-Alltag bedanken.

Der statistischen Beratungseinheit *fu:stat* der Freien Universität Berlin danke ich sehr für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst und der Frauenförderung der Freien Universität danke ich für die finanzielle Unterstützung bei verschiedenen Konferenzreisen.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Günther Weindl, Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting und Frau Prof. Dr. Sarah Hedtrich möchte ich

herzlich für die vielen hilfreichen Diskussionen sowie das angenehme Arbeitsklima danken. Hervorzuheben ist mein Dank insbesondere gegenüber:

- Nhung Do und Maja Natek für die Aufnahme in die Apfelgruppe und ein wunderbares erstes Promotionsjahr
- Lilli Löwenau für befruchtende Gespräche über BMBF-Belange oder auch alles andere während der gesamten Promotionszeit
- Leonie Wallmeyer für die stete Unterstützung beruflich wie privat, egal ob die Situation Grumpy Cat oder Korrekturlesen erforderte; egal ob morgens um 8 Uhr zur Klausuraufsicht oder während der Konferenz in Prag
- Gerrit Müller für die Bereitstellung gehegter und gepflegter MoLC und MoDC, seine reizende Assistenz bei der Lehre und die angenehme Atmosphäre während der gemeinsamen Konferenz-Reise nach Kiel
- Anna Löwa für ihre ansteckende Motivation und die Aufnahme im gemütlichen Kellerzimmer
- Stefan Hönzke für die geteilte Liebe zur HPLC

Auch außerhalb des Labors gibt es viele Menschen, die mich vor, während und sicherlich auch nach der Promotionszeit begleitet haben/begleiten werden und denen ich von ganzem Herzen an dieser Stelle danken möchte:

- meiner Familie Eva, André und Thomas Grohmann für ihre bedingungslose, immerwährende Unterstützung in allen Bereichen des Lebens, egal ob uns 20 km oder ein ganzer Ozean trennen
- Wasja Dücker für seine Liebe, Unterstützung und Geduld, wenn ich sie nicht habe
- Franziska Hendreschke für eine tiefe Verbundenheit seit Beginn unserer persönlichen Zeitrechnung und ihr immer offenes Ohr
- Carolin Mackowiak für wunderbare gemeinsame Stunden irgendwo in Europa oder im Wedding Kiez
- Steve Zacharias Martin für sein ansteckendes Lachen und seine Unterstützung und Beratung in naturwissenschaftlichen und allen anderen Fragen

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Haut	2
1.1.1 Aufbau der Haut	2
1.1.2 Barrierefunktion der Haut	4
1.1.3 Immunsystem der Haut	5
1.2 In vitro Hautmodelle als Alternative zum Tierversuch	7
1.3 Fremdstoffmetabolismus	9
1.3.1 Metabolismus	9
1.3.2 Reaktionen der Phase-I	10
1.3.3 Reaktionen der Phase-II	13
1.3.4 Biotransformation am Beispiel von 2,4-Diaminotoluol	17
1.4 Zielsetzung	21
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Verbrauchsmaterial	25
2.1.3 Chemikalien und andere Verbrauchslösungen	27
2.2 Zellkultur	30
2.2.1 Keratinozyten, Fibroblasten	30
2.2.2 HepG2	33
2.2.3 MoLC, MoDC	33
2.3 Exzidierte und rekonstruierte Humanhaut	36
2.3.1 Native Humanhaut <i>ex vivo</i>	36
2.3.2 Rekonstruierte 3D-Vollhautmodelle	36
2.4 Genexpression	37
2.4.1 RNA Isolation	37
2.4.2 cDNA Synthese	38
2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR	39
2.5 Proteinexpression	41
2.5.1 Probenvorbereitung	41
2.5.2 Bestimmung der Proteinmenge	41
2.5.3 SDS-PAGE	42
2.5.4 Western Blot	43

2.6 Enzymaktivität	45
2.6.1 MAO Assay.....	45
2.6.2 SULT Assay.....	46
2.6.3 GST Assay	48
2.7 Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT.....	49
2.7.1 Probenaufarbeitung	51
2.7.2 HPLC-Analytik	52
2.7.3 Inhibition der N-Acetyltransferase.....	53
2.7.4 Stabilität von 2,4-DAT	54
2.7.4.1 MPLC Analytik	54
2.7.4.2 NMR Analytik	55
2.7.4.3 LC-MS Analytik	55
2.7.5 Zytotoxizität	56
2.7.5.1 Bestimmung der Zellviabilität mit MTT-Test	56
2.7.5.2 Quantifizierung inflammatorischer Zytokine mit ELISA.....	57
2.7.5.3 Ermittlung des zytotoxischen Potentials durch LDH-Bestimmung...58	
2.8 Datenauswertung und Statistik	60
3. ERGEBNISSE	61
3.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzyme	61
3.1.1 Monoaminoxidasen	62
3.1.2 Steroid-5 α -Reduktasen	66
3.1.3 Sulfotransferasen.....	67
3.1.4 Glutathion-S-Transferasen.....	70
3.2 Entwicklung einer HPLC/UV-Detektion	72
3.2.1 Methodenentwicklung	72
3.2.2 Stabilität von 2,4-DAT und M1	76
3.3 Biotransformation von 2,4-DAT	79
3.3.1 Zytotoxizität von 2,4-DAT	79
3.3.2 Biotransformation von 2,4-DAT in Zellkulturen	81
3.3.3 Inhibition der N-Acetyltransferase.....	83
3.3.4 Biotransformation von 2,4-DAT in Vollhautmodellen	84
4. DISKUSSION.....	86
4.1 Biotransformationsreaktionen der Phase-II überwiegen beim Fremdstoffmetabolismus in der Haut.....	87
4.1.1 Phase-I-Oxidationen spielen in der Haut eine untergeordnete Rolle.....	87

4.1.2 Steroid-5 α -Reduktasen der Typen 1 und 3 dominieren in kutanen Geweben.....	89
4.1.3 Glutathion-S-Transferasen gehören zu den dominierenden Phase-II-Enzymen in der Haut.....	90
4.1.3.1 Die in der Leber für den Fremdstoffmetabolismus relevante SULT 1A1 spielt in kutanen Geweben keine Rolle.....	90
4.1.3.2 Für die Familie der GST wurden kaum Expressionsunterschiede in den untersuchten Geweben beobachtet.....	92
4.2 2,4-DAT eignet sich als Modellschubstanz zur Untersuchung des kutanen Phase-II-Fremdstoffmetabolismus	95
4.2.1 2,4-DAT wirkt nur in hohen Konzentrationen zytotoxisch.....	95
4.2.2 Die Instabilität von 2,4-DAT unter Versuchsbedingungen muss bei Beurteilung der Biotransformation berücksichtigt werden.....	96
4.2.3 Die N-Acetylierung dominiert bei der Biotransformation von 2,4-DAT in Hautgeweben.....	97
4.2.3.1 Unter Katalyse der N-Acetyltransferase entsteht nur ein monoacetylierter Metabolit.....	100
4.2.3.2 Die N-Acetylierung aromatischer Amine dient als Schutzmechanismus	101
4.3 Abschließende Beurteilung der 3D-Vollhautmodelle und Ausblick: Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT sind gute Modelle für den kutanen Fremdstoffmetabolismus	102
4.3.1 Die Expression verschiedener Enzyme ist in Phenion [®] FT, EpiDerm [™] FT und exzidierter Humanhaut ähnlich.....	102
4.3.2 Die dreidimensionale Struktur der RHS ist wichtig für die Beurteilung der Biotransformation <i>in vivo</i>	103
4.3.3 Ausblick: Möglichkeiten zur Optimierung von Vollhautmodellen.....	106
4.3.3.1 Die Expression von Enzymen kann spenderabhängig sein.....	106
4.3.3.2 Berücksichtigung weiterer Zelltypen, Hautstrukturen und erkrankter Haut	107
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	109
6. SUMMARY	111
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	113
8. LITERATUR	117
9. VERÖFFENTLICHUNGEN.....	128
10. LEBENS LAUF	130
11. EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	132

1. EINLEITUNG

Der menschliche Körper ist täglich einer Vielzahl von körperfremden Stoffen ausgesetzt, deren Aufnahme inhalativ, oral oder über Hautkontakt erfolgen kann. Der Hautkontakt spielt dabei eine sehr wichtige Rolle, da Fremdstoffe nicht nur in Kosmetikprodukten vorkommen, sondern auch in Produkten des täglichen Bedarfs Verwendung finden, wie zum Beispiel in Kleidung, Verpackungen oder Spielzeug. Durchdringen chemische Substanzen die Haut, können sie in der Haut selbst oder nach Eintritt in die Blutzirkulation in der Leber verstoffwechselt werden. Deshalb müssen nach gesetzlichen Regelungen alle Bedarfsgegenstände sowie Kosmetika oder Waschmittel auf ihre Unschädlichkeit hin getestet werden, bevor sie dem Verbraucher zur Verfügung gestellt werden können. Viele dieser Tests machen den Einsatz von Versuchstieren erforderlich [1]. Weiterhin stellt die seit 2007 geltende Chemikalienverordnung der Europäischen Union (EU) REACH (engl. *registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals*) im Sinne des Verbrauchers strenge Auflagen an die in der EU verwendeten Chemikalien. Dabei müssen auch Informationen bezüglich deren Reizungs- und Sensibilisierungspotentials, Mutagenität oder akuter Toxizität vorliegen [2]. Für die Beurteilung dieser Risiken wird nach wie vor jährlich eine Vielzahl von Versuchstieren eingesetzt [3], wobei jedoch die Anwendung der Tierversuche im Rahmen der REACH-Verordnung dem 3R-Prinzip unterliegt. Ziel dessen ist es, so weit wie möglich die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren (engl. *reduce*), das Leiden der Versuchstiere zu verringern (engl. *refine*) und idealerweise Tierversuche durch Alternativen zu ersetzen (engl. *replace*) [4]. Neben den hohen Kosten [3] und der in der Bevölkerung weitgehend fehlenden ethischen Akzeptanz von Tierversuchen ist ein weiterer Nachteil, dass die metabolische Aktivität gegenüber dem humanen System sehr unterschiedlich sein kann [1]. Hinzu kommt, dass durch die 7. Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie [5] die Testung fertiger Kosmetikprodukte sowie deren einzelner Inhaltsstoffe an Versuchstieren schrittweise bis 2013 verboten wurde. Es besteht also ein zwingender Bedarf, auch im Sinne des 3R-Prinzips, neue, tierversuchsfreie Methoden als validierte Testsysteme zur Verfügung zu stellen, um vor allem auch speziesspezifische Unterschiede zu umgehen [6, 7].

1.1.1 AUFBAU DER HAUT

Die Haut ist das wichtigste Grenzorgan des Organismus zur Außenwelt. Mit ihrem komplexen Aufbau bildet sie nicht nur eine wichtige Barriere gegen äußere Einflüsse, sondern stellt auch eine der wichtigsten Kontaktflächen des Körpers dar. Neben ihrer Schutzfunktion vor Pathogenen oder anderen schädlichen Faktoren chemischer oder physikalischer Natur ist sie außerdem essenziell für die Thermoregulation des Körpers sowie für die Wahrnehmung von Druck, Bewegung, Temperatur oder Schmerz über für den jeweiligen Reiz spezialisierte Sinneszellen [8]. Die Haut verhindert den unkontrollierten Verlust von Wasser und Nährstoffen, ermöglicht jedoch eine kontrollierte Wasserabgabe. Entscheidend für diese verschiedenen Aufgaben ist die schichtartige Struktur der Haut (siehe Abbildung 1-1).

Die äußere Schicht, die in direktem Kontakt mit der Umgebung steht, ist die **Epidermis**. Sie besteht hauptsächlich aus **Keratinozyten**, die in verschiedenen Differenzierungsstadien unterschiedliche Schichten der Epidermis bilden. Die Epidermis ist ein sich permanent regenerierendes Epithel. Das *Stratum basale*, die unterste Schicht der Epidermis, besteht aus basalen Keratinozyten. Diese besitzen eine hohe mitotische Aktivität und bilden immer neue Zellen, die anschließend einen Differenzierungsprozess durchlaufen. Währenddessen kommt es zu Veränderungen der zellulären Struktur sowie der exprimierten und sekretierten Proteine. Weiterhin wandern die differenzierenden Keratinozyten Richtung Hautoberfläche und bilden dabei die übrigen Schichten der lebenden Epidermis, bis sie als tote, zellkernlose, mit Proteinen angereicherte Korneozyten die Hornschicht, das *Stratum corneum*, formen und nach einer gewissen Zeit abschilfern. Diese äußerste Schicht der Epidermis nimmt eine wesentliche Rolle in der Barrierefunktion ein (siehe 1.1.2). Neben Keratinozyten befinden sich Melanozyten, die für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind, sowie Zellen des Immunsystems, Langerhans Zellen und Lymphozyten, in der Epidermis (siehe Abbildung 1-1 links).

Unter der Epidermis liegt die **Dermis**. Diese Schicht besteht aus einer extrazellulären Matrix, in die Bindegewebsfasern, Schweiß- und Talgdrüsen, verschiedene Mechanosensoren sowie Blutgefäße eingebettet sind. Die Dermis ist

somit für die Nährstoffversorgung und Elastizität der Haut verantwortlich. Den zellulären Hauptbestandteil bilden die **Fibroblasten**, welche konstant Matrixproteine wie z. B. Kollagen oder Elastin sekretieren und außerdem mit den Keratinozyten der Epidermis interagieren [9, 10]. In der Dermis ist darüber hinaus eine Vielzahl unterschiedlicher Immunzellen zu finden. Dazu zählen beispielsweise dendritische Zellen oder Makrophagen, aber auch T-Zellen (weitere Informationen dazu siehe 1.1.3).

Die **Hypodermis** liegt unter der Dermis und obwohl sie selbst nicht mehr zur Haut zählt, ist sie über Bindegewebsfasern mit der Dermis verbunden. Sie besteht überwiegend aus Fettzellen und Blutgefäßen, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix. Neben der Nährstoffversorgung der Haut fungiert sie als Verbindungsschicht zwischen Haut und übrigen Gewebe (Muskeln, Knochen) und trägt außerdem zur Stabilität der Haut bei.

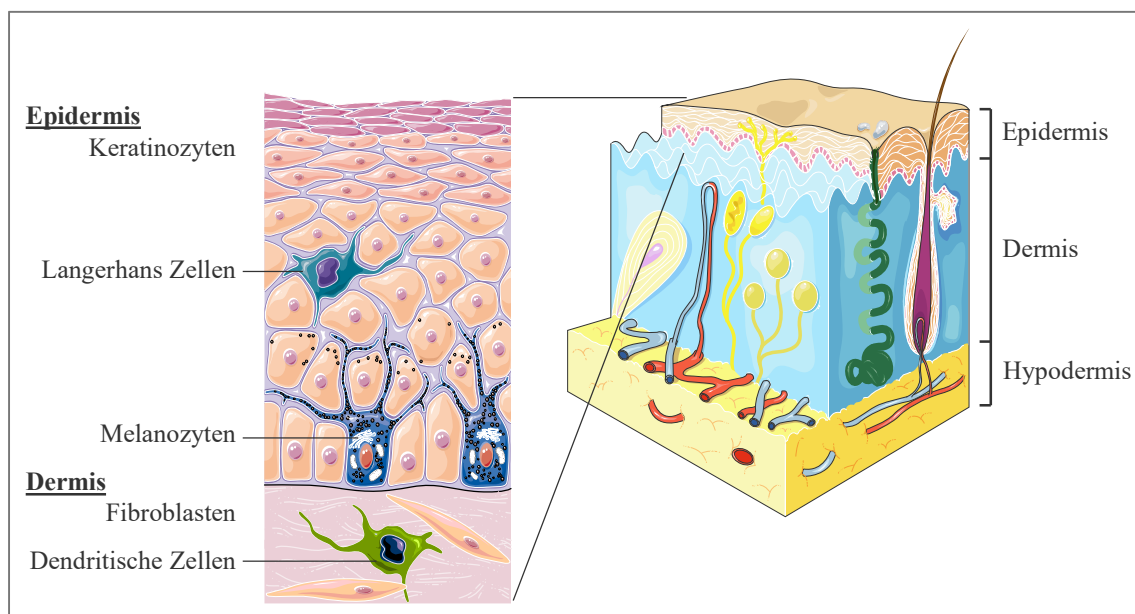


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut. Gezeigt ist eine Darstellung der Haut (rechts) bestehend aus Epidermis, Dermis und Hypodermis inklusive weiterer Bestandteile wie verschiedenen Mechanosensoren, Talg- und Schweißdrüsen, Blutgefäßen und Haaren. Die Vergrößerung (links) zeigt die oberen Hautschichten inklusive der verschiedenen Zelltypen: Keratinozyten, Langerhans Zellen und Melanozyten in der Epidermis sowie Fibroblasten und Dendritische Zellen in der Dermis, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix. Die Abbildung wurde mithilfe von Servier Medical Art erstellt (Copyright © 2012, Les Laboratoires Servier – Sämtliche Rechte vorbehalten).

Die Haut bildet auf verschiedene Weisen eine Barriere gegen äußere Faktoren. Zum einen stellen das *Stratum corneum* und die lebende Epidermis eine physische Barriere dar. Das *Stratum corneum* besteht aus proteinreichen, abgeflachten Korneozyten ohne Zellkern oder Organellen. Diese toten Zellen enthalten wenig Wasser und sind über spezielle Strukturen, die Korneodesmosomen, fest miteinander verbunden. Weiterhin sind die Korneozyten von einer protein- und lipidreichen Hülle umgeben und in eine Matrix aus unpolaren Lipiden eingebettet [11]. Somit bildet das *Stratum corneum* eine sehr hydrophobe Schicht, die sowohl den Austritt von Wasser aus dem Körperinneren als auch das Eindringen hydrophiler Substanzen in den Organismus verhindert. Im Gegensatz dazu sind die anderen Schichten der Epidermis mit einem Wasseranteil von circa 70 % sehr hydrophil, weshalb hydrophobe Substanzen, die leicht das *Stratum corneum* durchqueren konnten, die lebende Epidermis kaum überwinden können [12]. Zusätzlich sind auch die Keratinozyten durch verschiedene Strukturen (*Tight Junctions* und *Gap Junctions*) horizontal und vertikal miteinander verbunden, wodurch die Zellzwischenräume verschlossen werden.

Zum anderen gibt es neben dieser physischen auch eine chemische Barriere. Dazu zählen die bereits erwähnte Hydrophobie des *Stratum corneum* bzw. die Hydrophilie der Epidermis genauso wie antimikrobielle Peptide oder hydrolytische Enzyme, die von den epidermalen Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden [11].

Eine dritte Art der Barriere ist immunologischer Natur und meint Prozesse der angeborenen sowie adaptiven Immunantwort, die auch in der Haut stattfinden. Diese Barriere richtet sich vor allem gegen pathogene Organismen wie beispielsweise Bakterien oder Pilze und verhindert, dass diese in den Körper gelangen (siehe 1.1.3).

Trotz dieser unterschiedlichen Barrieren können Substanzen, vor allem Moleküle mit einem niedrigen Molekulargewicht (< 500 g/mol), in die Haut eindringen [12]. Der Begriff **Penetration** beschreibt dabei den Eintritt einer Substanz in die Haut. Unter **Permeation** versteht man wiederum das Durchdringen der verschiedenen Hautschichten, bis die Substanz in kutane Blutgefäße und somit in den systemischen Blutkreislauf gelangt. Die Penetration beruht auf einer passiven Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten und kann über drei

potentielle Wege stattfinden: Die **interzelluläre** Route beschreibt das Durchqueren der extrazellulären Matrix, ohne dabei in die Zellen einzudringen. Dieser Weg dominiert gegenüber der **intrazellulären** Route, bei welcher der Ein- und Austritt in bzw. aus den Hautzellen nötig ist. Die intrazelluläre Route eignet sich vor allem für hydrophoben Substanzen. Eine dritte Möglichkeit bietet der **follikuläre** Weg: Haarschaft oder Schweißdrüsen verursachen Unterbrechungen des *Stratum corneum* und reichen bis in die Dermis hinein, wobei sie nur von einer dünnen epidermalen Schicht umgeben sind.

1.1.3 IMMUNSYSTEM DER HAUT

Das Immunsystem der Haut dient der Erkennung und Abwehr von Pathogenen, die von außen in den Körper eindringen. Zum Immunsystem der Haut gehören Komponenten sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Neben verschiedenen Zellen des Immunsystems (z. B. Antigen-präsentierende Zellen oder T-Zellen) sind auch Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen durch die Sekretion verschiedener Signalmoleküle an der Immunabwehr beteiligt.

Neben wenigen intra-epidermalen T-Zellen sind die dominierenden Immunzellen der Epidermis **Langerhans Zellen** (LC, engl. *Langerhans cells*, siehe Abbildung 1-1). Diese Zellen residieren im unteren Bereich der Epidermis und bilden mit ihren dendritischen Fortsätzen ein dichtes Netzwerk in der Epidermis. Durch die Fortsätze stehen sie einerseits in Kontakt mit den sie umgebenden Keratinozyten und können andererseits die Epidermis großflächig nach Pathogenen bzw. Antigenen absuchen. Haben die LC ein Antigen erkannt, wird dieses ins Zellinnere aufgenommen und ein Reifungsprozess eingeleitet. Dabei verlieren die LC ihre dendritische Struktur und lösen sich durch Veränderungen in den exprimierten Oberflächenproteinen aus dem epidermalen Zellverband. Die gereiften LC migrieren zu den nahegelegenen Lymphknoten, um dort als Antigen-präsentierende Zellen (APC, engl. *antigen presenting cell*) der adaptiven Immunantwort aktiv zu werden [13].

In der Dermis übernehmen diese Aufgabe dermale **Dendritische Zellen** (DC, engl. *dendritic cells*), die nach Aktivierung durch Antigenaufnahme ebenfalls einen Reifungsprozess durchlaufen und aus der Dermis zu nahegelegenen Lymphknoten wandern. Es gibt verschiedene Subpopulationen der dermalen DC,

1. Einleitung

von denen einige eine wichtige Rolle bei der Immuntoleranz (dem Ausbleiben einer Immunantwort) in der Haut spielen. Im Normalfall findet die Antigenpräsentation über MHC-Moleküle (engl. *major histocompatibility complex*) des Typs II statt, die im weiteren Verlauf eine Immunantwort mit CD4⁺ (CD = engl. *cluster of differentiation*) T-Helfer-Zellen einleitet. Im Falle der *cross*-Präsentation wird das Antigen über MHC Typ I präsentiert, was wiederum CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aktiviert. Abhängig von der Menge oder dem Fehlen weiterer inflammatorischer Signale kommt es zur Immunantwort oder Immuntoleranz, z. B. gegenüber fremden, aber harmlosen Substanzen aus der Umwelt oder kommensalen Erregern [13].

Weitere Immunzellen in der Haut sind verschiedene T-Zellen, Mastzellen und Natürliche Killerzellen, die alle überwiegend in der Dermis lokalisiert sind oder regelmäßig zwischen der Haut und den nächsten Lymphknoten zirkulieren.

Im Falle einer Entzündung werden diese und weitere Immunzellen wie z. B. Makrophagen mithilfe unterschiedlicher inflammatorischer Signalmoleküle in das entzündete Hautgewebe rekrutiert. Ein wichtiges Signalmolekül ist **Interleukin-1 α** (IL-1 α), welches vor allem von Keratinozyten ausgeschüttet wird, nachdem diese z. B. mithilfe spezieller Oberflächenrezeptoren pathogene Strukturen erkannt haben oder die epidermale Barriere durchbrochen wurde. IL-1 α diffundiert in die Dermis und unterstützt den Reifungsprozess von LC und DC. Weiterhin bewirkt es in Endothelzellen die Hochregulation von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen oder in Fibroblasten die Sekretion des chemotaktischen **Interleukin-8** (IL-8), das migrierende Neutrophile oder T-Zellen zum Ort der Entzündung leiten soll. Beide Zytokine, IL-1 α und IL-8, sind also Indikatoren für entzündetes oder geschädigtes Gewebe. Ihre Quantifizierung erlaubt indirekt Rückschlüsse darauf, ob eine applizierte Substanz oder andere Einflüsse schädlich für die Haut sind [13].

Das Immunsystem der Haut spielt auch bei der Beurteilung des Einflusses von körperfremden Substanzen, sogenannter Xenobiotika, sowie deren Biotransformation in der Haut eine Rolle: das Xenobiotikum oder dessen Metabolite können teilweise Sensibilisierungsreaktionen verursachen. Darunter versteht man das Entstehen einer Kontaktallergie, die aus einer Überreaktion der adaptiven Immunantwort resultiert [14]. Am häufigsten wird eine Kontaktallergie nach folgendem Mechanismus ausgelöst: Bei erstmaligem Hautkontakt kann ein Xenobiotikum eine Immunantwort induzieren, indem es sich kovalent mit Proteinen verbindet (Haptenylierung). Dieser Protein-Substanz-Komplex wird

anschließend von APC aufgenommen, wodurch diese aktiviert werden. Das zieht deren Migration zu den Lymphknoten und dort die Aktivierung verschiedener T-Zellen, die spezifisch gegen das Xenobiotikum gerichtet sind, nach sich. In dieser „Sensibilisierungsphase“ nach erstmaligem Allergenkontakt treten noch keine Symptome auf. Bei erneutem Kontakt mit dem Xenobiotikum kommt es dann in der „Effektorphase“ zum Ausbruch der allergischen Symptome (roter Ausschlag, Blasen, Juckreiz, Brennen; [14]), verursacht durch während der Sensibilisierungsphase induzierte humorale (z. B. spezifische Antikörper) und zelluläre (z. B. T-Zellen) Komponenten des Immunsystems [15].

1.2 *IN VITRO* HAUTMODELLE ALS ALTERNATIVE ZUM TIERVERSUCH

Kosmetika, Arzneistoffe, Bedarfsgegenstände und andere Chemikalien müssen hinsichtlich ihres Gefährdungspotentials für den menschlichen Organismus beurteilt werden, bevor sie dem Verbraucher zur Verfügung gestellt werden können. Viele dieser Test erfordern den Einsatz von Versuchstieren: so werden beispielsweise zur Beurteilung der Genotoxizität *in vitro* oft Systeme tierischen Ursprungs wie die S9-Fraktion aus Rattenleberhomogenisaten verwendet [1]. Zur Evaluierung des Sensibilisierungspotentials einer Substanz wird vor allem der lokale Lymphknotentest LLNA (engl. *local lymphnode assay*) an Mäusen durchgeführt, der auch durch die seit 2007 geltende REACH-Verordnung der Europäischen Union als bevorzugtes *in vivo*-Testverfahren empfohlen wird [2]. Im Sinne des 3R-Prinzips, welches die Anzahl an Versuchstieren bzw. deren Leiden reduzieren oder wenn möglich Tierversuche komplett ersetzen soll [4], wurden in den letzten Jahren verschiedene alternative Testsysteme entwickelt.

Im Bereich der Haut gibt es zwei Arten von *in vitro*-Modellen: dreidimensionale (3D) rekonstruierte Epidermismodelle (RHE, engl. *reconstructed human epidermis*) und rekonstruierte Vollhautmodelle (RHS, engl. *reconstructed human full-thickness skin*). RHE bestehen ausschließlich aus Keratinozyten, die auf einer Kunststoffmembran gezüchtet werden. Sie weisen alle Schichten und Differenzierungsstadien einer viablen Epidermis einschließlich des *Stratum corneum* auf (siehe 1.1.1). RHS besitzen zusätzlich zur Epidermis ein Dermis-Äquivalent, das häufig aus einer Kollagenmatrix mit darin eingebetteten Fibroblasten besteht. Inzwischen sind RHE und RHS hinsichtlich ihrer

1. Einleitung

Morphologie und Barrierefunktion gut charakterisiert und in ihren Eigenschaften der Humanhaut *ex vivo* vergleichbar [16-20]. Verschiedene Epidermismodelle sind bereits als geeignete Testsysteme für die Beurteilung von Hautreizung oder Hautätzung validiert worden [21, 22].

Vollhautmodelle mit ihrem Dermisäquivalent repräsentieren in der Regel die *in vivo*-Situation von Humanhaut besser als Epidermismodelle. So bilden RHS im Gegensatz zu RHE beispielsweise den unter physiologischen Bedingungen in der Haut stattfindenden *cross-talk* zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten ab, der unter anderem die Proteinexpression beeinflusst [9, 10]. Weiterhin spielt die Dermis inklusive ihres Bindegewebes eine Rolle bei der Homöostase der Epidermis und besitzt ebenfalls metabolische Aktivität [23, 24]. Bevor jedoch RHS als validierte Testsysteme für Gefährdungseinschätzungen oder Penetrationsstudien eingesetzt werden können, müssen sie in verschiedenen Studien hinreichend evaluiert werden. Diese Arbeiten finden im Rahmen aktuell laufender Forschungsprojekte statt.

Zwar waren rekonstruierte Epidermismodelle und teilweise rekonstruierte Vollhautmodelle in den letzten Jahren Gegenstand vieler Forschungsprojekte; dennoch ist deren Charakterisierung noch nicht abgeschlossen [24] und die bisherigen Studien zum Fremdstoffmetabolismus in der Haut konzentrierten sich überwiegend auf RHE [7, 25]. Im Gegensatz dazu wurde die metabolische Kompetenz von Vollhautmodellen im Allgemeinen und im Speziellen deren Verstoffwechslung von körperfremden Substanzen noch nicht hinreichend untersucht. Die Biotransformationskapazität der Haut spielt aber eine wichtige Rolle bei der Gefährdungsbeurteilung von Stoffen, die mit der Haut in Kontakt kommen. Xenobiotika und andere Substanzen können durch Enzyme in der Haut metabolisiert werden, was unter anderem zu reizenden oder toxischen Metaboliten führen kann und somit deren Risikobewertung beeinflusst. Auch im Falle von Prodrugs entsteht erst durch die Biotransformation der aktive Wirkstoff [26-28]. Weiterhin kann die Biotransformation eines Stoffes auch dessen Penetrationsverhalten beeinflussen [29-31]. Deshalb müssen die *in vitro*-Testsysteme hinsichtlich ihrer metabolischen Kapazität untersucht und mit Humanhaut verglichen werden.

Im Rahmen eines vorangegangenen vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes (Förderkennzeichen: 0316008B) wurden verschiedene kommerzielle rekonstruierte 3D-Vollhautmodelle evaluiert und dabei

zwei als besonders vielversprechend für weitere Studien ausgewählt: das Phenion[®]FT der Firma Henkel (Düsseldorf, Deutschland) und das EpiDerm[™]FT der MatTek Corporation (Ashland, MA, USA) [17, 32]. Beide RHS wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit hinsichtlich verschiedener fremdstoff-metabolisierender Enzyme charakterisiert, damit diese Modelle in Zukunft als tierversuchsfreie Systeme bei dermatotoxikologischen Testreihen eingesetzt werden können.

1.3 FREMDSTOFFMETABOLISMUS

1.3.1 METABOLISMUS

Metabolismus bezeichnet die Gesamtheit chemischer Umwandlungen von Substanzen innerhalb eines Organismus. Dazu gehört die Verstoffwechslung endogener und exogener, sowie körperfremder, sogenannter xenobiotischer Moleküle. Der menschliche Körper kommt täglich mit einer Vielzahl xenobiotischer Substanzen in Kontakt, die über die Atemluft, Nahrung oder auch durch Hautkontakt aufgenommen werden. Falls diese Stoffe nicht direkt ausgeschieden werden können, beispielsweise aufgrund hoher Lipophilie, erfolgt mithilfe enzymatisch katalysierter Reaktionen die chemische Modifikation solcher Substanzen. Diese Umwandlung von Fremdstoffen wird als Biotransformation bezeichnet und dient der Entgiftung des Körpers. Für die Verwendung von Pharmaka ist die Kenntnis über deren Biotransformation von großer Bedeutung. Nach oraler Aufnahme werden Arzneistoffe überwiegend im Dünndarm resorbiert und anschließend über die Pfortader in die Leber transportiert, bevor sie in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Die Biotransformation der Pharmaka in der Leber wird als First-Pass-Effekt bezeichnet. Als dessen Folge kann einerseits die Wirksamkeit der Pharmaka reduziert werden oder andererseits können die entstandenen Metabolite auch eine höhere Wirksamkeit aufweisen. Somit kann das Wissen über die Biotransformationskapazität eines Gewebes gezielt genutzt werden, um Prodrugs zu entwickeln, die erst nach Metabolisierung ihre volle therapeutische Wirkung entfalten.

Der größte Teil der Biotransformationsreaktionen findet in der Leber statt. Jedoch sind auch andere Organe wie Niere oder Darm mit fremdstoff-metabolisierenden Enzymen ausgestattet und an der Biotransformation beteiligt.

1. Einleitung

Diese sogenannten extrahepatischen Biotransformationsreaktionen finden ebenfalls in der Lunge und der Haut statt, die mit der Außenwelt interagieren und in Hinblick auf die zunehmende Exposition mit Umweltgiften an Bedeutung gewinnen [33].

Bei der Biotransformation werden unterschiedliche chemische Reaktionsarten in verschiedenen Phasen zusammengefasst. Phase-I-Reaktionen (Funktionalisierungsreaktionen) umfassen dabei alle Reaktionen, bei denen ein Xenobiotikum oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch modifiziert wird. Ziel dieser Phase-I-Reaktionen ist es, bestimmte polare funktionelle Gruppen in das Molekül einzubauen oder bereits vorhandene funktionelle Gruppen umzuwandeln. In Phase-II-Reaktionen (Konjugationsreaktionen) wird ein Xenobiotikum direkt oder nach vorheriger Phase-I-Biotransformation mit körpereigenen Molekülen verknüpft. Das Konjugat weist eine erhöhte Hydrophilie auf und kann dadurch leichter ausgeschieden werden. Phase-III-Reaktionen beschreiben den aktiven Transport der Metabolite aus den Zellen mithilfe spezieller Transportproteine, z. B. ABC-Transporter (ABC = engl. *ATP-binding cassette*).

1.3.2 REAKTIONEN DER PHASE-I

Phase-I-Reaktionen werden von einer Vielzahl von Enzymen katalysiert. Die wichtigste Phase-I-Reaktion, die Oxidation, wird in der Leber überwiegend von Cytochrom P450-Isoenzymen (CYP) katalysiert. Diese Enzymsuperfamilie umfasst verschiedene Gen- und Subfamilien, deren Isoenzyme sich hinsichtlich der Expression im Gewebe und ihrer Substratspezifität unterscheiden [33, 34]. Wenn auch die Monooxygenierung (genauer Hydroxylierung, R-H wird zu R-OH) die dominierende Reaktion ist, so werden auch andere Reaktionen durch unterschiedliche CYP-Isoenzyme katalysiert. Dazu zählen z. B. die Epoxidation von Doppelbindungen, Oxidierung und Dealkylierung verschiedener Heteroatome oder die N-Hydroxylierung von Aminfunktionen (-NH₂). Weitere wichtige Enzyme für Biotransformationsreaktionen der Phase-I sind Hydrolasen (z. B. Esterasen) und verschiedene Reduktasen (z. B. NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase). Im Folgenden werden nur die in dieser Arbeit untersuchten Enzymgruppen genauer vorgestellt.

Monoaminoxidasen

Monoaminoxidasen (MAO) gehören zur Gruppe der Flavin-abhängigen Monooxygenasen und oxidieren primäre, sekundäre oder auch tertiäre Monoamine unter Verwendung von Sauerstoff (O₂) und Wasser (H₂O) zu den entsprechenden Aldehyden (siehe Abbildung 1-2). Biologisch spielt diese Reaktion vor allem eine Rolle bei der Deaktivierung von Neurotransmittern und Hormonen wie Dopamin, Serotonin, Adrenalin oder Noradrenalin. Darüber hinaus katalysieren MAO aufgrund ihrer breiten Substratspezifität auch die Desaminierung verschiedener Xenobiotika und sind somit für den Fremdstoffmetabolismus bedeutend [35].

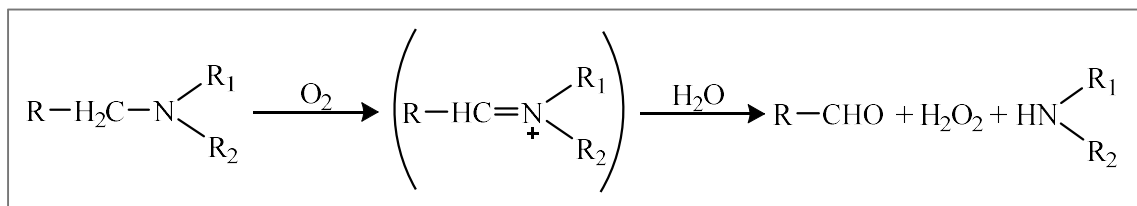


Abbildung 1-2: Reaktionsmechanismus der Monoaminoxidasen. Unter Bildung eines Imin-Zwischenproduktes wird durch Entfernen eines Wasserstoffatoms ein Amin zu einem Aldehyd umgewandelt. Das eingebaute Sauerstoffatom wird aus Wasser gewonnen und durch Reoxidation des Cofaktors FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid; nicht gezeigt) entsteht bei der Reaktion außerdem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Nebenprodukt (nach [35]).

Bei den MAO sind zwei Subfamilien bekannt, MAO A und MAO B. Sie weisen circa 70 % Gensequenzhomologien auf, unterscheiden sich aber in ihren Substratspezifitäten und Sensitivitäten gegenüber Inhibitoren. MAO sind intrazellulär lokalisiert und fest mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert [35]. Die MAO-Expression wurde nicht nur in neuronalen, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen, wobei die periphere Expression in der Leber am stärksten ist [35, 36]. In den meisten Geweben werden beide MAO-Subfamilien exprimiert, jedoch gibt es auch Ausnahmen: in humaner Plazenta wird nur *MAOA*, in Thrombozyten und Lymphozyten hingegen nur *MAOB* exprimiert [35].

In Humanhaut wurden Monoaminoxidasen bereits in den 1950er Jahren histologisch nachgewiesen [37, 38]. Studien zur MAO-Aktivität an Human- oder Nagetierhaut folgten [39-41], jedoch ohne zwischen MAO A und MAO B zu differenzieren. Eine detaillierte Charakterisierung der MAO-Aktivität in Humanhaut sowie rekonstruierten Vollhautmodellen ist wichtig, da die

1. Einleitung

transdermale Applikation für verschiedene Pharmaka immer mehr an Bedeutung gewinnt. Für Arzneistoffe wie z. B. Propranolol, das unter anderem zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt wird, stellt die transdermale Route eine sinnvolle Alternative dar, um den bei oraler Applikation sehr dominanten First-Pass-Effekt zu umgehen, der die Bioverfügbarkeit stark verringert [42, 43].

Steroid-5 α -Reduktasen

Steroid-5 α -Reduktasen (5 α R) spielen eine wichtige Rolle bei der Verstoffwechslung von androgenen Hormonen. Ihre biologische Funktion besteht hauptsächlich in der Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron (siehe Abbildung 1-3), welches eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor aufweist [44]. Dennoch können 5 α R auch andere steroidale Strukturen als Substrat erkennen und die entsprechende Reduktionsreaktion katalysieren, beispielsweise synthetische Glucocorticoide wie Prednisolon, die unter anderem bei der Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen eingesetzt werden [45, 46].

In der Peripherie werden mithilfe verschiedener Enzyme inklusive der 5 α R Androgene aus zirkulierenden Vorläufern wie Cholesterin oder Dehydroepiandrosteron (DHEA) bzw. dessen Sulfat (DHEA-S) synthetisiert. In der Haut sind Androgene an verschiedenen Funktionen wie z. B. Wachstum und Differenzierung der Talgdrüsen, der Wundheilung oder der Homöostase der epidermalen Barriere beteiligt [47]. Einige Hauterkrankungen wie Akne oder Hirsutismus zeichnen sich durch veränderte Mengen der am Androgenstoffwechsel beteiligten Enzyme bzw. des Androgenrezeptors aus. Für deren Behandlung oder auch die therapeutische Verabreichung von Testosteron oder anderer steroidaler Wirkstoffe wird als Applikation oft die transdermale Route gewählt [48], weshalb die am kutanen Androgenmetabolismus beteiligten Enzyme sowohl in Humanhaut *ex vivo* als auch in RHS umfassend charakterisiert werden müssen.

