

**Untersuchungen der Fremdstoffbindung in permanenten  
Keratinocyten- und Melanocyten-Zelllinien sowie die  
Eignung von Primärkulturen aus humanen Haarfollikeln zur  
In-vitro-Messung der Fremdstoffaufnahme im Haar**

**Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften (V)  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg**

von  
Dino Magnani  
geboren am 28. Oktober 1970 in Itzehoe

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Melanogenese</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Melanosomenreifung</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Melanosomentransfer</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Melanozyten beeinflussende Faktoren</b>	<b>9</b>
1.4.1 Proliferation beeinflussende Faktoren	9
1.4.2 Stimulatoren der Melanogenese	10
1.4.3 Inhibitoren der Melanogenese	12
<b>1.5 Die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Die Pigment-Zelllinie B16F1</b>	<b>15</b>
<b>1.7 Wirksubstanzen</b>	<b>17</b>
1.7.1 Imipramin	17
1.7.2 Haloperidol	18
1.7.3 Morphin	18
1.7.4 Diazepam	19
1.7.5 Nikotin	20
<b>1.8 Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>23</b>
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3 Puffer und Lösungen	25
2.1.4 Zellkulturmedien	25
2.1.5 Verwendete Kultivierungsgefäße	27
2.1.6 Geräte	28
<b>2.2 Zellkultivierung</b>	<b>29</b>
2.2.1 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung	29
2.2.2 Gefrierkonservierung von Zellen	29
2.2.3 Rekultivierung eingefrorener Zellen	30
2.2.4 Mycoplasmentest	30
2.2.5 Zellkultivierung der B16F1 Melanomzelllinie	31
2.2.6 Zellkultivierung der HaCaT-Zellen	31
<b>2.3 Methoden</b>	<b>32</b>
2.3.1 Proteinbestimmung	32
2.3.2 Melaninbestimmung	32
2.3.3 Zellproteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	33
2.3.4 Untersuchungen an der Keratinozytenzelllinie HaCaT	33
2.3.4.1 Fremdstoffaufnahme / Akkumulation in HaCaT-Zellen	33
2.3.5 Untersuchungen an der Pigmentzelllinie B16F1	35
2.3.5.1 Fremdstoffaufnahme und Akkumulation in B16F1-Zellen	35
2.3.5.2 Fremdstoffadsorption an der Oberfläche reifer Melaningranula	36
2.3.5.3 Fremdstoffaufnahme in Gegenwart des Tyrosinase-Inhibitors Phenylthiocarbamid	37
2.3.6 Isolierung und Langzeitkultivierung humaner Zellpopulationen aus Kopfhautpräparaten	38
2.3.6.1 Isolierung epidermaler Melanozyten / Keratinozyten	40
2.3.6.2 Isolierung von Melanozyten aus der äußeren Wurzelscheide (ORS)	41
2.3.6.3 Isolierung peripapillärer Melanozyten	41
2.3.6.4 Kultivierung follikulärer Keratinozyten	42

---

2.3.7 Herstellung mikroskopischer Präparate für immunhistologische Untersuchungen	42
2.3.7.1 Gefrierschnitte humaner Kopfhaut	42
2.3.7.2 Melanozyten-Zellkulturpräparate	43
2.3.7.3 Keratinozyten / Melanozyten Kokultur-Präparate	43
2.3.8 Immunhistologische Melanozyten-Identifizierung	44
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Untersuchungen an der Keratinozytenzelllinie HaCaT</b>	<b>46</b>
3.1.1 Proliferationskinetik der HaCaT-Zelllinie und Wachstumshemmung durch die Fremdstoffe	46
3.1.2 Fremdstoffaufnahme und -Akkumulation in HaCaT-Zellen	47
3.1.3 Konzentrationsabhängige Fremdstoffaufnahme in die HaCaT-Zellen	50
3.1.4 Proteinbindung der Fremdstoffe in HaCaT-Zellen	51
<b>3.2 Untersuchungen an der Pigmentzelllinie B16F1</b>	<b>53</b>
3.2.1 Pigmentbildung und Proliferationshemmung von B16F1-Zellen	53
3.2.2 Proteinbindung der Fremdstoffe in B16F1-Zellen	54
3.2.3 Fremdstoffbindung am Melanin in B16F1-Zellen	55
3.2.4 Fremdstoffbindung an Melaningranula	56
3.2.5 Fremdstoffaufnahme / Akkumulation in Gegenwart des Tyrosinase-Inhibitors Phenylthiocarbamid	56
<b>3.3 Untersuchungen an humaner Kopfhaut / Haarfollikeln</b>	<b>59</b>
3.3.1 Epidermale Melanozyten und Keratinozyten	59
3.3.1.1 Immunhistologischer Nachweis epidermaler Melanozyten	59
3.3.1.2 Herstellung primärer epidermaler Melanozyten- und Keratinozytenkulturen	60
3.3.2 ORS-Melanozyten und -Keratinozyten	63
3.3.2.1 Immunhistologischer Nachweis der ORS-Melanozyten	63
3.3.2.2 Melanozyten- und Keratinozytenkulturen aus der äußeren Wurzelscheide (ORS)	64
3.3.3 Peripapilläre Melanozyten	68
3.3.3.1 Immunhistologischer Nachweis peripapillärer Melanozyten	68
3.3.3.2 Kultivierung peripapillärer Melanozyten	69
<b>4 Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>4.1 Untersuchungen an HaCaT-Zellen und B16F1-Zellen</b>	<b>70</b>
<b>4.2 Zellisolierung aus humaner Kopfhaut / Haarfollikeln</b>	<b>80</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>85</b>
<b>6 Summary</b>	<b>88</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>91</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>107</b>
<b>8.1 Melanozyten im Epidermalkomplex</b>	<b>107</b>
<b>8.2 Melanozyten im Haarfollikel</b>	<b>107</b>
<b>8.3 Haarzyklus</b>	<b>108</b>
<b>8.4 Keratinisierung</b>	<b>109</b>
<b>8.5 Haaraufbau</b>	<b>111</b>
<b>8.6 Verwendete Abkürzungen</b>	<b>113</b>
<b>8.7 Danksagung</b>	<b>116</b>
<b>8.8 Lebenslauf</b>	<b>117</b>
<b>8.9 Erklärung</b>	<b>118</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Melanogenese	5
Abb. 1.2: HaCaT-Zelllinie	14
Abb. 1.3: Pigment produzierende B16F1-Zellen	16
Abb. 1.4: Imipramin	17
Abb. 1.5: Haloperidol	18
Abb. 1.6: Morphin	19
Abb. 1.7: Diazepam	20
Abb. 1.8: Nikotin	21
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Experimente	35
Abb. 2.2: Kopfhautpräparat mit Haarfollikeln	39
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Follikelpräparation	39
Abb. 3.1: Proliferationskinetik der HaCaT-Zelllinie	46
Abb. 3.2: Zeitabhängige Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	48
Abb. 3.3: Zeitabhängige Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	48
Abb. 3.4: Zeitabhängige Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	49
Abb. 3.5: Zeitabhängige Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	49
Abb. 3.6: Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	50
Abb. 3.7: Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen	51
Abb. 3.8: Vergleich der Protein gebundenen Fremdstoffe	51
Abb. 3.9: Zeitlicher Verlauf der Pigmentbildung	53
Abb. 3.10: Vergleich der Proliferationshemmung	54
Abb. 3.11: Vergleich der Protein gebundenen Fremdstoffe	54
Abb. 3.12: Fremdstoffbindung am Melanin der B16F1-Zellen	55
Abb. 3.13: Fremdstoffadsorption an Melaningranula	56
Abb. 3.14: Haloperidolgehalt in B16F1-Zellen	57
Abb. 3.15: Imipramingehalt in B16F1-Zellen	58
Abb. 3.16: Nachweis epidermaler Melanozyten	59
Abb. 3.17: Epidermale Primärkultur	60
Abb. 3.18: Passagierte Melanozyten	61
Abb. 3.19: Immunhistologische Identifizierung epidermaler Melanozyten	62
Abb. 3.20: Nachweis der ORS-Melanozyten	63
Abb. 3.21: Passagierte ORS-Melanozyten	65

