
Vergleich der kutanen Expression von Esterasen in
rekonstruierter humaner Vollhaut bzw. Epidermis und
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

Franzisca Marie Bätz,

geb. Kantner

aus Berlin

Berlin, im Februar 2013

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie
der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Gerhard Wolber

Datum der Disputation: 24. April 2013

Meiner Familie

Mein zutiefst empfundener Dank gilt Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting, die es mir ermöglicht hat, durch die Vergabe dieses interessanten Forschungsthemas die vorliegende Arbeit im Rahmen des BMBF-Forschungsprojektes „Hautmetabolismus“ in ihrem Arbeitskreis anzufertigen. Mit ihr hatte ich eine kompetente Ansprechpartnerin an meiner Seite, deren exzellente Betreuung durch stete Gesprächsbereitschaft und sach- sowie fachliche Kompetenz charakterisiert waren.

Meinem Zweitgutachter, Herrn Professor Dr. Gerhard Wolber, danke ich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Professor Dr. Günther Weindl bin ich für seine sach- und fachkundige Einweisung in die Geheimnisse der Laborarbeit, seine stetige Ansprechbarkeit sowie seine Bereitschaft, bei Problemen als ein kompetenter Gesprächspartner zur Verfügung zu stehen, zutiefst verbunden.

Ferner bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. Monika Schäfer-Korting und Herrn Professor Dr. Günther Weindl für die Koordination des FU-verantwortlichen Bereiches des BMBF-Forschungsprojektes „Hautmetabolismus“. In diesem Zusammenhang danke ich ebenfalls dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung dieses Projektes.

Herrn Professor Dr. Peter Surmann danke ich für sein kritisch analytisches Hinterfragen und seine Sachkunde bei verschiedenen Fragestellungen.

Bei Herrn PD Dr. Ralph Pirow bedanke ich mich für die Bereitschaft, biometrische Fragen mit mir zu erörtern.

Herrn Dr. Henning Otto bin ich für die Erweiterung meines biochemischen Wissens bei allgemeinen sowie speziellen Fragen zu Enzymen dankbar.

Dem Team der Privatklinik für plastische und ästhetische Chirurgie des Helios Klinikums Emil von Behring unter der Leitung von Herrn Dr. Uwe von Fritschen, im Besonderen Herrn Dr. Uwe von Fritschen, Herrn Dr. Manfred Wehr und Frau Manuela Steege, und den unzähligen freiwilligen, unbekanntem Spendern von Hautproben verdanke ich die Basis dieser Arbeit. Ohne diese Zusammenarbeit wäre die Untersuchung des Hautmetabolismus gar nicht möglich gewesen.

Bei Frau Dr. Sarah Küchler bedanke ich mich für die Koordinierung und Betreuung des Projektes zur Entwicklung eines rekonstruierten humanen Atopiemodells sowie bei Frau Dominika Henkes für die Herstellung dieser Modelle, die für die Quantifizierung der Esteraseaktivität genutzt wurden.

Danksagung

Ferner bedanke ich mich bei der Dahlem Research School (DRS) für die Möglichkeit am Postgraduiertenstudiengang „Biomedical Sciences“ teilzunehmen ebenso wie für die finanzielle Unterstützung in Form eines Anschubstipendiums und zweier Kongressreisen zum „16th Congress on Alternatives to Animal Testing“, Linz (Österreich) 2010 und „40th Annual Meeting of European Society for Dermatological Research“, Helsinki (Finnland) 2010. Mit meinem DRS-Betreuungsteam, bestehend aus Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting, Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser und Herrn Prof. Dr. Günther Weindl, hatte ich ein Expertengremium an meiner Seite, dem ich für die Betreuung sehr herzlich danke.

Neben den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises sind insbesondere meinen lieben Kollegen Frau Nada Charbaji, Frau Lisa Grohmann, Frau Dr. Sarah Heilmann, Frau Dominika Henkes, Frau Wiebke Klipper, Frau Dr. Vivian Kral, Frau Dr. Cherine Mohamed Ali von Laue, Frau Maja Natek, Frau Dr. Peggy Schlupp und Christian Zoschke hervorzuheben, die mir zu teuren Weggefährten geworden sind, die nicht nur zum rein wissenschaftlichen Austausch bereit waren, sondern mir auch mal experimentell aushalfen.

Bei Frau Dr. Sarah Heilmann, Frau Dr. Vivian Kral, Herrn Dr. Mark-Oliver Carl und Herrn Christian Zoschke bedanke ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit, sowie ihren sachdienlichen Hinweisen.

Daneben sollen Frau Barbara Brüggener, Frau Hannelore Gonska und Frau Gabriele Roggenbuck-Kosch nicht unerwähnt bleiben, die dafür sorgten, dass der gesamte Arbeitsbetrieb des Arbeitskreises am Laufen blieb und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie (allen voran meinem Ehemann und meinen Eltern), die mich auf meinem Weg vom Studium bis zum Abschluss der Promotion fortwährend unterstützt und mit mir Höhen und Tiefen überstanden haben, sowie meinen Freunden, die mich ab und zu in die „nicht wissenschaftliche“ Welt entführten.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Formelverzeichnis.....	X
1 Einleitung: Alternativen zum Tierversuch	2
1.1 Rechtsrahmen in Deutschland und der Europäischen Union (EU).....	2
1.2 Humanhaut und biotechnologische Konstrukte	8
1.2.1 Morphologie.....	8
1.2.2 Rekonstruierte Epidermis und Humanhaut.....	11
1.3 Fremdstoffmetabolismus der Haut.....	14
1.4 Methodische Grundlagen der Versuche	16
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Technische Geräte	22
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Zellen und Kulturmedien.....	27
2.1.4 Haut, Hautmodelle und Kulturmedien.....	29
2.1.5 Lösungen für Esteraseaktivitätsbestimmung und Enzyminhibition.....	31
2.1.6 Lösungen für MTT, Zelllyse und Proteinbestimmung	33
2.1.7 Lösungen für die Genexpressionsuntersuchungen.....	34
2.1.8 Programme und Internetseiten	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Kultur humaner Zellen.....	37
2.2.2 Handhabung humaner Haut und rekonstruierter Gewebe	38
2.2.3 Grundlage der Esteraseaktivitätsmessung, Testprotokolle für den FLUOstar..	40
2.2.4 quantitative Esteraseaktivitätsbestimmung	41
2.2.5 Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure	46
2.2.6 Viabilitätsuntersuchungen	47
2.2.7 Esteraseinhibition bei Humanhauthomogenisaten	48
2.2.8 Untersuchungen zur Genexpression	48
2.2.9 Statistik.....	55
3 Ergebnisse	58
3.1 Entwicklung der quantitativen Esteraseaktivitätsbestimmung	58

3.1.1	Auswahl der Untersuchungssubstanz	58
3.1.2	Testbedingungen	58
3.1.3	Messanordnung, -reihenfolge und -zeitpunkt.....	59
3.1.4	Gewebeaufschluss und Aufbereitung.....	60
3.1.5	Viabilitätsuntersuchung.....	61
3.2	Quantitative Bestimmung enzymkinetischer Daten	62
3.2.1	Zweidimensionale Zellkultur.....	62
3.2.2	Humanhaut, rekonstruierte Humanhaut bzw. Epidermis.....	65
3.3	Korrelation esteratischer Spaltung von FDA und Prednicarbat	68
3.4	Isoformen der dermalen Esterasen	70
3.4.1	Inhibition der Esteraseaktivität.....	71
3.4.2	Untersuchung der Genexpression	72
3.4.3	Anhang: Untersuchung der Genexpression weiterer Metabolisierungsenzyme	73
3.5	Erstellte Standardarbeitsvorschriften (SOPs).....	74
4	Diskussion	76
4.1	Entwickelte Methoden	76
4.1.1	Humanhautaufschluss	76
4.1.2	Esteraseaktivitätsbestimmung.....	77
4.1.3	Viabilitätsuntersuchung.....	81
4.1.4	Esteraseinhibition	81
4.2	Dermale Esterasen.....	82
4.3	Korrelation esteratischer Spaltung von FDA und Prednicarbat	87
4.4	Genexpression weiterer Phase-I-Metabolisierungsenzyme.....	89
4.5	Ausblick.....	90
5	Zusammenfassung.....	94
6	Summary	98
7	Literaturverzeichnis	100
8	Anhang.....	112
8.1.1	Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis	112
8.1.2	Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur.....	128
8.1.3	Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut.....	145
9	Lebenslauf	160

10 Eidesstattliche Erklärung..... 162

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Franziska Marie Bätz*, Wiebke Klipper*, Hans Christian Korting, Frank Henkler, Robert Landsiedel, Andreas Luch, Uwe von Fritschen, Günther Weindl and Monika Schäfer-Korting, Esterase Activity in Excised and Reconstructed Human Skin - Biotransformation of Prednicarbate and the Model Dye Fluorescein Diacetate, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **seit 29. November 2012 bereits online verfügbar**
Impact Factor (2011): 4,269

(*beide Autoren waren gleichermaßen an der Erstellung der Arbeit beteiligt)

Poster

Wiebke Klipper*, Franziska Marie Baetz*, Günther Weindl, Monika Schäfer-Korting, Comparative Analysis of Esterase Activity in Reconstructed Human Skin Models and Excised Human Skin, 40th Annual ESDR Meeting, Helsinki (Finnland), 2010

(*beide Autoren waren gleichermaßen an der Erstellung der Arbeit beteiligt)

Franziska Marie Baetz, Günther Weindl, Monika Schäfer-Korting, Quantification of esterase activity in human keratinocytes and fibroblasts, ex vivo skin and reconstructed human skin models, 16th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz (Österreich), 2010

Franziska Marie Baetz, Günther Weindl, Monika Schäfer-Korting, Quantification of esterase activity in human keratinocytes and fibroblasts, ex vivo skin and reconstructed human skin models, Skin in vitro, Frankfurt am Main, 2010

Franziska Marie Baetz, Günther Weindl, Peggy Schlupp, Monika Schäfer-Korting, Quantification of esterase activity in human keratinocytes and fibroblasts, 20 Jahre ZEBET, Berlin, 2009

Baetz, F.M., Weindl, G., Schlupp, P., Schäfer-Korting, M., Quantifizierung von Esteraseaktivität in humanen Keratinozyten und Fibroblasten, DPhG-Jahrestagung, Jena, 2009

Abkürzungsverzeichnis

#

\bar{X} Mittelwert

A

AMG Deutsches Arzneimittelgesetz

AST2000 Rekonstruierte humane Vollhaut von CellSystems

B

BCA Bicinchoninsäure

BfR Bundesinstitut für Risikobewertung

BNPP Bis-(4-nitrophenyl)phosphat

BPE Boviner Hypophysenextrakt

BSA Bovines Serumalbumin

C

CES Carboxylesterase

CLS Cell Line Service

Cp Crossing points

D

DEPC Diethylpyrocarbonat

DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO Dimethylsulfoxid

E

ECHA Europäische Agentur für chemische Stoffe/ European Chemicals Agency

ECVAM European Center for Validation of Alternative Methods

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EpiDerm Rekonstruierte humane Epidermis von MatTek

EpiDerm-FT Rekonstruierte humane Vollhaut von MatTek

EU Europäische Union

F

FbBM NHDF-Basalmedium

FbGM NHDF-Wachstumsmedium

FDA Fluoresceindiacetat

FKS Fetales Kälberserum

FMCA fluorimetric microculture cytotoxicity assay

FU Freie Universität Berlin

FU barrieredefizitär Filaggrin Knockdown Konstrukt (Atopie-Modell der FU Berlin)

FU normal Normales Konstrukt (rekonstruierte humane Vollhaut der FU Berlin)

G

GHS global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

H

HaCaT Humane, spontan transformierte Keratinozytenzelllinie

hEGF Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2 Humane, kaukasische Leberzell-Karzinom-Zelllinie
HT29 Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie (ATCC HTB-38)

I

ICCVAM Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

J

JaCVAM Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

K

KBM Keratinozytenbasalmedium

KGM Keratinozytenwachstumsmedium

L

LDH Lactatdehydrogenase

M

M molare Masse [g/mol]

M [mol/L]

MEME Minimum Essential Medium Eagle

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

N

n Anzahl der durchgeführten Versuche

NCBI National Center for Biotechnology Information

NC-IUBMB Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

NEM N-Ethylmaleinimid

NHDF Normale humane, dermale Fibroblasten

NHK Normale humane Keratinozyten

NMF natural moisturizing factor/ natürlicher Feuchthaltefaktor

O

OECD TG 437 OECD Richtlinie 437: Augenirritationstest an boviner Kornea

OECD TG 438 OECD Richtlinie 438: Augenirritationstest am isolierten Hühnerauge

OECD TG 439 OECD Richtlinie 439: Hautirritationstest an rekonstruierter Humanhaut

P

PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4

PC Prednicarbat

PCR Polymerasekettenreaktion

PD Prednisolon

Phenion FT Rekonstruierte humane Vollhaut von Henkel

PMSF Phenylmethylsulfonfluorid

PON Arylesterasen

Q

QSAR Quantitative Structure-Activity Relationship

Abkürzungsverzeichnis

R

RHERekonstruierte humane Epidermis
RHSRekonstruierte humane Haut
RWTH Aachen Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

S

SD Standardabweichung
SDS Natriumdodecylsulfat

T

TEWL transepithelialer Wasserverlust
TierSchG..... Tierschutzgesetz
Tris-Base Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl..... Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid

V

Vk..... Variationskoeffizient

Z

ZEBETZentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

Formelverzeichnis

Gleichung 1: Berechnung der Nachweisgrenze (NWG).

$$\text{NWG} = \overline{\text{NA}} + 3 \cdot \text{SD}_{\text{NA}}$$

mit $\overline{\text{NA}}$ Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve

Gleichung 2: Bestimmungsgrenze (BSG).

$$\text{BSG} = \overline{\text{NA}} + 10 \cdot \text{SD}_{\text{NA}}$$

Gleichung 3: analog zur zweiphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion.

$$f(x) = Y_{\text{max}1} \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot x}) + Y_{\text{max}2} \cdot (1 - e^{-K_2 \cdot x})$$

mit Y_{max} Fluoreszenzintensität

K Kurvensteigung

Gleichung 4: Korrektur der Fluoreszenzmesswerte.

$$XY_{\text{korr}} = \overline{XY} - \overline{BY} - \overline{CA}$$

mit \overline{XY} Fluoreszenzintensität der Untersuchungsreihe

\overline{BY} Fluoreszenzintensität der Hydrolysekontrolle

\overline{CA} Fluoreszenzintensität der Autofluoreszenzkontrolle

XY_{korr} korrigierte Fluoreszenzmesswerte

Gleichung 5: Enzymatische Spaltung von FDA (eS).

$$eS = XY_{\text{korr}, t_2} - XY_{\text{korr}, t_1}$$

mit t_1 Zeitpunkt der Basalfluoreszenzmessung

t_2 Zeitpunkt der 2. Fluoreszenzintensitätsmessung

Gleichung 6: Umsatzgeschwindigkeit (v) der enzymatischen Spaltung von FDA zu Fluorescein.

$$v = \frac{eS}{t}$$

Gleichung 7: Allosterische Sigmoidalkurve.

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [s]^h}{k_{\text{prime}} + [s]^h}$$

mit v Umsatzgeschwindigkeit

v_{max} maximale Umsatzgeschwindigkeit

k_{prime} verwandt mit k_M (Verwendung im Zusammenhang mit Michaelis-Menten-Enzymkinetik, Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit (Vgl. Gleichung 16))

h Hill-Koeffizient

$[s]$ Substratkonzentration

Formelverzeichnis

Gleichung 8: Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit ($s_{0,5}$).

$$[S]_{0,5} = \sqrt[3]{k_{\text{prime}}}$$

Gleichung 9: Kooperativitätsindex (R_s).

$$R_s = \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}}$$

mit $[S]_{0,9}$ Substratkonzentration bei 90% v_{max}
 $[S]_{0,1}$ Substratkonzentration bei 10% v_{max}

Gleichung 10: Berechnung der prozentualen Viabilität.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Absorption der Probe} \cdot 100\%}{\text{Absorption der Negativkontrolle}}$$

Gleichung 11: Korrektur der Fluoresceinkonzentrationen der zwei verschiedenen Messzeitpunkte.

$$C_{\text{korr},t_1} = C_{\overline{XY},t_1} - C_{\overline{BY},t_1}$$

$$C_{\text{korr},t_2} = C_{\overline{XY},t_2} - C_{\overline{BY},t_2}$$

Gleichung 12: Enzymatische Spaltung von FDA zu Fluorescein nach Inhibition ($e_i S$).

$$e_i S = C_{\text{korr}, t_2} - C_{\text{korr}, t_1}$$

Gleichung 13: Umsatzgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung von FDA zu Fluorescein nach Inhibition.

$$v = \frac{e_i S}{t}$$

Gleichung 14: Berechnung der „Crossing Point“ Differenz (ΔC_p).

$$\Delta C_p_{\text{Enzym}_i, \text{Spender}_a} = \left| C_p_{\text{Enzym}_i, \text{Spender}_a} - C_p_{\text{Referenzgen}_n, \text{Spender}_a} \right|$$

Gleichung 15: Berechnung der Transkriptanzahl für die untersuchten Enzyme im Verhältnis zum Haushaltsgen [128].

$$n(\text{Transkripte Enzym}) = \frac{10000}{\text{Primereffizienz} \Delta C_p}$$

Gleichung 16: Michaelis-Menten-Gleichung.

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

mit v Umsatzgeschwindigkeit
 k_m Michaelis-Menten-Konstante
 X Substratkonzentration

Einleitung

1 Einleitung: Alternativen zum Tierversuch

Der menschliche Organismus kommt im Laufe seines Lebens mit einer Vielzahl von chemischen und/oder biologischen Stoffen in Form von Chemikalien, Kosmetika und Arzneimitteln in Berührung. Die Sicherheit und Wirksamkeit (und Unbedenklichkeit) dieser Stoffe, die auf verschiedenen Expositionswegen (meist oral, pulmonal, dermal) mit dem menschlichen Körper in Kontakt gelangen können, müssen daher vorab geprüft werden. Sie werden anhand von Versuchen in der Zellkultur getestet, bevor sie ggf. auch in Tierversuchen geprüft werden, wobei sich die Anforderungen bei der Testung von Chemikalien, Kosmetika und deren Bestandteile sowie bei der Arzneimittelentwicklung deutlich unterscheiden.

1.1 Rechtsrahmen in Deutschland und der Europäischen Union (EU)

Chemikalien

2007 trat die aktuelle EU-Chemikaliengesetzgebung (REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals), [29]) in Kraft. Nunmehr dürfen chemische Stoffe nur noch in der EU in den Verkehr gebracht werden, sofern sie bei der Europäischen Agentur für chemische Stoffe (European Chemicals Agency (ECHA)) registriert sind. Für die Registrierung von Stoffen mit einer Jahresproduktion oder -einfuhr größer einer Tonne werden im Registrierungsdossier Daten zu den physikochemischen Eigenschaften verlangt. Des Weiteren werden Untersuchungen der toxikologischen Effekte durch Reizung von Auge und Haut (*in vitro*), Sensibilisierung der Haut (*in vivo*), Mutagenität in Bakterienkultur (*in vitro*) sowie akute Toxizität und ökotoxikologische Auswirkungen auf Gewässerorganismen und der biotischen Abbaubarkeit der Stoffe gefordert. Bei Produktions-/Einfuhrgrößen, die 10 Tonnen pro Jahr übersteigen, ist zusätzlich ein Stoffsicherheitsbericht vorgeschrieben. Darüber hinaus sind die Standardanforderungen für die toxikologische Prüfung der Haut- und Augenreizung durch *in vivo* Daten zu ergänzen. Die Mutagenität ist zusätzlich an Säugerzellen zu testen und neben der Ausweitung der akuten Toxizität auf inhalative und dermale Applikation sind die chronische Toxizität über 28 Tage, reproduktionstoxische sowie toxikokinetische Daten der Stoffe zu prüfen. Ein Expositionsszenario ergänzt das Registrierungsdossier eines gefährlichen Stoffes. Übersteigt die Produktion bzw. die Einfuhr einer Chemikalie 100 Tonnen pro Jahr, werden die toxikologischen Prüfungen bei wiederholter Applikation (subchronische Toxizität) und der Reproduktionstoxizität (pränatale Entwicklung und 2-Generationentest) intensiviert und bei der ökotoxikologischen Prüfung wird verstärkt die akute Belastung von Erdboden und Gewässer untersucht. Ab 1000 Tonnen pro Jahr müssen zusätzlich die Karzinogenität der Stoffe getestet und die Langzeitfolgen auf

Organismen untersucht werden [29]. Datenlücken sind nach Genehmigung der ECHA mit geeigneten Testverfahren vom Registranten zu beseitigen [27].

Zur Reduzierung redundanter Versuche (vor allem in Hinblick auf Tierversuche) sowie zur Standardisierung von Einstufung und Kennzeichnung der chemischen Stoffe wurden von der ECHA Datenbanken zur Verfügung gestellt, welche den Registranten einen Informationsaustausch ermöglichen. Die darin zu archivierenden Daten zu den einzelnen Stoffen müssen von den Herstellern bzw. Exporteuren eingepflegt werden. Zentraler Bestandteil bei der Datenerhebung für Sicherheitsbericht und Expositionsszenario zur Gefahrenabschätzung ist das von William Russell und Rex Burch entwickelte und 1959 veröffentlichte 3R-Prinzip (**R**efine, **R**educe, **R**eplace) [130], wonach verstärkt Alternativmethoden zum Tierversuch eingesetzt bzw. bei Tierversuchen die Bedingungen für die Versuchstiere verbessert und die Versuchstierzahlen auf das unverzichtbare Minimum reduziert werden sollen.

Neben den *in vitro* Testmethoden umfasst der von der ECHA definierte Begriff Alternativmethoden auch nicht-experimentelle Datenerhebungen. Dazu zählen unter anderem mathematische Vorhersagemodelle zur Struktur-Wirkungsbeziehung (QSAR) und Verfahren, die Daten mittels Übertragungs- oder Beweiskonzepten (read-across und weight-of-evidence) bewerten. Gefordert ist außerdem der Verzicht auf Wiederholung aus wissenschaftlicher Sicht nicht nötiger, nicht möglicher oder aufgrund der geringen Exposition unnötig erscheinender Versuche [151].

Die mit der Implementierung von REACH befürchteten stark Steigerung der Tierversuchszahlen im Rahmen der geforderten Prüfungen hat sich bisher, dem ersten ECHA Bericht 2011 zufolge, nicht bestätigt. Bei den bis zum 28. Februar 2011 bei der ECHA registrierten Substanzen mit einer Jahresproduktion von mehr als 1000 Tonnen stammt die Mehrheit der Daten aus Tierversuchen. Jedoch wurden dabei weniger als 1% neue Tierversuche durchgeführt, da bereits toxikologische Daten vorlagen [151].

Kosmetika

Bereits seit 1989 verzichtet die deutsche Kosmetikindustrie freiwillig auf die Testung kosmetischer Fertigprodukte im Tierversuch. Mit der Novelle des deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) von 1998 wurde die Prüfung von Kosmetika an Tieren gesetzlich untersagt (§ 7 Abs. 5) [14]. Auf EU-Ebene wurde 2003 durch die siebte Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie [28] neben dem Verbot der Testung gebrauchsfertiger Kosmetika ein schrittweises Verbot von Tierversuchen zum Testen kosmetischer Inhalts- und Rohstoffe in Europa beschlossen (Abbildung 1).

Seit September 2004 dürfen somit in der EU keine kosmetischen Fertigprodukte an Tieren getestet werden. Ab März 2009 war auch die Prüfung von Kosmetikbestandteilen und

-rohstoffen und deren Kombinationen an Tieren untersagt, wobei die komplexen Endpunkte Reproduktionstoxizität, Toxikokinetik und Toxizität bei wiederholter Verabreichung von diesem Verbot ausgenommen waren. Im März 2013 wird auch diese Übergangsfrist enden. Dann sollen notwendige Untersuchungen ausschließlich mit Alternativmethoden durchgeführt werden. Ab Juli 2013 ist das Inverkehrbringen von kosmetischen Mitteln untersagt, deren einzelne Bestandteile, Kombinationen von Bestandteilen sowie die Fertigerzeugnisse an Tieren getestet wurden (Artikel 18 §1, oder Kosmetikverordnung EU 1223/2009 [30]).



Abbildung 1: Schrittweises Verbot von Tierversuchen mit Kosmetika und deren Bestandteilen [30].

Zweifelhaft ist allerdings, ob dieses Ziel bis 2013 erreicht werden kann, da trotz finanzieller Unterstützung mit mehr als 200 Mio. Euro durch die EU bislang nicht jeder zu prüfende Endpunkt mit einer *in vitro* Methode hinterlegt ist. Zwar wurde in den letzten Jahren bei den Endpunkten Reproduktionstoxizität, Toxikokinetik und Toxizität bei wiederholter Verabreichung erhebliche Fortschritte in Bezug auf das Verständnis der toxikologischen Vorgänge im menschlichen Körper erzielt, dennoch wurde aufgrund des enormen Aufwandes (Ringversuche zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse) bislang noch keine Alternativmethode für diese Endpunkte validiert und behördlich anerkannt [32, 95].

Regulatorisch gehören einige Stoffe sowohl unter den Zuständigkeitsbereich der EU-Kosmetik-Richtlinie als auch von REACH. Der straffe Zeitplan bei dem Verbot von Tierversuchen im Rahmen der EU-Kosmetikrichtlinie hat die Entwicklung von Alternativmethoden wesentlich gefördert, wovon die Hersteller und/oder Importeure dieser Stoffe profitieren. In der EU koordiniert das Europäische Zentrum zur Validierung von

Alternativmethoden (ECVAM) solche Untersuchungen. Insgesamt 16 Alternativmethoden für 7 verschiedene Endpunktkategorien sind dabei von der EU bereits anerkannt [26] (Tabelle 1, Stand 03/2012).

Für die Untersuchung der Haut- und Augenreizung existieren auch jenseits der EU, d.h. in allen wichtigen Industrieländern, validierte und anerkannte *in vitro* Testverfahren (Haut: OECD TG 439; Auge: OECD TG 437, 438; Tabelle 1). Seit der Anerkennung durch die OECD 2009 und 2010 werden über 75% der Haut- und Augenirritationstests, die im Rahmen der REACH Gesetzgebung vorgeschrieben sind, mit *in vitro* Methoden durchgeführt [151].

Große Industrienationen wie die USA und Japan haben nach dem Vorbild der ZEBET/ECVAM entsprechende Institutionen aufgebaut (ICCVAM und JaCVAM) und kooperieren bei der Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden und deren Anerkennung eng mit den europäischen Behörden. Die Angleichung der Bestimmungen im Hinblick auf tierversuchsfreie Testung von kosmetischen Rohstoffen/Bestandteilen und deren Kombinationen bzw. der Anforderungen an die Testung von Chemikalien erleichtern den globalen Handel.

Arzneimittel

Tier- und Humanarzneimittel unterliegen nicht der EU-Chemikaliengesetzgebung, sondern den strengeren Anforderungen der Arzneimittelgesetze (AMG, [13]) bzw. der EU-Kosmetikrichtlinie [31]. Letztere fordert Tierversuche in der präklinischen Prüfung (EU 2001/83/EG, Anhang 1). Existieren validierte *in vitro* Testmethoden zur toxikologischen Untersuchung der lokalen Verträglichkeit, deren Ergebnisse bei der Sicherheitsbeurteilung den Resultaten der Tierversuche äquivalent sind, können diese Testmethoden Tierversuche ersetzen [31] (Anhang 1 §4.2.3f Abs. 4).

Tabelle 1: Europaweit validierte und akzeptierte Alternativmethoden [26].

Thema	Titel	Richtlinien	Kommentar
akute orale Toxizität	• „acute toxic class methode for acute oral toxicity testing“	OECD TG 423 (12/2001)	Ersatz von OECD TG 401 (Refinement)
	• „fixed dose procedure for acute oral toxicity testing“	OECD TG 420 (12/2001)	
	• „up- and down procedure for acute oral toxicity testing“	OECD TG 425 (12/2001)	
	• „isolated chicken eye (ICE) test method“	OECD TG 438 (09/2009)	Vorschaltung zur Reduktion der Tierversuche am Kaninchenauge
Genotoxizität	• „bovine corneal opacity and permeability test method“	OECD TG 437 (09/2009)	
	• „in vitro mammalian cell micronucleus test“	OECD TG 487 (07/2010)	
Hautirritation	• „two in vitro skin irritation tests: Modified EpiDerm SIT and SkinEthic™ RHE assay“	OECD TG 439 (07/2010)	Einzeltests mit EpiDerm SIT, SkinEthic™ und EpiSkin® ersetzen Draize-Hautirritationstest; Test ermöglicht Chemikalienklassifizierung als Haut irritierend nach GHS) Kategorie 2
	• „artificial skin models (EpiSkin®, EpiDerm®) for skin irritation testing“		

Fortsetzung Tabelle 1: Europaweit validierte und akzeptierte Alternativmethoden [26].

Thema	Titel	Richtlinien	Kommentar
Hautkorrosion	• „corrositex assay for skin corrosivity“	OECD TG 435 (07/2006)	
	• „epiCS® test method“	OECD TG 431 (06/2009)	
	• „SkinEthic™ human skin model for skin corrosivity testing“	(11/2009)	
	• „EpiDerm™ skin corrosivity test“	(04/2004)	
	• „EPISKIN™ skin corrosivity test“		
	• „Rat TER skin corrosivity test“	OECD TG 430 (04/2004)	
Hautresorption	• „in vitro tests for skin absorption“	OECD TG 428 (04/2004)	
	• „3T3 NRU phototoxicity test“	OECD TG 432 (04/2004)	Phototoxizitätstest nur noch an Zellkulturen durchzuführen

1.2 Humanhaut und biotechnologische Konstrukte

Mit einer Oberfläche von bis zu 2 m² bildet die Humanhaut eine wichtige Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und seiner Umwelt. In Abhängigkeit von Lokalisation und Alter variieren die Dicke der Haut und das Vorkommen von Hautanhangsgebilden (Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen) stark. Die ausgebildete Barriere verhindert neben dem transepidermalen Wasserverlust (TEWL) das Eindringen von Fremdstoffen und -organismen. Zudem bietet sie kurzfristig einen natürlichen Schutz gegenüber energiereicher UV-Strahlung.

Makroskopisch sind drei Hautschichten erkennbar (Abbildung 2). Diese können mikroskopisch weitergehend differenziert werden [96].

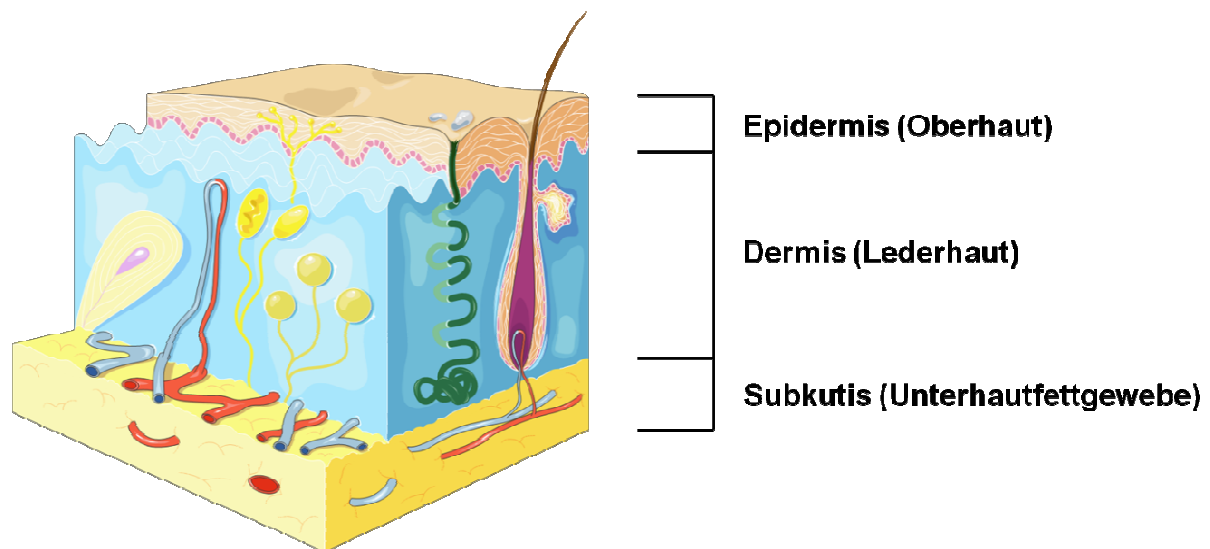


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Haut. Diese Abbildung wurde erstellt mit Servier Medical Art.

1.2.1 Morphologie

Die **Epidermis** (Oberhaut) ist ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel. Mit einer Schichtdicke von 30-300 µm stellt sie die äußerste Struktur dar. Neben normalen humanen Keratinozyten (NHK) als größter Zellpopulation sind in der Epidermis Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Lymphozyten zu finden. Die Epidermis lässt sich von außen nach innen in *Stratum corneum* (Hornschicht), *Stratum granulosum* (Körnerschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Basalschicht) unterteilen. Das *Stratum basale* ist die innerste Zellschicht und besteht aus einer einzigen Zellreihe (in Abbildung 2 rosa gestrichelt angedeutet). Von diesem Proliferationsgewebe aus gelangen die sich durch Mitose fortwährend neu bildenden Keratinozytentochterzellen unter Differenzierung apikal bis in das *Stratum corneum*. Aus kubischen, kernhaltigen Keratinozyten werden schließlich flache, kernlose, verhornte Korneozyten, die etwa vier

Wochen nach der Entstehung als Hornschuppe abgeschilfert werden. Dieser Prozess der terminalen epidermalen Differenzierung kann in drei Stadien unterteilt werden [96].

Im Synthesestadium, vom unteren *Stratum spinosum* bis zum unteren *Stratum granulosum*, werden die für die Keratinisierung benötigten Vorläuferproteine und -lipide synthetisiert, wie beispielsweise die Strukturproteine Lorikrin, Involukrin, und die Lipide Phospholipide, Cholesterolsulfat, Sphingolipide und Glucosylceramide. Die Vorläuferlipide werden im Rahmen des Differenzierungsprozesses in den Odland-Körperchen (Lamellenkörperchen) des *Stratum granulosum* gespeichert [23, 85, 145]. Gegen Ende der Synthesephase lagert sich eine dünne Schicht aus den Strukturproteinen Lorikrin und Involukrin (auch als marginales Band bezeichnet) in Vorbereitung der Bildung der Hornhülle an die Innenseite der Plasmamembran an. Weitere typische epidermale Differenzierungsprodukte der Synthesephase sind: Keratinfilamente, Desmosomen und Zonula occludens [96], d.h. Tight Junctions, welche erst vor wenigen Jahren in der Haut nachgewiesen wurden [97].

Im anschließenden Transformationsstadium, welches in etwa dem unteren *Stratum granulosum* entspricht, werden in die Odland-Körperchen zusätzlich antimikrobielle Peptide und Enzyme eingeschlossen. Außerdem beginnt in den Keratohyalingranula des *Stratum granulosum*, welche aus Profilaggrin bestehen, die Spaltung von Profilaggrin zu Filaggrin. Das histidinreiche Matrixprotein Filaggrin führt zur vollständigen Aggregation der Keratinfilamente, die durch Vernetzung über Disulfidbrücken Keratinfibrillen des Zytoskelettes bilden, die für die mechanische Stabilität des *Stratum corneums* verantwortlich sind (68). Zusätzlich werden lysomale Enzyme (im oberen *Stratum granulosum*) freigesetzt, die angestoßen durch die Keratinisierung zur Auflösung von Zellkern und Zellorganellen führen. Dadurch flachen die Keratinozyten ab und wandeln sich in Korneozyten um [23, 36, 96].

Im Terminalstadium (Übergang oberes *Stratum granulosum* bis *Stratum corneum*) vernetzen calciumabhängige, membrangebundene Transglutaminasen die Proteine des marginalen Bandes untereinander und mit dem Keratingerüst sowie den Desmosomen, wodurch der sogenannten „cornified envelope“ (Hornhülle) entsteht [23, 85, 87, 96, 145]. Die aus Histidin und Glutamin gebildeten Abbauprodukte von Filaggrin, Urocaninsäure und Pyrrolidon-5-carbonsäure, sorgen zusammen mit freien Aminosäuren, Milchsäure und Harnstoff als „natural moisturizing factor“ (NMF) (natürliche Feuchthaltefaktoren) für die Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitsgehaltes des *Stratum corneum* [12, 36, 124]. Dabei ist der Prozess der NMF-Bildung selbst wieder vom Hydratationslevel des *Stratum corneums* abhängig [12]. Zudem wird der Inhalt der Odland-Körperchen in den Interzellularraum freigesetzt. Die sezernierten Enzyme, Phospholipase A₂, Steroidsulfatase und β -Glucocerebrosidase [120], wandeln die Vorläuferlipide in Abhängigkeit des pH-Gradienten (neutral nach sauer) in freie Fettsäuren (mitverantwortlich für die Azidifizierung) [35], Cholesterol und Ceramide im

Verhältnis 1:1:3 um. Diese Lipide ordnen sich im interzellularen Spalt zu Lipidlamellen an, die sich parallel zur Zelloberfläche der Korneozyten ausrichten. Dabei binden Ceramide mit langkettigen ω -Hydroxyfettsäuren kovalent an Proteine der Hornhülle (unter anderem Involukrin) [17, 120]. Die enge Verzahnung Amid-gebundener Fettsäuren der Ceramide mit freien Fettsäuren führen zur Ausbildung von Bereichen mit einer Gel-Phasen-artigen Membran, die von flüssig-kristallinen Bereichen unterbrochen sind [12, 17].

Die Kombination aus Zell-Zellverbindungen über Zonulae occludentes und der Verschluss des Interzellularraumes mit Lipiden sind essentiell für die Ausbildung der Diffusionsbarriere der Epidermis. Dadurch kann der transepidermale Wasserverlust reduziert werden. Zugleich bildet sich eine Struktur aus, die eine Plastizität und Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften besitzt [23, 85].

Die **Basalmembran** (dermoepidermale Verbindungszone) setzt sich aus der Lamina lucida, Lamina densa, Fibrillen, dermalen Kollagenfasern und dermalen Matrix zusammen. Sie sorgt für eine stabile Verbindung zwischen Epidermis und Dermis. Die Lamina lucida ist über Verankerungsfilamente mit der Plasmamembran der Basalzellen und die Lamina densa über Verankerungsfibrillen- und Mikrofibrillenbündel mit der Dermis verbunden [96].

Die **Dermis** besteht aus drei Hauptkomponenten: Zellen (vorrangig: normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF)), Fasern und einer Matrix. Zu den dermalen Zellen gehören neben Fibroblasten Makrophagen (Histiozyten), Mastzellen und Melanozyten, Langerhans-Zellen und Lymphozyten. Dermale Fasern umfassen Kollagenfasern, Verankerungsfibrillen und elastischen Fasern. Die dermale Matrix ist ein Vielkomponentengemisch, das sowohl von Fibroblasten als auch Keratinozyten synthetisiert wird. Sie besteht unter anderem aus Proteoglykanen (langen, dünnen Makromolekülen mit Polysaccharid-Seitenketten) wie Hyaluronsäure und Dermatan-sulfat, Wasser, Proteinen und Kohlenhydraten. Die Schichtdicke der Dermis variiert in Abhängigkeit vom Lokalisationsort. Histologisch lässt sich die Dermis weiter in *Stratum papillare* und *Stratum reticulare* auftrennen.

Das *Stratum papillare* setzt an der dermoepidermalen Verbindungszone an, in die Verankerungsfibrillen (quergestreifte Kollagenfibrillen aus Kollagen Typ VII) ziehen, welche für die feste Verankerung zwischen Epidermis und Dermis sorgen. In dieser Schicht sind hauptsächlich dermale Zellen und Matrix zu finden.

Das darüber liegende *Stratum reticulare* wird vorrangig aus dermalen Fasern gebildet. Die Kollagenfasern sorgen mit ihrer netzartigen Anordnung für die mechanische Stabilität und Dehnbarkeit der Dermis. Sie sind aus dem Hauptstrukturprotein des Bindegewebes, Kollagen I, aufgebaut. Die elastischen Fasern (bestehend aus Elastin und Fibrillin) sorgen für Festigkeit und Elastizität der Dermis [96].

1.2.2 Rekonstruierte Epidermis und Humanhaut

Eine Weiterentwicklung der zweidimensionalen Mono- oder Ko-Kulturen aus Keratinozyten und/oder Fibroblasten (zumeist zur Aufklärung von pathologischen, physiologischen, biologischen und Substanzeffekten genutzt) stellen organotypische „Hautmodelle“ dar, welche die natürlichen Gegebenheiten der Haut besser imitieren [77]. 1975 beschrieben Rheinwald und Green [127] eine Methode, welche eine fortlaufende Kultivierung von NHK ermöglicht, und zeigten, dass die oberen Schichten einer NHK-Kolonie bei mehrschichtigem Wachstum verhornen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde es möglich, große Mengen an NHK zu generieren und ein mehrschichtiges Gewebe nachzubilden. 1988 wurde das erste Autotransplantat humaner Haut (Epicel[®], Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts (USA)) vermarktet [15, 116].

Humanhautkonstrukte können in rekonstruierte humane Epidermis (RHE) und rekonstruierte humane Vollhaut (RHS) unterschieden werden. Für die Konstruktion von RHE werden NHK auf Membranen (Zelluloseacetat oder Polycarbonat), z.B. in Form von Zellkultureinsätzen, ausgesät. Die Zellen werden in einer Submerskultur vermehrt und bilden eine vielschichtige Matrix aus. Nach Abschluss der Proliferationsphase wird der Spiegel an Nährmedium bis zur Membran abgesenkt, sodass die Zellschichten in Luftkontakt treten (sogenannter „Air Lift“). Dieser Reiz führt zur Differenzierung der Zellen, die daraufhin die verschiedenen Epidermisschichten der Haut ausbilden [165].

RHS bestehen aus zwei unterschiedlichen Matricelementen, die nacheinander aufgebaut werden. Als Erstes wird die Dermis rekonstruiert. Dies kann durch Einbettung von NHDF in ein Kollagengel geschehen, oder es werden Dermis-Äquivalente genutzt, die auf de-epidermisierte Dermis, extrazellulärer Matrix (synthetischer oder biologischer Herkunft), Gerüstsubstanzen oder Schwämmen basieren. Die NHK werden darauf ausgesät und zunächst submers, anschließend als „Air Lift“-Kultur kultiviert (Abbildung 3) [77, 165].

Vorteil dieser Konstrukte ist die Möglichkeit der Untersuchung von Zell-Matrix-/ Zell-Zell-Interaktionen [21, 77] sowie von Untersuchungen zu Hautirritation, Hautkorrosion, Phototoxizität und perkutaner Absorption an einer der Humanhaut äquivalenten Epidermis. Kommerziell verfügbare RHE sind für diese Zwecke als Alternative zum Tierversuch validiert und Gegenstand von OECD Richtlinien (Tabelle 1, Seite 6) [108, 109, 138]. Die Konstrukte, allen voran das RHE EpiDerm, unterscheiden sich histologisch geringfügig in der Feinstruktur von menschlicher Humanhaut. *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* inklusive der charakteristischen Lamellenkörperchen (Odland-Körperchen) und Keratohyalin granula des *Stratum granulosum* sind vorhanden, jedoch zeigen die Konstrukte intrazelluläre Lipideinschlüsse in *Stratum basale*, *Stratum spinosum* und *Stratum corneum* sowie kristallines Cholesterol im *Stratum corneum*, welche

in der Humanhaut nicht vorkommen. Auffällig ist die starke Verhornung der Konstrukte. Ihr *Stratum corneum* ist fast doppelt so dick wie das der Humanhaut [117].

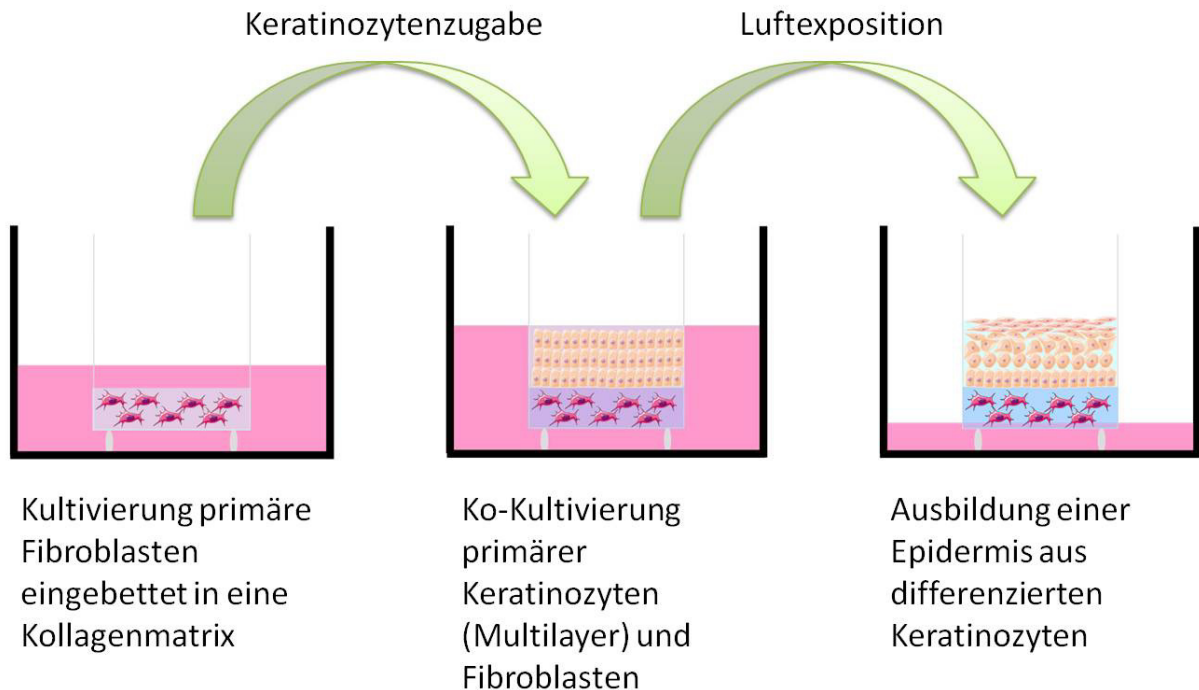


Abbildung 3: Prinzip der Konstruktion humaner Vollhaut. Diese Abbildung wurde erstellt mit Servier Medical Art.