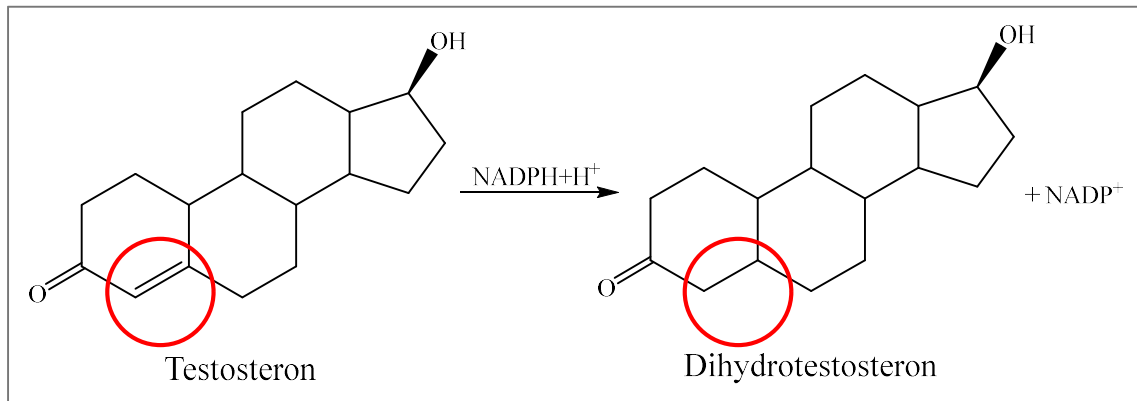


Abbildung 1-3: Reaktionsmechanismus der Steroid-5 α -Reduktasen. Die Reduktionsreaktion führt zu einem irreversiblen Bruch der Doppelbindung zwischen C4 und C5 des steroidalen Grundgerüsts, an das zusätzlich mithilfe des Cofaktors NADPH+H⁺ zwei Wasserstoffatome eingefügt werden (nach [44]).

Zu den 5 α R zählen die drei Unterfamilien 5 α R 1, 5 α R 2 und 5 α R 3. Die Familien 1 und 2 unterscheiden sich in ihrem pH-Optimum, der Bindungsaffinität zu ihren Substraten und werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. So dominiert 5 α R2 in der Prostata und 5 α R1 in Hautgeweben. Neben der Expression in Epidermis und Dermis lässt sich 5 α R1 besonders in Talgdrüsen und Haarfollikeln nachweisen [49]. Die Unterfamilie 5 α R 3 wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt [50], jedoch konnte bereits eine ubiquitäre 5 α R3-Expression nachgewiesen werden [44].

1.3.3 REAKTIONEN DER PHASE-II

Bei den Phase-II-Reaktionen der Biotransformation werden xenobiotische Moleküle über funktionelle Gruppen wie Carboxyl- (-COOH), Hydroxyl- (-OH), Thiol- (-SH) oder Aminogruppen (-NH₂), die bereits im Molekül vorhanden waren oder über Phase-I-Reaktionen eingefügt wurden, auf körpereigene, lösliche Moleküle (z. B. Acetyl-Coenzym A oder Glutathion) übertragen. Zu diesen Reaktionen gehören Glucuronidierung, Sulfonierung, Acetylierung, Methylierung und die Konjugation mit Glutathion oder Aminosäuren [51].

Der überwiegende Teil der Phase-II-Reaktionen führt zu einer erhöhten Hydrophilie, um die modifizierten Xenobiotika vor allem über die Niere besser ausscheiden zu können. In der Leber dominieren Glucuronidierungs- und Sulfonierungsreaktionen. Dennoch finden ebenfalls Acetylierung und Glutathion-Konjugation statt. Bei den Phase-II-Enzymen handelt es sich überwiegend um

1. Einleitung

zytosolische Proteine. Eine Ausnahme bilden z. B. die Uridin-5'-diphosphoglucuronosyltransferasen (UGT), da sie gebunden an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums vorliegen. Im Folgenden wird auf die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Phase-II-Enzymgruppen näher eingegangen.

Sulfotransferasen

Die Superfamilie der Sulfotransferasen (SULT) umfasst eine Vielzahl von Mitgliedern. Für den humanen Stoffwechsel sind die Familien SULT 1 und SULT 2, die sich wiederum in weitere Subfamilien unterteilen lassen, von größter Bedeutung. Alle SULT katalysieren die Übertragung einer Sulfogruppe ($-\text{SO}_3\text{H}$)¹, wobei 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS, siehe Abbildung 1-4) als universeller Donor dient.

Die SULT-Familien unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Substratspezifität, decken aber insgesamt ein breites Substratspektrum ab und spielen somit für den Stoffwechsel von sowohl endogenen als auch körperfremden Molekülen eine wichtige Rolle.

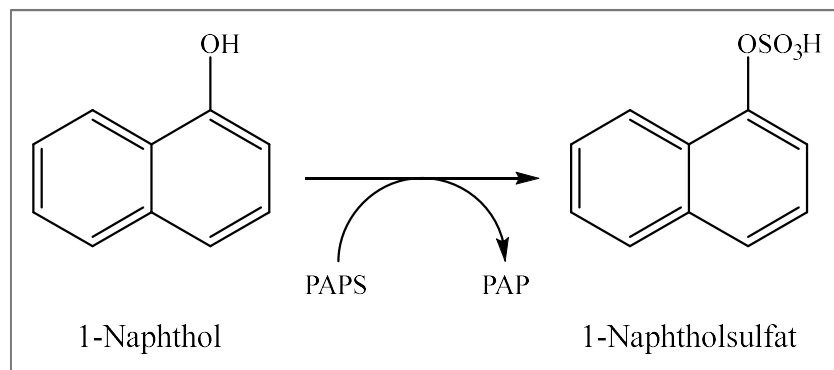


Abbildung 1-4: Reaktionsmechanismus der Sulfotransferasen. Als universeller Donor der Sulfogruppe dient 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), das mithilfe der PAPS-Synthetase aus ATP und anorganischem Sulfat gebildet wird. Sulfotransferasen übertragen $-\text{SO}_3\text{H}$ auf verschiedene funktionelle Gruppen in xenobiotischen sowie endogenen Substraten. In diesem Beispiel dient 1-Naphthol als Substrat, welches an seiner phenolischen Hydroxylgruppe sulfoniert wird.

¹ Diese Sulfonierungsreaktion wird in der deutschsprachigen Literatur oft als „Sulfatierung“ bezeichnet, da die Reaktion in der englischen Sprache „*sulfation*“ genannt wird. Hinter der „Sulfatierung“ verbirgt sich aber streng genommen die Addition von Sulfatgruppen ($-\text{SO}_4\text{H}$). Im Folgenden wird konsequent der Begriff der Sulfonierung verwendet.

Die SULT 1-Familie ist für die Biotransformation von Xenobiotika die wichtigste. Neben verschiedenen endogenen Molekülen wie z. B. Katecholaminen oder Schilddrüsenhormonen zählen auch viele körperfremde Moleküle zu ihren Substraten. Dabei sulfonieren die Enzyme der SULT 1-Subfamilien spezifische Strukturen: Die SULT 1A beispielsweise sulfonieren bevorzugt phenolische Strukturen, weshalb sie auch als phenolische SULT bezeichnet werden. Das Isoenzym SULT 1A1 gilt als die wichtigste fremdstoffmetabolisierende SULT. Sie weist ein breites Substratspektrum auf, kommt in einer Vielzahl von Geweben vor und ist eine der entscheidenden SULT in der Leber [52]. Neben SULT 1A ist auch die SULT 1E-Subfamilie von Bedeutung. Sie bevorzugt östrogene Strukturen als Substrate und ihr wichtigstes Mitglied, die SULT 1E1, wird deshalb auch als Östrogen-SULT bezeichnet. Die SULT 1E1 hat eine hohe Affinität für endogene Östrogene, vor allem β -Estradiol. Daneben zählen aber auch xenobiotische Östrogene, wie beispielsweise Ethinylestradiol, zu ihren Substraten [53].

Die SULT 2-Familie umfasst die Subfamilien SULT 2A und SULT 2B und zu ihren Substraten zählen steroidale Strukturen wie z. B. DHEA oder auch Testosteron. Vor allem SULT 2A1 ist für den Fremdstoffmetabolismus wichtig. Diese Enzymgruppe sulfoniert bevorzugt nicht-aromatische OH-Gruppen [52]. Die Isoenzyme SULT 2B1a und SULT 2B1b hingegen sind spezifisch für endogene Steroide [34]. Ein wichtiges Substrat der SULT 2B1b ist Cholesterin. Deshalb spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle in der Haut, da Cholesterinsulfat am Differenzierungsprozess von epidermalen Keratinozyten beteiligt ist [54, 55]. Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche anderen SULT in kutanen Geweben exprimiert werden. Denn neben der überwiegend detoxifizierenden Funktion der Sulfonierung ist bekannt, dass vor allem die O-Sulfonierung zu reaktiven Metaboliten und DNA-Schädigung führen kann [56]. Aufgrund dessen ist für die Untersuchung neuer, topisch oder transdermal applizierter Substanzen sowie die Beurteilung ihres genotoxischen oder sensibilisierenden Potentials die Kenntnis über kutane SULT-Aktivität von großer Relevanz.

Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GST) gehören zu den wichtigsten Enzymen, die an der Detoxifizierung von endogenen und xenobiotischen Elektrophilen beteiligt

1. Einleitung

sind [34]. Sie katalysieren die Bindung von Glutathion, einem endogenen Peptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin (Glu-Cys-Gly, siehe Abbildung 1-5 a), unter Bildung eines Thioethers über das Schwefelatom der Aminosäure Cystein. Die GST deprotonieren das Cystein im Glutathion und stabilisieren das entstandene Glutathionthiolat-Anion (GS^-), welches anschließend an einem elektrophilen Atom nukleophil angreift (siehe Abbildung 1-5 b) [51]. Die gebildeten Metabolite haben gegenüber der Ausgangssubstanz eine höhere Hydrophilie und können entweder direkt über Gallensekrete oder nach Bildung von Mercaptursäuren renal ausgeschieden werden.

Bei den GST gibt es ebenfalls verschiedene Unterfamilien, die in vielen Geweben vorkommen. Der überwiegende Teil der GST (> 95 %) kommt dabei in Form löslicher, zytosolischer Proteine vor, aber auch mitochondriale oder mikrosomale GST sind bekannt. Wie andere fremdstoffmetabolisierende Enzyme weisen GST eine breite Substratspezifität auf, wobei alle Substrate hydrophob sind und ein elektrophiles Atom besitzen [51]. Neben ihrer dominierenden Funktion bei Entgiftungsprozessen sind GST auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt, wie z. B. der Synthese von Leukotrienen oder Progesteron [34].

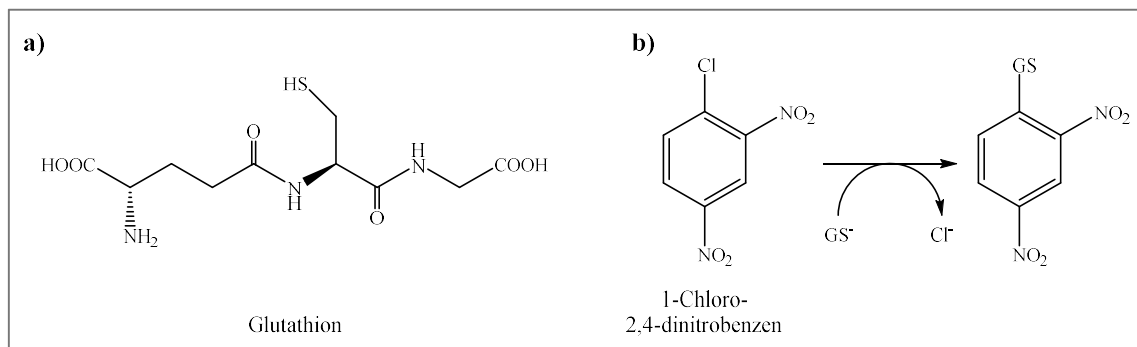


Abbildung 1-5: Reaktionsmechanismus der Glutathion-S-Transferasen. GST binden endogenes Glutathion (a) und stabilisieren das deprotonierte Glutathionthiolat-Anion (GS^-), welches anschließend diverse Substrate mit elektrophilem Atomen angreift, in diesem Beispiel 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (b).

Die wichtigsten GST-Familien bei Säugetieren sind Alpha (GST A), My (GST M) und Pi (GST P), die alle stark in der Leber exprimiert werden und für den Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Die Theta-Familie (GST T) ist vor allem im Gastrointestinaltrakt für die Detoxifizierung von mit der Nahrung aufgenommenen Xenobiotika von Bedeutung. Die GST-Familien Sigma (GST S), Omega (GST O), Zeta (GST Z) sowie mitochondriale und mikrosomale

GST übernehmen hauptsächlich endogene Funktionen und sind für den Fremdstoffmetabolismus nicht relevant [34]. Die Zuordnung der GST zu einer der aufgeführten Familien erfolgt hinsichtlich der Sequenzhomologie, wenn diese mehr als 40 % beträgt [57]. Die Subfamilien unterscheiden sich in ihren isoelektrischen Punkten bzw. dem pH-Optimum aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen. GST A haben einen basischen, GST M einen neutralen und GST P einen sauren isoelektrischen Punkt. Während in der Leber vor allem die GST A vorkommen (sie bilden circa 3 % der löslichen Leberproteine, [34]), so dominieren in der Peripherie GST P-Isoenzyme [51]. Auch für die Haut trifft dies zu: verschiedene GST-Subfamilien wurden in Nagetier- oder humaner Haut sowie verschiedenen RHE oder RHS detektiert, wobei GST P vor allem in humanen Geweben überwiegt [58]. Glutathion-S-Transferasen sind im kutanen Fremdstoffmetabolismus involviert und im Rahmen dieser Arbeit galt es zu klären, ob das auch für die rekonstruierten 3D-Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT zutrifft.

1.3.4 BIOTRANSFORMATION AM BEISPIEL VON 2,4-DIAMINOTOLUOL

2,4-Diaminotoluol (2,4-DAT, IUPAC Name 4-Methylbenzen-1,3-diamin) gehört zu den aromatischen Aminen. Aromatische Amine sind in einer Vielzahl alltäglicher Produkte enthalten und Hautkontakt bildet dabei einen wesentlichen Aufnahmeweg. So sind sie zum Beispiel in Textilfarben und Haarfärbemitteln enthalten oder kommen während der Synthese von Pestiziden und Kunststoffen vor [59]. Von verschiedenen aromatischen Aminen ist bekannt, dass sie oder deren Metabolite genotoxisch wirken und speziell in der Haut auch allergische Reaktionen verursachen können [59-62]. Deshalb ist es von großem Interesse, möglichst viele aromatische Amine hinsichtlich ihrer Hautpenetrationsfähigkeit und ihrer kutanen Biotransformation zu untersuchen, wie es in dieser Arbeit für 2,4-DAT gemacht wurde.

Bis in die 1970er Jahre war 2,4-DAT Bestandteil verschiedener Haarfärbemittel, bevor es aufgrund seiner mutagenen Wirkung verboten wurde [62, 63]. 2,4-DAT kommt allerdings nach wie vor in verschiedenen Bereichen der chemischen Industrie vor, z. B. bei der Herstellung von Industrieschäumen durch die Verarbeitung von Toluendiisocyanat [64]. Die Aufnahme von 2,4-DAT findet hauptsächlich durch Einatmen oder Hautkontakt statt. Die Permeation von

1. Einleitung

2,4-DAT wurde bereits früh in verschiedenen Spezies inklusive des Menschen nachgewiesen [65]. Jedoch fehlen bis heute Daten zur kutanen Biotransformation, die aber hinsichtlich der Einschätzung des genotoxischen oder auch sensibilisierenden Potentials von 2,4-DAT wichtig ist und weshalb sie in dieser Arbeit untersucht wurde. Weiterhin wurde 2,4-DAT im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes (Förderkennzeichen: 0316008B) als Testsubstanz ausgewählt, da es als *in vivo*-Genotoxin eingestuft wurde, welches auch *in vitro* im *Comet Assay* zu positiven genotoxischen Ergebnissen führen soll [66, 67].

Bei der Biotransformation in der Leber durchläuft 2,4-DAT sowohl Funktionalisierungs- als auch Konjugationsreaktionen, wobei die oxidative Phase-I-Biotransformation katalysiert durch CYP überwiegt. Phase-II-Biotransformationsreaktionen wie Glucuronidierung, Sulfonierung oder N-Acetylierung wurden zu einem geringeren Anteil ebenfalls beobachtet (siehe Abbildung 1-6) [68-71].

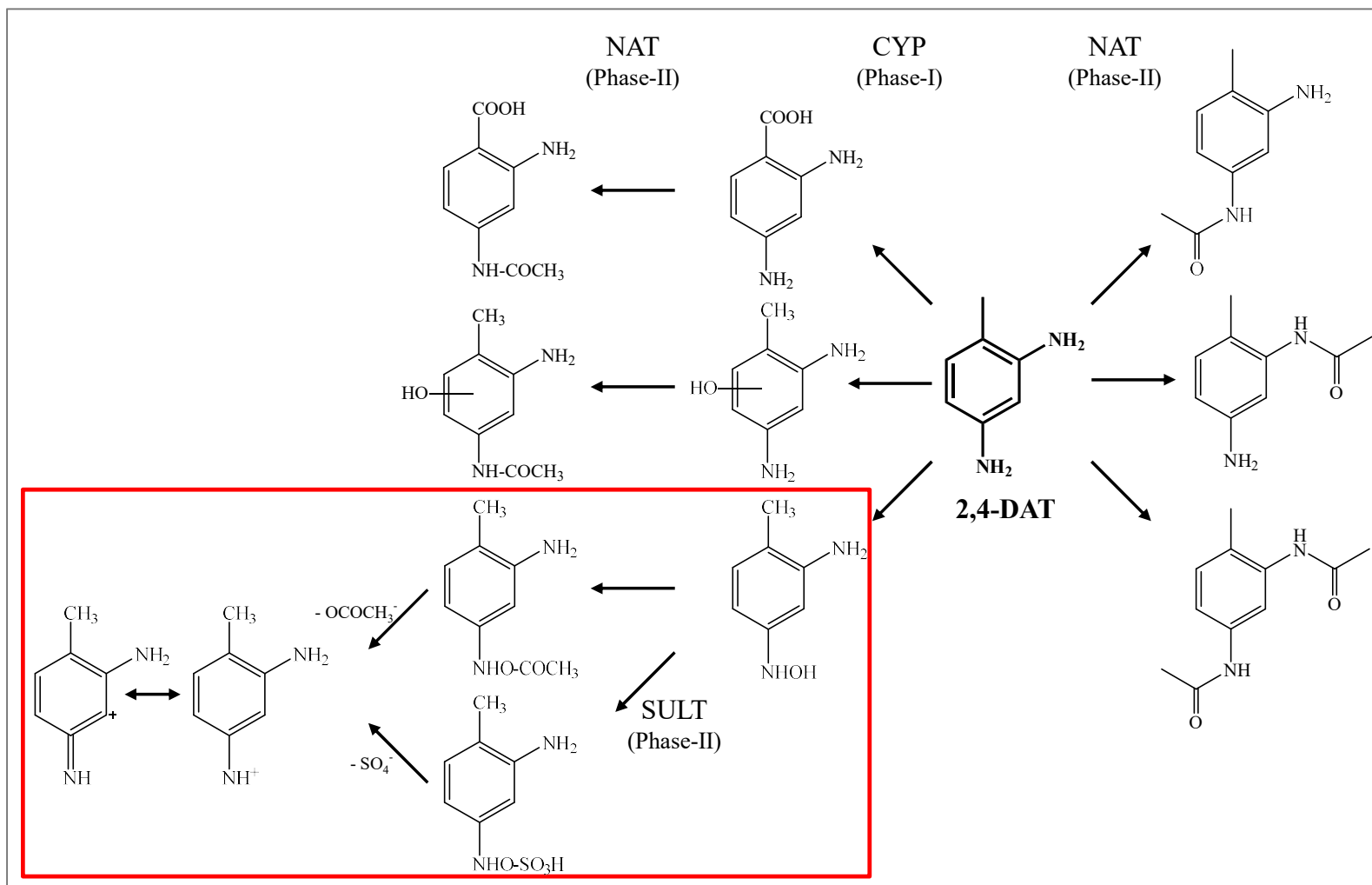


Abbildung 1-6: Auswahl verschiedener Biotransformationsreaktionen für 2,4-DAT in der Leber. In verschiedenen Studien konnten detektierte Metabolite den unterschiedlichen gezeigten Biotransformationsreaktionen zugeordnet werden [68-71]. Entscheidend für die toxische Wirkung von 2,4-DAT ist, ob es durch eine CYP-katalysierte Phase-I-Biotransformationsreaktion N-hydroxyliert wird und anschließend eine O-Acetylierung oder O-Sulfonierung stattfindet (roter Kasten). Findet die N-Acetylierung direkt statt (Reaktionen nach rechts), so können die Metabolite nicht zu reaktiven Nitrenium- oder Carboniumionen zerfallen [51].

1. Einleitung

In verschiedenen Nagerstudien wurde gezeigt, dass 2,4-DAT genotoxische und zytotoxische Effekte aufweist, nachdem es in der Leber metabolisiert wurde [63, 64, 72-74]. Ebenso wurden in humanen Systemen wie der Zelllinie HepG2 (Zelllinie eines Leberkarzinoms, siehe 2.2.2) oder auch rekonstruierten Epidermismodellen zytotoxische Effekte hoher 2,4-DAT-Konzentrationen nachgewiesen [67, 75]. Toxische Metabolite entstehen aus aromatischen Aminen wie 2,4-DAT, wenn diese durch CYP oxidativ zu N-Hydroxylaminen umgewandelt werden (siehe Abbildung 1-6), welche anschließend Substrate für Sulfotransferasen oder N-Acetyltransferasen (NAT) darstellen. Die dominierende Biotransformationsreaktion der NAT ist die N-Acetylierung, bei der ein Acetylrest (-COCH₃) vom Cofaktor Acetyl-Coenzym A auf eine Aminogruppe (-NH₂) übertragen wird. Wurde so eine Aminofunktion zuvor durch CYP hydroxyliert (-NHOH), kann auch eine O-Acetylierung durch NAT katalysiert werden (siehe Abbildung 1-6). Die resultierenden Acetoxyester sind instabil und können leicht zerfallen, wobei hoch reaktive Nitrenium- oder Carboniumionen entstehen können. Diese können anschließend kovalent an zelluläre Proteine oder auch DNA binden und somit die Zelle schädigen [51]. Für die toxischen Effekte von 2,4-DAT ist also entscheidend, ob die NAT-katalysierte Phase-II-Biotransformation in der Haut mit oder ohne vorherige CYP-katalysierte Phase-I-Biotransformation stattfindet. Bisherige Studien zeigten die direkte N-Acetylierung aromatischer Amine als dominierende Biotransformationsreaktion in humanen Hautgeweben [61, 76]. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob das auch für 2,4-DAT zutrifft und ob es zwischen exzidiierter und rekonstruierter Humanhaut Unterschiede in der Biotransformation gibt.

1.4 ZIELSETZUNG

In den letzten Jahren haben rekonstruierte Hautmodelle (RHE und RHS) als alternative Testsysteme zum Tierversuch stark an Bedeutung gewonnen. Der Fokus lag bisher jedoch vor allem auf den Epidermismodellen und weniger auf den RHS, obwohl die 3D-Vollhautmodelle durch ihr zusätzliches Dermisäquivalent der *in vivo*-Situation der Haut näher sind. Die bisherige Charakterisierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme in rekonstruierten Hautmodellen konzentrierte sich bei Phase-I-Reaktionen auf CYP [77, 78] und Esterasen [17] sowie NAT oder UGT für Phase-II-Reaktionen [78, 79]. Andere fremdstoffmetabolisierende Enzyme wurden vor allem in RHS noch nicht untersucht. Zielstellung dieser Arbeit war es deshalb, die Charakterisierung um weitere Enzyme zu ergänzen und die rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT untereinander sowie mit Humanhaut *ex vivo* zu vergleichen.

Ziel des ersten Teilprojektes dieser Arbeit war die Charakterisierung der basalen Expression der fremdstoffmetabolisierenden Phase-I-Enzyme MAO und 5 α R sowie der Phase-II-Enzyme SULT und GST auf Gen- und Proteinebene. Dafür wurde die Genexpression in exzidierte und rekonstruierte Humanhaut und außerdem in Zellkulturen isolierter primärer basaler Keratinozyten und Fibroblasten mittels RT-PCR analysiert. Um die Enzymaktivität beurteilen zu können, galt es zunächst verschiedene kommerzielle Assays (MAO, GST) oder auf Basis von Fachliteratur selbst entwickelte Assays (SULT) zu etablieren. Im Falle einer nicht detektierbaren Enzymaktivität sollte die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht werden.

Die zweite Kernaufgabe dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Biotransformationskapazität von den intakten RHS Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT im Vergleich zu exzidierte Humanhaut anhand des Xenobiotikums 2,4-DAT. Dafür wurde zunächst eine nicht-toxische Arbeitskonzentration von 2,4-DAT mithilfe von Zytotoxizitätsstudien an Einzelzellkulturen bestimmt. Nach topischer Applikation auf RHS und native Humanhaut wurden 2,4-DAT und dessen potentielle Metabolite auf der Geweboberfläche, im Gewebe und im Akzeptormedium quantifiziert, um einerseits das Penetrations- und Permeationsverhalten und andererseits die enzymatische Ausstattung anhand der gebildeten Metabolite beurteilen zu können. Dafür war zunächst die Etablierung einer geeigneten Probenaufarbeitung und HPLC/UV-Detektionsmethode

1. Einleitung

notwendig. Weiterhin wurde die Metabolisierung von 2,4-DAT in den APC der Haut, also epidermalen LC und dermalen DC untersucht, um zu beurteilen ob es im Falle des aromatischen Amins 2,4-DAT zu einer Bioaktivierung kommt [80]. Da deren Isolierung aus Humanhaut sehr schwer und nur mit geringen Ausbeuten verbunden ist, wurden für diese Arbeit *ex vivo* Monozyten-abgeleitete LC und DC (MoLC bzw. MoDC) verwendet, die in ihren Eigenschaften sehr gut mit LC und DC *in vivo* übereinstimmen [81-83]. Auch die in der Haut überwiegenden epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten wurden hinsichtlich der Biotransformation von 2,4-DAT analysiert, um einen Überblick über den Anteil der verschiedenen Zelltypen an der gesamten Biotransformationskapazität der Hautgewebe zu erhalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 GERÄTE

-80°C Gefrierschrank Hera freeze	Heraeus, Hanau
-20°C Gefrierschrank	Siemens, München
4°C Kühlschrank	Siemens, München
Absaugpumpe	VWR, Darmstadt
Agilent 6210 ESI-TOF/MS	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Autoklav (V Serie)	Systec, Wettengel
Backofen	Memmert, Schwabach
Brutschrank (BB6220; 37°C, 5% CO ₂)	Heraeus, Hanau
Dermatom Acculan 3 Ti	Aesculap, Tuttlingen
Dounce Tissue Grinder	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Einfrierhilfe Nalgene [®] Cryo 1 °C	Nalge Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA
Filtrationseinheit Millipore [®]	Millipore-Waters, Eschborn
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Flüssigstickstofflagerbehälter (Arpege 70)	Air Liquide, Paris, Frankreich
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
HPLC-Anlage LaChrom [®] Autosampler L-7200 HSM-Software D-7000 Interface D-7000 Pumpe L-7100 UV-Detektor L-7400	Merck Hitachi, Tokio, Japan
LC-MS Agilent 1100 Series mit Diodenarray-Detektor	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Lochstanze 10 (DIN 7200; Durchmesser: 10 mm)	Bauhaus, Berlin
MACS MidiMACS [™] Separator MACS MultiStand LS Columns MACS MicroBeads anti-CD1a	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mettler AK160 Laborwaage	Mettler, Gießen
Mettler Toledo XS205 Analysenwaage	Mettler, Gießen
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell System	BioRad, München
MPLC-Anlage Biotage Isolera Prime Systems Biotage SNAP Ultra C18 Kartusche	Biotage, Uppsala, Schweden
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena

2. Material und Methoden

NMR Bruker Avance III	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pinzetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten (Eppendorf Reference [®] , 10, 20, 100, 200 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Easypet [®])	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetboy [®]) PowerPac [™]	Integra Bioscience, Fernwald BioRad, München
PXi/PXi Touch Gel Imaging System	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Savant SC 210 A Speed Vac Concentrator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Schüttelinkubator TH 10	Edmund Bühler, Victor Becker Krankenhaus Laborbedarf, Berlin
Skalpelle	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilarbeitsbank (LaminAir [®] HB 2472)	Heraeus, Hanau
Thermoblock: T-Gradient	Biometra, Göttingen
TissueLyzer II, inklusive rostfreier Stahlkugeln (Durchmesser: 5 mm)	Qiagen, Hilden
Trans-Blot [®] Turbo [™] Blotting System	BioRad, München
Ultraschallbad Sonorex [®] RK100	Bandelin, Berlin
Ultraschallbad USR 57	Merck Eurolab N.V., Belgien
Umkehrmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung Axiovert 40C	Zeiss, Jena
UVS 400 A Univ. Vac. System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vortex Genie 2 [™]	Bender Hobein, Zürich, Schweiz
Wasseraufbereitungsanlage (SG LaboStar)	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge für 0,5-2,0 ml Reaktionsgefäße: Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für 15 ml- und 50 ml-Zentrifugationsröhrchen: Megafuge [®] 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge für RT-PCR und cDNA Synthese: Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL

Aesculap Dermatorklingen	Aesculap, Tuttlingen
Filter für Absaugpumpe (Pall Vacushield™ PN 4402)	VWR, Darmstadt
Filter-Aufsatz 250 ml	TPP, Transadingen, Schweiz
Glasröhrchen mit Schraubverschluss, 12 ml, silikonisiert ^{II}	DURAN Group, Wertheim/Main
HPLC Zubehör	
0,1 ml Mikroinsert, Klarglas	VWR, Darmstadt
8 mm Septum, Silikon weiß/PTFE blau, geschlitzt	
Glasfläschchen mit Gewinde, 1,5 ml, 32x11,6 mm	
Schraubdeckel, 8 mm, geschlitzt	
Vorsäule: Kinetex™ Phenyl-Hexyl Enhancement Kit	Phenomenex, Aschaffenburg
Säule: 250x4,6 mm Kinetex™ 5 µm Phenyl-Hexyl 100 Å	
Säule: LiChroCART® 250-4, 5 µm, RP-8 oder RP-18	Merck, Darmstadt
Immun-Blot PVDF Membran, (26 cm x 3,3 m)	VWR, Darmstadt
Immunplatte F96 (mit Zertifikat) für ELISA	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen 2 ml	Biochrom, Berlin
LC-MS Zubehör	
Säule: Phenomenex-Luna-C18 (4,6x100 mm, 3 µm, 100 Å)	Phenomenex, Aschaffenburg
LightCycler 480 Folien	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler 480 Mikrotiterplatte, 96-well, klar	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
Membranfilter 0,45µm, PTFE, steril für Easypet	VWR, Darmstadt
Millicell® Zellkultureinsätze (Durchmesser: 10 mm)	Merck Millipore, Darmstadt
Nanosep® Centrifugal Devices	PALL Life Sciences, Washington, DC, USA
Nylonnetz (Monofil), Porengröße: 150 µm	Neolab, Heidelberg
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas, 230 mm	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße 8er	Carl Roth, Karlsruhe
pH-Papier (pH 8,0-10,0)	Macherey-Nagel, Düren

^{II} Die Glasröhrchen wurden selbst silikonisiert. Dafür wurden sie komplett mit einer Silikon/Isopropanol-Lösung befüllt und circa 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, bevor die Silikon/Isopropanol-Lösung wieder aus den Glasröhrchen entfernt wurde. Im Anschluss wurden sie 3 h bei 120 °C gebacken und nach Abkühlen waren die Glasröhrchen silikonisiert und gebrauchsfertig.

2. Material und Methoden

Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Biosphere [®] , RNase frei (10, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße <i>safe-lock</i> (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reservoirgefäß	VWR, Darmstadt
Rotilabo [®] -Skalpell-Klingen (11 und 24 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Serologische Pipette (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter (Celluloseacetat, Poren: 0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter (Polyethersulfon, Poren: 0,2 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilfilter: Filtropur S plus 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilisationsindikatorband (Farbumschlag nach 20 min bei 121°C)	Carl Roth, Karlsruhe
Transportröhrchen für Vorhautbiospien	Sarstedt, Nümbrecht
UV-STAR Mikroplatte, 96-well, F-Boden, µclear; für GST Assay	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Multiwell 24-well	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkultur Testplatten (6F und 96F)	TPP, Transadingen, Schweiz
Zellkultur Testplatten (96F, schwarz)	VWR, Darmstadt
Zellkultur Testplatten (96F, weiß)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	TPP, Transadingen, Schweiz
Zellkulturplatten (96F, transparent); für BCA-Assay	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen (Durchmesser: 53 und 87 mm)	TPP, Transadingen, Schweiz
Zellsieb, Porengröße: 70 µm	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugationsröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 CHEMIKALIEN UND ANDERE VERBRAUCHSLÖSUNGEN

1-Chloro-2,4-dinitrobenzen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2,4-Diaminotoluol (2,4-DAT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Propanol	VWR, Darmstadt
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7-Hydroxycoumarin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
7-Hydroxycoumarinsulfat	Biozol, München
Aceton, <i>HPLC grade</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril, <i>LC-MS grade</i>	Fisher Scientific, Loughborough, Großbritannien
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Amplex [®] Red Monoamine Oxidase Assay Kit	Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA), proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cyanamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxycholsäure	VWR, Darmstadt
Desoxyribonuklease I (Kit)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dichlormethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylether	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO, <i>plant cell culture tested</i>)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Dispase II	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
Dnase I Kit, <i>Amplification grade</i> , AMPD1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DuoSet ELISA Human IL-1α	R&D Systems, Abingdon, Großbritannien
DuoSet ELISA Human IL-8	R&D Systems, Abingdon, Großbritannien
EpiDerm [™] FT EpiDerm [™] FT <i>maintenance medium</i> (Epi-400-ASY)	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA

2. Material und Methoden

Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol 96 %	VWR, Darmstadt
Ethanol absolut	VWR, Darmstadt
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
GST Assay Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GST, isoliert aus Pferdeleber	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalibrierlösungen (pH 7 und pH 10)	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Kaliumchlorid (KCl, <i>cell culture tested</i>)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Keratinocytes Growth Medium (KGM)-BulletKit, bestehend aus Keratinocytes Basal Medium (KBM) und SingleQuots	Lonza, Basel, Schweiz
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgC ₁₂ ·6 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe
MAO-Glo [™] Assay	Promega, Mannheim
Methanol, <i>HPLC grade</i>	Fisher Scientific, Loughborough, Großbritannien
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid (M1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-(5-Amino-2-methylphenyl)acetamid (M2)	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl, pro analysi)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid-Plättchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Nonidat P-40	VWR, Darmstadt
NucleoSpin [®] RNA II Kit zur RNA-Isolation	Macherey-Nagel, Düren
Nycoprep [™] 1,077	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAA Laboratories, Coelbe
Phenion [®] FT Phenion [®] FT ALI-Medium	Henkel AG & Co. KgaA, Düsseldorf
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Precision Plus Protein [™] WesternC [™] Standards	BioRad, München
Primer	Tib Molbiol, Berlin

Protease/Phosphatase Inhibitor (100x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
rekombinante humane MAO A: MAO A Supersomes	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
rekombinante humane SULT 1A1	R&D Systems, Abingdon, Großbritannien
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (HCl), konzentriert (37 %)	Merck, Darmstadt
SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Silikon/Isopropanol	Serva, Heidelberg
Stickstoff (flüssig)	Air Liquide, Paris, Frankreich
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzidin	Carl Roth, Karlsruhe
Toluol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris PUFFERAN	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trockeneis	FU Berlin, Institut für Anorganische Chemie
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Zitratsäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Zusätze für MoLC/MoDC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Differenzierungsmedien:	
TGF-β1	
GM-CSF	
IL-4	

2.2 ZELLKULTUR

2.2.1 KERATINOZYTEN, FIBROBLASTEN

Zellisolation

Primäre basale Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus juvenilen Vorhäuten isoliert (siehe 2.3.1). Die Isolation fand einem Standardarbeitsprotokoll folgend unter sterilen Bedingungen statt [84] und alle verwendeten Lösungen und Nährmedien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der für die Zellkultivierung benötigten Nährmedien und Puffer.

Medium bzw. Puffer	Zusammensetzung
Dispase-Arbeitslösung	<ul style="list-style-type: none"> • Dispase, 1,2 U/ml • in PBS
Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none"> • Dimethylsulfoxid, 10 % • fetales Kälberserum, 10 % • in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Fibroblastenbasalmedium (FBM)	<ul style="list-style-type: none"> • L-Glutamin, 2 mM • in DMEM
Fibroblastenwachstumsmedium (FGM)	<ul style="list-style-type: none"> • fetales Kälberserum, 10 % • L-Glutamin, 2 mM • in DMEM
Keratinozytenbasalmedium (KBM)^{III}	<ul style="list-style-type: none"> • ggf. Amphotericin • ggf. Gentamycin • in KBM
Keratinozytenwachstumsmedium (KGM)^{III}	<ul style="list-style-type: none"> • Amphotericin • Gentamycin • humaner epidermaler Wachstumsfaktor • Hydrocortison • Insulin • Rinderhypophysenextrakt • in KBM
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	<ul style="list-style-type: none"> • KCl, 0,2 g/l • KH₂PO₄, 0,2 g/l • NaCl, 8,0 g/l • Na₂HPO₄, 1,44 g/l • in bidestilliertem Wasser • pH 7,4

^{III} Die genaue Zusammensetzung des KBM sowie der Zusätze des KGM ist nur dem Hersteller bekannt. Bei der Inkubation von exzidierte Humanhaut wurde das KBM mit den Antibiotika Amphotericin und Gentamycin versetzt, während die Inkubation von Keratinozyten in antibiotikafreiem KBM oder KGM stattfand.

Transportmedium	<ul style="list-style-type: none"> • fetales Kälberserum, 10 % • Penicillin, 100 U/ml • Streptomycin, 100 µg/ml • in DMEM
Trypsin/EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA, 0,67 mg/ml • Trypsin, 1,67 mg/ml • in PBS

Die Vorhäute wurden mit PBS gewaschen und nach Entfernung des subkutanen Fettgewebes in circa 5x5 mm große Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden in einer Zellkulturschale (Durchmesser: 53 mm) in Dispase-Lösung eingelegt und für 20 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde mithilfe von Pinzetten die Epidermis abgezogen, in einem 15 ml-Zentrifugationsröhrchen mit 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung und 12 ml PBS gesammelt und 20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 ml FGM zugegeben, um den Trypsinverdau abzustoppen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) filtriert, um die Keratinozyten weiter zu vereinzeln. Die filtrierte Suspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, Raumtemperatur (RT)) und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert, um die Zellzahl unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer zu ermitteln. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Keratinozyten in KGM aufgenommen, in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät (2x10⁶ Keratinozyten pro Flasche, Zellpassage (p): p0) und unter Standardbedingungen (im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, wobei das alte Medium inklusive toter, schwimmender Zellen und Zelltrümmer entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch frisches KGM ersetzt wurde. Nach 7 Tagen, in denen alle 3 Tage ein Mediumwechsel erfolgte, wurden die Keratinozyten passagiert. Dafür wurde das Kultivierungsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin/EDTA für 2-5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zum Zellkulturflaschenboden, sowie die Zell-Zell-Adhäsion zu lösen. Durch Zugabe von FGM wurde die Trypsinierung gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Nach Waschen mit PBS wurde das Keratinozytenpellet in KGM resuspendiert und die Zellen auf neue 75 cm²-Zellkulturflaschen verteilt (Zellpassage: p1). Die Subkultivierung erfolgte wie bereits beschrieben und wenn die Keratinozyten eine Konfluenz von 80-90 % aufwiesen, wurden sie aus den Zellkulturflaschen entnommen (Zellpassage: p2)

2. Material und Methoden

und für Experimente verwendet oder zur Langzeitlagerung eingefroren (siehe unten).

Die Dermis-Stücken wurden mit der apikalen Seite zum Zellkulturplattenboden in die Vertiefungen einer 6-well-Zellkulturplatte verteilt und für 30 min bei RT trocken inkubiert. Es folgte die vorsichtige Zugabe von je 1,5 ml FGM pro Vertiefung und die Inkubation der Platten unter Standardbedingungen. Nach einer Woche, wenn die Auswanderung von Fibroblasten aus den Dermis-Stücken mikroskopisch bestätigt wurde, wurden die Dermis-Stücken entfernt, das Medium gewechselt und die isolierten Fibroblasten (Zellpassage: p0) weiter kultiviert, bis die Zellen in den Vertiefungen zu circa 90 % konfluent waren (Dauer: rund 4 Wochen). Während dieser Zeit wurde spätestens alle 3 Tage das Medium gewechselt. Die Fibroblasten wurden analog den Keratinozyten passagiert, wobei die Zellen aus 2 Vertiefungen der 6-well-Zellkulturplatte in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit FGM überführt wurden (Zellpassage: p1). Auch die Fibroblasten wurden für Experimente verwendet oder eingefroren (Zellpassage: p2), nachdem eine Konfluenz der Zellen von circa 90 % in den Zellkulturflaschen erreicht war.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Keratinozyten und Fibroblasten, die nicht direkt für Experimente verwendet wurden, wurden zur Langzeitlagerung in Zellpassage p2 eingefroren. Dafür wurden die Zellen nach den bereits beschriebenen Schritten aus den Zellkulturflaschen geerntet und ihre Zellzahl bestimmt. Das Zellpellet wurde anschließend in Einfriermix resuspendiert, sodass 3×10^6 Keratinozyten bzw. $1,5 \times 10^6$ Fibroblasten pro 1,8 ml Einfriermix in je ein Kryoröhrchen überführt wurden. Die Kryoröhrchen wurden in eine auf Zimmertemperatur temperierte Einfrierhilfe gegeben und anschließend bei -80 °C über Nacht eingefroren. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank für die Langzeitlagerung überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. Die 1,8 ml Zellsuspension wurden anschließend in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen mit 8 ml warmem PBS (37 °C) gegeben und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Daraufhin wurde das Zellpellet in 25 ml warmem Wachstumsmedium (37 °C)

resuspendiert, je 12,5 ml pro 75 cm²-Zellkulturflasche verteilt und die Zellen wie bereits beschrieben kultiviert, bis eine Konfluenz von circa 70-80 % erreicht war.