---

Abb. 3.22: Zellkulturpräparat aus humanen Haarfollikeln	66
Abb. 3.23: Kultivierung von ORS-Melanozyten	67
Abb. 3.24: Nachweis der peripapillären Melanozyten	68
Abb. 3.25: Primärkultur peripapillärer Zellen	69
Abb. 8.1: Gewebslokalisierung der Melanozyten beim Menschen	107
Abb. 8.2: Haarfollikel	108
Abb. 8.3: Haarquerschnitt	112

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Kultivierungsgefäße	27
Tab. 2.2: Tabelle der verwendeten Primärantikörper	45
Tab. 4.1: Parameter der verwendeten Testsubstanzen	72
Tab. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse	77

# 1 Einleitung

Haare waren schon immer ein interessantes Untersuchungsmaterial in der Forensik. Zunächst lag die Feststellung von Individualmerkmalen an Haaren und die Zuordnung einer Haarspur zu einer bestimmten Person oder deren Ausschluss als Spurenleger im Vordergrund der Beobachtungen. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Methoden in der forensischen Medizin konnte der Nachweis einer chemischen Belastung des Organismus mit toxischen Substanzen, Drogen oder Medikamenten an Haaren von lebenden Personen oder Verstorbenen geführt werden.

Der Giftnachweis hat in der forensischen Chemie Tradition. Viele Metalle und Metallverbindungen waren bereits im Altertum als Heilmittel und als Gifte bekannt, besonders Arsen wurde häufig als Mordgift verwendet. Lange bevor der Nachweis von Arsen sowie anderen toxischen Substanzen in Körperflüssigkeiten wie Urin oder Blut gelang, konnten bereits im 19. Jahrhundert anorganische Substanzen in Haaren bei Vergiftungen nachgewiesen werden [Casper, 1857]. Seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts erlaubten aufwändige mikroanalytische Verfahren die Feststellung von Spurenelementen in menschlichen Haaren [Kijewski, 1993]. Bereits 1954 gelang Goldblum am Beispiel von Barbituraten der Nachweis einer organischen Fremdschubstanz in der Haut und Haaren von Versuchstieren [Goldblum *et al.*, 1954]. Es dauerte allerdings noch weitere 30 Jahre, bis durch den radioimmunologischen Nachweis von Opiaten sowie anderen forensisch relevanten Substanzen die Ära des heutigen Drogen- und Medikamentennachweises, sowie der Einsatz der Haaranalyse im Rahmen eines umwelttoxikologischen Biomonitorings am Haar begann.

Seit Mitte der 80er Jahre standen forensischen Laboratorien hoch empfindliche apparative Analysetechniken zur Verfügung und die Mitteilungen über den Nachweis von körperfremden organischen Stoffen im Haar stiegen explosionsartig an. Seit den 90er Jahren hat sich der Nachweis eines zurückliegenden Medikamenten- oder Drogenkonsums an Haaren etabliert und wird inzwischen zunehmend auf Antrag der Verkehrsbehörden oder der Justiz in der forensischen Begutachtung eingesetzt. Man geht davon aus, dass Haare wie

ein "Fahrtschreiber" fungieren und ein großes, mehrere Monate umfassendes Zeitfenster des Konsums repräsentieren. Diese Möglichkeit, sowie der Vorteil der nicht invasiven Probennahme, hat zu einem raschen Einsatz und einer weiten Verbreitung der Haaranalytik in folgenden Bereichen geführt [Madea und Mußhoff, 2004]:

- bei Fahreignungsbegutachtung zur Wiedererlangung des Führerscheins
- bei Verstößen gegen das Betäubungsmittelgesetz
- bei Drogen assoziierten Todesfällen oder Todesfällen mit Verdacht einer Gift- oder Medikamentenbeibringung
- zur Überprüfung einer Drogenabstinenz während eines Rehabilitationsprogramms
- zur Überprüfung der Compliance eines Patienten nach Dauermedikation
- zur Unterstützung von Schuldfähigkeitsbegutachtung
- in der Perinatalmedizin zur Erkennung intrauteriner Suchtstoffexpositionen
- in den USA bei Personaleinstellungen und zur Überprüfung von Arbeitnehmern in sicherheitssensiblen Bereichen („work place testing“).

Zu Beginn der Haaranalytik wurden die aus Haaren extrahierten Fremdstoffe meist mithilfe radioimmunologischer Analyseverfahren nachgewiesen [Püschel *et al.*, 1983]. Heute kommen vorwiegend gekoppelte, hochempfindliche Analyseverfahren wie Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC / MS) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie / Massenspektrometrie (LC / MS) zum Einsatz. Mittels dieser Analysemethoden ist es möglich, nahezu jeden Fremdstoff in Haarproben mit einer Nachweisgrenze im Bereich bis 0,1 ng/mg Haar nachzuweisen. Inzwischen liegen unzählige Publikationen vor, die über Extraktionsmethoden berichteten, mit denen sich die jeweiligen Fremdstoffe zufriedenstellend aus der Haarmatrix herauslösen lassen. Meist werden bei Extraktionen zum Nachweis illegaler Betäubungsmittel unterschiedliche Lösungsmittel angewendet, so dass standardisierte Verfahren nicht vorhanden sind [Eser *et al.*, 1997].

Die Frage, wie die analytisch fassbaren Fremdstoffmoleküle in die Haare gelangen und an welchen Haarstrukturen sie lokalisiert werden, kann bis heute nicht eindeutig beantwortet werden. Zunächst soll hier die Frage der Fremdstoffaufnahme in die Haarfollikel erläutert werden. Bei der Aufnahme der Fremdstoffe in das Haar ging man zunächst davon aus, dass die Xenobiotika über die Blutversorgung im Kontakt mit den Zellen der Haare standen. In diesem einfachen Inkorporationsmodell werden die Fremdsbstanzen über den Blutweg in die Wachstumszone des Haares transportiert, gelangen in die keratogene Zone und werden dort eingeschlossen. Als fixierte Substanzbanden werden die Fremdstoffe mit der Haarfaser entsprechend dem Haarwachstum weiter transportiert und können so retrospektiv nachgewiesen werden. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die Fremdstoffkonzentrationen im Haar mit den im Blut enthaltenen Konzentrationen der Xenobiotika korrelieren [Nakahara *et al.* 1995; Gygi *et al.*, 1996 a]. Basierend auf dem einfachen Inkorporationsmodell, geht das komplexe Inkorporationsmodell [Henderson, 1993] davon aus, dass im Haar nachweisbare Fremdstoffe eine Gesamtbelastung des Organismus repräsentieren und aus verschiedenen Quellen stammen können. Danach sind folgende Aufnahmewege für Fremdstoffe ins Haar möglich

- aus dem Blut nach aktivem und / oder passivem Konsum
- aus dem Flüssigkeitssystem der Haut
- aus dem Schweiß und Talg
- aus der Epidermis bzw. dem *Stratum corneum*
- durch direkten Kontakt (Aerosole, Stäube, Körperflüssigkeiten, Lösungen).