Ferner zeigen sich deutliche Abweichungen zu den Eigenschaften der Humanhaut, insbesondere ist die Barriere der Konstrukte geringer als bei Humanhaut. Ursache hierfür ist vermutlich das abweichende Lipidprofil [165]. Besonders groß sind dabei die Unterschiede im Ceramidprofil. Ceramid 7 (normalerweise zu etwa 10% vorhanden) wurde in keinem der untersuchten RHE (EpiDerm, SkinEthic, Episkin) gefunden und Ceramid 5 (normalerweise zu etwa 20% vorhanden) und 6 (normalerweise zu etwa 5% vorhanden) waren in nur geringen Mengen (ca. 3-8% bzw. 1-2%) nachweisbar, wohingegen von Ceramid 2 (normalerweise zu etwa 25% vorhanden) deutlich höhere Mengen (ca. 40-53%) gefunden wurde [66, 117, 118]. Entscheidend für die Synthese von Ceramid 5, 6 und 7 ist die Fähigkeit zur Hydroxylierung der gesättigten C24-Fettsäure (Lignocerinsäure) an Position 2 zu Cebronsäure (2-Hydroxytetracosansäure). Das würde erklären, weshalb Ceramid 2 (Lignocerinsäure) verstärkt in den rekonstruierten Häuten gefunden wurde.

Seit neustem werden auch Hautkrankheiten wie atopische Dermatitis, Psoriasis oder Ichthyosis in Form von Hautmodellen nachgebaut [4, 64, 74, 111, 144]. Diese bieten unter anderem die Möglichkeit, die Ätiologie der Erkrankung, deren Entwicklung und die Therapie auf molekularer Ebene zu erforschen. Ebenso lassen sich assoziierte Erkrankungen wie bakterielle und/oder Pilzkrankungen untersuchen. Das Penetrations- und Permeationsverhalten geschädigter Haut wurde bislang durch das Setzen gezielter Hautläsionen (wie mittels „Tape stripping“ oder Chemikalien) untersucht [18].

Krankheitsmodelle könnten wichtige Erkenntnisse über Eindringtiefe von Substanzen und Mikroorganismen liefern, um dadurch Arzneistoffe und Wirkstoffe von Kosmetika und Stoffformulierung zu verbessern oder - bei Chemikalien - deren Gefährlichkeit besser einzuschätzen. Jedoch ist die Nutzung von Krankheitsmodellen bei der Erforschung von Behandlungsmöglichkeiten bislang noch limitiert. T-Lymphozyten, die an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind, und deren Interleukin 2-Produktion die Hyperproliferation der Keratinozyten auslöst, sind bislang nicht integrierbar [144, 163].

Ferner gibt es Bestrebungen, Langerhans-Zellen [33, 112] und Blutgefäße [9] in die Konstrukte zu integrieren. Dadurch wird sich das Spektrum der Forschungsmöglichkeiten erweitern. Neben molekularbiologischen Untersuchungen zu Ablauf, Reaktionspartnern und Beeinflussungsmöglichkeiten der dermalen Immunreaktion, Sensibilisierung oder Allergisierung, könnte die systemische Verfügbarkeit dermal applizierter Stoffe direkt gemessen werden. Auf Basis der sich daraus ergebenden Erkenntnisse könnten Vorhersagemodelle für die verschiedenen Einsatzgebiete (Chemikalien, Kosmetika und Arzneimittel) entwickelt werden. Die Nutzung von rekonstruierter Humanhaut als Alternativmethode zum Tierversuch für die Sicherheits- und/oder Risikoabschätzung von Chemikalien bei dermalen Exposition ist - wie in REACH gefordert - bei entsprechender Validierung und Anerkennung möglich. Ebenso können Kosmetikzubereitungen und deren Bestandteile damit auf ihre Verträglichkeit getestet werden. Des Weiteren eröffnet für die Arzneimittelentwicklung diese Grundlagenforschung Chancen, neue Angriffspunkte von Arzneistoffen zu identifizieren, Arzneiformulierungen und -stoffdosierungen zu verbessern und neue Behandlungsmöglichkeiten präklinisch zu testen.

Die rekonstruierten Humanhäute sind hinsichtlich ihrer Penetrations- und Permeationseigenschaften bereits mit den OECD-Standardtestsubstanzen Testosteron und Koffein gut charakterisiert [2, 138, 139, 141]. Zur Nutzung der Konstrukte als Surrogat für Versuche an Humanhaut ist das Spektrum der Biotransformationsenzyme von großer Bedeutung, weshalb deren Genexpression von verschiedenen Wissenschaftlern intensiv untersucht wird [22, 38, 59, 83, 84, 100]. Die Untersuchung der Biotransformationskompetenz von rekonstruierter Humanhaut sowie deren Vergleich zur Humanhaut *ex vivo* hat in den letzten Jahren stark zugenommen [43, 44, 59, 158]. Die Ergebnisse aus Biotransformations- und Absorptionsstudien könnten daher zu einer umfassenden Charakterisierung der kommerziellen Konstrukte führen. Daraus würde sich bei entsprechender Anerkennung und Validierung die Möglichkeit eines *in vitro* Testverfahrens als Alternative zum Tierversuch ergeben.

1.3 Fremdstoffmetabolismus der Haut

Bislang galt die Leber als eines der bedeutendsten biotransformationsfähigen Organe. In den letzten Jahren rückte jedoch die Humanhaut in den Fokus von Wissenschaftlern, da sie mit ihrer großen Oberfläche eine wichtige Grenzfläche zur Umwelt darstellt und häufig Xenobiotika ausgesetzt ist. Ausgehend von den Erkenntnissen zum Leber-Metabolismus wurden hepatisch-dominante Enzyme in der Haut gesucht und gefunden. Esterasen haben eine wichtige Funktion durch Spaltung von Esterstrukturen in Rahmen einer Phase-I-Biotransformation. Die freigelegten Carboxyl- und Hydroxylgruppen können anschließend in der Phase II der Biotransformation mit körpereigenen Substanzen konjugiert werden, sodass eine renale oder biliäre Eliminierung erfolgen kann. Die geschilderten Prozesse laufen vorrangig in der Leber ab, aber auch andere Gewebe wie die Haut zeigen Biotransformationskompetenzen [42]: Esterasen sind ubiquitär in verschiedenen Geweben zu finden [58, 86].

Die in Dermatika besonders häufig eingesetzten Ester-Prodrugs erhöhen die Lipophilie der Arzneistoffe. Dies verbessert die Penetration in das *Stratum corneum*. In der Epidermis erfolgt dann die Abspaltung der Estergruppe und Freilegung des wirksamen Arzneistoffes. Durch die Esterspaltung kann die Wirkstärke des Arzneistoffes verändert werden. Zum Beispiel wird Prednicarbat (GC-Klasse nach Nieder: II; [105]) durch enzymatische Spaltung zu Prednisolon-17-ethylcarbonat umgewandelt [42], welches eine vergleichbare Bindungsaffinität zum Glucocorticoid-Rezeptor wie Prednicarbat und Dexamethason (GC-Klasse nach Nieder: I/II; [105]) zeigt, jedoch deutlich niedriger ist als bei Betamethason-17-valerat (GC-Klasse nach Nieder: II/III; [105]) [152]. Die antiinflammatorische Wirkung wird durch den Biotransformationsschritt von Prednicarbat zu Prednisolon-17-ethylcarbonat nicht reduziert [134]. Die weiteren Metabolite der Prednicarbat-Biotransformation Prednisolon-21-ethylcarbonat (durch Acylmigration aus Prednisolon-17-ethylcarbonat entstehend [42]) und Prednisolon (durch enzymatische Esterspaltung von Prednisolon-21-ethylcarbonat [42]) zeigen dagegen eine deutlich geringere Affinität zum Glucocorticoid-Rezeptor [45]. Die dadurch bedingte geringere Inhibition der Ausschüttung von Interleukinen, einhergehend mit einer weniger starken Reduzierung der Fibroblastenproliferation und der Kollagensynthese vermindert das Risiko einer Hautatrophie [172], welches die häufigste unerwünschte Arzneimittelwirkung topisch applizierter Glucocorticoide darstellt [70]. Ebenso sinkt durch die Biotransformation zu Prednisolon (GC-Klasse nach Nieder: I; [105]) der antiinflammatorische Effekt im Vergleich zu Glucocorticoiden der Klasse II [70, 82, 134].

Dies zeigt, dass die dermale Exposition bei der Beurteilung von Toxizität eine große Bedeutung hat. Die Haut schützt den Organismus vor äußeren Einflüssen. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass sie neben der Resorptionsbarriere auch über die Biotransformation von

Fremdstoffen (Xenobiotika) protektiv wirken kann. Daher erforschten im BMBF-Verbundvorhaben „Charakterisierung der metabolischen Kapazität von *in vitro* Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen mit dermalen Biotransformation“ (2009-14) Wissenschaftler aus der Industrie (BASF, Henkel), nationalen Behörden (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET)) und Universitäten (Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (RHTW Aachen, Freie Universität Berlin, FU) die Biotransformation in RHS verschiedener Hersteller (MatTek: EpiDerm FT, Henkel: Phenion FT, Cell Systems: AST 2000) anhand von Modellsubstanzen vergleichend zu Humanhaut *ex vivo* und RHE (MatTek: EpiDerm). Die FU Berlin verantwortet die Testung von Arzneistoffen (Prednicarbat und Testosteron). Ferner wurden im Rahmen des Projektes wichtige Biotransformationsenzyme des Phase-I- und -II-Metabolismus dieser und anderer Stoffe, wie CYP1A1, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 und N-Acetyltransferase (NAT), Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO), Alkohol-Dehydrogenase (ADH), Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) und Esterasen untersucht.

Fremdstoffmetabolisierende Esterasen

Das „Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (NC-IUBMB) klassifiziert Esterasen weiterführend hinsichtlich ihrer Spezifität zur Spaltung bestimmter Bindungsarten und ihren bevorzugt umgesetzten Substraten. Die physiologischen Substrate der verschiedenen Esterasen sind meist unbekannt, die Präferenzen für bestimmte Substrate können sich zwischen den verschiedenen Esterase-Klassen überschneiden [92, 160]. Nicht selten spalten Esterasen neben Carbonsäure-Estern auch Amide, Thiolester und Phosphate. Zudem können Esterspaltungen auch durch andere Hydrolasen katalysiert werden. So spaltet beispielsweise die Carbonat-Dehydratase einfache Ester [115, 160]. Versuche am isolierten Enzym zur Charakterisierung der Esterasen sind problematisch, da unbekannte Faktoren Einfluss auf die Reaktion nehmen können. Hinzu kommt, dass es von Esterasen verschiedene Isoformen gibt, die eine unterschiedliche Substratspezifität und Verteilung aufweisen können [160].

Das Vorkommen von Esterasen in Leber und Dünndarm wurde bereits untersucht [61], die Erkenntnisse über dermale Esterasen sind jedoch bislang unzulänglich [1, 22, 158]. Die Auswahl von Standardsubstanzen wie Fluorescein (FDA) und die Entwicklung von Testprotokollen können bei der umfassenden Klärung der Esteraseaktivitäten von Enzymen (z.B. der Haut) hilfreich sein.

1.4 Methodische Grundlagen der Versuche

Esteraseaktivitätsbestimmung

Das nicht fluoreszierende Fluoresceindiacetat ((6'-Acetyloxy-3-oxospiro[2-benzofuran-1,9'-xanthene]-3'-yl) acetat; FDA) wird von Esterasen in fluoreszierendes Fluorescein gespalten. Dieser Prozess ist fluorimetrisch erfassbar. Dazu werden die Fluoresceindiacetat/Fluorescein enthaltende Lösungen mit Licht ($\lambda=485\text{ nm}$) angeregt, und emittieren daraufhin Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm .

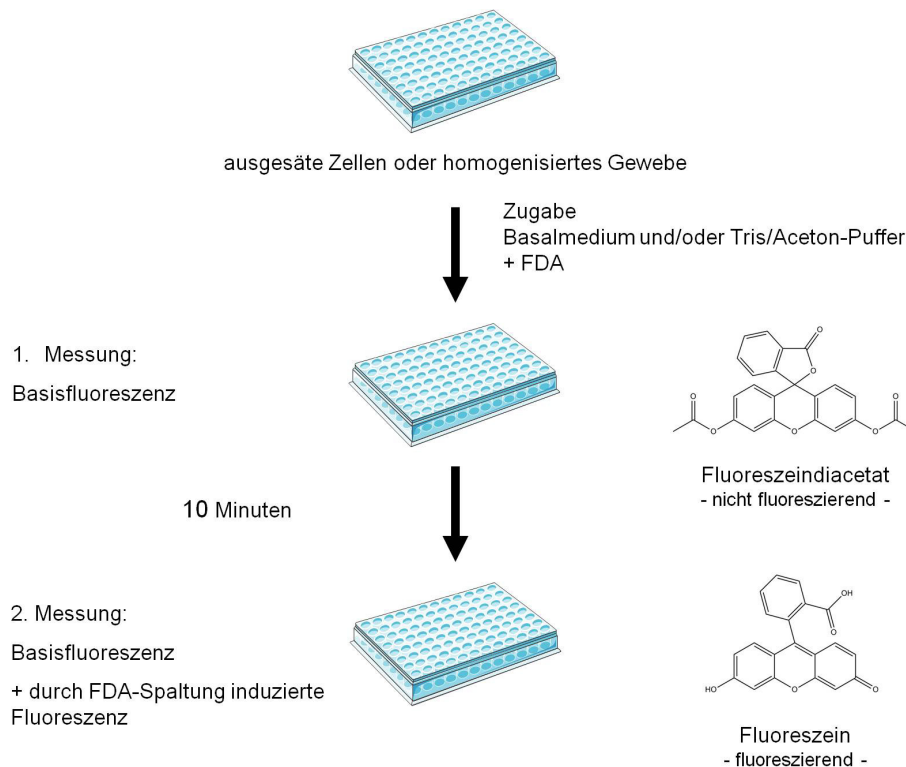


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Diese Abbildung wurde erstellt mit Servier Medical Art.

Die von der Produktkonzentration abhängige Fluoreszenzintensität kann dabei zur Kalkulation der kinetischen Parameter der Esteraseaktivität genutzt werden.

Viabilitätsuntersuchung

Bei der Esteraseaktivitätsbestimmung an Zellkulturen müssen zellschädigende und damit aktivitätsmindernde Einflüsse durch die Versuchsbedingungen ausgeschlossen - bzw. berücksichtigt - werden. Dazu eignet sich die MTT-Methode [98, 114]. Dabei wird gelbes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), das in die Zellen aufgenommen wird, durch mitochondriale Succinyldehydrogenase [98], dem NADH/NADPH-System [7] oder endosomalen/lysosomalen Enzymen (NEM-sensitive Flavinoxidasen [80] zu violetter Formazan reduziert (Abbildung 5). Formazan wird mittels der MTT-Lyse-Lösung aus den Zellen extrahiert und photometrisch quantifiziert, die Farbstoffmenge korreliert mit

der Viabilität der Zellen. Dazu wurde von Frau Anja Schwanke für den Arbeitskreis eine SOP entwickelt, welche an die Versuchsbedingungen der Esteraseaktivitätsbestimmung angepasst wurde (2.2.6, Seite 47) [137].

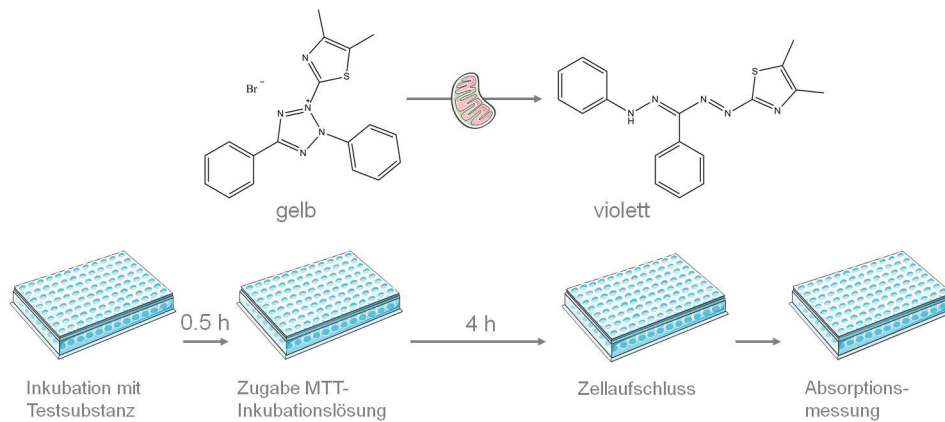


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufes der Viabilitätsuntersuchung. Diese Abbildung wurde erstellt mit Servier Medical Art.

Proteinquantifizierung

Schließlich gilt es auch hinsichtlich der Zellzahl die Ergebnisse zu normalisieren, was anhand des Proteingehaltes möglich ist. Der Bicinchoninsäure-Assay stellte eine Kombination aus Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) dar. Dabei wird Cu^{2+} durch Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Cystin in alkalischer Lösung zu Cu^+ reduziert. Cu^+ wird von BCA komplexiert, was am Farbumschlag von türkis nach violett erkennbar ist (Abbildung 6). Diese Methode wurde als Alternative zum Lowry-Assay 1985 von Smith et al. entwickelt [149].

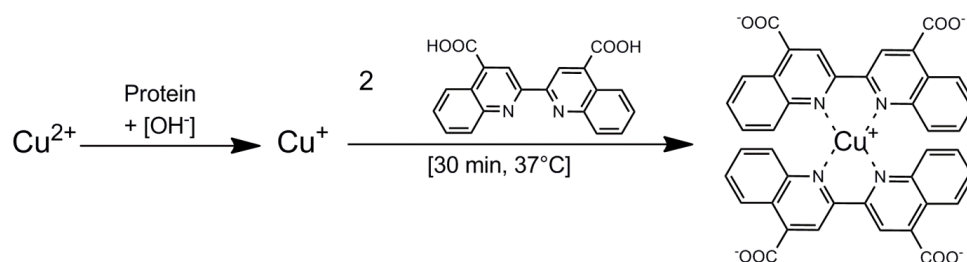


Abbildung 6: Chemische Reaktion bei der Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA).

Esteraseinhibition

Inhibitoren bieten die Möglichkeit einzugrenzen, welche Enzyme an der Umsetzung von FDA beteiligt sind. Die Auswahl der möglichen Inhibitoren erfolgte aufgrund der strukturellen Voraussetzungen, die für die Metabolisierung von Bedeutung sind. FDA (Abbildung 7) weist zwei Phenolester und eine Benzoessäurelaktonstruktur auf, welche mittels Hydrolasen (EC3) gespalten werden können.

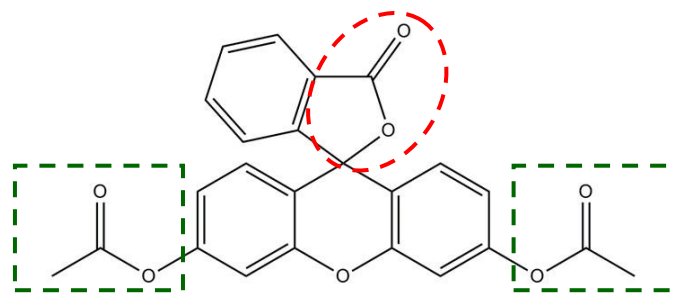


Abbildung 7: Struktur von Fluoresceindiacetat (FDA), relevante Phenolesterstrukturen (grüne Rechtecke) und Benzoessäurelaktonstrukturen (rote Elipse) herausgestellt.

Hydrolasen werden im Klassifikationssystem des NC-IUBMB in Untergruppen unterteilt. Zur Gruppe der Carboxylesterhydrolasen (EC3.1.1) gehören Enzyme, die an der Umsetzung von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein beteiligt sein könnten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Auswahl von Carboxylesterhydrolasen, typische Substrate und spezifische Inhibitoren.

Enzyme	Substrate	Inhibitoren
Carboxylesterase (EC3.1.1.1)	aliphatische Ester	Bis-(4-Nitrophenyl)-phosphat, Benzil
Arylesterase (EC3.1.1.2)	aromatische Ester	N-Ethylmaleinimid
Acetylesterase (EC3.1.1.6)	Essigsäureester	-
Acetylcholinesterase (EC3.1.1.7)	Acetylcholin	Neostigmin, Physostigmin

Zur Inhibition der Carboxylesterasen wurden ein phosphathaltiger Inhibitor (Bis-(4-Nitrophenyl)-phosphat) und ein nicht phosphathaltiger (Benzil) eingesetzt. Eine Untersuchung der Acetylerasen war aufgrund fehlender selektiver Inhibitoren nicht möglich. Darüber hinaus werden generelle Zweifel über die Existenz von Acetylerasen geäußert [160]. Acetylcholinesterase-Inhibitoren wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Dabei wurde Neostigmin für die Inhibitionsversuche mit Homogenisaten und Physostigmin für die Zellversuche verwendet, da es keine Partialladung besitzt und dadurch in die Zellen aufgenommen werden kann. Zusätzlich wurde ein unspezifischer Serinproteaseinhibitor (Phenylmethylsulfonfluorid, PMSF) zur unspezifischen Hemmung der Esterhydrolyse verwendet.

Genexpressionsuntersuchung

Die Genexpressionsuntersuchung ermöglicht es, Gene anhand ihrer typischen Gensequenzen zu identifizieren. Dadurch kann die Verteilung verschiedener Enzyme in Geweben lokalisiert und in ein quantitatives Verhältnis zu einem Gen des Grundstoffwechsels gesetzt werden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die aktuelle Rechtslage veranlasst verstärkte Bestrebungen zur Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch. Da die menschliche Haut eine wichtige Grenzfläche zur Umwelt und vielfach die erste Kontaktfläche mit Fremdstoffen darstellt, war und ist sie Objekt intensiver Untersuchungen. Ferner steht sie durch das EU-Chemikaliengesetz (REACH) und durch die neue, demnächst in Kraft tretende EU-Kosmetikverordnung im Fokus der Erforschung von Alternativmethoden zum Tierversuch. Hinsichtlich ihrer Penetrations- und Permeationseigenschaften sind einige Konstrukte gut charakterisiert, RHE: [138, 139], RHS: [2, 141]. Die Konstrukte der Humanhaut sind in den Penetrations- und Permeationseigenschaften ähnlich, aber nicht identisch. Auch die zunehmenden Erkenntnisse über dermale Metabolisierung und deren Bedeutung erfordern es, die Konstrukte mit Humanhaut zu vergleichen. Parallele Arbeiten haben gezeigt, dass sich die Expressionsmuster der Enzyme zwischen den rekonstruierten Humanhäuten unterscheiden [43, 44, 100], aber Ähnlichkeiten zur Humanhaut aufweisen [59, 110].

Aufgrund des verbreiteten Einsatzes von Estern in Dermatika war die Entwicklung einer Standardmethode zur quantitativen Bestimmung der Esteraseaktivität ein wichtiger Teilaspekt dieser Dissertation. Eine solche Methode sollte basierend auf einer breit eingesetzten, einfach quantifizierbaren Markersubstanz wie FDA zur quantitativen Bestimmung der Esteraseaktivität in rekonstruierten Geweben und Humanhaut entwickelt werden (Abbildung 4, Seite 16).

Die Methodenentwicklung erfolgte zunächst in der Zellkultur mit primären Keratinozyten und Fibroblasten. Anhand der HaCaT-Zelllinie sollte anschließend die Präzision der Methode ohne eine Beeinflussung durch die biologische Variabilität primärer Zellen überprüft werden. Des Weiteren war die Beeinflussung der Viabilität der Zellkultur durch die Versuchsbedingungen der Esteraseaktivitätsbestimmung durch ein Testverfahren wie den MTT-Test zu prüfen.

FDA weist ähnliche stoffbezogene Eigenschaften wie Prednicarbat auf (Tabelle 19, Seite 88) und könnte diesbezüglich eine Modellschubstanz sein. Daher sollten die Enzymaktivitäten der Humanhaut und der rekonstruierten Humanhaut bestimmt und anhand der FDA-Spaltung mit dem Prednicarbat-Metabolismus verglichen werden.

Einleitung

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war die Identifizierung der Esterasetypen, die am Umsatz von FDA zu Fluorescein beteiligt sind. Eine erste Eingrenzung sollte über eine Enzyminhibitionsmethode erfolgen, die es zuvor zu entwickeln und etablieren galt. Zur Sicherung der Erkenntnisse sollte eine Genexpressionsanalyse der FDA-metabolisierenden Enzyme und deren Isoformen angeschlossen werden.

Die neuen Methoden sollten in SOPs standardisiert und Partnerlaboren verfügbar gemacht werden.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

-80°C Gefrierschrank Hera freeze	Heraeus, Hanau
Akkulan 3Ti (Dermatom)	B.Braun, Melsungen
BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Brutschrank BB6220	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415D (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Elektronische Pipette (Charlotte/Ovation)	VistaLab, Brewster, New York, USA
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Heizplatten-Magnetrührer (IKA-Combimag)	IKA-Werke, Staufen
LightCycler® 480	Roche, Mannheim
Lochstanze Ø 1 cm	Bauhaus
Maßkolben (10,0 mL, 50,0 mL und 1,0 L)	Brand, Wertheim
Mettler AK160 Laborwaage	Mettler, Gießen
Mettler Toledo XS205 Analysenwaage	Mettler Toledo, Gießen
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² ; 0,1 mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Pinzetten (anatomisch/chirurgisch)	Carl-Roth, Karlsruhe
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf, Hamburg
PowerPack P25	Biometra, Göttingen
SG-Labostar 2-DI/ -UV	SG-Wasseraufbereitung + Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermoblock	Biometra, Göttingen
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
UV-Meter WPA Biowave DNA	Biochrom Ltd., Cambridge, UK

Vakuumpumpe Universal Vacuum System Plus UVS 400A	Savant, Bethesda, Maryland USA
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Heraeus pico 17	Thermo scientific, Langenselbold
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
20 mL Spritzen	B. Braun, Melsungen
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Aceton, Chromasolv Plus für HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Agarose	Carl-Roth, Karlsruhe
Benzil	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bis-(4-nitrophenyl)phosphat (BNPP)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo scientific, Schwerte
Calciumchloriddihydrat (CaCl ₂ ·H ₂ O)	Carl-Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl-Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl-Roth, Karlsruhe
Dinatriummethylen-diamintetraessigsäureacetat-dihydrat (Na ₂ EDTA-2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
DNase I, Amplification grade, AMPD1	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fluorescein (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe

Material

Fluoresceindiacetat (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in Wasser	Biotium, Hayward, Californien USA
Gelred™ Nucleic Acid Stain	Biotrend, Köln
GeneRuler 50 bp DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf; Merk, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Keratinocytenbasalmedium (KBM)	Lonza, Köln
Keratinocytenwachstumsmedium (KGM)	Lonza, Köln
konzentrierte Salzsäure	Merk, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
LightCycler 480 96-Loch Mikrotiterplatte klar (inkl. Folien)	Roche, Mannheim
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
Mikrotiterplatten 96-Loch, Flachboden, transparent	Nunc, Roskilde, Dänemark
Minimum Essential Medium Eagle (MEME)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumhydroxid Rotulli (NaOH-Rotulli)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Neostigmin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nescofilm	Carl-Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Orange G	Carl-Roth, Karlsruhe

Parafilm	VWR, Darmstadt
PBS ohne Calcium-/Magnesium-Ionen	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin (100x) -Lösung	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Phenylmethylnsulfonfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)	2.1.3, Seite 27
Physostigmin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific, Schwerte
Pipettenspitzen Eppendorf	Sarstedt, Nürnberg
Proteinase K	Carl-Roth, Karlsruhe
Quarzküvetten und Einmalküvetten	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Reservoirgefäß	VWR, Darmstadt
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nürnberg
Supplements zur Herstellung von KGM	Lonza, Köln
- boviner Hypophysenextrakt (BPE)	
- humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	
- Gentamicinsulfat	
- Hydrocortison	
- Insulin	
Thermolysin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypanblau	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio USA
Trypsin	Biochrom, Berlin

Material

Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 24-Loch, Flachboden, transparent	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten 96-Loch, Flachboden, schwarz	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten 96-Loch, Flachboden, transparent	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.3 Zellen und Kulturmedien

Tabelle 3: Zellen und Zelllinien

Zellart	Beschreibung	Bezugsquelle
NHK	Normale humane Keratinozyten	Isolation aus humaner Vorhaut
NHDF	Normale humane, dermale Fibroblasten	Isolation aus humaner Vorhaut
HepG2	Humane, kaukasische Leberzell-Karzinom-Zelllinie	European collection of cell cultures (ECACC), Salisbury (UK)
HT29	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie (ATCC HTB-38)	Prof. Gust, FU Berlin [136]
HaCaT	Humane, spontan transformierte Keratinozytenzelllinie gewonnen von 62-jährigen männliche Spender	Cell Lines Service, Eppelheim, Prof. Boukamp und Prof. Fusening [10]

Tabelle 4: Zellkulturmedien

	Basalmedium	Wachstumsmedium	Stopppmedium
NHK	KBM + hEGF + Insulin	KBM + BPE + hEGF + Gentamicin + Hydrocortison + Insulin	
NHDF	DMEM + 2 mM L-Glutamin	DMEM + 7,5% FKS + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin	DMEM + 10% FKS + 2 mM L-Glutamin + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin
HaCaT	DMEM mit hohem Glucosegehalt + 2 mM L-Glutamin	DMEM mit hohem Glucosegehalt + 2 mM L-Glutamin + 10% FKS	
HepG2	MEME + 2 mM L-Glutamin + 1% nicht essentielle Aminosäuren + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin	MEME + 2 mM L-Glutamin + 1% nicht essentielle Aminosäuren + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin + 10% FKS	

Material

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

0,2 g/L KCl
8,0 g/L NaCl
0,2 g/L KH₂PO₄
1,44 g/L Na₂HPO₄
in Reinstwasser

Die Lösung wird nach Herstellung autoklaviert.

Trypsin-EDTA-Lösung

92,59 mg/mL Trypsin
37,04 mg/mL EDTA
in PBS

Die Stammlösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung werden Aliquots mit sterilem PBS verdünnt, so dass folgende Konzentrationen erreicht werden:

1,67 mg/mL Trypsin
0,67 mg/mL EDTA
in PBS

Dispase-Lösung (10 U/mL)

10 mg/mL Dispase II
in Reinstwasser

Die Stammlösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypanblau-Lösung

4 g/L Trypanblau
in PBS

Die Stammlösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert.

EDTA-Lösung

0,5 mg/L EDTA
in PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)

EDTA wird mit einem Teil PBS gelöst, steril filtriert und mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Einfrier-Mix

800 µL/mL DMEM
100 µL/mL DMSO

100 µL/mL FKS

Transportmedium

100 U/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

in DMEM

2.1.4 Haut, Hautmodelle und Kulturmedien

Tabelle 5: Haut und Hautmodelle

Gewebeart	Beschreibung	Bezugsquelle
Humanhaut	operativ entfernte Haut aus Abdominal-/ seltener Mammabereich	Operationen der plastischen Chirurgie, Dr. von Fritschen (mit Einverständniserklärung des Patienten und genereller Erlaubnis bei der Landesärztekammer Berlin)
Humanhaut	Vorhaut juveniler Spender	verschiedene Kliniken und Praxen mit Zustimmung der Landesärztekammer Berlin
EpiDerm™	rekonstruierte humane Epidermis	MatTek®, Ashland, Massachusetts, USA
EpiDerm-FT™	rekonstruierte humane Haut	MatTek®, Ashland, Massachusetts, USA
AST2000	rekonstruierte humane Haut	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf
Phenion FT®	rekonstruierte humane Haut	Henkel AG & Co.KGaA, Düsseldorf
Normales Konstrukt (FU normal)	hausinterne rekonstruierte Humanhaut	Dr. Sarah Küchler & Dominika Henkes, Freie Universität Berlin
Filaggrin Knockdown Konstrukt (FU barrieredefizitär)	hausinternes Atopie-Modell	Dr. Sarah Küchler & Dominika Henkes, Freie Universität Berlin

Tabelle 6: Erhaltungsmedien

Gewebeart	Zusammensetzung der Medien
EpiDerm [90] EpiDerm-FT [91]	DMEM + hEGF + Gentamicin + Amphotericin B + Hydrocortison + Insulin
AST2000	definiertes Medium Die genaue Zusammensetzung ist nur dem Hersteller bekannt.
Phenion FT [®] [94]	DMEM mit Glutamax/ Ham's F12 (3:1) + BSA + Penicillin + Streptomycin + Hydrocortison + Insulin + Ascorbinsäure-2-phosphat
Hausinternes Konstrukt [74]	definiertes Medium

2.1.5 Lösungen für Esteraseaktivitätsbestimmung und Enzyminhibition

Tabelle 7: Esteraseaktivitätsbestimmung

	Tris	Fluorescein	FDA	Reinstwasser	Fluorescein-Stammlösung I	FDA-Stammlösung	Basalmedium	Aceton	Tris-Puffer
Tris-Puffer (0,1 M, pH 8,0) ^{1,2}	15,76 mg			ad 1,0 mL ³					
Fluorescein-Stammlösung I ($5 \cdot 10^{-4}$ M) ⁴		166,15 µg							ad 1,0 mL ³
Fluorescein-Stammlösung II (10^{-6} M) ⁴					2 µL				ad 1,0 mL ³
FDA-Stammlösung ($4 \cdot 10^{-2}$ M) ^{4,5}			16,65 mg					ad 1,0 mL ³	
FDA-Testlösung ($8 \cdot 10^{-5}$ M) ⁶						2 µL			ad 1,0 mL ³
Lösemittelkontrolle Zellversuche							250 µL	2 µL	ad 1 mL
Tris/Aceton ⁷								2 µL	ad 1 mL

¹ Der pH wird mittels NaOH Rotuli zur Vermeidung von Verdünnungseffekten auf 8,0 eingestellt.

² Die Lösung wird steril filtriert und aliquotiert und bei -80°C gelagert.

³ Für die Herstellung der Lösung wird ein Maßkolben verwendet.

⁴ Die Lösung wird bei -80°C gelagert und maximal vier Wochen verwendet.

⁵ Das Lagerungsgefäß wurde zusätzlich mittels Parafilm zur Minimierung von Lösemittelverdunstung verschlossen.

⁶ Die Lösung wird kurz vor Versuchsbeginn hergestellt, um die spontane Esterhydrolyse zu minimieren.

⁷ = Lösemittelkontrolle der Fluoresceinstandardkonzentrationen der Homogenisationsversuche

Tabelle 8: Verdünnungsschema für die Fluorescein-Standardkurve

	Verdünnungen	Endkonzentration		Verdünnungen	Endkonzentration
Stammlösung I	1:2	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	Stammlösung II	1:2	$5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
	1:5	10^{-4} M		1:4	$2,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
	1:10	$5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$		1:10	10^{-7} M
	1:50	10^{-5} M		1:20	$5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$
	1:100	$5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$		1:40	$2,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$
	1:500	10^{-6} M		1:100	10^{-8} M

Die Lösungen werden in 2 mL Reaktionsgefäßen hergestellt.

Tabelle 9: Inhibitorlösungen

	BNPP	PMSF	NEM	Neostigmin	Neostigmin-Stammlösung	Aceton	Tris
BNPP-Lösung (0,2 M)	68,04 mg					ad 1 mL	
PMSF-Lösung (0,2 M)		34,84 mg				ad 1 mL	
NEM-Lösung (0,2 M)			25,03 mg			ad 1 mL	
BNPP/PMSF-Lösung (je 0,2 M)	68,04 mg	34,84 mg				ad 1 mL	
BNPP/PMSF/NEM-Lösung (je 0,2 M)	68,04 mg	34,84 mg	25,03 mg			ad 1 mL	
BNPP/NEM-Lösung (je 0,2 M)	68,04 mg		25,03 mg			ad 1 mL	
Neostigmin-Stammlösung (0,1 M)				30,32 mg			ad 1 mL
Neostigmin-Lösung (0,2 mM)					2 μL	ad 1 mL	

Spüllösungen für den FLUOstar Optima

- Spüllösung 1 gesättigte NaOH-Lösung
- Spüllösung 2 Reinstwasser
- Spüllösung 3 70% Ethanol

2.1.6 Lösungen für MTT, Zellyse und Proteinbestimmung

MTT-Lösung

- 5 mg/mL MTT
- in PBS

Die Lösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

MTT-Inkubationslösung

- 75 µL/mL MTT-Lösung
- in Basalmedium

MTT-Lyse-Lösung (zum Herauslösen von Formazan aus den Zellen)

- 0,1 g/mL SDS
- 6 µL/mL 10% Essigsäure
- 994 µL/mL DMSO

Bovines Serum Albumin Standard-Kurve (Proteinreferenz für die Proteinquantifizierung)

Tabelle 10: Albuminstandard-Verdünnung nach Herstellerangabe

BSA-Stammlösungen [µg/mL]	Tris/ Aceton- Zugabe [µL]	BSA-Zusatz [µL] (Herkunft)
2000	—	300 (2000 µg/mL Stammlösung)
1500	125	375 (2000 µg/mL Stammlösung)
1000	325	325 (2000 µg/mL Stammlösung)
750	175	175 (1500 µg/mL Stammlösung)
500	325	325 (1000 µg/mL Stammlösung)
250	325	325 (500 µg/mL Stammlösung)
125	325	325 (250 µg/mL Stammlösung)
25	400	100 (125 µg/mL Stammlösung)
—	400	—

Material

0,5% Natriumdodecylsulfat-Lösung (für Proteinbestimmung)

5 mg/mL SDS
in Reinstwasser

Quantifizierungslösung für die Proteinbestimmung

20 µL/mL 4%ige Kupfersulfat-Lösung
980 µL/mL BCA Reagenz (Bicinchoninsäure)

2.1.7 Lösungen für die Genexpressionsuntersuchungen

DEPC-Wasser

1 µL/mL DEPC
in Reinstwasser

Die Lösung wird in einer Glasflasche hergestellt. Die Flasche wird gut verschlossen und kräftig geschüttelt. Für die Inaktivierung von RNasen wird sie über Nacht unter einem Abzug gestellt. Anschließend werden letzte Spuren von DEPC beseitigt (Zerfall in CO₂, H₂O, Ethanol), indem die Flasche autoklaviert wird.

Thermolysin-Reaktionspuffer

2,46 mg/mL KCl
2,92 mg/mL NaCl
0,74 mg/mL CaCl₂·H₂O
2,383 mg/mL HEPES
in DEPC-Wasser

Die Lösung wird steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Thermolysin-Lösung

0,5 mg/mL Thermolysin
in Thermolysin-Reaktionspuffer

0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0

186,12 mg/mL Na₂EDTA-2H₂O
in DEPC-Wasser

Na₂EDTA-2H₂O wird mit einem Teil DEPC Wasser gelöst. Anschließend wird mit NaOH Rotuli der aus pH 8,0 eingestellt. Das Gemisch wird mit dem restlichen DEPC-Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

TBE-Puffer (10x)

108 mg/mL Tris-Base
55 mg/mL Borsäure
40 µL/mL 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0
in DEPC-Wasser

Tris-Base und Borsäure werden mit einem Teil DEPC Wasser gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0. Das Gemisch wird anschließend mit dem restlichen DEPC-Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

0,15 M Tris-Puffer pH 7,6

18,17 mg/mL Tris-Base
in DEPC-Wasser

Tris-Base wird mit einem Teil DEPC Wasser gelöst. Anschließend wird mit konzentrierter Salzsäure der pH auf 7,6 eingestellt. Das Gemisch wird mit dem restlichen DEPC-Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Ladepuffer (6x)

3,6 mg/mL Orange G
0,6 g/mL Glycerol
in 0,15 M Tris-Puffer pH 7,6

Gel-Färbelösung

0,2 µL/mL GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in Wasser
in Reinstwasser

0,01 M Tris-Puffer pH 7,5

1,21 mg/mL Tris-Base
in DEPC-Wasser

Tris-Base wird mit einem Teil DEPC Wasser gelöst. Anschließend wird mit konzentrierter Salzsäure der pH auf 7,5 eingestellt. Das Gemisch wird mit dem restlichen DEPC-Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

70% Ethanol (V/V)

772,7 µL/mL 96% Ethanol
227,3 µL/mL DEPC-Wasser

1% Agarose-Gel

10 mg/mL Agarose
in TBE-Puffer (1x)

Das Gemisch wird erhitzt, bis der gebildete Schaum verschwunden ist.

Material

2% Agarose-Gel

20 mg/mL Agarose
in TBE-Puffer (1x)

Das Gemisch wird erhitzt, bis der gebildete Schaum verschwunden ist.

NucleoSpin® RNA II Lyse-Puffer

10 µL/mL β-Mercaptoethanol
in NucleoSpin® RNA II RA1 Puffer

PCR-Mastermix

62,5 µL/mL Primer_f (Vorwärtsprimer)
62,5 µL/mL Primer_r (Rückwärtsprimer)
625 µL/mL SYBR Green I Mix
in PCR-Wasser

Der PCR-Mastermix wird in Abhängigkeit der zu untersuchenden Probenanzahl hergestellt, wobei ein Überschuss zum Ausgleich von Messungenauigkeiten vonseiten der Pipette (meist in Form einer zusätzlichen Probe) zu berücksichtigen ist. Die Lösungen werden stets auf Eis und unter Lichtschutz gelagert.

2.1.8 Programme und Internetseiten

Tabelle 11: Software und online verfügbare Programme

Programm/ Datenbanken	Anbieter	Anwendung
Excel	Microsoft	Datenauswertung
Prism 5.04	GraphPad	Datenauswertung
Grubbs test free web calculator http://www.graphpad.com/quickcalcs	GraphPad	Ausreißertest nach Grubbs
FLUOstar Optima Software V2.10 R7	BMG Labtech	Datengenerierung
LightCycler® 480 Software	Roche	PCR-Analytik
Brenda http://www.brenda-enzymes.org/index.php4	TU- Braunschweig	Enzymdatenbank
Gendatenbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene	NCBI	Primergenerierung
ChemBioDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft	Zeichnen von Strukturformeln
Servier Medical Art http://www.servier.de/medicalart/	Servier Deutschland GmbH	Graphikbausteine zum Erstellen von Abbildungen

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur humaner Zellen

Die Isolation von primären humanen Zellen aus humanem Gewebe erfolgte basierend auf standardisierten Arbeitsanweisungen von Frau Hannelore Gonska [39].

normale humane Keratinozyten (NHK)

Die primären Keratinozyten (NHK) werden aus juveniler Vorhaut isoliert. Bei Ankunft der Vorhaut nach bis zu 36 Stunden seit Entnahme wird das Transportmedium nach entfernt, die Haut zweimal mit PBS gewaschen und in 1:10 mit PBS verdünnter Dispase-Lösung nach dem Zerteilen mit einem Skalpell in kleine, maximal 9 mm² große Stücke 20-21 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend werden in PBS und mit Hilfe von Pinzetten Epidermis und Dermis getrennt und mit PBS gewaschen. Die Epidermis wird in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt und mit 4 mL einer 1:2 Verdünnung der gebrauchsfertigen Trypsin-EDTA-Lösung circa 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Indikator für das Herauslösen von Zellen aus dem Zellverband wird die Trübung der Lösung unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Beenden der Reaktion durch Zugabe von 5 mL Stopp-Medium werden die Suspension 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert, unter PBS-Zugabe gewaschen und durch nochmaliges Zentrifugieren die Zellen abgetrennt und in 5 mL Keratinozytenwachstumsmedium (KGM) aufgenommen. Die fertige Zellsuspension wird in große Zellkulturflaschen (75 cm²) aufgeteilt und zusammen mit 12 mL Wachstumsmedium und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

normale humane dermale Fibroblasten (NHDF)

Primäre dermale Fibroblasten (NHDF) werden aus juveniler Vorhaut isoliert, indem die unzerkleinerte Vorhaut 24 Stunden in gebrauchsfertiger Trypsin-EDTA-Lösung eingelegt wird. Durch Schwenken werden vor dem Entfernen des Hautstückes aus der Zellsuspension lose/leicht anhaftende Zellen der Haut abgelöst. Zur Kultivierung dient Fibroblastenwachstumsmedium.

Passagierung

Sobald die Zellen Konfluenz in der Zellkulturflasche erreichen, werden sie mit 10 mL PBS gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung, werden 1,5 mL Trypsin-EDTA-Lösung pro Flasche zu den Zellen zugegeben und diese zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden maximal 3 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. EDTA komplexiert Calciumionen, welche ein wichtiger Kofaktor bei der Ausbildung

von Zell-Zell-Kontakten sind [51]. Die Reaktion wird durch Zugabe von 8,5 mL Stopp-Medium pro Flasche beendet und die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wird anschließend einmal mit 10 mL PBS gewaschen. Die mit der Waschlösung vereinigte Zellsuspension wird im 50 mL Zentrifugenröhrchen 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min zentrifugiert, das Pellet disaggregiert und zur vollständigen Entfernung von Trypsin/EDTA-Resten mit 10 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min bei 1000 Umdrehungen/min). Die Zellen aus dem in Wachstumsmedium resuspendierten Zellpellet werden neu eingesät und die Passagezahl der Zellen auf dem Zellkulturgefäß vermerkt. Zum Erhalt optimaler Kulturbedingungen wird alle 2-3 Tage das Medium in den Zellkulturflaschen durch frisches Medium ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird vor dem Aussäen der Zellen in Zellkulturplatten bestimmt. Dazu werden 10 µL der 1:2 mit Trypanblau-Lösung verdünnten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die nicht gefärbten (lebenden) Zellen in allen vier Quadranten der Zahlkammer gezählt und der Mittelwert für die Berechnung der Zellzahl ermittelt. Dabei ist der Verdünnungsfaktor von 2 mit in die Berechnungen einzubeziehen.

Besonderheit beim Passagieren der HaCaT Zelllinie

Die Zellen werden in großen Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 75 cm²) unter Standardbedingungen (bei 37°C und 5% CO₂) mit HaCaT-Wachstumsmedium kultiviert. HaCaT Zellen müssen vor dem Passagiervorgang mit 10 mL PBS/EDTA-Lösung gewaschen werden. Nach Entfernen der Waschlösung werden die Zellen 10 Minuten mit 10 mL PBS/EDTA-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ präinkubiert, um die Desmosomen (Zell-Zell-Verbindungen) zu lösen und zweiwertige Kationen abzufangen (gemäß CLS Anweisungen zum Umgang mit HaCaT Zellen).

2.2.2 Handhabung humaner Haut und rekonstruierter Gewebe

Humanhaut

Anhaftendes Fett von Brust- bzw. Bauchhaut wird mit Hilfe von Skalpell und anatomischer Pinzette abgetrennt und die nahezu fettfreie Haut in Tücher eingeschlagen, gekühlt zum Institut transportiert und dort mit PBS gereinigt, um sie von Blut und anderen Verunreinigungen zu befreien. In Aluminium-Folie eingeschlagen ist die Haut bei -20°C kryokonserviert für Penetrationsversuche maximal sechs Monate verwendbar [135].

Konstrukte

Die rekonstruierten Gewebe werden nach Herstelleranweisung behandelt. Nach Ankunft am Institut werden die Konstrukte in Zellkulturgefäße mit Medium umgesetzt und über Nacht äquilibriert. Eine Stunde vor Versuchsbeginn erfolgt ein Mediumwechsel, das alte Medium wird zur Qualitätskontrolle (Bestimmung der LDH- und IL-8-Freisetzung) aufbewahrt.