Für die Analyse der Genexpression von Keratinozyten oder Fibroblasten wurden Zellen verschiedener Einzelspender verwendet. Alle übrigen Experimente wurden mit Zellenpools aus je 3 verschiedenen Spendern durchgeführt, um interindividuelle Schwankungen zu minimieren. Die Primärzellen wurden in den verschiedenen Experimenten ab Passage 2 bis maximal Passage 4 verwendet.

2.2.2 HEPG2

Die humane, kaukasische Leberzellkarzinom-Zelllinie HepG2 wurde bei der *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, Großbritannien) erworben. Die Kultivierung dieser adhärennten Zelllinie erfolgte in HepG2-Wachstumsmedium (HGM, siehe Tabelle 2-2). Für die Experimente zur Zytotoxizität von 2,4-DAT wurden HepG2-Zellen in den Passagen 11-15 verwendet und nicht benötigte HepG2 wurden nach der bereits beschriebenen Methode eingefroren.

Tabelle 2-2: Übersicht der Kultivierungsmedien für HepG2 Zellen.

Medium	Zusammensetzung
HepG2-Basalmedium (HBM)	<ul style="list-style-type: none"> • L-Glutamin, 2 mM • nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % • Penicillin, 100 U/ml • Streptomycin, 100 µg/ml • in Minimum Essential Medium Eagle
HepG2-Wachstumsmedium (HGM)	<ul style="list-style-type: none"> • fetales Kälberserum, 10 % • L-Glutamin, 2 mM • nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % • Penicillin, 100 U/ml • Streptomycin, 100 µg/ml • in Minimum Essential Medium Eagle

2.2.3 MoLC, MoDC

Die Monozyten-abgeleiteten Langerhans Zellen (MoLC) und Dendritischen Zellen (MoDC) wurden analog Said *et al.* [85, 86] hergestellt.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch Gerrit Müller am Institut für Pharmazie (Pharmakologie und Toxikologie) der Freien Universität

2. Material und Methoden

Berlin durchgeführt. Alle verwendeten Zellkulturmedien und Puffer sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Isolation von Monozyten

Frische humane Blutkonserven (Quelle: Deutsches Rotes Kreuz Blutspendedienst Ost, Berlin, mit Erlaubnis EA4/036/14 der Ethikkommission der Berliner Ärztekammer) wurden unter sterilen Bedingungen mit PBS/EDTA auf das zwei- bis dreifache ihres ursprünglichen Volumens verdünnt und anschließend auf eine NycoPrepTM 1,077 Dichtelösung überschichtet. Während der anschließenden Zentrifugation (1400 rpm, 45 min, 4 °C, ohne Bremse) wurden die zellulären Bestandteile des Blutes ihrer Dichte nach aufgetrennt. Die Fraktion der mononukleären Blutzellen (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) bildete nach der Zentrifugation eine Grenzschicht zwischen Blutplasma und Dichtelösung und wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Waschen mit kaltem PBS/EDTA (4 °C) und erneuter Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das Zellpellet (PBMC) im warmen Kompletmedium resuspendiert (37 °C) und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche eingesät. Nach 35 min Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen, in denen die Monozyten am Flaschenboden adhärirten, wurde das Kompletmedium abgesaugt und durch Differenzierungsmedium ersetzt.

Tabelle 2-3: Übersicht der Kultivierungsmedien für MoLC und MoDC.

Medium	Zusammensetzung
Kompletmedium	<ul style="list-style-type: none">• fetales Kälberserum, hitze-inaktiviert^{IV}, 10 %• L-Glutamin, 2 mM• Penicillin, 100 U/ml• Streptomycin, 100 µg/ml• in RPMI-1640
MoDC-Differenzierungsmedium	<ul style="list-style-type: none">• Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, 100 ng/ml• Interleukin 4, 20 ng/ml• in Kompletmedium

^{IV} Die Hitze-Inaktivierung erfolgte durch Inkubation im Wasserbad für 30 min bei 56 °C.

MoLC-Differenzierungsmedium I	<ul style="list-style-type: none"> • Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, 100 ng/ml • Interleukin 4, 20 ng/ml • Transformierender Wachstumsfaktor β1, 20 ng/ml • in Kompletmedium
MoLC-Differenzierungsmedium II	<ul style="list-style-type: none"> • Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, 100 ng/ml • Transformierender Wachstumsfaktor β1, 20 ng/ml • in Kompletmedium
PBS/EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA, 2 mM • in PBS

Kultivierung und Differenzierung

Die aus PBMC isolierten Monozyten dienten als Vorläuferzellen für die *ex vivo* Differenzierung in Monozyten-abgeleitete Langerhans Zellen (MoLC) oder Dendritische Zellen (MoDC). Durch Zugabe spezifischer Differenzierungsmedien wurde die insgesamt 7 Tage dauernde Differenzierung induziert. Während dieser Zeit wurden die Zellen im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert, wobei alle 2 Tage das Medium zur Hälfte entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde.

Um MoDC zu generieren, wurde das MoDC-Differenzierungsmedium verwendet. Für die Differenzierung der MoLC wurden die Monozyten erst in MoLC-Differenzierungsmedium I und ab Tag 2, also mit dem ersten Mediumwechsel, in MoLC-Differenzierungsmedium II inkubiert.

Zellseparation

Mittels magnetischer Zellsortierung (MACS, engl. *magnetic-activated cell separation*) wurden die MoLC und MoDC an Tag 7 der Differenzierung separiert. MoLC und MoDC exprimieren spezifisch das Oberflächenprotein CD1a (CD = engl. *cluster of differentiation*) und durch die Inkubation mit anti-CD1a MicroBeads und der anschließenden MACS nach Herstellerangaben [87] wurden die MoLC bzw. MoDC von übrigen Zellen und Verunreinigungen getrennt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS/EDTA resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml) und direkt für die Experimente verwendet (siehe 2.7 und 2.7.5.1).

2.3.1 NATIVE HUMANHAUT *EX VIVO*

Die normalen, humanen juvenilen Vorhäute (NHFS, engl. *normal human juvenile foreskin*) wurden überwiegend für die Isolation von Keratinozyten und Fibroblasten verwendet. Die Vorhäute wurden in kooperierenden chirurgischen Arztpraxen bei Zirkumzisionen gewonnen und mit dem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt (mit Erlaubnis EA1/081/13 der Ethikkommission der Berliner Ärztekammer). Die Biopsien wurden unmittelbar nach der operativen Entfernung in Transportmedium (siehe Tabelle 2-1) eingelegt, bei 4 °C gelagert und nach spätestens 36 h zum Institut transportiert um dort die Primärzellen zu isolieren (siehe 2.2.1).

Als adulte normale humane Haut (NHS, engl. *normal human skin*) wurden operativ entfernte Hautstücken aus Abdominal- oder Mammareduktionen verwendet, die uns nach Einverständniserklärung des Patienten von der Abteilung für Plastische Chirurgie des Emil-von-Behring-Krankenhauses Berlin zur Verfügung gestellt wurden (mit Erlaubnis der Ethikkommission der Berliner Ärztekammer). Die Bearbeitung der NHS erfolgte nach standardisierten Protokollen [19]. Direkt nach operativer Entnahme wurde das subkutane Fettgewebe entfernt und die NHS anschließend gekühlt (4 °C) zum Institut transportiert, wo innerhalb von 4 h nach Entnahme die weitere Bearbeitung folgte. Die Hautoberfläche wurde mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Acculan 3TI Dermatom auf eine definierte Schichtdicke von $500 \pm 25 \mu\text{m}$ geschnitten. Mit einer Stanze wurden runde Stücke aus der Haut geschnitten (Durchmesser: 1 cm, Oberfläche: $0,78 \text{ cm}^2$). Für die Untersuchung der Biotransformation von 2,4-DAT wurden die Hautstücke in Millicell[®] Zellkultureinsätze in einer 6-well-Zellkulturplatte platziert, die pro Vertiefung 1 ml KBM (inklusive Antibiotika, siehe Tabelle 2-1) enthielt. Es folgte eine Vorinkubation von 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂, bevor das Medium gewechselt und mit den Experimenten begonnen wurde.

2.3.2 REKONSTRUIERTE 3D-VOLLHAUTMODELLE

Die in dieser Arbeit untersuchen RHS waren das Phenion[®]FT (Durchmesser: 1,3 cm, Oberfläche: $1,3 \text{ cm}^2$) und das EpiDerm[™]FT (Durchmesser:

1,2 cm, Oberfläche: 1 cm²). Beide RHS wurden den jeweiligen Herstellerprotokollen folgend unter sterilen Bedingungen kultiviert [88, 89], wobei ausschließlich das vom Hersteller zur Verfügung gestellte Material (Plastikware und Nährmedien) verwendet wurde (siehe auch [17]; Abbildung 2-1). Beide RHS wurde nach Erhalt für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert und das Akzeptormedium wurde analog der exzidierten Humanhaut (siehe 2.3.1) vor Beginn der Experimente durch frisches Medium ersetzt.

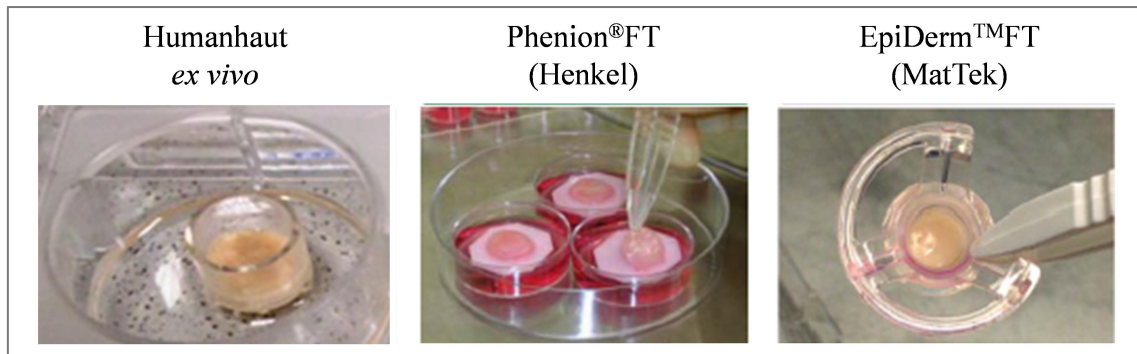


Abbildung 2-1: Kultivierung von exzidiertem und rekonstruierter Vollhaut. Humanhaut *ex vivo* und das EpiDerm™FT wurden in speziellen Zellkultureinsätzen in den Vertiefungen einer 6-well-Zellkulturplatte kultiviert, wohingegen das Phenion®FT auf Filterpapiere in separierten Zellkulturschalen inkubiert wurde [88-90].

2.4 GENEXPRESSION

2.4.1 RNA ISOLATION

Die Isolation der RNA erfolgte unter Anwendung des Kits *NucleoSpin® RNA II* nach Herstellerangaben und mit den zur Verfügung gestellten Materialien und Puffern [91]. Weitere benötigte Lösungen sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Keratinocyten oder Fibroblasten wurden wie beschrieben kultiviert und geerntet (siehe 2.2.1). Das Zellpellet wurde anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in 350 µl RNA-Isolationspuffer (siehe Tabelle 2-4) resuspendiert und bis zur weiteren Isolation bei -80 °C gelagert.

Für die Untersuchungen zur Genexpression wurden die RHS mit einem Skalpell halbiert und von einer Hälfte die Epidermis mit einer Pinzette abgezogen. Die kompletten Modelle bzw. die separierte Epidermis und das Dermisäquivalent wurden genauso wie die exzidierte Humanhaut (NHS oder NHFS) für die RNA-Isolation in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit einer Stahlkugel (Durchmesser: 5 mm)

2. Material und Methoden

und je 350 µl RNA-Isolationspuffer gegeben und im *TissueLyzer II* homogenisiert: NHS, NHFS 12 min bei 30 Hz; komplettes Phenion[®]FT und separierte Dermis 5 min bei 25 Hz, separierte Epidermis 0,5 min bei 25 Hz; komplettes EpiDerm[™]FT und separierte Epidermis oder Dermis je 2 min bei 25 Hz. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Isolation bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen der Proben wurde die RNA-Isolation nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei jedoch der Schritt des DNA-Verdau ausgelassen wurde [91]. Die isolierte RNA (und DNA) wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2-4: Arbeitslösungen für die RNA-Isolation.

Lösung	Zusammensetzung
DEPC-Wasser	<ul style="list-style-type: none">• Diethylpyrocarbonat (DEPC), 0,1 %• in bidestilliertem Wasser DEPC wurde zum bidestillierten Wasser gegeben, anschließend gut vermischt und über Nacht bei geöffnetem Verschluss unter einem Abzug stehen gelassen. Am Folgetag wurde die Lösung autoklaviert und nach Abkühlen bei 4 °C gelagert.
Ethanollösung (70 %)	<ul style="list-style-type: none">• DEPC-Wasser, 227,3 µl/ml• Ethanol (96 %), 772,7 µl/ml
RNA-Isolationspuffer	<ul style="list-style-type: none">• β-Mercaptoethanol, 1 %• in <i>NucleoSpin[®] RNA II</i> RA1 Puffer

2.4.2 cDNA SYNTHESE

Vor der cDNA-Synthese wurden die DNA aus den RNA-Proben unter Verwendung des *Dnase I-Kits* entfernt: 8 µl der isolierten RNA wurden mit 1 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl Dnase I versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde pro Reaktionsansatz 1 µl Stopplösung zugegeben und der DNA-Verdau durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min beendet. Nach Abkühlen der Proben auf Eis folgte die cDNA-Synthese mittels *RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit*. Dafür wurde 1 µl RNA mit 9 µl des cDNA-Mastermixes (siehe Tabelle 2-5) vermischt. Der Mastermix wurde in Abhängigkeit der Probenanzahl vorbereitet.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung des cDNA-Mastermixes (1x Ansatz).

Reagenz	Volumen [μ l]
Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ μ l)	1
5x Reaktionspuffer	4
RiboLock Ribonuklease Inhibitor (20 U/ μ l)	1
dNTP Mix (10 mM)	2
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	1

Es folgte die Inkubation im Thermoblock unter Verwendung der folgenden Temperatureinstellungen: 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 5 min bei 70 °C.

Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurde jede Probe durch Zugabe von 60 μ l DEPC-Wasser verdünnt und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR

Mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (RT-PCR, engl. *real time polymerase chain reaction*) wurde die Genexpression verschiedener am Fremdstoffmetabolismus beteiligter Enzyme analysiert. Hierfür wurden das *LightCycler*[®] 480 *SYBR Green I Master Kit* und die in Tabelle 2-6 aufgeführten Primer verwendet.

Für jeden Reaktionsansatz wurden 2 μ l cDNA mit 8 μ l des RT-PCR-Mastermixes versetzt (siehe Tabelle 2-7). Der Mastermix wurde in Abhängigkeit von der Probenanzahl vorbereitet. Die Analyse der Proben erfolgte in Duplikaten. Als Kontrolle der RT-PCR-Ansätze wurde anstelle der cDNA Wasser zugegeben.

Tabelle 2-6: Sequenzen der verwendeten Primer bei der Analyse der Genexpression fremdstoffmetabolisierender Enzyme.

Gen [Referenz]	F/ R	Primersequenz (5' → 3')	Produkt- größe [bp]
<i>MAOA</i> [92]	F	CCTTGACTGCCAAGATTCACCTC	93
	R	TGCACTTAATGACAGCTCCCAT	
<i>MAOB</i> [92]	F	CTTTTTGGAGAGACATTTGCC	116
	R	TCACAAGTAGCCCCCTTTTGT	
<i>5αR1</i> [93]	F	GGAATCTGTCTAGGAGCCCTCT	126
	R	TCCCCAAGTTCTCCACTTACACA	
<i>5αR2</i> [94]	F	CAGCTACAGGATTCCACAAGG	72
	R	TCAATGATCTCACCGAGGAA	
<i>5αR3</i> [95]	F	TCCAAGCTGGCTTCATGGTT	129
	R	CACTCGAAGAGTCTTCGTAA	
<i>SULT1A1</i> [96]	F	AACGCAAAGGATGTGGCA	120
	R	TCCGTAGGACACTTCTCCGA	

2. Material und Methoden

<i>SULT1E1</i> [96]	F	TGGTGGCTGGTCATCCAAA	130
	R	ACACGTGGACTCTTTCCTTTT	
<i>SULT2A1</i> [54]	F	CACCTCCCCATCCAGTTATTCC	287
	R	GTTCTTCCTGTGTCCTGTTTCAGC	
<i>SULT2B1a</i> [54]	F	TCACCACTTTACAGAAGAGGGACTG	299
	R	GATCTCGATCATCCAGGTCGTG	
<i>SULT2B1b</i> [54]	F	GGCTTGTGGGACACCTATGAAG	206
	R	ATCTCGATCATCCAGGTCGTGC	
<i>GSTP1</i> [97]	F	TCACCCTGTACCAGTCCAATACC	81
	R	CTGCCTCCTGCTGGTCCTT	
<i>GSTT1</i> [92]	F	AGAGTTGGATGTGACCCTGCA	87
	R	TCAGCTAAGGAGATGTGAGGACC	
<i>GSTA1</i> [98]	F	AGCCGGGCTGACATTCATCT	230
	R	TGGCCTCCATGACTGCGTTA	
<i>SDHA</i> [99]	F	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	86
	R	CCACCACTGCATCAAATTCATG	

Tabelle 2-7: Zusammensetzung des Mastermixes für die RT-PCR (1x Ansatz).

Reagenz	Volumen [μ l]
F-Primer (10x)	0,5
R-Primer (10x)	0,5
Wasser	2
SYBR Green Master Mix (2x)	5

Die Primer wurden als Lyophilisat geliefert und nach Ankunft in DEPC-Wasser gelöst (finale Konzentration: 10 μ M). Alle Primer wurden mit Hilfe eines cDNA-Mixes (hausgemacht, enthielt cDNA von basalen Keratinozyten, Fibroblasten und verschiedenen Zelllinien) auf ihre Funktionalität hin überprüft und die Produktgrößen der PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Zur Quantifizierung der RT-PCR wurde die Ct-Methode (Ct = engl. *cycle threshold*) gewählt. Eine relative Quantifizierung mit den Ct-Werten war möglich, indem man den Ct-Wert des untersuchten Gens auf den Ct-Wert des Referenzgens (Untereinheit A des Succinatdehydrogenase-Komplexes, SDHA) in der gleichen Probe bezog. Niedrige Δ Ct-Werte bedeuteten eine starke Genexpression und hohe Δ Ct-Werte eine geringe Genexpression. In dieser Arbeit wurde die Genexpression folgendermaßen quantifiziert: Δ Ct < 0 sehr starke, Δ Ct < 5 starke, $5 < \Delta$ Ct < 10 moderate und Δ Ct > 10 geringe Genexpression.

Primereffizienz

Die Effizienz der Primer wurde bestimmt und die ermittelten Werte bei der Berechnung der Ct-Werte eingesetzt. Dafür wurde eine Reihe verschiedener, definierter Konzentrationen aus cDNA- oder verdünntem RT-PCR-Produkt in Wasser hergestellt. Anschließend wurde mit dieser Verdünnungsreihe eine normale RT-PCR durchgeführt. Die Errechnung der Primereffizienz erfolgte durch die Software des *LightCyclers*, nachdem die Konzentrationen der cDNA-Proben eingetragen wurden [100].

2.5 PROTEINEXPRESSION

2.5.1 PROBENVORBEREITUNG

Zellpellets von Keratinozyten oder Fibroblasten bzw. Stücke exzidierte oder rekonstruierter Humanhaut wurden analog der RNA-Isolation (siehe 2.4.1) in je 250 µl RIPA-Puffer (siehe Tabelle 2-8) homogenisiert und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13200 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2-8: Zusammensetzung des RIPA-Puffers.

RIPA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • Desoxycholsäure, 0,5 % • EDTA, 1 mM • NaCl, 150 mM • Nonidat P-40, 1 % • Protease/Phosphatase-Inhibitor, 1 % ^V • SDS, 0,1 % • TRIS-HCl, 50 mM • in PBS
--------------------	--

2.5.2 BESTIMMUNG DER PROTEINMENGE

Die Bestimmung des Proteingehalts in den Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot als auch in den Proben zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (siehe 2.6) erfolgte mit dem *Pierce® BCA Protein Assay Kit*. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt sowie die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Materialien verwendet [101].

^V Der Protease/Phosphatase-Inhibitor wurde direkt vor Nutzung des RIPA-Puffers hinzugegeben.

2. Material und Methoden

Bei jeder Messung wurde zur Quantifizierung eine Standardreihe aus Bovinem Serumalbumin (BSA) mitgeführt (25-2000 µg/ml), die im jeweiligen Puffer hergestellt wurde.

2.5.3 SDS-PAGE

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde das *Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell System* verwendet [102]. Die für die SDS-PAGE verwendeten Puffer sowie die Rezeptur für das 10 %ige SDS-Polyacrylamidgel sind in Tabelle 2-9 und Tabelle 2-10 aufgelistet.

Tabelle 2-9: Übersicht der für die SDS-PAGE benötigten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Ladepuffer für Proteinproben (3x)	<ul style="list-style-type: none">• Bromphenolblau, 0,03 %• Dithiothreitol, 1,25 M^{VI}• Glycerol, 30 %• SDS, 6 %• TRIS-HCl, 187,5 mM• in bidestilliertem Wasser• pH 6,8
Laufpuffer (10x)	<ul style="list-style-type: none">• Glycin, 144,0 g/l• SDS, 10 g/l• TRIS-Base, 30,2 g/l• in bidestilliertem Wasser• pH 8,3
Sammelgel-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• TRIS-HCl, 15,0 g pro 250 ml• in bidestilliertem Wasser• pH 6,8
Trenngel-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• TRIS-Base, 56,2 g pro 250 ml• in bidestilliertem Wasser• pH 8,8

^{VI} Dithiothreitol wurde als 1,25 M Lösung (in Wasser) bei -20 °C gelagert und erst kurz vor dem Aufkochen der Proben hinzugegeben.

Tabelle 2-10: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE. Die angegebenen Mengen entsprechen einer Gesamtmenge von circa 10-12 ml, was für 2 Trenngele bzw. 4 Sammelgele gereicht hat. Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge (oben beginnend) pipettiert.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese[®] Gel 40 (37,5:1)	3,3 ml	3,3 ml
Gelpuffer (siehe Tabelle 2-9)	2,5 ml	2,5 ml
SDS (1 %) ^{VII}	0,1 ml	0,1 ml
Wasser	4,1 ml	6,1 ml
TEMED	5 µl	10 µl
APS (10 %) ^{VIII}	50 µl	50 µl

Die Gele für die SDS-PAGE wurden stets frisch hergestellt. Alle Proben wurden mit RIPA Puffer (ohne Protease/Phosphatase Inhibitor) so verdünnt, dass eine Proteinkonzentration 0,9 µg/µl vorlag. Anschließend wurden sie mit 3x Ladepuffer 3:1 (Probe:Ladepuffer) versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach Abkühlen auf Eis und Zentrifugation (13200 rpm, 5 min, 4 °C) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen (15 µl (9 µg)/Geltasche). Als Marker wurde der *Precision Plus ProteinTM WesternCTM Standards* verwendet, von dem pro Gel 5 µl aufgetragen wurden.

2.5.4 WESTERN BLOT

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert, die zuvor durch Inkubation für 10 sec in Methanol und anschließender Trocknung an der Luft aktiviert wurde. Es folgte die Rehydratisierung in Methanol für 10 sec und in bidestilliertem Wasser. Das Gel wurde vor Beginn des Blots 15 min im Blotpuffer inkubiert. Der Western Blot wurde im *Semi Dry*-Verfahren unter Verwendung des *Trans-Blot[®] TurboTM Blotting Systems* [103] durchgeführt. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 2-11 aufgeführt.

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde diese nach dem Western Blot 1-2 min mit Ponceau-Lösung angefärbt. Anschließend wurde die PVDF-Membran zweimal mit Wasser und

^{VII} Für die 1 %ige SDS-Lösung wurden 100 mg SDS in 10 ml bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die Lagerung dieser Lösung erfolgte bei RT.

^{VIII} Für das dafür benötigte 10 %ige Ammoniumpersulfat (APS) wurden 50 mg kurz vor Gebrauch in 500 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

2. Material und Methoden

einmal mit TBST gewaschen (Inkubation unter Schwenken für je 5 min bei RT), um die Färbung vollständig zu entfernen.

Unbesetzte Bindungsstellen der PVDF-Membran wurden durch Inkubation mit Blockpuffer für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator gesättigt, bevor mit Primärantikörper (siehe Tabelle 2-12) über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert wurde. Danach wurde die Membran mit TBST gewaschen (dreimal je 5 min unter Schwenken bei RT) und anschließend eine Stunde mit Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2-12) unter Schwenken bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Detektion mittels *SignalFireTM ECL* Reagenz und des *Pxi/Pxi Touch gel imaging system*.

Es folgte eine semiquantitative densitometrische Auswertung der erhaltenen Banden mit *ImageJ*, Version 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, USA), bei der das Signal des untersuchten Proteins (MAO A, MAO B oder SULT 1A1) auf das Signal des Referenzproteins (β -Aktin) derselben Probe normalisiert wurde.

Tabelle 2-11: Übersicht der für Western Blot benötigten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Blockpuffer	<ul style="list-style-type: none">• Magermilchpulver, 5 g pro 100 ml• in TBST (siehe unten)
Blotpuffer (10x)^{IX}	<ul style="list-style-type: none">• Glycin, 144 g/l• TRIS-Base, 30 g/l• in bidestilliertem Wasser• pH 8,3
Ponceau-Lösung	<ul style="list-style-type: none">• Ponceau S, 0,1 %• Essigsäure, 5 %• in bidestilliertem Wasser
TBST	<ul style="list-style-type: none">• Tween 20, 0,1 %• in TBS (1x, siehe unten)• pH 7,9-8,1
TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, 10x)^{VIII}	<ul style="list-style-type: none">• NaCl, 87,7 g/l• TRIS-HCl, 12,14 g/l• in bidestilliertem Wasser• pH 8,0

^{IX} Alle 10x Pufferstammlösungen wurden kurz vor ihrer Anwendung mit bidestilliertem Wasser zu 1x Arbeitslösungen verdünnt.

Tabelle 2-12: Übersicht der beim Western Blot verwendeten Antikörper.

Antikörper	Hersteller (Katalognr.)	Verdünnung in Blockpuffer
anti-MAO A (aus Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (sc-20156, polyklonal)	1:1000
anti-MAO B (aus Kaninchen)	Sigma-Aldrich (M1946, monoklonal)	1:3000
anti-SULT 1A1 (aus Maus)	R&D Systems (MAB5546, polyklonal)	1:1000
anti-β-Aktin (aus Kaninchen)	New England Biolabs (4970 S, polyclonal)	1:2000
anti-Kaninchen IgG-HRP (aus Ziege)	New England Biolabs (7074 S, polyklonal)	1:1000
anti-Maus IgG-HRP (aus Ziege)	Santa Cruz Biotechnology (sc-2005, polyklonal)	1:1000
Precision Protein™-StrepTactin-HRP	BioRad (161-0380)	1:5000

2.6 ENZYMAKTIVITÄT

2.6.1 MAO ASSAY

Die Aktivität der Monoaminoxidasen (MAO) wurde mithilfe zweier verschiedener kommerzieller Assays in Zell- und Gewebekomponenten untersucht.

Zum einen wurde das *Amplex[®] Red Monoamine Oxidase Assay Kit* verwendet [104]. Dieses Assay basiert auf der Detektion der Fluoreszenz von Resorufin, das aus dem Substrat *Amplex[®] Red* unter Einwirkung von H_2O_2 entsteht. Das H_2O_2 wiederum ist ein Nebenprodukt MAO-katalysierter Reaktionen (vgl. Abbildung 1-2). Alle benötigten Komponenten waren im Kit enthalten (Substrat, Inhibitoren spezifisch für MAO A oder MAO B) und das Protokoll des Herstellers wurde befolgt. Die Fluoreszenz wurde in schwarzen 96-well-Zellkulturplatten gemessen.

Die Gewebe (NHS, RHS) wurden wie bereits beschrieben mittels *TissueLyzer II* in Kaliumphosphatpuffer (50 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) homogenisiert (siehe 2.4.1) und die Keratinozyten oder Fibroblasten wurden mittels *Dounce Tissue Grinder* manuell aufgeschlossen. Im Aktivitätsassay wurde die „grobe Mitochondrienfraktion“ untersucht, die durch eine zweistufige Zentrifugation bei 4 °C erhalten wurde: zuerst 15 min bei 1000 g und der dabei entstandene Überstand anschließend 30 min bei 10000 g [105]. Danach waren die

2. Material und Methoden

Mitochondrien im Pellet enthalten, welches in Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und auf MAO-Aktivität untersucht wurde.

Als Positivkontrolle wurden *MAO A Supersomes* mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt [106]. Die Messung aller Proben erfolgte in Duplikaten und es wurde eine Kontrollprobe mitgeführt, die statt Gewebefraktion Puffer enthielt. Aufgrund der hohen Basisfluoreszenz in diesen Proben wurde das *Amplex[®] Red Monoamine Oxidase Assay Kit* nicht weiter genutzt.

Zum anderen wurde das *MAO-GloTM Assay* verwendet [107]. Hierbei entsteht durch die katalytische Aktivität der MAO ein Zwischenprodukt (Methylesterluciferin), das in einem zweiten Schritt durch Zugabe des Detektionsreagenz gespalten wird. Die dabei entstehende Lumineszenz korreliert mit der MAO-Aktivität in der Probe.

Das Assay wurde nach Angaben des Herstellers bzw. Valley *et al.* durchgeführt [106]. Das Kit enthielt verschiedene Reaktionspuffer für die Bestimmung der MAO A- oder MAO B-Aktivität. Zur Detektion der Lumineszenz wurden weiße 96-well-Zellkulturplatten verwendet. Untersucht wurden S1-Fractionen (Überstand nach Zentrifugation für 15 min bei 1000 g, 4 °C) der zuvor in HEPES-Puffer (siehe Tabelle 2-13) homogenisierten Zellen oder Gewebe.

Auch bei diesem Aktivitätsassay wurden analog des *Amplex[®] Red Monoamine Oxidase Assay Kit* eine Positivkontrolle (MAO A) und eine gewebefreie Kontrolle mitgeführt sowie die Messung aller Proben in Duplikaten durchgeführt.

Tabelle 2-13: Rezeptur des beim *MAO-GloTM Assay* verwendeten HEPES-Puffers.

HEPES-Puffer	<ul style="list-style-type: none">• 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 100 mM• ggf. DMSO, 10 %^X• Glycerol, 5 %• in bidestilliertem Wasser
---------------------	---

2.6.2 SULT ASSAY

Die Aktivität der Sulfotransferase (SULT) wurde mit der Umwandlung des Substrates 7-Hydroxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarinsulfat [108], das mittels

^X Zur Untersuchung der MAO A-Aktivität wurde der Puffer ohne und zur Untersuchung der MAO B-Aktivität mit 10 % DMSO versetzt [106].

Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) detektiert wurde (siehe 2.7.4.3), gemessen. Der experimentelle Ablauf orientierte sich an verschiedenen Referenzen [108, 109] und soll im Folgenden kurz erläutert werden: Da die SULT ein zytosolisches Protein ist, wurden alle Versuche mit der S9-Fraktion der Zellen und Gewebe durchgeführt. Nach Aufschluss der Gewebe in Kaliumphosphatpuffer (vgl. 2.6.1 MAO Assay) wurde das Gemisch zentrifugiert (10 min, 9000 g, 4 °C) und der Überstand als S9-Fraktion verwendet. Die für das Assay verwendeten Stammlösungen der Substrate sind in Tabelle 2-14 aufgeführt.

Tabelle 2-14: Übersicht der für das SULT Assay verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Lösung
7-Hydroxycoumarin	<ul style="list-style-type: none"> • 7-Hydroxycoumarin, 0,1 M • in DMSO
7-Hydroxycoumarinsulfat	<ul style="list-style-type: none"> • 7-hydroxycoumarinsulfat, 2 mg/ml • in bidestilliertem Wasser
PAPS	<ul style="list-style-type: none"> • 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), 4 mM • in bidestilliertem Wasser

Das Substrat 7-Hydroxycoumarin (finale Konzentration: 100 µM) sowie der Cofaktor PAPS (finale Konzentration: 20 µM oder 100 µM, beide Varianten parallel) wurden zur S9-Fraktion gegeben, worauf eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad folgte. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem Acetonitril (im Verhältnis 1:1) gestoppt. Nach Zentrifugation (15 min, 14000 g, 4 °C) wurde der Überstand in *Nanosep*[®] *Centrifugal Devices* überführt und durch erneute Zentrifugation (5 min, 5000 g, 4 °C) von allen Proteinen > 30 kDa befreit. Das erhaltene Filtrat wurde anschließend mittels LC-MS auf 7-Hydroxycoumarin und 7-Hydroxycoumarinsulfat hin untersucht (siehe 2.7.4.3).

Um die Funktionalität des Aktivitätsassays zu überprüfen wurde rekombinante SULT 1A1 mit einer finalen Konzentration von rund 5 µg/ml eingesetzt. Der Metabolit 7-Hydroxycoumarinsulfat wurde in diesem Ansatz erfolgreich detektiert. Kontrollansätze ohne zugesetztes PAPS in der S9-Fraktion von Humanhaut zeigten jedoch eine deutliche Reduzierung der detektierten 7-Hydroxycoumarinmenge im Vergleich zum Kontrollansatz in Kaliumphosphatpuffer. Dies deutet daraufhin, dass 7-Hydroxycoumarin während der Aufreinigung teilweise verloren ging, da es womöglich an zelluläre Bestandteile bindet, die bei der Zentrifugation präzipitieren. Da keine SULT-Expression auf

2. Material und Methoden

Proteinebene in den verschiedenen Hautgeweben nachgewiesen werden konnte (siehe 3.1.3), wurden die Experimente zur SULT-Aktivität im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

2.6.3 GST ASSAY

Um die Aktivität der GST zu untersuchen, wurde die Konjugation des Substrates 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) auf die Thiolgruppe des Glutathions untersucht (vgl. 1.3.3). Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des *GST Assay Kits* nach Herstellerangaben im Mikrotiterplattenformat [110].

Die S9-Fraktion aus Keratinozyten, Fibroblasten, exzidierte oder rekonstruierter Vollhaut wurden in Homogenisierungspuffer (siehe Tabelle 2-15) analog des SULT Assays hergestellt. Die Substratlösung (1 mM CDNB und 2 mM L-Glutathion in PBS) wurde in eine 96-well-UV-STAR Mikroplatte vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe der S9-Fraktion gestartet. Die Bildung des farbigen Reaktionsproduktes wurde im *FluoSTAR Optima* (temperiert auf 25 °C) über einen Zeitraum von 15 min verfolgt, wobei jede Minute die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte im Anschluss nach Herstellerprotokoll [110].

Als Positivkontrolle diente aus Pferdeleber aufgereinigte GST mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Die Messung aller Proben erfolgte in Triplikaten.

Tabelle 2-15: Puffer und Stammlösungen für das GST Assay.

Lösung	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer (nach [111])	<ul style="list-style-type: none">• EDTA, 0,001 M• KCl, 0,15 M• KH₂PO₄, 0,25 M• in bidestilliertem Wasser• pH 7,25
CDNB	<ul style="list-style-type: none">• 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 100 mM• in Ethanol (absolut)
Glutathion	<ul style="list-style-type: none">• L-Glutathion (reduziert), 200 mM• in bidestilliertem Wasser

2.7 EXPERIMENTE ZUR BIOTRANSFORMATION VON 2,4-DAT

2,4-DAT und seine Metabolite

Von 2,4-DAT und dessen potentiellen Metaboliten N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid (M1) und N-(5-Amino-2-methylphenyl)acetamid (M2, siehe Abbildung 2-2) wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 0,1 M in Wasser (2,4-DAT) oder DMSO (M1, M2) hergestellt und bei -20°C für maximal 3 Monate gelagert.

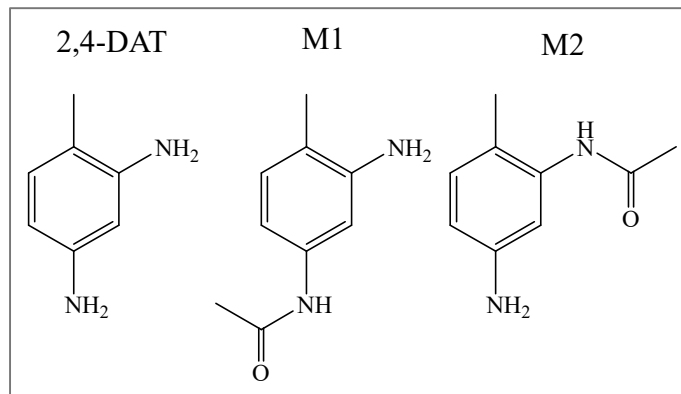


Abbildung 2-2: Strukturformeln. Gezeigt sind die Strukturformeln von 2,4-Diaminotoluol (2,4-DAT) und seinen beiden potentiellen einfach N-acetylierten Metaboliten N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid (M1) und N-(5-Amino-2-methylphenyl)acetamid (M2).

2,4-DAT-Biotransformation in Keratinozyten und Fibroblasten

Keratinozyten und Fibroblasten, jeweils als Pool aus drei verschiedenen Spendern, wurden wie oben beschrieben (siehe 2.2.1) kultiviert und in 6-well-Zellkulturplatten in 2 ml Wachstumsmedium (KGM bzw. FGM) mit 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Wachstumsmedium entfernt, die adhärenen Zellen in den Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen (1 ml/Vertiefung) und anschließend ohne (Kontrolle) oder mit 1×10^{-4} M 2,4-DAT in je 1 ml Basalmedium (KBM bzw. FBM) für 3 h oder 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Bei der Kontrolle wurde statt 2,4-DAT dessen Lösungsmittel bidestilliertes Wasser zugegeben und analog in Basalmedium verdünnt.

Zum Versuchsende wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die adhärenen Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml PBS pro Vertiefung gewaschen, welches anschließend ebenfalls

2. Material und Methoden

aufbewahrt wurde. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml Lyse-Reagenz (0,5 % SDS in PBS) pro Vertiefung und Inkubation für 5 min unter Standardbedingungen. Anschließend wurde das Zelllysate aus den Vertiefungen zur weiteren Analyse in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße übertragen.

2,4-DAT-Biotransformation in MoLC, MoDC

Die Monozyten-abgeleiteten Langerhans-Zellen (MoLC) oder dendritischen Zellen (MoDC) wurden an Tag 7 der Differenzierung wie oben beschrieben vorbereitet und mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml in PBS/EDTA verwendet (siehe 2.2.3). Die Zellsuspension wurde anschließend in 15 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt um die Stimulation der Zellen vorzubereiten. Dabei wurden, je nach verfügbarer Zellzahl, 1×10^6 oder $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Zentrifugenröhrchen überführt, um die Stimulation in Duplikaten bzw. Triplikaten durchzuführen. Nach Zentrifugation (1200 g, 10 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in Stimulationsmedium resuspendiert und in eine 24 *well*-Zellkulturplatte übertragen (pro Vertiefung 5×10^5 Zellen in 0,5 ml Medium). Die Inkubation erfolgte für 24 h unter Standardbedingungen. Das Stimulationsmedium bestand aus Komplettmedium (siehe Tabelle 2-3) versetzt mit Wasser (Kontrolle) oder 1×10^{-4} M 2,4-DAT.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Suspensionszellen aus den Vertiefungen der 24 *well*-Zellkulturplatte in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4 °C). Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und in einem separaten Reaktionsgefäß aufbewahrt. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen, welches nach Zentrifugation ebenfalls abgenommen und aufbewahrt wurde. Anschließend wurde das Zellpellet in 0,5 ml Lyse-Reagenz resuspendiert und durch Inkubation für 5 min bei 37 °C, 5 % CO₂ aufgeschlossen.