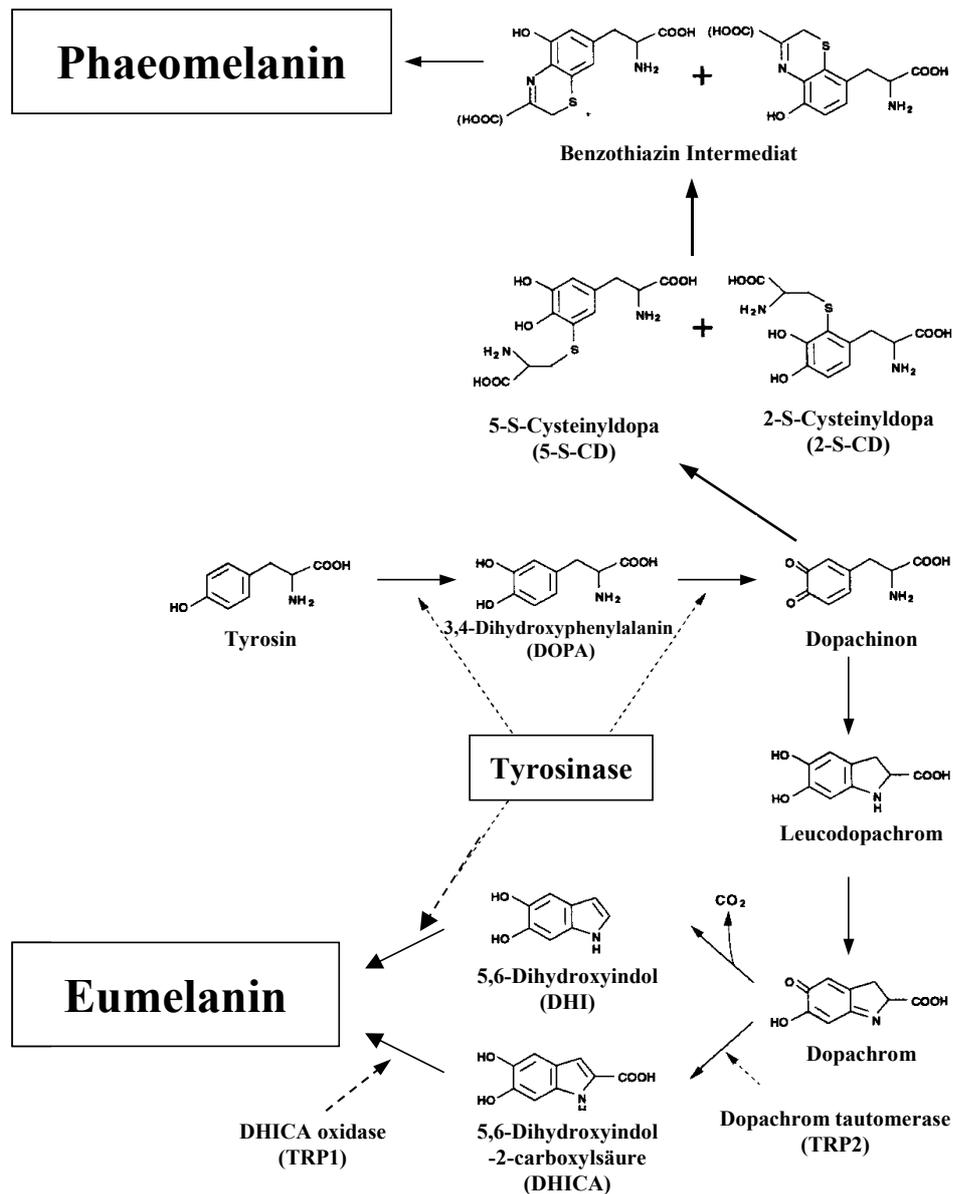
Die Ergebnisse unterschiedlicher Studien deuten daraufhin, dass die Aufnahme organischer Fremdstoffe, sowohl nach aktivem Konsum über Inhalation oder Injektion, als auch über die Umwelt bedingte Antragnungen über die Haut und nach passivem Konsum (ebenfalls Inhalation) im Haar nachgewiesen werden können, so dass das einfache Inkorporationsmodell für den Nachweis von Fremdstoffen nicht ausreicht [Balabanova *et al.* 1992; Cone *et al.* 1994; Lademann *et al.* 2003]. Vielmehr ist die Gesamtbelastung eines Organismus mit Xenobiotika auf die Summe der unter den komplexen Inkorporationsmodell aufgelisteten Aufnahmewege zurückzuführen.

Für die Bindung der Fremdstoffe an die zellulären Strukturen des Haares während der Keratinisierung kommen drei Möglichkeiten in Betracht. Neben der Assoziation der Fremdstoffe an Haarproteine, den Intermediärfilamenten, werden die Lipide (Zellmembrankomplex) und die Melanine genannt [Pötsch *et al.*, 1997 c]. In dieser Arbeit gilt die besondere Aufmerksamkeit der Bindungsmöglichkeit der Fremdstoffe an die Melanine. Die Bildung der Melanine in Melanozyten, ihr Transfer in Keratinozyten und somit ihrer Lokalisation im Haar ist komplex. Ohne ihr Verständnis ist der gewählte Untersuchungsansatz zum Nachweis der Bindung von Xenobiotika nicht zu verstehen. Deshalb werden in den folgenden Abschnitten zunächst die Grundlagen der Pigmentierung erläutert.

## 1.1 Melanogenese

Die Synthese des Melanins (Melanogenese) findet in Zellkompartimenten der Melanozyten, den Melanosomen statt. Zu Beginn der Synthese steht die Aminosäure Tyrosin und führt über eine Reihe von Syntheseschritten zu einem langkettigen Biopolymer, das aus sich wiederholenden Melanineinheiten besteht (Abbildung 1.1). Das Schlüsselenzym der Melanogenese ist die kupferhaltige Tyrosinase, das die ersten beiden Schritte der Melanogenese katalysiert. Bei der Tyrosinase handelt es sich um ein membranständiges Glycoprotein, das ausschließlich in Melanosomen nachgewiesen wird [Seiji und Iwashita, 1965]. Des Weiteren sind noch zwei Tyrosinase verwandte Proteine (TRP = Tyrosinase Related Protein) bekannt, das TRP-1 und TRP-2. Beide teilen mit der Tyrosinase 40 % Struktur-Homologie und haben eine katalytische als auch regulatorische Funktion in der Melanogenese. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff wird die Aminosäure Tyrosin durch die Tyrosinase zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oxidiert und das gebildete DOPA wird weiter zu Dopachinon oxidiert [Jimbow *et al.*, 1976]. Nach der Bildung von Dopachinon trennen sich die Stoffwechselwege: Dopachinon wird in einer Reihe von Oxidationsschritten zu Eumelanin [Furumura *et al.*, 1996] oder alternativ zu Phaeomelanin synthetisiert (Abbildung 1.1). Beim nächsten Schritt der Eumelaninsynthese entsteht Leukodopachrom (Zyklodopa), das über Dopachrom, und 5,6-Dihydroxyindol zu Indolchinon synthetisiert wird. Indolchinon ist Ausgangsmonomer für die Polymerisation des Eumelanin. Die Phaeomelaninsynthese erfolgt durch

Anlagerung der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein an DOPA zu Cysteinyl-DOPA und anschließender Zyklisierung und oxidativer Polymerisation. Das Eumelanin besteht hauptsächlich aus einem Polymer mit 5,6-Dihydroxyindol und 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure-Einheiten, dagegen besteht das Phaeomelanin aus Benzothiazin-Einheiten.