Gewebehomogenisierung

Die Homogenisierung von Haut und Konstrukten erfolgt in gekühlten Teflonhalterungen (zur Kompensation entstehender Aufschlusswärme) der Kugelschwingmühle TissueLyser II. Das Gewebe wird zusammen mit einer Stahlkugel (\varnothing 5 mm) in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Zugabe von 500 μ L Tris/Aceton homogenisiert (Tabelle 12). Anschließend werden dem Homogenisat 1000 μ L Tris/Aceton-Lösung hinzugefügt und der Gesamtansatz für 5 Sekunden geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Zur Feststoffseparation dient eine 10 minütige Zentrifugation bei 9000x g in einer gekühlten Zentrifuge. Der Zentrifugationsüberstand wird im weiteren Verlauf für die Esteraseaktivitätsbestimmung genutzt.

Tabelle 12: Aufschlussparameter

	Humanhaut	Phenion FT	1: EpiDerm, 2: EpiDerm-FT, 3: AST2000	hausinterne Konstrukte (normal/ barriere-defizitär)
Gewebegröße [cm ²]	0,785	1,3	1: 0,63 2: 1 3: 0,6	0,785
Schwingungs- frequenz [Hz]	30	25	25	25
Homogenisations- dauer [min]	12	7	2	1
Besonderheiten	Aufschluss- verbesserung durch Schock frieren in flüssigen Stickstoff für einige Minuten	Abgießen überschüssige n Mediums nach Überführung in 2 mL Gefäß	Herauslösen Inserts mittels Skalpell	Ausstanzen aus einem großen Zell-kulturplatten- einsatz

2.2.3 Grundlage der Esteraseaktivitätsmessung, Testprotokolle für den FLUOstar

Vor Beginn jeder Messung werden die Platten im FLUOstar 5 Sekunden lang gerüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung der in die Vertiefungen pipettierten Lösungen zu erreichen. Die Wartezeit nach einem Positionswechsel der Platte, bis das Plattenlesegerät mit der Einzelmessung beginnt, beträgt 0,5 Sekunden (gemäß Benutzerhandbuch des FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg).

Tabelle 13: Testprotokolle für die Messungen am FLUOstar

Testprotokoll	Einsatzbereich	Beschreibung
Testprotokoll 1	Einspritzen Tris/Aceton	<ul style="list-style-type: none">- Zugabe Tris/Aceton-Lösung in Hydrolyse- und Untersuchungsvertiefungen- „Well-mode“- mit Pumpe 2- Injektionsgeschwindigkeit 420 $\mu\text{L/s}$- Startzeitpunkt 0 Sekunden- Bestrahlung pro Intervall: 0- Anzahl Intervalle: 1- Leserichtung: spaltenweise
Testprotokoll 2	Basal- fluoreszenz- messung	<ul style="list-style-type: none">- Zugabe FDA in Hydrolyse- und Untersuchungsvertiefungen zum Zeitpunkt null- Fluoreszenzmessung- „Well-mode“- mit Pumpe 1- Injektionsgeschwindigkeit 420 $\mu\text{L/s}$- Startzeitpunkt nach 2 Sekunden- Bestrahlungen pro Intervall: 10- Anzahl Intervalle: 20- Anregungswellenlänge 485 nm- Emissionswellenlänge 520 nm- Leserichtung: spaltenweise
Testprotokoll 3	End- fluoreszenz- messung	<ul style="list-style-type: none">- Messung der Fluoresceinfluoreszenz etwa 10 Minuten nach FDA-Zugabe- Fluoreszenzmessung- „Well-mode“- ohne Pumpe- Startzeitpunkt nach 2 Sekunden- Bestrahlungen pro Intervall: 10- Anzahl Intervalle: 20- Anregungswellenlänge 485 nm- Emissionswellenlänge 520 nm- Leserichtung: spaltenweise

Fortsetzung Tabelle 13: Testprotokolle für die Messungen am FLUOstar

Testprotokoll 4	Viabilitätsmessung	<ul style="list-style-type: none"> - Quantifizierung der Formazanbildung - Absorptionsmessung - Startzeitpunkt null Sekunden - Bestrahlung pro Intervall: 20 - Anzahl Intervalle: 1 - Absorptionswellenlänge 540 nm (Filter 550-10 nm) - Leserichtung: beliebig
Testprotokoll 5	Zugabe Arbeitslösung für Proteinbestimmung	<ul style="list-style-type: none"> - Zugabe Arbeitslösung für die Proteinbestimmung - „Plate-mode“ - mit Pumpe 1 - Injektionsgeschwindigkeit 360 µL/s - Startzeitpunkt 2,5 Sekunden - Bestrahlung pro Intervall: 0 - Anzahl Intervalle: 1 - Leserichtung: beliebig
Testprotokoll 6	Proteinquantifizierung	<ul style="list-style-type: none"> - Proteinquantifizierung - Absorptionsmessung - „Plate-mode“ - Startzeitpunkt null Sekunden - Bestrahlung pro Intervall: 20 - Anzahl Intervalle: 1 - Absorptionswellenlänge 550-10 nm - Leserichtung: beliebig

2.2.4 quantitative Esteraseaktivitätsbestimmung

Versuchsvorbereitung

Vor Versuchsbeginn wird die Haut (frisch oder aufgetaut) mit einem Dermatom (Acculan3Ti) auf eine Schichtdicke von 500 µm getrimmt. Dazu wird die Haut über Blumensteckschaum mit Pinnadeln fixiert. Aus den dermatomisierten Stücken wurden 0,79 cm² große Proben mit einer geschärften Lochstanze (∅ 1 cm) entnommen.

Quantifizierung der FDA-Hydrolyse

Die Messung erfolgt in schwarzen 96-Loch Platten und erfordert die programmgesteuerte Zugabe des Esterasesubstrates (Tabelle 14, Seite 43). Das Medium der 24 Stunden zuvor in 200 µL Wachstumsmedium (mittels einer 8-Kanal-Pipette) ausgesäten Zellsuspensionen (Keratinozyten und HaCaT Zelllinie 15000 Zellen pro 200 µL, Fibroblasten 30000 Zellen pro 200 µL) wird entfernt und durch 50 µL Basalmedium ersetzt (Abbildung 8, Reihe F und G). Je 200 µL der Lösungen für die Fluorescein-Standardkurve (Tabelle 8, Seite 32) werden im Duplett in aufsteigender Konzentrationsreihenfolge manuell in eine schwarze 96-Loch-Zellkulturplatte gegeben (Abbildung 8, Reihe B und C) und die entsprechende

Methoden

Lösemittelkontrolle als Triplet (Abbildung 8, Reihe A). In die für die Hydrolysekontrolle vorgesehenen Vertiefungen werden jeweils 50 µL Basalmedium gefüllt (Abbildung 8, Reihe D und E). Die Vertiefungen für die Autofluoreszenz der Zellen und die dazugehörigen zellfreien Kontrollvertiefungen werden mit je 200 µL Basalmedium gefüllt (Abbildung 8, Reihe A).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standardkurven-Lösemittelkontrolle; Autofluoreszenz, -kontrolle											
B	Fluorescein-Standardkurve in absinkender Reihenfolge ($2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M} \rightarrow 10^{-8} \text{ M}$)											
C												
D	Hydrolysekontrolle mit absinkender Reihenfolge Fluoresceindiacetat- Testlösung ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M} \rightarrow 10^{-6} \text{ M}$)											
E												
F	Untersuchungsreihen mit absinkender Reihenfolge Fluoresceindiacetat- Testlösung ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M} \rightarrow 10^{-6} \text{ M}$)											
G												
H	leer											

Abbildung 8: Belegungsschema einer 96-Loch-Platte für die Esteraseaktivitätsbestimmung.

Über das Pumpensystem des FLUOstars werden die unterschiedlichen Volumina von Tris-Puffer mit Acetonzusatz (Tabelle 13 (Seite 40): Testprotokoll 1; Tabelle 14) und FDA-Testlösung (Tabelle 13 (Seite 40): Testprotokoll 2; Tabelle 14) mit einem Gesamtapplikationsvolumen von 150 µL in die Vertiefungen der 96-Loch-Platte injiziert. Daraus ergibt sich ein Endvolumen von 200 µL pro Vertiefung in allen genutzten Vertiefungen.

Tabelle 14: Applikationsschema für Esterasesubstrat (FDA). Verdünnungen aus der FDA-Standardlösung bezogen auf Gesamtvolumen von 200 µL in der Vertiefung.

	Verdünnungen von FDA- Untersuchungslösung	Endkonzentration von FDA in der Vertiefung
Esterasesubstrat	3:4	$6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	9:16	$4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	3:8	$3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	3:16	$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	1:8	10^{-5} M
	9:80	$9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	3:32	$7,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	3:40	$6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	9:160	$4,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	3:80	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	3:160	$1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	1:80	10^{-6} M

Besonderheiten bei der Durchführung mit Gewebehomogenisaten

Bei der Untersuchung von Gewebehomogenisaten werden in die Vertiefungen für die Untersuchungsreihen (Abbildung 8, Seite 42, Reihe F und G) und für die Ermittlung der Autofluoreszenz (Abbildung 8, Seite 42, Reihe A) jeweils 50 µL des Gewebehomogenisates eingebracht (anstelle der 50 µL Basalmedium für die Versuche mit Zellen). Die Löcher für die Hydrolysekontrolle (Abbildung 8, Seite 42, Reihe D und E) werden im Rahmen der Tris/Aceton-Lösungszugabe (Tabelle 13 (Seite 40): Testprotokoll 1), als Ersatz für die 50 µL Basalmedium mit 50 µL Tris/Aceton gefüllt, um das Endvolumen von 200 µL pro Vertiefung zu erreichen.

Messanordnung, -reihenfolge und -zeitpunkt

Die A-Reihe der 96-Loch-Platte (Abbildung 8, Seite 42) wird für die Kontrollen der Leerwerte der Fluorescein-Standardkurve und Zellen in Basalmedium oder Homogenisat in Puffer genutzt. Zusammengehörende Proben der Reihen B bis G werden auf der 96-Loch-Platte entsprechend der Leserichtung des Plattenlesegerätes vertikal untereinander angeordnet. Dadurch kann eine vernachlässigbare

Zeitdifferenz von etwa sechs Sekunden (etwa 1% von der Gesamtversuchsdauer) zwischen den Probenpaaren erreicht werden.

Die Messungen erfolgen immer von den höchsten zu den niedrigsten Konzentrationen, um zufällig auftretende Fehler frühzeitig erkennen und gegebenenfalls beheben zu können. Die Fluoreszenzintensität der Leerwertkontrolle als erste Station einer jeden Messung ermöglicht Anzeichen für fehlerhafte Messergebnisse in Form einer erhöhten Basalfluoreszenz zu identifizieren, die durch Prüfung der Fluoreszenzintensität der höchsten Fluorescein-Standardkonzentration verifiziert oder falsifiziert werden können. Ein Messabbruch zu diesem Zeitpunkt verhindert ein komplettes Verwerfen des gesamten Versuches. Ferner kann dadurch vor der entscheidenden Messphase inklusive Esterasesubstratinjektion festgestellt werden, ob die Fluoreszenzdetektion im erwarteten Meßbereich liegt.

Mit der Herstellung der FDA-Testlösung mit Tris/Aceton startet die spontane Esterhydrolyse. Als Messparameter wird daher der Anstieg der Fluoresceinkonzentration (gemessen als Veränderung der Fluoreszenzintensität) gewählt und eine vergleichende Messung zu zwei Zeitpunkten wird erforderlich. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, den Zeitpunkt der ersten Messung und das Intervall zwischen den Messungen zu optimieren. Gemäß Michaelis und Menten [143] wird für die Enzymaktivitätsbestimmung die Anfangsumsatzgeschwindigkeit der Reaktion benötigt. Daher soll der zweite Messpunkt möglichst nahe am Ersten liegen. Der Zeitrahmen von 10 Minuten trägt den Möglichkeiten des FLUOstars bei der Rastergeschwindigkeit Rechnung.

Messdurchführung

Die mit Standardkurve, Basalmedium und Kontrollen befüllte Platte wird in den FLUOstar eingesetzt und die Pumpe 2 für die Injektion von Tris/Aceton-Lösung vorbereitet. Anschließend wird Testprotokoll 1 gestartet (Tabelle 13, Seite 40), bei dem Tris/Aceton-Lösung in die Reihen D bis G injiziert wird. Parallel dazu werden 10,0 mL Fluoresceindiacetat-Testlösung hergestellt.

Sobald Testprotokoll 1 (Tabelle 13, Seite 40) beendet ist, wird Pumpe 1 mit 1500 µL der Fluoresceindiacetat-Testlösung gespült und für die Applikation vorbereitet. Vor dem Start von Testprotokoll 2 (Tabelle 13, Seite 40: Zugabe FDA und Messung Basalfluoreszenz) wird die maximale Fluoreszenzintensität überprüft und die Sensitivität des Photomultiplier der Detektionsoptik auf 95% der vorgegebene Messobergrenze von 65000 relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) bei der höchsten Konzentration der Fluorescein-Standardkurve justiert. Ist der Wert <65000 rfu, kann die Messung beginnen. Während des folgenden Versuchs werden die

Fluoreszenzwerte über das „current state overview“ verfolgt. Überschreiten die ersten drei Fluoreszenzmesswerte (Spalte 1, Reihe A bis C) den Messbereich von 65000 rfu, kann die Messung ohne ein Verwerfen des Versuches abgebrochen und neu gestartet werden. Häufigste Ursache dafür ist eine Verunreinigung der Messoptik, die daher mit 70% Ethanol zu reinigen ist.

Nach Abschluss der Messung der Basalfluoreszenz (circa 10 Minuten nach der ersten FDA-Zugabe) (Tabelle 13, Seite 40: Testprotokoll 2) schließt sich die Messung der Fluoreszenzentwicklung nach FDA-Spaltung (Tabelle 13, Seite 40: Testprotokoll 3) an. Vor dem Start dieser Messung wird wieder die Fluoreszenzintensität der höchsten Konzentration der Fluorescein-Standardkurve überprüft und ggf. die Sensitivität des Photomultipliers der Detektionsoptik auf 95% der Messobergrenze von 65000 rfu justiert.⁸

Auswertung

Die Auswertung erfolgt unter Einsatz einer Kombination aus FLUOstar Optima Software V2.10 R7, Microsoft Excel und Graphpad Prism 5.04. Aus den in Excel übertragenen Rohdaten der Fluoreszenzmessungen (Tabelle 13, Seite 40: Testprotokolle 2 und 3) werden die Mittelwerte für die weiterführende Analyse der FDA-Hydrolyse berechnet. Aus den Rohdaten wird die Nachweisgrenze (NWG) ermittelt. Dazu wird dem gemittelten Wert der Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve (NA) dessen dreifache Standardabweichung hinzuaddiert (Gleichung 1, Seite XI). Die Berechnung erfolgt für jede Platte individuell. Mittelwerte der Rohdaten unterhalb dieser Grenze bleiben bei der Auswertung unberücksichtigt. Dabei können auch einzelne Messwerte der Hydrolysekontrolle oder der Untersuchungsreihen unter der Nachweisgrenze liegen. Die kompletten Messwertepaare aus Hydrolysekontrolle und Untersuchungswert der gleichen FDA-Konzentration werden unter diesen Voraussetzungen von der Berechnung ausgeschlossen. An die Messwerte der Fluorescein-Standardkurve und die Daten der enzymatischen Spaltung von FDA (eS; Gleichung 5, Seite XI) werden mit der Bestimmungsgrenze (Gleichung 2, Seite XI) höhere Anforderungen gestellt, da sie der Quantifizierung der Fluoreszenzentwicklung dienen.

Der Verlauf der Fluorescein-Standardkurve ergibt sich in Analogie zu einer zweiphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion (Gleichung 3, Seite XI), die mittels GraphPad Prism 5.04 erstellt wird.

⁸ Diese nochmalige Anpassung der Messobergrenze wird in 4.1.2 Esteraseaktivitätsbestimmung (Seite 82f) kritisch zu hinterfragen sein.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der Untersuchungsreihen (XY) erfolgt in einer Excel-Vorlage unter Abzug der jeweils zugehörigen zellfreien Kontrolle (BY) zur Korrektur der nicht-enzymatischen Esterhydrolyse. Ferner wird die Autofluoreszenz von Geweben oder Medien mit entsprechenden Kontrollen berücksichtigt (CA), sofern diese Werte - im Ausnahmefall - die Nachweisgrenze überschreiten (Gleichung 4, Seite XI).

So wird für beide Messungen (Basalfluoreszenz und Fluoreszenzmessung 10 Minuten nach FDA-Zugabe) verfahren. Anschließend werden die korrigierten Fluoreszenzmesswerte mit den dazugehörigen Konzentrationen in eine neue Arbeitsmappe übertragen und die Basalfluoreszenz (1. Messung, $XY_{\text{korrr},t_1} = 0$) von der Fluoreszenzintensität 10 Minuten nach FDA-Zugabe (2. Messung, XY_{korrr,t_2}) subtrahiert. Die Differenz gibt die enzymatische Spaltung von FDA (eS) wieder (Gleichung 5, Seite XI). Anhand der Differenz kann über GraphPad Prism 5.04 mittels Standardkurven-Interpolation die umgesetzte Menge an FDA ermittelt und in Excel für weiterführende Berechnungen übertragen werden. Messwerte außerhalb der Standardkurven werden von den Berechnungen ausgeschlossen.

Die Umsatzgeschwindigkeit (Mol pro Liter pro Minute) wird unter Berücksichtigung der zeitlichen Differenz (in Minuten) der beiden Fluoreszenzintensitätsmessungen berechnet (Gleichung 6, Seite XI) und mittels GraphPad Prism 5.04 eine Auswertung mit Hilfe einer allosterischen Sigmoidalkurve (Hill-Modell; Gleichung 7, Seite XI) vorgenommen. Der $s_{0,5}$ -Wert (Gleichung 8, Seite XII) ergibt sich über Formelumformung und wird mit wichtigen anderen Kenndaten (v_{max} -Wert, h (Hill-Koeffizient), r^2 (Bestimmtheitsmaß der Kurvenanpassung), R_s (Kooperativitätsindex, Gleichung 9, Seite XII) dokumentiert.

Der Kooperativitätsindex (R_s) wird mittels Gleichung 9 (Seite XII) berechnet, wobei $[S]_{0,9}$ die Substratsättigung bei 90% Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf v_{max} und $[S]_{0,1}$ die bei 10% darstellt. $R_s < 81$ weist auf einen Hill-Koeffizienten (h) >1 , daher auf eine positive Kooperativität hin, $R_s > 81$ auf einen Hill-Koeffizienten (h) <1 und daher auf eine negative Kooperativität.

2.2.5 Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure

Mit dieser Methode sollte der Proteingehalt von Zelllysaten sowie von Gewebehomogenisaten quantifiziert werden.

Nach der Bestimmung der Esteraseaktivität werden alle Flüssigkeiten aus der schwarzen 96-Loch-Platte entfernt, in jede Vertiefung mit Zellen 60 μL 0,5% SDS-pipettiert und die Platte 10 Minuten bei 600 Umdrehungen/min gerüttelt. Da der Proteingehalt einer einzelnen

zellenenthaltenden Vertiefung gerade bei den Fibroblasten sehr gering war und einer hohen Streuung unterlag, wurden die Zellysate einer Versuchsplatte vereinigt und der durchschnittliche Proteingehalt bestimmt.

Zur Ermittlung des Proteingehaltes von Homogenisaten werden 30 μL des Zentrifugationsüberstandes (2.2.2, Seite 38) entnommen und 1:2 mit Tris-Puffer verdünnt.

Anschließend wird gemäß dem Pierce BCA Protein Assay Kit Protokoll weiter vorgegangen. Die BSA-Standardlösungen werden gemäß Tabelle 10 (Seite 33) hergestellt und je 25 μL davon im Triplet in die Vertiefung einer transparenten 96-Loch-Platte pipettiert. 25 μL des verdünnten Homogenisatüberstandes und/oder des Zellysates werden im Duplett in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die Quantifizierung erfolgt gemäß Testprotokoll 5 (Tabelle 13, Seite 40) im FLUOstar. Jeweils 200 μL der Quantifizierungslösung für die Proteinbestimmung werden automatisch in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die Platte wird aus dem Gerät entnommen und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgt gemäß Testprotokoll 6 (Tabelle 13, Seite 40), nachdem die Platte nach Ablauf der Inkubation zunächst einige Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt ist.

2.2.6 Viabilitätsuntersuchungen

NHK und HaCaT werden in einer Dichte von $4,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ($1,5 \cdot 10^4$ Zellen/200 μL) in eine transparente 96-Loch-Zellkulturplatte 24 Stunden vor Versuchsdurchführung ausgesät. NHDF werden in einer Dichte von $9 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ($18 \cdot 10^4$ Zellen/1000 μL) in eine transparente 24-Loch-Zellkulturplatte einen Tag vor Versuchsbeginn eingesät. Am Versuchstag werden Basalmedium und DMSO als Negativkontrolle und Positivkontrolle (als Triplet) in die vorgesehenen Vertiefungen mit Zellen appliziert. Nach der Inkubation mit Esterasesubstrat über 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂, werden sämtliche Flüssigkeiten auf der Platte durch Ausschütten und Ausklopfen (kein Absaugen, um den Zellverlust zu verringern) vollständig entfernt und durch 200 μL MTT-Inkubationslösung ersetzt. Die Platten werden mit Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend werden die MTT-Inkubationslösung entfernt, mittels 150 μL MTT-Lyse-Lösung das entstandene Formazan 5 Minuten unter Schütteln bei 300 Umdrehungen/min gelöst und mittels Testprotokoll 4 (Tabelle 13, Seite 40) im FLUOstar quantifiziert. Als Lösemittelkontrolle dient MTT-Lyse-Lösung. Liegen die Absorptionswerte außerhalb des linearen Bereiches von Lambert-Beer, werden die Proben verdünnt und erneut analysiert.

Nach Abzug der Lösemittelkontrolle von allen Absorptionswerten wird der Mittelwert der Negativkontrolle (Inkubation Zellen 30 Minuten mit Basalmedium) berechnet und auf 100%

Viabilität festgesetzt. Mittels Gleichung 10 (Seite XII) werden die sich daraus ergebenden Viabilitäten der anderen Proben ermittelt.

2.2.7 Esteraseinhibition bei Humanhauthomogenisaten

Die Enzyminhibitionsversuche sind auf Basis der quantitativen Esteraseaktivitätsbestimmung entwickelt worden. Dabei sind folgende Adaptionen vorgenommen worden: die Reihenfolge der Applikation der Flüssigkeiten, die Volumina, die Verwendung einer einzigen FDA-Konzentration, die Zugabe von Inhibitorlösungen und eine Inkubationszeit von 10 Minuten.

Nach dem Beschichten der schwarzen 96-Loch-Platte mit den Fluoresceinlösungen für die Standardkurve und Leerwertkontrollen, werden über das Pumpensystem des FLUOstar 75 bzw. 25 μL Tris/Aceton-Lösung in Hydrolysekontroll- und Untersuchungsreihe appliziert (Tabelle 13, Seite 40: Testprotokoll 1). Anschließend werden je 50 μL des Homogenisats in die vorgesehenen Vertiefungen für die Untersuchungsreihen und für die Autofluoreszenzkontrolle gegeben. 10 μL der Lösemittelkontrolle und je 10 μL der verschiedenen Inhibitoren/Inhibitorgemische in die Hydrolysekontroll- und Untersuchungsreihen werden in die vorgesehenen Vertiefungen hinzugefügt und 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wird über das FLUOstar Pumpensystem 125 μL des FDA-Testlösung zugegeben und die Messung der Basalfluoreszenz (Tabelle 13, Seite 40: Testprotokoll 2) gestartet, sodass anschließend die Fluoreszenzentwicklung mittels Testprotokoll 3 (Tabelle 13, Seite 40) gemessen werden kann.

Die Auswertung erfolgt über die Umsatzgeschwindigkeit. Anstelle der Nachweisgrenze wird bei dieser Auswertung die Bestimmungsgrenze der Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve (NA) genutzt (Gleichung 2, Seite XI). Messwerte unterhalb dieser Grenze werden wiederum von der Auswertung ausgeschlossen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzmesswerte der Basalfluoreszenz (t_1) und der Gesamtfluoreszenz (t_2) werden auf die Standardkurve (Gleichung 3, Seite XI) bezogen, um die Fluorescein-Konzentration ($c_{\overline{XY},t_1}$; $c_{\overline{XY},t_2}$; $c_{\overline{BY},t_1}$; $c_{\overline{BY},t_2}$) zu ermitteln. Die Fluorescein-Konzentrationen werden um die Hydrolysekontrolle korrigiert (Gleichung 11, Seite XII), um so den Umsatz von FDA zu Fluorescein (Gleichung 12, Seite XII), respektive die Umsatzgeschwindigkeit (Gleichung 13, Seite XII), zu erfassen, und daraus die prozentuale Aktivität im Vergleich zur ungehemmten FDA-Hydrolyse zu berechnen.

2.2.8 Untersuchungen zur Genexpression

Separation von Epidermis und Dermis

Die Inkubation von Epidermis und Dermis mittels Thermolysin ermöglicht eine exakte Trennung der Hautstrata in der dermoepidermalen Verbindungszone [169]. Dazu werden die Konstrukte zweimal mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem PBS gewaschen und mit

Hilfe einer Pinzette vorsichtig in eine 6-Loch-Platte transferiert, wobei die Epidermis nach oben weist. 1 mL Thermolysin-Lösung wird in die entsprechenden Vertiefungen gegeben, ohne die Epidermis mit der Lösung zu überdecken. Die Gewebe werden 1 Stunde bei 4°C inkubiert, bevor Epidermis und Dermis mittels Pinzetten vorsichtig voneinander getrennt und jede in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt wird. Die Homogenisierung (2.2.2, Seite 38) erfolgt unter Zusatz von NucleoSpin® RNA II Lyse-Puffer. Die Epidermis ist für die RNA-Isolation bereit. Das Dermis-Homogenisat wird zunächst 30 Sekunden bei 4°C mit 15.700x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µL RNase-freiem Wasser und 1,6 µL Proteinase K (zum Verdau von Proteinen und Aufreinigung von Nukleinsäuren [54, 147]) versetzt, vorsichtig durchmischt und anschließend 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Zum Abschluss wird nochmals 30 Sekunden bei 4°C mit 15.700x g zentrifugiert, um aufgewirbelte Zellfragmente zu sedimentieren. Die Weiterbehandlung der Proben erfolgte gemäß RNA-Isolationsprotokoll.

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Zellen, aus juveniler humaner Vorhaut und den rekonstruierten humanen Geweben mittels NucleoSpin® RNA II erfolgte gemäß der Herstelleranleitung. Nach Einsaat von 10.000 Zellen/cm² in 6-Loch-Platten und Entfernung des Mediums nach 24 Stunden, werden die Zellen mittels 350 µL NucleoSpin® RNA II Lyse-Puffer lysiert und gemäß der Herstelleranweisung weiter bearbeitet. Vorhaut sowie die Konstrukte werden mithilfe des TissueLyser II unter Verwendung von 700 µL (aufgeteilt in zwei Portionen) NucleoSpin® RNA II Lyse-Puffer (2.2.2, Seite 38) homogenisiert. Als Lyse-Puffer dient eine Lösung chaotroper Salze (wie Guanidinthiocyanat) und 2-Mercaptoethanol zur Inaktivierung allgegenwärtiger RNasen.

Von Lysat bzw. Homogenisat werden über die Zentrifugation mit Hilfe von violetten NucleoSpin® Filtereinsätzen die festen Bestandteile (Zelltrümmer/ Gewebeteile) von den Liquiden (1 Minute bei 11.000x g) getrennt. Das Filtrat wird - mit 350 µL 70% Ethanol gemischt - auf den blauen NucleoSpin® Filtereinsatz (Silica-Membran) gegeben, auf dem sich die DNA und/oder RNA nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 11.000x g abscheidet. Die Filtermembran wird mit 350 µL des Entsalzungspuffers in Vorbereitung auf den sich anschließenden rDNase-Verdau durch Zentrifugation (1 Minute bei 11.000x g) getrocknet. Der DNA-Verdau mittels 95 µL rDNase Reaktionsgemisch, zuvor aus 10 µL rekonstituierter rDNase und 90 µL rDNase Reaktionspuffer hergestellt, erfolgt während 15 Minuten bei Raumtemperatur. Mit 200 µL RA2 Puffer wird die rDNase inaktiviert und somit die Reaktion beendet.

Anschließend wird die Membran zweimal gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet, bevor die isolierte RNA mit 40 µL RNA-freiem Wasser von der Silica-Membran eluiert (1 Minute bei 11.000x g) wird.

Gelelektrophorese

Für die RNA-Kontrolle wird 1%-iges Agarosegel und für PCR-Produkte 2%-iges Agarosegel (Ausbildung kleinerer Poren) verwendet. Das Gel wird in die Gelkammer gegossen und von Luftblasen befreit. Weiterhin wird ein Kamm in das Gel zur Schaffung von Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm vorsichtig entfernt, die Gelkammer in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und mit TBE (1x) überschichtet. Die Taschen werden vorsichtig mit 6 µL eines Gemisches aus 2 µL RNA-Probe oder PCR-Produkt (welches zusätzlich 1:4 mit DEPC-Wasser verdünnt wird) und 4 µL Ladepuffer (1x) beschickt. Die Größen der PCR-Produkte werden mittels einer mitlaufenden Basenpaarleiter (GeneRuler 50bp DNA ladder) geschätzt. Dazu wird das Referenzmaterial 1:4 mit DEPC-Wasser verdünnt und mit 4 µL Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche appliziert. Die Elektrophoresegele werden 45 Minuten bei 100 V entwickelt.

Das fertige Gel wird 20 Minuten in eine Gel-Färbelösung eingelegt, die durch Interaktion des Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoffes mit RNA und/oder DNA markierte RNA- und/oder DNA-Banden wird bei Anregung über das UV-Transilluminationssystem (BioDocAnalyse, $\lambda=312$ nm) sichtbar und kann mit Hilfe des Geldokumentationssystems (BioDocAnalyse) erfasst und visuell ausgewertet werden. Bei der RNA-Qualitätskontrolle wird auf stark gefärbte Geltaschen als Anzeichen für Rest-DNA und das Vorkommen der zwei charakteristischen Banden für die 18S- und 28S-Untereinheit der ribosomalen RNA (als Hinweis auf Degradation) geachtet.

UV-Quantifizierung

Die isolierte RNA wird 1:35 mit 0,01 M Tris-Puffer pH 7,5 (oder mit DEPC-Wasser) verdünnt und gegen eine Referenzprobe aus der Verdünnungslösung mittels UV-Meter WPA Biowave DNA anhand der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm quantifiziert. Neben dem Gehalt liefern die Quotienten der Absorptionswerte (A260/A280: Alkohol-/Proteinverunreinigungen; A230/260 Verunreinigungen mit Polysacchariden) der RNA-Proben Aufschluss über die Reinheit der RNA. Ausgehend von der Konzentration wird das nötige Volumen für den im Folgenden durchgeführten cDNase-Verdau und cDNA-Synthese berechnet.

DNase-Verdau

Der DNase-Verdau wird mittels DNase I Amplification grade nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Dazu werden maximal 1 µg RNA (maximal 8 µL) zusammen mit 1 µL 10x Reaktionspuffer und 1 µL DNase I vorsichtig gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 µL 50 mM EDTA-Lösung abgestoppt und durch das Erhitzen auf 70°C wird DNase I und RNA denaturiert.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgt mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit nach Anweisung des Herstellers.

Die von DNA befreiten RNA-Proben werden mit einer Mischung aus 1 µL Random Hexamer Primer, 4 µL 5x Reaktionspuffer, 1 µL RiboLock Ribonuclease-Inhibitor (Schutz der RNA vor Degradierung), 2 µL eines Gemisches verschiedener Nukleotide und 1 µL reverse Transkriptase versetzt und einem speziellen Temperaturprogramm unterzogen (5 Minuten 25°C, 60 Minuten 42°C und 5 Minuten 70°C).

Primer-Generierung

Der „Accession-Code“, der mittels der Gendatenbank ermittelt wird (Tabelle 11, Seite 36), ist die verwendete Referenzsequenz für die Auswahl eines passenden Primers. Unter der Funktion „pick primers“ werden vor der Suche verschiedene Parameter modifiziert. So wird die Produktgröße des PCR-Produktes auf 100 bis 250 bp begrenzt und die ideale Primer-Schmelztemperatur T_m (Polymerase-Kettenreaktion) bei $60 \pm 3^\circ\text{C}$ festgelegt. Des Weiteren ist das Überbrücken einer Exon-Exon Verknüpfung (nur Erfassung der kodierenden DNA-Abschnitte) zum Ausschluss der Detektion genomischer DNA durch die Primer sehr wichtig. Die Suche ergibt Vorschläge für verschiedene Primerpaare. Bei der Auswahl ist darauf zu achten, dass die verschiedenen Transkriptionsvarianten eines zu untersuchenden Gens mit einem Primer erfasst werden können. Die ausgewählten Primer sind anschließend auf ihre Eignung zu prüfen.

Tabelle 15: Auflistung der Primer für die Genexpressionsuntersuchung inklusive des „Accession-Codes“.

Enzym (Primer-Abkürzung)	„Accession-Code“	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge	Primer-effizienz
Carboxylesterase 1 (CES1)	NM_001025194.1	f: gCTTgggggCATCCgTCCTC r: TggTTCCTgCAggCTgCggTg	174 bp	1,95
Carboxylesterase 2 (CES2)	NM_003869.5	f: CggCAGcGAAcCcgAgACCAg r: CTgAgTCCTggCCCTGgCCCC	118 bp	2,00
Carboxylesterase 3 (CES3)	NM_024922.5	f: gCACAAgCCAAA TgCCAggCg r: TCTggAAAgCCAggCgggA	248 bp	nicht bestimmbar
Carboxylesterase 4 (CES4A)	NM_001190202.1	f: CgCAggTgCC TgCAggAgTC r: ACCATCACTggCAgCTggggA	155 bp	nicht bestimmbar
Carboxylesterase 5A(t1+2) (CES5(t1+2)) [#]	NM_001143685.1	f: CTC TgCTgCCCTCTgCCCTgCC r: CAgAAggCCCTTTggTggggg	208 bp	nicht bestimmbar
Carboxylesterase 5A(t3) (CES5(t3)) [#]	NM_001190158.1	f: gTCAAggCCAgCTgggATgCTg r: gAAggCCCTCATCTTTggAAgTgT	220 bp	nicht bestimmbar
CYP3A5	NM_000777.3	f: TgTCAgCCTggTgCTCCTCT r: gggAgTTgACCTTCATACgTTCCCC	192 bp	1,91
CYP3A4	NM_017460.5	f: TCCAgggCCCACACCTCTgC r: TggACCAAAAggCCTCCggT	217 bp	1,94

Fortsetzung Tabelle 15: Auflistung der Primer für die Genexpressionsuntersuchung inklusive des „Accession-Codes“.

Enzym (Primer-Abkürzung)	„Accession-Code“	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge	Primer-effizienz
CYP3A7	NM_000765.3	f: TgTCCTTCCgTAAgggCTATTggAC r: AATCCCACtggCCCgAAAggC	217 bp	nicht bestimmbar
3 α -Hydroxisteroiddehydrogenase (AKR1C1-4)	NM_001135241.1	f: ATgCgCCTgCagAggTTCCt r: CggATggCCAgTCCAACCTgC	127 bp	1,94
Arylesterase Typ 1 (PON1)	NM_000446.5	f: ATCCTCCTgCATCagAggTgCTTCg r: ggTCCTCggAATA TggCAAgCgg	246 bp	2,02
Arylesterase Typ 2 (PON2)*	NM_001018161.1	f: ATCCTTCCtCg9gggACATCTgg r: ATgCggAgAACCTCTgACgAggg	100 bp	1,99
Arylesterase Typ 3 (PON3)*	NM_000940.2	f: CCCAAgggAggTTAAAgTggTggC r: ggTgCCCCAACTgTATCACCTTCAG	172 bp	1,94
Succinatdehydrogenase Untereinheit A (SHDA) ^o [166]	NM_004168	f: TgggAACAAAgAgggCATCTg r: CCACCACTgCATCAAAATTCA Tg	86 bp	1,94

* Die eingesetzte Primermenge bei der Genexpressionsuntersuchung wird auf Hälfte reduziert.

^o Referenzen, Enzym des Citratzyklus des Grundstoffwechsels

Primer-Etablierung

Anhand einer Positivkontrolle (HepG2-Zellen) werden die in Frage kommenden Primer mittels PCR auf Funktionsfähigkeit getestet (siehe unten) und die PCR-Produktegröße per Gelelektrophorese überprüft. Bei der Auswahl wird darauf geachtet, dass die Transkriptionsvarianten der mRNA eines Enzyms mit einem Primer detektiert werden können. Erweisen sich die getesteten Primer bei der Gelelektrophorese als funktionsfähig (Hauptbande \equiv Produktgröße; kein Auftreten von Nebenbanden), wird die Effizienz mit Hilfe einer Standardkurve aus PCR-Produkt bestimmt. Dazu wird das PCR-Produkt 1:1000 (10^{-3}) für die Stammlösung verdünnt. Aus dieser Stammlösung werden weitere Verdünnungen (10^{-5} bis 10^{-11}) erstellt. Die Fluoreszenzentwicklung der Konzentrationsreihe während der PCR-Reaktion wird anschließend im LightCycler[®] 480 gemessen und deren Effizienz bestimmt (Effizienz von 2 ist ideal). In Tabelle 15 sind die getesteten Primer aufgelistet.

Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, entwickelt von Mullis und Faloona [99], besteht in der Amplifizierung spezieller DNA-Abschnitte mit Hilfe eines Primers und einem speziellen Temperaturprogramm. Zur Durchführung einer PCR werden in Duplikaten je 2 μ L cDNA oder 2 μ L PCR-Wasser als Negativkontrolle in eine transparente 96-Loch Mikrotiterplatte für den LightCycler[®] 480 vorgelegt und 8 μ L PCR-Mastermix (2.1.7, Seite 34) zugegeben, die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und 2 Minuten bei 1500 Umdrehungen/min zentrifugiert bevor im LightCycler[®] 480 mit Hilfe eines spezielles Temperaturprogramms die Fluoreszenzentwicklung gemessen wird.

Dabei heizt sich der LightCycler 480 zuerst 5 Minuten auf 95°C auf, um die FastStart Taq DNA Polymerase zu aktivieren und doppelsträngige DNA zu denaturieren. Danach wird die Temperatur auf 60°C gesenkt, damit sich die Primer an die einsträngige DNA anlagern können (Primerhybridisierung). In den Doppelstrang kann nun der Fluorezenzfarbstoff SYBR Green I interkalieren und ein Fluoreszenzsignal ($\lambda=530$ nm) abgeben. Die Elongation des komplementären DNA-Stranges erfolgt bei 72°C mittels der FastStart Taq DNA Polymerase zusammen mit einem Nukleotidgemisch. Weitere Interkalation von SYBR Green I erhöhte die Fluoreszenz. Zur Trennung der DNA-Doppelstränge (Denaturierung) wird das Gerät abermals auf 95°C aufgeheizt. Mit dem Absenken der Temperatur auf 60°C startet der Zyklus erneut. Die Amplifikation wird 45-mal wiederholt, sodass mit jedem Zyklus die Anzahl an spezifische DNA-Doppelsträngen und die Fluoreszenzintensität steigt, bis sie ein Plateau erreichen. Zur Auswertung wird dabei das direkt proportionale Verhältnis der Anzahl der cDNA-

Kopien und der Fluoreszenzintensität genutzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch nach vorheriger Denaturierung langsam von 65°C auf 97°C erhitzt. Dadurch steigt zunächst die Fluoreszenz (verstärktes Interkalieren von SYBR Green I in komplementäre Doppelstränge), die ab einer speziellen Schmelztemperatur (T_m ; 1:1 Verhältnis von doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA) wieder absinkt. Die Schmelztemperatur ist für ein spezifisches PCR-Produkt charakteristisch und die Schmelzkurve gibt Hinweise auf die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches.

Auswertung

Für die quantitative Auswertung werden die sogenannten „Crossing points“ (Cp) verwendet, also der Punkt der Amplifikationskurve, an dem die Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt [128]). Die Cp werden von der Software des LightCycler® 480 ausgegeben und manuell in ein vorbereitetes Excel-Arbeitsblatt übertragen. Werte aus Replikationszyklen größer 35 werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend werden Differenzen der Cp der verschiedenen Enzyme innerhalb einer Untersuchungsmaterialcharge eines Spenders zu dem Cp des Referenzgens Succinyldehydrogenase Untereinheit A (SDHA) gebildet (Gleichung 14, Seite XII). Die Anzahl der Transkripte für die untersuchten Enzyme werden mittels Gleichung 15 [128] ermittelt, wobei die Anzahl der Transkripte des Referenzgens auf 10.000 festgelegt wird.

2.2.9 Statistik

Messdaten werden stets aus mindestens zwei Parallelversuchen generiert und die Ergebnisse (Mittelwert und Standardabweichung, $MW \pm SD$) von mindestens drei unabhängigen Experimenten mittels deskriptiver Statistik (GraphPad Prism 5.04) ausgewertet, wobei für die schließende Statistik der nichtparametrische Test nach Mann-Whitney für zwei Datenpaare und nach Kruskal-Wallis für mehr als zwei Datenpaare genutzt werden. Bei signifikanten Unterschieden ($p \leq 0,05$) im Kruskal-Wallis-Test wurde mittels post-hoc-Tests (Dunn's multiple comparison test) auf Unterschiede zwischen den einzelnen Geweben geprüft. Mittels Grubb's Test wurden die Ergebnisse auf Ausreißer getestet. Die identifizierten Werte ($p < 0,05$) wurden in den Rohdaten gekennzeichnet und für die weiterführende Analytik verwendet, da es keine Begründung zum Ausschluss gab.



Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der quantitativen Esteraseaktivitätsbestimmung

3.1.1 Auswahl der Untersuchungssubstanz

Die Esteraseaktivität von humaner Haut (*ex vivo*) sollte vergleichend mit rekonstruierter Humanhaut bzw. den in der Haut quantitativ dominierenden Zellen, NHK und NHDF, an einer Modellschubstanz untersucht werden. Ferner sollte die mittels FDA quantifizierte Esteraseaktivität der Gewebe/Konstrukte mit dem Metabolitenprofil von Prednicarbat verglichen werden. Daher war die strukturelle Ähnlichkeit (Diester) bei der Auswahl der Modellschubstanz entscheidend sowie eine Ähnlichkeit in den physikochemischen Eigenschaften wünschenswert. Weiterhin sollte der Umsatz der Standardschubstanz in einfacher Weise quantifizierbar sein. Aufgrund der erfolgreichen Charakterisierung der metabolischen Aktivität von humanen Kornea-Konstrukten [142] anhand der Umsetzung von FDA, wurde FDA für die Etablierung eines Verfahrens zur Quantifizierung der kutanen Esterasen als Modellschubstanz gewählt.

3.1.2 Testbedingungen

Lösemittel für FDA und Fluorescein

Die Löslichkeit von FDA wurde sowohl in wässrigen wie auch in nicht-wässrigen Systemen geprüft. Zur Reduktion des Risikos einer spontanen Esterhydrolyse und da FDA im Wässrigen nicht bzw. nur sehr schwer löslich war, wurden verschiedene organische Lösemittel (Ethanol, DMSO, Aceton) getestet [129, 150]. Aceton erwies sich dabei als geeignet. Die gewählten FDA-Konzentrationen für die Aktivitätsbestimmung lagen bei 10^{-6} bis $6 \cdot 10^{-5}$ M. Limitierende Faktoren waren die Löslichkeit im wässrigen System bei geringster Opaleszenz und die Fluoreszenz-Nachweisgrenze.

Als potentielle Lösemittel für die Fluorescein-Stammlösung wurden PBS, 0,1 M Tris-Puffer pH 7,4 und 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 getestet. 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 erwies sich als geeignet. Der Konzentrationsbereich der Fluorescein-Standardkurve reichte von 10^{-8} bis $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Erste Versuche zur Ermittlung eines detektierbaren Konzentrationsbereiches von Fluorescein wurden mit variablen Zusätzen von 0,025 bis 12,5% (V/V) Aceton durchgeführt, um den verschiedenen Aceton-Gehalt beim Verdünnen der Fluoresceindiacetat-Testlösungen nachzubilden. Ein konstanter Zusatz von 0,2% (V/V) Aceton senkte die Anzahl an mitzuführenden Kontrollen und erhöhte entsprechend die Zahl der in einem Arbeitsgang untersuchbaren Proben. Inwieweit diese Konzentration NHK, NHDF und die HaCaT Zelllinie beeinflusst, war

im weiteren Verlauf mittels des MTT-Tests zu prüfen. Bekannt ist jedoch, dass 0,2% (V/V) Aceton humane Hautzellen wie NCTC clone 2414 nicht negativ beeinträchtigt [113].

Kurz vor Beginn der Esteraseaktivitätsbestimmung wurde die acetonische FDA-Stammlösung mit 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 1:500 verdünnt. Durch diesen zeitlichen Ablauf konnte die spontane Esterhydrolyse im Wasser auf ein Minimum reduziert werden.

Medien und Zusätze

Zu Beginn der Methodenentwicklung erfolgten die Zellversuche mit Wachstumsmedien (KGM / FbGM). Es wurde auf die entsprechenden Basalmedien (KBM/FbBM) umgestellt, da somit Beeinflussungen durch tierisches Serum/Extrakte (FbGM: FKS, KGM: BPE), Hydrocortison und Penicillin/Streptomycin oder Gentamycin ausgeschlossen werden konnten. Zudem erfolgte dies in Anlehnung an die Untersuchungen zum Prednicarbat-Metabolismus.

Ferner wurde die Notwendigkeit der Zugabe von HEPES zum Medium geprüft. Diese Puffersubstanz dient zur Aufrechterhaltung von pH 7,4 bei Versuchen ohne CO₂-Begasung bei 37°C. Da die Zellen den Aufenthalt außerhalb des Brutschrankes für den Zeitraum der Untersuchung ohne einen Mediumzusatz überstehen, konnte auf HEPES verzichtet werden.

Platten und weitere Hilfsmittel

Für die fluorimetrischen Messungen wurde anfangs mit schwarzen Platten mit transparentem Boden gearbeitet, die aufgrund einer Verbesserung der Zellaussaat (sterile Reagenzreservoirs) durch komplett schwarze Platten ersetzt werden konnten. Die auf die gewünschte Zellzahl pro 200 µL in sterilen Reagenzreservoirs eingestellte Zellsuspension wurde unter Nutzung einer 8-Kanal-Transferpipette in die Vertiefungen überführt. Dadurch konnten Fehler minimiert und eine erhebliche Zeiteinsparung realisiert werden.