2,4-DAT-Biotransformation in exzidiierter und rekonstruierter Vollhaut

Um die Biotransformation von 2,4-DAT in exzidiierter oder rekonstruierter Vollhaut zu untersuchen, wurde 2,4-DAT auf die Hautoberfläche appliziert. Eine 0,1 M Lösung wurde mit einem Volumen von $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ (das entsprach einer Konzentration von $122,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) aufgetragen und die gleichmäßige Verteilung der Lösung auf der gesamten Oberfläche durch Auflegen eines Nylonnetzes gewährleistet. Nach 3 h oder 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden

die verschiedenen Fraktionen für die weitere Analyse vorbereitet: Um eine weitere Permeation zu verhindern, wurde zuerst das Gewebe aus dem Akzeptormedium entnommen und das Akzeptormedium in ein 2 ml-Reaktionsgefäß übertragen. Das Nylonnetz wurde vorsichtig von der Oberfläche abgezogen und in ein 2 ml *safe lock*-Reaktionsgefäß übertragen. Im Anschluss wurde die Hautoberfläche dreimal mit je 100 µl TRIS-Puffer gewaschen (siehe Tabelle 2-16), wobei der Waschpuffer im gleichen Reaktionsgefäß wie das jeweilige Nylonnetz gesammelt wurde. Das Gewebe (NHS, Phenion[®]FT oder EpiDermTMFT) wurde in ein weiteres 2 ml *safe lock*-Reaktionsgefäß gegeben, in dem 300 µl TRIS-Puffer und eine Stahlkugel (Durchmesser: 5 mm) vorgelegt waren, um anschließend in der Rotorschwingmühle *TissueLyzer II* unter Kühlung zerkleinert zu werden: NHS wurde 12 min bei 30 Hz, Phenion[®]FT 7 min und EpiDermTMFT 2 min bei jeweils 25 Hz homogenisiert. Im Falle des Phenion[®]FT wurde außerdem der Filter (vgl. Abbildung 2-1) als separate Probe analog dem Modell behandelt.

Tabelle 2-16: Zusammensetzung des für die Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT verwendeten TRIS-Puffers.

TRIS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA, 2 mM • HCl, 0,004 M ^{XI} • TRIS, 0,01 M ^{XI} • in bidestilliertem Wasser • pH 8,2
--------------------	---

2.7.1 PROBENAUFARBEITUNG

Die zuvor hergestellten Zellysate, Gewebehomogenisate, Mediumproben und Waschfraktionen und bei Untersuchungen des Phenion[®]FT auch die Filterfraktion wurden mit Aceton aufgereinigt, bevor die Proben mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und UV-Detektion (HPLC/UV) analysiert werden konnten. Von den Proben wurden Aliquots von 300 µl in je ein 2 ml *safe lock*-Reaktionsgefäß überführt, mit 1200 µl eiskaltem Aceton versetzt und 1 min bei 30 Hz im *TissueLyzer II* gemischt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei -80 °C. Um die ausgefällten Proteine, Zell- und Gewebetrümmer aus

^{XI} Für die Herstellung des TRIS-Puffers wurden eine 0,2 M HCl-Stammlösung und eine 0,2 M TRIS-Stammlösung mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Arbeitslösung wurde nach Bedarf frisch hergestellt mit 21,7 ml 0,2 M HCl und 50 ml 0,2 M TRIS-Lösung pro Liter Wasser (Protokoll nach [112]). Der TRIS-Puffer wurde vor Gebrauch filtriert (0,2 µm Porengröße) und 15 min im Ultraschallbad entgast.

2. Material und Methoden

dem Gemisch zu entfernen, wurden die Proben 10 min bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert und danach 1200 µl des Überstandes in ein silikonisiertes 12 ml-Glasröhrchen überführt. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt, wobei pro Wiederholung neben 1200 µl Aceton auch 300 µl TRIS-Puffer zu jeder Probe gegeben wurden. Im Falle des Phenion® FT gab es Abweichungen: bei der dritten Wiederholung wurde kein TRIS-Puffer zugegeben und die Filter-Fractionen wurden nur mit jeweils 900 µl Aceton versetzt.

Nach der Zentrifugation wurden je 1400 µl des Überstandes abgenommen und in das entsprechende Glasröhrchen überführt. Die aus den drei Aufreinigungsdurchgängen vereinten Überstände wurden über Nacht mittels Vakuum-Zentrifugation getrocknet. Am Folgetag wurden die Rückstände in je 300 µl TRIS-Puffer resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (13200 rpm, 10 min, 4 °C) um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. 250 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert, bevor 150 µl des Überstandes zur weiteren Analyse in HPLC-Glasfläschen gegeben wurden.

Während der Aufreinigung wurden die Überstände nicht vollständig, sondern nur definierte Volumina dieser weiter verarbeitet (siehe oben). Bei der späteren quantitativen Auswertung wurde dies berücksichtigt und die berechneten Mengen um einen Aufreinigungsfaktor korrigiert.

2.7.2 HPLC-ANALYTIK

Während der Etablierung der HPLC/UV-Analytik für 2,4-DAT und dessen potentielle Metabolite wurden verschiedene Chromatographiesäulen und Fließmittelmischungen getestet (siehe 3.2.1) und als optimale Bedingungen ergaben sich: Die HPLC/UV-Analytik mit einem *LaChrom*® HPLC System und Verwendung einer *Kinetex*TM 5 µm *Phenyl-Hexyl 100 Å* Säule inklusive *Kinetex*TM *Phenyl-Hexyl Enhancement Kit*, wobei als Fließmittel ein graduelles Gemisch aus TRIS-Puffer (Fließmittel A) und Acetonitril (Fließmittel B) verwendet wurde (Details siehe Tabelle 2-17). Die Gesamtlaufzeit betrug 45 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die HPLC wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 292 nm.

Tabelle 2-17: Übersicht des finalen Fließmittelgradienten für die HPLC/UV-Analytik.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0-10	98	2
10-20	98-90	2-10
20-30	90	10
30-45	98	2

Um 2,4-DAT sowie dessen potentielle Metabolite M1 und M2 quantifizieren zu können, wurden serielle Verdünnungen dieser drei Substanzen in TRIS-Puffer für jede HPLC-Messung frisch hergestellt. Die Standardreihe deckte einen Konzentrationsbereich von 1×10^{-7} M bis 1×10^{-3} M ab. Die Detektionsgrenze lag bei 1×10^{-7} M und die Quantifizierungsgrenze bei $2,5 \times 10^{-6}$ M. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen des HPLC/UV-Chromatogramms (ermittelt mit der *HSM Software D-7000*) gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen um mittels einer linearen Trendlinie bzw. Geradengleichung die Konzentration in den unbekanntenen Proben zu bestimmen.

Die Methode wurde auf Reproduzierbarkeit geprüft, wobei verschiedene Konzentrationen von 2,4-DAT, M1 und M2 in TRIS-Puffer oder den verwendeten Nährmedien hergestellt, der beschriebenen Aufreinigungsprozedur unterzogen und anschließend mittels HPLC/UV-Analytik quantifiziert wurden. Messungen von fünf Konzentrationsreihen am gleichen oder an fünf unterschiedlichen Tagen wurden zur Bestimmung der Intra- bzw. Inter-Tages-Variabilität durchgeführt.

2.7.3 INHIBITION DER N-ACETYLTRANSFERASE

Um zu verifizieren, dass der Metabolit M1 unter Katalyse der N-Acetyltransferase (NAT) gebildet wird, wurden in primären basalen Keratinozyten Inhibitionsexperimente durchgeführt. Keratinozyten wurden analog der Untersuchung zur Biotransformation von 2,4-DAT in *6-well*-Zellkulturplatten ausgesät (siehe 2.7). Am Folgetag wurden die Keratinozyten 1 h ohne (Kontrolle) oder mit dem NAT 1-Inhibitor Cyanamid in einer Konzentration von 1 mM [112] unter Standardbedingungen inkubiert, bevor 2,4-DAT zu den Zellen gegeben wurde. Nach 24 h Inkubation mit 2,4-DAT wurden die Zellkulturüberstände entnommen und hinsichtlich M1 quantifiziert.

Von Cyanamid wurde eine sterile Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 M in Wasser hergestellt und für maximal 3 Monate bei -20 °C gelagert.

2. Material und Methoden

Die bei den Versuchen verwendeten Konzentrationen wurden jeweils direkt vor Versuchsbeginn in KBM hergestellt.

2.7.4 STABILITÄT VON 2,4-DAT

Neben der Biotransformation wurde auch die Stabilität von 2,4-DAT und dem Metaboliten M1 unter Versuchsbedingungen untersucht. Dafür wurden 2,4-DAT oder M1 in der gleichen Menge wie bei topischer Applikation (10 µl einer 0,1 M Lösung pro cm²) oder in der gleichen Konzentration wie bei den Versuchen mit Einzelzellkulturen (0,1 mM) in den verschiedenen Nährmedien für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Es folgte die Probenaufarbeitung und Analyse mittels HPLC/UV.

Die im Folgenden (2.7.4.1 – 2.7.4.3) beschriebenen Analyseverfahren wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann und Herrn Daniel Becker vom Institut für Pharmazie (Medizinische Chemie) der Freien Universität Berlin durchgeführt.

2.7.4.1 MPLC ANALYTIK

Während der Stabilitätsstudien von 2,4-DAT und M1 wurde eine nicht-enzymatische Umwandlung von 2,4-DAT in allen Nährmedien beobachtet (siehe 3.2.2). Um das bei dieser Umwandlung dominierende Produkt zu identifizieren, wurde 2,4-DAT mit einer Konzentration von 0,1 M für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM inkubiert. Nach Probenaufarbeitung erfolgte die Isolation des nicht-enzymatischen Produktpeaks mittels MPLC (engl. *medium pressure liquid chromatography*) unter Verwendung des automatisierten *Biotage Isolera Prime Systems* mit einer *Biotage SNAP Ultra C18* Kartusche. Die Elution fand bei einer Flussrate von 12 ml/min und einem Fließmittelgradienten aus 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer pH 8 (Fließmittel A) und Acetonitril (Fließmittel B) statt, der in Tabelle 2-18 aufgeschlüsselt ist.

Tabelle 2-18: Übersicht des bei der MPLC verwendeten Fließmittelgradienten.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0-1:15	99	1
1:15-6:15	99-90	1-10
6:15-8:45	90	10
8:45-11:15	90-75	10-25

Die Fraktionen des dominierenden Produktpeaks wurden vereint und mit einer *Christ Alpha 2-4 Ldplus* bei -85 °C und 0,01-0,05 mbar lyophilisiert. Im Anschluss wurden die Proben in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril gelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet.

2.7.4.2 NMR ANALYTIK

Um das Hauptprodukt nicht-enzymatischer Umwandlung von 2,4-DAT in Nährmedien zu identifizieren, wurde die zuvor isolierte Probe (siehe 2.7.4.1) mittels Elektrospray-Flugzeitmassenspektrometrie (ESI-TOF/MS) und anschließender Kernspinresonanz (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) analysiert. Dafür wurde die Probe in deuteriertem Wasser (D₂O) gelöst und mit einem *Agilent 6210 ESI-TOF* gemessen, wobei die Flussrate 4 µl/min und die Sprayspannung 4 kV betrug. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen [M+H]⁺ optimiert.

Die Proton- (¹H) und Carbon-Spektren (¹³C) wurden mit einem *Bruker Avance III* Spektrometer bei 700 MHz (¹H) bzw. 175 MHz (¹³C) aufgenommen und die chemische Verschiebung wurde in *parts per million* (ppm) in Bezug auf das Lösungsmittel gemessen.

Die NMR-Messungen wurden in der *Core Facility BioSupraMol* im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

2.7.4.3 LC-MS ANALYTIK

Die Liquidchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde unter Verwendung eines Geräts der *Agilent 1100 Series* durchgeführt, sowohl für die Massenbestimmung des 2,4-DAT-Abbauproduktes als auch zur Identifikation des SULT Assay-Produktes 7-Hydroxycoumarinsulfat (siehe 2.6.2). Die Auftrennung erfolgte in beiden Fällen mit einer *Phenomenex-Luna-C18* Säule (4,6x100 mm, 3 µm, 100 Å) und die Elution mittels eines Fließmittelgradienten aus Wasser/0,1 % Ameisensäure (Fließmittel A) und Acetonitril/0,1% Ameisensäure (Fließmittel B), bei dem die Zusammensetzung innerhalb von 5,5 min von 5 % B auf 99 % B geändert wurde. Diese Fließmittelzusammensetzung blieb konstant für 4,5 min, bevor die Messung beendet wurde. Die Flussrate betrug 1 ml/min und die

2. Material und Methoden

Detektion mittels Diodenarray-Detektor erfolgte bei den Wellenlängen 210 nm, 254 nm und 325 nm.

2.7.5 ZYTOTOXIZITÄT

2.7.5.1 BESTIMMUNG DER ZELLVIABILITÄT MIT MTT-TEST

Der MTT-Test basiert auf der enzymatischen Umsetzung des wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu wasserunlöslichen Formazankristallen. Diese Reaktion findet nur in lebenden Zellen statt und kann somit als Maß für die Viabilität genutzt werden. Im Umkehrschluss deutet das Ausbleiben dieser Reaktion auf eine eingeschränkte Viabilität oder tote Zellen hin.

Der MTT-Test wurde in 96-well-Zellkulturplatten durchgeführt. Dafür wurden pro Vertiefung 1×10^4 Zellen (Keratinocyten, Fibroblasten oder HepG2) in 200 μ l Wachstumsmedium (KGM, FGM oder HGM) gegeben und für 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurde das Wachstumsmedium aus den Vertiefungen abgesaugt und die Zellen einmal mit 100 μ l PBS pro Vertiefung gewaschen. Es folgte die Stimulation der Zellen in Basalmedium (KBM, FBM oder HBM) für 24 h oder 48 h unter Standardbedingungen. Die 2,4-DAT-Stammlösung wurde in Basalmedium auf verschiedene Konzentrationen zwischen 0,05 mM und 20 mM (6,1-2443,4 μ g/ml) verdünnt und mit 100 μ l pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Für die Positivkontrolle wurden Zellen nur mit Basalmedium und für die Negativkontrolle mit 5 % DMSO in Basalmedium inkubiert. Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Triplikaten geführt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden in jede Vertiefung 10 μ l einer MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) gegeben und für weitere 4 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand vorsichtig abgesaugt und die wasserunlöslichen Formazankristalle durch Zugabe von 62,5 μ l DMSO pro Vertiefung gelöst. Mit dem *FLUOstar Optima* wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Referenz der Auswertung war die Positivkontrolle mit einer Viabilität von 100 % und eine Konzentration wurde als nicht-toxisch definiert, wenn die Viabilität der behandelten Zellen $\geq 80\%$ lag.

Verschiedene Konzentrationen von Cyanamid (0,5-5 mM) wurden ebenfalls mittels MTT-Test an Keratinozyten auf ihr zytotoxisches Potential hin überprüft, wobei die Inkubation mit Cyanamid für 25 h erfolgte.

Der MTT-Test mit den Suspensionszellen MoLC und MoDC wurde mit einigen Änderungen durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden: MoLC und MoDC wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte in je 100 μ l Komplettmedium ausgesät und direkt stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h wurden dem Protokoll von Campling *et al.* folgend [113] in jede Vertiefung 25 μ l einer 2 mg/ml-MTT-Stammlösung gegeben und erneut für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden pro Vertiefung 100 μ l einer Lösung aus Isopropanol:1 N HCl (25:1) gegeben und eine weitere Stunde unter Standardbedingungen inkubiert, bevor die Formazankristalle gelöst und die Absorption bei einer Wellenlänge 540 nm gemessen wurde.

2.7.5.2 QUANTIFIZIERUNG INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE MIT ELISA

Bei den Versuchen zur Biotransformation von 2,4-DAT in NHS oder RHS konnte kein MTT-Test mit den Geweben durchgeführt werden, da sie für die Analyse von 2,4-DAT und dessen Metaboliten aufgearbeitet wurden (siehe 2.7.1). Bei einem MTT-Test mit Geweben werden diese mit MTT inkubiert und anschließend auf spezielle Weise aufbereitet [89], jedoch standen aus Kostengründen keine Modelle für einen MTT-Test im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung.

Um dennoch eine gewebeschädigende Wirkung von der genutzten 2,4-DAT-Konzentration abschätzen zu können, wurde das Akzeptormedium der Hautgewebe auf die inflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-8 (siehe 1.1.3) untersucht.

Die Analyse der Akzeptormedien erfolgte mit der Methode des Sandwich-ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Nach Versuchsende des Biotransformationsexperiments (siehe 2.7) wurde ein Aliquot des Akzeptormediums in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Quantifizierung von IL-1 α oder IL-8 bei -20 °C gelagert.

Beide Zytokine wurden separat unter Verwendung der *ELISA DuoSet Kits* und Befolgen der Herstellerangaben quantifiziert [114, 115]. Tabelle 2-19 listet die für die ELISA-Analysen verwendeten selbst hergestellten Puffer.

2. Material und Methoden

Eine Schädigung des Gewebes wurde angenommen, wenn die Zytokinmengen in den mit 2,4-DAT behandelten Geweben gegenüber den Kontrollmodellen signifikant erhöht waren.

Tabelle 2-19: Übersicht der bei ELISA verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Probenpuffer IL-1α	<ul style="list-style-type: none">• bovines Serumalbumin, 1 %• in PBS
Probenpuffer IL-8	<ul style="list-style-type: none">• bovines Serumalbumin, 0,1 %• NaCl, 150 mM• Tween 20, 0,05 %• TRIS-Base, 20 mM• in bidestilliertem Wasser• pH 7,4
Blockpuffer	<ul style="list-style-type: none">• bovines Serumalbumin, 1 %• Natriumazid, 0,05 %• in PBS
Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none">• Tween 20, 0,05 %• in PBS
Substratlösung ^{XII}	<ul style="list-style-type: none">• Tetramethylbenzidin (2 % in DMSO/Ethanol (1/1)), 110 μl pro 11 ml• Wasserstoffperoxid (30 %ige Lösung), 3,3 μl pro 11 ml• in Zitratpuffer, 40 mM• pH 3,95
Stopplösung ^{XIII}	<ul style="list-style-type: none">• HCl, 1 N

2.7.5.3 ERMITTLUNG DES ZYTOTOXISCHEN POTENTIALS DURCH LDH-BESTIMMUNG

Eine ggf. stattgefunden zytotoxische Wirkung der verwendeten 2,4-DAT-Konzentration in NHS oder RHS nach topischer Applikation wurde zusätzlich durch die Messung der sekretierten Laktatdehydrogenase (LDH) überprüft. Die Quantifizierung der LDH ist ein direktes Maß, um Gewebeschäden zu beurteilen. Bei der LDH handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, das ausschließlich bei Zellschädigung in das Akzeptormedium freigesetzt wird. Die Messung der LDH im Akzeptormedium erfolgte mit dem *Cytotoxicity Detektion Kit* nach Angaben des Herstellers [116]. Sofern LDH im Akzeptormedium vorhanden war, entstand ein farbiges Reaktionsprodukt, welches durch Messung der Optischen Dichte (OD)

^{XII} Der Zitratpuffer und die Tetramethylbenzidin-Stammlösung wurden bei 4 °C und das 30 %ige Wasserstoffperoxid bei Raumtemperatur gelagert. Die Substratlösung wurde immer kurz vor deren Benutzung frisch aus den Einzelkomponenten hergestellt.

^{XIII} Für die Stopplösung wurde 37 %ige, konzentrierte Salzsäure mit bidestilliertem Wasser verdünnt und anschließend bei RT gelagert.

bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert werden konnte (siehe Abbildung 2-3).

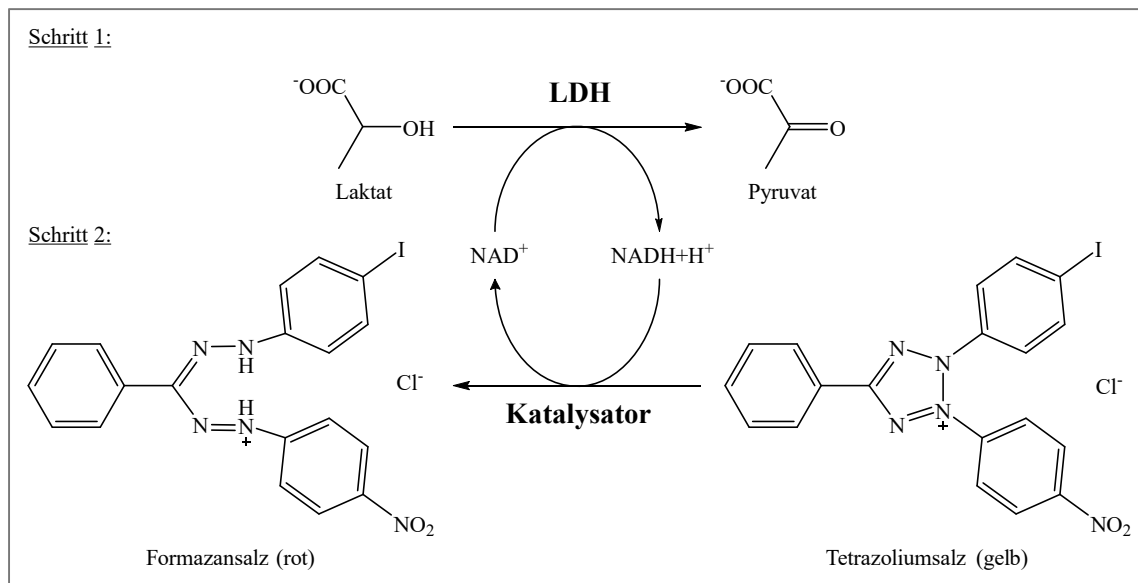


Abbildung 2-3: Prinzip der Farbreaktion zur LDH-Bestimmung. In einem ersten Schritt oxidiert die LDH das im Kit vorhandene Lactat zu Pyruvat, wobei NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ reduziert wird. In einem zweiten Schritt werden durch den im Kit vorhandenen Katalysator zwei Protonen von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das Tetrazoliumsals 2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazoliumchlorid übertragen, wodurch dieses seine Farbe ändert und bei 490 nm detektiert werden kann (Grafik nach [116]).

Nach Versuchsende der Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT in den Hautgeweben wurde ein Aliquot des Akzeptormediums entnommen und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Quantifizierung der LDH erfolgte innerhalb einer Woche und eine zellschädigende Wirkung wurde angenommen, wenn die LDH-Menge in den mit 2,4-DAT behandelten Geweben gegenüber der mit Wasser behandelten Kontrolle signifikant erhöht war.

Die LDH-Bestimmung wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Nan Ma und Frau Ruth Hesse am Institut für Biomaterialforschung (Biokompatibilität) des Helmholtz Zentrum Geesthacht in Teltow durchgeführt.

Im Ergebnisteil sind die Ergebnisse aus je 3-5 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, engl. *standard deviation*) dargestellt. Im Normalfall wurden pro Experiment die behandelten Proben in Triplikaten geführt, nur bei den Experimenten mit MoLC und MoDC musste teilweise aufgrund zu geringer Zellzahlen auf Unikate und Duplikate ausgewichen werden.

Für die Messung der Enzymaktivität sowie die Analysen mittels RT-PCR oder Western Blot wurde pro Versuch das Homogenisat eines Hautstückes oder eines kompletten bzw. eines halben Hautmodells (eine Hälfte komplett, eine Hälfte separiert in Epidermis und Dermis) verwendet.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm *GraphPad PRISM*, Version 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden unter Annahme einer Normalverteilung alle Daten beim Vergleich von zwei Gruppen mittels *Student's t-Test* (ungepaart) und beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* auf signifikante Unterschiede geprüft. In den Abbildungen wurden die Signifikanzniveaus folgendermaßen verschlüsselt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$, jeweils zwischen zwei verglichenen Proben. Bei den Western Blot- und Genexpressionsdaten wurden zur Vereinfachung alle Signifikanzniveaus als * $p \leq 0,05$ zusammengefasst. Für die statistische Auswertung der MAO-Proteinexpression und der NAT-Inhibition wurde ein *Student's* Einstichproben-t-Test verwendet und * bedeutet $p \leq 0,05$.

3. ERGEBNISSE

Die Charakterisierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme in den beiden rekonstruierten 3D-Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT (RHS) im Vergleich zu Humanhaut *ex vivo* (NHS) wurde anhand zweier unterschiedlicher Ansätze durchgeführt.

Im ersten Teilprojekt wurde die basale Expression ausgewählter Enzyme analysiert. Ziel dieser Untersuchung war es, die Aktivität der verschiedenen Enzyme in den drei Hautkonstrukten zu messen und zu vergleichen. Die Analyse der Proteinexpression sowie die Quantifizierung auf Genebene ergänzten die Ergebnisse zur Enzymaktivität und gaben einen Überblick über das Expressionsmuster verschiedener Subtypen innerhalb einer Enzymgruppe (siehe 3.1).

Zur funktionellen Charakterisierung der RHS und NHS wurde im zweiten Teil die Modellsubstanz 2,4-DAT topisch appliziert, um nach definierten Inkubationszeiten die Gewebe sowie das Nährmedium auf 2,4-DAT und seine potentiellen Metabolite zu untersuchen. Dieser Ansatz erlaubte neben dem Vergleich des Metabolisierungsmusters zusätzlich die Beurteilung des Penetrations- und Permeationsverhaltens der Ausgangssubstanz und ihrer Metabolite in den untersuchten Geweben (siehe 3.3).

3.1 FREMDSTOFFMETABOLISIERENDE ENZYME

Im Folgenden werden die untersuchten Enzymgruppen separat betrachtet. Das Hauptinteresse dieser Arbeit lag bei der Enzymaktivität, weshalb in einem ersten Schritt für jede Enzymgruppe ein Aktivitätsassay ggf. etabliert und getestet wurde (ausgenommen sind die Steroid-5 α -Reduktasen, da deren Aktivität in Humanhaut und den beiden Vollhautmodellen bereits untersucht wurde; siehe 3.1.2). Bei ausbleibender Detektion der Enzymaktivität wurde die Expression der Enzyme auf Proteinebene mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Für alle Enzymgruppen wurde außerdem die Genexpression mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Untersucht wurden dafür basale Keratinozyten, Fibroblasten und exzidierte oder rekonstruierte Vollhaut. Bei den RHS wurde außerdem unterschieden zwischen dem kompletten Modell und separierter Epidermis bzw. Dermisäquivalent. Bei den humanen Hautgeweben *ex vivo* gibt es diese

3. Ergebnisse

Unterscheidung nicht, da keine schonende Trennung von Epidermis und Dermis experimentell möglich war (Daten nicht gezeigt).

3.1.1 MONOAMINOXIDASEN

Zunächst wurde die Enzymaktivität der Monoaminoxidasen (MAO) mithilfe des *MAO-GloTM Assays* bestimmt (Abbildung 3-1). Die Enzymaktivität beider Subtypen MAO A und MAO B konnte jedoch nur in Proben exzidierter adulter Humanhaut, nicht aber in den RHS oder Primärzellkulturen detektiert werden.

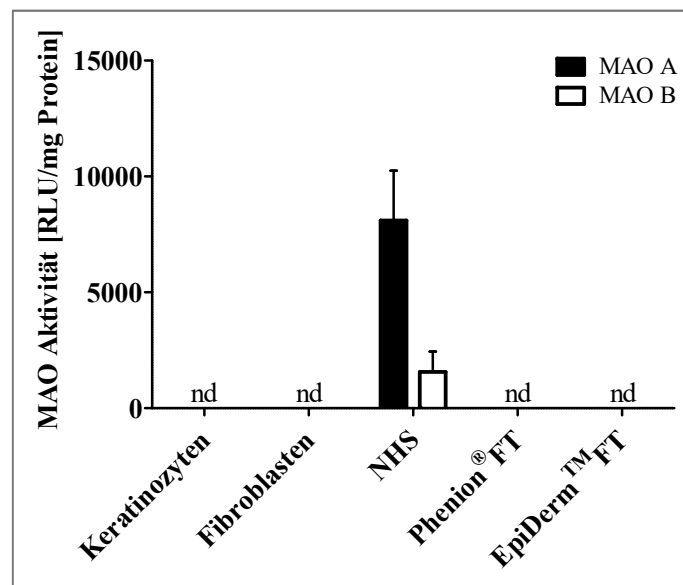


Abbildung 3-1: Aktivität der Monoaminoxidasen. Die MAO-Aktivität wurde in S1-Fractionen von undifferenzierten Keratinozyten, Fibroblasten, Humanhaut (NHS) und rekonstruierten Vollhautmodellen (Phenion®FT, EpiDerm™FT) unter Verwendung des *MAO-GloTM Assay* bestimmt [107]. Die Quantifizierung der Lumineszenz erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU, engl. *relative light units*) und wurde auf den Proteingehalt der untersuchten Proben normalisiert (Mittelwert + SD, n = 3; nd = nicht detektiert).

Daraufhin wurde die Expression der Subtypen MAO A und MAO B auf Gen- und Proteinebene untersucht. Abbildung 3-2 zeigt die Genexpression von *MAOA* und *MAOB* (zur Quantifizierung der Genexpression siehe 2.4.3). *MAOA* wurde in allen untersuchten Geweben stark exprimiert, wobei sowohl zwischen adulter Humanhaut und dem kompletten EpiDerm™FT als auch zwischen der Phenion®FT Dermis und primären Fibroblasten ein signifikanter Unterschied beobachtet wurde. Die *MAOB*-Expression war in den Vollhautgeweben im Vergleich zu *MAOA* geringer und fehlte in basalen Keratinozyten. Hingegen wurde

in differenzierten epidermalen Geweben *MAOB* detektiert, jedoch mit deutlich geringerer Expression als in den dermalen Geweben (siehe Abbildung 3-2, Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT). Exzidierte juvenile Humanhaut (NHFS) wies gegenüber den übrigen kompletten Hautgeweben (NHS und RHS) eine signifikant erhöhte Genexpression der *MAOB* auf.

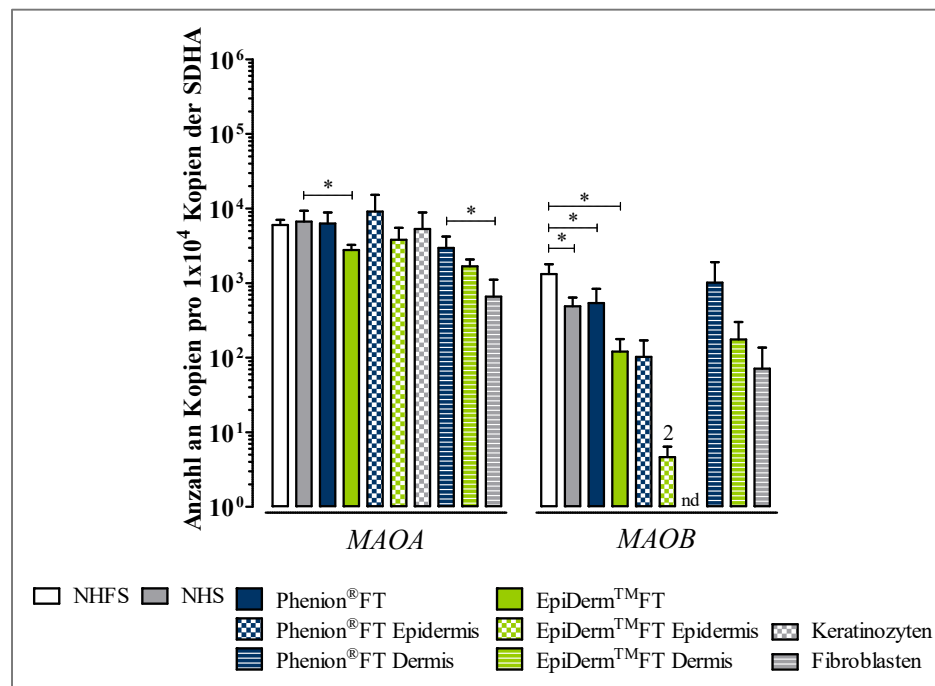


Abbildung 3-2: Genexpression der MAO. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *MAOA* und *MAOB* in undifferenzierten epidermalen Keratinozyten, dermalen Fibroblasten sowie in exzidiierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) und adulter Humanhaut (NHS) oder den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT untersucht. Dargestellt ist die basale Genexpression normalisiert auf das Referenzgen der Succinatdehydrogenase (SDHA). Mittelwert + SD, n = 3-5; nd = nicht detektiert und „2“ bedeutet, dass die mRNA nur in zwei von drei Spendern detektiert wurde. Mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* wurde jeweils innerhalb der kompletten, epidermalen oder dermalen Gewebe auf signifikante Expressionsunterschiede getestet und * bedeutet $p \leq 0,05$.

Anschließend wurden MAO A und MAO B mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Proteinebene untersucht. Trotz starker *MAOA*-Genexpression in allen untersuchten Geweben und Zelltypen, wurden auf Proteinebene deutliche Unterschiede beobachtet (Abbildung 3-3 a): In undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten wurde kein MAO A-Protein detektiert. In den separierten Epidermis-Proben des Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT war die Proteinexpression der MAO A sehr schwach, in den Dermisäquivalenten hingegen stark. Adulte

3. Ergebnisse

Humanhaut (NHS) wies eine höhere MAO A-Proteinmenge als juvenile Humanhaut (NHFS) und insgesamt die stärkste Proteinexpression auf. Auch die densitometrische, semiquantitative Analyse der Blots bestätigte, dass MAO A-Protein in NHS, gesetzt als 100 %, um mindestens 25 % mehr exprimiert war als in den anderen Proben (Abbildung 3-3 b), gefolgt vom kompletten EpiDermTMFT mit einer durchschnittlichen Proteinexpression 77 ± 11 %.

Bei MAO B wurden ebenfalls Unterschiede auf Proteinebene beobachtet. So war das Gewebe mit der höchsten MAO B-Proteinmenge die juvenile Vorhaut (NHFS, Abbildung 3-3 a) und übertraf die Expression in NHS um circa 40 % (siehe Abbildung 3-3 b). Allerdings wurden zwischen verschiedenen NHFS-Spendern unterschiedlichen Alters starke Unterschiede beobachtet (nicht gezeigt), was die sehr hohe Standardabweichung in Abbildung 3-3 b erklärt. In Kontrast steht diese Beobachtung außerdem zu der sehr geringen bis fehlenden MAO B-Expression in den rekonstruierten Vollhautmodellen. In undifferenzierten Keratinozyten sowie epidermalen Geweben wurde kein MAO B-Protein detektiert und auch die Banden in den dermalen Geweben wiesen eine sehr geringe Intensität auf.

Die Analyse der Proteinexpression zeigte weiterhin, dass MAO A in allen Geweben stärker exprimiert wird als MAO B und bestätigte somit die Beobachtungen auf Genebene. Da die Proteinexpression von MAO A und MAO B in exzidiertem Humanhaut wesentlich stärker war als in den RHS, ist anzunehmen, dass die MAO-Aktivität in den RHS unterhalb des Detektionslimits des angewendeten Aktivitätsassays lag und deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnte.

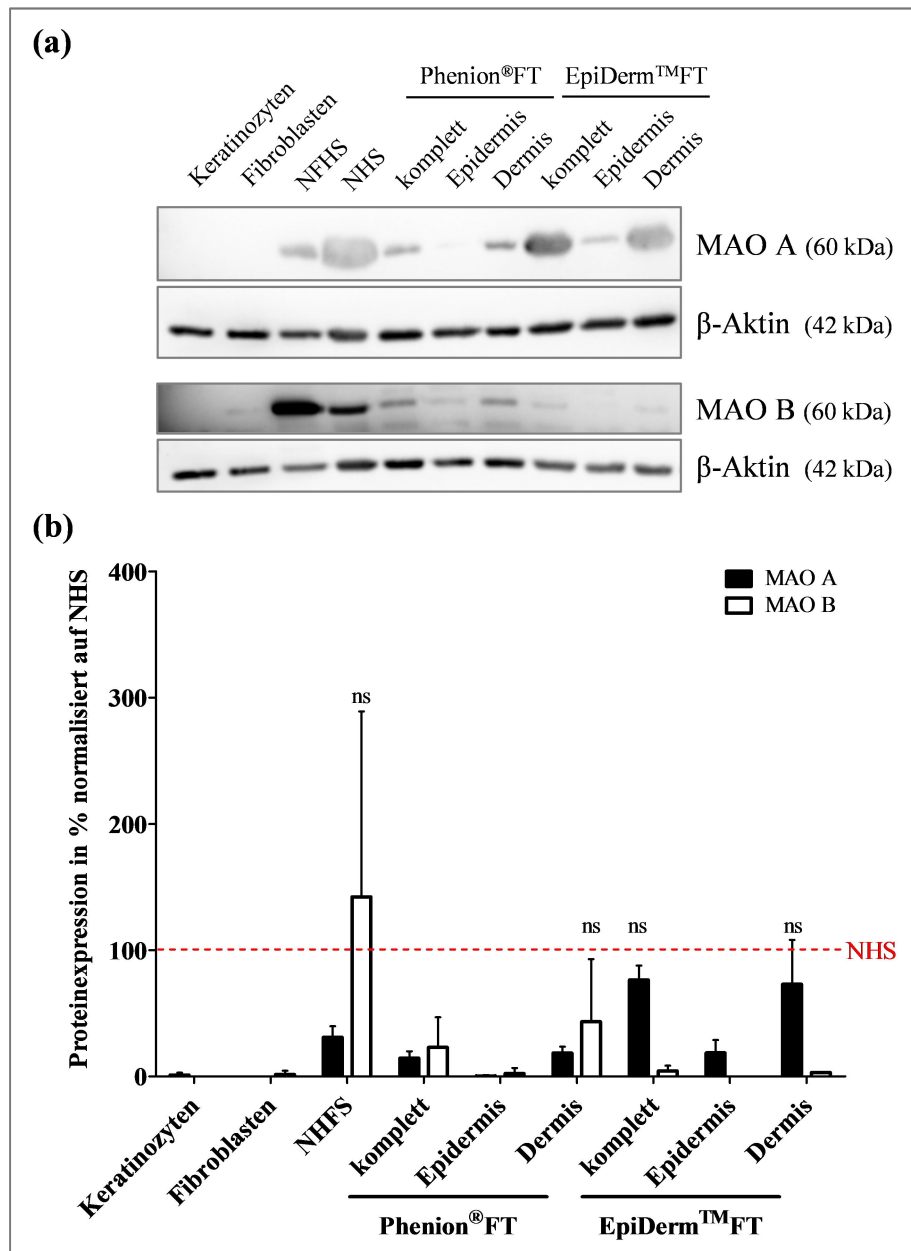


Abbildung 3-3: Proteinexpression von MAO A und MAO B. Mittels SDS-PAGE und Western Blot wurde die Proteinexpression in undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten, exzidiierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) und adulter Humanhaut (NHS) sowie in den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT untersucht. Gezeigt sind repräsentative Blots, bei denen MAO A oder MAO B jeweils gemeinsam mit dem Referenzprotein β -Aktin detektiert wurden (a) und die densitometrische Auswertung für mindestens drei unabhängige Experimente (b; Mittelwert + SD, n = 3). Mittels *Student's* Einstichproben-t-Test wurde die Proteinexpression bezogen auf NHS mit 100 % auf signifikante Unterschiede getestet; ns = nicht signifikant, in den übrigen Proben wurde ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) ermittelt.

3.1.2 STEROID-5 α -REDUKTASEN

Bereits erhobene Daten zur 5 α R-Aktivität in exzidiierter Humanhaut und den 3D-Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT [117] sollten ergänzt werden, weshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit die Genexpression der verschiedenen Subtypen *5 α R1*, *5 α R2*, *5 α R3* untersucht wurde.

Die Genfamilien *5 α R1* und *5 α R3* wurden in allen untersuchten Zellen und Modellen stark exprimiert, wobei die Genexpression in epidermalen Zellen und Geweben (Keratinocyten, Epidermis) gegenüber den dermalen Zellen und Geweben (Fibroblasten, Dermis) leicht erhöht war (Abbildung 3-4). Innerhalb der kompletten Hautgewebe wurde in NHS signifikant mehr *5 α R1*-mRNA detektiert als in den beiden RHS. Die Genfamilie *5 α R2* wies eine geringere und insgesamt moderate Genexpression auf, wobei in undifferenzierten epidermalen Zellen keine *5 α R2*-mRNA detektiert wurde. In differenzierten epidermalen Geweben wurde *5 α R2* in der Epidermis des EpiDerm[™]FT nicht und in der Epidermis des Phenion[®]FT nur in 2 von 5 Chargen gemessen. Die Genexpression der *5 α R2* überwog in den dermalen Geweben, wobei aber die Expression im EpiDerm[™]FT nicht in allen untersuchten Chargen nachgewiesen werden konnte. Bei den kompletten Hautkonstrukten wurde im Phenion[®]FT am meisten *5 α R2*-mRNA detektiert.