**Abb. 1.1: Melanogenese.** Schematische Darstellung der Melanogenese [nach Ito *et al.*, 1993].

Basierend auf der Molekülstruktur bestehen die Unterschiede der beiden Melaninarten in der Farbe, der Löslichkeit und dem Schwefelgehalt. Beim Eumelanin handelt es sich um ein dunkelbraunes / schwarzes Pigment, das alkaliumlöslich ist und das Stickstoff (6–9 %), aber kaum Schwefel (0-1 %)

enthält. Dagegen handelt es sich beim Phaeomelanin um ein gelbes / rotes Pigment das alkalilöslich ist und einen hohen Anteil von Schwefel hat (9-12 %). Ausschlaggebend für die Pigmentierung der Epidermis oder des Haarfollikel ist nicht die Anzahl der Melanozyten, sondern vielmehr ihre Aktivität und die synthetisierte Melaninart. Auch wenn die Dichte der Melanozyten auf der Körperoberfläche individuell variiert, ist die Anzahl der Melanozyten im Vergleich der Hauttypen I-IV und sogar im Vergleich zu ethnischen Gruppen gleich [Staricco und Pinkus, 1957; Szabo, 1959 und 1967]. Die Pigmentierung ist vielmehr abhängig von der Aktivität der Melanogenese und dem Transfer an die benachbarten Keratinozyten (Abschnitt 1.3). Ergebnisse aus Studien, in denen die Tyrosinaseexpression in unterschiedlichen Hauttypen bzw. Hauttypen unterschiedlichen ethnischen Ursprungs untersucht wurden, haben gezeigt, dass die Tyrosinaseaktivität in Melanozyten von schwarzer Haut 6-8 mal höher ist als die der Haut weißer Individuen bei gleichem Protein- und mRNA-Gehalt [Naeyaert *et al.*, 1991; Iozumi *et al.*, 1993]. Studien von Spritz und Mitarbeitern zeigten, dass die Gensequenz der Tyrosinase von Schwarzen und Kaukasiern gleich ist [Spritz *et al.*, 1991; Giebel *et al.*, 1991]. Da die Regulation der Tyrosinase weder über die Transkription noch über die Translation stattfindet, wurden Untersuchungen unternommen, zelluläre Regulatoren zu ermitteln. Fuller und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass der melanosomale pH-Wert die Tyrosinaseaktivität beeinflusst und dass die optimale enzymatische Aktivität des Enzyms im neutralen pH-Bereich liegt. Der melanosomale pH-Wert schwarzer Haut liegt oberhalb von pH 6 im Bereich des Optimums der Tyrosinaseaktivität von 7,5. Dagegen liegt der pH-Wert von Kaukasiern unterhalb pH 6 [Saeki und Oikawa, 1983; Fuller *et al.*, 2001].

## 1.2 Melanosomenreifung

Die Melanosomen sind Organellen mit einer elliptischen oder kugeligen Form, die alle für die Melanogenese erforderlichen Enzyme enthalten. Die Melanosomen werden in vier Stadien unterteilt, die elektronenmikroskopisch unterschieden werden können und den Grad der Melanisierung widerspiegeln [Kushimoto *et al.*, 2001]. Sie entstehen durch die Fusion aus dem Trans-Golgi-Netz stammenden Coated Vesicles, die für die Melanogenese erforderlichen Enzyme enthalten - mit

den Melanosomen des Stadium I und II - die den gleichen biosynthetischen Ursprung wie die Lysosomen [Zhou *et al.*, 1993; Diment *et al.*, 1995] vom glatten endoplasmatischen Reticulum haben [Jimbow *et al.*, 1997]. Anhand der Form der Melanosomen lassen sich auch Rückschlüsse auf die in ihnen synthetisierte Melaninart ziehen. Die elliptisch geformten Melanosomen enthalten Eumelanin, in den runden Melanosomen ist das Phaeomelanin enthalten [Orfanos und Ruska, 1968]. Im Stadium I, der Melanosomenreifung besitzen die Eumelanosomen noch eine kugelige Form mit einer unvollständigen lamellenartigen Struktur und Proteine in einer amorphen Matrix. Mit Fortschreiten der Melanogenese in den Eumelanosomen im Stadium II kann eine lamellenartige, strukturierte Matrix identifiziert werden, die dann über das Stadium III über den stetigen Anstieg der elektronischen Dichte hin zum Stadium IV, den amorphen, komplett pigmentierten Zustand des Melanosoms führt. Dagegen unterscheiden sich die Phäomelanosomen nicht nur in der kugeligen / runden Form und granulären Beschaffenheit über alle vier Stadien der Melanosomenreifung von den Eumelanosomen, sondern auch durch das Fehlen von TRP-1, TRP-2 und einen reduzierten Tyrosinasegehalt [Kobayashi *et al.*, 1995]. Die Tyrosinaseaktivität ist im Stadium IV der Melanosomenreifung nicht mehr nachweisbar [Seiji, 1981], was ebenfalls auf einen abgeschlossenen Melanisierungsvorgang hindeutet.

### 1.3 Melanosomentransfer

Der intrazelluläre Transport im Melanozyt erfolgt entlang der Dendriten über Aktinfilamente des Zytoskeletts und Motorproteine wie Kinesin, Dynein und Myosin V zu den distalen Enden der Dendriten [Wu *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1998; Hara *et al.*, 2000]. Es ist immer noch wenig über den genauen Mechanismus des Melanosomentransfers und der Regulation des Transfers an die Keratinozyten bekannt. Studien, die sich mit dem Transfer von Melanosomen an die Keratinozyten beschäftigt haben, resultieren in den folgenden Hypothesen [Jimbow *et al.*, 1998]: (i) Abgabe der Melanosomen von den Melanozyten und die Aufnahme durch die Keratinozyten über Endozytose; (ii) Die Keratinozyten umschließen die Dendriten der Melanozyten durch aktive Phagozytose und inkorporieren Teile der Melanozyten (Zytophagozytose) [Okazaki *et al.*, 1976]; (iii) Aktiver Transfer der Melanosomen von den Melanozyten an die

Keratinocyten oder (iv) Ausbildung einer Pore zwischen den Plasmamembranen der beiden Zellen über die die Melanosomen transferiert werden. Nach der Aufnahme der Melanosomen lagern sich die Zellorganellen um den Zellkern der Keratinocyten und absorbieren die schädigende UV-Strahlung.

Neben der Aktivität der Melanogenese ist die Pigmentierung abhängig vom Transfer an die benachbarten Keratinocyten und der Anordnung der Melanosomen in den Keratinocyten. Bei Menschen weißer Hautfarbe mit blonder oder roter Haarfarbe, werden kleine Gruppen von Melanosomen in den Keratinocyten von einer Membran umgeben (Melanosomenkomplexe). Bei Afrikanern und Aborigines dagegen sind die Melanosomen größer und einzelliegend verteilt; für die Art der Verpackung ist wahrscheinlich die Partikelgröße entscheidend. Im Vergleich epidermaler und follikulärer Melanosomen fällt auf, dass follikuläre Melanosomen 2-4fach größer sind als epidermale. Bei heller Haut erfolgt der lysosomale Abbau der Melanosomen schon in den unteren Epidermislagen, während bei dunkler Haut noch intakte Melanosomen in der Hornschicht gefunden werden. Entscheidend für das phänotypische Erscheinungsbild sind auch die von den Melanozyten gebildeten Melaninarten, dem stickstoffhaltigen Eumelanin und dem schwefelhaltigen Phaeomelanin. Beide Melaninarten werden epidermal [Hunt *et al.*, 1995] und follikulär [Orfonne und Prota, 1993] vom Menschen synthetisiert. Die Haarfarbe hängt von den unterschiedlichen Anteilen der Melaninarten in den Haaren ab. Das Eumelanin kommt in größeren Mengen bei Menschen mit dunkler Haut und dunklen Haaren vor, sie besitzen die größeren Melanosomen, die über Medulla und Cortex (Abschnitt 8.5) des Haarschaftes verstreut sind und bieten größeren Schutz vor UV-Strahlen [Sarna und Sealy, 1984; Korytowski *et al.*, 1986]. Die höchsten Mengenanteile Eumelanin kommen bei Menschen asiatischen und negroiden Ursprungs vor. Das Phaeomelanin liegt in blonden / roten Haar und dem Hauttyp I vor [Thody *et al.*, 1991]. Unter UV-Einstrahlung trägt Phaeomelanin zu Strahlen induzierten Hautschäden durch die Bildung von freien Radikalen bei [Agin *et al.*, 1980; Chedekel und Zeise, 1988]. Die Farbintensität (blond, dunkelblond oder braun) wird dagegen von der Zahl der Pigmentgranula bestimmt.