3.1.3 Messanordnung, -reihenfolge und -zeitpunkt

Die A-Reihe der 96-Loch-Platte (Abbildung 8, Seite 42) wurde für die Kontrollen der Leerwerte der Fluorescein-Standardkurve und Zellen in Basalmedium oder Homogenisat in Puffer genutzt. Zusammengehörige Proben der Reihen B bis G wurden auf der 96-Loch-Platte entsprechend der Leserichtung des Plattenlesegerätes vertikal untereinander angeordnet. Dadurch konnte eine vernachlässigbare Zeitdifferenz von etwa sechs Sekunden (etwa 1% von der Gesamtversuchsdauer) zwischen den Probenpaaren erreicht werden.

Die Messungen erfolgten immer von den höchsten zu den niedrigsten Konzentrationen, um zufällig auftretende Fehler frühzeitig erkennen und gegebenenfalls beheben zu können. Die Fluoreszenzintensität der Leerwertkontrolle als erste Station einer jeden Messung ermöglicht Anzeichen für fehlerhafte Messergebnisse zu identifizieren, die durch Prüfung der Fluoreszenzintensität der höchsten Fluorescein-Standardkonzentration verifiziert oder falsifiziert werden konnte. Ein Messabbruch zu diesem Zeitpunkt verhinderte ein komplettes Verwerfen des gesamten Versuches. Ferner konnte dadurch vor der entscheidenden Messphase mit Esterasesubstratinjektion festgestellt werden, ob die Fluoreszenzdetektion im erwarteten Meßbereich lag.

Als Messparameter wurde daher der Anstieg der Fluoresceinkonzentration gewählt und eine vergleichende Messung zu zwei Zeitpunkten wurde erforderlich. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, den Zeitpunkt der ersten Messung und das Intervall zwischen den Messungen zu optimieren. Gemäß Michaelis und Menten [143] wird für die Enzymaktivitätsbestimmung die Anfangsumsatzgeschwindigkeit der Reaktion benötigt. Daher sollte der zweite Messpunkt möglichst nahe am Ersten liegen. Der Zeitrahmen von 10 Minuten trägt den Möglichkeiten des FLUOstars bei der Rastergeschwindigkeit Rechnung.

3.1.4 Gewebeaufschluss und Aufbereitung

Anders als bei den Versuchen mit Zellen war für die Untersuchung der Enzymaktivität von Humanhaut und RHS/RHE ein geeigneter Aufschluss durch Homogenisation erforderlich. Gesucht wurde eine Aufschlussmethode, die die Aktivität der Enzyme allenfalls geringfügig schädigt. Verschiedene Verfahren wurden erprobt.

Bei der Behandlung mit flüssigem Stickstoff und manuelle Zerkleinerung mittels Mörser und Pistill wurden die Enzyme großer Kälte (-196°C) ausgesetzt. Die Haut zeigte sich als sehr robust, sodass zufriedenstellende Ergebnisse nicht erreicht wurden. Zudem barg diese offene Arbeitsweise das Risiko einer möglichen Kontamination mit Keimen, Schmutz oder fremden Hautzellen, die die Ergebnisse hätten beeinflussen können.

Der Aufschluss mit dem Ultraturax bedeutet trotz intensiver Kühlung eine hohe thermische Belastung durch Wärmeentwicklung für die Proben. Zudem war das erforderliche Probenvolumen bei Nutzung großer Rotoren hoch, kleinere Rotoren aber waren aufgrund der faserigen Struktur der Dermis permanent verstopft. Damit würde sich die Aufschlusszeit, die möglichst gering gehalten werden sollte, unangemessen verlängern.

Ultraschall, der hauptsächlich bei der Homogenisierung von Zellen eingesetzt wird, brachte ebenfalls keine zufriedenstellenden Aufschlussergebnisse und eine enzymatische Vorbehandlung der Humanhaut durch Kollagenverdau zur Lockerung des dermalen

Zellverbandes wurde aufgrund möglicher Interferenz mit der Esteraseaktivität und der Proteinbestimmung ausgeschlossen.

Mit der Kugelschwingmühle TissueLyser II, die mittels Prallkräften zum Gewebeaufschluss führt, konnten für die Gewebe bei unterschiedlicher Dauer der Krafteinwirkung zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 12, Seite 39). Die thermische Belastung konnte durch Kühlen der Tefloneinsätze reduziert werden und auch ein geringeres Probevolumen in 2 mL Reaktionsgefäßen war möglich. Der Aufschluss ließ sich durch Zugabe von 500 µL Flüssigkeit sowie Verlängerung der Krafteinwirkung verbessern. Daher wurde dieses Verfahren zur Homogenisation gewählt. Die Aufschlusszeiten zeigen die hohe Widerstandsfähigkeit der Humanhaut: trotz 12 Minuten Aufschlusszeit wirkte die Epidermis visuell intakt und die Struktur der Dermis nur teilweise aufgebrochen.

Zur Abtrennung der zellulären Bestandteile wurde das Gemisch bei 9000x g 10 Minuten unter Kühlung (+4°C) zentrifugiert. Dadurch wurden Interferenzen durch zelluläre Bestandteile reduziert und nur die löslichen Bestandteile untersucht.

3.1.5 Viabilitätsuntersuchung

Mit Hilfe eines an die Fragestellung adaptierten MTT-Reduktionsassays wurde untersucht, ob die Methode der Esteraseaktivitätsbestimmung anhand der FDA-Hydrolyse die Viabilität der Zellen reduzierte. Vor der Zugabe des MTT-haltigen Kulturmediums (2.2.6, Seite 47) wurden die Testlösungen von der Platte entfernt (Ausklopfen) um chemische Interaktionen zu vermeiden. Neben der Kürzung der Inkubationszeit auf 30 Minuten im Vergleich zur Testung von Zytostatika (48 h) wurde durch die Verwendung MTT-haltigen Kulturmediums die Genauigkeit der Messung erhöht. Zusätzlich wurde die Effektivität des Zellaufschlusses durch das Hinzufügen von SDS und Essigsäure zu DMSO erhöht [7, 173].

Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode der Esteraseaktivitätsbestimmung die Zellviabilität nicht beeinträchtigt. Die mediane Zellviabilität lag zwischen 80 und 116,5% (Abbildung 9) und somit in einem Bereich, der als nicht zytotoxisch angesehen wird. Die starken Schwankungen der Werte (angegeben als Variationskoeffizient) lassen sich mit der hohen biologischen Variabilität des Untersuchungsmaterials erklären.

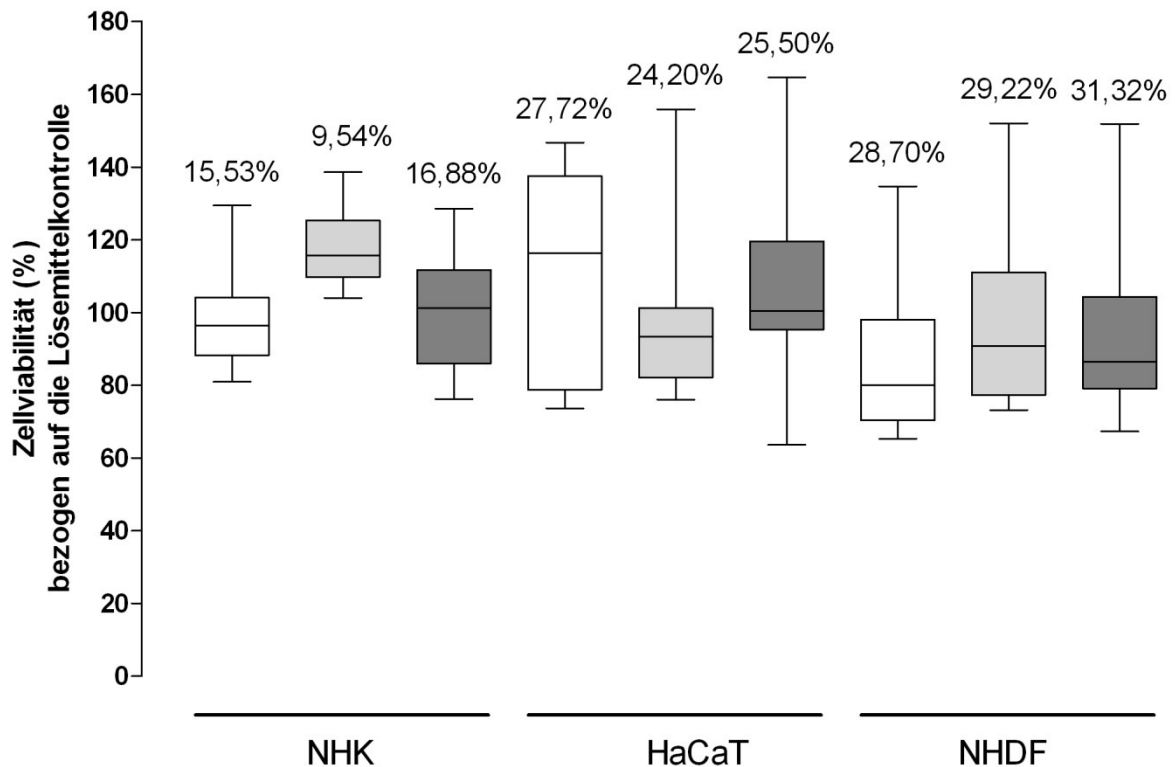


Abbildung 9: Bestimmung der Zellviabilität von jeweils drei verschiedenen Spendern bzw. drei verschiedenen Passagen bei der HaCaT-Zelllinie mittels MTT. Darstellung der prozentualen Zellviabilität dreier verschiedener FDA-Konzentrationen (weiß 60 µM, hellgrau 9 µM, dunkelgrau 1 µM). Minimum, Maximum, 25%-/ 75%-Perzentil und Median als Box-Plot dargestellt. Angabe des Variationskoeffizienten über den Box-Plots. NHK (n=7), HaCaT (n=9), NHDF (n=6).

3.2 Quantitative Bestimmung enzymkinetischer Daten

Nach der Entwicklung des fluorimetrischen Testsystems wurde die Esteraseaktivität der Zielgewebe untersucht. Die Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb von 10 Minuten in Abhängigkeit zu den verschiedenen Substratkonzentrationen folgte einem sigmoidalen Kurvenverlauf. Daher erfolgten die Auswertung mit Hilfe der Hill-Funktion (Gleichung 7, Seite XI).

3.2.1 Zweidimensionale Zellkultur

Wie schon aus den vorangegangenen Untersuchungen zu erwarten war, zeigten die NHK die höchste Esteraseaktivität der untersuchten Zellen [42]. NHDF waren weniger aktiv, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Ferner wurden keine signifikanten Unterschiede in den Aktivitätsniveaus von NHK und NHDF bei der Verwendung von Zellen von Einzelspendern oder Spenderpools festgestellt. Die hohe Variabilität der Esteraseaktivität ist Ausdruck der biologischen Streuung der Primärzellen. Mit Hilfe der Keratinozytenzelllinie HaCaT sollte die Präzision der Esteraseaktivitätsbestimmung mit FDA als Esterasesubstrat unter weitgehendem Ausschluss biologischer Variabilität geprüft werden. Der Variationskoeffizient der Resultate der HaCaT-Zelllinie (Vk: 15,86%) war

dementsprechend deutlich niedriger als bei NHK ($V_{k_{\text{[Einzelspender/ Spenderpool]}}}$: 56,45/ 61,67%) und NHDF ($V_{k_{\text{[Einzelspender/ Spenderpool]}}}$: 14,76/ 36,51%). Dies belegt die gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Esteraseaktivität der HaCaT-Zelllinie signifikant geringer war als die der NHK (Abbildung 10A, Seite 64). Wurde die HaCaT-Zelle mehr als 60-mal passagiert, traten ungewöhnlich große Schwankungen aller untersuchten enzymkinetischen Parameter auf, ohne dass Auffälligkeiten während der Versuchsdurchführung zu erkennen waren. Versuche an niedrigeren Passagen bestätigten diese Beobachtungen nicht, sodass davon auszugehen war, dass eine nicht näher definierte Veränderung in der HaCaT-Zelllinie Auslöser für dieses Phänomen war. Daher wurden alle Versuche, die mit HaCaT-Zellen ab der 60. Passage von der Untersuchung ausgeschlossen. Somit ist die Verwendung der HaCaT-Zelllinie als Surrogat für Versuche an primären Keratinozyten für diesen Bereich kritisch zu hinterfragen.

Trotz nicht signifikanter Unterschiede der Esteraseaktivitätsniveaus zwischen Einzelspender und Spenderpool bei NHDF und NHK fiel der steigende Variationskoeffizient auf (3.2.1, Seite 62f). Das Zusammenfassen mehrerer Spenderzellen zu einem Spenderpool ermöglicht dabei die Egalisierung einzelner Spenderzellen-Inkompetenzen. Jedoch birgt dies die Gefahr von zellulären Inkompatibilitäten zwischen den Spenderzellen, die dazu führen können, dass die Proliferation von einzelnen Spenderzellen gehemmt wird, wodurch Missverhältnisse im Zellwachstum entstehen. Dadurch kommt es eher zu einer Erhöhung der biologischen Variabilität. Dies suggeriert jedoch, dass die Verwendung von Spenderpools nicht wie allgemein angenommen eine höhere Präzision mit sich bringt.

Der $s_{0,5}$ -Wert gibt die Substratkonzentration entsprechend der Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit v_{max} wieder (Berechnung Gleichung 8, Seite XII). In Anlehnung an die Michaelis-Menten-Konstante stellt $s_{0,5}$ ein enzymespezifisches Charakteristikum dar, mit dessen Hilfe Anhaltspunkte über die Art bzw. Gleichartigkeit von Enzymen gewonnen werden können. Bei der statistischen Analyse der $s_{0,5}$ -Daten wurden trotz der unterschiedlich starken Streuung der $s_{0,5}$ -Werte keinerlei Unterschiede identifiziert (Abbildung 10B, Seite 64). Daher sollten die an der Umsetzung von FDA zu Fluorescein beteiligten Enzyme der Hautzellen gleichartig sein. Wie bei der Esteraseaktivität überstieg auch beim $s_{0,5}$ -Wert die Variabilität der Primärzellen die der HaCaT-Zelllinie.

Ferner ermöglicht der Hill-Koeffizient (h) die Art der gegenseitigen Einflussnahme der Enzyme auf die Bindungseigenschaften zum jeweiligen Substrat (Kooperativität) zu beurteilen [25]. Ein Koeffizient von eins entspricht einer Enzymkinetik nach Michaelis-Menten (keine gegenseitige Beeinflussung). Werte kleiner eins sind ein Hinweis für negative Kooperativität, mit zunehmender Ligandenbindung sinkt die Affinität für die letzten freien Bindungsstellen, d.h. die Liganden behindern sich gegenseitig.

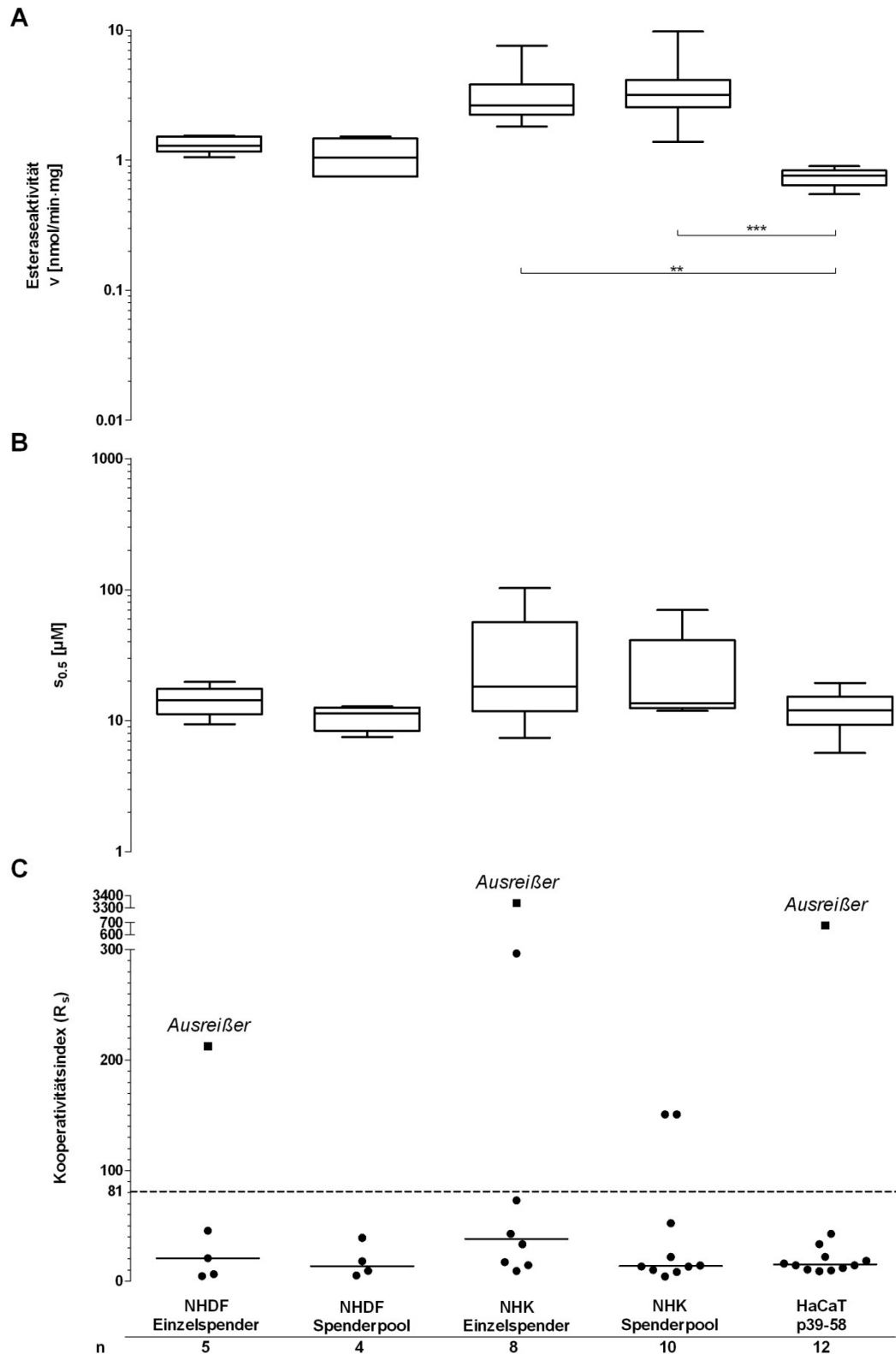


Abbildung 10: Vergleich der enzymkinetischen Parameter Esteraseaktivität (A), Enzymkonstante $s_{0,5}$ (B) und Kooperativitätsindex (C) für die Kulturen primärer humaner Fibroblasten (NHDF) und Keratinozyten (NHK) und der HaCaT Zelllinie. Minimum, Maximum, 25%-/ 75%-Perzentil und Median als Box-Plot dargestellt. Anzahl Spender: NHDF Einzelspender (3); NHDF Spenderpool (2); NHK Einzelspender (4); NHK Spenderpool (3); HaCaT (1). Datenauswertung erfolgte nach Kruskal-Walis mit angeschlossenen Dunn's multiple comparison Test (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$), Ausreißertest nach Grubbs ($p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu steigt die Affinität für die letzten freien Bindungsstellen bei positiver Kooperativität, der Hill-Koeffizient ist damit größer eins.

Die Mittelwerte der Hill-Koeffizienten waren allesamt größer eins und zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16). Beim Kooperationsindex konnten bei den NHDF und NHK Einzelspendern sowie bei den HaCaT-Zellen Ausreißer festgestellt werden. Aufgrund fehlender Ausschlusskriterien wurden die Werte nicht von den Ergebnissen ausgeschlossen.

Tabelle 16: Hill-Koeffizienten für zweidimensionale Zellkulturen. Prüfung auf Signifikanz: t-Test (hellgrau), Kruskal-Wallis (dunkelgrau).

	Mittelwert	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]	Signifikanz- niveau
NHDF Einzelspender	1,75	0,89	50,72	keine Signifikanzen nachweisbar
NHDF Spenderpool	1,85	0,64	34,80	
NHK Einzelspender	1,24	0,48	38,25	
NHK Spenderpool	1,75	0,59	33,92	
HaCaT p39-58	1,54	0,38	24,29	

Die zusammenfassende Beurteilung von Hill-Koeffizienten und Kooperativitätsindizes (Gleichung 8; Abbildung 10C) ergibt, dass die enzymatische Umsetzung von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein vorrangig mittels positiv kooperierender, allosterischer Enzyme abläuft (2.2.3, Seite 40, Absatz Auswertung).

Die Auswertung der Versuche ergab somit, dass bei gleichartigen positiv kooperierenden Enzymen (Tabelle 16, Abbildung 10C) NHK eine größere Esteraseaktivität als NHDF und HaCaT Zelllinie aufweisen (Abbildung 10A).

3.2.2 Humanhaut, rekonstruierte Humanhaut bzw. Epidermis

Bei der Qualitätsuntersuchung im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens „Charakterisierung der metabolischen Kapazität von *in vitro* Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen mit dermalen Biotransformation“ (2009-14) wurde festgestellt, dass das RHS AST 2000 nicht den Anforderungen einer rekonstruierter Humanhaut nach den Vorgaben der OECD entspricht [107]. Daher wurde dieses Konstrukt von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

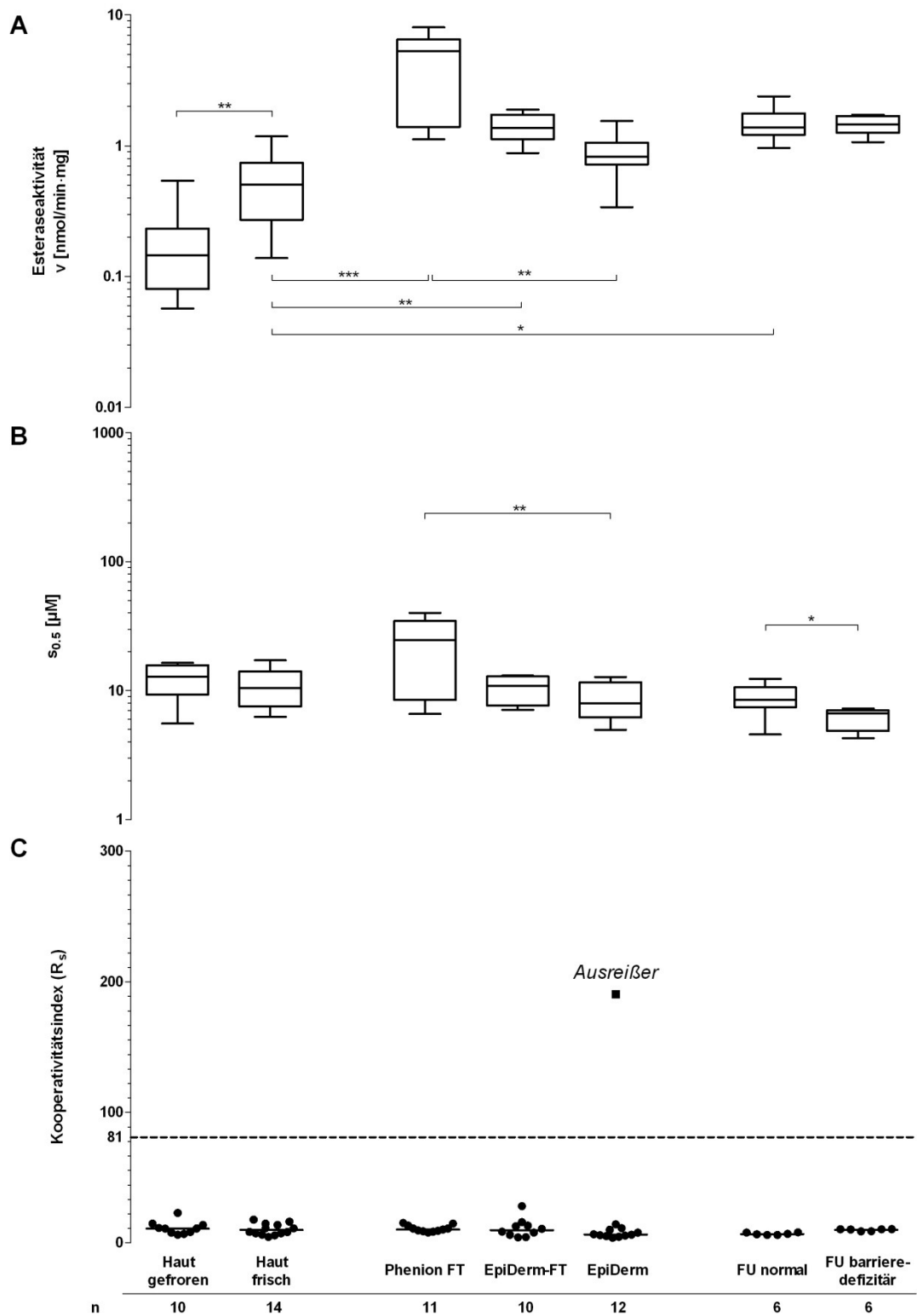


Abbildung 11: Vergleich der enzymkinetischen Parameter Esteraseaktivität (A), Enzymkonstante $s_{0.5}$ (B) und Kooperativitätsindex (C) für Humanhaut, RHE und RHS. Minimum, Maximum, 25%-/ 75%-Perzentil und Median als Box-Plot dargestellt. Anzahl der Spender bzw. Chargen: Haut gefroren (4); Haut frisch (5); Phenion FT (4); EpiDerm-FT (4); EpiDerm (5); FU hausinternes Konstrukt normal (3) und barriere-defizitär (3). Datenauswertung erfolgte nach Mann-Whitney für die Humanhautproben und FU hausinternen Konstrukte, Kruskal-Wallis mit angeschlossenen Dunn's multiple comparison Test für frische Humanhaut, RHE und RHS (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$), Ausreißertest nach Grubbs ($p < 0,05$).

In Vorbereitung auf die Identifizierung eines der Humanhaut äquivalenten Konstrukts wurden zunächst kryokonservierte und frische Humanhaut *ex vivo* vergleichend untersucht. Dabei erwies sich gefrorene Humanhaut als deutlich weniger aktiv als frische (Abbildung 11A, Seite 66). Bei der Betrachtung der Art der biotransformierenden Enzyme mittels $s_{0,5}$, h und R_s wurden keine Unterschiede zwischen kryokonservierter und frischer Humanhaut festgestellt, erneut aber eine positive Kooperativität der Esterasen (Abbildung 11B+C; Tabelle 17).

Die Variabilität der Esteraseaktivität und $s_{0,5}$ -Werte war sehr hoch und ist mit der biologischen Streuung zu erklären. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch die Kryokonservierung verstärkt wurde. Der Vergleich der Esteraseaktivität rekonstruierter Humanhäute bzw. Epidermis muss daher mit Ergebnissen der frischen Humanhaut erfolgen. Die beiden untersuchten RHS, Phenion FT und EpiDerm-FT, wiesen eine signifikant höhere Esteraseaktivität auf als frische Humanhaut. Dabei war Phenion FT das aktivste Konstrukt. Die Variabilität der Esteraseaktivität und der $s_{0,5}$ -Werte war bei Phenion FT stärker ausgeprägt als bei EpiDerm-FT. Die $s_{0,5}$ -Werte ergaben keinen Hinweis auf Unterschiede der biotransformierenden Enzyme bei den Konstrukten und Humanhaut (Abbildung 11B), auch bei der rekonstruierten humanen Vollhaut lag ein positiv kooperatives Verhalten vor (Abbildung 11C, Tabelle 17).

Bei dem RHE EpiDerm waren statistisch keine Unterschiede zu frischer Humanhaut zu erkennen. Allerdings war EpiDerm signifikant weniger aktiv als das RHS Phenion FT. Der deutlich abweichende $s_{0,5}$ -Wert legt zudem nahe, dass bei diesen beiden Konstrukten nicht von einer Gleichartigkeit der biotransformierenden Enzyme ausgegangen werden kann.

In Kooperation mit Frau Sarah Kuchler und Frau Dominika Henkes, die ein Filaggrin defizitäres *in vitro* Krankheitsmodell auf Basis einer Filaggrin-Herabregulation [74] entwickelt haben, wurde dessen Esteraseaktivität sowie die des entsprechenden normalen Konstruktes (kein Filaggrin Knock down) getestet. Die Esteraseaktivität des FU-hausinternen normalen und des barriere-defizitären Konstrukts war annähernd gleich. Verglichen mit frischer Humanhaut zeigte das normale Konstrukt ebenso wie die kommerziellen Vollhautkonstrukte (EpiDerm-FT, Phenion FT) eine höhere Esteraseaktivität mit statistischer Signifikanz zur Humanhaut (Abbildung 11A). Auffällig war, dass die $s_{0,5}$ -Werte der beiden Konstrukte signifikant voneinander differierten, sodass vermutlich der Transfizierungsprozess einen Einfluss auf die biotransformierenden Enzyme ausübt (Abbildung 11B). Zudem waren die Variationskoeffizienten beim barriere-defizitären Konstrukt immer niedriger als beim normalen Konstrukt (exemplarisch Tabelle 17), was ein weiterer Hinweis auf Einflussnahme des Transfizierungsprozesses sein könnte. Die biotransformierenden Enzyme zeigten in den FU-hausinternen Konstrukten ebenfalls positive Kooperativität (Abbildung 11C; Tabelle 17).

An dem Esteraseaktivitätswert der verschiedenen Konstrukte wird der Einfluss der Keratinozytendifferenzierung deutlich. Während NHK in der zweidimensionalen Zellkultur

Ergebnisse

einen mittlere Esteraseaktivität von $3,30 \pm 1,86$ nmol/(min·mg) (Einzelspender) bzw. $3,72 \pm 2,29$ nmol/(min·mg) (Spenderpool) aufweisen (Abbildung 10A), erreicht das FU-normale Konstrukt mit $1,50 \pm 0,48$ nmol/(min·mg) unter den untersuchten Konstrukten die zweithöchste mittlere Esteraseaktivität. Allein das Phenion FT mit einer mittleren Esteraseaktivität von $4,74 \pm 2,45$ nmol/(min·mg) übertrifft die Esteraseaktivität der NHK.

Tabelle 17: Hill-Koeffizienten für Humanhaut und Konstrukte. Prüfung auf Signifikanz: t-Test (weiß + hellgrau), Kruskal-Wallis (dunkelgrau + hellgrau).

	Mittelwert	Standard-abweichung	Variations-koeffizient [%]	Signifikanz-niveau
Haut gefroren	1,91	0,31	16,14	
Haut frisch	2,01	0,41	20,36	** P<0,01
Phenion FT	1,87	0,17	9,02	
EpiDerm-FT	2,07	0,57	27,42	
EpiDerm	2,24	0,63	28,19	** P<0,01
FU normal	2,29	0,16	6,81	
FU barrieredefizitär	1,93	0,07	3,57	

Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass keines der getesteten Konstrukte hinsichtlich der Esteraseaktivität der Humanhaut voll entspricht. Die Ähnlichkeit der $s_{0,5}$ -Werte zwischen Humanhaut und den RHS lässt vermuten, dass die biotransformierenden Enzyme gleichartig sind, ebenso wie das positiv kooperative Verhalten, allerdings übertrifft die Esteraseaktivität der Konstrukte die der Humanhaut. Da die Lagerung der Haut (kryokonserviert) zu einer Reduktion der Esteraseaktivität führt, ist es ebenfalls denkbar, dass ein mit der Entnahme der Humanhaut beginnender Enzymabbau sich während des Transportes von der Klinik in das Labor über die anschließende Verarbeitung der Haut für die Versuche fortsetzt und damit die geringere Esteraseaktivität der Humanhaut erklärt.

3.3 Korrelation esteratischer Spaltung von FDA und Prednicarbat

Die Ergebnisse aus der Biotransformationsuntersuchung von Prednicarbat (PC), die im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes von Frau Wiebke Klipper durchgeführt wurden, sollten mit denen der Esteraseaktivitätsbestimmung zusammengeführt werden, um aus der Kombination der Daten die Eignung des Systems als Vorhersagemodell zu prüfen. Dazu wurden die Esteraseaktivitäten auf die Oberfläche der Gewebe/Konstrukte normalisiert. Eine

weitere Normalisierung dieser Daten auf Proteingehalt war in Ermangelung von Untersuchungsmaterial beim PC-Metabolismus nicht möglich. Anschließend wurde es mit der prozentualen Umsetzung von Prednicarbat (mol/mol) zu Prednisolon (PD) bzw. Prednisolon plus Prednisolon-17-ethylcarbonat (PD+P17EC), bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an PC, korreliert. Der biotransformierte Anteil von PC war bei RHS und RHE annähernd gleich hoch. Einzig die Humanhaut wies eine geringere Biotransformationsleistung auf. Auch die Esteraseaktivität zeigte die beiden RHS und das RHE der Humanhaut überlegen. Daraus ergibt sich folgende Rangfolge: RHS~RHE>Humanhaut.

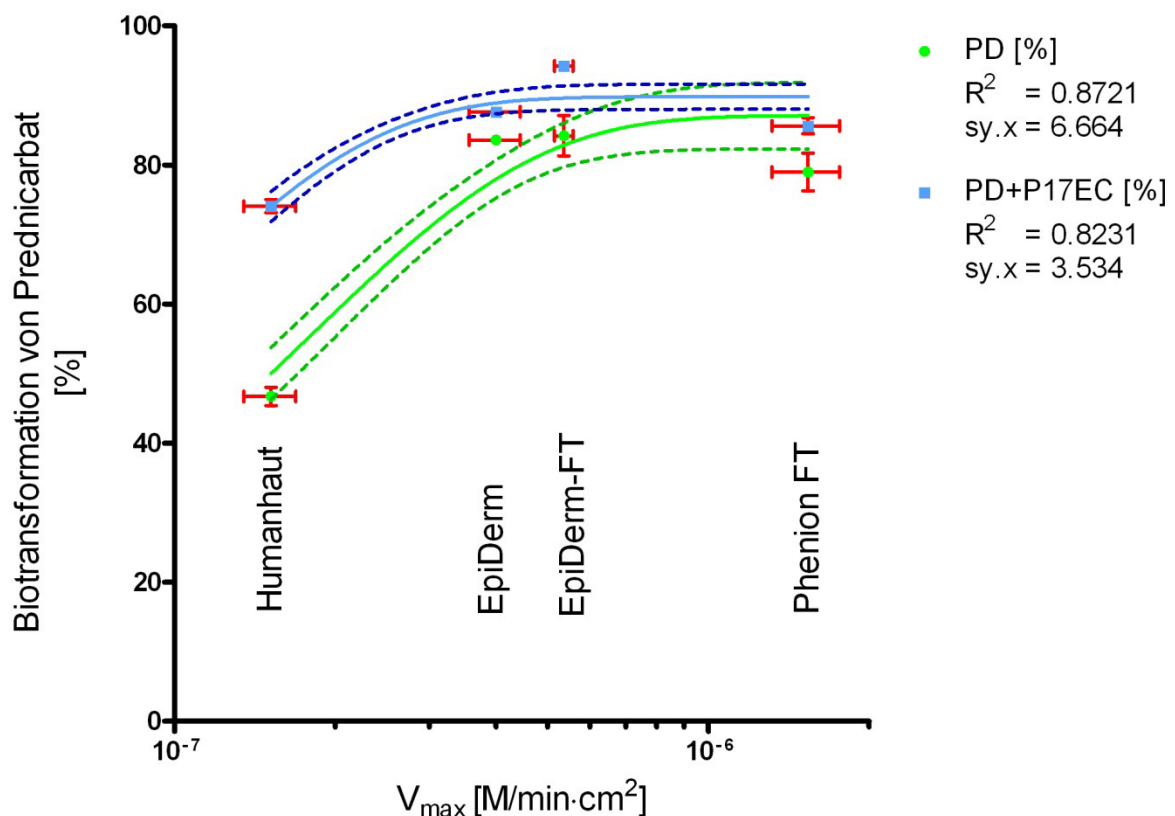


Abbildung 12: Halblogarithmische Darstellung der zusammengeführten Daten aus Untersuchungen zur Prednicarbat-Biotransformation und der Esteraseaktivität bei der Umsetzung von FDA zu Fluorescein in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis. Darstellung der Fehler der Kurvenanpassung als Band (gestrichelte Linien). n=4-8.

Dabei ergab sich ein einphasiger exponentiell-assoziativer Zusammenhang zwischen der PC-Biotransformation und der FDA-Spaltung. Neben dem Korrelationskoeffizienten R^2 gibt der $sy.x$ -Wert einen Hinweis auf die Qualität der Kurvenanpassung, er gibt dabei die Streuung der Messwerte um die angepasste Kurve in der Einheit der Ordinate wieder (Abbildung 12). Die Korrelation verdeutlicht die Unterschiede in der Esteraseaktivität zwischen den verschiedenen Geweben (Abbildung 11A). Die Konstrukte unterschieden sich jedoch in ihrem Metabolitenprofil (Daten Wiebke Klipper). Daher erscheint das gewählte System als Vorhersagemodell nur partiell geeignet.

3.4 Isoformen der dermalen Esterasen

Ausgehend von der FDA Struktur (Abbildung 7, Seite 18) kommen zwei große Gruppen von Esterasen (Carboxyl- und Arylesterasen) in Betracht, an der Umsetzung von FDA zu Fluorescein beteiligt zu sein.

Die beiden wichtigsten Isoformen der Carboxylesterase (CES) sind CES1 und CES2. CES1 wird vorrangig in der Leber und CES2 im Darm exprimiert [58]. Das trimere CES1 spaltet bevorzugt Ester aus kleinen Alkoholgruppen und großen Acylgruppen, das monomere CES2 dagegen Substrate mit großen Alkoholgruppen und kleinen Acylgruppen. Zusätzlich weist CES1 eine Transesterifizierungsaktivität gerade bei hydrophoben Alkoholen auf, die CES2 fehlt [61, 177].

Aus den Arbeiten verschiedener Wissenschaftler [6, 58, 61, 126, 177] geht hervor, dass die Carboxylesterasen mit mindestens zwei Ligandenbindungsstellen die strukturelle Voraussetzung für allosterisches Verhalten aufweisen. Die dreidimensionale Strukturanalyse der CES1 hat gezeigt, dass das Enzym in einem Trimer-Hexamer-Gleichgewicht vorliegt und zwei bis drei Ligandenbindungsstellen aufweist (aktives Zentrum, Seitentür („side door“), Z-Seite („Z-side“)). Das aktive Zentrum befindet sich auf dem Grund der großen katalytischen Tasche und bindet eine Vielzahl von Substraten. Die Seitentür ist benachbart zum aktiven Zentrum, jedoch durch eine dünne Wand aus Aminosäureseitenketten abgegrenzt. Die Funktion der Seitentür als zweiter Zugang von der Enzymoberfläche zum aktiven Zentrum oder aber als Abgabestelle des Umsatzproduktes wird diskutiert. Die Z-Seite ist eine Ligandenbindungsstelle an der Enzymoberfläche, die für das Trimer-Hexamer-Gleichgewicht der CES1 verantwortlich ist. Beim Binden eines Liganden (unter anderem Moleküle mit Cholesterolstruktur) an die Z-Seite verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des Trimers. Dadurch wird der Zugang zum aktiven Zentrum freigelegt, wodurch eine Substratbindung ans aktive Zentrum erst ermöglicht wird. Des Weiteren bewirkt die Ligandenbindung eine Konformationsänderung in der katalytischen Region des aktiven Zentrums, wodurch eine korrekte Positionierung von Glu354 für die Enzymreaktion erfolgt. Die Z-Seite könnte also eine allosterische Funktion bei der Katalyse übernehmen [6, 126].

CES2 besitzt anders als das tri- oder hexamere CES1 [177] eine monomeren Struktur [61, 177]. Die dreidimensionale Enzymstruktur der CES2 wurde von Holmes und Kollegen [58] anhand eines Vergleiches der Aminosäuresequenzen von CES1 und CES2 in Kombination mit einem Vergleich der dreidimensionalen Struktur der CES1 vorhergesagt. CES2 wird daher als identisch zur CES1 postuliert [58]. Demnach könnte auch CES2 eine allosterische Funktion besitzen.

Arylesterasen (PON) kommen in drei verschiedenen Isoformen vor. PON1 ist dabei das am meisten untersuchte Enzym dieser Familie. Die PON1-mRNA wird nur in Leber, Niere und Colon exprimiert [86], jedoch ist das dazugehörige Enzym, welches mit HDL-Partikeln assoziiert ist, ubiquitär vertreten [122]. Die mRNA der intrazellulären PON2 dagegen weist eine ubiquitäre Verteilung auf [86, 123]. Und PON3-mRNA wird in Niere und Leber exprimiert und das Enzym ist wie PON1 mit HDL-Partikeln assoziiert [123]. Die dreidimensionale Struktur wurde bislang nur von der PON1 untersucht, sie weist zwei Bindungsstellen auf, von denen eines Calcium zur Stabilisierung des Enzyms vorbehalten ist und eines das aktive Zentrum darstellt [46, 47]. Im solubilisierten Zustand bilden sie bevorzugt Dimere und Oligomere. Aufgrund der 60%-igen Sequenzhomologie innerhalb der PON-Familie wird davon ausgegangen, dass PON2 und PON3 ähnlich strukturiert sind [46, 47]. Es ist daher zu vermuten, dass Arylesterasen keine allosterischen Eigenschaften besitzen.

3.4.1 Inhibition der Esteraseaktivität

Aus der Gruppe der spezifischen Carboxylesteraseinhibitoren (Tabelle 2, Seite 18) wurde ein Phosphat-haltiger (Bis-4-Nitrophenylphosphat (BNPP)) und Phosphat-freier Inhibitor (Benzil) für die Inhibitionsversuche eingesetzt. Anders als erwartet [34, 60, 167] hemmte Benzil die Esteraseaktivität nicht und wurde von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. N-Ethylmaleinimid (NEM) war ein spezifischer Arylesteraseinhibitor. Die beiden Acetylcholinesterase-Inhibitoren (Neostigmin und Physostigmin) dienten als Negativkontrollen, wobei das quartäre Neostigmin aufgrund seiner Partialladung anders als Physostigmin ausschließlich für die Enzyminhibition mit Hauthomogenisat verwendet werden konnte. Eine Übertragbarkeit der mit Hauthomogenisat gewonnenen Erkenntnisse auf Zellen wurde geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass es weitergehender Anpassungen bedarf, gerade in Bezug auf die Inhibitorkonzentrationen bei gleichzeitigem Nachweis der Zellviabilität, weshalb diese Untersuchungen abgebrochen wurden. Neben spezifischen Esteraseinhibitoren (BNPP als Carboxylesteraseinhibitor, NEM als Arylesteraseinhibitor) kam der unspezifische Serinproteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zum Einsatz [48]. Vorversuche zeigten, dass die aktivitätsmindernde Wirkung der Inhibitoren für die verschiedenen Esterasen unterschiedlich ausgeprägt war. Von den Monosubstanzen hemmte der Carboxylesteraseinhibitor BNPP mit $11,79 \pm 6,01\%$ Restaktivität die Hydrolyse von FDA am effektivsten. Unter Einwirkung des Arylesteraseinhibitor NEM betrug die Restaktivität $38,37 \pm 2,75\%$, bei den als Negativkontrolle eingesetzten Neostigmin $72,47 \pm 6,92\%$. Der unspezifische Inhibitor PMSF zeigte eine Restaktivität von $17,11 \pm 3,25\%$. Durch Kombination der einzelnen Inhibitoren konnte die Hemmung deutlich gesteigert werden. Am effektivsten erwies sich die Kombination aus PMSF, BNPP und NEM

mit einer Absenkung der Enzymaktivität auf $5,11 \pm 2,87\%$ bezogen auf die Lösemittelkontrolle (Abbildung 13).

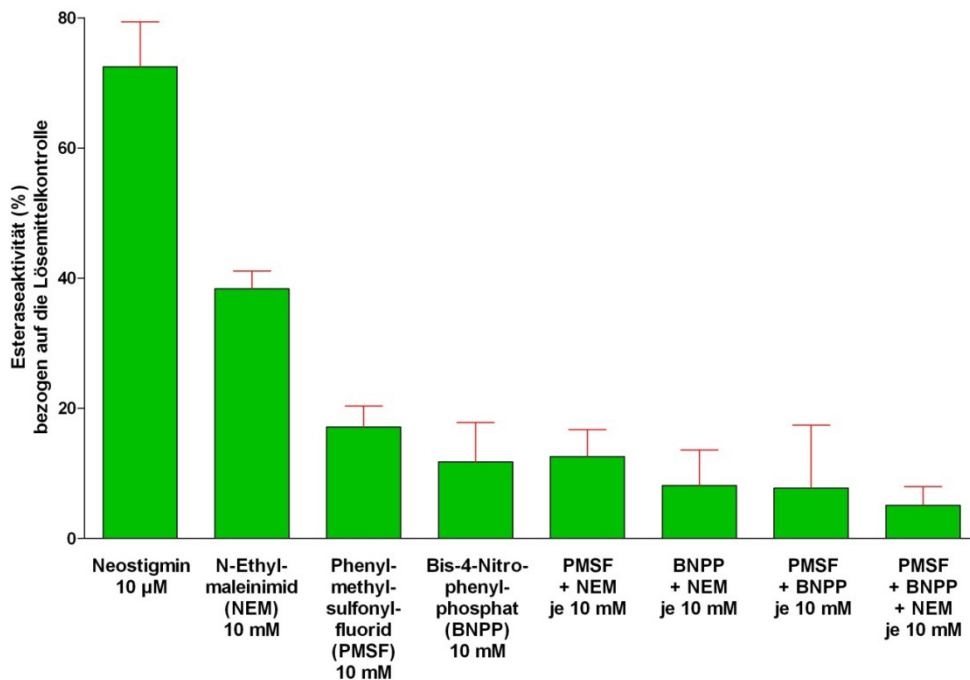


Abbildung 13: Verbliebene Esteraseaktivität frischer Humanhaut in Gegenwart verschiedener einzelner Inhibitoren und von Kombinationen. n=3 Spender, 11 Einzelversuche.

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass an der Umsetzung von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein neben Carboxylesterasen und Arylesterasen auch unspezifische Esterasen beteiligt sind. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden daher Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt.

3.4.2 Untersuchung der Genexpression

Für die Untersuchung der Genexpression in Humanhaut, RHE (EpiDerm), RHS (Phenion FT, EpiDerm-FT), humanen Keratinozyten (NHK), humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) und der Keratinozytenzelllinie HaCaT wurden Primer für folgende Esterasen nach erfolgreicher Überprüfung der Funktionsfähigkeit an HepG2-Zellen ausgewählt: Carboxylesterasen (CES1, CES2), Arylesterasen (PON1, PON2, PON3) (Tabelle 15, Seite 52). Nach Separation von Epidermis und Dermis am Phenion FT Konstrukt konnte das Vorkommen der Enzyme in den beiden Strata getrennt analysiert werden. Anhand der quantitativen Analyse der basalen relativen Genexpression konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Esterasen kutan exprimiert werden – wenn auch in unterschiedlicher Intensität (Abbildung 14).

Die Carboxylesterase 1 (CES1) wurde am stärksten in NHDF exprimiert. Humanhaut, rekonstruierte Humanhaut bzw. Epidermis zeigten eine mittelstarke Expression und bei den NHK war CES1 nur in einem geringen Ausmaß detektierbar. In der HaCaT-Zelllinie konnte, wie schon in der Literatur beschrieben [177], keine CES1-Expression nachgewiesen werden.