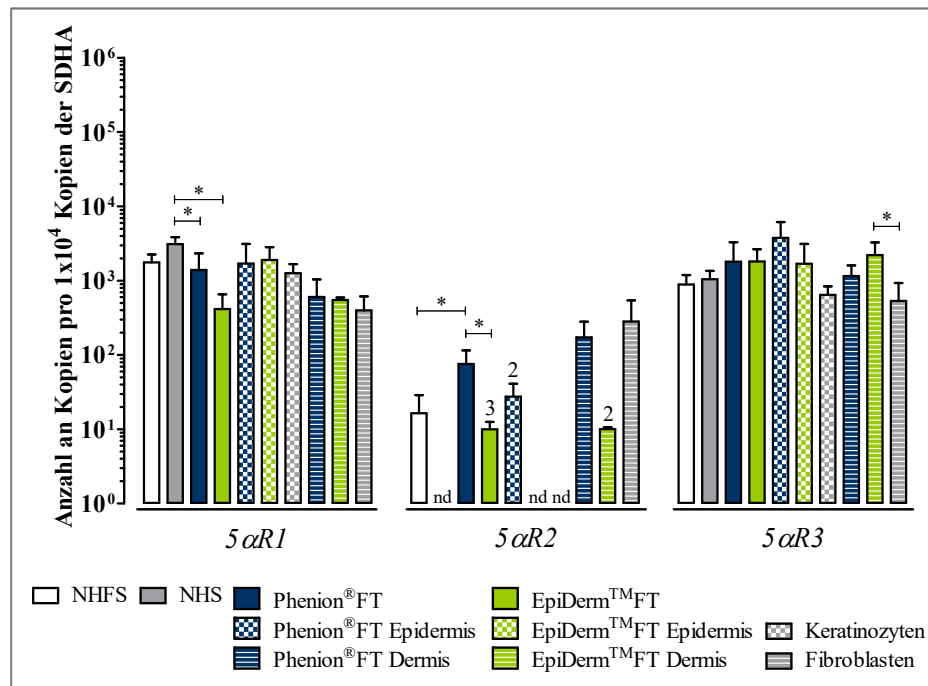


Abbildung 3-4: Genexpression der 5αR. Mittels RT-PCR wurde die Expression der 5αR Subtypen 1-3 in undifferenzierten epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten, sowie in exzidiierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) oder adulter Humanhaut (NHS) und den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT untersucht. Dargestellt ist die basale Genexpression normalisiert auf das Referenzgen der Succinatdehydrogenase (SDHA). Mittelwert + SD, n = 3-5; nd = nicht detektiert und „2“ oder „3“ bedeutet, dass die mRNA nur in zwei von drei bzw. drei von fünf Spendern detektiert wurde. Mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* wurde jeweils innerhalb der kompletten, epidermalen oder dermalen Gewebe auf signifikante Expressionsunterschiede getestet und * bedeutet $p \leq 0,05$.

3.1.3 SULFOTRANSFERASEN

Da die SULT 1A1 bezüglich der Sulfonierung xenobiotischer Substrate die wichtigste SULT ist [34], sollten die RHS und Humanhaut *ex vivo* auf ihre SULT 1A1-Aktivität untersucht werden. Basierend auf verschiedenen Veröffentlichungen [118-121] wurde 7-Hydroxycoumarin als Substrat für das Aktivitätsassay gewählt (siehe 2.6.2). Bei Durchführung des Assays mit rekombinanter SULT 1A1 wurde erfolgreich der zu erwartende Metabolit 7-Hydroxycoumarinsulfat detektiert. Unter Verwendung der S9-Fraktion aus exzidiierter Humanhaut war hingegen kein 7-Hydroxycoumarinsulfat nachweisbar und weiterhin wurde beobachtet, dass sich die Konzentration des Metaboliten in der S9-Fraktion verringerte (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen war die Messung der SULT-Aktivität in den verschiedenen Hautgeweben nicht möglich.

3. Ergebnisse

Um trotz fehlender Aktivitätsergebnisse Aussagen über die SULT-Ausstattung der exzidierten und rekonstruierten Vollhaut treffen zu können, wurde die Expression verschiedener SULT-Isoenzyme auf Gen- und Proteinebene untersucht.

Die Genexpression der SULT-Subfamilien unterschied sich in den verschiedenen Zell- und Gewebetypen, wobei sie in den ausdifferenzierten Geweben insgesamt höher war als in undifferenzierten Primärzellkulturen (siehe Abbildung 3-5). In undifferenzierten Keratinozyten war von den untersuchten SULT-Isoenzymen lediglich die *SULT2B1b* nachweisbar und in differenzierten epidermalen Geweben wie NHFS, NHS und den RHS war deren Expression am höchsten (sehr starke Genexpression). *SULT2B1a* wurde mit moderater Genexpression in exzidierten Hautproben sowie den kompletten RHS detektiert. *SULT2A1*, welche im Fremdstoffmetabolismus in der Leber eine Rolle spielt [52], konnte in keinem der untersuchten Hautgewebe detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die Biotransformationen von Xenobiotika waren die Mitglieder der SULT 1-Familie von besonderem Interesse, vor allem die SULT 1A1. Deren mRNA wurde in allen untersuchten Hautgeweben außer in undifferenzierten epidermalen Zellen moderat exprimiert. Die *SULT1E1*-Expression war in exzidiierter Humanhaut (NHFS und NHS) sowie dem Phenion[®]FT stark und in den Proben des EpiDerm[™]FT moderat (komplettes Modell und Dermis) bis stark (Epidermis). In Primärzellkulturen von Fibroblasten wurde *SULT1A1*, nicht aber *SULT1E1* detektiert. Innerhalb der kompletten Hautgewebe war sowohl die Expression von *SULT1A1* als auch von *SULT1E1* in NHFS gegenüber den anderen kompletten Hautgeweben signifikant erhöht.

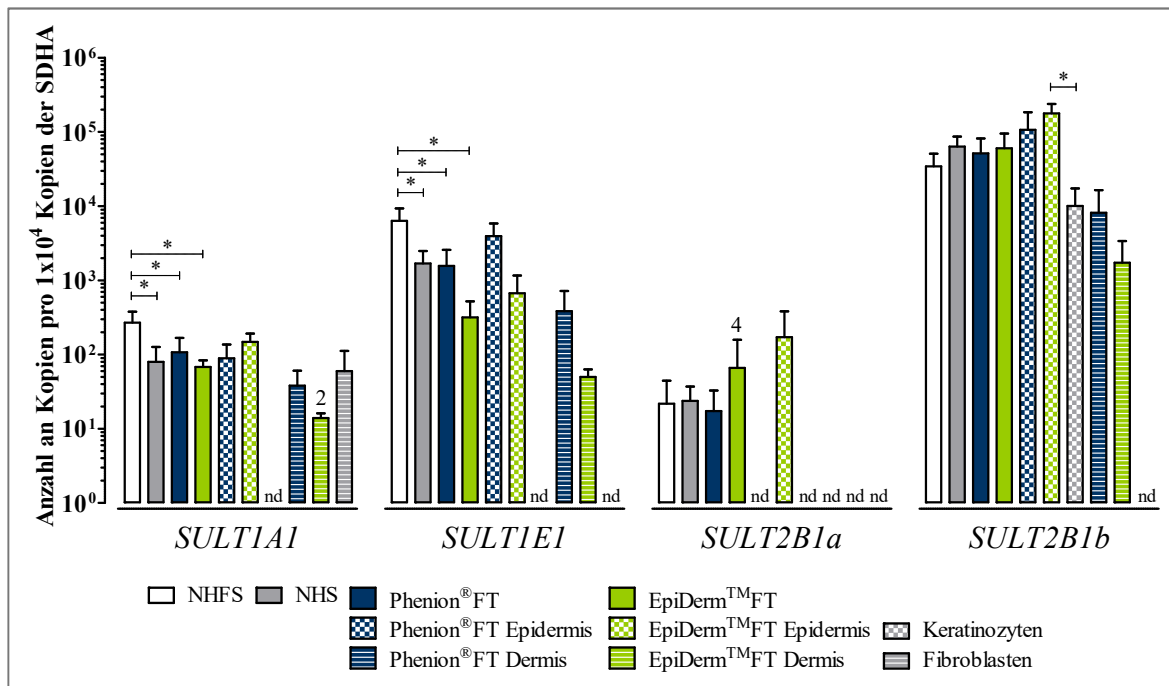


Abbildung 3-5: Genexpression verschiedener SULT. Mittels RT-PCR wurde die Genexpression der SULT-Isoenzyme 1A1, 1E1, 2B1a und 2B1b in undifferenzierten epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten, sowie in exzidiierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) oder adulter Humanhaut (NHS) und den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT untersucht. Dargestellt ist die basale Genexpression normalisiert auf das Referenzgen der Succinatdehydrogenase (SDHA). Mittelwert + SD, n = 3-5, nd = nicht detektiert und „2“ oder „4“ bedeutet, dass die mRNA nur in zwei von drei bzw. vier von fünf Spendern detektiert wurde. Mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* wurde jeweils innerhalb der kompletten, epidermalen oder dermalen Gewebe auf signifikante Expressionsunterschiede getestet und * bedeutet $p \leq 0,05$.

Die verschiedenen Hautgewebe und -konstrukte wurden außerdem hinsichtlich der SULT 1A1-Proteinexpression untersucht. Wie Abbildung 3-6 zeigt, war die für den Fremdstoffmetabolismus wichtige SULT 1A1 in Hautgeweben auf Proteinebene nicht nachweisbar. In undifferenzierten Keratinozyten konnte keine *SULT1A1*-mRNA nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3-5), was deren Fehlen auf Proteinebene erklärt. Jedoch konnte trotz moderater *SULT1A1*-Genexpression weder in basalen Fibroblasten, juveniler (NHFS) oder adulter Humanhaut (NHS), noch in den RHS Phenion®FT oder EpiDerm™FT SULT 1A1-Protein detektiert werden.

3. Ergebnisse

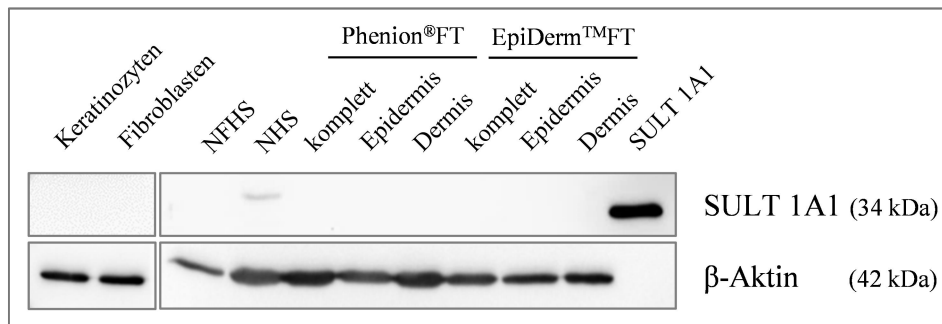


Abbildung 3-6: Proteinexpression der SULT1A1. Die Proteinexpression wurde in undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten, exzidierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) und adulter Haut (NHS) sowie in den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT untersucht. Als Positivkontrolle wurde rekombinant hergestelltes humanes SULT 1A1-Protein (0,7 µg/ml) mitgeführt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot für drei unabhängige Experimente, bei denen SULT 1A1 gemeinsam mit dem Referenzprotein β-Aktin detektiert wurde.

3.1.4 GLUTATHION-S-TRANSFERASEN

Die Aktivität der GST wurde mittels *GST Assay Kit* untersucht (siehe 2.6.3). Die gemessenen Aktivitäten in undifferenzierten Keratinozyten, Fibroblasten und dem Phenion®FT lagen bei rund 81-87 nmol/mg Protein/min (siehe Abbildung 3-7). Im Vergleich dazu wies das EpiDerm™FT eine leicht erhöhte Aktivität auf ($100,7 \pm 16,8$ nmol/mg Protein/min) und adulte Humanhaut zeigte eine geringere GST-Aktivität ($47,0 \pm 33,2$ nmol/mg Protein/min). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

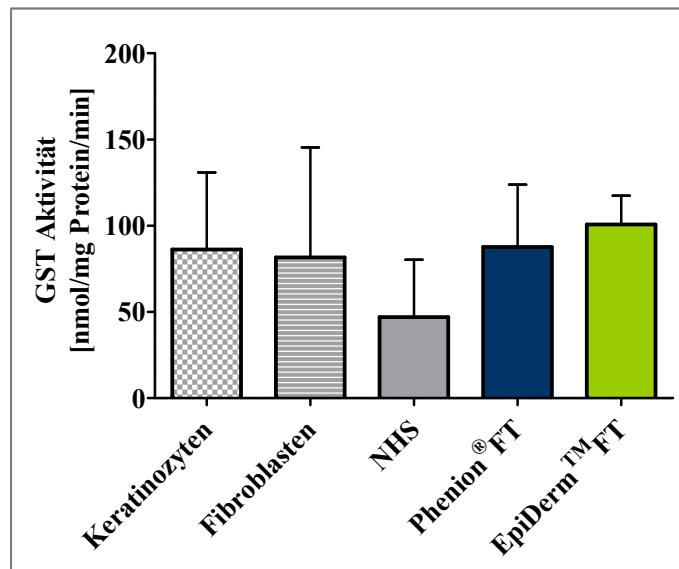


Abbildung 3-7: Aktivität der Glutathion-S-Transferasen. Die GST-Aktivität wurde in S9-Fractionen von undifferenzierten Keratinozyten, Fibroblasten, Humanhaut (NHS) und rekonstruierten Vollhautmodellen (Phenion®FT, EpiDerm™FT) mittels *GST Assay Kit* [110] bestimmt und anschließend auf den Proteingehalt normalisiert. Die statistische Analyse mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede (Mittelwert + SD, n = 3-8).

Auch die Genexpression verschiedener GST-Subtypen wurde in den unterschiedlichen Hautgeweben oder undifferenzierten epidermalen und dermalen Zellen untersucht (siehe Abbildung 3-8).

Die Genfamilien Pi (*GSTP1*) und Theta (*GSTT1*) wurden sowohl in undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten als auch in differenzierter exzidierter (NHFS, NHS) und rekonstruierter Vollhaut (Phenion®FT, EpiDerm™FT) stark exprimiert, wobei die *GSTP1* dominierte (sehr starke Genexpression). Das EpiDerm™FT wies eine signifikant niedrigere *GSTT1*-Expression als die anderen kompletten Hautgewebe auf. Im Gegensatz zu *GSTP1* und *GSTT1* war *GSTA1* in den meisten Geweben nicht nachweisbar. *GSTA1*-mRNA konnte nur in humaner juveniler Vorhaut und dem Dermisäquivalent des Phenion®FT mit moderater bzw. geringer Expression detektiert werden.

3. Ergebnisse

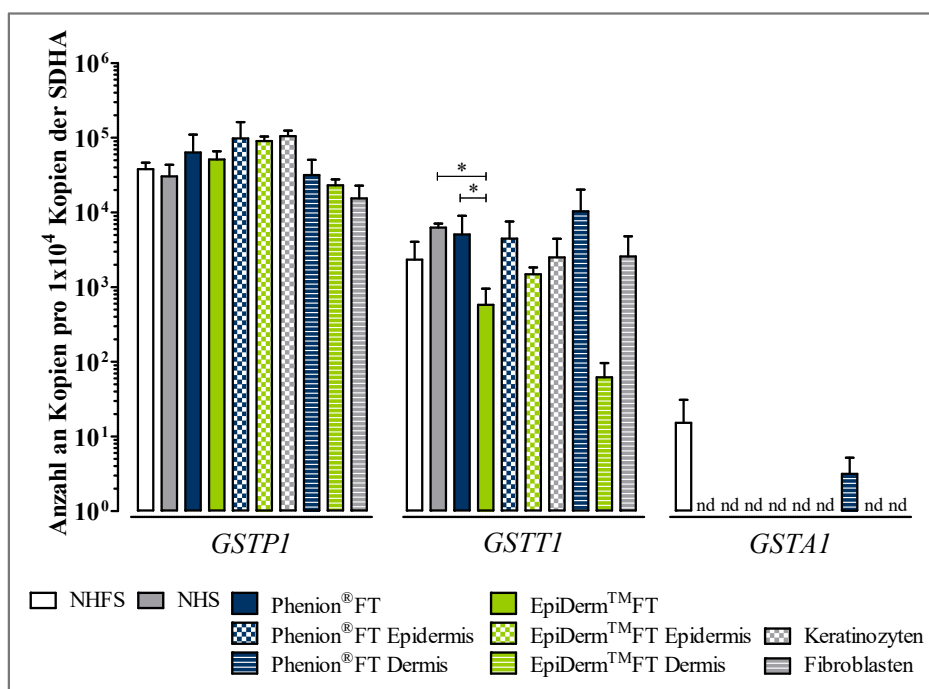


Abbildung 3-8: Genexpression verschiedener GST. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *GSTP1*, *GSTT1* und *GSTA1* in undifferenzierten epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten, sowie in exzidierter humaner juveniler Vorhaut (NHFS) oder adulter Humanhaut (NHS) und den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT untersucht. Dargestellt ist die basale Genexpression normalisiert auf das Referenzgen der Succinatdehydrogenase (SDHA). Mittelwert + SD, n = 3-5. Mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* wurde jeweils innerhalb der kompletten, epidermalen oder dermalen Gewebe auf signifikante Expressionsunterschiede getestet und * bedeutet $p \leq 0,05$.

3.2 ENTWICKLUNG EINER HPLC/UV-DETEKTION

3.2.1 METHODENENTWICKLUNG

Die Biotransformation von 2,4-DAT in verschiedenen Hautzellen, exzidierter Humanhaut und den rekonstruierten 3D-Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT sollte unter Anwendung einer HPLC-Analytik mit UV-Detektion analysiert werden, welche zunächst etabliert werden musste. Die Anforderungen an die HPLC/UV-Analytik waren unter anderem, dass 2,4-DAT und dessen potentielle Metabolite mit ausreichender Auflösung voneinander getrennt wurden und außerdem keine Komponenten aus den Nährmedien oder untersuchten Geweben mit den Signalen von 2,4-DAT und den Metaboliten interferierten.

Zu Beginn wurden unterschiedliche Zusammensetzungen aus Wasser mit Acetonitril oder Methanol als Fließmittel und RP-8 (RP = engl. *reversed phase*)

oder RP-18-Chromatographiesäulen verwendet [122, 123]. Jedoch wurde mit keiner der getesteten Kombinationen eine gute Peaksymmetrie und ausreichend lange Wechselwirkung von 2,4-DAT mit der Chromatographiesäule, gemessen in der Retentionszeit (t_{ret}), erzielt (siehe Tabelle 3-1). Daraufhin wurde eine modifizierte RP-Säule verwendet, an welcher die Kohlenstoffketten durch Phenyl-Hexyl-Strukturen ersetzt wurden. Diese ermöglichen aromatischen Strukturen, zu denen 2,4-DAT und seine Metabolite zählen, eine bessere Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial. Die Kombination dieser Säule mit der Erhöhung des pH-Wertes im Fließmittel durch Verwendung von TRIS-Puffer pH 8,1 statt Wasser führten bei guter Peaksymmetrie zu einer Retentionszeit von 7,90 min (siehe Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Übersicht zu Säulen, Fließmittel und Retentionszeiten von 2,4-DAT bei verschiedenen HPLC-Methoden.

Säulenmaterial	Fließmittelzusammensetzung		t_{ret} 2,4-DAT [min]
RP-18	Wasser 20%	Acetonitril 80%	1,42
	Wasser 80%	Acetonitril 20%	3,54
	Wasser 20%	Methanol 80%	4,10
RP-8	Wasser 50%	Acetonitril 50%	13,77
RP-Phenyl-Hexyl	TRIS-Puffer 90%	Acetonitril 10%	7,90

Bei der isokratischen HPLC mit TRIS-Puffer und Acetonitril wurde eine zufriedenstellende Retentionszeit für 2,4-DAT erzielt. Bei Vermessung der beiden potentiellen Metabolite M1 und M2 sowie der Analyse einer KBM-Mediumprobe wurde jedoch festgestellt, dass sich verschiedene Signale überlagerten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde statt einer isokratischen Elution bei der HPLC ein Fließmittelgradient etabliert (vgl. Tabelle 2-17), mit dem eine gute Auftrennung von 2,4-DAT, M1 und M2 sowie die Unterscheidung von anderen Mediumkomponenten möglich war. Beispielchromatogramme sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

3. Ergebnisse

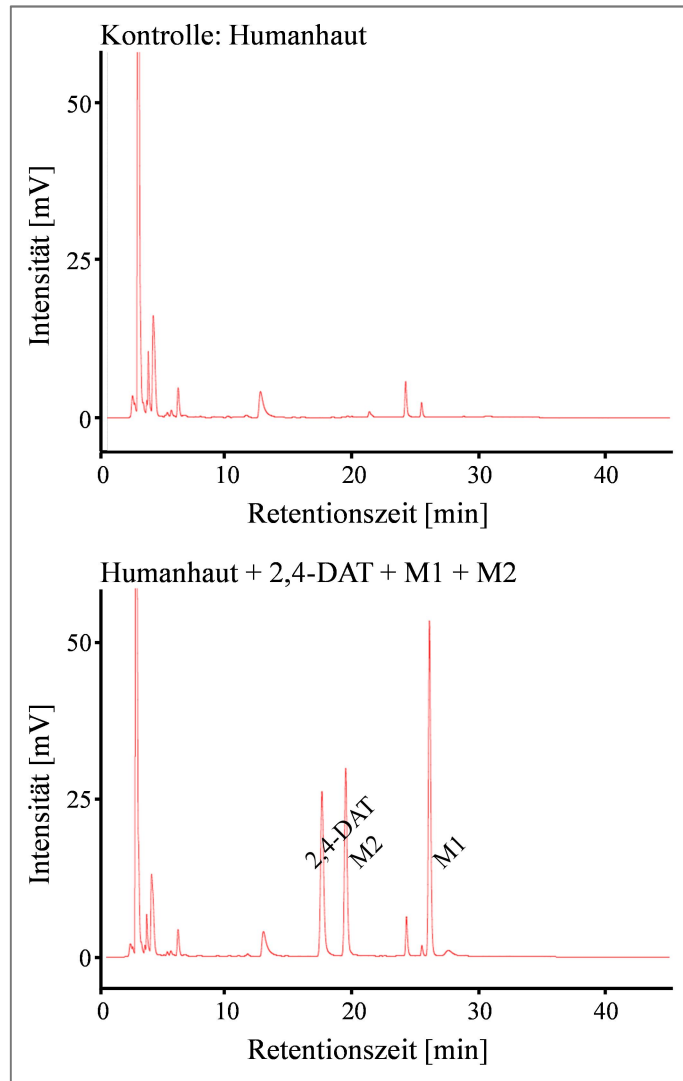


Abbildung 3-9: Auftrennung von 2,4-DAT, M1 und M2. Beispielchromatogramme für die Auftrennung von 2,4-DAT, M1 und M2 von Störsignalen einer Humanhaut-Probe mit der etablierten HPLC/UV-Analytik (vgl. 2.7.2). Das obere Chromatogramm zeigt die unbehandelte Humanhautprobe, während im unteren Chromatogramm die Substanzen 2,4-DAT, M1 und M2 in einer Konzentration von 10^{-4} M zugesetzt wurden.

Eine weitere Herausforderung für die HPLC/UV-Analytik stellte die Probenvorbereitung dar. Das bei einer HPLC verwendete Säulenmaterial zeichnet sich durch sehr kleine Poren aus, die von großen Molekülen wie beispielsweise Proteinen oder Zelltrümmern blockiert werden können. Aus diesem Grund mussten Proteine und Gewebebruchstücken aus den untersuchten Gewebeproben entfernt werden, bevor die HPLC/UV-Messung durchgeführt werden konnte. Verschiedene Extraktionsmittel und Proteinfällungen wurden getestet, wobei jedes Extraktions- oder Fällungsreagenz in mindestens zwei unabhängigen Experimenten oder Proben verwendet wurde (siehe Tabelle 3-2). Nur die Proteinfällung mit Aceton in einem

Verhältnis von 5:1 (Aceton:Probe) führte zu einer effektiven Probenaufreinigung bei gleichzeitig hoher Wiederfindung von 2,4-DAT mit knapp 80 %.

Tabelle 3-2: Wiederfindung von 2,4-DAT nach Anwendung unterschiedlicher Probenaufreinigungen.

Lösungsmittel	Verhältnis Lösungsmittel:Probe	Wiederfindung 2,4-DAT [%]
Aceton	5:1	78,3 ± 20,2
Acetonitril:Methanol (10:1)	4:1	63,9 ± 31,2
Dichlormethan	5:1	37,6 ± 13,5
Diethylether	1:1	3,5 ± 0,7
Ethylacetat	1:1	28,7 ± 36,4
Toluol	1:1	6,1 ± 0,8

In einem nächsten Schritt wurden neben der Wiederfindung von 2,4-DAT auch die Wiederfindung der beiden potentiellen Metabolite M1 und M2 überprüft. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen von 2,4-DAT, M1 und M2 in TRIS-Puffer oder Nährmedien hergestellt und der Aufreinigungsprozedur unterzogen. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC/UV-Analytik gemessen und anhand einer frischen, nicht aufgereinigten Standardreihe in TRIS-Puffer quantifiziert. Die Ergebnisse ausgewählter Konzentrationen für die Aufreinigung aus TRIS-Puffer sind in Tabelle 3-3 aufgeführt. Bei TRIS-Puffer konnten auch die Ausgangslösungen gemessen werden und somit war direkt die Berechnung der Wiederfindung möglich. Auch für die übrigen Nährmedien KBM, FBM, ALI, EFT-400-ASY und Komplettmedium wurden Intratages- und Intertages-Variabilität bestimmt, wobei ähnliche Ergebnisse erhalten wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Wiederfindung von 2,4-DAT nach der Aufreinigung schwankte stark und war bei niedrigen Konzentrationen geringer als bei hohen Konzentrationen. Hingegen war die Wiederfindung der Metabolite M1 und M2 konzentrations-unabhängig konstant bei über 100% (nach Einbeziehung des Aufreinigungsfaktors, siehe 2.7.1). Im Mittel ergab sich z. B. für den Metaboliten M1 eine Wiederfindung von 114,8 % und die Werte der übrigen Analysen wurden auf 100 % korrigiert.

3. Ergebnisse

Tabelle 3-3: Wiederfindung von 2,4-DAT, M1 und M2 nach Aufreinigung aus TRIS-Puffer.

Substanz	Konzentration [M]	Intratages-Wiederfindung [%]	Intertages-Wiederfindung [%]
2,4-DAT	1×10^{-5}	15,91 ^{XIV}	24,76 ^{XIV}
	1×10^{-4}	23,9 ± 10,6	17,8 ± 16,1
	1×10^{-3}	93,6 ± 1,5	55,1 ± 42,7
M1	1×10^{-5}	114,6 ± 2,0	109,9 ± 13,4
	1×10^{-4}	116,8 ± 2,8	114,6 ± 12,1
	1×10^{-3}	115,7 ± 1,7	116,4 ± 26,7
M2	1×10^{-5}	116,4 ± 2,0	109,5 ± 8,0
	1×10^{-4}	112,3 ± 2,0	111,3 ± 9,4
	1×10^{-3}	113,3 ± 1,4	115,5 ± 26,1

3.2.2 STABILITÄT VON 2,4-DAT UND M1

Während der Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT in kutanen Zelltypen und exzidierter Humanhaut wurde in Kontrollproben, in denen 2,4-DAT nur in Nährmedium inkubiert wurde, ein nicht-enzymatischer Abbau von 2,4-DAT unter experimentellen Bedingungen beobachtet. Die Kontrollproben dienten der Identifikation von Peaks in den Analysechromatogrammen, die nicht durch Biotransformationsprodukte von 2,4-DAT verursacht wurden.

Wie Abbildung 3-10 b zeigt, wiesen diese HPLC/UV-Chromatogramme neben dem Peak von 2,4-DAT mehrere Peaks geringer und einen charakteristischen Peak hoher Intensität auf, der vor der Muttersubstanz 2,4-DAT eluierte.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Stabilitätsexperimente mit 2,4-DAT und dem einfach N-acetylierten Metaboliten M1 durchgeführt (siehe 2.7.4). Nach Quantifizierung von 2,4-DAT bzw. M1 mithilfe der etablierten HPLC/UV-Methode wurde die detektierte Menge auf die eingesetzte Substanzmenge normalisiert (Abbildung 3-10 a). 2,4-DAT wurde in allen verwendeten Kulturmedien zwar unterschiedlich stark, aber in jedem Fall deutlich nicht-enzymatisch umgesetzt. Der Metabolit M1 hingegen war über die untersuchte Inkubationszeit in den verschiedenen Nährmedien stabil. Folglich wurde für die Untersuchung der Biotransformation von 2,4-DAT nur der Metabolit und nicht die Muttersubstanz quantifiziert.

^{XIV} Bei dieser Konzentration wurde nur in einem von fünf Experimenten ein Signal von 2,4-DAT oberhalb des Detektionslimits gemessen.

Die Analysen mittels LC-MS und NMR ergaben, dass es sich bei dem dominierenden Umwandlungsprodukt um das N-Glykosid N-4-(*o*-toluidin)- α -D-glucosylamin handelt. Die Struktur ist in Abbildung 3-10 c dargestellt und entstand vermutlich aus der Reaktion von 2,4-DAT mit Glukose, die als Nährstoff in allen verwendeten Nährmedien vorhanden war. In den ^1H -NMR-Spektren gab jedes Wasserstoffatom abhängig von seinen Bindungspartnern ein charakteristisches Signal, sodass sowohl die N-glykosidische Bindung an der Aminogruppe des 2,4-DAT in *para*-Position, als auch die Ringstruktur der Glukose eindeutig zugeordnet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

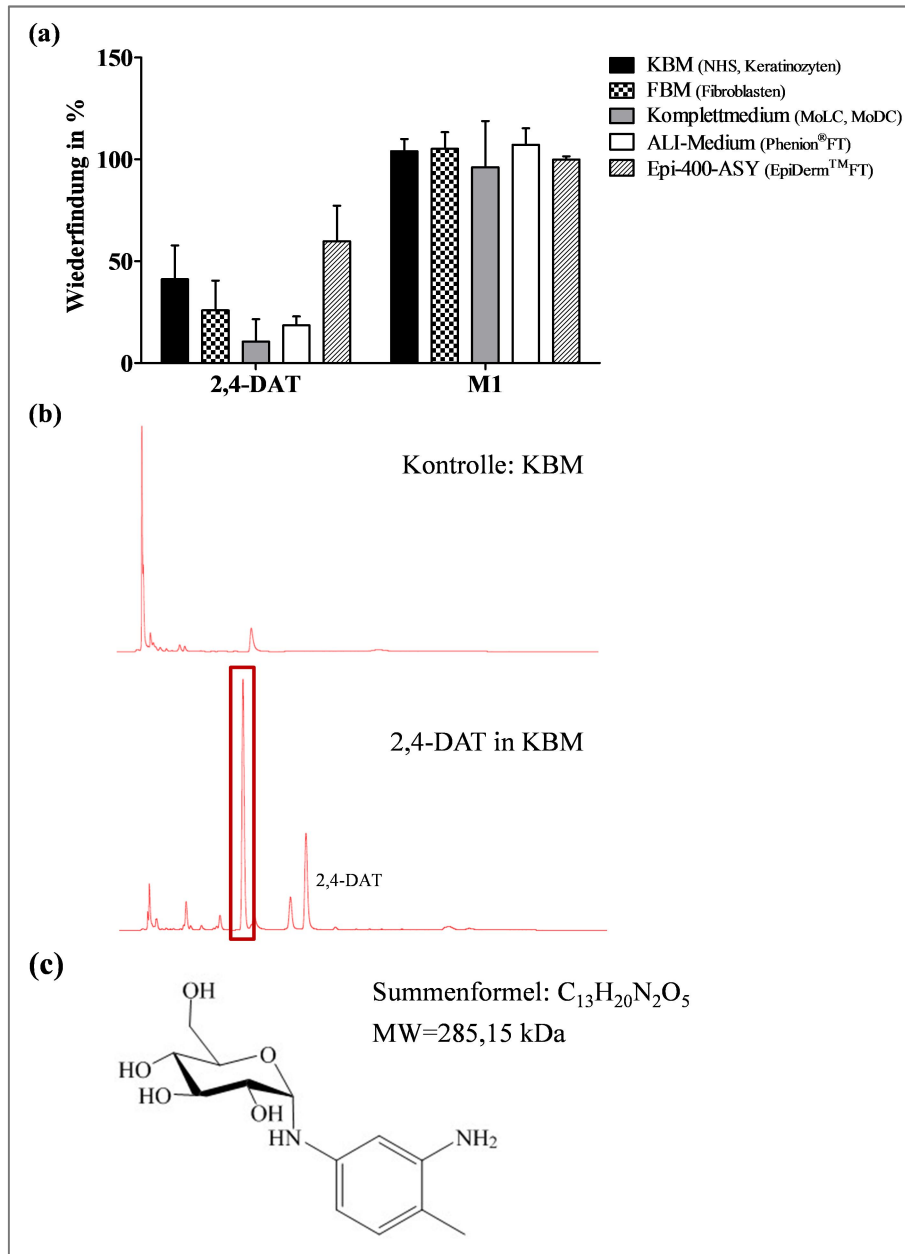


Abbildung 3-10: Stabilität von 2,4-DAT und M1. (a) 2,4-DAT oder M1 wurden unter experimentellen Bedingungen für 24 h in verschiedenen Nährmedien inkubiert, anschließend mit der etablierten HPLC/UV-Methode quantifiziert und auf die Ausgangsmenge normalisiert (Mittelwert + SD, n = 2-9). (b) Repräsentative HPLC/UV-Chromatogramme von KBM nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen ohne (oben) oder mit (unten) 2,4-DAT. Die Umrandung markiert den Peak des dominierenden nicht-enzymatischen Reaktionsproduktes, dessen Struktur mittels LC-MS sowie ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrometrie als N-4-(o-toluidin)-α-D-glucosylamin identifiziert wurde (c).

3.3 BIOTRANSFORMATION VON 2,4-DAT

Bevor die Biotransformation von 2,4-DAT untersucht werden konnte, galt es zunächst eine geeignete 2,4-DAT-Konzentration zu ermitteln. Diese Arbeitskonzentration durfte nicht zell- oder gewebeschädigend sein, damit die Biotransformationskapazität der zu untersuchenden Zellen und Gewebe nicht eingeschränkt wurde.

3.3.1 ZYTOTOXIZITÄT VON 2,4-DAT

Die Zytotoxizität unterschiedlicher 2,4-DAT-Konzentrationen zwischen 0,05 mM (5×10^{-5} M bzw. 6,1 µg/ml) und 20 mM (2×10^{-2} M bzw. 2443,4 µg/ml) wurde unter Verwendung des MTT-Tests an primären Keratinozyten, Fibroblasten und HepG2-Zellen untersucht.

Bei Keratinozyten reduzierten Konzentrationen ≥ 1 mM (1×10^{-3} M) die Viabilität nach 24 h auf unter 80 % und nach 48 h Inkubation mit 2,4-DAT war die Zellviabilität bereits bei 0,05 mM (5×10^{-5} M) verringert. Im Gegensatz dazu wirkten bei Fibroblasten und HepG2 sowohl nach 24 h als auch nach 48 h erst Konzentrationen ≥ 20 mM (2×10^{-2} M) zytotoxisch (siehe Abbildung 3-11 a-c).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde 1×10^{-4} M als Arbeitskonzentration für die Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT in Einzelzellkulturen über einen Zeitraum von 24 h gewählt. Auch MoLC und MoDC zeigten bei dieser Konzentration von 2,4-DAT keine verringerte Zellviabilität (siehe Abbildung 3-11 d).

3. Ergebnisse

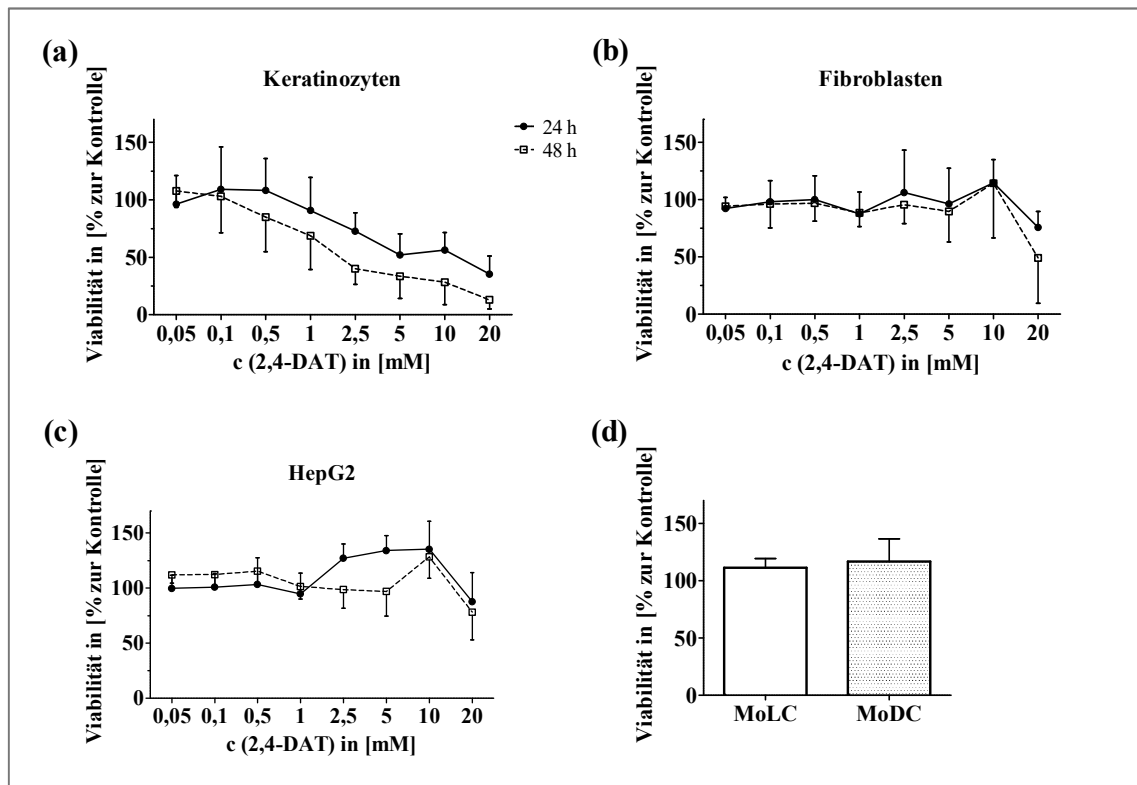


Abbildung 3-11: MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Keratinozyten (a), Fibroblasten (b) und HepG2 (c) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 2,4-DAT im Bereich von 0,05-20 mM über 24 h oder 48 h stimuliert und anschließend ihre Viabilität mittels MTT-Test bestimmt. Die Absorptionen einer nur mit dem Lösungsmittel Wasser in Basalmedium behandelten Kontrolle wurden als 100 % gesetzt und die übrigen Werte mit dieser verglichen (Mittelwert \pm SD, n = 5). (d) MoLC und MoDC wurden für 24 h mit 10^{-4} M 2,4-DAT inkubiert und anschließend ihre Zellviabilität geprüft (Mittelwert + SD, n = 3-4).

Um eine Gewebeschädigung der exzidierten oder rekonstruierten Vollhaut nach Inkubation mit 2,4-DAT auszuschließen, wurden die Akzeptormedien auf die Sekretion der inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 α (IL-1 α) und IL-8 sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht.

Beim Vergleich des Akzeptormediums der Kontrollmodelle mit den mit 2,4-DAT behandelten Modellen konnte weder bei exzidiierter Humanhaut (NHS), noch bei den RHS Phenion[®]FT und EpiDermTMFT eine erhöhte IL-Sekretion durch die Stimulation mit 2,4-DAT über 3 h (nicht gezeigt) oder 24 h festgestellt werden (Abbildung 3-12 a und b). Weiterhin wurde auch kein Unterschied in der LDH-Sekretion zwischen den mit 2,4-DAT behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, wie Abbildung 3-12 c zeigt.