## **1.4 Melanozyten beeinflussende Faktoren**

Erste Erkenntnisse zur Aufklärung der Mechanismen der Melanogenese wurden an Melanomzelllinien erhalten, die später durch Untersuchungen an humanen Melanozyten, kultiviert aus der Haut, ergänzt wurden. Entsprechende Untersuchungen an Melanozyten, die aus menschlichen Haarfollikeln isoliert wurden, liegen nicht vor.

### **1.4.1 Proliferation beeinflussende Faktoren**

Eisinger und Marko gelang es 1982 durch den Zusatz des Tumorpromoters Phorbol-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) und Cholera-Toxin (CT) in Zellkulturmedien, das Überwuchern der zahlenmäßig gering vorliegenden und langsam proliferierenden Melanozyten aus der Haut durch Keratinozyten und Fibroblasten zu verhindern und epidermale Melanozytenkulturen zu erhalten [Eisinger und Marko, 1982]. Neben einem toxischen Effekt auf die Keratinozyten und Fibroblastenpopulationen erhöhte TPA die Proliferation der Melanozyten über eine Aktivierung der Proteinase C. Auch andere Zellkulturzusätze, die zum Ansteigen der Proliferationsrate der Melanozyten über einen intrazellulären cAMP-Anstieg führen, sind inzwischen bekannt und werden als Zusätze in Medien für die Kultivierung von Melanozyten verwendet. Hierzu zählen 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Theophyllin, sowie der Zusatz Dibutyryl-cAMP. Halaban [Halaban, 2000] zeigte, dass eine Kombination verschiedener mitogener Substanzen im Kulturmedium über den gleichen Wirkmechanismus, den Anstieg des cAMP-Gehaltes, zu synergistischen Wachstums-Effekten führt. Ebenfalls noch in den 80er Jahren gelang es Halaban und Alfano [Halaban und Alfano, 1984] durch den Zusatz des Antibiotikums Geneticin - das toxisch auf schnell proliferierende Zellen wirkt - selektiv Fibroblasten aus den Kulturen zu eliminieren. Zusätzlich zu diesen genannten Chemikalien werden die Medien mit endogenen Wachstumsfaktoren ergänzt, die über die Proliferation steigernde Wirkung hinaus auch einen positiven Einfluss auf die Pigmentierung haben.

### 1.4.2 Stimulatoren der Melanogenese

Verschiedene exogene und endogene Faktoren beeinflussen die Melanogenese. Als einer der Wichtigsten ist hierbei die UV-Strahlung zu nennen, über die die Melanozyten direkt beeinflusst werden können oder indirekt über die Stimulation der Keratinozyten. Über UV-Strahlung induzierte DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimere werden durch DNA-Reparatursysteme beseitigt. Die dabei entstehenden Dinukleotide erhöhen die Melaninsynthese über die Regulation der Tyrosinase mRNA [Eller *et al.*, 1996]. Dagegen bewirkt die UV-Exposition auf die Keratinozyten die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) [Romero-Graillet *et al.*, 1996]. Der Second Messenger NO erhöht den intrazellulären cGMP-Gehalt der Zelle. cGMP stimuliert die Tyrosinaseaktivität und erhöht dadurch die Melaninsynthese in Melanozyten [Hoganson *et al.*, 1989]. Im Gegensatz zu der parakrinen Freisetzung von NO setzen die Melanozyten aber auch autokrin NO nach UVB-Bestrahlung frei [Romero-Graillet *et al.*, 1996 und 1997].

Seit den sechziger Jahren ist bekannt, dass die Hypophysenhormone wie Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und das Alpha-Melanozyten stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) die Melanogenese in epidermalen Melanozyten erhöhen [Lerner und McGuire, 1961 und 1964]. Es wurde gezeigt, dass das Polypeptid  $\alpha$ -MSH die Melanogenese epidermaler Melanozyten stimuliert und außerdem zu einer diffusen Verteilung der Pigmentgranula in der Zelle führt [Jiménez *et al.*, 1988; Levine *et al.*, 1991]. Hierin vermutet man die Ursache für die Sofortbräunung der Haut, die bereits nach Stunden eintritt. Des Weiteren beeinflusst  $\alpha$ -MSH die Differenzierung muriner Melanozyten [Hirobe und Takeuchi 1977; Hirobe und Abe, 1999]. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass das Hypophysenprodukt  $\alpha$ -MSH und MSH-Analoga die Tyrosinase-Aktivität in S91-Zellen erhöht [Fuller *et al.*, 1990] und somit die Melanogenese stimuliert [Abdel-Malek *et al.*, 1995]. Die Stimulation der Melanogenese mittels  $\alpha$ -MSH wurde auch durch *in vivo*-Untersuchungen an Nagern belegt [Bhardwaj *et al.*, 2000]. Auch in Untersuchungen am Menschen wurde gezeigt, dass nach subcutaner Applikation des synthetischen  $\alpha$ -MSH-Analogs NDP ein Anstieg epidermaler Pigmentierung, insbesondere in UV-Licht exponierten Arealen wie im Nacken zur Folge hat [Levine *et al.*, 1991]. Lunec und Mitarbeiter [Lunec *et*

*al.*, 1990] zeigten, dass  $\alpha$ -MSH auch von pigmentbildenden Zellen selbst produziert werden kann. Aus Zellkulturversuchen ergab sich, dass Keratinozyten ebenfalls  $\alpha$ -MSH bilden können. Bhardwaj und Luger [Bhardwaj und Luger, 1994] wiesen nach, dass durch die Ausschüttung von  $\alpha$ -MSH durch die Keratinozyten sowohl die Proliferation als auch die Pigmentbildung benachbarter Melanozyten gefördert wird. Eine Verstärkung des Pigmentierungseffekts wurde durch die Kombination von  $\alpha$ -MSH Applikation und UV Bestrahlung sowohl tierexperimentell [Levine *et al.*, 1991] als auch beim Menschen beschrieben. Es wird vermutet, dass UV-Strahlung  $\alpha$ -MSH sowohl autokrin als auch zusätzlich parakrin freisetzt.

Weitere Beeinflussungen der Melaninbildung gehen durch parakrine Wachstumsfaktoren von Keratinozyten aus. Einer dieser Faktoren ist der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), der in Kokulturen [Halaban *et al.*, 1988 a] die Kultivierung der Melanozyten über mehrere Wochen möglich macht. Ebenfalls parakrin wirkt der Nerv Growth Factor (NGF) [Yaar *et al.*, 1991] sowie das Endothelin-1 (ET-1) [Hara *et al.*, 1995], das dosis abhängig die Proliferation von humanen Melanozyten [Tada *et al.*, 1998], die Ausbildung der Dendriten sowie die Tyrosinaseaktivität stimuliert. Durch Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren wurden bisher die besten Erfolge in der Kultivierung der Melanozyten erzielt [Halaban, 2000].