CES2 wurde in allen Testgeweben stark exprimiert, besonders stark bei der Epidermis des Phenion FT, sodass das Verhältnis zum Haushaltsgen, der Succinatdehydrogenase Untereinheit A (SDHA) > 1 war (Abbildung 14).

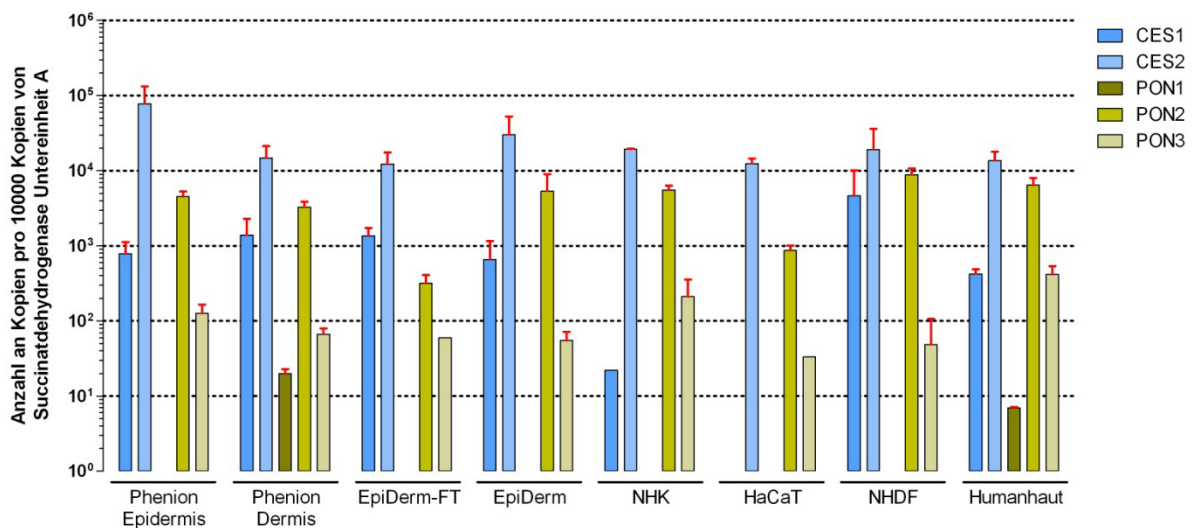


Abbildung 14: Quantitative Analyse der relativen Genexpression von Carboxylesterasen (CES1+2) und Arylesterasen (PON1-3) in Humanhaut und Hautzellen von drei verschiedenen Spendern. Logarithmische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=3. Succinatdehydrogenase Untereinheit A (SDHA) wurde als Haushaltsgen verwendet.

Die Arylesterase 1 (PON1) konnte nur in einigen Proben der Humanhaut und der Dermis von Phenion FT und nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. PON2 wies in EpiDerm-FT und der HaCaT-Zelllinie ein mittelstarkes Expressionsniveau auf, wohingegen sie in allen übrigen Geweben und Zellen stark exprimiert war. Die dritte Isoform der Arylesterasen (PON3) wurde in Phenion Epidermis, NHK und Humanhaut deutlich exprimiert, in den anderen Materialien war die Expression schwach (Abbildung 14).

3.4.3 Anhang: Untersuchung der Genexpression weiterer Metabolisierungsenzyme

Des Weiteren wurden Enzyme des oxidativen Metabolismus untersucht, insbesondere die Expression Cytochrom-P450 abhängiger Monooxygenasen CYP3A4 und CYP3A5 neben den vier Isoformen der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (AKR1C1-4).

CYP3A4 konnte, wie schon in vorangegangenen Untersuchungen, in NHK nicht nachgewiesen werden [5], auch nicht in NDHF. In der HaCaT-Zelllinie wurde jedoch CYP3A4 detektiert [43]. Wie schon bei der Biotransformation von FDA gesehen, unterscheiden sich die Eigenschaften der HaCaT-Zelllinie von denen der primären Keratinozyten. Am stärksten war CYP3A4 im RHS EpiDerm-FT exprimiert, in den anderen Konstrukten und Humanhaut war eine geringere Expression nachweisbar, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wird [100]. Zwar wurde in allen Chargen der RHS/RHE eine CYP3A4-Expression beobachtet, jedoch mussten wegen der hohen Ansprüche an die qualitative PCR-Messmethode einige

Daten aufgrund theoretischer Unselektivitäten der Primer in höheren PCR-Zyklen ($C_p \geq 35,0$) von der Auswertung ausgeschlossen werden.

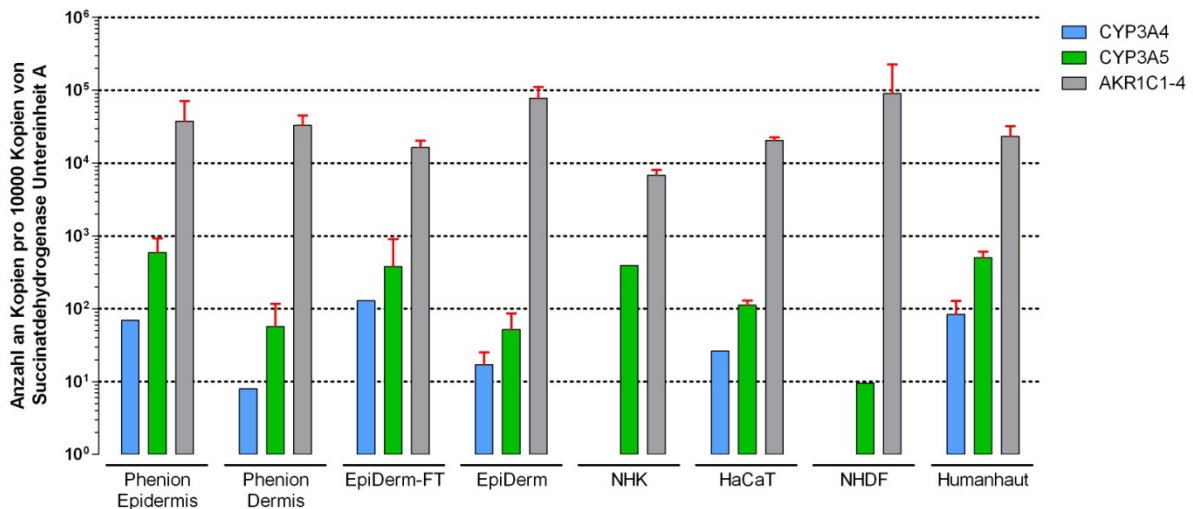


Abbildung 15: Quantitative Analyse der relativen Genexpression von Enzymen des oxidativen Testosteron-Metabolismus in Humanhaut und Hautzellen von drei verschiedenen Spendern. Logarithmische Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung, n=3. Succinatdehydrogenase Untereinheit A (SDHA) wurde als Haushaltsgen verwendet.

CYP3A5 war hingegen in jedem der Gewebe exprimiert. Epidermis von Phenion FT, EpiDerm-FT, Humanhaut und NHK wiesen dabei ein mittelstarkes, Dermis von Phenion FT, EpiDerm und HaCaT ein schwaches und NHDF ein sehr geringes Expressionsniveau auf. Die Genexpression von AKR1C1-4 war in allen untersuchten Geweben und Zellen stark, besonders stark konnte sie im RHE EpiDerm und den NHDF nachgewiesen werden (Abbildung 15).

3.5 Erstellte Standardarbeitsvorschriften (SOPs)

Die im Rahmen der Dissertation entwickelten Testmethoden zur „Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur“ (8.1.1, Seite 112), „Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis“ (8.1.1, Seite 112) und „Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut“ (8.1.3, Seite 145) wurden durch das Erstellen von standardisierten Arbeitsvorschriften den Projektpartnern und anderen Wissenschaftlern zugänglich gemacht. Diese SOPs sind der Arbeit angehängt (Kapitel 8, Seite 112).

Diskussion

4 Diskussion

Dermale Esterasen sind eine wichtige Komponente im Fremdstoffmetabolismus der Haut. Die Esteraseaktivität in dermale Gewebe von Mensch und Ratte ist in unterschiedlicher Verarbeitung (humane Mikrosomen und Zytosol [121], Humanhauthomogenisat [102], Rattenhauthomogenisat [157]) und häufig mittels monosubstituierten Esterverbindungen als Esterasesubstrat, wie Ethylnicotinat [102], untersucht worden. Hierzu wurden verschiedenste chromatographische sowie spektroskopische Analysemethoden, wie HPLC-, UV- und fluorimetrische Verfahren eingesetzt [3, 8, 102, 103, 121, 156, 157]. Eine vergleichende Quantifizierung der Esteraseaktivität von Humanhaut und rekonstruierten Humanhäuten wurde jedoch bislang noch nicht durchgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen Esteraseaktivitätsbestimmung entwickelt, die nicht nur für Homogenisate von Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis, sondern auch in zweidimensionalen Kulturen humaner dermaler Zellen einsetzbar ist. Diese Standardmethode ist ein wichtiger Schritt in der Grundlagenforschung lokal angewandter Dermatika oder dermal absorbierten Stoffe. Die schnelle und unkomplizierte Methode zur Untersuchung der Esteraseaktivität ermöglicht für Prednicarbat und weitere lokal angewandte Glucocorticoide (Betamethason-17-valerat, Clobetason-17-propionat, Beclometason-dipropionat, Fluticason-17-propionat), die zur Behandlung von Dermatitiden oder entzündlichen Atemwegserkrankungen eingesetzt werden [71, 76, 140, 158, 174], sowie für Chemikalien und auch Kosmetikbestandteile die Einschätzung von Wirksamkeit und Sicherheit. Des Weiteren können vergleichende Untersuchungen von *in vitro* Testsystemen Differenzen in den Biotransformationskapazitäten identifizieren. Dabei sollte die Übertragbarkeit von in Zelllinien generierten Versuchsergebnissen auf primäre Zellen (sowie umgekehrt) kritisch hinterfragt werden.

4.1 Entwickelte Methoden

4.1.1 Humanhautaufschluss

Die Humanhauthomogenisation mittels TissueLyser II stellt unter den getesteten mechanischen Aufschlüssen die schonendste und sauberste Methode dar (3.1.3, Seite 59). Das makroskopische Erscheinungsbild der Humanhaut wirkte nur teilweise aufgeschlossen. Der Einsatz von Verdauungsenzymen, wie Kollagenasen, die eine Lockerung des Zellverbandes bewirken würden, kam aufgrund des unbekanntes Risikos einer Beeinflussung der Enzymreaktion bei der Esterhydrolyse jedoch nicht infrage. Somit könnte die Esteraseaktivität der Humanhaut unterschätzt worden sein.

4.1.2 Esteraseaktivitätsbestimmung

Enzymkinetische Daten können mittels dieser einfachen Methode anhand der FDA-Hydrolyse innerhalb von 30 Minuten generiert werden, ohne dass es aufwändiger Extraktionsverfahren oder einer komplexen Analytik bedarf. Das computergestützte halbautomatische Injektionssystem des verwendeten Plattenlesegerätes FLUOstar ermöglicht dabei eine genaue zeitliche Applikation der Testsubstanz und Messung der Fluoreszenzintensität. Bei einem maximalen Zeitaufwand von 45 Minuten pro Probe (Homogenisation des Untersuchungsmaterials + Messung) kann auf diese Weise die Esteraseaktivität von bis zu 50 Gewebeproben pro Arbeitswoche quantifiziert werden. Damit können Ergebnisse schneller als mit einer HPLC-Analytik bestimmt werden, da lange Inkubationszeiten sowie zeitintensive Extraktionsschritte entfallen.

Die Entwicklung der Esteraseaktivitätsbestimmung lehnt sich an verschiedene Arbeiten an. Rotman und Papermaster [129] legten den Grundstein für die Nutzung von FDA zur Untersuchung der Zellviabilität. Die „fluorimetric microculture cytotoxicity assay“, kurz FMCA-Methode [79], welche die Zytotoxizität von Tumortheraeutika (72 Stunden Inkubation) untersucht, nutzt dafür den Umsatz von FDA zu Fluorescein in viablen Zellen. Die FMCA-Methode und die entwickelte Esteraseaktivitätsbestimmungsmethode zeigen, dass die Hydrolyse von Estern durch Esterasen eine Eigenschaft eines viablen, zur Biotransformation fähigen Systems ist. Die Weiterentwicklung der FMCA-Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität von Umweltchemikalien in der Dissertation von Frau Heike Sommer [150] sowie die qualitative Bestimmung der Esteraseaktivität in humanen Kornea-Konstrukten mittels FDA [142] haben den Entwicklungsprozess der Esteraseaktivitätsbestimmungsmethode beeinflusst.

Anders als bei der FMCA-Methode, die eine längerdauernde Inkubation erforderte, konnten aufgrund der hier kurzen Versuchszeit von circa 30 Minuten die äußeren Vertiefungsreihen der 96-Loch Platte ebenfalls benutzt werden. Fehler infolge des Verdunstens des Lösemittels waren nicht zu erwarten und der Probendurchsatz konnte damit erhöht werden.

Esterasesubstrat FDA

In den Strukturen von FDA und Prednicarbat zeigen sich strukturellen Unterschiede. FDA besitzt ein Xanthengrundgerüst und einen Lactonring, wohingegen Prednicarbat ein Steroidgrundgerüst aufweist (Tabelle 19, Seite 88). Die physikochemischen Eigenschaften (Molekulargewicht, logP, H-Donor/-Akzeptor) von FDA und Prednicarbat deuten (bis auf die H-Donation) nach der modifizierten „Rule of five“ [19, 165] auf eine gute Permeation der Untersuchungssubstanzen durch die Haut hin (Tabelle 19, Seite 88). Der genaue Ablauf des Biotransformationsmechanismus ist für Prednicarbat bekannt [42]. Bei FDA kommt es vermutlich erst zur Hydrolyse der beiden Phenolester, bevor sich der Lactonring öffnet und die stabilere chinoide Form

von Fluorescein entsteht. Die Ergebnisse zur FDA-Biotransformation zeigen, dass neben der hydrolytischen Esterspaltung Carboxyl- und Arylesterase (aromatische Carboxylester [61] und Spaltung des γ -Lactonrings [122]) für die Umsetzung verantwortlich sind (3.4.1, Seite 71; Abbildung 14, Seite 73). Es ist zu vermuten, dass Prednicarbat strukturell bedingt ein anderes Esterasemuster (vorrangig Carboxylesterasen) aufweist, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Messmethode

Die Überprüfung und Adjustierung der Fluoreszenzintensität vor dem Start von Testprotokoll 3 (Tabelle 13, Seite 40) könnte einen systematischen Messfehler darstellen. Die Adjustierung der Sensitivität des Photomultipliers der Detektionsoptik auf 95% für die höchste Fluorescein-Standardkonzentration könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung ausgeübt haben. Diese Überprüfung diente der Inprozesskontrolle des höchsten Fluoresceinmessstandards. Wie aus Tabelle 18 ersichtlich, unterscheiden sich die mittleren Justierungswerte zwischen den Testprotokollen 2 und 3 nur geringfügig. Die maximal aufgetretene prozentuale Abweichung zwischen dem Justierungswert von Testprotokoll 3 zu Testprotokoll 2 beträgt für Zellen 1,77% und für Homogenisat 0,40% bezogen auf den kleineren dazugehörigen Justierungswert (Daten nicht gezeigt), und liegt somit unter dem Wert des Variationskoeffizienten (relativen Standardabweichung) (Tabelle 18). Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass der zeitliche Abstand zwischen den Fluoreszenzmessungen für den FDA-Umsatz nahezu identisch war. Zur Reduktion dieser möglichen Beeinflussung könnte zukünftig ein willkürlicher Wert für alle Messungen festgelegt werden. Die Alternative dazu wäre die Übernahme des Justierungswertes von Testprotokoll 2 für Testprotokoll 3 je Platte. Aufgrund der Betrachtung der sich bildenden Änderung der Fluoreszenzintensität bezogen auf eine Standardkurve wären beide Vorschläge möglich. Am sinnvollsten bzw. praktikabelsten erscheint die Fixierung des Justierungswertes auf Grundlage der bisher generierten Daten getrennt nach Zellen und Homogenisat (Tabelle 18). Dadurch würde sich die Zeit zwischen den zwei aufeinanderfolgenden Fluoreszenzmessungen etwas reduzieren. Die Harmonisierung des Justierungswertes hätte aber auch eine gleichbleibende Sensitivität der Detektionsoptik zur Folge, wodurch die Ergebnisse unter gleichen Voraussetzungen generiert würden. Es wäre zu prüfen, inwieweit sich durch die Modifikation der bisherigen Messmethode die Fluoreszenzintensitätsmesswerte verändern.

Tabelle 18: Methodenparameter der Esteraseaktivitätsmessung.

		Zellen	Homogenisat
Anzahl gemessener Platten	n	39	68
zeitlicher Abstand zwischen den Fluoreszenzmessungen	\bar{X} [min]	9,97	9,24
	SD [min]	0,09	0,02
	Vk [%]	0,86	0,22
Justierungswert für Testprotokoll 2	\bar{X} [willkürliche Einheit]	1035,10	1012,62
	SD [willkürliche Einheit]	26,95	8,01
	Vk [%]	2,60	0,79
Justierungswert für Testprotokoll 3	\bar{X} [willkürliche Einheit]	1034,10	1013,39
	SD [willkürliche Einheit]	27,00	6,95
	Vk [%]	2,61	0,69

Datenauswertung

Als Referenz für die Beurteilung der Esteraseaktivität der Konstrukte wurde frische Humanhaut verwendet.

Der Kurvenverlauf für die Fluorescein-Standardkonzentrationen folgt keinem linearen Zusammenhang. Daher wurde den Daten entsprechend ein komplexeres Kurvenanpassungsmodell (zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion) gewählt. Versuche, auf ein einfacheres lineares Modelle umzusteigen, scheiterten am vergleichsweise hohen Umsatz des RHS Phenion FT.

Anhand der Nachweisgrenze wurden alle nicht hinreichend sicheren Mittelwerte der Rohdaten aus der Berechnung der enzymatischen Fluoresceinbildung ausgeschlossen. Die Bestimmungsgrenze erhöhte zudem die Qualität der Auswertung, indem sie die Fluoreszenzwerte nach enzymatischer FDA-Spaltung (eS) und die der Fluorescein-Standardkonzentrationen vor der Quantifizierung der Fluorescein-Konzentration eliminierte, die keine akzeptable Präzision und Richtigkeit aufwiesen.

Zur Berechnung der enzymkinetischen Parameter wurden zunächst die Formel nach Michaelis-Menten genutzt (Gleichung 16, Seite XII) [52]. Im Laufe der Versuche fielen jedoch systematische Abweichungen der Umsatzgeschwindigkeits-Substratkonzentrations-Diagramme auf, die einen sigmoidalen Kurvenverlauf anstelle des erwarteten hyperbolischen andeuteten (Abbildung 16A). Hinzukam, dass nach Lineweaver-Burk-Umformung, zur rechnerisch-graphischen Aktivitäts- und

Konstantenbestimmung, die Messpunkte eine parabolische Anordnung anstelle der theoretischen Gerade zeigten (Abbildung 16B).

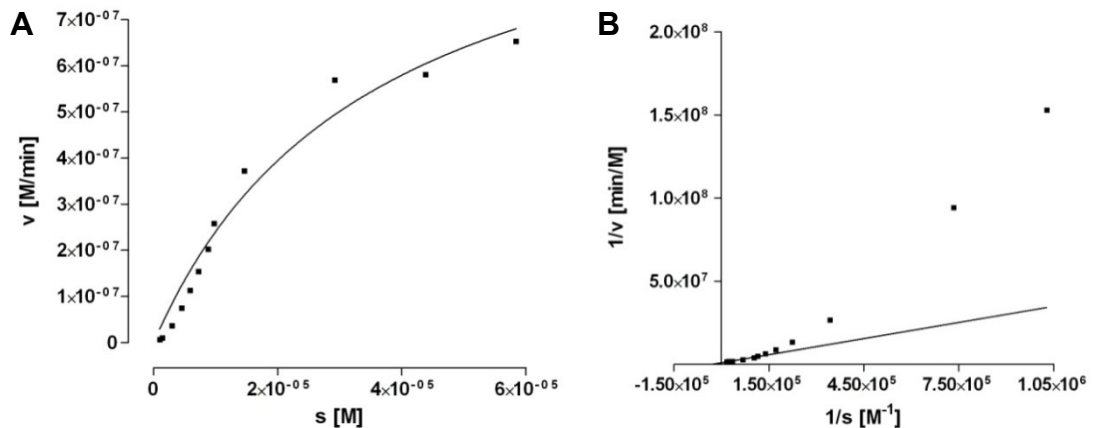


Abbildung 16: Umsatzgeschwindigkeit versus Substratkonzentration: sigmoidaler Kurvenverlauf bei Michaelis-Menten-Auswertung (A) und parabolische Beziehung nach Lineweaver-Burk-Umformung (B) am Beispiel eines Spenders.

Ein sigmoidaler Kurvenverlauf weist auf allosterisches Verhalten eines Enzyms hin, welches mit einer positiven Kooperativität im Zusammenhang stehen kann. Diese Vermutung konnte durch Auswertung nach Hill bestätigt werden [25, 143]. Das Hill-Modell (Gleichung 7, Seite XI) konkret der Hill-Koeffizient (h) bieten die Möglichkeit zwischen allosterisch-negativ kooperativen, nicht kooperierenden (Michaelis-Menten-Kinetik) und allosterisch-positiv kooperativen Enzymen zu unterscheiden. Per Definition ist ein Enzym mit einem Hill-Koeffizienten $h < 1$ allosterisch-negativ kooperativ, mit einem Koeffizienten $h = 1$ ein Michaelis-Menten-Enzym und mit $h > 1$ allosterisch-positiv kooperativ [25, 143]. Zur weiteren Absicherung der positiven Kooperativität wurde im Folgenden der Kooperativitätsindex R_s (Verhältnis der Substratkonzentrationen bei der 90% gegenüber 10% von v_{\max} erreicht werden) bestimmt. Dieses Verhältnis beträgt bei Michaelis-Menten-Enzymen 81. $R_s < 81$ bestätigt somit eine allosterisch-positive Kooperativität (Abbildung 10 (Seite 64) und Abbildung 11 (Seite 66)).

Der $s_{0,5}$ -Wert ist eine Enzymkonstante. Sie stellt eine enzymcharakteristische Größe über die Art der Enzyme dar, die auch bei Enzymgemischen einsetzbar zu sein scheint. Denn trotz der mittels Genexpression nachgewiesenen unterschiedlichen Quantitäten der Enzymzusammensetzungen der untersuchten Homogenisate waren keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Konstrukten der gleichen Konstruktionsart (RHS/RHE) im $s_{0,5}$ -Wert erkennbar (Abbildung 10, Seite 64, Abbildung 11, Seite 66). Der signifikante Unterschied des $s_{0,5}$ -Wertes zwischen Phenion FT und EpiDerm ist dagegen zum einen durch die Kultivierungsbedingungen

aber auch durch die Expression der FDA-Biotransformationsenzyme in der Dermis und deren Enzymaktivität im Phenion FT zu begründen.

4.1.3 Viabilitätsuntersuchung

Basierend auf den Daten der zellulären Esteraseaktivitätsbestimmung mit FDA sowie durch den Einsatz von FDA im Rahmen des FMCA zur Bestimmung der Zytotoxizität von Tumorthapeutika [79], wurden keine zellschädigenden Einflüsse durch FDA erwartet. Diese Hypothese konnte mit dem MTT-Test bestätigt werden. FDA beeinflusste bei der quantitativen Bestimmung der Esteraseaktivität die Viabilität der zweidimensionalen Zellkultur nicht. Die große Schwankungsbreite der Ergebnisse (Abbildung 9, Seite 62) spiegelt die große biologische Variabilität der verschiedenen Spender und die geringe Stichprobenanzahl der Versuche wider. Des Weiteren waren die Resultate innerhalb der verschiedenen Zellchargen in Abhängigkeit der Passagezahl heterogen. Dies zeigte sich im Besonderen bei der HaCaT-Zelllinie [11, 24]. Die Gründe dafür werden in Kapitel 4.2 (Seite 82ff) diskutiert.

Auf eine Prüfung der Viabilität der rekonstruierten Humanhaut und Humanhautproben mittels MTT wurde durch die Nutzung von Homogenisaten zur Untersuchung der Esteraseaktivität indes verzichtet.

Die Sensitivität auf Basis der fluorimetrischen Messmethode FMCA ist gegenüber der UV/VIS-Spektroskopie des MTT-Assays erhöht, wodurch auch Umsätze im unteren Konzentrationsbereich besser detektiert werden können. Damit könnte die entwickelte FDA-Methode die Viabilität über die Esteraseaktivität empfindlicher detektieren als der MTT-Test, unter der Voraussetzung, dass nur Zellmembranschäden zu erfassen sind.

4.1.4 Esteraseinhibition

Die Versuche an homogenisierter frischer Humanhaut haben gezeigt, dass mehrere Esterasen an der Umsetzung von FDA zu Fluorescein beteiligt sind (Abbildung 13, Seite 72). Eine nahezu vollständige Inhibition der Esteraseaktivität gelang durch die Kombination von Carboxylesterase-, Arylesterase- und einem unspezifischen Serinproteaseinhibitor. Die in der Literatur für die Untersuchung der Esteraseaktivität von Serum, Enzymextrakten, subzelluläre Fraktionen oder aufgeschlossenen Hautproben verschiedener Spezies verwendeten Konzentrationen betragen 1 μM bis 5 mM für BNPP und PMSF [8, 48, 52, 53, 65, 121, 159, 164, 176]. Neostigmin [48, 121] und NEM [81] wurden in den in der Literatur beschriebenen Versuchen in einer Konzentration von 1 μM und respektive 200 μM eingesetzt. Aufgrund von Vorversuchen wurden bei den eigenen Untersuchungen an homogenisierter Humanhaut Endkonzentrationen eingesetzt, welche die in der Literatur genannten Konzentrationen um bis zu eine Zehnerpotenz überstiegen (BNPP, PMSF, NEM:

10 mM; Neostigmin: 10 μ M). Eine Optimierung anhand umfassender konzentrationsabhängiger Untersuchungen erscheint wünschenswert.

PMSF ist hydrolyseempfindlich und weist bei pH 8 eine Halbwertszeit von 35 Minuten auf [62]. Daher wurde die anfängliche Applikationsreihenfolge „Inhibitorvorlage → Homogenisatzugabe“ gewählt. Doch zeigte PMSF erst nach Umstellung der Reihenfolge auf „Homogenisatvorlage → Inhibitorzugabe“ (2.2.7, Seite 48) einen inhibitorischen Effekt. Die Ursache dafür könnte möglicherweise in der unzureichenden Löslichkeit von PMSF bei Vorlage in die Plattenvertiefung und anschließender Verdunstung des Acetons liegen.

4.2 Dermale Esterasen

Die zweidimensionale Zellkultur wurde in erster Linie für die Etablierung des FDA-Testsystems verwendet. Die Ergebnisse bestätigen (Abbildung 10, Seite 64) die tendenziell geringere Esteraseaktivität von NHDF gegenüber NHK [42].

Die HaCaT-Zelllinie wurde zur Prüfung der Qualität des Testverfahrens eingesetzt. Bei der Zelllinie ist eine spenderspezifische Variabilität ausgeschlossen. Dies wird an den Variationskoeffizienten der HaCaT-Zelllinie, verglichen mit primären Zellen, deutlich. Die HaCaT-Zelllinie wies eine statistisch signifikant geringere Esteraseaktivität (Passagen 39-58) als NHK auf. Ursache dafür könnte neben der Spender-genetischen Disposition unter anderem das Lebensalter des HaCaT-Spenders (62 Jahre) und damit verbunden die Seneszenz der Zellen sein. Die beobachtete starke Streuung der Esteraseaktivität ab der 60. Passage der HaCaT-Zelllinie deutet auf eine Redifferenzierung der Zelllinie bei höheren Passagen hin. Dies wird durch Studien unterstrichen, die einen linearen Zusammenhang zwischen der steigenden Passagierungsanzahl und der vermehrten Bildung von Tumoren der HaCaT-Zelllinie (tumorigenes Potential) entdeckt haben [11, 24].

Wie zu erwarten war, zeigte gefrorene Haut eine geringere Enzymaktivität als frische. Durch den Einfrierprozess von Humanhaut wurden die Enzyme höchstwahrscheinlich degradiert, wie Untersuchungen des Energiestoffwechsels gezeigt haben [67]. Nur frische Humanhaut kann daher bei Biotransformationsuntersuchungen als Referenz dienen. Eine erhöhte Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) in Kulturmedien gefrorener Haut [93, 104] ist durch die Freisetzung von LDH bedingt und deutet auf eine Zellschädigung hin. Daher wurde eine geringe Freisetzung von LDH (gemessen als Enzymaktivität) als Qualitätsmerkmal der rekonstruierten Humanhäute bzw. Epidermis im BMBF-Forschungsprojekt gewertet.

Beim Aufbau der RHS/ RHE werden Zellen von Einzelspendern verwendet. Dabei hat jeder Hersteller (Henkel, FU, MatTek) seine eigenen Zellspender, aus deren Haut die NHK und NHDF isoliert werden. Die Phenion FT-Konstrukte werden immer aus demselben Spender (sowohl NHK als auch NHDF) aufgebaut. Für die FU-eigenen Konstrukte und bei den

Hautproben wurde für jede untersuchte Charge ein anderer Spender verwendet. MatTek verwendet verschiedene Spender für den Bau der Konstrukte sowohl innerhalb des EpiDerm-FT als auch zwischen EpiDerm und EpiDerm-FT (persönliche Kommunikation mit MatTek). Entgegen der hohen Chargenkonformität durch die Nutzung des selben Einzelspenders von NHK und NHDF beim Phenion FT und der darum vermuteten geringen Variabilität der Esteraseaktivität, war die Streuung der Esteraseaktivität stärker ausgeprägt als erwartet - wohingegen die auf verschiedenen Einzelspendern basierenden Konstrukte geringere Schwankungen in der Esteraseaktivität aufwiesen (Abbildung 11, Seite 66).

Die RHS (EpiDerm-FT, Phenion FT, FU normal und FU barrieredefizitär) unterscheiden sich zudem makroskopisch. EpiDerm-FT und die beiden FU-hausinternen Konstrukte zeichnen sich durch ein filigranes Erscheinungsbild, bedingt durch das starre Kollagengel, in das NHDF eingebettet und mit NHK überschichtet sind [165], aus. Die Kultivierungszeit nach „Air Lift“ beträgt für die FU-hausinternen Konstrukte 14 Tage [74]. Vom Hersteller der MatTek Konstrukte werden hierzu leider keine Angaben gemacht. Das Dermisäquivalent des Phenion FT besteht hingegen aus einer schwammartigen Kollagenmatrix, die durch chemische Quervernetzung eines zuvor gefriergetrockneten Kollagengels entsteht (Patent DE 10 2004 039 537 A1 and WO 2006 018147) [179], in das anschließend NHDF eingebettet werden [94, 180]. Dies ermöglicht den Fibroblasten eine freie Beweglichkeit und Zellteilung (Firma Henkel, persönliche Mitteilung). Die NHDF werden dazu zwei Wochen submers in der Matrix kultiviert, bevor NHK hinzugegeben werden. Letztendlich wird das Phenion FT insgesamt fünf Wochen herangezüchtet, von denen die letzten 12-14 Tage der Differenzierung der NHK nach „Air Lift“ dienen [178, 179].

Die RHS Phenion FT, das FU-eigene normale Konstrukt sowie das RHE EpiDerm wiesen großen Schwankungen nicht nur in den Esteraseaktivitätsergebnissen, sondern auch bei den $s_{0,5}$ -Werten auf. Der unterschiedliche Aufbau der Konstrukte könnte daher eine Ursache für die hohe Variabilität der Esteraseaktivität sein. EpiDerm-FT und die FU-eigenen Konstrukte gehören dem gleichen Bautyp an (siehe oben). Unter Berücksichtigung der Verwendung unterschiedlicher Spender sind die medianen Esteraseaktivitäten der FU-eigenen Konstrukte sowie deren Variabilität annähernd identisch gegenüber denen von EpiDerm-FT (Abbildung 11, Seite 66). Dabei fällt auf, dass die Variabilität der Ergebnisse des FU-eigenen normalen Konstrukts mit dem gezielten Ausschalten von Filaggrin mittels siRNA (FU barrieredefizitäres Konstrukt) sinkt (Abbildung 11, Seite 66). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass das gezielte Ausschalten von Proteinen über siRNA einen Einfluss auf die Enzymaktivität im Allgemeinen, und hier auf die Esteraseaktivität im Speziellen hat. Des Weiteren ist beim $s_{0,5}$ -Wert ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden FU-eigenen Konstrukten festzustellen (Abbildung 11, Seite 66). Möglicherweise beeinflusst der Filaggrin-Mangel die

Enzymausstattung der Keratinozyten. Diese Vermutung wäre jedoch mit weiteren Untersuchungen zu prüfen.

Aufgrund der verschiedenen Kulturbedingungen der Konstrukte lässt sich ein unterschiedlicher Differenzierungsgrad der Keratinozyten vermuten. Der Einfluss der Keratinozytendifferenzierung konnte anhand des Vergleiches der Esteraseaktivitäten von NHK und den Konstrukten gezeigt werden (3.2.2, Seite 65ff). Der marginale Esteraseaktivitätsunterschied der beiden MatTek Konstrukte (RHE: EpiDerm, RHS: EpiDerm-FT) ist auf einen ähnlichen Aufbau und Kulturbedingungen zurückzuführen. Der Einfluss der Fibroblasten auf die Esteraseaktivität des RHS EpiDerm-FT, ist - in Übereinstimmung mit den Resultaten in der zweidimensionalen Zellkultur - gering [42].

Die hohe Esteraseaktivität des Phenion FT (Abbildung 11, Seite 66) könnte unter anderem aufgrund eines erhöhten Vorkommens von Esterasen, repräsentiert durch die sehr starke CES2-mRNA-Genexpression in der Epidermis und Dermis von Phenion FT (Abbildung 14, Seite 73), verursacht worden sein. Aber auch eine Beeinflussung der Keratinozytendifferenzierung in einem anderen Maße als bei EpiDerm und EpiDerm-FT (3.2.2, Seite 65ff) erscheint möglich. Neben der Induktion der Keratinozytendifferenzierung durch den „Air Lift“ kann bovines Serumalbumin (BSA), das im Phenion FT Erhaltungsmedium enthalten ist, angeregt durch sichtbares Licht einer Wellenlänge von 453 nm, zur Freisetzung von NO führen, das wiederum eine Differenzierung von Keratinozyten bedingt [78]. Die während des Mediumwechsels im Rahmen der Kultivierung unvermeidliche Lichtbestrahlung der Phenion FT-Konstrukte kann daher den Differenzierungsgrad der Zellen beeinflusst haben. Bedingt durch den daraus resultierenden größeren Anteil differenzierter Keratinozyten und den damit verbundenen höheren Proteingehalt ist eine erhöhte Esteraseaktivität denkbar. In der Literatur ist ein ähnlicher Effekt bereits für Heparanasen in NHK beschrieben worden [72]. Der hohe Proteingehalt könnte auch Ausdruck für die Alterung der Zellen im Konstrukt sein, da mit häufiger Passagierung und zunehmender Seneszenz von NHK ein erhöhter Proteingehalt assoziiert ist [16, 106]. Das Altern der Konstrukte (Kulturdauer fünf Wochen), das bei Zellen durch Absinken der Proliferationsfähigkeit, anhaltender metabolischer Aktivität und morphologischen Veränderungen (Zellgrößenzunahme) der Zellen charakterisiert ist [49, 89, 155], könnte die Esteraseaktivität des Phenion FT erhöht haben. Anhaltspunkte dafür bietet die gesteigerte Enzymaktivität der seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase in Fibroblasten [73]. Das Alter von Zellspendern (NHK-/NHDF-Spender bis zu 3 Jahre alt; nach Aussage der Firma Henkel) scheint jedoch keinen Einfluss zu haben [101]. Die Kulturbedingungen (Kultivierungszeiten vor dem „Air Lift“) und damit verbunden ein vermutlich höherer Anteil nicht-differenzierter Keratinozyten könnten ebenfalls für Unterschiede in der Esteraseaktivität

der verschiedenen Konstrukte verantwortlich sein. Zur Aufklärung der Ursachen für die erhöhte Esteraseaktivität des Phenion FT sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Das RHE EpiDerm und das RHS Phenion FT unterscheiden sich in den Kultivierungsbedingungen von den anderen Konstrukten sowie untereinander und können daher nicht direkt mit einem bauähnlichen Konstrukt verglichen werden. Dies wird zudem bei der Betrachtung des $s_{0,5}$ -Wertes deutlich. Der signifikant höhere $s_{0,5}$ -Wert des Phenion FT im Vergleich zum EpiDerm deutet darauf hin, dass der Konstruktionstyp (RHE, RHS) sowie die Kulturbedingungen (siehe oben) die Enzymausstattung beeinflussen können. Zwischen EpiDerm und EpiDerm-FT bzw. zu den FU-eigenen Konstrukten wurden bei der Esteraseaktivität und $s_{0,5}$ -Werten indes keine signifikanten Unterschiede gefunden. Dies kann z.B. durch das eingesetzte Zellmaterial von verschiedenen Spendern für die Konstruktion des EpiDerm-FT und des EpiDerm bedingt sein. Die NHDF im EpiDerm-FT leisten derweil nur einen sehr geringen Beitrag zur Esteraseaktivität [42]. Dass zwischen den $s_{0,5}$ -Werten von EpiDerm bzw. EpiDerm-FT und den FU-eigenen Konstrukten keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren, lässt sich durch die gleichartigen Kultivierungsbedingungen erklären.

Die Esteraseaktivität des RHE EpiDerm ist der von Humanhaut am ähnlichsten. Allerdings ist ein vollständiger Gewebeaufschluss der entscheidende Schritt in der Esteraseaktivitätsbestimmung. Angesichts der schwierigen und langdauernden Homogenisation der Humanhaut könnten die ermittelten Esteraseaktivitätswerte der Humanhaut unter dem wahren Wert liegen (4.1.1, Seite 76). Hierzu wären weiterführende Untersuchungen interessant.

Aus den ermittelten $s_{0,5}$ -Werten ist zu schließen, dass bei den untersuchten Geweben größtenteils die gleichen Enzyme an der Umsetzung von FDA zu Fluorescein beteiligt sind. Für eine genaue Bestimmung der Qualität und Quantität waren jedoch weiterführende Experimente in Form von Genexpressions- und Inhibitionsuntersuchungen notwendig. Die Genexpressionsuntersuchung ergab, dass die Carboxylesterasen (vor allem CES2) am stärksten in den untersuchten Geweben exprimiert wurden. Dies stimmt mit den Erkenntnissen aus den Inhibitionsversuchen überein, die eine starke Beteiligung von Carboxylesterasen gefolgt von Arylesterasen zeigten (Abbildung 13, Seite 72). Die schwächere CES1-mRNA-Expression von Humanhaut und dem RHE EpiDerm gegenüber den RHS (Abbildung 14, Seite 73) steht in Einklang mit der geringeren Esteraseaktivität (Abbildung 11, Seite 66). Die sehr starke CES2-mRNA-Expression in der Epidermis des RHS Phenion FT (Abbildung 14, Seite 73) ist vermutlich die Ursache für die hohe Esteraseaktivität (Abbildung 11, Seite 66). Dafür spricht, dass FDA ein Substrat der CES2 ist [171]. Das Fehlen von CES1-mRNA in der HaCaT-Zelllinie (Abbildung 14, Seite 73) korreliert

mit den Literaturdaten [177] und erklärt die geringe Esteraseaktivität (Abbildung 10, Seite 64).

Für die übrigen Isoformen 3, 4 (auch als CES6 bezeichnet) und 5 (auch als CES7 oder Cauxin bezeichnet) der Carboxylesterase konnten in der HepG2-Zelllinie keine adäquaten Primer identifiziert werden. CES3, 5 und 6 sind vorrangig im Gehirn oder Körperflüssigkeiten lokalisiert [55-58]. Zusätzlich zur Überprüfung in der HepG2 Zelllinie wurden die mRNA von CES3, CES4 und CES5 in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y durch Frau Nada Charbaji und speziell CES3 in der humanen Kolorektaladenokarzinomzelllinie HT29 [131] durch Frau Wiebke Klipper getestet. Dabei deutete sich in Vorversuchen mit den Primern für CES4 und CES5A(1+2) (Tabelle 15, Seite 52) eine mRNA-Expression in der Neuroblastomzelllinie an. Die übrigen Isoformen konnten jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zur vollständigen Aufklärung der Genexpression von CES3, CES4 und CES5 in Humanhaut und RHE sind daher weitere Untersuchungen nötig.

Die Detektion von PON1-mRNA in der Phenion Dermis und der Humanhaut (Abbildung 14, Seite 73) ist nicht abschließend erklärbar. Aufgrund der Tatsache, dass nicht in jeder untersuchten Charge PON1-mRNA detektiert wurde und NHDF und NHK PON1-mRNA nicht exprimieren (Abbildung 14, Seite 73), erscheint ein systematischer Fehler bei der Versuchsdurchführung (Epidermis/Dermis-Separation, Homogenisation, RNA-Isolation, cDNA-Synthese) unwahrscheinlich. Daher könnte es auf einen zufälligen Fehler zurückzuführen sein. In der Literatur wird PON1-mRNA bislang nur in Leber, Niere und Colon nachgewiesen [86]. Einige Wissenschaftler überlegen jedoch, ob die Möglichkeit einer lokalen Synthese - allerdings bei Mäusen - in Frage käme [88]. Anders als PON1 besitzen PON2 und PON3 nahezu keine Paraoxonase-Aktivität, aber eine große Lactonase-Aktivität [46]. Es ist zu vermuten, dass neben der hydrolytischen Spaltung des Laktorings PON2 und/oder PON3 dessen Öffnung beim Umsatz von FDA zu Fluorescein bewirken, wobei wahrscheinlich PON2 aufgrund der konstant hohen mRNA-Expression eine stärkere Beteiligung als PON3 hat (Abbildung 14, Seite 73). Entgegen der bisherigen Veröffentlichungen, die eine Expression von PON3-mRNA nur in Leber und Colon [125] oder verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes [146] bzw. in porkinem subkutanen Fettgewebe [75] postulieren, wurde nunmehr eine Expression von PON3-mRNA in NHK, NHDF, HaCaT, Humanhaut sowie rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis nachgewiesen (Abbildung 14, Seite 73).

Aus den Inhibitionsversuchen mit NEM kombiniert mit den Erkenntnissen der Genexpressionsuntersuchung wird deutlich, dass hauptsächlich PON2 aus der Gruppe der Arylesterasen an der Umsetzung von FDA zu Fluorescein in Humanhaut beteiligt zu sein scheint. Ihr Ausmaß ist jedoch deutlich geringer als bei den Carboxylesterasen trotz ähnlicher mRNA-Expressionslevel (Abbildung 13, Seite 72; Abbildung 14, Seite 73).

Auch die unspezifischen Esterasen haben einen Anteil an der FDA-Umsetzung. Aus den verschiedenen Esteraseinhibitorkombinationen wird ersichtlich, dass die Carboxylesterasen die größte Bedeutung bei der Umsetzung von FDA, gefolgt von den unspezifischen Esterasen und den Arylesterasen besitzen (Abbildung 14, Seite 73). Somit kann festgehalten werden, dass verschiedene Enzyme für die ermittelte Esteraseaktivität verantwortlich sind. Neben den allosterischen CES1 und CES2 trugen vermutlich PON2 und PON3 zu der Esteraseaktivität der Humanhaut und der Konstrukte bei. Aus den Ergebnissen der mRNA-Expressionslevels ergab sich folgende Rangfolge: CES2 > PON2 > CES1 > PON3 (Abbildung 14, Seite 73). Die Kooperativität könnte zudem auch Ausdruck für eine Interaktion der unterschiedlichen Esterasen/Enzyme sowie eine Kombination aus den allosterischen Esterasen/Enzymen und deren Wechselwirkung untereinander sein. Diese Hypothese ist jedoch zu überprüfen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen erscheint dies aber schwierig. Wie die Inhibitionsversuche gezeigt haben (Abbildung 13, Seite 72), ist eine Beeinflussung der FDA-Hydrolyse durch unspezifische Esterasen und/oder andere hydrolytische Enzyme, die sich im Hauthomogenisat befinden, nicht auszuschließen. Auch die CES und PON unterliegen einem Polymorphismus [123, 132, 168], wodurch die biologische Streuung der Esteraseaktivitäts- und Genexpressionsergebnisse erklären könnte.

4.3 Korrelation esteratischer Spaltung von FDA und Prednicarbat

Die anhand der Spaltung von FDA und Prednicarbat (PC) gemessene Esteraseaktivität unterschied sich in der Rangfolge der Untersuchungsgewebe nicht (3.3, Seite 68; Abbildung 12, Seite 69). Die rekonstruierten Humanhäute zeigten bei beiden Testsubstanzen eine ähnliche Aktivität wie die rekonstruierte humane Epidermis, wohingegen die Humanhaut eine geringere Aktivität aufwies. Eine lineare Korrelation zwischen der Esteraseaktivität und der PC-Biotransformation bestand jedoch nicht; so dass mit dem Vorhersagemodell bisher nur qualitative Aussagen möglich sind, keine quantitativen.

Dies wird durch die Beteiligung unterschiedlicher Esterasen an der Umsetzung der Testsubstanzen verursacht. FDA wird durch Carboxylesterasen und Arylesterasen umgesetzt (Abbildung 13, Seite 72; Abbildung 14, Seite 73), wohingegen die PC-Biotransformation - abgeleitet von der Struktur - vermutlich nur mittels Carboxylesterasen stattfindet (dies war nicht Gegenstand der Arbeit). Daneben können die verschiedenen Inkubationszeiten und der Umgang mit den Geweben/Konstrukten eine Ursache für die begrenzte Aussagekraft des Vorhersagemodells sein. Für den PC-Metabolismus wurde eine wässrige PC-Lösung auf die intakte Konstrukt-/Gewebeoberfläche appliziert und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C die Enzymreaktion mit NaF abgestoppt, die

Die gewählten Methoden zur Erstellung eines Vorhersagemodells scheinen aufgrund der unterschiedlichen Nutzung/Aufbereitung des Gewebematerials nicht geeignet. Allerdings haben sich neben den physikochemischen Gemeinsamkeiten von FDA und PC (Tabelle 19, Seite 88), die auf eine erfolgsversprechende Prädiktion hindeuteten, Unterschiede in der Esterasenbeteiligung bei der Biotransformation herauskristallisiert.