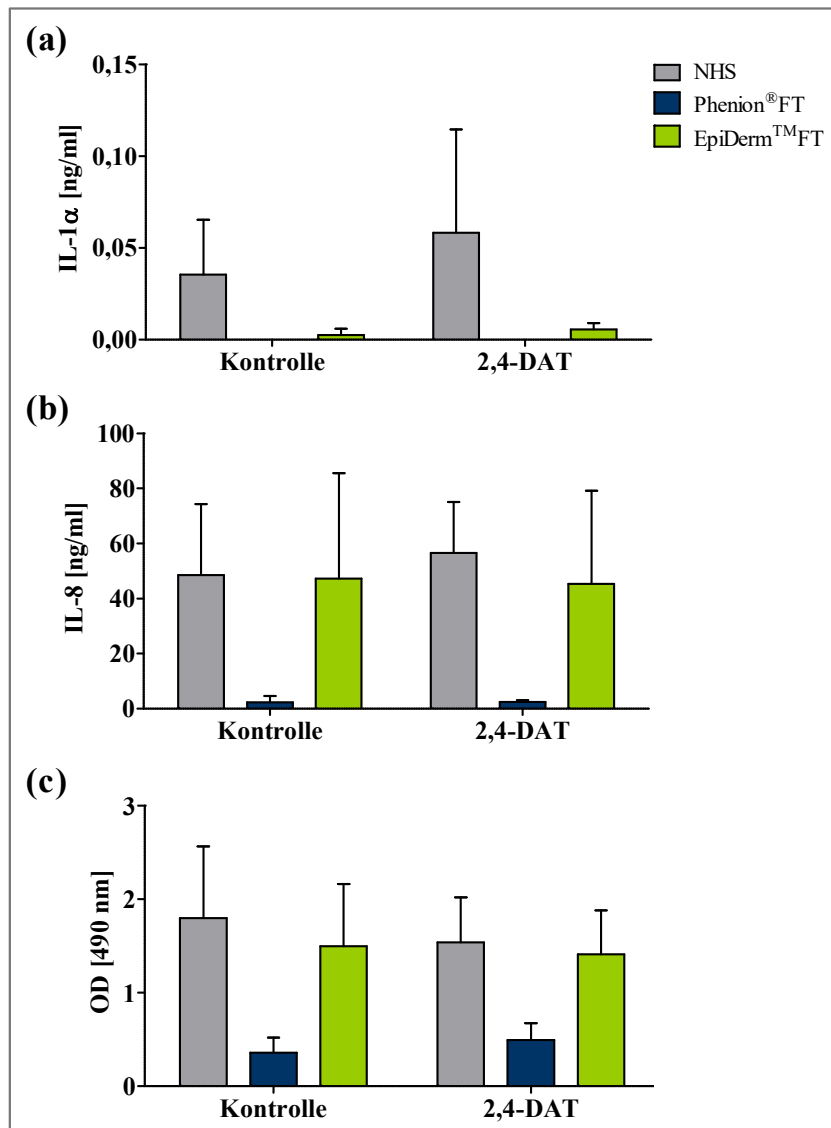


Abbildung 3-12: Sekretion von Interleukinen und LDH nach Behandlung der Hautgewebe mit 2,4-DAT. Im Akzeptormedium der für 24 h mit $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ mit 2,4-DAT (0,1 M) oder Wasser (Kontrolle) stimulierten exzidierten Humanhaut (NHS) oder den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT wurden unter Verwendung der *ELISA DuoSet Kits* [114, 115] die inflammatorischen Zytokine IL-1 α (a) und IL-8 (b) quantifiziert (Mittelwert + SD, n = 3-6). Die LDH-Sekretion (c) wurde mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit* [116] bestimmt (Mittelwert + SD, n = 2-3). Die statistische Analyse mittels *Student's t-Test* ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und mit 2,4-DAT behandeltem Gewebe.

3.3.2 BIOTRANSFORMATION VON 2,4-DAT IN ZELLKULTUREN

Verschiedene Zelltypen der Haut wurden in separaten Kulturen hinsichtlich ihrer Biotransformationkapazität für 2,4-DAT untersucht. Keratinozyten und Fibroblasten wurden nach 3 h oder 24 h Inkubation auf 2,4-DAT und dessen potentielle Metabolite analysiert. Da nach 3 h keine Metabolite detektierbar waren

3. Ergebnisse

(Daten nicht gezeigt), wurden MoLC und MoDC nur nach 24 h auf Biotransformationsprodukte von 2,4-DAT untersucht.

In allen vier untersuchten Zelltypen wurden 2,4-DAT und M1 nur im Zellkulturüberstand, nicht aber im Zellysate detektiert (Daten nicht gezeigt). In Keratinozyten, Fibroblasten, MoLC und MoDC wurde nur der Metabolit M1 (einfach N-acetyliert an der *para*-Aminogruppe, vgl. Abbildung 2-2) in detektierbaren Mengen beobachtet. Weder der Metabolit M2 noch ein diacetylierter Metabolit wurden in den Zellproben detektiert. Weitere Peaks in den Chromatogrammen konnten anhand der unbehandelten Proben und Medium-Kontrollen zugeordnet und als potentielle Metabolite ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung von M1 ist in Abbildung 3-13 zusammengefasst, wobei die Unterschiede im experimentellen Aufbau durch Normalisierung auf die Zellzahl ausgeglichen wurden.

Im Zellkulturüberstand der Keratinozyten wurde mit der dreifachen Menge signifikant mehr M1 detektiert als im Zellkulturüberstand der Fibroblasten oder Immunzellen. Die gemittelte Metabolitmenge in Fibroblasten und MoLC bzw. MoDC lag in einem ähnlichen Konzentrationsbereich.

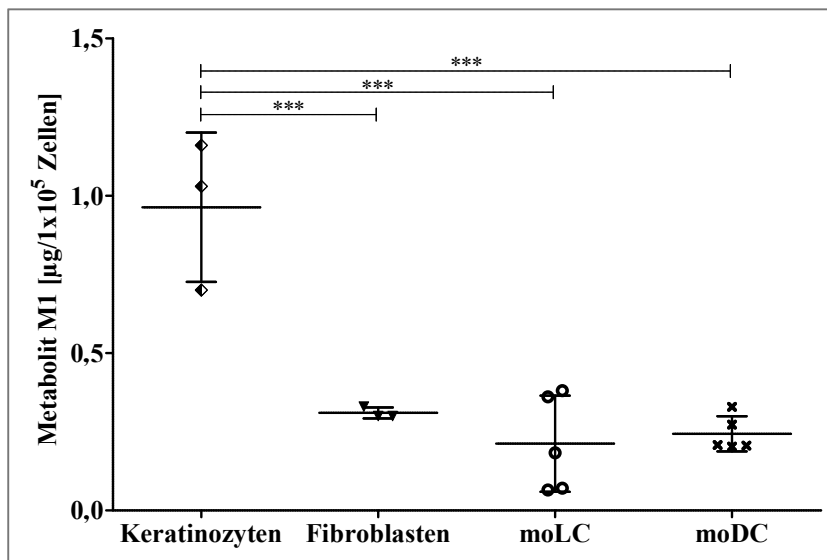


Abbildung 3-13: Biotransformation von 2,4-DAT in Einzelzellkulturen humaner Hautzellen. 2,4-DAT (10^{-4} M bzw. $12,2 \mu\text{g/ml}$) wurde für 24 h in Zellkulturen primärer Keratinozyten, Fibroblasten und Monozyten-abgeleiteter Langerhans-Zellen (MoLC) oder dendritischen Zellen (MoDC) inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand auf den Metaboliten M1 analysiert und dieser quantifiziert. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* auf signifikante Unterschiede geprüft, wobei *** $p \leq 0,001$ bedeutet (Mittelwert \pm SD, $n = 3-5$).

Um zu beurteilen, ob mit einer Konzentration von 1×10^{-4} M 2,4-DAT ausreichend Substrat zur Analyse des gesamten metabolischen Potentials von Keratinozyten gegeben war, wurde 2,4-DAT in einer Konzentration von 1×10^{-3} M eingesetzt. Trotz deutlich erhöhter Substratmenge wurde weder ein Anstieg in der M1-Menge beobachtet, noch konnten andere Metabolite detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die gewählte Konzentration von 2,4-DAT ausreichte, um die N-Acetyltransferase in den verschiedenen Hautzellen zu sättigen [124].

3.3.3 INHIBITION DER N-ACETYLTRANSFERASE

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem detektierten Metaboliten M1 um das durch N-Acetyltransferasen (NAT) gebildete N-(3-Amino-4-methylphenyl)-acetamid handelte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe gezielt die NAT inhibiert.

Die Cyanamidkonzentration von 1 mM wurde für die Inhibitions-experimente ausgewählt [112] und führte zu einer Reduktion der gebildeten M1-Menge um circa 60 % (Abbildung 3-14 a). Experimente zur Zytotoxizität mittels MTT-Test bestätigten außerdem eine ausreichend hohe Viabilität der Keratinozyten (> 80 %, Abbildung 3-14 b) bei dieser Konzentration, sodass eine verringerte Metabolitmenge aufgrund einer reduzierten Zellviabilität ausgeschlossen werden konnte.

3. Ergebnisse

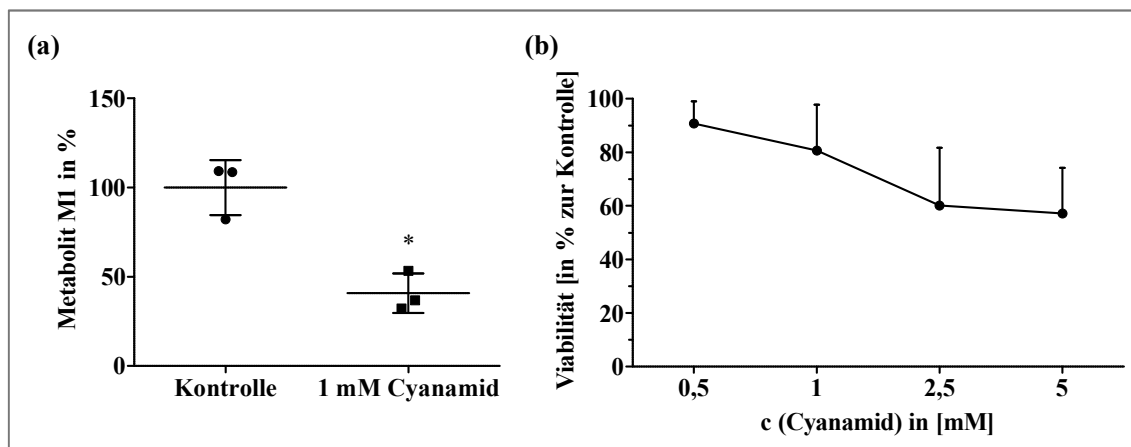


Abbildung 3-14: Inhibition der N-Acetyltransferase 1. (a) Primäre humane Keratinozyten wurden 1 h ohne (Kontrolle) oder mit dem spezifischen NAT1-Inhibitor Cyanamid (1 mM) vorinkubiert. 24 h nach Zugabe von 2,4-DAT (1×10^{-4} M bzw. 12,22 $\mu\text{g/ml}$) wurde der Metabolit M1 in den Zellkulturüberständen unter Verwendung der HPLC/UV-Analytik quantifiziert, wobei die M1-Menge in der Kontrollgruppe als 100 % gesetzt wurde. Die Daten wurden mittels *Student's* Einstichproben-t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft, * bedeutet $p \leq 0,05$ (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). (b) An primären Keratinozyten wurde die Zytotoxizität unterschiedlicher Cyanamid-Konzentrationen (0,5-5 mM) unter Anwendung des MTT-Tests nach einer Inkubationszeit von 25 h geprüft (Mittelwert + SD, $n = 5$).

3.3.4 BIOTRANSFORMATION VON 2,4-DAT IN VOLLHAUTMODELLEN

Der 2,4-DAT-Metabolismus in exzidiierter Humanhaut (NHS) und den beiden RHS Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT wurde nach 3 h und 24 h untersucht. Im Gegensatz zu den Einzelzellkulturen konnte in den verschiedenen Gewebeproben bereits nach 3 h der einfach N-acetylierte Metabolit M1 detektiert werden (Abbildung 3-15). Nach 24 h war dessen Menge in allen untersuchten Geweben nochmals deutlich erhöht, wobei in beiden RHS signifikant mehr M1 quantifiziert wurde als in exzidiierter Humanhaut.

Bei Betrachtung der Abbildung 3-15 a fällt auf, dass im Phenion[®]FT-Gewebe wesentlich mehr M1 detektiert wurde als in NHS und EpiDerm[™]FT, deren M1-Mengen ähnlich waren. Auch im Akzeptormedium des Phenion[®]FT wurde nach 24 h signifikant mehr M1 detektiert (Abbildung 3-15 b). Bei Quantifizierung der Gesamtmenge an gebildetem M1 in Gewebe und Akzeptormedium der drei verwendeten Modelle ergab sich folgendes Ergebnis: 24 h nach topischer Applikation von 2,4-DAT mit einer Konzentration von 122,17 $\mu\text{g/cm}^2$ wurden rund 5 % bei der Passage durch NHS zu M1 umgewandelt. Das EpiDerm[™]FT zeigte durch die Umwandlung von 9 % 2,4-DAT zu M1 eine

knapp doppelt so hohe NAT-Aktivität wie NHS. Die größten M1-Mengen und somit die höchste NAT-Aktivität wurde beim Phenion®FT beobachtet, welches insgesamt 13 % des applizierten Ausgangsmaterials metabolisch zu M1 umsetzte.

Weiterhin wurde ein rasches Penetrations- und Permeationsverhalten von 2,4-DAT in den untersuchten Hautgeweben beobachtet. Bereits nach 3 h wurden im Akzeptormedium 2,4-DAT (nicht gezeigt) und M1 detektiert (siehe Abbildung 3-15 b), das nur bei Durchqueren des Gewebes in lebenden Zellen mit NAT-Aktivität aus 2,4-DAT gebildet werden konnte. Zusätzlich war 2,4-DAT nach 3 h nur noch auf der Oberfläche von exzidierte Humanhaut nachweisbar, nicht aber auf der Oberfläche der RHS (nicht gezeigt), was eine rasche Penetration des 2,4-DAT in die 3D-Vollhautmodelle bestätigt. Nach 24 h war die Penetration nahezu vollständig, da 2,4-DAT weder auf der Oberfläche von NHS, noch auf RHS zu finden war. Außerdem wurde der überwiegende Teil von 2,4-DAT und M1 im Akzeptormedium detektiert (2,4-DAT nicht gezeigt, M1 siehe Abbildung 3-15 b).

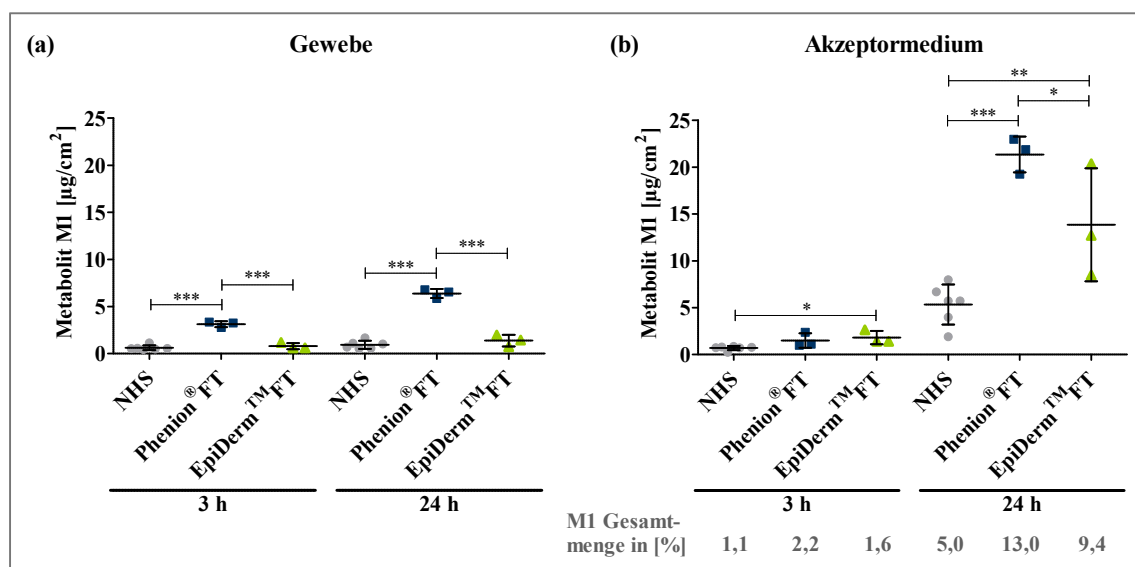


Abbildung 3-15: Biotransformation von 2,4-DAT in rekonstruierten Vollhautmodellen und exzidierte Humanhaut. 2,4-DAT ($122,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) wurde topisch auf frisch exzidierte Humanhaut (NHS) und die rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion®FT oder EpiDerm™FT appliziert und für 3 h oder 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden das Gewebe (a) und das Akzeptormedium (b) auf 2,4-DAT und M1 mit HPLC/UV-Analytik untersucht und M1 als einziger detektierbarer Metabolit quantifiziert. Die Daten wurden mittels *one-way ANOVA* und *Bonferroni's multiple comparison post test* auf signifikante Unterschiede geprüft, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ bedeutet (Mittelwert \pm SD, $n = 3-6$).

4. DISKUSSION

Die Reduzierung von Tierversuchen im Sinne des 3R-Prinzips [4] sowie einige Gesetzesänderungen innerhalb der EU führten zu der Entwicklung verschiedener *in vitro* generierter Hautmodelle als Alternativen zu Tierversuchen im Bereich der dermatologischen Forschung und Gefährdungsbeurteilung. Rekonstruierte Epidermismodelle sind inzwischen gut charakterisiert, aber das Wissen über die metabolische Kompetenz von der Humanhaut noch ähnlicheren 3D-Vollhautmodellen weist noch große Lücken auf. Gleichzeitig wird die Rolle der Haut im extrahepatischen Fremdstoffmetabolismus immer wichtiger [33], da sie täglich mit vielen verschiedenen Chemikalien und anderen Substanzen in Kontakt kommt und auch organspezifische Kontaktallergien durch diese ausgelöst werden können. Um solche Prozesse und Substanzen hinsichtlich ihres Gefährdungspotentials noch besser beurteilen zu können, ist eine umfassende Charakterisierung des metabolischen Potentials von Hautgeweben unerlässlich.

Die mit diesem Promotionsprojekt erarbeiteten Ergebnisse sollen neue Informationen zu fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in Humanhaut *ex vivo* sowie den rekonstruierten Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT zur Verfügung stellen. Neue Daten über die Expression und Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme Monoaminoxidasen, Steroid-5 α -Reduktasen, Glutathion-S-Transferasen und Sulfotransferasen in den verschiedenen Hautmodellen konnten erarbeitet werden. Weiterhin geben die Ergebnisse zur Verstoffwechslung von 2,4-Diaminotoluol nach topischer Applikation Aufschluss über das Penetrationsverhalten und die Biotransformationskapazität der untersuchten Gewebe und bilden eine Ergänzung zu den Studien anderer aromatischer Amine. Somit leistet dieses Promotionsprojekt einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der 3D-Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT. Es konnte gezeigt werden, dass beide 3D-Vollhautmodelle Humanhaut *ex vivo* bezüglich der Enzymausstattung gut repräsentieren und das bringt sie dem Ziel, als validierte Testsysteme zur Beurteilung dermatotoxikologischer Fragestellungen eingesetzt zu werden, ein Stück näher.

4.1 BIOTRANSFORMATIONSREAKTIONEN DER PHASE-II ÜBERWIEGEN BEIM FREMDSTOFFMETABOLISMUS IN DER HAUT

4.1.1 PHASE-I-OXIDATIONEN SPIELEN IN DER HAUT EINE UNTERGEORDNETE ROLLE

Die Expression der in der Leber bei Oxidationsreaktionen dominierenden Cytochrom P450-Isoenzyme (CYP) [34] wurde bereits vielfach in Haut und auch rekonstruierten Epidermis- oder Vollhautmodellen untersucht. Deren basale Expression in kutanen Geweben ist jedoch um ein Vielfaches geringer als in der Leber [33, 125] und in verschiedenen Studien wurde keine oder nur geringe CYP-Aktivitäten detektiert [25, 77, 78, 126]. Somit spielen CYP-katalysierte Oxidationsreaktionen in der Haut nur eine untergeordnete Rolle. Im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurde deshalb untersucht, ob Monoaminoxidasen (MAO) in der Haut stärker vertreten sind und alternativ zu CYP Phase-I-Oxidationen katalysieren.

Eine MAO-Enzymaktivität konnte nur in exzidiierter Humanhaut, nicht aber in Einzelzellkulturen oder rekonstruierten 3D-Vollhautmodellen detektiert werden. Trotz moderater bis starker Genexpression von *MAOB* bzw. *MAOA* in allen untersuchten Geweben zeigten Analysen mittels Western Blot eine wesentlich geringere oder fehlende Expression von MAO A bzw. MAO B auf Proteinebene in beiden RHS und undifferenzierten Keratinozyten oder Fibroblasten.

Das in dieser Arbeit verwendete Aktivitätsassay basiert auf der Detektion von Lumineszenz und war im Vergleich zu bisher verwendeten radiochemischen Messmethoden [41, 127, 128] anwendungsfreundlicher, aber weniger sensitiv. Mit Hilfe eines radiochemischen Aktivitätsassays hätte möglicherweise die MAO-Aktivität trotz geringerer Proteinexpression auch in den rekonstruierten Vollhautmodellen quantifiziert werden können.

Die höhere MAO-Expression bzw. -Aktivität in exzidiierter Humanhaut im Vergleich zu den anderen untersuchten Geweben kann verschiedene Ursachen haben. Die untersuchten 3D-Vollhautmodelle bestehen aus den in der Haut überwiegenden Zelltypen Keratinozyten und Fibroblasten, weisen aber keine Nervenzellen oder Drüsengewebe auf. Dies stellt einen großen Unterschied zur exzidierten Humanhaut dar und in früheren histologischen Untersuchungen wurde

4. Diskussion

gezeigt, dass die MAO-Expression in Nervenzellen, Haarfollikeln, Schweiß- und Talgdrüsen der Haut wesentlich stärker ist als in der Epidermis [37, 38].

Auch altersabhängige Expressionsunterschiede können im Fall der MAO eine Rolle spielen. Die untersuchten Zellkulturen von Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus juvenilen Vorhäuten isoliert (Alter maximal 10 Jahre; [84]) und auch die verwendeten RHS bestehen aus neonatalen Zellen (Angaben der Hersteller). Es handelt sich hierbei also um wesentlich jüngeres Gewebe als die untersuchte adulte Haut, die von Spendern älter als 40 Jahre gewonnen wurde. Vor allem MAO A ist in adulter exzidiert Humanhaut stärker exprimiert als in junger Vorhaut oder den RHS (siehe Abbildung 3-3). Für Fibroblastenkulturen wurde gezeigt, dass die MAO-Aktivität sowohl mit steigenden Spenderalter als auch mit steigender Zellkultur-Passage zunimmt, wobei die Aktivität der MAO A stärker zunahm als die der MAO B [105]. Auch in anderen humanen Geweben, vor allem im Gehirn, wurde eine altersabhängige Zunahme von MAO A und MAO B beobachtet [129-131]. Widersprüchlich zur Literatur erscheint in diesem Zusammenhang jedoch die in dieser Arbeit beobachtete wesentlich stärkere MAO B-Expression in juveniler Vorhaut im Vergleich zu adulter Abdominalhaut, sowohl auf Gen- als auch Proteinebene. Im Gegensatz zu abdominaler Haut konnten die Vorhäute nicht dermatomisiert werden und trotz vielfachen Waschens mit PBS waren die NHFS-Proben möglicherweise durch Blut verunreinigt. Thrombozyten exprimieren ausschließlich MAO B [35], sodass Blutreste in den NHFS-Proben die erhöhte MAO B-Expression im Vergleich zu dermatomisierter, abdominaler Haut bzw. blutfreien RHS erklären könnten. Auch für Thrombozyten wurde eine mit steigendem Alter zunehmende MAO-Aktivität nachgewiesen [132], was die Expressionsunterschiede zwischen neonatalen, Thrombozyten-freien RHS und juveniler (Alter maximal 10 Jahre) Vorhaut erklären könnte.

Um den Anteil der Thrombozyten oder auch anderer kutaner Strukturen wie Nervenzellen oder Haarfollikeln an den in dieser Arbeit beobachteten MAO-Expressionsunterschieden zu ermitteln, könnten alle Gewebe z. B. histologisch untersucht werden. Neben den Zielproteinen MAO A und MAO B könnten spezifische Markerproteine (Glykoprotein IIb/IIIa für Thrombozyten [133] oder Neurofilament [134] für Nervenzellen) Auskunft über eine eventuelle Kolokalisation mit MAO geben.

Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit zu Monoaminoxidasen auf Gen-, Protein- und funktionaler Ebene die Vermutung nahe, dass die MAO-

katalysierte Oxidation von Xenobiotika zwar eine Alternative zur CYP-Oxidation darstellt, aber dennoch den kutanen Fremdstoffwechsel, für den vor allem die Zellen der Epidermis und Dermis von Bedeutung sind, nicht dominiert.

4.1.2 STEROID-5 α -REDUKTASEN DER TYPEN 1 UND 3 DOMINIEREN IN KUTANEN GEWEBEN

Steroid-5 α -Reduktasen (5 α R) sind entscheidend an der Verstoffwechslung von Androgenen und anderen steroidal Substanzen beteiligt. Der bekannteste Vertreter ist Testosteron. Dieses endogene Molekül wird auch zu therapeutischen Zwecken unter anderem transdermal appliziert [48] und außerdem als OECD-Standard-Testsubstanz bei Untersuchungen zur Hautabsorption eingesetzt [135]. Da die rekonstruierten Vollhautmodelle unter anderem für solche Absorptionsstudien verwendet werden, ist das Wissen um deren Biotransformationskapazität, auch gegenüber Referenzsubstanzen wie Testosteron, unerlässlich.

Im Rahmen einer vorangegangenen Studie wurde die Biotransformation von Testosteron in Keratinozyten, Fibroblasten, exzidiierter Humanhaut und den beiden Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT untersucht [117]. Dabei konnten in allen untersuchten Geweben die Metabolite Dihydrotestosteron und Androstandion detektiert werden, die durch 5 α R-Katalyse entstehen [49]. Beide 3D-Vollhautmodelle zeigten eine im Vergleich zu exzidiierter Humanhaut geringere 5 α R-Aktivität, da weniger Dihydrotestosteron und Androstandion gebildet wurden [117]. Die während dieses Promotionsprojektes durchgeführte Analyse der 5 α R-Genexpression bietet eine Erklärung dieser Beobachtung und stellt eine wichtige Komplettierung der zum kutanen Testosteron-Metabolismus verfügbaren Literatur dar: In allen untersuchten Hautgeweben wurde eine starke Genexpression von *5 α R1* und *5 α R3* detektiert. Jedoch wurde in Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT signifikant weniger *5 α R1* gemessen als in adulter Abdominalhaut (siehe Abbildung 3-4), was die beobachtete geringere 5 α R-Aktivität [117] in den beiden RHS erklärt.

Auch die Ergebnisse für *5 α R3* sind von großem Interesse. In der Literatur wird die 5 α R 3 erstmalig 2008 erwähnt [50] und wurde somit bei früheren Studien zur Genexpression in kutanen Geweben nicht berücksichtigt [136, 137]. In rekonstruierten Hautgeweben wurde die *5 α R3*-Expression bisher nicht untersucht

4. Diskussion

und in exzidiierter weiblicher Humanhaut wurde in der Epidermis eine höhere *5αR3*-Expression beobachtet als in der Dermis [138]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Steroid-5α-Reduktase des Typs 3 eine wichtige biologische Rolle spielt, da sie sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten epidermalen und dermalen Hautgeweben stark exprimiert wird. Zukünftige Studien sollten z. B. durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren gezielt untersuchen, in welchem Ausmaß die *5αR 3* am kutanen Testosteron-Stoffwechsel beteiligt ist und die *5αR 1* ergänzt oder vielleicht auch ersetzt.

Die Analyse auf Genebene zeigte weiterhin eine wesentlich geringere, nur moderate *5αR2*-Expression in juveniler Humanhaut und den Vollhautmodellen, sowie deren Fehlen in adulter Humanhaut. Eine frühere Studie konnte *5αR2* in der Haut postnatal bis zu einem Alter von 1,5 Jahren nachweisen [44], was deren Expression in den aus neonatalen Vorhautzellen bestehenden RHS und das Fehlen in adulter Humanhaut erklärt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Genexpression der *5αR* zeigen deutlich, dass *5αR1* und *5αR3* in den verschiedenen Hautgeweben vorhanden sind. Die rekonstruierten Humanhäute Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT weisen ein der exzidierten Humanhaut überwiegend ähnliches Expressionsmuster auf und stellen somit gute Modelle für selbige dar.

4.1.3 GLUTATHION-S-TRANSFERASEN GEHÖREN ZU DEN DOMINIERENDEN PHASE-II-ENZYMEN IN DER HAUT

4.1.3.1 DIE IN DER LEBER FÜR DEN FREMDSTOFFMETABOLISMUS RELEVANTE SULT 1A1 SPIELT IN KUTANEN GEWEBEN KEINE ROLLE

Die Familie der Sulfotransferasen (SULT) katalysiert die Biotransformation einer Vielzahl endogener und xenobiotischer Strukturen und ist somit für den Organismus von zentraler Bedeutung. Die SULT 1A1 gilt dabei als wichtigste fremdstoffmetabolisierende SULT [34] und stand deshalb im Fokus dieser Arbeit.

Obwohl eine moderate *SULT1A1*-Genexpression detektiert wurde, konnte weder in exzidiierter Humanhaut, noch in den untersuchten Vollhautmodellen Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT SULT 1A1-Aktivität oder -Protein nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3-6). Auch Eilstein *et al.* beobachteten in verschiedenen

rekonstruierten Epidermismodellen keine und in Humanhaut nur eine geringe SULT-Aktivität unterhalb der Quantifizierungsgrenze [25]. In anderen Studien konnte eine geringe SULT-Aktivität in Humanhaut nachgewiesen werden [139, 140], wobei die Rate der Sulfonierung vom Substrat abhängig [139] und insgesamt sehr gering war [7]. Für das zur Behandlung von androgenetischem Haarausfall eingesetzte Minoxidil wurde außerdem gezeigt, dass die Sulfonierung vor allem in Haarfollikeln stattfindet [141]. Bisher beobachtete SULT-Aktivitäten in Humanhaut sind also eventuell durch follikuläre Strukturen beeinflusst, die in rekonstruierten Hautmodellen fehlen. Weiterhin wurde in keiner der Studien [139, 140] untersucht, welche SULT-Unterfamilien für die Katalyse verantwortlich waren.

Sulfotransferasen zeichnen sich durch eine breite Substratspezifität aus [34] und wie durch Analysen der mRNA-Expression in dieser Arbeit und auch anderen Studien an exzidierten und rekonstruierter Humanhaut gezeigt wurde, kommen verschiedene SULT-Isoenzyme in kutanen Geweben vor (siehe Abbildung 3-5 und [140, 142]). Auffällig ist die dominante *SULT2B1b*-Expression, die in differenzierten epidermalen Geweben noch stärker ist als in undifferenzierten. Erklärbar ist dies durch die Funktion der SULT 2B1b im kutanen Cholesterinstoffwechsel, da Cholesterinsulfat für die epidermale Differenzierung und Barrierefunktion eine wichtige Rolle spielt [54, 55]. Im Vergleich zu *SULT2B1* wurde eine deutlich geringere Genexpression von *SULT1A1* und *SULT1E1* detektiert. Dabei wurde die *SULT1E1* stärker in den untersuchten Geweben exprimiert als die *SULT1A1*. Luu-The *et al.* beobachteten ähnliche relative Genexpressionsunterschiede zwischen den verschiedenen SULT-Familien in den von ihnen untersuchten Hautgeweben, darunter auch das Epidermismodell EpiskinTM und das Vollhautmodell EpiskinTMFTM (beide von Episkin, Lyon, Frankreich) [142]. Auch das Fehlen der *SULT2A1*, das im Rahmen dieses Promotionsprojektes in allen untersuchten kutanen Geweben beobachtet wurde, bestätigt die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen [54, 142].

In dieser Arbeit wurden die rekonstruierten 3D-Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDermTMFT erstmalig hinsichtlich der Expression verschiedener SULT untersucht und die Ergebnisse stellen eine wichtige Ergänzung zu bestehender Literatur dar. Es konnte gezeigt werden, dass die für den Fremdstoffmetabolismus relevante SULT 1A1 in exzidierten und rekonstruierten humanen Hautgeweben zwar auf Genebene, nicht aber auf

4. Diskussion

Proteinebene exprimiert wird. In anderen Studien gemessene SULT-Aktivitäten gegenüber Xenobiotika sind wahrscheinlich durch andere Subtypen zu erklären [136, 143]. In zukünftigen Experimenten mit beispielsweise dem Einsatz spezifischer SULT-Inhibitoren sollte untersucht werden, welche SULT-Isoenzyme für die SULT-Aktivität in exzidiierter Humanhaut verantwortlich sind. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit aber darauf hin, dass die in der Leber wichtige SULT-katalysierte Phase-II-Biotransformation in der Haut nur eine geringe Relevanz hat und durch andere Phase-II-Reaktionen kompensiert wird.

4.1.3.2 FÜR DIE FAMILIE DER GST WURDEN KAUM EXPRESSIONSUNTERSCHIEDE IN DEN UNTERSUCHTEN GEWEBEN BEOBACHTET

Nicht nur Sulfotransferasen, sondern ebenfalls Glutathion-S-Transferasen (GST) sind ein zentraler Bestandteil des Phase-II-Fremdstoffmetabolismus in der Leber und anderen Geweben [33, 34]. Im Gegensatz zu Sulfotransferasen spielen die GST jedoch auch in der Haut eine wichtige Rolle: die Expression von GST in kutanen Geweben konnte auf Gen- und Proteinebene vielfach nachgewiesen werden. Bereits 1991 wurde GST-Aktivität in humanen Keratinozyten [144] und Haut von Mensch, Maus und Ratte beobachtet [58]. Zusätzlich wurde mittels Western Blot-Analysen gezeigt, dass die Familie der GST P in Humanhaut überwiegt, wohingegen GST A nur gering und GST M auf Proteinebene gar nicht exprimiert wird [58]. Neuere Studien bestätigten eine höhere *GSTP*-Expression in exzidiierter Humanhaut und einigen RHE bzw. RHS gegenüber anderen Subtypen (*GSTA*, *GSTT*, *GSTM*; [142, 145]).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen hinsichtlich der Genexpression verschiedener GST-Subtypen bestätigten größtenteils vorhandene Literaturdaten. So konnte ebenfalls eine sehr starke Expression der *GSTP1* gegenüber einer moderaten Expression der *GSTT1* detektiert werden. Die *GSTA1* konnte nur in juveniler Vorhaut und der Phenion[®]FT-Dermis mit maximal moderater Genexpression nachgewiesen werden, was die von Blacker *et al.* postulierte hauptsächlich in der Dermis vorkommende *GSTA*-Expression bestätigt [144]. Wie in Tabelle 4-2 dargestellt, wurden abgesehen von einer niedrigeren *GSTT1*-Genexpression in der EpiDerm[™]FT-Dermis sonst keine Expressionsunterschiede für *GSTT1* und *GSTP1* zwischen Humanhaut *ex vivo* und den RHS (komplett, Epidermis oder Dermis), sowie undifferenzierten oder differenzierten

Gewebe festgestellt. Dies deutet auf eine alters- und geschlechtsunabhängige Expression der GST hin.

In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse anderer Studien zur GST-Aktivität in kutanen Geweben aufgelistet. In Keratinozyten wurden GST-Aktivitäten zwischen 40 und 65 nmol/mg Protein/min gemessen [126, 146], Blacker *et al.* detektierten jedoch deutlich höhere Werte (156-718 nmol/mg Protein/min; [144]). Die Literaturwerte zu GST-Aktivität in Humanhaut liegen zwischen 20 ± 7 nmol/mg Protein/min [111] und 100 nmol/mg Protein/min [23]. Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass teilweise mit zuvor eingefrorenem Material gearbeitet wurde [111, 126], was die Viabilität des Gewebes insgesamt sowie die Aktivität verschiedener Enzyme herabsetzen kann [117, 147, 148]. Für GST gibt es bis heute keine vergleichenden Studien, ob die Aktivität durch Einfrieren des Gewebes herabgesetzt wird oder nicht. Um jedoch Aktivitätsunterschiede aufgrund der Lagerung auszuschließen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit frischer Humanhaut *ex vivo* gearbeitet.

Tabelle 4-1: Übersicht der in dieser Arbeit bestimmten und in der Literatur zu findenden Werte zur GST-Aktivität.

Gewebe	in dieser Arbeit gemessene Aktivität [nmol/mg Protein/min] (Mittelwert \pm SD)	Aktivität [nmol/mg Protein/min]; Referenz (Mittelwert \pm SD)	
Keratinozyten	86,3 \pm 44,7	156-718	[144]
		~50	[79]
		~62	[79]
		~40	[146]
		~100	[149]
Fibroblasten	81,6 \pm 63,8	~40	[149]
NHS	47,0 \pm 33,2	20 \pm 6,8	[79]
		~100	[23]
		25,8 \pm 2,0	[58]
		91 \pm 42	[125]
		~80	[149]
Epidermis	nicht bestimmt	~100	[149]
Dermis	nicht bestimmt	~40	[149]
Phenion[®] FT	87,7 \pm 36,1		
Epidermis	nicht bestimmt	~80	[149]
Dermis	nicht bestimmt	~50	[149]
EpiDerm[™] FT	100,7 \pm 16,8	-	
EpiDerm[™]	nicht bestimmt	84,1 \pm 4,1	[111]
		~62	[79]
open source RHE	nicht bestimmt	160-220	[149]

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur GST-Aktivität decken sich mit veröffentlichten Daten. Die in NHS gemessene GST-Aktivität von $47,0 \pm 33,2$ nmol/mg Protein/min lag im mittleren Bereich der Literaturwerte. Starke Schwankungen der Messergebnisse bei exzidiierter Humanhaut wurden ebenfalls von van Eijl *et al.* beobachtet [125]. Auch die in Zellkulturen von Keratinozyten gemessene GST-Aktivität bestätigt bereits veröffentlichten Daten. Die Ergebnisse der GST-Aktivität in NHS und Keratinozyten-Zellkulturen dienen einerseits zur Bestätigung der Methodik und andererseits als Referenzwerte für die neu erhobenen Daten zur GST-Aktivität in den RHS Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT. Zur GST-Aktivität im Phenion[®]FT gibt es bisher nur eine Studie [149], in der Werte zwischen 50 nmol/mg Protein/min (Dermis) und 80 nmol/mg Protein/min (Epidermis) detektiert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den im Rahmen dieses Promotionsprojektes für das komplette Phenion[®]FT gemessenen Werten überein. Mit dieser Arbeit wurde erstmalig die GST-Aktivität des EpiDerm[™]FT bestimmt und direkt mit dem Phenion[®]FT und Humanhaut *ex vivo* verglichen, wobei keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der GST-Aktivität zwischen den drei Hautkonstrukten festgestellt wurden. In Kombination mit der bereits erläuterten untergeordneten Rolle der kutanen SULT im Fremdstoffmetabolismus legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass GST eine der wichtigsten Phase-II-Reaktionen in der Haut katalysieren und somit neben N-Acetyltransferasen (siehe 4.2.3) entscheidend an kutanen Entgiftungsreaktionen beteiligt sind. Auch wurden keine Expressionsunterschiede zwischen adulter, meist weiblicher Abdominalhaut und den aus juvenilen Vorhautzellen entwickelten RHS bzw. undifferenzierten und differenzierten Geweben festgestellt, was auf eine alters- und geschlechtsunabhängige Expression der GST hindeutet. Trotz einer tendenziell leicht erhöhten GST-Aktivität repräsentieren die beiden untersuchten 3D-Vollhautmodelle die Situation von Humanhaut *ex vivo* sowohl auf genetischer als auch auf funktionaler Ebene sehr gut.

4.2 2,4-DAT EIGNET SICH ALS MODELLSUBSTANZ ZUR UNTERSUCHUNG DES KUTANEN PHASE-II-FREMDSTOFFMETABOLISMUS

4.2.1 2,4-DAT WIRKT NUR IN HOHEN KONZENTRATIONEN ZYTOTOXISCH

Für das aromatische Amin 2,4-DAT wurden in Nagetieren sowie humanen Zellen oder Geweben genotoxische und zytotoxische Effekte nachgewiesen [63, 75, 150, 151]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels MTT-Test bestätigten frühere Ergebnisse zur Zytotoxizität in HepG2 Zellen bei 2,4-DAT-Konzentrationen höher als 20 mM (2443 µg/ml) [75, 151]. Weiterhin wurde in Keratinozyten eine höher Empfindlichkeit gegenüber 2,4-DAT beobachtet als in Fibroblasten oder HepG2, aber dennoch reichte die gewählte Konzentration von 0,1 mM (12,2 µg/ml) 2,4-DAT für die Experimente zur Biotransformation in Einzelzellkulturen aus, um die N-Acetyltransferase zu sättigen [124] und somit das gesamte mögliche Metabolitenspektrum zu erhalten (vgl. 3.3.2).

Die Beurteilung einer gewebeschädigenden Wirkung des bei exzidiertem und rekonstruierter Vollhaut topisch applizierten 2,4-DAT (122,17 µg/cm²) erfolgte durch die Quantifizierung der inflammatorischen Zytokine IL-1α und IL-8 und der Laktatdehydrogenase (LDH). Die vergleichbaren Werte der sekretierten inflammatorischen Zytokine sowie der im Akzeptormedium detektierten LDH zwischen mit Wasser behandeltem Kontrollmodell und den mit 2,4-DAT inkubierten Modellen deuten darauf hin, dass keine Schädigung des Gewebes durch die verwendete 2,4-DAT-Konzentration auftrat. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass insgesamt nur sehr geringe Mengen an IL-1α detektiert wurden. Möglicherweise wurde in der Epidermis sekretiertes IL-1α teilweise durch die dermalen Fibroblasten in NHS bzw. im Dermisäquivalent der RHS aufgenommen [152]. IL-1α ist somit als Entzündungsmarker für Vollhautgewebe nicht optimal geeignet. Wenn auch beispielsweise ein MTT-Test mit den intakten Hautstücken oder RHS [89] bei ausreichenden Ressourcen (finanziell wie auch materiell) die bevorzugte Methode zur Beurteilung zytotoxischer Einflüsse wäre, so stellt die in dieser Arbeit verwendete Kombination aus Quantifizierung inflammatorischer Zytokine und der LDH im Akzeptormedium eine gute Alternative bei begrenzter Materialverfügbarkeit dar. Aussagen über ggf. genotoxische Effekte sind mit

4. Diskussion

diesen Markern jedoch nicht möglich und müssten in weiteren Experimenten wie z. B. dem *Comet Assay* separat überprüft werden.