Durch zahlreiche Untersuchungen wurde belegt, dass viele Substanzen stimulierend auf die Pigmentierung der Haut oder der Haare wirken. Die Substanz Psoralen (5-Methoxypsoralen) hat eine stimulierende Wirkung auf die Melanogenese, die durch Kombinationswirkung mit UV-Strahlen synergistisch gesteigert wird [Mengeaud und Ortonne, 1996]. Die Kombination dieser beiden Stimuli findet in der PUVA-Therapie zur Behandlung der Vitiligo, Psoriasis, kutanem T-Zell-Lymphom und anderen Erkrankungen Verwendung. Bei der Behandlung von Vitiligo-Patienten mit der PUVA-Therapie kann es zur Repigmentierung der Haut aufgrund eines Anstiegs der Melanozyten in depigmentierten Bereichen kommen [Ortonne *et al.*, 1980; Kao und Yu, 1992] und einer erhöhten Melanogeneseleistung in Haaren nach der Einzelapplikation von Psoralen. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) führte *in vitro* zum Anstieg der

Pigmentierung über verschiedene Wege. Zum einen über eine erhöhte Zellaktivität in Form einer gesteigerten Melaninproduktion und die Ausbildung von mehr Dendriten und zum anderen aus einem daraus resultierenden erhöhten Melanintransfer an die Keratinozyten [Gibbs *et al.*, 2000]. Zahlreiche Substanzen wurden auf die möglichen stimulierenden Effekte der Pigmentierung *in vitro* getestet. Dabei zeigte sich, dass Substanzen, die positiv die Melanogenese in Melanomzellkulturen, humanen Melanozytenkulturen oder in Tierversuchen beeinflussen konnten, diese Wirkung *in vivo* beim Menschen nicht zeigten. Zu diesen Substanzen gehörten unter anderem: L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) [Slominski *et al.*, 1988 und 1991], NO [Romero-Graillet *et al.*, 1996], 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) [Fuller *et al.*, 1990] und Diacylglycerol (DAG). Zudem wies ein Teil der Chemikalien eine kanzerogene Wirkung in Tierversuchen auf, was sie für den klinischen Anwendungsbereich unbrauchbar machen. Dagegen wurden für  $\alpha$ -MSH und L-Tyrosin auch beim Menschen positive Einflüsse auf die Pigmentierung festgestellt [Brown, 2001].

### 1.4.3 Inhibitoren der Melanogenese

Bisher sind zahlreiche biologische Faktoren bekannt, die die Melanogenese hemmen. Daneben wurden zahlreiche chemische Substanzen in der Literatur beschrieben, die an den verschiedensten Stellen in die Regulation der Melanogenese, der Melaninsynthese, der Melanosomenreifung oder dem Transfer der reifen Melanosomen an die Keratinozyten eingreifen.

Die Melanogenese in den Melanozyten wird über eine Reihe von endogenen Faktoren gesteuert. 1991 zeigten Swope und Mitarbeiter, dass das Zytokin, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha), die Melanogenese in normalen Melanozyten inhibiert [Swope *et al.*, 1991]. In einer Studie an murinen B16F1-Zellen wiesen Martinez-Esparza *et al.* [1998] nach, dass TNF-alpha die Tyrosin-Hydroxylase- und Dopa-Oxidase-Aktivität in diesen Zellen um 30 % verringerten. Aufgrund des Nachweises der TNF-alpha induzierten Verringerung des intrazellulären Tyrosinase- und TRP-1-Gehaltes vermuteten sie einen kombinierten Effekt, der zum einen durch mRNA und zum anderen durch eine reduzierte Enzymaktivität bedingt wurde.

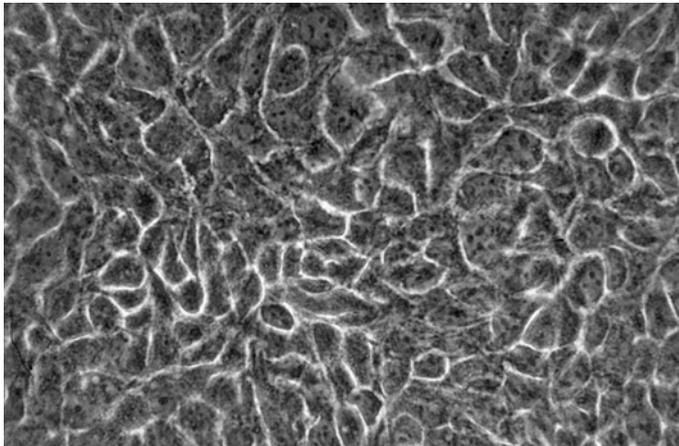
Auch ernährungsbedingte Mangelzustände können die Ursache für eine herabgesetzte Melanogeneseaktivität sein. Eisen und Vitamin A-Mangel führt zu einer verminderten Melanisierung in den Melanozyten, was die Ausbildung einer Hypomelanose zur Folge hat. Eine Unterversorgung mit Aminosäuren (Kwashiorkor) führt bei schwarzhaarigen Personen zur Aufhellung der genetisch bedingten Haarfarbe. Auch Medikamente können Nebenwirkungen hervorrufen, die die Haarfarbe verändern. So führt die Applikation des Antibiotikums Chloroquin zur Farbbeeinträchtigung bei blonden und roten Haaren, da es die Phaeomelaninsynthese behindert. Als Resultat dieser Synthesehemmung erscheint das Haar silbrig oder weiß. Zu einer reversiblen Störung der Melanogenese führen Substanzen aus unterschiedlichen medizinischen Anwendungsbereichen wie Haloperidol oder Bleomycin, die zum vorzeitigen Ergrauen führen können. Viele chemische Substanzen mit depigmentierender Wirkung sind Phenol / Catechol-Derivate, die aufgrund der Strukturverwandschaft mit Tyrosin oder DOPA alternative Substrate für die Tyrosinase sind [Passi und Nazzaro-Porro 1981; Menter *et al.*, 1993]. Es wurde nachgewiesen, dass die Substanzen 4-Tert-butylphenol (TBP) und 4-Tert-butylcatechol (TBC) von der Tyrosinase oxidiert werden [Thorneby-Andersson *et al.*, 2000] und wie zahlreiche andere Chemikalien die Tyrosinase inhibieren. N-acetyl-4-S-cysteaminylphenol (N-Ac-4-S-CAP), ein Tyrosinasesubstrat, führte in dunkler Haut und schwarzen Haaren von Mäusen zur Depigmentierung [Jimbow *et al.*, 1995]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass N-Ac-4-S-CAP die Anzahl der Melanozyten mit reifen Melanosomen verringert sowie einen verminderten Transfer der Melanosomen an die Keratinozyten verursacht. Dagegen besitzt Hydrochinon durch die Oxidation zu Chinonen eine zytotoxische Wirkung in den Melanozyten [Smith *et al.*, 1988]. In nicht zytotoxischen Konzentrationsbereichen erwies sich das Hydrochinon Arbutin (beta-D-glucopyranosid) als ein reversibler Inhibitor der Melaninsynthese [Maeda und Fukuda, 1996]. 1998 wies Chakraborty nach, dass Arbutin zusätzlich einen inhibierenden Effekt auf die Melanosomenreifung hat. Ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der Tyrosinase ist das Aloesin (2-acetonyl-8-beta-d-glucopyranosyl-7-hydroxy-5-methylchromon) [Jones *et al.*, 2002]. Die Wirkung von Nicotinamid, das zur Reduzierung einer Hyperpigmentierung humaner Haut führt, ist in einem

reduzierten Melanosomentransfer von den Melanozyten an die Keratinozyten begründet [Hakozaki *et al.*, 2002].