4.4 Genexpression weiterer Phase-I-Metabolisierungsenzyme

Testosteron wird als OECD-Standardsubstanz zur Untersuchung der perkutanen Absorption in *in vitro* Testsystemen, wie rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis, eingesetzt. Daher sind Erkenntnisse zu Vorkommen sowie Biotransformationkompetenz in diesen Konstrukten im Vergleich zur Humanhaut essentiell. Testosteron wird unter anderem durch die Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase CYP3A4 (Hauptmetabolisierungsenzym der Leber) in 6 β -Hydroxytestosteron (6- β -OHT) umgewandelt.

In der menschlichen Haut wird CYP3A4 vorrangig in der Epidermis exprimiert [63, 110], allerdings nur in sehr geringen Mengen [148, 175] und teilweise erst nach Enzyminduktion mit Dexamethason [5].

Dies erklärt die Abwesenheit von CYP3A4 in NHDF und die in der vorliegenden Arbeit gefundene geringe Expression von CYP3A4 bei Humanhaut (Abbildung 15, Seite 74). Weiterhin stimmen die fehlende Expression von CYP3A4 (Abbildung 15, Seite 74) in NHK [5] sowie die geringe Expression in den verschiedenen rekonstruierten Humanhäuten [100] mit den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen überein. In EpiDerm gelang jedoch erstmals der Nachweis von CYP3A4, entgegen der Literatur [59]. Möglicherweise ist der Differenzierungsgrad der Zellen für die Expression von CYP3A4 verantwortlich (Abbildung 15, Seite 74). Auffällig ist, dass primäre Zellen wie NHK und NHDF kein CYP3A4 exprimieren, wohl aber Phenion Dermis (bestehend aus NHDF), und dass eine stärkere Expression in EpiDerm-FT (Epidermis und Dermis) als in EpiDerm stattfindet. Die Expression von CYP3A4 in der HaCaT-Zelllinie unterliegt offensichtlich großen Schwankungen [43, 63], der sich möglicherweise durch den Einsatz verschiedener Subklone bzw. unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen in den Studien erklären lässt.

Aus der gleichen CYP-Familie wurde CYP3A5 untersucht. Dieses wird in allen relevanten Geweben stärker als CYP3A4 exprimiert [100, 110]. Anders als CYP3A4 scheint die Expression von CYP3A5 unabhängig vom Differenzierungsgrad des Untersuchungsgewebes zu sein. In NHK, weniger stark in NHDF und Phenion Dermis, war CYP3A5 nachweisbar. Der Grund für die geringe Expression von CYP3A5 im EpiDerm ist unbekannt. Sie wird jedoch durch Forschungsergebnisse anderer Autoren bestätigt [59].

Die Genexpression der 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ III (AKR1C2) [154], im Androgen-Stoffwechsel für die Umwandlung von Dihydrotestosteron (DHT) in Androstan-3 α ,17 β -diol (AL) und von Androsterondion (AD) in Androsteron (AS) verantwortlich, wurde ebenfalls untersucht, wobei der Primer neben diesem Enzym drei weitere Isoformen der Aldo-Ketoreduktase Familie 1 (AKR1C1 bis AKR1C4) aufgrund der großen Sequenzhomologie [154] innerhalb der Aldo-Ketoreduktase Familie 1 erfasste. Aufgrund der gleichen PCR-Produktgrößen konnten die vier Isoformen nicht voneinander unterschieden werden. AKR1C1-4 konnten in jedem der getesteten Gewebe nachgewiesen werden, besonders stark war die Expression im RHE EpiDerm und in NHDF. Vergleichsweise gering war die Expression in NHK.

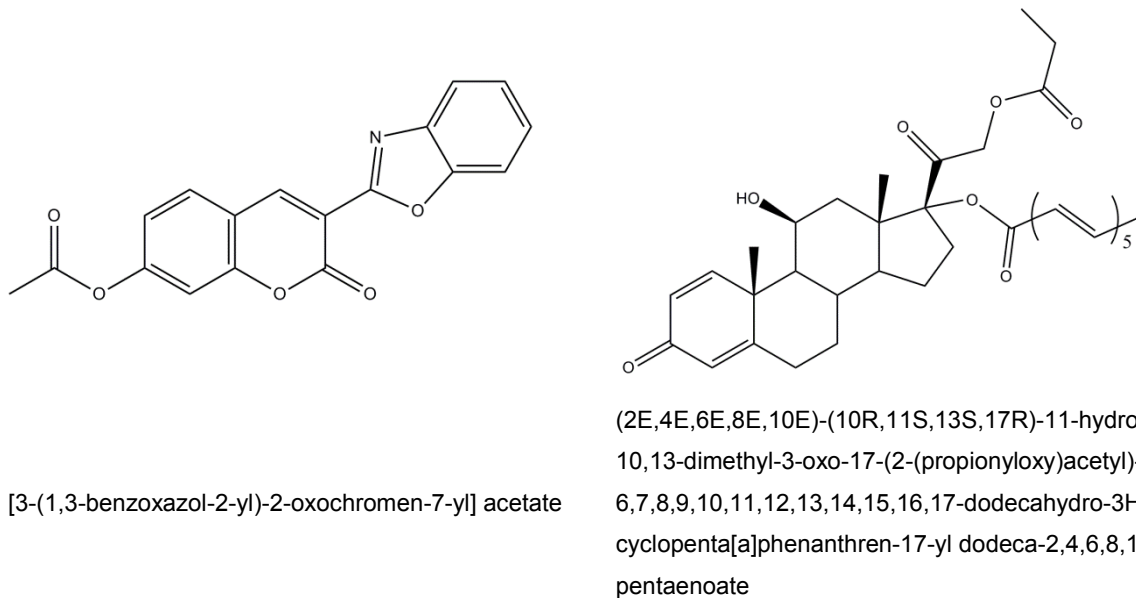
Der Nachweis von Testosteron-biotransformierenden Enzymen sollte zukünftig in Penetrationsstudien beachtet werden. Die Enzymexpressionsmuster der rekonstruierten Humanhäute (AKR1C1-4>CYP3A5>CYP3A4) sind mit denen der Humanhaut identisch (Abbildung 15, Seite 74). Sie unterscheiden sich lediglich in den Quantitäten. Um den Zusammenhang zwischen Enzymexpression und Enzymaktivität nachzuweisen, wurde letztere mittels HPLC/Radiodetektor-gestützter Analytik von Frau Wiebke Klipper untersucht und ausgewertet [69].

4.5 Ausblick

Möglicherweise würden sich die Differenzen in der Korrelation der Esteraseaktivität von FDA und dem Prednicarbat (PC)-Metabolismus nivellieren und eine eindeutigere Korrelation ergeben, wenn anstelle von FDA eine Substanz verwendet werden würde, deren Metabolismus PC gleicht und die dennoch genauso gut wie FDA detektierbar ist. Des Weiteren wären Erkenntnisse über die PC-umsetzenden Enzyme für die Substanzauswahl hilfreich. Kommerziell erhältliche Umbelliferon-Derivate, wie 3-(2-Benzoxaolyl)-umbelliferylacetat, werden leider diesen strukturellen Anforderungen nicht annähernd gerecht (Tabelle 20) und weisen zudem zusätzlich ein enzymatisch hydrolysierbares Strukturelement auf (Laktonring). Eine Prednicarbat-analoge Testsubstanz wäre ideal (Tabelle 20). Eine Veresterung von Prednisolon an Position 17 beispielsweise mit einer fluoreszierenden Decapentaencarbonsäure [37], würde eine sehr starke Abweichung bei Molekulargewicht und theoretischen logP von Prednicarbat bedeuten (Vgl. Tabelle 19, Seite 88). Diese Parameter, als Ausdruck für Permeationseigenschaften, sind für die Untersuchung der Esteraseaktivität im Homogenisat von untergeordneter Rolle. Das Molekulargewicht und die sich daraus ergebende Molekülgröße könnten aber die Passgenauigkeit in den Enzymtaschen beeinflussen. Prednisolon-17-ethylcarbonat,21-phenylacetat, dem eine vergleichbare Biotransformation in NHK und NHDF wie PC

nachgewiesen wurden [76, 133], ist leider zur fluoreszenzbasierten Esteraseaktivitätsbestimmung nicht geeignet, da ein aktivierbares konjugiertes System, indem die Elektronen verschieblich sind, fehlt.

Tabelle 20: Vorschläge für mögliche Testsubstanzen anstelle von FDA.



$M = 321,28 \text{ g/mol}$

theoretischer $\log P = 3,12 \pm 0,32$ [20, 161, 162]

Wasserstoffbrücken-Akzeptor: 6

Wasserstoffbrücken-Donator: 0

$M = 588,73 \text{ g/mol}$

theoretischer $\log P = 5,59 \pm 1,01$ [20, 161, 162]

Wasserstoffbrücken-Akzeptor: 6

Wasserstoffbrücken-Donator: 1

Die hohe Widerstandsfähigkeit der Humanhaut erschwert den Aufschluss. Die Eignung von Verdauungsenzymen, wie Kollagenasen, sollten zur Verbesserung des Aufschlussverfahrens getestet werden. Es muss allerdings ausgeschlossen werden, dass durch den Einsatz eine Beeinflussung der Ergebnisse/Aussagefähigkeit der Esteraseaktivitätsbestimmung auftritt. Des Weiteren sind Untersuchungen zur Lagerfähigkeit der Homogenisate interessant. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich frische Homogenisate verwendet. Sollten auch auf Vorrat hergestellte Homogenisate einsetzbar sein, könnte damit die oft schlechte Verfügbarkeit frischer Hautproben kompensiert werden. Als weiterführende Untersuchungen zur Inhibition der Esteraseaktivität sind die Optimierung der Inhibitor-Konzentrationen sowie die Zytotoxizitätsprüfung der einzelnen Inhibitoren mittels MTT-Test durchzuführen. Die Inhibitionstests der Esteraseaktivität an rekonstruierter Humanhaut stehen noch aus, wobei eine Auftrennung der Gewebe in Epidermis und Dermis

wünschenswert ist, um die Carboxyl-/Arylesterasen zu lokalisieren. Ergänzend sollte die Lokalisation der Enzyme in der primären Zellen (NHK, NHDF) sowie rekonstruierter Humanhaut/Epidermis auch immunhistochemisch erfasst werden.

Die Komplettierung der Genexpressionsuntersuchung mit den noch fehlenden CES-Isoenzymen (CES3-5) sowie eine getrennte Analyse der Isoenzyme der Aldo-Ketoreduktase Familie 1 (AKR1C1-4) sind erstrebenswert. Ferner sollte der Einfluss von FDA und Prednicarbat auf die Genregulation der Esterasen geprüft werden. Sowohl CES als auch PON können mittels verschiedenen Arzneistoffe induziert (Dexamethason, Fenofibrat, Resveratrol) oder auch herunter reguliert werden (Pravastatin, Simvastatin, Fluvastatin) [40, 41, 153].

Von anderen Forschergruppen werden für die Untersuchung von Enzymaktivitäten (auch der Esteraseaktivität) subzelluläre Fraktionen (Mikrosomen und Zytosol) [43, 44, 121] oder reine Enzymextrakte [170, 171] eingesetzt. Auch diese Systeme sollten getestet werden. Die Untersuchung der Esteraseaktivität der einzelnen Isoenzyme mittels rekombinanter Isoenzyme ist ebenfalls vorstellbar [170]. Dadurch würde der Anteil der einzelnen Isoenzyme am Umsatz von FDA ermittelbar. Kombiniert mit der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) [119] könnte damit unter anderem der Nachweis über die Anzahl der Bindungsstellen bei der Reaktion mit FDA sowie ein weiterer Beweis für das kinetische Verhalten (Allosterie) der einzelnen Esterasen erbracht werden [50, 119].

Die Kombination der bisher gewonnenen Erkenntnisse über Carboxyl- und Arylesterase in der Haut mit den oben beschriebenen ergänzenden Untersuchungen würden es ermöglichen, die Biotransformationsprozesse der Haut genauer zu verstehen. Dieses Wissen wäre unter anderem für die Entwicklung neuer Stoffe (Kosmetikbestandteile/Arzneimittel) und die Beurteilung von Sicherheitsrisiken (Chemikalien, Kosmetikbestandteile, Arzneimittel) in *in vitro* Testsystemen von hoher Bedeutung.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Die Haut ist eine wichtige Körpergrenzfläche, die mit Kosmetika, Arzneimitteln und oft mit Chemikalien in Berührung kommt. Für die Abschätzung von Gefahren für Mensch und Umwelt durch neu entwickelte (Neustoffe) sowie bereits etablierte Stoffe (Altstoffe) erlangt auch die metabolische Kompetenz von Humanhaut in Hinblick auf Toxifizierung oder Detoxifizierung Bedeutung. Im Rahmen der REACH-Gesetzgebung sind für Sicherheitstestungen Tierversuche – sofern möglich - durch geeignete *in vitro* Testsysteme zu ersetzen. Unter den Metabolisierungsenzymen haben Esterasen einen hohen Stellenwert. Dermale Esterasen sind unter anderem an der Aktivierung von Esterprodrugs, wie z.B. Prednicarbat, das zur topischen Therapie von entzündlichen Hauterkrankungen eingesetzt wird, beteiligt. Lipophile Arzneistoffe, wie Ester, können die lipophile Barriere des Stratum corneum überwinden. In der Epidermis werden die Esterschutzgruppen von den aktiven Esterasen abgespalten und - bei Prodrugs - der Wirkstoff freigegeben.

Mit der in der vorliegenden Arbeit entwickelten halbautomatischen Fluoresceindiacetat (FDA)-Methode wird die Änderung der Fluoreszenzintensität bei enzymatischer Umsetzung von nicht-fluoreszierendem FDA zu fluoreszierendem Fluorescein innerhalb von 10 Minuten zur Quantifizierung der Esteraseaktivität genutzt. Diese Methode zur Bestimmung der Esteraseaktivitäten in Zellkulturen sowie Geweben kann ohne einen hohen apparativen Aufwand durchgeführt werden und stellt eine einfache, schnelle und preiswerte Alternative zur HPLC-Analytik dar. Diese Methode ermöglichte erstmals den Vergleich der Esteraseaktivitäten (v_{max}) rekonstruierter Humanhäute (RHS) bzw. Epidermis (RHE) mit frischer Humanhaut. Zusammen mit den weiterführenden Untersuchungen zur Inhibition der Enzyme und der quantitativen PCR-Analytik, konnte ein Teil der verantwortlichen Esterasen (CES1/2 + PON2/3) für die Biotransformation von FDA in der Haut identifiziert werden. Die RHS Phenion FT zeigte dabei die höchste Esteraseaktivität, die mit einer erhöhten CES2-Genexpression in der Epidermis korrelierte. Die Studie hat weiterhin ergeben, dass die RHE EpiDerm bezogen auf die FDA-Biotransformation eine ähnliche metabolische Kompetenz aufweist wie die Humanhaut, weshalb dieses Konstrukt als geeignet für Ester-Biotransformationsuntersuchungen erscheint. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Resultaten der Korrelation, die einen Unterschied zwischen Konstrukten und Humanhaut identifiziert. Das in der Humanhaut nachgewiesene Expressionsmuster der CYP-Enzyme und der Aldo-Ketoreduktase Familie 1 stimmt hingegen mehr mit dem der rekonstruierten Humanhäute (RHS) überein.

Die stetig steigende Bedeutung von alternativen *in vitro* Testmethoden aufgrund gesetzlicher Regelungen wird weitere vergleichende Untersuchungen anderer Enzymssysteme der Haut

auf Aktivitäts- und Genexpressionsebene erfordern. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden weiterhin dazu führen, dass Versuche an Tieren und/oder Humanhaut reduziert bzw. ersetzt werden können.



Summary

6 Summary

The skin is an important interface of organisms, which comes into contact with cosmetics, drugs and often chemicals. Due to the REACh legislation, the assessment of risks for humans and the environment because of the production and consumption of newly developed and already established substances is of crucial interest. Therefore, the metabolic capacity associated with toxifying or de-toxifying processes of substances in human skin and skin equivalent, respectively, is focused on. Among the metabolizing enzymes, esterases are found omnipresent not only in human tissues. They play a very important role in biotransformation processes. Dermal esterases are responsible for the activation of ester prodrugs, as Prednicabate, which is used for topical treatment of inflammatory skin diseases with glucocorticoids of medium strength. Drugs with lipophilic structure elements like an ester are able to overcome lipophilic barriers without loss of efficacy. Afterwards, esterases cleave the ester-protecting group of the prodrug and the active agent is released.

The developed semi-automatic fluorescein diacetate method (FDA-method) to quantify esterase activity is based on the change of fluorescence intensity by enzymatic hydrolysis of non-fluorescent fluorescein diacetate (FDA) to fluorescent fluorescein within 10 minutes. This FDA-method is a simple, fast and inexpensive alternative to HPLC analysis. For the first time esterase activity (v_{max}) has been comparatively analysed in reconstructed tissues and human skin. Together with the results of enzyme inhibition and gene expression by real time PCR, CES1/2 and PON2/3 are identified as parts of enzymes which are responsible for FDA biotransformation. The RHS Phenion FT shows highest activity levels, which correlate with its high CES2 gene expression. Furthermore, the study shows that esterase activity of RHE EpiDerm is comparable to that of human skin, thus it seems to be suitable for investigations into ester biotransformation. However, this conflicts with the results of the correlation analyses, which indicate differences between constructs and human skin. In contrast, the gene expression pattern of CYP-enzymes and aldo-ketoreductase family 1 in human skin agrees more with RHS.

The continuously rising importance of *in vitro* alternative methods due to the valid legislation will need more comparable analyses of other enzymes of the skin with regard to activity and gene expression. Those results will lead to further reduction or replacement of animal test or test with human skin.

Literaturverzeichnis

7 Literaturverzeichnis

1. **Abdulmajed, K., C. McGuigan, and C. M. Heard.** 2006. Topical delivery of retinyl ascorbate co-drug. 5. In vitro degradation studies. *Skin Pharmacol Physiol* **19**:248-58.
2. **Ackermann, K., S. L. Borgia, H. C. Korting, K. R. Mewes, and M. Schäfer-Korting.** 2010. The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol Physiol* **23**:105-12.
3. **Barker, C. L., and R. H. Clothier.** 1997. Human keratinocyte cultures as models of cutaneous esterase activity. *Toxicol In Vitro* **11**:637-40.
4. **Barker, C. L., M. T. McHale, A. K. Gillies, J. Waller, D. M. Pearce, J. Osborne, P. E. Hutchinson, G. M. Smith, and J. H. Pringle.** 2004. The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol* **123**:892-901.
5. **Baron, J. M., D. Höller, R. Schiffer, S. Frankenberg, M. Neis, H. F. Merk, and F. K. Jugert.** 2001. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**:541-8.
6. **Bencharit, S., C. C. Edwards, C. L. Morton, E. L. Howard-Williams, P. Kuhn, P. M. Potter, and M. R. Redinbo.** 2006. Multisite promiscuity in the processing of endogenous substrates by human carboxylesterase 1. *J Mol Biol* **363**:201-14.
7. **Berridge, M. V., and A. S. Tan.** 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* **303**:474-82.
8. **Beydon, D., J. P. Payan, and M. C. Grandclaude.** 2010. Comparison of percutaneous absorption and metabolism of di-n-butylphthalate in various species. *Toxicol In Vitro* **24**:71-8.
9. **Black, A. F., F. Berthod, N. L'heureux, L. Germain, and F. A. Auger.** 1998. In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. *FASEB J* **12**:1331-40.
10. **Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106**:761-71.
11. **Boukamp, P., S. Popp, S. Altmeyer, A. Hülsen, C. Fasching, T. Cremer, and N. E. Fusenig.** 1997. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer* **19**:201-14.
12. **Bouwstra, J. A., H. W. Groenink, J. A. Kempenaar, S. G. Romeijn, and M. Ponec.** 2008. Water distribution and natural moisturizer factor content in human skin equivalents are regulated by environmental relative humidity. *J Invest Dermatol* **128**:378-88.
13. **BRD.** 2012. Arzneimittelgesetz (AMG). 24.08.1976.
14. **BRD.** 2010. Tierschutzgesetz (TierSchG). 24.07.1972.
15. **Brohem, C. A., L. B. Cardeal, M. Tiago, M. S. Soengas, S. B. Barros, and S. S. Maria-Engler.** 2011. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**:35-50.
16. **Brégègère, F., Y. Soroka, J. Bismuth, B. Friguet, and Y. Milner.** 2003. Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. *Exp Gerontol* **38**:619-29.
17. **Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino.** 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:328-40.
18. **Chiang, A., E. Tudela, and H. I. Maibach.** 2012. Percutaneous absorption in diseased skin: an overview. *J Appl Toxicol* **32**:537-63.

19. **Choy, Y. B., and M. R. Prausnitz.** 2011. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharm Res* **28**:943-8.
20. **Computer Aided Drug Design.** Chemical Identifier Resolver beta 4. Nation Cancer Institute/ Computer Aided Drug Design, <http://cactus.nci.nih.gov/chemical/structure>.
21. **Damour, O., C. Augustin, and A. F. Black.** 1998. Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. *Med Biol Eng Comput* **36**:825-32.
22. **Darbre, P. D., and P. W. Harvey.** 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol* **28**:561-78.
23. **Del Rosso, J. Q., and J. Levin.** 2011. Clinical relevance of maintaining the structural and functional integrity of the stratum corneum: why is it important to you? *J Drugs Dermatol* **10**:s5-12.
24. **Donfack, P., M. Rehders, K. Brix, P. Boukamp, and A. Materny.** 2010. Micro Raman spectroscopy for monitoring alterations between human skin keratinocytes HaCaT and their tumorigenic derivatives A5RT3—toward a Raman characterization of a skin carcinoma model. *J. Raman Spectrosc.* **41**:16-26.
25. **Dugal, B. S.** 1973. Allosterie und Cooperativität bei Enzymen des Zellstoffwechsels. *Biologie in unserer Zeit* **3**:40-49.
26. **ECVAM.** 2012. Methods validation > regulatory Acceptance, <http://ecvam.jrc.it/>.
27. **eREACH** 2007, posting date. Elearning Lehrgang zu REACH. DHI water and environment, HSE consult, Ökopol GmbH. [Online.]
28. **EU.** 2003/15/EG. 7. Änderung der Richtlinie 76/768/EWG. 2003.
29. **EU.** 1907/2006. EU Verordnung 1907/2006 (REACH-Verordnung). 2006.
30. **EU.** 1223/2009. Kosmetikverordnung. 2009.
31. **EU.** 2001/83/EG. Richtlinie 2001/83/EG (Arzneimittelrichtlinie). 2001.
32. **Europäische Kommission, E. K.** 2011. Kommission berichtet über Fortschritte bei der Entwicklung von Alternativmethoden für Tierversuche bei Kosmetika, <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/11/1028&format=HTML&aged=0&language=DE&guiLanguage=en>.
33. **Facy, V., V. Flouret, M. Régnier, and R. Schmidt.** 2004. Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol* **122**:552-3.
34. **Fleming, C. D., S. Bencharit, C. C. Edwards, J. L. Hyatt, L. Tsurkan, F. Bai, C. Fraga, C. L. Morton, E. L. Howard-Williams, P. M. Potter, and M. R. Redinbo.** 2005. Structural insights into drug processing by human carboxylesterase 1: tamoxifen, mevastatin, and inhibition by benzil. *J Mol Biol* **352**:165-77.
35. **Fluhr, J. W., J. Kao, M. Jain, S. K. Ahn, K. R. Feingold, and P. M. Elias.** 2001. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol* **117**:44-51.
36. **Fritsch, P.** 2009. *Dermatologie und Venerologie für das Studium.* Springer, Berlin, Heidelberg. Seite 11f.
37. **Förster, T.** 1982. *Fluoreszenz organischer Verbindungen, Unveränd. Nachdr. d. 1. Aufl., im Literaturverz. erg. um spätere Veröff. des Autors ed. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.* Seite 97.
38. **Gibbs, S., J. J. van de Sandt, H. F. Merk, D. J. Lockley, R. U. Pendlington, and C. K. Pease.** 2007. Xenobiotic metabolism in human skin and 3D human skin reconstructs: a review. *Curr Drug Metab* **8**:758-72.
39. **Gonska, H.** 2008. Isolierung der Keratinocyten aus der juvenilen Vorhaut mit Dispase, p. 7, Arbeitskreis interne Standardarbeitsanweisung.
40. **Gouédard, C., R. Barouki, and Y. Morel.** 2004. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:2378-83.
41. **Gouédard, C., N. Koum-Besson, R. Barouki, and Y. Morel.** 2003. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* **63**:945-56.

42. **Gysler, A., K. Lange, H. C. Korting, and M. Schäfer-Korting.** 1997. Prednicarbate biotransformation in human foreskin keratinocytes and fibroblasts. *Pharm Res* **14**:793-7.
43. **Götz, C., R. Pfeiffer, J. Tigges, V. Blatz, C. Jäckh, E. M. Freytag, E. Fabian, R. Landsiedel, H. F. Merk, J. Krutmann, R. J. Edwards, C. Pease, C. Goebel, N. Hewitt, and E. Fritsche.** 2012. 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* **21**:358-363.
44. **Götz, C., R. Pfeiffer, J. Tigges, K. Ruwiedel, U. Hübenthal, H. F. Merk, J. Krutmann, R. J. Edwards, J. Abel, C. Pease, C. Goebel, N. Hewitt, and E. Fritsche.** 2012. 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* **21**:364-9.
45. **Hammer, S., I. Spika, W. Sippl, G. Jessen, B. Kleuser, H. D. Höltje, and M. Schäfer-Korting.** 2003. Glucocorticoid receptor interactions with glucocorticoids: evaluation by molecular modeling and functional analysis of glucocorticoid receptor mutants. *Steroids* **68**:329-39.
46. **Harel, M., A. Aharoni, L. Gaidukov, B. Brumshtein, O. Khersonsky, R. Meged, H. Dvir, R. B. Ravelli, A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, J. L. Sussman, and D. S. Tawfik.** 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* **11**:412-9.
47. **Harel, M., B. Brumshtein, R. Meged, H. Dvir, R. B. Ravelli, A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, and J. L. Sussman.** 2007. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol* **58**:347-53.
48. **Harville, H. M., R. Voorman, and J. J. Prusakiewicz.** 2007. Comparison of paraben stability in human and rat skin. *Drug Metab Lett* **1**:17-21.
49. **Hayflick, L., and P. S. Moorhead.** 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**:585-621.
50. **Hellmann, N., E. Jaenicke, and H. Decker.** 2001. Two types of urate binding sites on hemocyanin from the crayfish *Astacus leptodactylus*: an ITC study. *Biophys Chem* **90**:279-99.
51. **Hennings, H., and K. A. Holbrook.** 1983. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* **143**:127-42.
52. **Hewitt, P. G., J. Perkins, and S. A. Hotchkiss.** 2000. Metabolism of fluroxypyr, fluroxypyr methyl ester, and the herbicide fluroxypyr methylheptyl ester. II: in rat skin homogenates. *Drug Metab Dispos* **28**:755-9.
53. **Heymann, E., W. Hoppe, A. Krüsselmann, and C. Tschoetschel.** 1993. Organophosphate sensitive and insensitive carboxylesterases in human skin. *Chem Biol Interact* **87**:217-26.
54. **Hilz, H., U. Wieggers, and P. Adamietz.** 1975. Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *Eur J Biochem* **56**:103-8.
55. **Holmes, R. S., L. A. Cox, and J. L. Vandenberg.** 2009. A new class of mammalian carboxylesterase CES6. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* **4**:209-17.
56. **Holmes, R. S., L. A. Cox, and J. L. Vandenberg.** 2010. Mammalian carboxylesterase 3: comparative genomics and proteomics. *Genetica* **138**:695-708.
57. **Holmes, R. S., L. A. Cox, and J. L. Vandenberg.** 2008. Mammalian carboxylesterase 5: comparative biochemistry and genomics. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* **3**:195-204.

58. **Holmes, R. S., M. W. Wright, S. J. Laulederkind, L. A. Cox, M. Hosokawa, T. Imai, S. Ishibashi, R. Lehner, M. Miyazaki, E. J. Perkins, P. M. Potter, M. R. Redinbo, J. Robert, T. Satoh, T. Yamashita, B. Yan, T. Yokoi, R. Zechner, and L. J. Maltais.** 2010. Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. *Mamm Genome* **21**:427-41.
59. **Hu, T., Z. S. Khambatta, P. J. Hayden, J. Bolmarcich, R. L. Binder, M. K. Robinson, G. J. Carr, J. P. Tiesman, B. B. Jarrold, R. Osborne, T. D. Reichling, S. T. Nemeth, and M. J. Aardema.** 2010. Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDermin vitro 3D human epidermis model compared to human skin. *Toxicol In Vitro* **24**:1450-63.
60. **Hyatt, J. L., V. Stacy, R. M. Wadkins, K. J. Yoon, M. Wierdl, C. C. Edwards, M. Zeller, A. D. Hunter, M. K. Danks, G. Crundwell, and P. M. Potter.** 2005. Inhibition of carboxylesterases by benzil (diphenylethane-1,2-dione) and heterocyclic analogues is dependent upon the aromaticity of the ring and the flexibility of the dione moiety. *J Med Chem* **48**:5543-50.
61. **Imai, T.** 2006. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab Pharmacokinet* **21**:173-85.
62. **James, G. T.** 1978. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem* **86**:574-9.
63. **Janmohamed, A., C. T. Dolphin, I. R. Phillips, and E. A. Shephard.** 2001. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* **62**:777-86.
64. **Jean, J., M. Lapointe, J. Soucy, and R. Pouliot.** 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *J Dermatol Sci* **53**:19-25.
65. **Jewell, C., C. Ackermann, N. A. Payne, G. Fate, R. Voorman, and F. M. Williams.** 2007. Specificity of procaine and ester hydrolysis by human, minipig, and rat skin and liver. *Drug Metabol Dispos* **35**:2015-22.
66. **Kandárová, H.** 2006. Evaluation and validation of reconstructed human skin models as alternatives to animal tests in regulatory toxicology. Dissertation an der Freie Universität Berlin.
67. **Kao, J., F. K. Patterson, and J. Hall.** 1985. 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* **81**:502-16.
68. **Kezic, S., A. Kammeyer, F. Calkoen, J. W. Fluhr, and J. D. Bos.** 2009. Natural moisturizing factor components in the stratum corneum as biomarkers of filaggrin genotype: evaluation of minimally invasive methods. *Br J Dermatol* **161**:1098-104.
69. **Klipper, W.** in Vorbereitung.
70. **Korting, H. C., A. Unholzer, M. Schäfer-Korting, I. Tausch, J. Gassmueller, and K. H. Nietsch.** 2002. Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15**:85-91.
71. **Kubota, K., J. Ademola, and H. I. Maibach.** 1995. Simultaneous diffusion and metabolism of betamethasone 17-valerate in the living skin equivalent. *J Pharm Sci* **84**:1478-81.
72. **Kurdykowski, S., S. Mine, V. Bardey, L. Danoux, C. Jeanmaire, G. Pauly, E. Brabencova, Y. Wegrowski, and F. X. Maquart.** 2012. Ultraviolet-B irradiation induces epidermal up-regulation of heparanase expression and activity. *J Photochem Photobiol B* **106**:107-12.
73. **Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong, and J. D. Erusalimsky.** 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**:3613-22.
74. **Küchler, S., D. Henkes, K. M. Eckl, K. Ackermann, J. Plendl, H. C. Korting, H. C. Hennies, and M. Schäfer-Korting.** 2011. Hallmarks of atopic skin mimicked in vitro by means of a skin disease model based on FLG knock-down. *Altern Lab Anim* **39**:471-80.

75. **Labrecque, B., D. Beaudry, M. Mayhue, C. Hallé, V. Bordignon, B. D. Murphy, and M. F. Palin.** 2009. Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene* **443**:110-20.
76. **Lange, K., B. Kleuser, A. Gysler, M. Bader, C. Maia, C. Scheiderei, H. C. Korting, and M. Schäfer-Korting.** 2000. Cutaneous inflammation and proliferation in vitro: differential effects and mode of action of topical glucocorticoids. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **13**:93-103.
77. **Lebonvallet, N., C. Jeanmaire, L. Danoux, P. Sibille, G. Pauly, and L. Misery.** 2010. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur J Dermatol* **20**:671-84.
78. **Liebmann, J., M. Born, and V. Kolb-Bachofen.** 2010. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol* **130**:259-69.
79. **Lindhagen, E., P. Nygren, and R. Larsson.** 2008. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc* **3**:1364-9.
80. **Liu, Y., D. A. Peterson, H. Kimura, and D. Schubert.** 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* **69**:581-93.
81. **Lorentz, K., W. Wirtz, and T. Weiss.** 2001. Continuous monitoring of arylesterase in human serum. *Clin Chim Acta* **308**:69-78.
82. **Luger, T., K. Loske, P. Elsner, A. Kapp, M. Kerscher, K. HC, J. Krutmann, R. Niedner, M. Röcken, T. Ruzicka, and T. Schwarz.** 2009. Topische Dermatotherapie mit Glukokortikoiden - Therapeutischer Index, Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, vol. 013/034. Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften, http://www.derma.de/fileadmin/derma/pdfs/ll_glukokortikoide.pdf.
83. **Luu-The, V., D. Duche, C. Ferraris, J. R. Meunier, J. Leclaire, and F. Labrie.** 2009. 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* **116**:178-86.
84. **Luu-The, V., C. Ferraris, D. Duche, P. Belanger, J. Leclaire, and F. Labrie.** 2007. Steroid metabolism and profile of steroidogenic gene expression in Episkin: high similarity with human epidermis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **107**:30-6.
85. **Lüllmann-Rauch, R.** 2006. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 2., komplett überarb. Aufl. ed. Thieme, Stuttgart [u.a.]. Seite 519-27.
86. **Mackness, B., R. Beltran-Debon, G. Aragones, J. Joven, J. Camps, and M. Mackness.** 2010. Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* **62**:480-2.
87. **Marks, R.** 2004. The stratum corneum barrier: the final frontier. *J Nutr* **134**:2017S-2021S.
88. **Marsillach, J., B. Mackness, M. Mackness, F. Riu, R. Beltrán, J. Joven, and J. Camps.** 2008. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* **45**:146-57.
89. **Matsumura, T., Z. Zerrudo, and L. Hayflick.** 1979. Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *J Gerontol* **34**:328-34.
90. **MatTek Cooperation.** 2012. EpiDerm Spezifikation, <http://www.mattek.com/pages/products/epiderm/specification>.
91. **MatTek Cooperation.** 2012. EpiDerm-FT Spezifikation, <http://www.mattek.com/pages/products/epidermft/specification>.
92. **Mentlein, R.** 1986. The tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate and regulatory diacylglycerols are substrates for the same carboxylesterase. *J Biol Chem* **261**:7816-8.
93. **Messenger, S., A. C. Hann, P. A. Goddard, P. W. Dettmar, and J. Y. Maillard.** 2003. Assessment of skin viability: is it necessary to use different methodologies? *Skin Res Technol* **9**:321-30.

94. **Mewes, K. R., M. Raus, A. Bernd, N. N. Zöller, A. Sättler, and R. Graf.** 2007. Elastin expression in a newly developed full-thickness skin equivalent. *Skin Pharmacol Physiol* **20**:85-95.
95. **Mildau, G., and B. Huber.** 2010. Die neue EG-Kosmetikverordnung 1223/2009 - Inhalte und erste Erläuterungen. *Seifen Öle Fette Wachse Journal* **3**:40-60.
96. **Moll, I., E. U. Jung, and M. Augustin.** 2010. *Dermatologie, 7., komplett überarb. und erw. Aufl.* ed. Thieme, Stuttgart. Seite 3-16.
97. **Morita, K., and Y. Miyachi.** 2003. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci* **31**:81-9.
98. **Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
99. **Mullis, K. B., and F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50.
100. **Neis, M. M., A. Wendel, T. Wiederholt, Y. Marquardt, S. Jousen, J. M. Baron, and H. F. Merk.** 2010. Expression and induction of cytochrome p450 isoenzymes in human skin equivalents. *Skin Pharmacol Physiol* **23**:29-39.
101. **Ng, M. H., B. S. Aminuddin, S. Hamizah, C. Lynette, A. L. Mazlyzam, and B. H. Ruszymah.** 2009. Correlation of donor age and telomerase activity with in vitro cell growth and replicative potential for dermal fibroblasts and keratinocytes. *J Tissue Viability* **18**:109-16.
102. **Ngawhirunpat, T., N. Kawakami, T. Hatanaka, J. Kawakami, and I. Adachi.** 2003. Age dependency of esterase activity in rat and human keratinocytes. *Biol Pharm Bull* **26**:1311-4.
103. **Ngawhirunpat, T., P. Opanasopit, and S. Prakongpan.** 2004. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *Eur J Pharm Biopharm* **58**:645-51.
104. **Nicoli, S., and P. Santi.** 2007. Suitability of excised rabbit ear skin - fresh and frozen - for evaluating transdermal permeation of estradiol. *Drug Deliv* **14**:195-9.
105. **Niedner, R.** 1996. Glukokortikosteroide in der Dermatologie, p. A-2686-2872, vol. 93, Deutsches Ärzteblatt.
106. **Norsgaard, H., B. F. Clark, and S. I. Rattan.** 1996. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. *Exp Gerontol* **31**:563-70.
107. **OECD.** 2004. Test Guideline 431: In vitro skin corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
108. **OECD.** 2004. Test Guideline 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
109. **OECD.** 2010. Test Guideline 439: In vitro skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
110. **Oesch, F., E. Fabian, B. Oesch-Bartlomowicz, C. Werner, and R. Landsiedel.** 2007. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev* **39**:659-98.
111. **Oji, V., K. M. Eckl, K. Aufenvenne, M. Nätebus, T. Tarinski, K. Ackermann, N. Seller, D. Metze, G. Nürnberg, R. Fölster-Holst, M. Schäfer-Korting, I. Hausser, H. Traupe, and H. C. Hennies.** 2010. Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet* **87**:274-81.
112. **Ouwehand, K., S. W. Spiekstra, T. Waaijman, R. J. Scheper, T. D. de Gruijl, and S. Gibbs.** 2011. 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* **90**:1027-33.
113. **Pace, D. M., and A. Elliot.** 1962. Effects of acetone and phenol on established cell lines cultivated in vitro. *Cancer Res* **22**:107-12.
114. **Pagé, M., N. Bejaoui, B. Cinq-Mars, and P. Lemieux.** 1988. Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity. *Int J Immunopharmacol* **10**:785-93.

115. **Pen, J., and J. J. Beintema.** 1986. Nomenclature of esterases. *Biochem J* **240**:933.
116. **Phillips, T. J.** 1998. New skin for old: developments in biological skin substitutes. *Arch Dermatol* **134**:344-9.
117. **Ponec, M., E. Boelsma, S. Gibbs, and M. Mommaas.** 2002. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **15 Suppl 1**:4-17.
118. **Ponec, M., E. Boelsma, A. Weerheim, A. Mulder, J. Bouwstra, and M. Mommaas.** 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *Int J Pharm* **203**:211-25.
119. **Praefcke, G. J. K., and C. Herrmann.** 2005. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zur Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen. *BIOspektrum* **11**:44-47.
120. **Proksch, E., J. M. Brandner, and J. M. Jensen.** 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* **17**:1063-72.
121. **Prusakiewicz, J. J., C. Ackermann, and R. Voorman.** 2006. Comparison of skin esterase activities from different species. *Pharm Res* **23**:1517-24.
122. **Précourt, L. P., D. Amre, M. C. Denis, J. C. Lavoie, E. Delvin, E. Seidman, and E. Levy.** 2011. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis* **214**:20-36.
123. **Rajkovic, M. G., L. Rumora, and K. Barisic.** 2011. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med (Zagreb)* **21**:122-30.
124. **Rawlings, A. V., and C. R. Harding.** 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* **17 Suppl 1**:43-8.
125. **Reddy, S. T., D. J. Wadleigh, V. Grijalva, C. Ng, S. Hama, A. Gangopadhyay, D. M. Shih, A. J. Lusic, M. Navab, and A. M. Fogelman.** 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:542-7.
126. **Redinbo, M. R., and P. M. Potter.** 2005. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discov Today* **10**:313-25.
127. **Rheinwald, J. G., and H. Green.** 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**:331-43.
128. **Roche Diagnostics, G.** 2008. LightCycler 480 Instrument Operator's Manual Software Version 1.5, p. 395, http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf. Seite 161f.
129. **Rotman, B., and B. W. Papermaster.** 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**:134-41.
130. **Russell, W. M., and R. L. Burch.** 1959. The principles of humane experimental technique, 1. publ ed. Methuen, London.
131. **Sanghani, S. P., S. K. Quinney, T. B. Fredenburg, Z. Sun, W. I. Davis, D. J. Murry, O. W. Cummings, D. E. Seitz, and W. F. Bosron.** 2003. Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis. *Clin Cancer Res* **9**:4983-91.
132. **Sanghani, S. P., P. C. Sanghani, M. A. Schiel, and W. F. Bosron.** 2009. Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3. *Protein Pept Lett* **16**:1207-14.
133. **Santos Maia, C. F.** 2002. Verbesserung der topischen Glucocorticoidtherapie: Prüfung von neuen Wirkstoffen und SLN-Präparationen. Weißensee-Verl., Berlin. Seite 51f.
134. **Schackert, C., H. C. Korting, and M. Schäfer-Korting.** 2000. Qualitative and quantitative assessment of the benefit-risk ratio of medium potency topical corticosteroids in vitro and in vivo: characterisation of drugs with an increased benefit-risk ratio. *BioDrugs* **13**:267-77.

135. **Schlupp, P., T. Blaschke, K. D. Kramer, H. D. Höltje, W. Mehnert, and M. Schäfer-Korting.** 2011. Drug Release and Skin Penetration from Solid Lipid Nanoparticles and a Base Cream: A Systematic Approach from a Comparison of Three Glucocorticoids. *Skin Pharmacol Physiol* **24**:199-209.
136. **Schwanke, A.** 2009. In-vitro-Testung und Analytik innovativer DNA Polymerase-Alpha-Hemmer, entwickelt für die topische Behandlung von Plattenepithelkarzinomen und Basaliomen. Dissertation an der Freie Universität Berlin, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000006374/Diss_Schwanke-aktuellste_1.10.09-upload.pdf?hosts=. Seite 28.
137. **Schwanke, A., C. Murruzzu, B. Zdrzil, R. Zuhse, M. Natek, M. Höltje, H. C. Korting, H. U. Reissig, H. D. Höltje, and M. Schäfer-Korting.** 2010. Antitumor effects of guanosine-analog phosphonates identified by molecular modelling. *Int J Pharm* **397**:9-18.
138. **Schäfer-Korting, M., U. Bock, W. Diembeck, H. J. Dusing, A. Gamer, E. Haltner-Ukomadu, C. Hoffmann, M. Kaca, H. Kamp, S. Kersen, M. Kietzmann, H. C. Korting, H. U. Krachter, C. M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, C. Müller-Goymann, F. Netzlaff, F. Niedorf, M. K. Rübhelke, U. Schäfer, E. Schmidt, S. Schreiber, H. Spielmann, A. Vuia, and M. Weimer.** 2008. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Altern Lab Anim* **36**:161-87.
139. **Schäfer-Korting, M., U. Bock, A. Gamer, A. Haberland, E. Haltner-Ukomadu, M. Kaca, H. Kamp, M. Kietzmann, H. C. Korting, H. U. Krachter, C. M. Lehr, M. Liebsch, A. Mehling, F. Netzlaff, F. Niedorf, M. K. Rübhelke, U. Schäfer, E. Schmidt, S. Schreiber, K. R. Schröder, H. Spielmann, and A. Vuia.** 2006. Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. *Altern Lab Anim* **34**:283-94.
140. **Schäfer-Korting, M., B. Kleuser, M. Ahmed, H. D. Holtje, and H. C. Korting.** 2005. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action. *Skin Pharmacol Physiol* **18**:103-14.
141. **Schäfer-Korting, M., A. Mahmoud, S. Lombardi Borgia, B. Bruggener, B. Kleuser, S. Schreiber, and W. Mehnert.** 2008. Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. *Altern Lab Anim* **36**:441-52.
142. **Seeber, J. W., M. Zorn-Kruppa, S. Lombardi-Borgia, H. Scholz, A. K. Manzer, B. Rusche, M. Schäfer-Korting, and M. Engelke.** 2008. Characterisation of human corneal epithelial cell cultures maintained under serum-free conditions. *Altern Lab Anim* **36**:569-83.
143. **Segel, I. H.** 1975. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley, New York [u.a.]. Seite 1-4, 18-22, 346-66.
144. **Semlin, L., M. Schäfer-Korting, C. Borelli, and H. C. Korting.** 2011. In vitro models for human skin disease. *Drug Discov Today* **16**:132-9.
145. **Senger, E.** 2003. Trockene Haut: Von der Fehldiagnose zum Behandlungskonzept, Mai 2003 ed, vol. 1. DermoTopics (Organ der GD - Gesellschaft für Dermopharmazie e.V.), http://www.dermotopics.de/german/ausgabe_1_03_d/behandlungskonzept_1_2003_d.htm.
146. **Shamir, R., C. Hartman, R. Karry, E. Pavlotzky, R. Eliakim, J. Lachter, A. Suissa, and M. Aviram.** 2005. Paraoxonases (PONs) 1, 2, and 3 are expressed in human and mouse gastrointestinal tract and in Caco-2 cell line: selective secretion of PON1 and PON2. *Free Radic Biol Med* **39**:336-44.
147. **Sigma-Aldrich.** 2011. Proteinase K, vol. 2012, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>.