4.2.2 DIE INSTABILITÄT VON 2,4-DAT UNTER VERSUCHSBEDINGUNGEN MUSS BEI BEURTEILUNG DER BIOTRANSFORMATION BERÜCKSICHTIGT WERDEN

Während der Experimente zur Biotransformation von 2,4-DAT wurde festgestellt, dass 2,4-DAT unter Versuchsbedingungen auch nicht-enzymatisch abgebaut wird (vgl. 3.2.2). Auch für andere aromatische Amine wurde eine Instabilität unter experimentellen Bedingungen beobachtet, wie z. B. die Autooxidation des strukturell ähnlichen *para*-Phenylendiamin (PPD; [60]).

Das Hauptprodukt der nicht-enzymatischen Umwandlung von 2,4-DAT konnte als N-Glykosid identifiziert werden. Da dieses N-Glykosid sowohl in den Ansätzen mit Zellen oder Hautgeweben als auch in den zell- und gewebefreien Medium-Kontrollen entstand, kann eine Beteiligung der Uridin-5'-diphosphoglucuronosyl-transferase (UGT) ausgeschlossen werden. Zwar wurde in exzidierte Humanhaut und verschiedenen rekonstruierten Hautmodellen bereits die Aktivität der UGT nachgewiesen [78, 139]; aber einerseits katalysiert die UGT die Übertragung von Glucuronsäure und nicht Glukose und andererseits ist die UGT intrazellulär in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert, was deren Vorkommen im Nährmedium ausschließt.

Neben dem Peak des N-Glykosids wurden weitere Peaks in den Chromatogrammen der Medium-Kontrollen beobachtet, hinter denen sich wahrscheinlich weitere nicht-enzymatische Abbauprodukte verbergen (vgl. Abbildung 3-10 b). Diese zu identifizieren war im Rahmen dieses Projektes leider nicht möglich, sollte aber für zukünftige Arbeiten berücksichtigt werden. Die Instabilität des 2,4-DAT machte eine absolute Quantifizierung von 2,4-DAT mit der etablierten HPLC/UV-Analytik unmöglich und erschwerte die Beurteilung der Massenbilanz. Wenn nicht alle Reaktionsprodukte, egal ob enzymatisch oder nicht-enzymatisch entstanden, bekannt sind, kann keine vollständige Quantifizierung unter Verwendung von Referenzchromatogrammen stattfinden. Dieses Problem wird bei Betrachtung der Massenbilanz innerhalb dieser Arbeit deutlich: Auch wenn das N-Glykosid unter der Annahme, sein Absorptionsverhalten sei dem des reinen 2,4-DAT gleich, quantifiziert und in die Massenbilanz einbezogen wird, so ergab sich nach 24 h Inkubation eine

Wiederfindung als reines 2,4-DAT, N-Glykosid oder Metabolit M1 von insgesamt rund 66 % ($63,4 \pm 12,7$ % in Gewebeprouben, $68,5 \pm 6,6$ % Zellkulturen). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass neben den beobachteten Abbauprodukten auch weitere Metabolite aus 2,4-DAT gebildet werden, wenn auch nur in geringen und mit der hier verwendeten Methodik nicht detektierbaren Mengen. Ein eindeutiges Ergebnis würde nur eine Quantifizierung jedes einzelnen Peaks aufgrund entsprechender Referenz-chromatogramme liefern.

Trotz der nicht-enzymatischen Umwandlung von 2,4-DAT unter experimentellen Bedingungen war mit den gewählten Konzentrationen von 0,1 mM ($12,2 \mu\text{g/ml}$) in Einzelzellkulturen und $122,2 \mu\text{g/cm}^2$ bei Hautgeweben eine ausreichende Menge von 2,4-DAT für die Untersuchung der Biotransformation gewährleistet. Einerseits wurde auch nach 24 h Inkubation noch 2,4-DAT in den Geweben bzw. im Zellkulturüberstand detektiert (Daten nicht gezeigt) und andererseits resultierte die Inkubation mit einer höheren 2,4-DAT-Konzentration (1 mM bzw. $122,2 \mu\text{g/ml}$) nicht in größeren Mengen des Metaboliten M1 (Daten nicht gezeigt), was auf eine Sättigung der NAT bei bereits moderaten Substratkonzentrationen (0,05-0,1 mM) hindeutet [153].

Aromatische Amine stellen eine Gruppe von Chemikalien dar, mit denen der Mensch im Alltag oft in Kontakt kommen kann. Sie sind beispielsweise Bestandteil von Haarfärbemitteln [61], Textilfarben [75] oder Kunststoffen [64]. 2,4-DAT stellt somit eine wichtige Modellschubstanz zur Untersuchung des kutanen Fremdstoffmetabolismus dar, jedoch sollte bei zukünftigen Untersuchungen dessen Instabilität berücksichtigt und definiert werden, um quantitative Aussagen zu dessen Biotransformation treffen zu können.

4.2.3 DIE N-ACETYLIERUNG DOMINIERT BEI DER BIOTRANSFORMATION VON 2,4-DAT IN HAUTGEWEBEN

Verschiedene Studien an Tier und Mensch zeigten nach systemischer Exposition von 2,4-DAT Metabolite der Phase-I- und Phase-II-Biotransformationsreaktionen, wobei in allen Spezies das durch CYP-Katalyse hydroxylierte 5-Hydroxy-2,4-DAT dominierte [68, 71, 154]. In der Leber überwiegt somit die Phase-I bei der Biotransformation von 2,4-DAT, jedoch wurden in geringeren Mengen auch Metabolite der Phase-II (Glucuronidierung, N-Acetylierung) detektiert.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Biotransformation in Hautzellen (Keratinocyten, Fibroblasten, MoLC, MoDC) und Vollhautgeweben (NHS, Phenion[®]FT, EpiDermTMFT) zeigten, dass 2,4-DAT hauptsächlich zum monoacetylierten N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid (M1) metabolisiert wird. Es wurde bereits in verschiedenen Studien festgestellt, dass die Haut sowie verschiedene RHE und das Phenion[®]FT im Vergleich zur Leber nur eine sehr geringe bis fehlende CYP-Aktivität sowie andere CYP-Subtypen aufweisen [7, 77, 78]. Aufgrund der Instabilität und der damit verbundenen unvollständigen Quantifizierung von 2,4-DAT (siehe 4.2.2) kann das Auftreten anderer Metabolite in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der hier verwendeten Analytik nicht ausgeschlossen werden. Dennoch deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die N-Acetylierung ohne vorherige Phase-I-Reaktion für 2,4-DAT der dominierende Biotransformationsweg ist und bestätigen die Ergebnisse verschiedener aktueller Studien zur Biotransformation anderer aromatischer Amine in der Haut unterschiedlicher Spezies [60, 61, 76].

Keratinocyten produzierten dreimal mehr M1 als die übrigen Hautzellen, was auf eine deutlich höhere NAT-Aktivität als in Fibroblasten oder in den Immunzellen MoLC und MoDC hinweist. Dennoch waren auch in den anderen Hautzellen deutliche M1-Mengen detektierbar und somit sollten bei der Beurteilung der kutanen NAT-Aktivität nicht nur epidermale Zelltypen berücksichtigt werden. Für *ex vivo* generierte MoDC wurde bereits eine NAT 1-Aktivität nachgewiesen [155], was in dieser Arbeit durch das Auftreten von M1 in MoDC bestätigt wurde. Sowohl in MoDC als auch in MoLC wurde der einfach N-acetylierte Metabolit M1 in vergleichbaren Mengen detektiert (siehe Abbildung 3-13), was auf eine ähnliche NAT-Aktivität in beiden Zelltypen hindeutet.

Die rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDermTMFT zeigten bei topischer Applikation von 2,4-DAT das gleiche Metabolitenmuster wie Humanhaut *ex vivo*, wobei jedoch beide RHS die exzidierte Humanhaut in ihrer NAT-Aktivität, gemessen an der Bildung des Metaboliten M1, übertrafen (siehe Abbildung 3-15). Dies kann dadurch erklärt werden, dass 2,4-DAT aufgrund einer geringeren epidermalen Barriere in die Vollhautodelle schneller penetriert als in exzidierte Humanhaut [19, 156]. Somit kann trotz gleicher NAT-Aktivität verschiedener Gewebe aufgrund unterschiedlicher Durchlässigkeit in den rekonstruierten Hautmodellen mehr Metabolit entstehen als in Humanhaut. Eine vollständige Massenbilanz unter Berücksichtigung des gebildeten Metaboliten

sowie der verbliebenen Muttersubstanz würde an dieser Stelle bestätigen, ob aufgrund einer höheren metabolischen Kompetenz oder einer geringeren epidermalen Barriere mehr Muttersubstanz in den RHS biotransformiert wurde. Dennoch eignet sich 2,4-DAT als Modellsubstanz zur Untersuchung der kutanen Biotransformation, da es sowohl in rekonstruierte als auch exzidierte Humanhaut penetriert. Bereits nach 3 h wurde 2,4-DAT im Gewebe und auch Akzeptormedium aller untersuchten Hautgewebe detektiert (Daten nicht gezeigt), was auf eine rasche Penetration der Muttersubstanz hindeutet. Weiterhin war die Bildung von M1 nur in lebenden Zellen mit NAT-Aktivität möglich, sodass mit dessen Detektion indirekt die Penetration von 2,4-DAT bestätigt wurde. War nach 3 h noch 2,4-DAT auf der Oberfläche von exzidierter Humanhaut detektierbar, so war nach 24 h die Penetration auch in NHS komplett. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die deutlichen Unterschiede in der M1-Menge zwischen beiden RHS und NHS vor allem in Unterschieden der NAT-Aktivität begründet sind.

Das Phenion[®]FT wies die größten Metabolitmengen auf, sowohl in der Gesamtbilanz als auch bei der nach 24 h noch im Gewebe vorgefundenen M1-Menge (siehe Abbildung 3-15). Dies kann durch seine Morphologie erklärt werden: mit ~ 2,0 mm ist das Phenion[®]FT deutlich dicker und hat auch eine dickere Epidermis als exzidierte, dermatomisierte Humanhaut (~ 0,5 mm) oder als das EpiDerm[™]FT (~ 1,0 mm) [17]. Bereits in früheren Studien wurden eine erhöhte Enzymaktivität für Esterasen [17] oder auch bezüglich des Testosteronmetabolismus [117] im Phenion[®]FT gegenüber EpiDerm[™]FT und NHS beobachtet. Da die epidermalen Keratinozyten eine deutlich höhere NAT-Aktivität zeigen als Fibroblasten, scheint auch im Falle der N-Acetylierung von 2,4-DAT die dickere Epidermis des Phenion[®]FT eine Ursache für dessen signifikant höhere NAT-Aktivität zu sein.

Das EpiDerm[™]FT wies zwischen den verschiedenen Experimenten starke Schwankungen in der Bildung des Metaboliten M1 auf, obwohl alle Modellchargen mit Zellen des gleichen Spenders angefertigt wurden (Auskunft vom Hersteller erhalten). Für das RHE EpiDerm[™] wurden von Jäckh *et al.* ebenfalls starke Schwankungen in der NAT-Aktivität zwischen unterschiedlichen Chargen beobachtet und vermutet, dass diese Schwankungen auf Unterschiede der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten zurückzuführen sind [78]. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob es in den verschiedenen

4. Diskussion

Schichten der Epidermis bzw. in Keratinozyten verschiedener Differenzierungsstadien Unterschiede in der NAT-Aktivität gibt, z. B. unter Verwendung von verschieden differenzierten Keratinozyten-Zellkulturen.

4.2.3.1 UNTER KATALYSE DER N-ACETYLTRANSFERASE ENTSTEHT NUR EIN MONOACETYLIERTER METABOLIT

Die Vorinkubation von Keratinozyten mit dem spezifischen NAT 1-Inhibitor Cyanamid führte zu einer signifikanten Reduktion der gebildeten Metabolitmenge. Allerdings wurde mit dem verwendeten Inhibitor keine vollständige Inhibition der NAT beobachtet (vgl. Abbildung 3-14 a). Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die trotz NAT 1-Inhibition detektierten M1-Mengen durch Typ 2 N-Acetyltransferasen entstanden sind, da bereits auf Genebene das Fehlen von *NAT2* in kutanen Geweben nachgewiesen wurde [142]. Die unvollständige Inhibition der NAT liegt wahrscheinlich daran, dass Cyanamid zwar ein spezifischer, aber kein besonders potenter NAT 1-Inhibitor ist [112]. Höhere Cyanamid-Konzentrationen hätten möglicherweise zu einer vollständigen NAT-Inhibition geführt, konnten aber aufgrund der zytotoxischen Effekte nicht eingesetzt werden (siehe Abbildung 3-14 b). Inhibitionsexperimente unter Verwendung potenterer NAT-Inhibitoren wie beispielsweise Iodacetamid [157] oder Disulfram [158] würden wahrscheinlich eine noch deutlichere Reduktion der M1-Menge zeigen. Trotzdem konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Cyanamid eine deutliche Reduktion der M1-Menge gegenüber den unbehandelten Proben erzielt und die Beteiligung der NAT 1 somit deutlich gezeigt werden, weshalb der Einsatz potenterer Inhibitoren an dieser Stelle nicht nötig war.

Die N-Acetylierung von 2,4-DAT erfolgte ausschließlich an der Aminogruppe in *para*-Position. Weder M2 (einfach N-acetyliert an der Aminogruppe in *ortho*-Position, siehe Abbildung 2-2), noch ein diacetylierter Metabolit wurden detektiert, obwohl Diacetylierung für andere aromatische Amine wie z. B. PPD beobachtet wurde [159]. Die Acetylierung der Aminogruppe in *ortho*-Position des 2,4-DAT findet wahrscheinlich aufgrund einer sterischen Hinderung durch die Methylgruppe nicht statt, wie sie auch für *ortho*-Toluidin beschrieben wurde [160].

4.2.3.2 DIE N-ACETYLIERUNG AROMATISCHER AMINE DIEN T ALS SCHUTZMECHANISMUS

Aromatische Amine werden im lebenden Organismus vor allem nach systemischer Exposition intensiv biotransformiert, wobei unter anderem zytotoxische und genotoxische Metabolite entstehen können [59]. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass nicht 2,4-DAT selbst genotoxisch ist, sondern wie bei anderen aromatischen Aminen seine N-hydroxylierten Metabolite (vgl. Abbildung 1-6). Die dafür entscheidende Hydroxylierung der Aminogruppe in *para*-Position wird durch CYP 1A1 katalysiert und das resultierende Hydroxylamin kann O-acetyliert werden, wodurch mutagene Metabolite entstehen [64, 74]. Wenn auch eine geringe *CYP1A1*-Genexpression in Humanhaut und verschiedenen rekonstruierten Epidermis- oder Vollhautmodellen beobachtet wurde [142], so war weder in exzidierte Humanhaut [77], noch im Phenion[®]FT und Epidermismodell EpiDerm[™] [78] CYP 1A1-Aktivität nachweisbar. Auch im Rahmen dieses Promotionsprojektes wurden keine hydroxylierten Metabolite von 2,4-DAT detektiert, sondern in quantifizierbaren Mengen nur der mono-N-acetylierte Metabolit M1. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die direkte Phase-II-Biotransformation von 2,4-DAT eine entgiftende Wirkung hat und die protektive Funktion der Haut unterstützt. Zum einen lassen die rasche Bildung und Permeation des Metaboliten M1 sowie die Tatsache, dass bei Experimenten mit Zellkulturen 2,4-DAT und M1 nur im Zellkulturüberstand, nicht aber im Zelllysat gefunden wurden die Vermutung zu, dass die N-Acetylierung von aromatischen Aminen wie 2,4-DAT in kutanen Geweben als Entgiftungsreaktion dient. Durch die schnelle Abgabe an den Blutkreislauf können Muttersubstanz und Metabolite aus dem Organismus ausgeschieden werden.

Zum anderen wurde mehrfach gezeigt, dass mono-acetylierte Derivate aromatischer Amine im Gegensatz zur Ausgangssubstanz keine genotoxische oder gewebeschädigende Wirkung haben [1, 61]. Auch bei aromatischen Aminen mit mehreren Aminfunktionen wie PPD reichte bereits die Acetylierung von einer Aminogruppe, um dessen genotoxische Wirkung aufzuheben [1]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die N-Acetylierung von aromatischen Aminen nicht nur deren genotoxisches, sondern auch deren Sensibilisierungspotential aufhebt [60]. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit das genotoxische oder sensibilisierende Potential von 2,4-DAT auf kutane Gewebe nicht gezielt untersucht wurde, so sind die

4. Diskussion

Ergebnisse zu dessen Biotransformation hinsichtlich Sensibilisierungsvorgängen in der Haut von Bedeutung, da 2,4-DAT als Chemikalie mit schwachem Sensibilisierungspotential eingestuft wird [161]. Die Annahme ist zulässig, dass die N-Acetylierung von 2,4-DAT dessen Sensibilisierungspotential reduziert oder sogar aufhebt, wie es auch für das starke Allergen PPD bekannt ist [60]. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch in den Immunzellen der Haut (MoLC, MoDC) die N-Acetylierung von 2,4-DAT dominierte und keine genotoxischen Metabolite entstehen, wie es für andere Xenobiotika beobachtet wurde [80].

4.3 ABSCHLIEßENDE BEURTEILUNG DER 3D-VOLLHAUTMODELLE UND AUSBLICK: PHENION[®]FT UND EPITMDERMTMFT SIND GUTE MODELLE FÜR DEN KUTANEN FREMDSTOFFMETABOLISMUS

4.3.1 DIE EXPRESSION VERSCHIEDENER ENZYME IST IN PHENION[®]FT, EPITMDERMTMFT UND EXZIDIERTER HUMANHAUT ÄHNLICH

Die rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDermTMFT exprimieren auf Genebene die gleichen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme wie Humanhaut *ex vivo* (siehe Tabelle 4-2) und zeigen das gleiche Metabolitenmuster nach Biotransformation von Substanzen, wie in dieser und auch anderen Arbeiten gezeigt wurde [25, 117, 162].

Die Genexpression in beiden RHS war bei den meisten untersuchten Enzymen ähnlich exzidiertes Humanhaut. Auf Protein- oder funktionaler Ebene wurden jedoch einige Unterschiede beobachtet, vor allem für Enzyme der Phase-I-Biotransformation. So wurde eine deutlich geringere MAO-Proteinexpression (siehe 4.1.1) und auch eine reduzierte 5 α R-Aktivität [117] in den Vollhautmodellen festgestellt. Für die im Rahmen dieses Promotionsprojektes untersuchten Phase-II-Enzyme hingegen wurde eine im Vergleich zu Humanhaut ähnliche (GST, siehe 4.1.3) oder sogar erhöhte Aktivität (NAT, siehe 4.2.3) beobachtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass jede Enzymgruppe vergleichend in rekonstruierter und exzidiertes Humanhaut untersucht werden sollte, da kein allgemeiner Trend bei den Expressionsunterschieden auf Gen-, Protein- oder funktionaler Ebene festgelegt werden kann. Entscheidend ist jedoch, dass die 3D-Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDermTMFT die gleichen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme wie exzidiertes Humanhaut exprimieren und

somit insgesamt gute Testsysteme für Untersuchungen zur Biotransformation topisch applizierter Substanzen darstellen.

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der basalen Genexpression ausgewählter fremdstoff-metabolisierender Enzyme in exzidiierter Humanhaut, den Vollhautmodellen Phenion®FT und EpiDerm™FT sowie in Zellkulturen von undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten. Die Daten wurden gemäß der Δ Ct-Methode ausgewertet und folgendermaßen dargestellt: - (nicht detektiert), + (Δ Ct > 10, geringe Genexpression), ++ ($5 < \Delta$ Ct < 10, moderate Genexpression), +++ (Δ Ct < 5, starke Genexpression), ++++ (Δ Ct < 0, sehr starke Genexpression).

Enzyme	native Humanhaut		Phenion®FT			EpiDerm™FT			undifferenzierte Zellen	
	Vor-haut	ab-dominal	kom-plett	Epi-dermis	Der-mis	kom-plett	Epi-dermis	Der-mis	Kerati-nozyten	Fibro-blasten
Phase-I										
<i>MAOA</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>MAOB</i>	+++	+++	+++	++	+++	++	+	++	-	++
<i>5αR1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>5αR2</i>	++	-	++	++	++	+	-	+	-	++
<i>5αR3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Phase-II										
<i>SULT1A1</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
<i>SULT1E1</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	-	-
<i>SULT2A1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SULT2B1a</i>	++	++	+	-	-	++	++	-	-	-
<i>SULT2B1b</i>	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	-
<i>GSTP1</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
<i>GSTT1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>GSTA1</i>	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten darauf hin, dass in humaner Haut Biotransformationsreaktionen der Phase-II dominieren, was mit einer überwiegend schützenden Funktion der Haut erklärt werden kann. Die Ergebnisse zur Biotransformation von 2,4-DAT zeigen eine vernachlässigbare bis fehlende CYP-Aktivität und eine dominierende NAT-Aktivität (siehe 4.2.3), wie es auch schon für andere aromatische Amine beobachtet wurde [7, 61, 76-78]. Auch die Ergebnisse zur GST-Aktivität (siehe 4.1.3) lassen eine dominierende Rolle der Phase-II-Biotransformation vermuten, was durch beide in dieser Arbeit untersuchten RHS gut repräsentiert wird.

4.3.2 DIE DREIDIMENSIONALE STRUKTUR DER RHS IST WICHTIG FÜR DIE BEURTEILUNG DER BIOTRANSFORMATION *IN VIVO*

Um die Biotransformation oder das schädigende Potential einer topisch applizierten Substanz zu beurteilen, spielt auch deren Penetrations- und Permeationsverhalten eine wichtige Rolle. Durch die im Zuge der

4. Diskussion

Biotransformation stattfindenden strukturellen Veränderungen werden die chemischen Eigenschaften des Xenobiotikums verändert, was wiederum Auswirkungen auf dessen Permeationsverhalten und die anschließende systemische Verfügbarkeit haben kann [30, 61, 163]. Zwar haben rekonstruierte humane Epidermis- oder Vollhautmodelle aufgrund von unterschiedlichen Lipidstrukturen im *Stratum Corneum* eine geringere Barriere als Humanhaut, stellen aber dennoch mit ihrer dreidimensionalen Struktur und der morphologischen Ähnlichkeit zu Humanhaut gute Testobjekte für Penetrations-, Permeations- und Biotransformationsstudien dar [16, 19, 30, 156].

Mit zweidimensionalen Zellkulturen können Penetration und Permeation nicht beurteilt werden. Weiterhin kann bei Keratinozyten der Differenzierungsgrad einen deutlichen Einfluss auf die Proteinexpression haben, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Beispielsweise werden *MAOB*, *SULT1A1* und *SULT1E1* im Gegensatz zu den differenzierten epidermalen Geweben des Phenion®FT und EpiDerm™FT in undifferenzierten Keratinozyten nicht exprimiert (siehe Tabelle 4-2). Bei Verwendung von Zellkulturen für Biotransformationsstudien müssen also unbedingt die verschiedenen Differenzierungsstadien berücksichtigt werden. Im Rahmen dieser Promotion wurden in Zellkultur nur basale Keratinozyten hinsichtlich der Expression und Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme untersucht. Bei zukünftigen Studien sollten Kulturen unterschiedlich differenzierter Keratinozyten, z. B. induziert durch die Zugabe von Calcium [164], in Kombination mit histologischen Untersuchungen an Vollhautmodellen eingeschlossen werden, um detaillierte Aussagen zur Beteiligung der einzelnen epidermalen Schichten an der Biotransformation des Gewebes treffen zu können. Ein Vorteil bei Verwendung von Einzelzellkulturen gegenüber kompletten Hautmodellen ist jedoch, dass die verschiedenen Hautzellen hinsichtlich ihrer metabolischen Kapazität beurteilt werden können, wie es im Rahmen dieser Arbeit für die Biotransformation von 2,4-DAT durchgeführt wurde (vgl. 3.3.2).

Außerdem ist in Zellkulturen nur die Untersuchung wässriger Lösungen möglich. Auf 3D-Hautmodellen hingegen können auch wasserunlösliche Substanzen in Form von Cremes, Pulvern oder Ölen appliziert und untersucht werden [24]. Die Vollhautmodelle haben gegenüber RHE den entscheidenden Vorteil, dass sie neben einer vielschichtigen Epidermis auch ein Dermisäquivalent besitzen und somit die *in vivo*-Situation der Haut noch besser widerspiegeln. Die Rolle der Dermis sollte mehr in den Fokus zukünftiger Forschung rücken. Für

einige Enzyme wurde bereits gezeigt, dass ihre Expression in der Dermis höher ist als in der Epidermis (in dieser Arbeit für Monoaminoxidasen, für weitere Enzyme siehe [142]). Außerdem findet eine Kommunikation zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten statt, die teilweise die Proteinexpression beeinflusst [23, 142]. Auch wenn die Expression vieler an der Biotransformation beteiligter Enzyme, besonders der im kutanen Fremdstoffmetabolismus dominierenden NAT und GST (wie in dieser Arbeit gezeigt), in der Epidermis überwiegt, so sollte der Beitrag der Dermis dennoch berücksichtigt werden. Blacker *et al.* postulierten, dass *GSTA* hauptsächlich in der Dermis exprimiert wird [144]. Die Ergebnisse dieser Promotion zeigen zum einen auf Genebene, dass viele der untersuchten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in der Dermis ähnlich stark exprimiert werden wie in der Epidermis (siehe Tabelle 4-2). Zum anderen wurde durch die Studien zur Biotransformation von 2,4-DAT in Einzelzellkulturen deutlich, dass auch in den anderen Zelltypen (Fibroblasten, dermale Immunzellen, vgl. Abbildung 3-13) eine deutliche NAT-Aktivität detektierbar war und sie somit zur gesamten kutanen NAT-Kapazität beitragen.

Die Untersuchung der Biotransformation topisch applizierter Substanzen in der Haut ist ein komplexer Vorgang. Zweidimensionale Zellkulturen einzelner Hautzelltypen ermöglichen einen differenzierten Einblick, in wieweit unterschiedliche Hautzellen zur Biotransformation beitragen. Andererseits repräsentieren nur dreidimensionale Hautmodelle wie das Phenion[®]FT oder das EpiDerm[™]FT die *in vivo*-Situation mit epidermaler Barriere, vielschichtiger Epidermis, Dermis und deren gegenseitiger Kommunikation, sodass die RHS verwendet werden sollten um Penetration und Biotransformation von Xenobiotika zu beurteilen.

4.3.3 AUSBLICK: MÖGLICHKEITEN ZUR OPTIMIERUNG VON VOLLHAUTMODELLEN

4.3.3.1 DIE EXPRESSION VON ENZYMEN KANN SPENDERABHÄNGIG SEIN

Wie in den vorherigen Abschnitten ausführlich dargestellt wurde, zeigen die rekonstruierten 3D-Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDermTMFT überwiegend das gleiche Expressions- und Aktivitätsmuster verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme wie exzidierte Humanhaut (siehe 4.1 und 4.2). Jedoch wurden auch einige Unterschiede beobachtet, z. B. bei der Expression von MAO (siehe 4.1.1) oder 5 α R (siehe 4.1.2), die aufgrund von alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschieden erklärt werden können. Die Zellen, aus denen die untersuchten RHS bestehen, werden aus juvenilen neonatalen Vorhäuten isoliert, wohingegen die verwendete Abdominalhaut von adulten weiblichen Spendern (älter als 40 Jahre) stammte. Es muss also bei der Beurteilung aller Versuche berücksichtigt werden, dass sowohl alters- als auch geschlechtsspezifische Unterschiede auftreten können. Auch wenn im Falle der für diese Arbeit untersuchten Enzymgruppen abgesehen von den Monoaminoxidasen keine Unterschiede auf Proteinebene festgestellt werden konnten, so sind für andere Enzyme bzw. Subtypen (MAO A, SULT 2A1) Expressionsunterschiede in anderen Säugetier-Geweben bekannt [130, 165]. Diese Beobachtungen legen nahe, dass bei der Konzipierung zukünftiger Studien und der Untersuchung weiterer fremdstoffmetabolisierender Enzyme auch gezielt Experimente zur Beurteilung von alters- oder geschlechtsspezifischen Unterschieden eingeplant werden müssen.

Neben Alter und Geschlecht kann außerdem die genetische Disposition des Zell- oder Hautspenders eine Rolle spielen. Für verschiedene Biotransformationsenzyme ist bekannt, dass es Genpolymorphismen gibt. Dazu zählen beispielsweise die N-Acetyltransferasen des Typs 2 [160], verschiedene Cytochrom P450-Isoenzyme [166, 167] oder auch Glutathion-S-Transferasen [168, 169]. Beim Vergleich von rekonstruierten Hautmodellen untereinander oder mit exzidiierter Humanhaut sollte deshalb bei zukünftigen Studien auch immer auf Genebene überprüft werden, ob detektierte Enzymaktivitätsunterschiede eventuell auf genetischen Polymorphismen beruhen.

4.3.3.2 BERÜCKSICHTIGUNG WEITERER ZELLTYPEN, HAUTSTRUKTUREN UND ERKRANKTER HAUT

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion®FT und EpiDerm™FT bestehen nur aus in Humanhaut dominierenden Keratinozyten (Epidermis) und Fibroblasten (Dermis). Zwar entspricht die Morphologie der nativen Epidermis bzw. Dermis, allerdings fehlen weitere Hautzellen (z. B. Melanozyten, Langerhans Zellen, Dendritische Zellen, Nervenzellen) und auch Strukturen wie Haarfollikel oder Talgdrüsen. Für eine umfassende Beurteilung der Biotransformationskapazität müssen zukünftig auch diese Zelltypen und Strukturen in RHS integriert werden, da gerade dort verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme stark exprimiert werden, z. B. MAO in Talgdrüsen und Nervenzellen [39] oder SULT in Haarfollikeln [141].

In den letzten Jahren wurden verschiedene immunkompetente Epidermis- oder Vollhautmodelle entwickelt, die Langerhans Zellen oder Dendritische Zellen enthalten [170-172]. Jedoch lag das bisherige Anwendungsziel dieser Modelle im Bereich der Tests des Sensibilisierungspotentials von Chemikalien und anderen Allergenen, da die kutanen Immunzellen bei Kontaktallergien eine entscheidende Rolle spielen [14]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Immunzellen der Haut auch Biotransformationsreaktionen katalysieren (vgl. 3.3.2). In zukünftigen Studien sollte deshalb die Biotransformation einer Substanz in rekonstruierten Hautmodellen mit und ohne Immunzellen vergleichend untersucht werden, da sowohl die Biotransformationsfähigkeit der Immunzellen als auch deren Reaktion auf in den anderen Hautzellen gebildete Metabolite genotoxische und sensibilisierende Effekte beeinflussen können [80].

Ein weiteres interessantes Feld, dem in Zukunft im Rahmen der kutanen Biotransformation mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte, ist erkrankte Haut. Teilweise sind bereits Unterschiede in der enzymatischen Aktivität zwischen gesunder und erkrankter Haut beobachtet worden. So wurde beispielsweise bei Vitiligo-Patienten eine erhöhte MAO-Aktivität [128] oder in der Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms (SCC-12, engl. *squamous cell carcinoma*) eine im Vergleich zu gesunden Keratinozyten verringerte Esterase-Aktivität [173] beobachtet. Untersuchungen zur Genexpression verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme deuten außerdem darauf hin, dass es auch für weitere

4. Diskussion

Enzyme wie CYP oder GST Unterschiede in gesunder und erkrankter Haut gibt [174-176]. Das Wissen um Unterschiede in der Expression bzw. Aktivität verschiedener Enzyme in gesunder und kranker Haut kann einerseits zum besseren Verständnis des Krankheitsbildes beitragen. Andererseits ist es vor allem auch für die Anwendung von Therapeutika wichtig zu wissen, in wieweit fremdstoffmetabolisierende Enzyme in erkrankter Haut anders exprimiert sind. Die Enzym-Charakterisierung erkrankter Haut könnte darüber hinaus genutzt werden, um *in vitro* generierte Krankheitsmodelle mit der *in vivo*-Situation zu vergleichen. Für verschiedene Hauterkrankungen wurden bereits Hautmodelle entwickelt, darunter z. B. Atopische Dermatitis [177], Psoriasis [178, 179] oder auch heller Hautkrebs [180]. Der Vergleich dieser Modelle mit exzidiierter erkrankter Haut beschränkte sich jedoch bisher überwiegend auf morphologische oder andere Charakteristika wie z. B. eine verringerte epidermale Barriere bei Atopischer Dermatitis [177]. Die Krankheitsmodelle sollen vor allem im Rahmen der Entwicklung und Evaluierung von Therapeutika zur Anwendung kommen. Unter diesem Gesichtspunkt ist es allerdings umso wichtiger, auch die Biotransformationskapazität der erkrankten Haut und Hautmodelle genau zu kennen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Als Alternative zu Tierversuchen gewinnen rekonstruierte humane dreidimensionale Vollhautmodelle (RHS) als Testsysteme in der Entwicklung von Arzneistoffen, Chemikalen und Kosmetika zunehmend an Bedeutung. Dennoch ist das Wissen über deren metabolische Kapazität bisher lückenhaft. Die durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme in der Haut katalysierten Reaktionen können jedoch eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie Hautsensibilisierung, Genotoxizität oder auch der Wirksamkeit topisch applizierter Pharmaka spielen.

In dieser Arbeit wurde die Biotransformationskapazität der kommerziell erhältlichen RHS Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT im Vergleich zu normaler Humanhaut *ex vivo* (NHS) sowie Einzelzellkulturen primärer epidermaler Keratinozyten und dermaler Fibroblasten untersucht.

Die Phase-I-Reaktionen katalysierenden Enzyme Monoaminoxidasen (MAO) und Steroid-5 α -Reduktasen (5 α R) und die Phase-II-Reaktionen katalysierenden Enzyme Sulfotransferasen (SULT) und Glutathion-S-Transferasen (GST) wurden hinsichtlich ihrer basalen Gen- und Proteinexpression bzw. Aktivität analysiert.

Die Genexpression der betrachteten Enzyme war in beiden 3D-Vollhautmodellen und Humanhaut vergleichbar. In RHS und undifferenzierten Keratinozyten und Fibroblasten wurden jedoch einige Enzyme unterschiedlich stark exprimiert, was auf Expressionsunterschiede aufgrund verschiedener Differenzierungsstadien des Gewebes hindeutet. Eine Aktivität der MAO konnte nur in NHS detektiert werden. Analysen mittels Western Blot bestätigten eine deutlich geringere Proteinexpression in RHS, Keratinozyten und Fibroblasten. Obwohl die für den Fremdstoffmetabolismus wichtige SULT 1A1 auf mRNA-Ebene detektiert wurde, fehlte in allen untersuchten Geweben SULT 1A1-Protein. Im Gegensatz dazu zeigten beide RHS eine mit NHS und Einzelzellkulturen vergleichbare GST-Aktivität.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Biotransformation des aromatischen Amins 2,4-Diaminotoluol (2,4-DAT) nach topischer Applikation vergleichend in rekonstruierter und exzidiierter Humanhaut untersucht. Zusätzlich wurde die Biotransformation von 2,4-DAT in Zellkulturen von Keratinozyten, Fibroblasten und *ex vivo* Monozyten-abgeleiteten Langerhans-Zellen (MoLC) und Dendritischen Zellen (MoDC) analysiert.

5. Zusammenfassung

In allen untersuchten Geweben wurde in quantifizierbaren Mengen nur das einfach N-acetylierte Derivat N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid detektiert, was die Dominanz dieser Phase-II-Reaktion andeutet. Dabei zeigten die RHS eine signifikant höhere Enzymaktivität der N-Acetyltransferase (NAT) als NHS, möglicherweise aufgrund einer schnelleren Penetration von 2,4-DAT, die ebenfalls beobachtet wurde. In den Zellkulturexperimenten wurde in Keratinozyten eine deutlich höhere Metabolitmenge detektiert als in Fibroblasten, MoLC und MoDC, die alle ähnliche Metabolitmengen zeigten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten rekonstruierten Vollhautmodelle Phenion[®]FT und EpiDerm[™]FT adäquate Testsysteme für die Untersuchung von Biotransformationsreaktionen in der Haut darstellen, vor allem hinsichtlich der Phase-II-Reaktionen. Obwohl die RHS eine höhere Biotransformationskapazität für 2,4-DAT aufwiesen, zeigten sie das gleiche Metabolitenmuster wie exzidierte Humanhaut. Sowohl die Ergebnisse zur basalen Enzymexpression als auch die Ergebnisse der Biotransformation von 2,4-DAT nach topischer Applikation deuten eine starke Dominanz von Phase-II-Enzymen (GST, NAT) an, was die These einer vor allem protektiven und entgiftenden Funktion der Haut unterstützt. RHS umgehen speziesabhängige Unterschiede und sind somit geeignete Testobjekte für die Beurteilung dermatotoxikologischer Risiken (Genotoxizität, Sensibilisierung) während der Entwicklung von Arzneistoffen oder Kosmetika.

6. SUMMARY

The use of three-dimensional reconstructed human skin (RHS) as animal-free test systems for risk assessment or the pre-clinical development of drugs and cosmetics gains increasing interest. Still, the knowledge about their biotransformation capacity is limited, although the metabolic activity plays an important role regarding skin sensitization, genotoxicity or the efficacy of topically applied drugs.

This study aimed to expand the knowledge of the biotransformation capacity of two RHS Phenion[®]FT and EpiDerm[™]FT in comparison with normal human skin *ex vivo* (NHS) as well as single cell cultures of primary epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts.

Basal enzyme expression and activity were investigated for the phase I catalyzing enzymes monoamine oxidase (MAO) and steroid-5 α -reductase (5 α R) as well as the phase II enzymes sulfotransferases (SULT) and glutathione-S-transferases (GST).

Although differences in the protein expression were observed, gene expression was similar in RHS and NHS but differed between undifferentiated keratinocytes and fibroblasts and RHS for some enzymes indicating altered enzyme expression due to tissue differentiation. MAO activity was detectable only in NHS and Western Blot analysis confirmed a higher MAO protein expression in excised human skin than in RHS or single cells. SULT 1A1 was detected at the mRNA, but not protein level in all tissues. In contrast, both RHS showed a strong GST activity comparable to NHS and single cell cultures.

In a second part, the biotransformation of the aromatic amine 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT) was examined after topical application and compared in reconstructed as well as excised human skin. In addition to whole skin tissues, biotransformation of 2,4-DAT was investigated in keratinocytes, fibroblasts and *ex vivo* generated monocyte-derived Langerhans and dendritic cells (MoLC and MoDC) as well.

Regarding biotransformation of 2,4-DAT, the mono N-acetylated derivative N-(3-amino-4-methylphenyl)acetamide was the only metabolite detectable in substantial amounts in all test matrices indicating the predominance of this phase II reaction. Here, RHS exceeded N-acetyltransferase activity in NHS significantly, likely due to the faster penetration of 2,4-DAT which was observed

6. Summary

as well. In cell cultures, the formation of the metabolite was similar in fibroblasts, MoLC and MoDC, but significantly higher in keratinocytes.