## 1.5 Die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT

Bei der verwendeten Keratinozytenzelllinie handelt es sich um eine spontan immortalisierte Zelllinie, die durch Langzeitinkubation einer histologisch unauffälligen Epidermisprobe eines 62-jährigen Mannes in einem Medium mit niedriger Calciumkonzentration und erhöhter Temperatur entstand. Die Bezeichnung HaCaT ist ein Akronym für:

**H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature Keratinocytes.



**Abb. 1.2: HaCaT-Zelllinie.** Konfluent gewachsene HaCaT-Zellen. Lichtmikroskopie.

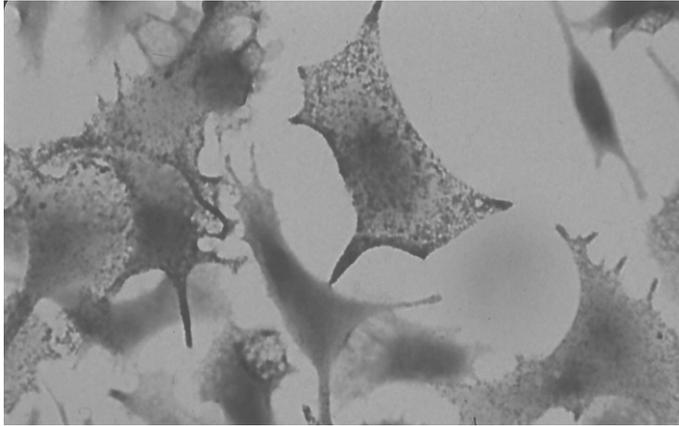
Nach Transplantation der Keratinozyten auf Nacktmäuse bildet sich eine strukturierte Epidermis [Boukamp *et al.*, 1988]. In organtypischen Co-Kulturen bildeten HaCaT-Zellen in Gegenwart von humanen Hautfibroblasten auf Kollagengel mehrschichtige Keratinozytenlayer mit hohem Differenzierungsgrad. Allerdings wurde die orthokeratotische Keratinisierung nicht vollständig erreicht [Schoop *et al.*, 1999]. HaCaT-Zellen exprimieren ein größeres Spektrum an Keratinen als dies üblicherweise in humanen Primärkulturen von Keratinozyten beobachtet werden kann. In serumhaltigem Kulturmedium exprimieren subkonfluent wachsende HaCaT-Zellen die Keratine (K) K1 und K10 sowie Involucrin und Filaggrin [Boukamp *et al.*, 1988]. Bei hoher Zelldichte ändert sich die Keratinexpression. Die Synthese K7, K8, K18 und K19 nimmt ab, während die Keratine K1, K10/11 verstärkt exprimiert werden [Ryle *et al.*, 1989]. Die

Kornifizierung lässt sich auch durch die Einwirkung äußerer Faktoren wie mechanischen Druck [Gormar *et al.*, 1990] oder eine hohe Calciumkonzentration (8 mM) im Kulturmedium erreichen. Theilig *et al.* [1994] zeigten, dass auch die Zugabe von Nikotin im Medium die Keratinisierung stimuliert.

Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel der HaCaT-Zelllinie ergaben ein mit Hautkeratinozyten vergleichbares Fettsäureprofil der Hauptlipidklassen sowie eine vergleichbare Zusammensetzung der neutralen Lipide. Der Anteil der Sphingolipide betrug < 10 % der Gesamtlipide, der Linolsäuregehalt (C 18:2) war stark erniedrigt, der von Palmitinsäure (C 16:1) erhöht. Köhne stellte fest, dass die LDL-rezeptorabhängige Cholesterinbiosynthese der HaCaT-Zellen mit zunehmender Konfluenz, anders als bei Primärzellkulturen menschlicher Haut, nicht abnimmt.

## **1.6 Die Pigment-Zelllinie B16F1**

Bei der verwendeten Zelllinie B16F1 handelt es sich um eine immortalisierte Melanom-Zelllinie murinen Ursprungs. Aufgrund eines hohen metastatischen Potenzials nach Implantation in C57BL/6-Mäusen [Fidler, 1975], stellt die B16F1-Zelllinie ein etabliertes Metasierungsmodell dar, womit die Vorgänge der Adhäsion und Invasion von Tumorzellen *in vivo* untersucht werden können. Die schwach metastasierende B16F1-Zellen wurden nach i. v. Injektion in Mäuse aus der Lunge der Versuchstiere selektiert [Fidler, 1973]. Die B16F1-Zellen exprimieren einige Melanozyten-Differenzierungs-Antigene, die auch bei Menschen in der Immunantwort auf Melanome eine wesentliche Rolle spielen.



**Abb. 1.3: Pigment produzierende B16F1-Zellen.** Subkonfluente Melanogenese aktive B16F1-Zellen 6 Tage nach Aussaat.

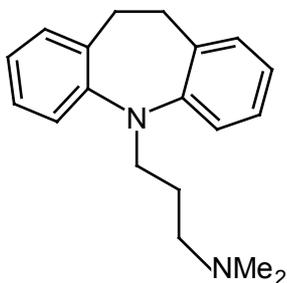
Die adhärenente B16F1-Zelllinie (Abbildung 1.3) eignet sich besonders für die *in vitro* Untersuchungen aufgrund der hohen Proliferationsrate und eines hohen Differenzierungsgrades. Unter den gegebenen Kulturbedingungen synthetisieren die B16F1-Zellen - nach Erreichen der stationären Phase - Melanin und geben dieses in den extrazellulären Raum ab. Etwa 3 - 5 Tage nach Aussaat der Zellen wird aufgrund der Melanogenese eine starke Pigmentierung des Mediums erfasst. Damit lässt sich nicht nur eine mögliche Akkumulation an das Melanin, sondern auch der Einschluss der markierten Fremdstoffe während der Melanogenese im Melanin untersuchen und macht diese Zelllinie zum geeigneten Untersuchungsgegenstand.

## 1.7 Wirksubstanzen

In dieser Arbeit wurden im folgenden aufgelistete Wirksubstanzen verwendet, anhand derer die Aufnahme bzw. die Einlagerung in die Zelllinien untersucht wurden.

### 1.7.1 Imipramin

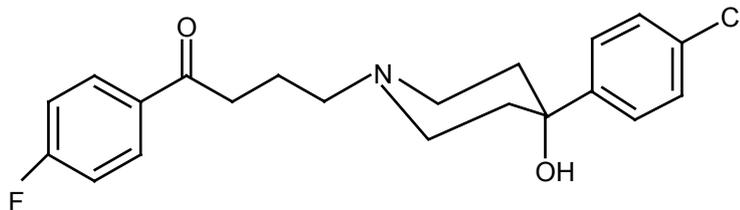
Das trizyklische Antidepressivum Imipramin (Tofranil®) wird zur Behandlung von endogenen Depressionen verwendet. Im Jahre 1957 wurde die antidepressive Wirkung des Präparats Imipramin vom Schweizer Psychiater R. Kuhn entdeckt und auf Grundlage dieses Medikamentes wurde in den folgenden Jahrzehnten eine Reihe von Derivate entwickelt. Imipramin bewirkt eine Aufhellung der Stimmungslage und eine Antriebssteigerung. Die Wirkung von Imipramin, vor allem die des Hauptmetaboliten Desipramin, beruht auf der Hemmung der postsynaptischen Alpha1-Rezeptoren, der Bindungsstelle des Noradrenalins, was zu einer verminderten Aktivität der präsynaptischen Alpha-2-Autorezeptoren führt. Eine weniger starke Wirkung zeigt Imipramin auf das Serotoninsystem, indem es die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt hemmt. Die absolute Bioverfügbarkeit von Imipramin nach oraler Gabe schwankt zwischen 22 % und 77 %. Imipramin wird im therapeutischen Bereich zu ca. 90 % an Plasmaproteine gebunden und weist eine hohe Gewebeeaffinität auf. Die Eliminations-Halbwertszeit aus dem Plasma liegt zwischen neun bis 24 Stunden. Imipramin und Desipramin überwinden die Blut-Hirn-Schranke.