148. **Smith, G., R. S. Dawe, C. Clark, A. T. Evans, M. M. Comrie, C. R. Wolf, J. Ferguson, and S. H. Ibbotson.** 2003. Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of drug metabolizing and cytoprotective genes in psoriasis and regulation by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* **121**:390-8.
149. **Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
150. **Sommer, H.** 2006. Zyto- bzw. gentoxische Wirkschwel len von Gemischen aus 2 – 8 Umweltchemikalien in Abhängigkeit von der Lipophil ität der Komponenten. Dissertation an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, <http://d-nb.info/981261450/34>. Seite 13, 19-23, 34f.
151. **Spielmann, H., U. G. Sauer, and O. Mekenyan.** 2011. A critical evaluation of the 2011 ECHA reports on compliance with the REACH and CLP regulations and on the use of alternatives to testing on animals for compliance with the REACH regulation. *Altern Lab Anim* **39**:481-93.
152. **Spika, I., S. Hammer, B. Kleuser, H. C. Korting, and M. Schäfer-Korting.** 2003. Transcriptional activity of potent glucocorticoids: relevance of glucocorticoid receptor isoforms and drug metabolites. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **16**:143-50.
153. **Staudinger, J. L., C. Xu, Y. J. Cui, and C. D. Klaassen.** 2010. Nuclear receptor-mediated regulation of carboxylesterase expression and activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**:261-71.
154. **Steiner, A. Z., L. Chang, Q. Ji, M. Ookhtens, A. Stolz, R. J. Paulson, and F. Z. Stanczyk.** 2008. 3alpha-Hydroxysteroid dehydrogenase type III deficiency: a novel mechanism for hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:1298-303.
155. **Stocker, C. C.** 2008. Die Rolle des Inhibitors der DNA-Bindung Id2 aus der Familie der Helix-Loop-Helix-Faktoren bei zellulärer Seneszenz. Dissertation an der Freie Universität Berlin, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000003658/01_kap1.pdf;jsessionid=2A0866ABC833C4FEC578BFF6A00F72D6?hosts=. Seite 1-3.
156. **Sugibayashi, K., T. Hayashi, K. Matsumoto, and T. Hasegawa.** 2004. Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Drug Metab Pharmacokinet* **19**:352-62.
157. **Sugibayashi, K., T. Hayashi, and Y. Morimoto.** 1999. Simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin after its topical application: the effect of enzyme distribution in skin. *J Control Release* **62**:201-8.
158. **Svensson, C. K.** 2009. Biotransformation of drugs in human skin. *Drug Metab lism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* **37**:247-53.
159. **Tanino, T., A. Nawa, Y. Miki, and M. Iwaki.** 2008. Enzymatic stability of 2'-ethylcarbonate-linked paclitaxel in serum and conversion to paclitaxel by rabbit liver carboxylesterase for use in prodrug/enzyme therapy. *Biopharm Drug Dispos* **29**:259-69.
160. **Testa, B., and J. M. Mayer.** 2003. Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology. *Verl. Helvetica Chimica Acta [u.a.]*, Zürich. Seite 25-34.
161. **Tetko, I. V.** 2005. Computing chemistry on the web. *Drug Discov Today* **10**:1497-500.
162. **Tetko, I. V., J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk, and V. V. Prokopenko.** 2005. Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J Comput Aided Mol Des* **19**:453-63.
163. **Tjabringa, G., M. Bergers, D. van Rens, R. de Boer, E. Lamme, and J. Schalkwijk.** 2008. Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *Am J Pathol* **173**:815-23.
164. **Tsujita, T., and H. Okuda.** 1983. Human liver carboxylesterase. Properties and comparison with human serum carboxylesterase. *J Biochem* **94**:793-7.

165. **Van Gele, M., B. Geusens, L. Brochez, R. Speeckaert, and J. Lambert.** 2011. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. *Expert Opin Drug Deliv* **8**:705-20.
166. **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0034.
167. **Wadkins, R. M., J. L. Hyatt, X. Wei, K. J. Yoon, M. Wierdl, C. C. Edwards, C. L. Morton, J. C. Obenauer, K. Damodaran, P. Beroza, M. K. Danks, and P. M. Potter.** 2005. Identification and characterization of novel benzil (diphenylethane-1,2-dione) analogues as inhibitors of mammalian carboxylesterases. *J Med Chem* **48**:2906-15.
168. **Walter Soria, N., A. Belaus, C. Galván, M. Ana Pasquali, P. Velez, C. Del Carmen Montes, and D. M. Beltramo.** 2010. A simple allele-specific polymerase chain reaction method to detect the Gly143Glu polymorphism in the human carboxylesterase 1 gene: importance of genotyping for pharmacogenetic treatment. *Genet Test Mol Biomarkers* **14**:749-51.
169. **Walzer, C., M. Benathan, and E. Frenk.** 1989. Thermolysin treatment: a new method for dermo-epidermal separation. *J Invest Dermatol* **92**:78-81.
170. **Wang, J., J. Bourgea, E. T. Williams, N. Wong, and C. Patten.** 2009. Expression and Characterization of Recombinant Human Carboxylesterases 1 and 2 Expressed in Baculovirus-Infected High Five Insect Cells, Internation Society of Xenobiotics Meeting 2009.
171. **Wang, J., E. T. Williams, J. Bourgea, Y. N. Wong, and C. J. Patten.** 2011. Characterization of recombinant human carboxylesterases: fluorescein diacetate as a probe substrate for human carboxylesterase 2. *Drug Metab Dispos* **39**:1329-33.
172. **Weindl, G., F. Castello, and M. Schäfer-Korting.** 2011. Evaluation of anti-inflammatory and atrophogenic effects of glucocorticoids on reconstructed human skin. *Altern Lab Anim* **39**:173-87.
173. **Weyermann, J., D. Lochmann, and A. Zimmer.** 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* **288**:369-76.
174. **Wohlrab, J., G. M. Beck, R. H. Neubert, U. Sischka, and B. Kreft.** 2010. Hydrocortisone aceponate activity and benefit/risk ratio in relation to reference topical glucocorticoids. *Skin Pharmacol Physiol* **23**:177-82.
175. **Yengi, L. G., Q. Xiang, J. Pan, J. Scatina, J. Kao, S. E. Ball, R. Fruncillo, G. Ferron, and C. Roland Wolf.** 2003. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem* **316**:103-10.
176. **Yoshigae, Y., T. Imai, M. Taketani, and M. Otagiri.** 1999. Characterization of esterases involved in the stereoselective hydrolysis of ester-type prodrugs of propranolol in rat liver and plasma. *Chirality* **11**:10-3.
177. **Zhu, Q. G., J. H. Hu, J. Y. Liu, S. W. Lu, Y. X. Liu, and J. Wang.** 2007. Stereoselective characteristics and mechanisms of epidermal carboxylesterase metabolism observed in HaCaT keratinocytes. *Biol Pharm Bull* **30**:532-6.
178. **Zimmermann, E.** 2008. In-vitro-/ ex-vivo Hautmodelle zur Erfassung der Reaktion auf externe Reize sowie der Wirkung einer antiinflammatorischen Behandlung. Dissertation an der Universität Basel, http://edoc.unibas.ch/752/1/DissB_8246.pdf. Seite 14f.
179. **Zöller, N. N.** 2008. Weiterentwicklung und Evaluation eines drei-dimensionalen Hautmodelles zur pharmakologischen Testung. Dissertation an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main, <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/5796>. Seite 32f.
180. **Zöller, N. N., S. Kippenberger, D. Thaçi, K. Mewes, M. Spiegel, A. Sättler, M. Schultz, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann, and A. Bernd.** 2008. Evaluation of beneficial and adverse effects of glucocorticoids on a newly developed full-thickness skin model. *Toxicol In Vitro* **22**:747-59.

Anhang

8 Anhang

8.1.1 Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis



Institut für Pharmazie
Pharmakologie und
Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 2+4
14195 Berlin

Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des
BMBF-Projekts Hautmetabolismus
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter
Humanhaut bzw. Epidermis

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_ho mo_03
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite von 1 16
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung	
05.08.11	05.08.11	- Fehlerkorrektur zur besseren Verständlichkeit	
26.04.12	21.02.2013	- Einfügen der Berechnung der Nachweisgrenze	
27.11.12	21.02.2013	- Einfügen der Berechnung der Bestimmungsgrenze	
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting			
Erstellt: Franzisca Marie Bätz		Geprüft: S. Heilmann	Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Verteiler: Verbundpartner des Vorhabens Ersatzmethoden zum Tierversuch BfR, RWTH Aachen, BASF, Henkel AG, Freie Universität Berlin			

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz		2 16

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1 ZWECK	4
2 EINSATZBEREICH	4
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
3.1 allgemeine Abkürzungen	4
3.2 Probenabkürzungen	4
4 EINLEITUNG	5
5 GERÄTE, MATERIALIEN	5
5.1 Geräte	5
5.2 Materialien	5
5.3 Programme	6
5.4 Haut und Hautmodelle	6
6 SUBSTANZEN, LÖSUNGEN	6
6.1 Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Tris/Aceton	6
6.2 Fluorescein-Eichlösungen I und II	6
6.3 Fluoresceindiacetat-/(FDA-)Stammlösung und Testlösung	7
6.4 Lösung der Leerwertkontrolle	7
6.5 Spüllösungen für den FLUOstar	8
6.6 Lösungen für die Proteinbestimmung	8
7 BELEGUNG DER PLATTE	8
8 PRINZIP DER AUTOMATISCHEN MESSUNG	10
8.1 Injektionschema	10
8.2 Aufruf der Testprotokolle	10
9 DURCHFÜHRUNG DES TESTS	11

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_0 3	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 3	von 16

9.1	Vorbereitung der Gewebe (Homogenisierung)	11
9.2	Feststoffseparation	12
9.3	Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung	12
9.4	Proteinbestimmung	13
10	AUSWERTUNG	14
10.1	Esterase-Aktivitätsbestimmung	14
10.2	Proteingehalt	15
11	MITGELTENDE UNTERLAGEN	15

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_0 3	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite 4
			von 16	

1 Zweck

Standardisierte Durchführung von Untersuchungen zur Bestimmung der Esteraseaktivität in Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut durch Inkubation mit einem Esterasesubstrat.

2 Einsatzbereich

Die Arbeitsanweisung dient der Vereinheitlichung der Untersuchungen zur Bestimmung der Esteraseaktivität in Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis im Rahmen des BMBF-Forschungsverbund: „Ersatzmethoden zum Tierversuch - Charakterisierung der metabolischen Kapazität von In-vitro-Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen mit dermalen Biotransformation“.

3 Abkürzungsverzeichnis

3.1 allgemeine Abkürzungen

BCA	Bicinchonin Säure
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Bestimmungsgrenze
FDA	Fluoresceindiacetat
NWG	Nachweisgrenze

3.2 Probenabkürzungen

BA – BL	Leerwerte für Gruppen A – L
CA1 – CA3	Korrektur der Eigenfluoreszenz der Zellen
NA	Leerwert für die Standardreihe
SA1	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$
SA10	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$
SA11	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-8} \text{M}$
SA12	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-8}M
SA2	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-4}M
SA3	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$
SA4	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-5}M
SA5	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$
SA6	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-6}M
SA7	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$
SA8	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$
SA9	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-7}M
XA – XL	Probe der Gruppen A – L

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franziska Marie Bätz	Seite 5	von 16

4 Einleitung

Kutane Esterasen besitzen eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von Prodrugs und der Biotransformation von Xenobiotika. Lipophile Prodrugs überwinden gut die Hornschichtbarriere und in der Epidermis bzw. Dermis werden die aktiven Wirkstoffe freigesetzt. Ziel ist es, die Esteraseaktivität in Humanhaut und rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis zu untersuchen.

Der Test wird als Einfachbestimmung mit mehreren Chargen (mindestens 3) Humanhaut und Konstrukten durchgeführt.

5 Geräte, Materialien

5.1 Geräte

Brutschrank BB6220	Heraeus, Hanau
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Maßkolben (10,0 mL, 50,0 mL und 1,0 L)	Brand, Wertheim
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf, Hamburg
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, CH
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

Äquivalente Geräte alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.2 Materialien

20 mL Spritzen	B.Braun, Melsungen
Aceton, Chromasolv Plus für HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fluorescein (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Fluoresceindiacetat (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Kanülen	B.Braun, Melsungen
Mikrotiterplatten 96-Loch, Flachboden, transparent	Roth, Karlsruhe
Nescofilm	Roth, Karlsruhe
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific, Schwerte
Pipettenspitzen für Eppendorf	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nürnberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Zellkulturplatten 96-Loch, Flachboden, schwarz	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz

Äquivalente Materialien alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz	6	16

5.3 Programme

FLUOstar Optima Software V2.10 R7	BMG Labtech, Offenburg
Graphpad Prism	Graphpad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
Microsoft Office Excel	Redmond, Washington, USA

Äquivalente Programme alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.4 Haut und Hautmodelle

Humanhaut		Material aus der plastischen Chirurgie
Epi-200	EpiDerm™	MatTek Epidermismodell
EFT-400	EpiDermFT™	MatTek Vollhautmodell
AST2000		CellSystem Vollhautmodell
Phenion	PhenionFT®	Henkel Vollhautmodell

6 Substanzen, Lösungen

6.1 Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Tris/Aceton

Tris-HCl Lösung (0,1 M; Einwaage Tris-HCl: 15,759 g/L) werden in einem Maßkolben unter Standardbedingungen in Reinstwasser gelöst und der gewünschte pH-Wert durch Zugabe von NaOH-Rotuli eingestellt. Anschließend wird die Lösung steril filtriert und in 50 mL Zentrifugenröhrchen aliquotiert.

Nach der Sterilfiltration ist die Filterintegrität mittels Bubble-Point-Test zu überprüfen. Die Lösung ist bis zu einem Jahr bei -80°C lagerfähig.

Tris/Aceton wird aus Tris-Puffer durch einen Zusatz von 0,2% Aceton hergestellt. Dazu werden 10 mL Tris-Puffer in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 20 µL Aceton versetzt. Anschließend wird das Röhrchen verschlossen und die Lösung durch Schwenken gut durchmischt.

Da pro Versuchsplatte 10 mL dieser Lösung benötigt werden, sollte die Anzahl der hergestellten Lösungen proportional der zu untersuchenden Versuchsplatten sein.

6.2 Fluorescein-Eichlösungen I und II

Für die Tests werden 12 Fluoresceinstandards unterschiedlicher Konzentrationen (SA1-12) benötigt, die durch Verdünnung von Eichlösung mit Tris-Puffer und unter Zusatz von 0,2% Aceton hergestellt werden. Sowohl die Eichlösungen als auch die Lösungen der 12 Standards für die Fluorescein Eichkurve können vier Wochen bei -80°C gelagert werden. Die Herstellung auf Vorrat ist also möglich.

Fluorescein-Eichlösung I ($5 \cdot 10^{-4}$ M; Einwaage Fluorescein: 8,307 mg/50 mL) wird unter Standardbedingungen mit 0,1 M Tris-Puffer hergestellt. Aus der Eichlösung I wird Eichlösung II (10^{-6} M; Verdünnung 1:500) mit Tris-Puffer hergestellt. Beide Lösungen werden für die Erstellung der Eichkurve mit 12 Messpunkten benötigt. Lösung der Fluorescein-Eichkurve sind aus Fluorescein-Eichlösungen I und II durch Zugabe definierter Volumina Tris-Puffer in 2 mL Reaktionsgefäßen herzustellen

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_0 3	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite 7
				von 16

(siehe Tabelle 1). Die Herstellung der Lösungen für die Standardkurve erfordert den Zusatz 0,2% (V/V) Aceton (bezogen auf das Endvolumen) damit gleiche Bedingungen bei Standard- und Untersuchungslösung vorliegen.

Tabelle 1: Verdünnungsschema für Eichkurve.

	Abkürzung für das Plattenlayout	Verdün- nungen	Tris-Puffer- Zusatz	Eich- lösungs- Zusatz	Aceton- Zusatz	Endkonzent- ration
Eichlösung I	SA1	1:2	996 µL	1000 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
	SA2	1:5	1596 µL	400 µL	4 µL	10^{-4} M
	SA3	1:10	1796 µL	200 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-5}$ M
	SA4	1:50	1956 µL	40 µL	4 µL	10^{-5} M
	SA5	1:100	1976 µL	20 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-6}$ M
	SA6	1:500	1992 µL	4 µL	4 µL	10^{-6} M
Eichlösung II	SA7	1:2	996 µL	1000 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA8	1:4	1496 µL	500 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA9	1:10	1796 µL	200 µL	4 µL	10^{-7} M
	SA10	1:20	1896 µL	100 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA11	1:40	1946 µL	50 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA12	1:100	1976 µL	20 µL	4 µL	10^{-8} M

Nach der Zugabe der einzelnen Bestandteile der Lösung für die Eichkurve werden die 2 mL Reaktionsgefäße für circa 5 s mit einem Vortexer durchmischt.

6.3 Fluoresceindiacetat-/(FDA-)Stammlösung und Testlösung

Fluoresceindiacetat-Stammlösung ($4 \cdot 10^{-2}$ M; Einwaage FDA: 166,544 mg/10 mL) wird unter Standardbedingungen mit Aceton hergestellt. Zur Minimierung der Verflüchtigung des Acetons aus dem Reaktionsgefäß wird dieses nach Verschluss zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Lösung ist bei -80°C für maximal vier Wochen lagerfähig.

Fluoresceindiacetat-Stammlösung wird, während Testprotokoll 1 läuft, 1:500 mit Tris-Puffer unter Standardbedingungen verdünnt (FDA-Testlösung $8 \cdot 10^{-5}$ M). Durch die geringe Kontaktzeit des Esters mit Wasser wird die Autohydrolyse minimiert.

6.4 Lösung der Leerwertkontrolle

Die Lösung für die Leerwertkontrolle (NA, Lösungsmittelkontrolle) wird aus 0,2% (V/V) Aceton und 99,8% (V/V) Tris-Puffer angefertigt.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz	8	16

6.5 Spüllösungen für den FLUOstar

Spüllösung 1:	gesättigte NaOH-Lösung (zur Lösung überschüssigen Fluoresceindiacetats)
Spüllösung 2:	Reinstwasser
Spüllösung 3:	70% Ethanol

6.6 Lösungen für die Proteinbestimmung

Der Pierce BCA Protein Assay Kit enthält folgende Komponenten: Albumin-(BSA-) Stammlösung (2000 µg/mL), 4% Kupfersulfat-Lösung und BCA Reagens (bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxidlösung).

Zur Durchführung der Proteinquantifizierung wird eine Arbeitslösung benötigt, die frisch vor Versuchsbeginn aus 50 Teilen BCA und 1 Teil Kupfersulfat-Lösung herzustellen ist. Bei der Herstellung muss ein Überschuss von mindestens 1,5 mL zum Spülen des Injektionssystems des FLUOstar einkalkuliert werden.

Die BSA-Eichlösungen werden mit Tris/Aceton hergestellt (Tabelle 2):

Tabelle 2: Verdünnung für BSA-Standardkurve (Angaben des Herstellers des Pierce BCA Protein Assay Kit).

BSA-Eichlösungen [µg/mL]	Tris/ Aceton- Zugabe [µL]	BSA-Zusatz [µL] (Herkunft)
2000	0	300 (2000 µg/mL Eichlösung)
1500	125	375 (2000 µg/mL Eichlösung)
1000	325	325 (2000 µg/mL Eichlösung)
750	175	175 (1500 µg/mL Eichlösung)
500	325	325 (1000 µg/mL Eichlösung)
250	325	325 (500 µg/mL Eichlösung)
125	325	325 (250 µg/mL Eichlösung)
25	400	100 (125 µg/mL Eichlösung)
0	400	0

7 Belegung der Platte

Das Belegungsschema (Abbildung 1) der Platte zeigt in fett das Funktionslayout, welches für das Messprogramm gewählt wird.

NA dient der Korrektur der Eigenfluoreszenz des Lösungsmittels, CA wird zur Korrektur der Eigenfluoreszenz der Zellrümpfer benötigt (Reihe A). Die Beschichtung der Platte erfolgt gemäß dem Layout mit Lösungsmittel bzw. Homogenisat ohne Zusatz von Fluorescein bzw. FDA. Reihe B und C sind der Fluorescein-Eichkurve zugeordnet, die Reihen D und E den Hydrolysekontrollen der verschiedenen FDA-Konzentrationen und die Reihen F und G den Homogenisaten.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz		10 16

8 Prinzip der automatischen Messung

In der FLUOstar Optima Software V2.10 R7 werden drei Testprotokolle im „Well mode“ für die Esterase-Quantifizierung programmiert. Die Leserichtung der Platte in den Testprotokollen 1-3 erfolgt spaltenweise. Vor Beginn der Messungen sollen die Platten im FLUOstar 5 s lang gerüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der zuvor manuell in die Vertiefungen pipettierten Lösungen zu erreichen. Die Wartezeit nach einem Positionswechsel der Platte, bis das Plattenlesegerät mit der Einzelmessung beginnt, liegt bei 0,5 s (siehe Benutzerhandbuch FLUOstar Optima).

Für die Proteinbestimmung werden zwei Testprotokolle (Testprotokoll 4 und 5) definiert, die im „Plate mode“ arbeiten. Die Leserichtung ist beliebig einstellbar.

8.1 Injektionschema

Ein Teil der automatisierten Messung ist die programmgesteuerte Zugabe des Esterasesubstrates (Tabelle 3). Für den Testansatz (BA-BL und XA-XL) werden über das Pumpensystem des FLUOstars jeweils 150 µL folgender FDA-Lösungen in die Plattenvertiefungen injiziert (automatische Verdünnung der frisch hergestellten FDA Testlösung mit Tris-Puffer).

Tabelle 3: Applikationsschema für Esterasesubstrat (FDA). Verdünnungen aus der FDA-Eichlösung bezogen auf Gesamtvolumen in der Vertiefung.

	Abkürzung für das Plattenlayout	Verdünnungen von FDA-Untersuchungslösung	Endkonzentration von FDA in der Vertiefung
Esterasesubstrat	BA und XA	3:4	$6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	BB und XB	9:16	$4,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	BC und XC	3:8	$3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	BD und XD	3:16	$1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
	BE und XE	1:8	10^{-5} M
	BF und XF	9:80	$9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BG und XG	3:32	$7,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BH und XH	3:40	$6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BI und XI	9:160	$4,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BJ und XJ	3:80	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BK und XK	3:160	$1,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
	BL und XL	1:80	10^{-6} M

Die zu injizierenden Volumina sollten zuvor berechnet und an die Leistung des jeweiligen Pumpensystems angepasst werden.

8.2 Aufruf der Testprotokolle

Das Testprotokoll 1 (mit Pumpennutzung) dient dem Vorlegen von Tris-Puffer (siehe Tabelle 3) über das Pumpensystem in die Vertiefungen BA-BL und XA-XL. Der Tris-Puffer wird bei höchster Injektionsgeschwindigkeit (420 µL/s, zur Gewährleistung der quantitativen Überführung) über Pumpe 2 in die Vertiefungen

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz		11 16

injiziert. Der Startzeitpunkt wird auf null Sekunden, die Bestrahlung pro Intervall auf null und die Zahl der Intervalle auf eins eingestellt.

Das **Testprotokoll 2** (mit Pumpennutzung) dient der Zugabe von FDA (BA-BL und XA-XL) gemäß Abbildung 1 und Tabelle 3 mit daran anschließender Fluoreszenzintensitätsmessung als Wert zum Zeitpunkt null. Die Messung der Fluoreszenzintensität (Nullwert) beginnt 2 s nachdem in die entsprechenden Vertiefungen die FDA-Untersuchungslösungen (siehe Tabelle 3) über Pumpe 1 bei höchster Geschwindigkeit injiziert worden sind. Die Bestrahlung pro Intervall wird auf zehn Wiederholungen und die Zahl der Intervalle auf 20 eingestellt. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen. Angegeben werden die Mittelwerte von 20 Messintervallen von je 0,2 s bei 10-maliger Anregung.

Das **Testprotokoll 3** (ohne Pumpennutzung) wird unverzüglich nach dem Durchlauf von Testprotokoll 2 gestartet und dient der Fluoreszenzintensitätsmessung nach etwa 10 min nach der FDA-Zugabe zu jeder Probe. Testprotokoll 3 entspricht der Programmierung von Testprotokoll 2 bei deaktiviertem Pumpensystem.

Testprotokoll 4 dient der Zugabe von Arbeitslösung für die Proteinbestimmung sowohl zur BSA-Eichkurve als auch zu den Proteinproben.

Testprotokoll 5 dient zur Proteinquantifizierung anhand der Absorption bei 550-10 nm.

9 Durchführung des Tests

9.1 Vorbereitung der Gewebe (Homogenisierung)

Die Homogenisierung der einzelnen Gewebe richtet sich nach deren sehr unterschiedlichen Festigkeit.

Humanhaut

Die frische oder kryokonservierte Haut (leichtes Antauen nötig) wird auf eine Schichtdicke von 500 µm dermatomisiert. Danach werden Biopsien mit einem Durchmesser von 1 cm genommen und in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Gefäß wird für einige Minuten in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend werden eine Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) und 500 µL Tris/Aceton in das Reaktionsgefäß hinzugefügt und alles in die zuvor heruntergekühlten Teflonhalterungen des TissueLyser II eingesetzt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgt 12 min bei 30 Hz. Zum Abschluss werden 1000 µL Tris/Aceton zugegeben und das Material durch 5 s Schütteln gut durchmischt.

Epi-200, EFT-400 und AST2000

Nach Äquilibration der Hautmodelle über Nacht und Mediumwechsel 1 Stunde vor Versuchsdurchführung werden die Hautmodelle mittels Skalpell aus den Inserts herausgelöst und mit einer Pinzette in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wird eine Stahlkugel in das Reaktionsgefäß zusammen mit 500 µL Tris/Aceton hinzugefügt und alles in die zuvor heruntergekühlten Teflonhalterungen des TissueLyser II eingesetzt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgt 2 min bei

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_0 3	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite 12
				von 16

25 Hz. Nach Zugabe von 1000 µL Tris/Aceton, wird das Material durch 5 s Schütteln gut durchmischt.

PhenionFT®

Nach Äquilibration der Hautmodelle über Nacht und Mediumwechsel 1 Stunde vor Versuchsdurchführung werden die Hautmodelle unter zur Hilfenahme einer Pinzette von dem Filterpapier in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wird eine Stahlkugel in das Reaktionsgefäß zusammen mit 500 µL Tris/Aceton hinzugefügt und alles in die zuvor heruntergekühlten Teflonhalterungen des TissueLyser II eingesetzt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgt 7 min bei 25 Hz. Anschließend werden 1000 µL Tris/Aceton zugegeben und das Material durch 5 s Schütteln gut durchmischt.

9.2 Feststoffseparation

An die Homogenisation schließt sich eine Feststoffseparation durch 10 minütige Zentrifugation bei 9000xg in einer kühlbaren (gekühlten) Zentrifuge an. Der Überstand wird im weiteren Verlauf für die Esterase Aktivitätsbestimmung genutzt.

9.3 Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung

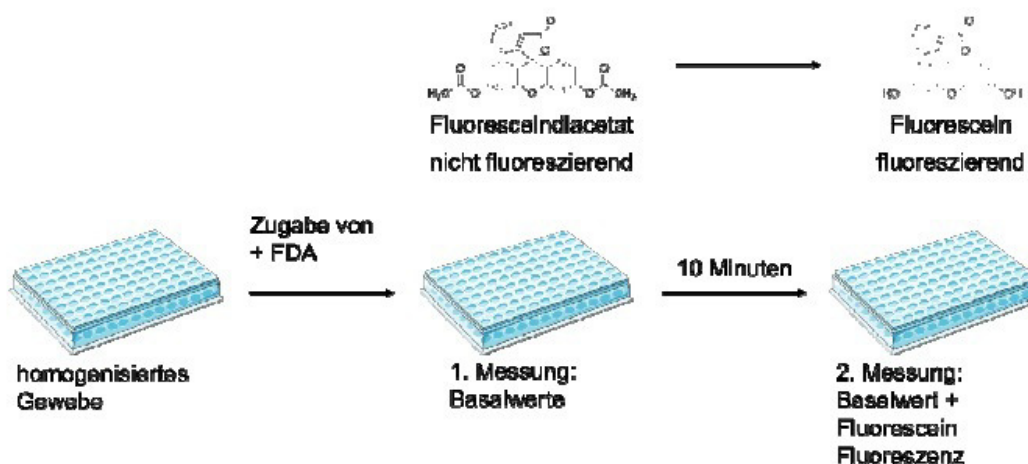


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Je 200 µL der Standardlösungen SA1-SA12 werden im Duplett manuell in eine schwarze 96-Loch Zellkulturplatte gegeben, die Leerwertkontrolle NA als Triplett (siehe Abbildung 1). In die Vertiefungen XA bis XL und CA werden jeweils 50 µL des Überstandes nach der Feststoffseparation (Homogenisates) manuell vorgelegt. Die Vertiefungen CA werden auf 200 µL mit Tris-Puffer ergänzt.

Bevor die vorbereitete Platte in den FLUOstar eingesetzt werden kann, muss Pumpe 2 mit mindestens 1500 µL der 10 mL Tris/Aceton-Lösung gespült werden, wobei die Abfalllösung in einem gesonderten Gefäß gesammelt wird. Die Injektionsnadel für

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz		13 16

Pumpe 2 zur Applikation der Tris/Aceton-Lösung wird in den FLUOstar montiert, die Platte in das Gerät eingefahren und Testprotokoll 1 gestartet.

Parallel zum Ablauf von Testprotokoll 1 werden 10,0 mL Fluoresceindiacetat-Testlösung hergestellt (siehe 6.3).

Sobald Testprotokoll 1 beendet ist, wird Pumpe 1 mit der 1500 µL Fluorescein-Untersuchungslösung gespült (gesonderte Sammlung der Abfalllösung) und die Injektionsnadel der Pumpe 1 wieder montiert. Vor dem Start von Testprotokoll 2 ist zur Überprüfung und ggf. Einstellung der maximalen Fluoreszenzintensität (Messobergrenze des FLUOstar: 65000 relative Fluoreszenzeinheiten) ein „gain adjustment“ bei der höchsten Konzentration der Standardkurve (SA1) durchzuführen. Wird ein Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten angezeigt, kann die Messung beginnen. Bei höheren Fluoreszenzintensitäten muss die Einstellung „required value“ von 95% heruntergesetzt werden, bis der Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten liegt.

Während der FDA-Zugabe und Messung sollten die Fluoreszenzwerte über das „current state overview“ verfolgt werden. Liegen die Messwerte von NA, SA1 (Plattenpositionen A1, B1, C1) über dem Messbereich, kann die Messung ohne ein Verwerfen des Versuches vor Beginn der ersten Injektion abgebrochen und ein erneuter Start der Messung versucht werden. Sollten die Werte abermals überschritten sein, ist eine Reinigung der Optik in Betracht zu ziehen.

Unmittelbar an die Fluoreszenzmessung gemäß Testprotokoll 2 schließt sich Testprotokoll 3 an. Auch hier ist vor Start des Versuchs ein „gain adjustment“ wie zuvor beschrieben durchzuführen.

Nach Beendigung des Versuches sind die Pumpen des FLUOstar durch mehrmaliges Spülen mit Spüllösung 1-3 (in selbiger Reihenfolge) zu säubern (siehe 6.5).

9.4 Proteinbestimmung

Vom Überstand des Homogenisates werden 30 µL entnommen, 1:2 verdünnt und gemäß dem Pierce BCA Protein Assay Kit Protokoll der Gehalt ermittelt. Die BSA-Eichlösungen werden gemäß Tabelle 2 und je 25 µL davon im Triplett in die Vertiefung einer transparente 96-Loch- Mikrotiterplatte pipettiert.

Das verdünnte Homogenisatsüberstand wird im Duplett in die Vertiefungen der Platte gegeben.

Die Injektion der Arbeitslösung erfolgt gemäß Testprotokoll 4. Nachdem jeweils 200 µL der Arbeitslösung auf die Platte automatisch gegeben wurde, wird die Platte aus dem Gerät entfernt und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgt anschließend gemäß Testprotokoll 5, nachdem die Platte nach Ablauf der Inkubation zunächst einige Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt wurde.

Nach Beendigung des Versuches ist das Pumpensystem durch mehrmaliges Spülen mit Spüllösung 2 und 3 zu säubern.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
07.07.2011	05.08.2011	Franzisca Marie Bätz		14 16

10 Auswertung

Die Probendoppelung auf der Mikrotiterplatte führt zu einer Einfachbestimmung von V_{\max} , $S_{0,5}$, h , R_s .

10.1 Esterase-Aktivitätsbestimmung

Ausgewertet wird über eine Kombination aus FLUOstar Optima Software V2.10 R7, Microsoft Excel und Graphpad Prism. Aus den zu Excel übertragenen Rohdaten der Fluoreszenzmessung (Testprotokolle 2 und 3) werden die Mittelwerte berechnet und den weiterführenden Berechnungen der Fluoresceindiacetat-Hydrolyse zugrunde gelegt.

Aus den Rohdaten wird die Nachweisgrenze (NWG) ermittelt. Dazu wird dem gemittelten Wert der Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve (NA) dessen dreifache Standardabweichung hinzuaddiert (Formel 1). Die Berechnung erfolgt für jede vermessene Platte individuell.

$$\overline{NA} + 3 \cdot SD_{NA} = \text{NWG} \quad \text{Formel 1}$$

Mittelwerte der Rohdaten, die unterhalb dieser Grenze liegen, werden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Ferner werden Werte verworfen, deren korrespondierende Kontrolle unterhalb der Nachweisgrenze liegt. D.h. auch Werte die aufgrund der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit in der zweiten Messung oberhalb der Nachweisgrenze liegen werden von den Berechnungen ausgeschlossen.

An die Fluoreszenzmesswerte der Fluorescein-Standardkurve und die Daten der enzymatischen Spaltung von FDA (eS) werden mit der Bestimmungsgrenze (BSG) (siehe Formel 2) höhere Anforderungen gestellt, da sie der Quantifizierung der Fluoreszenzentwicklung dient.

$$\overline{NA} + 10 \cdot SD_{NA} = \text{BSG} \quad \text{Formel 2}$$

Die Werte für die Fluorescein-Standardkonzentrationen werden über eine zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion (Formel 3) mittels Graphpad Prism angepasst.

Zwei-Phasen Exponential Funktion:

$$Y = Y_{\max 1} \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot X}) + Y_{\max 2} \cdot (1 - e^{-K_2 \cdot X}) \quad \text{Formel 3}$$

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der Proben (XA bis XL, allgemein: XY) erfolgt in einer Excel-Vorlage unter Abzug der jeweils zugehörigen zellfreien Leerwerte (BA bis BL, allgemein: BY) zur Korrektur der nicht-enzymatischen Esterhydrolyse. Zur Berücksichtigung des Einflusses der Zelltrümmer-Fluoreszenz werden die Mittelwerte der Kontrollwert CA ebenfalls von den Esterase-Messdaten subtrahiert (siehe Formel 4).

$$\text{Korrektur der Fluoreszenzmesswerte: } \overline{XY} - \overline{BY} - \overline{CA} = XY_{\text{korr}} \quad (\text{Formel 4})$$

So ist für beide Messungen zu verfahren. Anschließend werden die korrigierten Fluoreszenzmesswerte mit den dazugehörigen Konzentrationen eingegeben.

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		Version 3. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_homo_0 3	
Erstausgabedatum 07.07.2011	gültig ab 05.08.2011	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite von 15 16

Die Fluoreszenzintensität der 1. Messung wird als Basiswert ($XY_{\text{korr},t_1} = 0$) definiert und von der Fluoreszenzintensität der 2. (XY_{korr,t_2}) subtrahiert. Die Differenz gibt die enzymatische Spaltung von FDA (eS) wieder (siehe Formel 5).

$$eS = XY_{\text{korr},t_2} - XY_{\text{korr},t_1} \quad (\text{Formel 5})$$

Anhand der Differenz können über Graphpad Prism die umgesetzten Mengen berechnet und diese in Excel zurückübertragen werden. Die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit (mol pro Liter pro Minute) erfolgt unter Einbeziehung der zeitlichen Differenz der beiden Fluoreszenzintensitätsmessungen. Anhand der Umsatzgeschwindigkeit, die nach Graphpad Prism übertragen wird, kann eine Auswertung mit einer allosterischen Sigmoidalkurve (Michaelis-Menten mit Hill-Koeffizient; siehe Formel 6) erfolgen.

allosterische Sigmoidalkurve:
$$Y = \frac{V_{\text{max}} \cdot X^h}{k_{\text{prime}} + X^h} \quad (\text{Formel 6})$$

Der $s_{0,5}$ -Wert wird über Formelumformung in Excel berechnet und gemeinsam in eine Tabelle mit den wichtigsten Kenndaten ($s_{0,5}$ -Wert (Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit, siehe Formel 7), v_{max} -Wert, h , r^2 , R_s) überführt.

$s_{0,5}$:
$$s_{0,5} = \sqrt[h]{k_{\text{prime}}} \quad (\text{Formel 7})$$

Der Cooperativitätsindex (R_s) wird mittels Formel 8 berechnet, wobei $[S]_{0,9}$ die Substratsättigung bei 90% Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf v_{max} und $[S]_{0,1}$ die bei 10% darstellen.

Liegt dieser Wert unter 81 spricht dies für einen Hill-Koeffizienten (h) von größer 1 und das deutet auf eine positive Cooperativität hin. Liegt dieser Wert über 81 spricht dies für einen Hill-Koeffizienten (h) von kleiner 1 und das entspricht einer negativen Cooperativität.

Cooperativitätsindex:
$$R_s = \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}} \quad (\text{Formel 8})$$

10.2 Proteingehalt

Eine letzte Korrektur erfolgt anhand des Proteingehaltes der Proben.

Die Proteinmesswerte werden mit den Umsatzgeschwindigkeiten wie folgt in

Korrelation gesetzt:
$$eS_{\text{Protein}} = \frac{eS}{\text{Protein} \cdot 2} \quad (\text{Formel 9})$$

Der Faktor 2 ergibt sich aus der Verdünnung des Homogenates.

11 Mitgeltende Unterlagen

Benutzerhandbuch FLUOstar Optima

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in Humanhaut, rekonstruierter Humanhaut bzw. Epidermis		3. Version	SOP_MetEs_homo_03	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.07.2011	05.08.2011	Franziska Marie Bätz	16	16

Anleitung zum Pierce BCA Protein Assay Kit
Anleitung von MatTek zur Handhabung von Hautmodellen
Anleitung von Phenion zur Handhabung von Hautmodellen
Anleitung von CellSystems zur Handhabung von Hautmodellen

8.1.2 Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur



Institut für Pharmazie
Pharmakologie und
Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 2+4
14195 Berlin

Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des
BMBF-Projekts Hautmetabolismus
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEs_01
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite von 1 17
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung	
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting			
Erstellt: Franzisca Marie Bätz		Geprüft: G. Weindl, W. Klipper, N. Do-Sydow, A. Said, S. Heilmann	Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer- Korting
Verteiler: Verbundpartner des Vorhabens Ersatzmethoden zum Tierversuch BfR, RWTH Aachen, BASF, Henkel AG, Freie Universität Berlin			

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		2 von 17

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1 ZWECK	4
2 EINSATZBEREICH	4
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
3.1 allgemeine Abkürzungen	4
3.2 Probenabkürzungen	4
4 EINLEITUNG	5
5 GERÄTE, MATERIALIEN	5
5.1 Geräte	5
5.2 Materialien	5
5.3 Programme	6
5.4 Zellen und Zelllinien	6
5.5 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)	6
5.6 Trypsin-EDTA-Lösung	7
6 MEDIENZUSAMMENSETZUNGEN	7
6.1 Zellmedien	7
6.2 Stoppmedium	7
6.3 Untersuchungsmedium	7
7 SUBSTANZEN, LÖSUNGEN	7
7.1 Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Tris/Aceton	7
7.2 Lösung der Leerwertkontrolle	8
7.3 Fluorescein-Eichlösungen I und II	8
7.4 Fluoresceindiacetat-(FDA-)Stammlösung und Testlösung	9
7.5 Spüllösungen für den FLUOstar	9
7.6 Lösungen für die Proteinbestimmung	9

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz	3	17

8	VORBEREITUNG DER ZELLEN	10
9	BELEGUNG DER PLATTE	12
10	PRINZIP DER AUTOMATISCHEN MESSUNG	12
10.1	Injektionschema	12
10.2	Aufruf der Testprotokolle	13
11	DURCHFÜHRUNG DES TESTS	13
11.1	Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung	13
11.2	Proteinbestimmung	14
12	AUSWERTUNG	15
12.1	Esteraseaktivitätsbestimmung	15
12.2	Proteinbestimmung	17
13	MITGELTENDE UNTERLAGEN	17

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
21.02.2013	21.02.2013	Franziska Marie Bätz		4
				17

1 Zweck

Standardisierte Durchführung von Untersuchungen zur Bestimmung der Esteraseaktivität von Keratinozyten und Fibroblasten in 2D-Kultur in schwarzen 96-Loch-Platten durch Inkubation mit einem Esterasesubstrat.

2 Einsatzbereich

Die Arbeitsanweisung dient der Vereinheitlichung der Untersuchungen zur Bestimmung der Esteraseaktivität humaner Hautzellen im Rahmen des BMBF-Forschungsverbund: „Ersatzmethoden zum Tierversuch - Charakterisierung der metabolischen Kapazität von In-vitro-Hautmodellen zum Zwecke der Identifizierung eines optimalen Modells für die Hauttoxizitätsprüfung sowie zur Expositionsabschätzung von Substanzen mit dermalen Biotransformation“.

3 Abkürzungsverzeichnis

3.1 allgemeine Abkürzungen

BCA	Bicinchonin Säure
BPE	boviner Hypophysenextrakt
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Bestimmungsgrenze
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Fluoresceindiacetat
FKS	Fetales Kälberserum
hEGF	epidermaler Wachstumsfaktor
KBM	Keratinozytenbasalmedium
KGM	Keratinozytenwachstumsmedium
NHDF	(normale) humane Fibroblasten (aus juveniler Vorhaut)
NHK	(normale) humane Keratinozyten (aus juveniler Vorhaut)
NWG	Nachweisgrenze
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,4)

3.2 Probenabkürzungen

BA bis BL	Leerwerte für Gruppen A bis L
CA1 bis CA3	Zellfluoreszenzkorrektur
NA	Leerwert für die Standardreihe
SA1	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-4}M$
SA10	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-8}M$
SA11	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-8}M$
SA12	Fluoresceinstandardkonzentration $10^{-8}M$
SA2	Fluoresceinstandardkonzentration $10^{-4}M$
SA3	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-5}M$
SA4	Fluoresceinstandardkonzentration $10^{-5}M$
SA5	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-6}M$

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz	5	17

SA6	Fluoresceinstandardkonzentration $10^{-6}M$
SA7	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-7}M$
SA8	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-7}M$
SA9	Fluoresceinstandardkonzentration $10^{-7}M$
XA bis XL	Proben der Gruppen A bis L

4 Einleitung

Kutane Esterasen besitzen eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von Prodrugs und der Biotransformation von Xenobiotika. Lipophile Prodrugs überwinden gut die Hornschichtbarriere und in der Epidermis bzw. Dermis werden die aktiven Wirkstoffe freigesetzt. Ziel ist es, die Esteraseaktivität mittels der Modellschubstanz Fluoresceindiacetat in NHK und NHDF zu untersuchen.

Der Test wird als Einfachbestimmung an mehreren (mindestens 3) Zellpopulationen (Keratinocyten und/ oder Fibroblasten; entweder von 3 Einzelspendern oder an Zellpools von jeweils 3 Spendern; gewonnen aus juveniler Vorhaut) durchgeführt.

5 Geräte, Materialien

5.1 Geräte

Brutschrank BB6220	Heraeus, Hanau
FLUOstar optima	BMG Labtech, Offenburg
Maßkolben (10,0 mL, 50,0 mL und 1,0 L)	Brand, Wertheim
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² ; 0,1 mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf, Hamburg
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Vakuum-Pumpe Universal Vacuum System Plus UVS 400A	Savant, Bethesda, MD
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, CH
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

Äquivalente Geräte alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.2 Materialien

20 mL Spritzen	B.Braun, Melsungen
Aceton, Chromasolv Plus für HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fluorescein (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Fluoresceindiacetat (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Kanülen	B.Braun, Melsungen

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franziska Marie Bätz	6	17

Keratinocytenbasalmedium (KBM)	Lonza, Köln
L-Glutamin	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nescofilm	Röth, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin (100x) -Lösung	PAA, Laboratories GmbH, Cölbe
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific, Schwerte
Pipettenspitzen Eppendorf	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Spritzenvorsatzfilter, Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nürnberg
Supplements zur Herstellung von KGM	} Lonza, Köln
- boviner Hypophysenextrakt (BPE)	
- epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	
- Gentamicinsulfat	
- Hydrocortison	
- Insulin	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 96-Loch, Flachboden, schwarz	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz

Äquivalente Materialien alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.3 Programme

FLUOstar Auswertesoftware	BMG Labtech, Offenburg
Graphpad Prism	Graphpad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
Microsoft Office Excel	Redmond, Washington, USA

Äquivalente Programme alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.4 Zellen und Zelllinien

NHK	normale humane Keratinozyten	Isolierung aus juveniler Vorhaut
NHDF	normale humane Fibroblasten	Isolierung aus juveniler Vorhaut

Für die Versuche werden Keratinozyten bis Passage 3, Fibroblasten bis Passage 5 eingesetzt (Einzelspender oder Zellpool von jeweils 3 Spendern).

5.5 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS)

KCl	0,2 g/L
NaCl	8,0 g/L
KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz	7	17

in Aqua bidest.
Im Anschluss erfolgt Autoklavierung.

5.6 Trypsin-EDTA-Lösung

Trypsin 92,59 mg/mL
EDTA 37,04 mg/mL
in PBS.

Die Stammlösung wird steril filtriert und aliquotiert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung werden die Aliquots mit sterilem PBS verdünnt, so dass folgende Massekonzentrationen in der Lösung erreicht werden:

Trypsin 1,67 mg/mL
EDTA 0,67 mg/mL.

6 Medienzusammensetzungen

6.1 Zellmedien

ZELLART	BASALMEDIUM	WACHSTUMSMEDIUM
NHK	KBM + hEGF 0,1% + Insulin 0,1%	KBM + Supplements (siehe Materialien)
NHDF	DMEM + L-Glutamin	NHDF-Basalmedium + FKS 7,5%

6.2 Stoppmedium

DMEM
+ FKS 10%
+ Penicillin 100 U/ml
+ Streptomycin 100 µg/ml

6.3 Untersuchungsmedium

Das Untersuchungsmedium dient der Versorgung der Zellen während des gesamten Versuches. Es besteht aus dem jeweiligen Basalmedium mit einem Zusatz von 0,2% Aceton.

7 Substanzen, Lösungen

7.1 Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Tris/Aceton

Tris-HCl Lösung (0,1 M; Einwaage Tris-HCl: 15,759 g/L) werden in einem Maßkolben unter Standardbedingungen in Reinstwasser gelöst und der gewünschte pH-Wert durch Zugabe von NaOH-Rotuli eingestellt. Anschließend wird die Lösung steril filtriert und in 50 mL Zentrifugenröhrchen aliquotiert.

Nach der Sterilfiltration ist die Filterintegrität mittels Bubble-Point-Test zu überprüfen.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz	8	17

Die Lösung ist bis zu einem Jahr bei -80°C lagerfähig.

Tris/Aceton wird aus Tris-Puffer durch einen Zusatz von 0,2% Aceton hergestellt. Dazu werden 10 mL Tris-Puffer in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 20 µL Aceton versetzt. Anschließend wird das Röhrchen verschlossen und die Lösung durch Schwenken gut durchmischt.

Da pro Versuchsplatte 10 mL dieser Lösung benötigt werden, sollte die Anzahl der hergestellten Lösungen proportional der zu untersuchenden Versuchsplatten sein.

7.2 Lösung der Leerwertkontrolle

Die Lösung für die Leerwertkontrolle (NA, Lösemittelkontrolle) wird aus 25% (V/V) Basalmedium, 0,2% (V/V) Aceton und 74,8% (V/V) Tris-Puffer angefertigt.

7.3 Fluorescein-Eichlösungen I und II

Für die Tests werden 12 Fluoresceinstandards unterschiedlicher Konzentrationen (SA1-12) benötigt, die durch Verdünnung von Eichlösung mit Tris-Puffer und unter Zusatz von 0,2% Aceton hergestellt werden.