In conclusion, the RHS Phenion[®]FT and EpiDerm[™]FT are adequate test systems for the evaluation of biotransformation in skin, especially for phase II reactions. Although the RHS showed an enhanced biotransformation capacity of 2,4-DAT, the metabolic pattern was similar to human skin. Both the investigation of basal enzyme expression and the biotransformation of 2,4-DAT after topical application indicate a strong predominance of phase II enzymes (GST, NAT), thus contributing to the protective, detoxifying role of skin. RHS are useful test matrices to study biotransformation-related toxicological endpoints in the development of drugs or cosmetics, thereby overcoming species-related differences.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
α	alpha (griechischer Buchstabe)
β	beta (griechischer Buchstabe)
2,4-DAT	2,4-Diaminotoluol
3D	dreidimensional
5αR	Steroid-5 α -Reduktase
ALI	Luft-Flüssigkeitsgrenze (engl. <i>air liquid interface</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchonic acid</i>)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius (Temperatureinheit)
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen
-COOH	Carboxylgruppe
Cys	Cystein
D₂O	deutერიertes Wasser
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunesorbent assay</i>
engl.	englisch
ESI-TOF/MS	Elektrospray-Flugzeitmassenspektrometrie (engl. <i>electrospray ion-time of flight-mass spectrometry</i>)
et al.	und andere (lateinisch <i>et alia</i>)
EU	Europäische Union
F	Vorwärtsprimer (engl. <i>forward</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FBM	Fibroblasten-Basalmedium
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calve serum</i>)
FGM	Fibroblasten-Wachstumsmedium (engl. <i>fibroblasts growth medium</i>)
g	Gramm (Mengeneinheit)
g	Gravitationskraft
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase

7. Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde (Zeiteinheit, engl. <i>hour</i>)
-H, H₂	Wasserstoff
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HBM	HepG2-Basalmedium
HCl	Hydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	humane Leberzellkarzinom-Zelllinie
HGM	HepG2-Wachstumsmedium (engl. <i>HepG2 growth medium</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz (Frequenzeinheit)
IL-	Interleukin
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KBM	Keratinocyten-Basalmedium
KCl	Kaliumchlorid
KGM	Keratinocyten-Wachstumsmedium (engl. <i>keratinocyte growth medium</i>)
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter (Volumeneinheit)
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar (Konzentrationseinheit)
m-	milli
μ-	mikro
M1	N-(3-Amino-4-methylphenyl)acetamid
M2	N-(5-Amino-2-methylphenyl)acetamid
MACS	magnetische Zellseparation (engl. <i>magnetic-activated cell separation</i>)
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute (Zeiteinheit)
Mg	Magnesium
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (engl. <i>monocyte-derived dendritic cells</i>)
MoLC	Monozyten-abgeleitete Langerhans-Zellen (engl. <i>monocyte-derived Langerhans cells</i>)
MPLC	engl. <i>medium pressure liquid chromatography</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Versuche
N	normal (Konzentrationseinheit)
n-	nano
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAT	N-Acetyltransferase
-NH₂	Aminogruppe
NHFS	normale humane juvenile Vorhaut (eng. <i>normal human foreskin</i>)

NHS	normale Humanhaut (engl. <i>normal human skin</i>)
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
O₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (engl. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
-OH	Hydroxylgruppe
p	Passage (bei Zellkultivierung)
p-	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBMC	mononukleäre Blutzellen (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PPD	<i>para</i> -Phenylendiamin
ppm	engl. <i>parts per million</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rückwärtsprimer (engl. <i>reverse</i>)
-R	Rest
REACH	Chemikalienverordnung der Europäischen Union, Nr. 1907/2006 (engl. <i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>)
RHE	rekonstruierte humane Epidermis
RHS	rekonstruierte Humanhaut (engl. <i>reconstructed human skin</i>)
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RLU	relative Lichteinheiten (engl. <i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrchromatographie (engl. <i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RPMI-1640	Zellkulturmedium (entwickelt am „Roswell Park Memorial Institute“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>)
SCC-12	Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms (engl. <i>squamous cell carcinoma</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDHA	Succinat-Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde (engl. <i>second</i> ; Zeiteinheit)
-SH	Thiolgruppe
-SO₃H	Sulfogruppe
-SO₄H	Sulfatgruppe
SULT	Sulfotransferase
TGF-β1	transformierender Wachstumsfaktor β1 (engl. <i>transforming growth factor β1</i>)
t_{ret}	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit für Aktivität eines Proteins)

7. Abkürzungsverzeichnis

UGT	Uridin-5'-diphospho-glucuronosyltransferase
UV	ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

8. LITERATUR

1. Zeller, A. and Pfuhler, S.: *N-acetylation of three aromatic amine hair dye precursor molecules eliminates their genotoxic potential*. *Mutagenesis*, 2014. **29**(1): p. 37-48.
2. EU: 1907/2006. *EU Verordnung 1907/2006 (REACH-Verordnung)*. 2006.
3. Hartung, T. and Rovida, C.: *Chemical regulators have overreached*. *Nature*, 2009. **460**(7259): p. 1080-1.
4. Russell, W.M. and Burch, R.L.: *The principles of human experimental technique*. 1959. 1. publ ed. Methuen, London.
5. EU: 2003/15/EG. 7. *Änderung der Richtlinie 76/768/EWG*. 2003.
6. Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G. et al.: *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(9): p. 3507-12.
7. Oesch, F., Fabian, E., Guth, K., and Landsiedel, R.: *Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models*. *Arch Toxicol*, 2014. **88**(12): p. 2135-90.
8. Thews, G., Mutschler, E., and Vaupel, P.: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 2007, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
9. Bellemare, J., Roberge, C.J., Bergeron, D. et al.: *Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars*. *J Pathol*, 2005. **206**(1): p. 1-8.
10. Fernandez, T.L., Van Lonkhuyzen, D.R., Dawson, R.A. et al.: *In vitro investigations on the effect of dermal fibroblasts on keratinocyte responses to ultraviolet B radiation*. *Photochem Photobiol*, 2014. **90**(6): p. 1332-9.
11. Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.M.: *The skin: an indispensable barrier*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(12): p. 1063-72.
12. Bolzinger, M.A., Briancon, S., Pelletier, J., and Chevalier, Y.: *Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane*. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2012. **17**: p. 156-165.
13. Williams, A.E.: *Immunology - Mucosal and Body Surface Defences*. 2011, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
doi: 10.1002/9781119998648.ch10
14. Adler, S., Basketter, D., Creton, S. et al.: *Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010*. *Arch Toxicol*, 2011. **85**(5): p. 367-485.
15. Striessnig, J. and Legat, F.J.: *Arzneimittelallergie*, in *Pharmakotherapie*. 2010, Springer Verlag, Heidelberg.
16. Ackermann, K., Borgia, S.L., Korting, H.C. et al.: *The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2010. **23**(2): p. 105-12.
17. Bätz, F.M., Klipper, W., Korting, H.C. et al.: *Esterase activity in excised and reconstructed human skin-biotransformation of prednicarbate and the model dye fluorescein diacetate*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013. **84**(2): p. 374-85.
18. Lotte, C., Patouillet, C., Zanini, M. et al.: *Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002. **15 Suppl 1**: p. 18-30.

8. Literatur

19. Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W. et al.: *The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study*. *Altern Lab Anim*, 2008. **36**(2): p. 161-87.
20. Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S., and Mommaas, M.: *Characterization of reconstructed skin models*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002. **15 Suppl 1**: p. 4-17.
21. OECD: *Test Guideline 431: In vitro skin corrosion: Human skin model test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2004.
22. OECD: *Test Guideline 439: In vitro skin irritation: reconstructed human epidermis test method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2010.
23. Hewitt, N.J., Edwards, R.J., Fritsche, E. et al.: *Use of human in vitro skin models for accurate and ethical risk assessment: metabolic considerations*. *Toxicol Sci*, 2013. **133**(2): p. 209-17.
24. Alepee, N., Bahinski, A., Daneshian, M. et al.: *State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology*. *ALTEX*, 2014. **31**(4): p. 441-77.
25. Eilstein, J., Lereaux, G., Budimir, N. et al.: *Comparison of xenobiotic metabolizing enzyme activities in ex vivo human skin and reconstructed human skin models from SkinEthic*. *Arch Toxicol*, 2014. **88**(9): p. 1681-1694.
26. Bhaiya, P., Roychowdhury, S., Vyas, P.M. et al.: *Bioactivation, protein haptentation, and toxicity of sulfamethoxazole and dapsone in normal human dermal fibroblasts*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006. **215**(2): p. 158-67.
27. Goebel, C., Troutman, J., Hennen, J. et al.: *Introduction of a methoxymethyl side chain into p-phenylenediamine attenuates its sensitizing potency and reduces the risk of allergy induction*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014. **274**(3): p. 480-7.
28. Sharma, A.M. and Uetrecht, J.: *Bioactivation of drugs in the skin: relationship to cutaneous adverse drug reactions*. *Drug Metab Rev*, 2014. **46**(1):p. 1-18.
29. Kao, J., Patterson, F.K., and Hall, J.: *Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985. **81**(3 Pt 1): p. 502-16.
30. Lombardi Borgia, S., Schlupp, P., Mehnert, W., and Schäfer-Korting, M.: *In vitro skin absorption and drug release - a comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. **68**(2): p. 380-9.
31. Qiao, G.L. and Riviere, J.E.: *Systemic uptake and cutaneous disposition of pentachlorophenol in a sequential exposure scenario: effects of skin preexposure to benzo[a]pyrene*. *J Toxicol Environ Health A*, 2002. **65**(18): p. 1307-31.
32. BMBF: *Projektnummer 0315226*.
33. Gundert-Remy, U., Bernauer, U., Blömeke, B. et al.: *Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces*. *Drug Metab Rev*, 2014. **46**(3): p. 291-324.
34. Anzenbacher, P. and Zanger, U.M.: *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. 2012, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany

35. Benedetti, M.S.: *Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2001. **15**(2): p. 75-84.
36. Grimsby, J., Lan, N.C., Neve, R. et al.: *Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA*. *J Neurochem*, 1990. **55**(4): p. 1166-9.
37. Shelley, W.B., Cohen, S.B., and Koelle, G.B.: *Histochemical demonstration of monoamine oxidase in human skin*. *J Invest Dermatol*, 1955. **24**(5): p. 561-5.
38. Yasuda, K. and Montagna, W.: *Histology and cytochemistry of human skin. 20. The distribution of monoamine oxidase*. *J Histochem Cytochem*, 1960. **8**: p. 356-66.
39. Hashimoto, K., Ogawa, K., and Lever, W.F.: *Histochemical studies on the skin. IV. The activity of monoamine oxidase during the embryonic development of the skin in the rat*. *J Invest Dermatol*, 1963. **41**: p. 81-90.
40. Moeller, H.: *Uptake and metabolism of noradrenaline in acute inflammation of rabbit skin induced by ultra-violet light*. *Nature*, 1964. **201**: p. 1233-4.
41. Lovenberg, W., Dixon, E., Keiser, H.R., and Sjoerdsma, A.: *A comparison of amine oxidase activity in human skin, rat skin and rat liver: relevance to collagen cross-linking*. *Biochem Pharmacol*, 1968. **17**(6): p. 1117-20.
42. Cormier, M., Ledger, P.W., Marty, J.P., and Amkraut, A.: *In vitro cutaneous biotransformation of propranolol*. *J Invest Dermatol*, 1991. **97**(3): p. 447-53.
43. Guan, Y., Zuo, T., Chang, M. et al.: *Propranolol hydrochloride-loaded liposomal gel for transdermal delivery: Characterization and in vivo evaluation*. *Int J Pharm*, 2015. **487**(1-2): p. 135-41.
44. Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., and Mohler, J.: *The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases*. *Adv Urol*, 2012. **2012**: p. 530121.
45. Hikima, T. and Tojo, K.: *Binding of prednisolone and its ester prodrugs in the skin*. *Pharm Res*, 1997. **14**(2): p. 197-202.
46. Santos Maia, C., Mehnert, W., Schaller, M. et al.: *Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use*. *J Drug Target*, 2002. **10**(6): p. 489-95.
47. Zouboulis, C.C., Chen, W.C., Thornton, M.J. et al.: *Sexual hormones in human skin*. *Horm Metab Res*, 2007. **39**(2): p. 85-95.
48. Hadgraft, J. and Lane, M.E.: *Transdermal delivery of testosterone*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015. **92**: p. 42-8.
49. Chen, W., Thiboutot, D., and Zouboulis, C.C.: *Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives*. *J Invest Dermatol*, 2002. **119**(5): p. 992-1007.
50. Uemura, M., Tamura, K., Chung, S. et al.: *Novel 5 alpha-steroid reductase (SRD5A3, type-3) is overexpressed in hormone-refractory prostate cancer*. *Cancer Sci*, 2008. **99**(1): p. 81-6.
51. Parkinson, A.: *Biotransformation of Xenobiotics*, in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, Klaasen, C.D., Editor. 2001, McGraw-Hill Medical Pub.
52. James, M.O. and Ambadapadi, S.: *Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics*. *Drug Metab Rev*, 2013. **45**(4): p. 401-14.
53. Schrag, M.L., Cui, D., Rushmore, T.H. et al.: *Sulfotransferase 1E1 is a low Km isoform mediating the 3-O-sulfation of ethinyl estradiol*. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(11): p. 1299-303.

8. Literatur

54. Higashi, Y., Fuda, H., Yanai, H. et al.: *Expression of cholesterol sulfotransferase (SULT2B1b) in human skin and primary cultures of human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1207-13.
55. Elias, P.M., Williams, M.L., Choi, E.H., and Feingold, K.R.: *Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 353-61.
56. Glatt, H.: *Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics*. Chem Biol Interact, 2000. **129**(1-2): p. 141-70.
57. Hayes, J.D. and Pulford, D.J.: *The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995. **30**(6): p. 445-600.
58. Raza, H., Awasthi, Y.C., Zaim, M.T. et al.: *Glutathione S-transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression*. J Invest Dermatol, 1991. **96**(4): p. 463-7.
59. Platzek, T.: *Risk from exposure to arylamines from consumer products and hair dyes*. Front Biosci (Elite Ed), 2010. **2**: p. 1169-83.
60. Aeby, P., Sieber, T., Beck, H. et al.: *Skin sensitization to p-phenylenediamine: the diverging roles of oxidation and N-acetylation for dendritic cell activation and the immune response*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 99-109.
61. Goebel, C., Hewitt, N.J., Kunze, G. et al.: *Skin metabolism of aminophenols: human keratinocytes as a suitable in vitro model to qualitatively predict the dermal transformation of 4-amino-2-hydroxytoluene in vivo*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **235**(1): p. 114-23.
62. Ames, B.N., Kammen, H.O., and Yamasaki, E.: *Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(6): p. 2423-7.
63. Ito, N., Hiasa, Y., Konishi, Y., and Marugami, M.: *The development of carcinoma in liver of rats treated with m-toluylenediamine and the synergistic and antagonistic effects with other chemicals*. Cancer Res, 1969. **29**(5): p. 1137-45.
64. Cheung, Y.L., Snelling, J., Mohammed, N.N. et al.: *Interaction with the aromatic hydrocarbon receptor, CYP1A induction, and mutagenicity of a series of diaminotoluenes: implications for their carcinogenicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. **139**(1): p. 203-11.
65. Marzulli, F.N., Anjo, D.M., and Maibach, H.I.: *In vivo skin penetration studies of 2,4-toluenediamine, 2,4-diaminoanisole, 2-nitro-p-phenylenediamine, p-dioxane and N-nitrosodiethanolamine in cosmetics*. Food Cosmet Toxicol, 1981. **19**(6): p. 743-7.
66. Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L. et al.: *Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop*. Mutat Res, 2008. **653**(1-2): p. 99-108.
67. Reus, A.A., Reisinger, K., Downs, T.R. et al.: *Comet assay in reconstructed 3D human epidermal skin models-investigation of intra- and inter-laboratory reproducibility with coded chemicals*. Mutagenesis, 2013. **28**(6): p. 709-20.
68. Glinsukon, T., Benjamin, T., Grantham, P.H. et al.: *Enzymic N-acetylation of 2,4-toluenediamine by liver cytosols from various species*. Xenobiotica, 1975. **5**(8): p. 475-83.

69. Mráz, J., Sakai, T., Chvalová, D. et al.: *HPLC/MS analysis of the metabolites of 2,4-toluenediamine (2,4-TDA) and 2,4-toluenediisocyanate (2,4-TDI) in rat urine*. 2015. personal communication.
70. Timchalk, C., Smith, F.A., and Bartels, M.J.: *Route-dependent comparative metabolism of [¹⁴C]toluene 2,4-diisocyanate and [¹⁴C]toluene 2,4-diamine in Fischer 344 rats*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994. **124**(2): p. 181-90.
71. Waring, R.H. and Pheasant, A.E.: *Some phenolic metabolites of 2,4-diaminotoluene in the rabbit, rat and guinea-pig*. *Xenobiotica*, 1976. **6**(4): p. 257-62.
72. Aune, T., Nelson, S.D., and Dybing, E.: *Mutagenicity and irreversible binding of the hepatocarcinogen, 2,4-diaminotoluene*. *Chem Biol Interact*, 1979. **25**(1): p. 23-33.
73. Burns, L.A., Bradley, S.G., White, K.L. et al.: *Immunotoxicity of 2,4-diaminotoluene in female B6C3F1 mice*. *Drug Chem Toxicol*, 1994. **17**(3): p. 401-36.
74. Cunningham, M.L. and Matthews, H.B.: *Evidence for an acetoxylamine as the ultimate mutagenic reactive intermediate of the carcinogenic aromatic amine 2,4-diaminotoluene*. *Mutat Res*, 1990. **242**(2): p. 101-10.
75. Severin, I., Jondeau, A., Dahbi, L., and Chagnon, M.C.: *2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)-induced DNA damage, DNA repair and micronucleus formation in the human hepatoma cell line HepG2*. *Toxicology*, 2005. **213**(1-2): p. 138-46.
76. Bonifas, J. and Blömeke, B.: *N-acetylation of aromatic amines: Implication for skin and immune cells*. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2015. **7**: p. 305-21.
77. Goetz, C., Pfeiffer, R., Tigges, J. et al.: *Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D epidermis model and keratinocyte-based cell culture as in vitro alternatives for chemical testing: activating enzymes (Phase I)*. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(5): p. 358-63.
78. Jaeckh, C., Blatz, V., Fabian, E. et al.: *Characterization of enzyme activities of Cytochrome P450 enzymes, Flavin-dependent monooxygenases, N-acetyltransferases and UDP-glucuronyltransferases in human reconstructed epidermis and full-thickness skin models*. *Toxicol In Vitro*, 2011. **25**(6): p. 1209-14.
79. Goetz, C., Pfeiffer, R., Tigges, J. et al.: *Xenobiotic metabolism capacities of human skin in comparison with a 3D-epidermis model and keratinocyte-based cell culture as in vitro alternatives for chemical testing: phase II enzymes*. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(5): p. 364-9.
80. Modi, B.G., Neustadter, J., Binda, E. et al.: *Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma*. *Science*, 2012. **335**(6064): p. 104-8.
81. Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J.P. et al.: *Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells*. *J Exp Med*, 1998. **187**(6): p. 961-6.
82. Said, A.: *Dissertation: Funktionelle Charakterisierung dendritischer Zellen unter entzündlichen Bedingungen in vitro und Integration in humane Vollhautäquivalente*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2014, Freie Universität Berlin.
83. Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.: *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and*

8. Literatur

- downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
84. Zoschke, C. and Gonska, H.: *SOP: Keratinozyten- und Fibroblasten-isolierung aus humanen Biopsien*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2015, Freie Universität Berlin.
 85. Said, A., Bock, S., Lajqi, T. et al.: *Chloroquine promotes IL-17 production by CD4+ T cells via p38-dependent IL-23 release by monocyte-derived Langerhans-like cells*. J Immunol, 2014. **193**(12): p. 6135-43.
 86. Said, A., Bock, S., Müller, G., and Weindl, G.: *Inflammatory conditions distinctively alter immunological functions of Langerhans-like cells and dendritic cells in vitro*. Immunology, 2015. **144**(2): p. 218-30.
 87. Miltenyi Biotec GmbH: *Manual CD1a MicroBeads (human), order-no. 130-051-001*. 2009
 88. Henkel AG & Co. KGaA: *Manual Phenion Full-Thickness Skin Models, Version 2013.03*. 2013
 89. MatTek Corporation: *EpiDerm Full Thickness 400 (EFT-400) Use Protocol*. 2011
 90. Blatz, V. *3-D human skin models - appropriate test systems for toxicology testing?* in *2nd Skin Metabolism Meeting*. 2013. Valbonne, France.
 91. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG: *NucleoSpin RNA II protocols, Version 06/2012, Rev. 14*. 2012
 92. Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S., and Hiraoka, I.: *Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR*. Yakugaku Zasshi, 2002. **122**(5): p. 339-61.
 93. Shirakawa, T., Okada, H., Acharya, B. et al.: *Messenger RNA levels and enzyme activities of 5 alpha-reductase types 1 and 2 in human benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue*. Prostate, 2004. **58**(1): p. 33-40.
 94. MacKenzie, S.M., Dewar, D., Stewart, W. et al.: *The transcription of steroidogenic genes in the human cerebellum and hippocampus: a comparative survey of normal and Alzheimer's tissue*. J Endocrinol, 2008. **196**(1): p. 123-30.
 95. Li, J., Ding, Z., Wang, Z. et al.: *Androgen regulation of 5alpha-reductase isoenzymes in prostate cancer: implications for prostate cancer prevention*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28840.
 96. Miyano, J., Yamamoto, S., Hanioka, N. et al.: *Involvement of SULT1A3 in elevated sulfation of 4-hydroxypropranolol in Hep G2 cells pretreated with beta-naphthoflavone*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(6): p. 941-50.
 97. Kordi-Tamandani, D.M., Hashemi, M., Birjandian, E. et al.: *Lack of association of GSTT1 and GSTP1 genes methylation and their expression profiles with risk of NAFLD in a sample of Iranian patients*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011. **35**(5): p. 387-92.
 98. Ng, L., Nichols, K., O'Rourke, K. et al.: *Repression of human GSTA1 by interleukin-1 beta is mediated by variant hepatic nuclear factor-1C*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(1): p. 201-8.
 99. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F. et al.: *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
 100. Roche Diagnostics: *LightCycler 480 Instrument Poerators`s Manual. Software Version 1.5*. 2008
 101. Thermo Scientific: *Instructions Pierce BCA Protein Assay Kit, Catalog-no. 23225 and 23227*.

102. BioRad: *Instruction Manual Mini-PROTEAN Tetra Cell, Catalog-no. 165-8000 and 165-8001, Version 10007296 Rev B.*
103. BioRad: *Instruction Manual Trans-Blot Turbo Blotting System, Catalog-no. 170-4155.* 2010
104. Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies: *Manual Amplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit, Catalog-no. A12214), revised 01-October-2004.* 2004
105. Edelstein, S.B. and Breakefield, X.O.: *Monoamine oxidases A and B are differentially regulated by glucocorticoids and "aging" in human skin fibroblasts.* Cell Mol Neurobiol, 1986. **6**(2): p. 121-50.
106. Valley, M.P., Zhou, W., Hawkins, E.M. et al.: *A bioluminescent assay for monoamine oxidase activity.* Anal Biochem, 2006. **359**(2): p. 238-46.
107. Promega: *MAO-Glo Assay; Instructions for Use of Products V1401, V1402, V1452 and V1560; revised 5/09.* 2009
108. Wang, Q., Jia, R., Ye, C. et al.: *Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2005. **41**(3-4): p. 97-103.
109. Prusakiewicz, J.J., Harville, H.M., Zhang, Y. et al.: *Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects.* Toxicology, 2007. **232**(3): p. 248-56.
110. Sigma-Aldrich: *Technical Bulletin Glutathione S-Transferase Assay Kit, Catalog-no. CS0410, Version KAA,PHC 08/07-1.*
111. Goetz, C., Hewitt, N.J., Jermann, E. et al.: *Effects of the genotoxic compounds, benzo[a]pyrene and cyclophosphamide on phase I and 2 activities in EpiDerm models.* Xenobiotica, 2012. **42**(6): p. 526-37.
112. Dierolf, D., Scheitza, S., Bonifas, J., and Blömeke, B.: *Cyanamide-mediated Inhibition of N-acetyltransferase I.* Toxicology, 2012. **302**(1): p. 1-10.
113. Campling, B.G., Pym, J., Galbraith, P.R., and Cole, S.P.: *Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells.* Leuk Res, 1988. **12**(10): p. 823-31.
114. R&D Systems: *Datasheet DuoSet ELISA Development System Human IL-1alpha/IL-1F1, Catalog-no: DY200-05 and DY200.*
115. R&D Systems: *Datasheet DuoSet ELISA Development System Human CXCL8/IL-8, Catalog-no: DY208-05 and DY208.*
116. Roche Diganostics: *Manual Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Version 10.* 2012
117. Löbker, W.: *Dissertation: Biotransformation Capacity of Reconstructed Human Skin versus Human Skin ex vivo - analysing Prednicarbate and Testosterone as Example, in Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie.* 2013, Freie Universität Berlin.
118. Wierzbicki, A., Loadman, P.M., Cubberley, R., and Moore, C.: *Investigating the phase II metabolic capacity of full thickness human skin S9 - important considerations regarding the stability of enzymes in S9 fractions.* 2013: personal communication.
119. Martignoni, M., Monshouwer, M., de Kanter, R. et al.: *Phase I and phase II metabolic activities are retained in liver slices from mouse, rat, dog, monkey and human after cryopreservation.* Toxicol In Vitro, 2004. **18**(1): p. 121-8.
120. Somers, G.I., Lindsay, N., Lowdon, B.M. et al.: *A comparison of the expression and metabolizing activities of phase I and II enzymes in freshly*

8. Literatur

- isolated human lung parenchymal cells and cryopreserved human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(10): p. 1797-805.
121. Wang, Q., Ye, C., Jia, R. et al.: *Inter-species comparison of 7-hydroxycoumarin glucuronidation and sulfation in liver S9 fractions*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. **42**(1-2): p. 8-12.
 122. De Lorenzi, E., Massolini, G., Macchia, M., and Caccialanza, G.: *HPLC Determination of Urinary 2,4- and 2,6-Toluendiamines as Potential Degradation Products of Polyurethane Breast Implants*. Chromatographia, 1995. **41**(11/12): p. 661-664.
 123. Freedman, D.L., Shanley, R.S., and Scholze, R.J.: *Aerobic biodegradation of 2,4-dinitrotoluene, aminonitrotoluene isomers, and 2,4-diaminotoluene*. J Hazard Mater, 1996. **49**: p. 1-14.
 124. Bonifas, J., Hennen, J., Dierolf, D. et al.: *Evaluation of cytochrome P450 1 (CYP1) and N-acetyltransferase 1 (NAT1) activities in HaCaT cells: implications for the development of in vitro techniques for predictive testing of contact sensitizers*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(3): p. 973-80.
 125. van Eijl, S., Zhu, Z., Cupitt, J. et al.: *Elucidation of xenobiotic metabolism pathways in human skin and human skin models by proteomic profiling*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41721.
 126. Harris, I.R., Siefken, W., Beck-Oldach, K. et al.: *Comparison of activities dependent on glutathione S-transferase and cytochrome P-450 IAI in cultured keratinocytes and reconstructed epidermal models*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. **15 Suppl 1**: p. 59-67.
 127. Groshong, R., Gibson, D.A., and Baldessarini, R.J.: *Monoamine oxidase activity in cultured human skin fibroblasts*. Clin Chim Acta, 1977. **80**(1): p. 113-20.
 128. Schallreuter, K.U., Wood, J.M., Pittelkow, M.R. et al.: *Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(1): p. 14-8.
 129. Lewinsohn, R., Glover, V., and Sandler, M.: *Development of benzylamine oxidase and monoamine oxidase A and B in man*. Biochem Pharmacol, 1980. **29**(9): p. 1221-30.
 130. Nicotra, A., Pierucci, F., Parvez, H., and Senatori, O.: *Monoamine oxidase expression during development and aging*. Neurotoxicology, 2004. **25**(1-2): p. 155-65.
 131. Volchegorskii, I.A., Shemyakov, S.E., Turygin, V.V., and Malinovskaya, N.V.: *Comparative analysis of age-related changes in activities of monoamine oxidase-B and antioxidant defense enzymes in various structures of human brain*. Bull Exp Biol Med, 2001. **132**(2): p. 760-2.
 132. Veral, A., Alper, G., Mentés, G., and Ersoz, B.: *Age and sex related alterations in serum and platelet monoamine oxidase*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1997. **35**(4): p. 265-8.
 133. Madan, M., Berkowitz, S.D., and Tchong, J.E.: *Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade*. Circulation, 1998. **98**(23): p. 2629-35.
 134. Eyer, J. and Leterrier, J.F.: *Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments in vitro*. Biochem J, 1988. **252**(3): p. 655-60.
 135. OECD: *Test Guideline 428: Skin absorption: In vitro method. Adopted on 13th April 2004*. 2004.
 136. Luu-The, V., Ferraris, C., Duché, D. et al.: *Steroid metabolism and profile of steroidogenic gene expression in Episkin: high similarity with human epidermis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(1-2): p. 30-6.

137. Luu-The, V., Sugimoto, Y., Puy, L. et al.: *Characterization, expression, and immunohistochemical localization of 5 alpha-reductase in human skin*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(2): p. 221-6.
138. Yamana, K., Labrie, F., and Luu-The, V.: *Human type 3 5alpha-reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2010. **2**(3): p. 293-9.
139. Manevski, N., Swart, P., Balavenkatraman, K.K. et al.: *Phase II metabolism in human skin: skin explants show full coverage for glucuronidation, sulfation, N-acetylation, catechol methylation, and glutathione conjugation*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(1): p. 126-39.
140. Dooley, T.P., Haldeman-Cahill, R., Joiner, J., and Wilborn, T.W.: *Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(1): p. 236-45.
141. Goren, A., Castano, J.A., McCoy, J. et al.: *Novel enzymatic assay predicts minoxidil response in the treatment of androgenetic alopecia*. Dermatol Ther, 2014. **27**(3): p. 171-3.
142. Luu-The, V., Duché, D., Ferraris, C. et al.: *Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **116**(3-5): p. 178-86.
143. He, D. and Falany, C.N.: *Characterization of proline-serine-rich carboxyl terminus in human sulfotransferase 2B1b: immunogenicity, subcellular localization, kinetic properties, and phosphorylation*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(10): p. 1749-55.
144. Blacker, K.L., Olson, E., Vessey, D.A., and Boyer, T.D.: *Characterization of glutathione S-transferase in cultured human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(3): p. 442-6.
145. Hu, T., Khambatta, Z.S., Hayden, P.J. et al.: *Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDerm in vitro 3D human epidermis model compared to human skin*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(5): p. 1450-63.
146. Hirel, B., Watier, E., Chesne, C. et al.: *Culture and drug biotransformation capacity of adult human keratinocytes from post-mortem skin*. Br J Dermatol, 1996. **134**(5): p. 831-6.
147. Messenger, S., Hann, A.C., Goddard, P.A. et al.: *Assessment of skin viability: is it necessary to use different methodologies?* Skin Res Technol, 2003. **9**(4): p. 321-30.
148. Utesch, D., Diener, B., Molitor, E. et al.: *Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cells by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes*. Biochem Pharmacol, 1992. **44**(2): p. 309-15.
149. Wiegand, C., Hewitt, N.J., Merk, H.F., and Reisinger, K.: *Dermal xenobiotic metabolism: a comparison between native human skin, four in vitro skin test systems and a liver system*. Skin Pharmacol Physiol, 2014. **27**(5): p. 263-75.
150. Furlong, B.B., Weaver, R.P., and Goldstein, J.A.: *Covalent binding to DNA and mutagenicity of 2,4-diaminotoluene metabolites produced by isolated hepatocytes and 9000 g supernatant from Fischer 344 rats*. Carcinogenesis, 1987. **8**(2): p. 247-51.

8. Literatur

151. Jondeau, A., Dahbi, L., Bani-Estivals, M.H., and Chagnon, M.C.: *Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants*. Toxicology, 2006. **226**(2-3): p. 218-28.
152. Boxman, I.L., Ruwhof, C., Boerman, O.C. et al.: *Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(7): p. 391-8.
153. Bonifas, J., Scheitza, S., Clemens, J., and Blömeke, B.: *Characterization of N-acetyltransferase 1 activity in human keratinocytes and modulation by para-phenylenediamine*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(1): p. 318-26.
154. Grantham, P.H., Mohan, L., Benjamin, T. et al.: *Comparison of the metabolism of 2,4-toluenediamine in rats and mice*. J Environ Pathol Toxicol, 1979. **3**(1-2): p. 149-66.
155. Lichter, J., Heckelen, A., Fischer, K., and Blömeke, B.: *Expression of N-acetyltransferase in monocyte-derived dendritic cells*. J Toxicol Environ Health A, 2008. **71**(13-14): p. 960-4.
156. Schmook, F.P., Meingassner, J.G., and Billich, A.: *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption*. Int J Pharm, 2001. **215**(1-2): p. 51-6.
157. Andres, H.H., Klem, A.J., Schopfer, L.M. et al.: *On the active site of liver acetyl-CoA. Arylamine N-acetyltransferase from rapid acetylators rabbits (III/J)*. J Biol Chem, 1988. **263**(16): p. 7521-7.
158. Malka, F., Dairou, J., Ragnathan, N. et al.: *Mechanisms and kinetics of human arylamine N-acetyltransferase 1 inhibition by disulfiram*. FEBS J, 2009. **276**(17): p. 4900-8.
159. Nohynek, G.J., Duché, D., Garrigues, A. et al.: *Under the skin: Biotransformation of para-aminophenol and para-phenylenediamine in reconstructed human epidermis and human hepatocytes*. Toxicol Lett, 2005. **158**(3): p. 196-212.
160. Hein, D.W., Doll, M.A., Rustan, T.D. et al.: *Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases*. Carcinogenesis, 1993. **14**(8): p. 1633-8.
161. Vanoirbeek, J.A., De Vooght, V., Synhaeve, N. et al.: *Is toluene diamine a sensitizer and is there cross-reactivity between toluene diamine and toluene diisocyanate?* Toxicol Sci, 2009. **109**(2): p. 256-64.
162. Bätz, F.M.: *Dissertation: Vergleich der kutanen Expression von Esterasen in rekonstruierter humaner Vollhaut bzw. Epidermis und Humanhaut ex vivo*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2013, Freie Universität Berlin.
163. Hu, T., Bailey, R.E., Morrall, S.W. et al.: *Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine: application of the EpiDerm human reconstructed epidermis model*. Toxicol Lett, 2009. **188**(2): p. 119-29.
164. Hennings, H., Michael, D., Cheng, C. et al.: *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture*. Cell, 1980. **19**(1): p. 245-54.
165. Runge-Morris, M. and Wilusz, J.: *Age and gender-related gene expression of hydroxysteroid sulfotransferase-a in rat liver*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **175**(3): p. 1051-6.

166. Distlerath, L.M., Reilly, P.E., Martin, M.V. et al.: *Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism.* J Biol Chem, 1985. **260**(15): p. 9057-67.
167. Lee, C.R., Goldstein, J.A., and Pieper, J.A.: *Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data.* Pharmacogenetics, 2002. **12**(3): p. 251-63.
168. Miller, S.M., McCarver, D.G., Bell, D.A. et al.: *Symposium Overview: Genetic polymorphisms in human drug metabolizing enzymes.* Fund Appl Toxicol, 1997. **40**: p. 1-14.
169. Ginsberg, G., Smolenski, S., Hattis, D. et al.: *Genetic polymorphism in glutathione transferases (GST): population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity.* J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2009. **12**(5-6): p. 389-439.
170. Facy, V., Flouret, V., Regnier, M., and Schmidt, R.: *Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation.* Toxicol In Vitro, 2005. **19**(6): p. 787-95.
171. Ouwehand, K., Spiekstra, S.W., Waaijman, T. et al.: *Technical advance: Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration.* J Leukoc Biol, 2011. **90**(5): p. 1027-33.
172. Bock, S., Zoschke, C., Müller, G. et al.: *Functional characterization of reconstructed human skin containing in vitro-generated Langerhans cell-like cells.* 2015: personal communication.
173. Zoschke, C., Ulrich, M., Sochorová, M. et al.: *Altered stratum corneum lipids and altered tight junctions impair skin barrier in organotypic cutaneous squamous cell carcinoma models.* submitted, 2015.
174. Richter-Hintz, D., Their, R., Steinwachs, S. et al.: *Allelic variants of drug metabolizing enzymes as risk factors in psoriasis.* J Invest Dermatol, 2003. **120**(5): p. 765-70.
175. Ahmad, N. and Mukhtar, H.: *Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases.* J Invest Dermatol, 2004. **123**(3): p. 417-25.
176. Minashkin, M.M., Salnikova, L.E., Lomonosov, K.M. et al.: *Possible contribution of GSTP1 and other xenobiotic metabolizing genes to vitiligo susceptibility.* Arch Dermatol Res, 2013. **305**(3): p. 233-9.
177. KÜchler, S., Henkes, D., Eckl, K.M. et al.: *Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down.* Altern Lab Anim, 2011. **39**(5): p. 471-80.
178. Barker, C.L., McHale, M.T., Gillies, A.K. et al.: *The development and characterization of an in vitro model of psoriasis.* J Invest Dermatol, 2004. **123**(5): p. 892-901.
179. Chamcheu, J.C., Pal, H.C., Siddiqui, I.A. et al.: *Prodifferentiation, anti-inflammatory and antiproliferative effects of delphinidin, a dietary anthocyanidin, in a full-thickness three-dimensional reconstituted human skin model of psoriasis.* Skin Pharmacol Physiol, 2015. **28**(4): p. 177-88.
180. Ali-von Laue, C., Zoschke, C., Do, N. et al.: *Improving topical non-melanoma skin cancer treatment: In vitro efficacy of a novel guanosine-analog phosphonate.* Skin Pharmacol Physiol, 2014. **27**(4): p. 173-80.

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten

Oestereich F., Bittner H.J., Weise C., **Grohmann L.**, Janke L.K., Hildebrand P.W., Multhaup G., Munter L.M.: *Impact of amyloid precursor protein hydrophilic transmembrane residues on amyloid-Beta generation*. *Biochemistry*, 2015. **54**(17): p. 2777–84.

Do N., Weindl G., **Grohmann L.**, Salwiczek M., Kokschi B., Korting H.C., Schäfer-Korting M.: *Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin*. *Exp Dermatol*, 2014. **23**(5): p. 326–31.

Winkler F., Kleinau G., Tarnow P., Rediger A., **Grohmann L.**, Gaetjens I., Krause G., l'Allemand D., Grüters A., Krude H., Biebermann H.: *A new phenotype of nongoitrous and nonautoimmune hyper-thyroidism caused by a heterozygous thyrotropin receptor mutation in transmembrane helix 6*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. **95**(8): p. 3605–10.

Originalarbeiten in Vorbereitung

Grohmann L., Becker D., Rademann J., Ma N., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Biotransformation of 2,4-toluenediamine in human skin and reconstructed tissues*.

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Characterization of monoamine oxidases, steroid-5 α -reductases, sulfotransferases and glutathione S-transferases in reconstructed skin tissues and human skin ex vivo*.

Poster

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *In vitro characterization of monoamine oxidases, steroid-5 α -reductases, sulfotransferases and glutathione S-transferases in excised human skin and reconstructed skin*. Annual Congress of the European Society for Alternatives to Animal Testing (EUSAAT), Linz/Österreich, 20.-23. September 2015.

(Abstract publiziert in: ALTEX Proceedings, 2015. **4**: p. 86.)

Grohmann L., Becker D., Rademann J., Ma N., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Biotransformation of 2,4-toluenediamine by human skin and reconstructed tissues*. Annual Congress of the European Society for Alternatives to Animal Testing (EUSAAT), Linz/Österreich, 20.-23. September 2015.

(Abstract publiziert in: ALTEX Proceedings, 2015. **4**: p. 87.)

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Characterization of monoamine oxidases, steroid-5 α -reductases, sulfotransferases and glutathione S-transferases in human skin ex vivo and reconstructed skin tissues*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Kiel/Deutschland, 09.-12. März 2015.

Grohmann L., Klipper W., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Biotransformation of testosterone and 2,4-toluenediamine by human skin and reconstructed tissues*. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag/Tschechische Republik, 24.-28. August 2014.
(Abstract publiziert in: ALTEX Proceedings, 2014. **3**: p. 300.)

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Characterization of monoamine oxidases, steroid-5 α -reductases, sulfotransferases and glutathione S-transferases in reconstructed skin tissues and human skin ex vivo*. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag/Tschechische Republik, 24.-28. August 2014.
(Abstract publiziert in: ALTEX Proceedings, 2014. **3**: p. 226.)

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *2,4-Toluenediamine as a model compound for biotransformation studies in human skin and reconstructed full thickness skin*. 2nd Skin Metabolism Meeting, Valbonne/Frankreich, 10.-11. Oktober 2013.

Grohmann L., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *2,4-Diaminotoluene as a model compound for biotransformation studies in human skin and reconstructed skin models – Cellular toxicity and development of an HPLC-UV method*. Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Chicago, Illinois/USA, 14.-18. Oktober 2012.

Vorträge

Grohmann L., Klipper W., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Testosterone and 2,4-toluenediamine metabolism by human skin and reconstructed tissues*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Kiel/Deutschland, 09.-12. März 2015.
(Abstract publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015. **388**: p. 63.)

Grohmann L., Klipper W., Schäfer-Korting M., Weindl G.: *Biotransformation of testosterone and 2,4-toluenediamine by human skin and reconstructed tissues*. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag/Tschechische Republik, 24.-28. August 2014.
(Abstract publiziert in: ALTEX Proceedings, 2014. **3**: p. 300.)

Preise, Stipendien

Young scientists travel award der Alternatives Congress Trust Germany und der Stiftung SET für die Teilnahme am 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 24.-28. August 2014 in Prag/Tschechische Republik.

Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) für die Teilnahme am *Annual Meeting of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 14.-18. Oktober 2012 in Chicago, Illinois/USA.

10. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

11. Eidesstattliche Erklärung

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, Lisa Grohmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den

Lisa Grohmann