Fluorescein-Eichlösung I ($5 \cdot 10^{-4}$ M; Einwaage Fluorescein: 8,307 mg/50 mL) wird unter Standardbedingungen mit 0,1 M Tris-Puffer hergestellt. Aus der Eichlösung I wird Eichlösung II (10^{-6} M; Verdünnung 1:500) mit Tris-Puffer hergestellt. Beide Lösungen werden für die Erstellung der Eichkurve mit 12 Messpunkten benötigt. Die Eichlösungen können vier Wochen bei -80°C gelagert werden.

Lösung der Fluorescein-Eichkurve sind aus Fluorescein-Eichlösungen I durch Zugabe definierter Volumina Tris-Puffer in 2 mL Reaktionsgefäßen herzustellen (siehe Tabelle 1). Die Herstellung der Lösungen für die Standardkurve erfordert den Zusatz von 25% Basalmedium und 0,2% (V/V) Aceton (bezogen auf das Endvolumen) damit gleiche Bedingungen bei Standard- und Untersuchungslösung vorliegen.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		9
			von	17

Tabelle 1: Verdünnungsschema für Eichkurve.

	Abkürzung für das Plattenlayout	Verdünnungen	Basal-medium	Tris-Puffer-Zusatz	Eich-lösungs-Zusatz	Aceton-Zusatz	Endkonzentration
Eichlösung I	SA1	1:2	500 µL	996 µL	1000 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
	SA2	1:5	500 µL	1596 µL	400 µL	4 µL	10^{-4} M
	SA3	1:10	500 µL	1796 µL	200 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-5}$ M
	SA4	1:50	500 µL	1956 µL	40 µL	4 µL	10^{-5} M
	SA5	1:100	500 µL	1976 µL	20 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-6}$ M
	SA6	1:500	500 µL	1992 µL	4 µL	4 µL	10^{-6} M
Eichlösung II	SA7	1:2	500 µL	996 µL	1000 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA8	1:4	500 µL	1496 µL	500 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA9	1:10	500 µL	1796 µL	200 µL	4 µL	10^{-7} M
	SA10	1:20	500 µL	1896 µL	100 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA11	1:40	500 µL	1946 µL	50 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA12	1:100	500 µL	1976 µL	20 µL	4 µL	10^{-8} M

Nach der Zugabe der einzelnen Bestandteile der Lösung für die Eichkurve werden die 2 mL Reaktionsgefäße für circa 5 s mit einem Vortexer durchmischt.

7.4 Fluoresceindiacetat-/(FDA-)Stammlösung und Testlösung

Fluoresceindiacetat-Stammlösung ($4 \cdot 10^{-2}$ M; Einwaage FDA: 166,544 mg/10 mL) wird unter Standardbedingungen mit Aceton hergestellt. Zur Minimierung der Verflüchtigung des Acetons aus dem Reaktionsgefäß wird dieses nach Verschluss zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Lösung ist bei -80°C für maximal vier Wochen lagerfähig.

Fluoresceindiacetat-Stammlösung wird, während Testprotokoll 1 läuft, 1:500 mit Tris-Puffer unter Standardbedingungen verdünnt (FDA-Testlösung $8 \cdot 10^{-5}$ M). Durch die geringe Kontaktzeit des Esters mit Wasser wird die Autohydrolyse minimiert.

7.5 Spüllösungen für den FLUOstar

Spüllösung 1: gesättigte NaOH-Lösung
(zur Lösung überschüssigen Fluoresceindiacetats)

Spüllösung 2: Reinstwasser

Spüllösung 3: 70% Ethanol

7.6 Lösungen für die Proteinbestimmung

Der Pierce BCA Protein Assay Kit enthält folgende Komponenten: Albumin-(BSA-) Stammlösung (2000 µg/mL), 4% Kupfersulfat-Lösung und BCA Reagens (bestehend

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz	10	17

aus Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxidlösung).

Zur Durchführung der Proteinquantifizierung wird eine Arbeitslösung benötigt, die frisch vor Versuchsbeginn aus 50 Teilen BCA und 1 Teil Kupfersulfat-Lösung herzustellen ist. Bei der Herstellung muss ein Überschuss von mindestens 1,5 mL zum Spülen des Injektionssystems des FLUOstar einkalkuliert werden.

Die BSA-Eichlösungen werden mit Tris/Aceton hergestellt (Tabelle 2):

Tabelle 2: Verdünnung für BSA-Standardkurve (Angaben des Herstellers des Pierce BCA Protein Assay Kit).

BSA-Eichlösungen [µg/mL]	Tris/ Aceton- Zugabe [µL]	BSA-Zusatz [µL] (Herkunft)
2000	0	300 (2000 µg/mL Eichlösung)
1500	125	375 (2000 µg/mL Eichlösung)
1000	325	325 (2000 µg/mL Eichlösung)
750	175	175 (1500 µg/mL Eichlösung)
500	325	325 (1000 µg/mL Eichlösung)
250	325	325 (500 µg/mL Eichlösung)
125	325	325 (250 µg/mL Eichlösung)
25	400	100 (125 µg/mL Eichlösung)
0	400	0

8 Vorbereitung der Zellen

Die frisch isolierten Zellen (Keratinocyten und Fibroblasten) werden in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Mediumwechsel, Splitten und Aussäen der Zellen werden unter der Sterilarbeitsbank durchgeführt. Jede Zellkultur wird in der Zellkulturflasche (75 cm²) einmal mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 1,5 mL Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Leichtes Klopfen des Bodens und der Seiten der Zellkulturflaschen beschleunigt das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Die Trypsinreaktion wird durch Zugabe von 8,5 mL Stoppmedium beendet, die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellkulturflasche zweimal mit je 10 mL PBS gewaschen. Die Waschlösungen werden mit der Zellsuspension vereinigt und bei RT 5 min bei 250xg zentrifugiert. Das Zellpellet wird zweimal mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend in 5 mL Wachstumsmedium pro Zellkulturflasche resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und der Trypanblau-Färbung wird die Zahl der viablen Zellen bestimmt.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		12
				von
				17

9 Belegung der Platte

Das Belegungsschema (Abbildung 1) der Platte zeigt in fett das Funktionslayout, welches für das Messprogramm gewählt wird.

NA dient der Korrektur der Eigenfluoreszenz des Lösungsmittels, CA wird zur Korrektur der Eigenfluoreszenz der Zellen benötigt (Reihe A). Die Beschickung der Platte erfolgt gemäß dem Layout mit Lösungsmittel bzw. in Vorinkubation mit Zellen ohne Zusatz von Fluorescein bzw. FDA. Reihe B und C sind der Fluorescein-Eichkurve zugeordnet, die Reihen D und E den Hydrolysekontrollen der verschiedenen FDA-Konzentrationen und die Reihen F und G den Zellen.

10 Prinzip der automatischen Messung

In der FLUOstar Optima Software V2.10 R7 werden drei Testprotokolle im „Well mode“ für die Esterase-Quantifizierung programmiert. Die Leserichtung der Platte in den Testprotokollen 1-3 erfolgt spaltenweise. Vor Beginn der Messungen sollen die Platten im FLUOstar 5 s lang gerüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der zuvor manuell in die Vertiefungen pipettierten Lösungen zu erreichen. Die Wartezeit nach einem Positionswechsel der Platte, bis das Plattenlesegerät mit der Einzelmessung beginnt, liegt bei 0,5 s (siehe Benutzerhandbuch FLUOstar Optima).

Für die Proteinbestimmung werden zwei Testprotokolle (Testprotokoll 4 und 5) definiert, die im „Plate mode“ arbeiten. Die Leserichtung ist beliebig einstellbar.

10.1 Injektionschema

Ein Teil der automatisierten Messung ist die programmgesteuerte Zugabe des Esterasesubstrates (Tabelle 3). Für den Testansatz (BA-BL und XA-XL) werden über das Pumpensystem des FLUOstars jeweils 150 µL folgender FDA-Lösungen in die Plattenvertiefungen injiziert (automatische Verdünnung der frisch hergestellten FDA Testlösung mit Tris-Puffer).

Tabelle 3: Applikationsschema für Esterasesubstrat (FDA). Verdünnungen aus der FDA-Eichlösung bezogen auf Gesamtvolumen in der Vertiefung.

	Abkürzung für das Plattenlayout	Verdünnungen von FDA-Untersuchungslösung	Endkonzentration von FDA in der Vertiefung
Esterasesubstrat	BA und XA	3:4	$6 \cdot 10^{-5}$ M
	BB und XB	9:16	$4,5 \cdot 10^{-5}$ M
	BC und XC	3:8	$3 \cdot 10^{-5}$ M
	BD und XD	3:16	$1,5 \cdot 10^{-5}$ M
	BE und XE	1:8	10^{-5} M
	BF und XF	9:80	$9 \cdot 10^{-6}$ M
	BG und XG	3:32	$7,5 \cdot 10^{-6}$ M
	BH und XH	3:40	$6 \cdot 10^{-6}$ M
	BI und XI	9:160	$4,5 \cdot 10^{-6}$ M
	BJ und XJ	3:80	$3 \cdot 10^{-6}$ M
	BK und XK	3:160	$1,5 \cdot 10^{-6}$ M
	BL und XL	1:80	10^{-6} M

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite
21.02.2013	21.02.2013	Franziska Marie Bätz		von 13 17

Die zu injizierenden Volumina sollten zuvor berechnet und an die Leistung des jeweiligen Pumpensystems angepasst werden.

10.2 Aufruf der Testprotokolle

Das **Testprotokoll 1** (mit Pumpennutzung) dient dem Vorlegen von Tris-Puffer (siehe Tabelle 3) über das Pumpensystem in die Vertiefungen BA-BL und XA-XL. Der Tris-Puffer wird bei höchster Injektionsgeschwindigkeit (420 µL/s, zur Gewährleistung der quantitativen Überführung) über Pumpe 2 in die Vertiefungen injiziert. Der Startzeitpunkt wird auf null Sekunden, die Bestrahlung pro Intervall auf null und die Zahl der Intervalle auf eins eingestellt.

Das **Testprotokoll 2** (mit Pumpennutzung) dient der Zugabe von FDA (BA-BL und XA-XL) gemäß Abbildung 1 und Tabelle 3 mit daran anschließender Fluoreszenzintensitätsmessung als Wert zum Zeitpunkt null. Die Messung der Fluoreszenzintensität (Nullwert) beginnt 2 s nachdem in die entsprechenden Vertiefungen die FDA-Untersuchungslösungen (siehe Tabelle 3) über Pumpe 1 bei höchster Geschwindigkeit injiziert worden sind. Die Bestrahlung pro Intervall wird auf zehn Wiederholungen und die Zahl der Intervalle auf 20 eingestellt. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen.

Angegeben werden die Mittelwerte von 20 Messintervallen von je 0,2 s bei 10-maliger Anregung.

Das **Testprotokoll 3** (ohne Pumpennutzung) wird unverzüglich nach dem Durchlauf von Testprotokoll 2 gestartet und dient der Fluoreszenzintensitätsmessung nach etwa 10 min nach der FDA-Zugabe zu jeder Probe. Testprotokoll 3 entspricht der Programmierung von Testprotokoll 2 bei deaktiviertem Pumpensystem.

Testprotokoll 4 dient der Zugabe von Arbeitslösung für die Proteinbestimmung sowohl zur BSA-Eichkurve als auch zu den Proteinproben.

Testprotokoll 5 dient zur Proteinquantifizierung anhand der Absorption bei 550-10 nm.

11 Durchführung des Tests

11.1 Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung

Die gemäß Kapitel 8 vorbereiteten in eine schwarze 96-Loch Platte eingesäten Zellen (15000 NHK respektive 30000 NDHF pro Vertiefung) werden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (XA-XL, CA2 und CA3, siehe Abbildung 1).

Je 200 µL der Standardlösungen SA1-SA12 werden im Duplett manuell in eine schwarze 96-Loch Zellkulturplatte gegeben, die Leerwertkontrolle NA als Triplett (siehe Abbildung 1). In den Vertiefungen XA bis XL mit den vorinkubierten Zellen werden Medium vorsichtig mit einer Eppendorfpipette entfernt und jeweils 50 µL frisches Basalmedium hinzugefügt. Das Medium der Vertiefungen CA2 und CA3 wird entfernt und zusammen mit CA1 (Leerwertkontrolle der Autofluoreszenz der Zellen) mit 200 µL Basalmedium gefüllt.

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		14 17

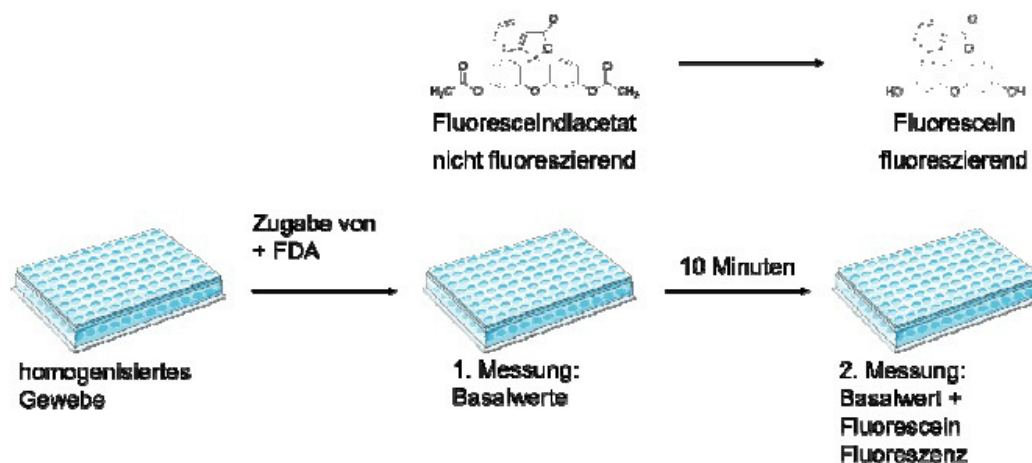


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Bevor die vorbereitete Platte in den FLUOstar eingesetzt werden kann, muss Pumpe 2 mit mindestens 1500 µL der 10 mL Tris/Aceton-Lösung gespült werden, wobei die Abfalllösung in einem gesonderten Gefäß gesammelt wird. Die Injektionsnadel für Pumpe 2 zur Applikation der Tris/Aceton-Lösung wird in den FLUOstar montiert, die Platte in das Gerät eingefahren und Testprotokoll 1 gestartet.

Parallel zum Ablauf von Testprotokoll 1 werden 10,0 mL Fluoresceindiacetat-Testlösung hergestellt (siehe 7.4).

Sobald Testprotokoll 1 beendet ist, wird Pumpe 1 mit der 1500 µL Fluorescein-Testlösung gespült (gesonderte Sammlung der Abfalllösung) und die Injektionsnadel der Pumpe 1 wieder montiert. Vor dem Start von Testprotokoll 2 ist zur Überprüfung und ggf. Einstellung der maximalen Fluoreszenzintensität (Messobergrenze des FLUOstar: 65000 relative Fluoreszenzeinheiten) ein „gain adjustment“ bei der höchsten Konzentration der Standardkurve (SA1) durchzuführen. Wird ein Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten angezeigt, kann die Messung beginnen. Bei höheren Fluoreszenzintensitäten muss die Einstellung „required value“ von 95% heruntersetzt werden, bis der Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten liegt.

Während der FDA-Zugabe und Messung sollten die Fluoreszenzwerte über das „current state overview“ verfolgt werden. Liegen die Messwerte von NA, SA1 (Plattenpositionen A1, B1, C1) über dem Messbereich, kann die Messung ohne ein Verwerfen des Versuches vor Beginn der ersten Injektion abgebrochen und ein erneuter Start der Messung versucht werden. Sollten die Werte abermals überschritten sein, ist eine Reinigung der Optik in Betracht zu ziehen.

Unmittelbar an die Fluoreszenzmessung gemäß Testprotokoll 2 schließt sich Testprotokoll 3 an. Auch hier ist vor Start des Versuchs ein „gain adjustment“ wie zuvor beschrieben durchzuführen.

Nach Beendigung des Versuches sind die Pumpen des FLUOstar durch mehrmaliges Spülen mit Spüllösung 1-3 (in selbiger Reihenfolge) zu säubern (siehe 7.5).

11.2 Proteinbestimmung

Nachdem die Fluoreszenzmessungen abgeschlossen sind, wird die Platte aus dem Gerät entfernt. Den Zellen (CA2 und CA3) überstehende Flüssigkeit wird vorsichtig

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		15 17

entfernt. Anschließend werden 60 µL 0,5% SDS-Lösung zum Zellaufschluss für eine anschließende Proteinbestimmung (mittels des Pierce BCA Protein Assay Kits) zugefügt. Die Platte wird etwa 10 min bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Schüttlers bei 600 rpm geschwenkt. Die Vertiefungsinhalte werden gesammelt, da die Einzelproteinmesswerte stark schwanken und im unteren Detektionsbereich liegen. Je 25 µL der BSA-Eichlösungen (siehe 7.6) werden im Triplet in die Vertiefung einer durchsichtigen 96-Loch-Platte mit Flachboden pipettiert. Anschließend werden 25 µL der entsprechenden Zellsuspension im Duplett in die Vertiefungen der Platte gegeben. Die Injektion der Arbeitslösung (siehe 7.6) erfolgt gemäß Testprotokoll 4. Nach Abschluss wird die Platte aus dem Gerät entfernt und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Messung der Absorption erfolgt anschließend gemäß Testprotokoll 5 nachdem die Platte nach Ablauf der Inkubation zunächst einige Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt werde.

Nach Beendigung des Versuches sind die Pumpensysteme durch mehrmaliges Spülen mit Spüllösung 2 und 3 zu säubern.

12 Auswertung

Die Probendoppelung auf der Mikrotiterplatte führt zu einer Einfachbestimmung von v_{max} , $s_{0,5}$, h , R_s .

12.1 Esteraseaktivitätsbestimmung

Ausgewertet wird über eine Kombination aus FLUOstar Optima Software V2.10 R7, Microsoft Excel und Graphpad Prism. Aus den zu Excel übertragenen Rohdaten der Fluoreszenzmessung (Testprotokolle 2 und 3) werden die Mittelwerte berechnet und den weiterführenden Berechnungen der Fluoresceindiacetat-Hydrolyse zugrunde gelegt.

Aus den Rohdaten wird die Nachweisgrenze (NWG) ermittelt. Dazu wird dem gemittelten Wert der Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve (NA) dessen dreifache Standardabweichung hinzuaddiert (Formel 1). Die Berechnung erfolgt für jede vermessene Platte individuell.

$$\overline{NA} + 3 \cdot SD_{NA} = NWG \quad \text{Formel 1}$$

Mittelwerte der Rohdaten, die unterhalb dieser Grenze liegen, werden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Ferner werden Werte verworfen, deren korrespondierende Kontrolle unterhalb der Nachweisgrenze liegt. D.h. auch Werte die aufgrund der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit in der zweiten Messung oberhalb der Nachweisgrenze liegen werden von den Berechnungen ausgeschlossen.

An die Fluoreszenzmesswerte der Fluorescein-Standardkurve und die Daten der enzymatischen Spaltung von FDA (eS, Formel 5) werden mit der Bestimmungsgrenze (BSG) (siehe Formel 2) höhere Anforderungen gestellt, da sie der Quantifizierung der Fluoreszenzentwicklung dient.

$$\overline{NA} + 10 \cdot SD_{NA} = BSG \quad \text{Formel 2}$$

Titel		Version	Dokumentennr.	
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite von
21.02.2013	21.02.2013	Franzisca Marie Bätz		16 17

Die Werte für die Fluoreszenz-Standardkonzentrationen werden über eine zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion mittels Graphpad Prism angepasst.

Zwei-Phasen Exponential Funktion:

$$Y = Y_{\max 1} \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot X}) + Y_{\max 2} \cdot (1 - e^{-K_2 \cdot X}) \quad \text{Formel 3}$$

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität der Proben (XA bis XL, allgemein: XY) erfolgt in einer Excel-Vorlage unter Abzug der jeweils zugehörigen zellfreien Leerwerte (BA bis BL, allgemein: BY) zur Korrektur der nicht-enzymatischen Esterhydrolyse. Zur Berücksichtigung des Einflusses der Zelltrümmer-Fluoreszenz werden die Mittelwerte der Kontrollwert CA ebenfalls von den Esterase-Messdaten subtrahiert (siehe Formel 4).

$$\text{Korrektur der Fluoreszenzmesswerte:} \quad \overline{XY} - \overline{BY} - \overline{CA} = XY_{\text{korr}} \quad \text{(Formel 4)}$$

So ist für beide Messungen zu verfahren. Anschließend werden die korrigierten Fluoreszenzmesswerte mit den dazugehörigen Konzentrationen eingegeben.

Die Fluoreszenzintensität der 1. Messung wird als Basiswert ($XY_{\text{korr},t_1} = 0$) definiert und von der Fluoreszenzintensität der 2. (XY_{korr,t_2}) subtrahiert. Die Differenz gibt die enzymatische Spaltung von FDA (eS) wieder (siehe Formel 5).

$$eS = XY_{\text{korr},t_2} - XY_{\text{korr},t_1} \quad \text{(Formel 5)}$$

Anhand der Differenz können über Graphpad Prism die umgesetzten Mengen berechnet und diese in Excel zurückübertragen werden. Die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit (mol pro Liter pro Minute) erfolgt unter Einbeziehung der zeitlichen Differenz der beiden Fluoreszenzintensitätsmessungen. Anhand der Umsatzgeschwindigkeit, die nach Graphpad Prism übertragen wird, kann eine Auswertung mit einer allosterischen Sigmoidalkurve (Michaelis-Menten mit Hill-Koeffizient; siehe Formel 6) erfolgen.

$$\text{allosterische Sigmoidalkurve:} \quad Y = \frac{V_{\max} \cdot X^h}{K_{\text{prime}} + X^h} \quad \text{(Formel 6)}$$

Der $s_{0,5}$ -Wert wird über Formelumformung in Excel berechnet und gemeinsam in eine Tabelle mit den wichtigsten Kenndaten ($s_{0,5}$ -Wert (Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit, siehe Formel 7), v_{\max} -Wert (maximal erreichte Enzymaktivität), h (Hill-Koeffizient), r^2 , R_s (Cooperativitätsindex)) überführt.

$$s_{0,5}: \quad s_{0,5} = \sqrt[h]{K_{\text{prime}}} \quad \text{(Formel 7)}$$

Der Cooperativitätsindex (R_s) wird mittels Formel 8 berechnet, wobei $[S]_{0,9}$ die Substratsättigung bei 90% Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf v_{\max} und $[S]_{0,1}$ die bei 10% darstellen.

Liegt dieser Wert unter 81 spricht dies für einen Hill-Koeffizienten (h) von größer 1 und das deutet auf eine positive Cooperativität hin. Liegt dieser Wert über 81 spricht dies für einen Hill-Koeffizienten (h) von kleiner 1 und das entspricht einer negativen Cooperativität.

$$\text{Cooperativitätsindex:} \quad R_s = \frac{[S]_{0,9}}{[S]_{0,1}} \quad \text{(Formel 8)}$$

Titel		Version	Dokumentennr.		
Untersuchung der Esteraseaktivität in 2D-Kultur		1. Version	SOP_MetEs_01		
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller		Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franziska Marie Bätz		17	17

12.2 Proteinbestimmung

Eine letzte Korrektur erfolgt anhand des Proteingehaltes der Proben.

Die Proteinmesswerte werden mit den Umsatzgeschwindigkeiten wie folgt in

Korrelation gesetzt:

$$eS_{\text{Protein}} = \frac{eS}{\text{Protein} \cdot 0,3} \quad (\text{Formel 9})$$

Der Faktor 0,3 ergibt sich aus dem Quotienten des Lysevolumens von 60 µL und dem Gesamtvolumen des vermessenen Wells (200 µL).

13 Mitgeltende Unterlagen

Benutzerhandbuch FLUOstar Optima

Anleitung zum Pierce BCA Protein Assay Kit

8.1.3 Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut



Institut für Pharmazie
Pharmakologie und
Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 2+4
14195 Berlin

Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des
BMBF-Projekts Hautmetabolismus
Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEsInhi bi_homo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franziska Marie Bätz		Seite von 1 13
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Franziska Marie Bätz		Geprüft: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting		Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Verteiler: Verbundpartner des Vorhabens Ersatzmethoden zum Tierversuch BfR, RWTH Aachen, BASF, Henkel AG, Freie Universität Berlin				

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 2	von 13

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1 ZWECK	4
2 EINSATZBEREICH	4
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
3.1 allgemeine Abkürzungen	4
3.2 Probenabkürzungen	4
4 EINLEITUNG	5
5 GERÄTE, MATERIALIEN	5
5.1 Geräte	5
5.2 Materialien	5
5.3 Programme	6
5.4 Haut	6
6 SUBSTANZEN, LÖSUNGEN	6
6.1 Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,0) und Tris/Aceton	6
6.2 Fluorescein-Eichlösungen I und II	6
6.3 Fluoresceindiacetat-/ (FDA-) Stammlösung und Testlösung	7
6.4 Lösung der Leerwertkontrolle	8
6.5 Spüllösungen für den FLUOstar	8
6.6 Inhibitionslösungen	8
7 BELEGUNG DER PLATTE	8
8 PRINZIP DER AUTOMATISCHEN MESSUNG	10
8.1 Injektionschema	10
8.2 Aufruf der Testprotokolle	10
9 DURCHFÜHRUNG DES TESTS	11

Titel		Version	Dokumentennr.	
Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		1. Version	SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
21.02.2013	21.02.2013	Franziska Marie Bätz	3	13
9.1	Vorbereitung der Haut (Hauthomogenisierung)			11
9.2	Feststoffseparation			11
9.3	Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung			11
10	AUSWERTUNG			12
10.1	Esteraseaktivitätsbestimmung			12
11	MITGELTENDE UNTERLAGEN			13

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite 4
			von 13	

1 Zweck

Bestimmung von Esterase-Isoformen in Humanhaut.

2 Einsatzbereich

Standardisierte Vorinkubation mit Esteraseinhibitoren und anschließender Inkubation mit einem Esterasesubstrat basierend auf dem enzymatischen Umsatz von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein in homogenisierter Humanhaut.

3 Abkürzungsverzeichnis

3.1 allgemeine Abkürzungen

BNPP	Bis-(4-nitrophenyl)phosphat
BSG	Bestimmungsgrenze
FDA	Fluoresceindiacetat
NEM	N-Ethylmaleinimid
Neo	Neostigminbromid
NWG	Nachweisgrenze
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

3.2 Probenabkürzungen

BA - BI	Leerwerte für Gruppen A – I
CA	Korrektur der Eigenfluoreszenz der Zelltrümmer
NA	Leerwert für die Standardreihe
SA1	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$
SA10	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-8} \text{M}$
SA11	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-8} \text{M}$
SA12	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-8}M
SA2	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-4}M
SA3	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$
SA4	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-5}M
SA5	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$
SA6	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-6}M
SA7	Fluoresceinstandardkonzentration $5 \cdot 10^{-7} \text{M}$
SA8	Fluoresceinstandardkonzentration $2,5 \cdot 10^{-7} \text{M}$
SA9	Fluoresceinstandardkonzentration 10^{-7}M
XA - XI	Probe der Gruppen A – I

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEsInhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 5	von 13

4 Einleitung

Kutane Esterasen besitzen eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von Prodrugs und der Biotransformation von Xenobiotika. Lipophile Prodrugs überwinden gut die Hornschichtbarriere, in der Epidermis bzw. Dermis werden die aktiven Wirkstoffe freigesetzt. Ziel ist es, die an der Umsetzung von Fluoresceindiacetat zu Fluorescein beteiligten Esterasen mittels verschiedener Inhibitoren zu bestimmen.

Der Test wird als Einfachbestimmung mit 3 Wiederholungen an der Haut von mindestens 3 Spendern durchgeführt.

Enzym	typisches Substrate	Inhibitor
Carboxylesterase	aliphatische Ester	BNPP
Arylesterase	aromatische Ester	NEM
Acetylcholinesterase	Acetylcholin	Neo
Serinprotease	Trypsin	PMSF

5 Geräte, Materialien

5.1 Geräte

Brutschrank BB6220	Heraeus, Hanau
FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg
Maßkolben (10,0 mL, 50,0 mL und 1,0 L)	Brand, Wertheim
Pipetten Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Easypet®	Eppendorf, Hamburg
Sterilarbeitsbank LaminAir®	Heraeus, Hanau
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex® RK 100	Bandelin, Berlin
Vortex-Gerät	Bender & Hobein, Zürich, CH
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

Äquivalente Geräte alternativer Hersteller können ebenfalls eingesetzt werden.

5.2 Materialien

20 mL Spritzen	B.Braun, Melsungen
Aceton, Chromasolv Plus für HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phenylmethylsulfonfluorid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bis-(4-nitrophenyl)phosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N-Ethylmaleinimid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Neostigminbromid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fluorescein (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Fluoresceindiacetat (definierter Gehalt)	Alfa Aesar, Karlsruhe

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite von 7 13

Lösungen der 12 Standards für die Fluorescein Eichkurve können vier Wochen bei -80°C gelagert werden. Die Herstellung auf Vorrat ist also möglich.

Fluorescein-Eichlösung I ($5 \cdot 10^{-4}$ M; Einwaage Fluorescein: 8,307 mg/50 mL) wird unter Standardbedingungen mit 0,1 M Tris-Puffer hergestellt. Aus der Eichlösung I wird Eichlösung II (10^{-6} M; Verdünnung 1:500) mit Tris-Puffer hergestellt. Beide Lösungen werden für die Erstellung der Eichkurve mit 12 Messpunkten benötigt.

Lösungen der Fluorescein-Eichkurve sind aus Fluorescein-Eichlösungen I und II durch Zugabe definierter Volumina Tris-Puffer in 2 mL Reaktionsgefäßen herzustellen (siehe Tabelle 1). Dies erfordert den Zusatz 0,2% (V/V) Aceton (bezogen auf das Endvolumen) damit gleiche Bedingungen bei Standard- und Untersuchungslösung vorliegen.

Tabelle 1: Verdünnungsschema für Eichkurve.

	Abkürzung für das Plattenlayout	Verdünnungen	Tris-Puffer-Zusatz	Eichlösungs-Zusatz	Aceton-Zusatz	Endkonzentration
Eichlösung I	SA1	1:2	996 µL	1000 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
	SA2	1:5	1596 µL	400 µL	4 µL	10^{-4} M
	SA3	1:10	1796 µL	200 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-5}$ M
	SA4	1:50	1956 µL	40 µL	4 µL	10^{-5} M
	SA5	1:100	1976 µL	20 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-6}$ M
	SA6	1:500	1992 µL	4 µL	4 µL	10^{-6} M
Eichlösung II	SA7	1:2	996 µL	1000 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA8	1:4	1496 µL	500 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-7}$ M
	SA9	1:10	1796 µL	200 µL	4 µL	10^{-7} M
	SA10	1:20	1896 µL	100 µL	4 µL	$5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA11	1:40	1946 µL	50 µL	4 µL	$2,5 \cdot 10^{-8}$ M
	SA12	1:100	1976 µL	20 µL	4 µL	10^{-8} M

Nach der Zugabe der einzelnen Bestandteile der Lösung für die Eichkurve werden die 2 mL Reaktionsgefäße für circa 5 s mit einem Vortexer durchmischt.

6.3 Fluoresceindiacetat-/(FDA-)Stammlösung und Testlösung

Fluoresceindiacetat-Stammlösung ($4 \cdot 10^{-2}$ M; Einwaage FDA: 16,654 mg/mL) wird unter Standardbedingungen mit Aceton hergestellt. Zur Minimierung der Verflüchtigung des Acetons aus dem Reaktionsgefäß wird dieses nach Verschluss zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Lösung ist bei -80°C für maximal vier Wochen lagerfähig.

Fluoresceindiacetat-Stammlösung wird, während Testprotokoll 1 läuft, 1:500 mit Tris-Puffer unter Standardbedingungen verdünnt (FDA-Testlösung $8 \cdot 10^{-5}$ M). Durch die geringe Kontaktzeit des Esters mit Wasser wird die Autohydrolyse minimiert.

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 8	von 13

6.4 Lösung der Leerwertkontrolle

Die Lösung für die Leerwertkontrolle (NA, Lösungsmittelkontrolle) wird aus 0,2% (V/V) Aceton und 99,8% (V/V) Tris-Puffer angefertigt.

6.5 Spüllösungen für den FLUOstar

- Spüllösung 1: gesättigte NaOH-Lösung
(zur Lösung überschüssigen Fluoresceindiacetats)
- Spüllösung 2: Reinstwasser
- Spüllösung 3: 70% Ethanol

6.6 Inhibitionslösungen

Die Inhibitionslösungen werden mit Aceton als Lösemittel wie in Tabelle 2 hergestellt.

Gefärbte Lösungen müssen verworfen und neu hergestellt werden. BNPP degradiert unter Lichtexposition relativ rasch. Eine Kontamination der wasserfreien Inhibitionslösungen mit Wasser bei der Zubereitung der Lösungen ist zu vermeiden (Ausnahme: Neo), da vor allem PMSF hydrolyseempfindlich ist.

Tabelle 2: Herstellung der Inhibitionslösungen.

	Einwaage PMSF [mg/mL]	Einwaage BNPP [mg/mL]	Einwaage NEM [mg/mL]	Einwaage Neo [mg/mL]	End- konzentration	Inhibitor- konzentration
PMSF	34,84	-	-	-	0,2 M	10mM
PMSF + BNPP	34,84	68,04	-	-	je 0,2 M	je10mM
PMSF + NEM	34,84	-	25,03	-	je 0,2 M	je10mM
PMSF + BNPP + NEM	34,84	68,04	25,03	-	je 0,2 M	je 10mM
BNPP	-	68,04	-	-	0,2 M	10mM
NEM	-	-	25,03	-	0,2 M	10mM
BNPP + NEM	-	68,04	25,03	-	je 0,2 M	je 10mM
Neo	-	-	-	30,32*	0,2 mM	10µM

* Lösemittel Tris-Puffer; anschließend Verdünnung 1:500 mit Aceton

7 Belegung der Platte

Das Belegungsschema (Abbildung 1) der Platte zeigt in fett das Funktionslayout, welches für das Messprogramm gewählt wird.

NA dient der Korrektur der Eigenfluoreszenz des Lösungsmittels, CA wird zur Korrektur der Eigenfluoreszenz der Zelltrümmer benötigt (Reihe A).

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 10	von 13

Die Beschichtung der Platte erfolgt gemäß dem Layout mit Lösungsmittel bzw. Homogenisat ohne Zusatz von Fluorescein bzw. FDA. Reihe B und C sind der Fluorescein-Eichkurve zugeordnet, die Reihen D und E den Hydrolysekontrollen der verschiedenen Inhibitoren und der eingesetzten FDA-Konzentration und die Reihen F und G den verschiedenen Inhibitoren und dem Homogenisat.

8 Prinzip der automatischen Messung

In der FLUOstar Optima Software V2.10 R7 werden drei Testprotokolle im „Well mode“ für die Esterase-Quantifizierung programmiert. Die Leserichtung der Platte in den Testprotokollen 2-3 erfolgt spaltenweise. Vor Beginn der Messungen sollen die Platten im FLUOstar 5 s lang gerüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der zuvor manuell in die Vertiefungen pipettierten Lösungen zu erreichen. Die Wartezeit nach einem Positionswechsel der Platte, bis das Plattenlesegerät mit der Einzelmessung beginnt, liegt bei 0,5 s (siehe Benutzerhandbuch FLUOstar Optima).

8.1 Injektionschema

Ein Teil der automatisierten Messung ist die programmgesteuerte Zugabe des Esterasesubstrates. Für den Testansatz (BA-BI und XA-XI) werden über das Pumpensystem des FLUOstars jeweils 125 µL der FDA-Testlösung in die Plattenvertiefungen injiziert.

8.2 Aufruf der Testprotokolle

Das **Testprotokoll 2** (mit Pumpennutzung) dient der Zugabe von FDA (BA-BI und XA-XI) gemäß Abbildung 1 und 8.1 Injektionschema mit daran anschließender Fluoreszenzintensitätsmessung als Wert zum Zeitpunkt null. Die Messung der Fluoreszenzintensität (Nullwert) beginnt 2 s nachdem in die entsprechenden Vertiefungen die FDA-Testlösungen über Pumpe 1 bei höchster Geschwindigkeit injiziert worden sind. Die Bestrahlung pro Intervall wird auf zehn Wiederholungen und die Zahl der Intervalle auf 20 eingestellt. Die Fluoreszenz wird bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen.

Angegeben werden die Mittelwerte von 20 Messintervallen von je 0,2 s bei 10-maliger Anregung.

Das **Testprotokoll 3** (ohne Pumpennutzung) wird unverzüglich nach dem Durchlauf von Testprotokoll 2 gestartet und dient der Fluoreszenzintensitätsmessung nach etwa 10 min nach der FDA-Zugabe zu jeder Probe. Testprotokoll 3 entspricht der Programmierung von Testprotokoll 2 mit dem Unterschied, dass das Pumpensystem deaktiviert ist.

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEslnhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 11	von 13

9 Durchführung des Tests

9.1 Vorbereitung der Haut (Hauthomogenisierung)

Die frische oder kryokonservierte Haut (leichtes Antauen nötig) wird auf eine Schichtdicke von 500 µm dermatomisiert. Danach werden Biopsien mit einem Durchmesser von 1 cm angefertigt und in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses Gefäß wird für einige Minuten in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend werden eine Stahlkugel (Durchmesser 5 mm) und 500 µL Tris/Aceton in das Reaktionsgefäß hinzugefügt und alles in die zuvor heruntergekühlten Teflonhalterungen des TissueLyser II eingesetzt. Die Zerkleinerung des Gewebes erfolgt 12 min bei 30 Hz. Zum Abschluss werden 1000 µL Tris/Aceton zugegeben und das Material durch 5 s Schütteln gut durchmischt.

9.2 Feststoffseparation

An die Homogenisation schließt sich eine Feststoffseparation durch 10 minütige Zentrifugation bei 9000xg in einer kühlbaren (gekühlten) Zentrifuge an. Der Überstand wird im weiteren Verlauf für die Esterase Aktivitätsbestimmung genutzt.

9.3 Messung der Esteraseaktivität der Fluoreszenzbildung

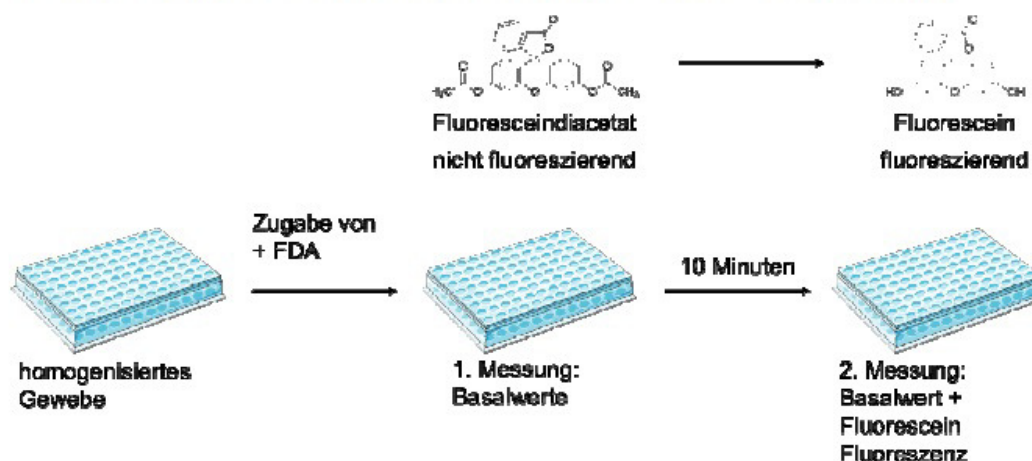


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

Je 200 µL der Standardlösungen SA1-SA12 werden im Duplett manuell in eine schwarze 96-Loch Zellkulturplatte gegeben, die Leerwertkontrolle NA als Triplet (siehe Abbildung 1). In die Vertiefungen BA bis BI werden jeweils 75 µL und in die Vertiefungen XA bis XI jeweils 25 µL Tris/Aceton-Lösung zugegeben. Anschließend werden in die Vertiefungen von BA bis BI, XA bis XI und CA jeweils 50 µL des Überstandes nach der Feststoffseparation (Homogenisates) manuell hinzugefügt. Die Vertiefungen CA werden auf 200 µL mit Tris-Puffer ergänzt. Danach werden die verschiedenen Inhibitor-Lösungen (je 10 µL) manuell in die Löcher injiziert und die Platte für 10 min ab der ersten Zugabe bei 36°C vorinkubiert.

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEsInhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz	Seite 12	von 13

Etwa zwei Minuten vor Ablauf der Vorinkubation werden 10,0 mL Fluoresceindiacetat-Testlösung hergestellt (siehe 6.3) und die Pumpe 1 für ihren Einsatz vorbereitet. Dazu wird die Pumpe 1 mit der 1500 µL Fluorescein-Untersuchungslösung gespült (gesonderte Sammlung der Abfalllösung) und die Injektionsnadel der Pumpe 1 wieder montiert. Vor dem Start von Testprotokoll 2 ist zur Überprüfung und ggf. Einstellung der maximalen Fluoreszenzintensität (Messobergrenze des FLUOstar: 65000 relative Fluoreszenzeinheiten) ein „gain adjustment“ bei der höchsten Konzentration der Standardkurve (SA1) durchzuführen. Wird ein Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten angezeigt, kann die Messung beginnen. Bei höheren Fluoreszenzintensitäten muss die Einstellung „required value“ von 95% herungesetzt werden, bis der Wert <65000 relative Fluoreszenzeinheiten liegt.

Während der FDA-Zugabe und Messung sollten die Fluoreszenzwerte über das „current state overview“ verfolgt werden. Liegen die Messwerte von NA, SA1 (Plattenpositionen A1, B1, C1) über dem Messbereich, kann die Messung ohne ein Verwerfen des Versuches vor Beginn der ersten Injektion abgebrochen und ein erneuter Start der Messung versucht werden. Sollten die Werte abermals überschritten sein, ist eine Reinigung der Optik in Betracht zu ziehen.

Unmittelbar an die Fluoreszenzmessung gemäß Testprotokoll 2 schließt sich Testprotokoll 3 an. Auch hier ist vor Start des Versuchs ein „gain adjustment“ wie zuvor beschrieben durchzuführen.

Nach Beendigung des Versuches sind die Pumpen des FLUOstar durch mehrmaliges Spülen mit Spüllösung 1-3 (in selbiger Reihenfolge) zu säubern (siehe 6.5).

10 Auswertung

Die Probendoppelung auf der Mikrotiterplatte führt zu einer Einfachbestimmung von Inhibition.

10.1 Esteraseaktivitätsbestimmung

Ausgewertet wird über eine Kombination aus FLUOstar Optima Software V2.10 R7, Microsoft Excel und Graphpad Prism. Aus den zu Excel übertragenen Rohdaten der Fluoreszenzmessung (Testprotokolle 2 und 3) werden die Mittelwerte berechnet und den weiterführenden Berechnungen der Fluoresceindiacetat-Hydrolyse zugrunde gelegt.

Aus den Rohdaten wird die Bestimmungsgrenze (BSG) ermittelt. Dazu wird dem gemittelten Wert der Lösemittelkontrolle der Fluorescein-Standardkurve (NA) dessen zehnfache Standardabweichung hinzuaddiert (Formel 1). Die Berechnung erfolgt für jede vermessene Platte individuell.

$$BSG = \overline{NA} + 10 \cdot SD_{NA} \quad (\text{Formel 1})$$

Mittelwerte der Rohdaten, die unterhalb dieser Grenze liegen, werden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Ferner werden Werte verworfen, deren korrespondierende Kontrolle unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt. D.h. auch Werte, die aufgrund der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit in der zweiten

Titel Inhibition der Esteraseaktivität in homogenisierter Humanhaut		Version 1. Version	Dokumentennr. SOP_MetEsInhibi_ho mo_01	
Erstausgabedatum 21.02.2013	gültig ab 21.02.2013	Ersteller Franzisca Marie Bätz		Seite von 13 13

Messung oberhalb der Bestimmungsgrenze liegen werden von den Berechnungen ausgeschlossen.

Die Werte für die Fluorescein-Standardkonzentrationen werden über eine zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion mittels Graphpad Prism angepasst.

Zweiphasige exponentielle Assoziationsfunktion:

$$f(x) = Y_{\max 1} \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot X}) + Y_{\max 2} \cdot (1 - e^{-K_2 \cdot X}) \quad (\text{Formel 2})$$

Die erhaltenen Messwerte für jede Messung werden direkt ohne mathematische Umformungen auf die Standardkurve (zweiphasige exponentielle Assoziation, Formel 2) bezogen.

Die Analyse der gemessenen, interpolierten Fluorescein-Konzentrationen der Proben (XA bis XI, allgemein: XY) erfolgt in einer Excel-Vorlage unter Abzug der ermittelten Fluoresceinkonzentration der jeweils zugehörigen zellfreien Leerwerte (BA bis BI, allgemein: BY) der nicht-enzymatischen Esterhydrolyse (Formel 3). Der Einfluss der Zelltrümmer-Fluoreszenz wird hierbei nicht berücksichtigt, da die Messwerte des Kontrollwertes CA zumeist unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen werden (siehe Formel 1).

Korrektur der Fluoresceinkonzentration: $C_{\text{korr}} = C_{\text{XY}} - C_{\text{BY}} \quad (\text{Formel 3})$

So ist für beide Messungen zu verfahren. Anschließend werden die korrigierten Fluorescein-Konzentrationen der 1. Messung als Basiswert (C_{korr,t_1}) definiert und von den Fluorescein-Konzentrationen der 2. (C_{korr,t_2}) subtrahiert. Die Differenz gibt die enzymatische Spaltung von FDA zu Fluorescein nach Vorinkubation (e_iS) wieder (Formel 4).

$$e_iS = C_{\text{korr},t_2} - C_{\text{korr},t_1} \quad (\text{Formel 4})$$

Mit Hilfe der korrigierten Daten wird der Umsatzgeschwindigkeit (mol pro Liter pro Minute) durch die Einbeziehung der zeitlichen Differenz der beiden Fluoreszenzintensitätsmessungen berechnet. Daraus wird anschließend die prozentuale Aktivität (EA%) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle der Inhibitoren (KL) erhalten (Formel 5).

Prozentuale Enzymaktivität nach Inhibition (EA%):

$$\text{EA\%} = \frac{\text{Enzymaktivität nach Inhibitoreinsatz} \cdot 100}{\text{Enzymaktivität mit Lösemittelkontrolle (KL)}} \quad (\text{Formel 5})$$

11 Mitgeltende Unterlagen

Benutzerhandbuch FLUOstar Optima

SOP_MetEs_homo_03

Anleitung von MatTek zur Handhabung von Hautmodellen

Anleitung von Phenion zur Handhabung von Hautmodellen

Anleitung von CellSystems zur Handhabung von Hautmodellen



Lebenslauf

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Eidesstattliche Erklärung

10 Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, den _____

Franzisca Marie Bätz