**Abb. 1.4: Wirkstoff Imipramin:** Trizyklisches Antidepressivum. 3-(10,11-Dihydro-5H-dibenz[*b,f*]azepin-5-yl)-NN-dimethylpropylamine; C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>2</sub> MW: 280,4  
log P<sub>ow</sub>: 2,5; pK<sub>a</sub>: 9,5

## 1.7.2 Haloperidol

Haloperidol ist der bekannteste Vertreter der Neuroleptika mit einer hohen neurologischen Potenz, der aufgrund der antipsychotischen Effekte zur Behandlung von Psychosen, wie der Schizophrenie, eingesetzt wird und Halluzinationen und Wahnvorstellungen reduziert. Haloperidol (Haldol®) gehört zu den Butyrophenonderivaten und wurde 1959 durch Janssen eingeführt. Es blockiert die Bindungsstellen der Dopamin 2-Rezeptoren, wodurch die Wirkung der Überträgersubstanz Dopamin verringert wird. Weniger ausgeprägt als die dopaminantagonistische Wirkung ist die Wirkung auf die Serotoninrezeptoren und die Alpha-Adrenozeptoren. Erst in extrem hohen Dosen hat Haloperidol auch eine anticholinerge und eine Antihistaminwirkung. Haloperidol wird nach oraler Gabe rasch aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert; die Resorption ist nach drei Stunden vollständig. Wegen des hohen First-pass-Effektes beträgt die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe 60 – 70 %. Maximale Plasmakonzentrationen wurden bei oraler Verabreichung nach 3 – 6 Stunden gemessen und etwa 20 Minuten nach i.m.-Applikation. Die Plasmaeiweißbindung beträgt 92 %. Die Eliminations-Halbwertszeit aus dem Plasma liegt zwischen 14 bis 24 Stunden. Haloperidol überwindet die Blut-Hirn-Schranke.

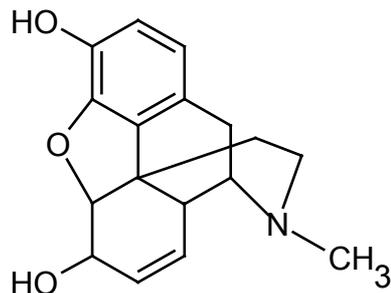


**Abb. 1.5: Haloperidol:** 4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluorobutyrophenone;  $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ ; MW: 375,9  
 $\log P_{ow}$ : 4,1;  $pK_a$ : 8,3

## 1.7.3 Morphin

Morphin ist medizinisch das wichtigste Alkaloid, das aus dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns *Papaver somniferum* gewonnen wird. Morphin wird in der Medizin seit Jahrhunderten als stark wirkendes Analgetikum eingesetzt. Es

hat ein hohes suchterzeugendes Potential (Morphinismus). 1803 wurde es vom deutschen Apotheker Friedrich W. A. Sertürner isoliert. Die Wirkung des Morphins ist auf die reversible Bindung am  $\mu$ -Opioidrezeptor des ZNS und deren Hemmung zurückzuführen. Über ein GTP-bindendes Protein hemmen die Rezeptoren die Öffnung der präsynaptischen N-Typ Kalziumkanäle wodurch die Signalweiterleitung blockiert und der schmerzstillende Effekt erzeugt wird. Die Wirkung der Substanz tritt nach intravenöser Gabe in wenigen Minuten, nach intramuskulärer oder subkutaner Applikation nach 15 - 30 Minuten ein. Die Wirkungsdauer beträgt ca. 4 – 6 h. Morphin unterliegt nach oraler Applikation einem ausgeprägtem First-pass-Effekt, die Bioverfügbarkeit beträgt 20 - 40 %. Morphin wird zu ca. 20 - 35 % an Plasmaproteine, bevorzugt an die Albuminfraktion, gebunden. Morphin überwindet die Blut-Hirnschranke. Morphin wird vorwiegend in der Leber metabolisiert Hauptmetabolite sind vor allem Morphin-3-glucuronid und in geringerer Menge Morphin-6-glucuronid.

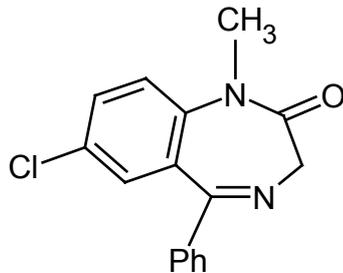


**Abb. 1.6: Morphin:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>; MW:285,3;  
log P<sub>ow</sub>: 1,3; pK<sub>a</sub>: 8,1

### 1.7.4 Diazepam

Diazepam (Valiquid<sup>®</sup>) ist ein Tranquilizer und gehört zu der Klasse der 1,4-Benzodiazepine. Die Substanz hat eine beruhigende und dosisabhängig eine angst- und spannungslösende, aber auch muskelerschlaffende und krampflösende Wirkung. Diazepam bindet an die  $\alpha$ -Untereinheit des GABA-Transmittersystems und verstärkt so die hemmende Wirkung der GABA vermittelten Übertragung im ZNS. Diazepam ist lipophil und gelangt rasch mit seinem aktiven Hauptmetaboliten in die cerebrospinale Flüssigkeit. Die Bioverfügbarkeit von Diazepam nach i. v. Verabreichung liegt bei 100 %, nach oraler Gabe bei 75 - 80 %, die Plasmaproteinbindung beträgt 95 - 99 %. Der Abbau von Diazepam erfolgt

hauptsächlich in der Leber zu den pharmakologisch aktiven Metaboliten N-Desmethyldiazepam (Nordazepam), Temazepam und Oxazepam. Aus dem Blutplasma wird Diazepam und sein Hauptmetabolit nur sehr langsam eliminiert. Nach Abhängigkeit des Alters und der Leberfunktion ergeben sich Werte von 20 – 100 h. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal.

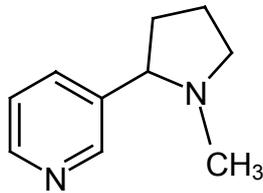


**Abb. 1.7: Diazepam (Valium):** 7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-on;  $C_{16}H_{13}ClN_2O$ ; MW: 284,7  
 $\log P_{ow}$ : 3,8;  $pK_a$ : 3,4

### 1.7.5 Nikotin

Nikotin ist ein Alkaloid und wird als Genussmittel konsumiert. Nikotin, benannt nach Jean Nicot, der 1556 die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* von Amerika nach Frankreich brachte, wurde 1828 erstmals von den deutschen Chemikern L. Reimann und W. Posselt isoliert. Nikotin wird rasch über die respiratorischen Organe resorbiert und kann bereits zehn Sekunden nach der Inhalation im Gehirn nachgewiesen werden [Reichl, 2002]. Nikotin bewirkt sowohl eine Erregung des Sympathicus, als auch eine Erregung des Gegenspielers im vegetativen Nervensystem, des Parasympathikus. Bei der Bindung an die nikotineren Rezeptoren kommt es zur Ausschüttung unterschiedlicher Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin, Noradrenalin und Endorphinen. Höhere Nikotindosen führen demgegenüber zu einer Hemmung sowohl der sympathischen und parasympathischen Innervation. Diese Effekte spielen sich vorwiegend im Bereich der vegetativen Ganglien an den synaptischen Übergangsstellen zwischen den prä- und postganglionären autonomen Nerven ab. Nikotin beschleunigt den Herzschlag, erhöht den Blutdruck und verringert den Appetit. Die Plasmaproteinbindung beträgt 5 %. Nikotin wird in der Leber schnell zum Cotinin oxidiert und mit einer Eliminationshalbwertszeit von zwei Stunden renal

ausgeschieden [Moyer *et al.*, 2002]. Nikotin führt weiterhin zur Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin aus dem Nebennierenmark.



**Abb. 1.8: Nikotin:** (1-Methyl-2-(3-pyridyl)-pyrrolidin);  $C_{10}H_{14}N_2$ ; MW: 162,2  
 $\log P_{ow}$ : 0,7;  $pK_a$ : 8,0

## 1.8 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, in einem *in vitro*-Modell den Einfluss der Haarpigmentierung auf die Bindung pharmakologisch interessanter Moleküle im Haar zu untersuchen. Aufgrund der Tatsache, dass zur Aufnahme organischer Fremdstoffe in die anagene Haarwurzel nur wenige Erkenntnisse vorliegen, da diese Zellen des Haarfollikels nicht direkten Untersuchungen zugänglich sind, wurde die Fremdstoffbindung anhand von *in vitro*-Untersuchungen vorgenommen. Es wurde sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch die zeitliche Abhängigkeit der Aufnahme von Fremdstoffen in diesem Zellkulturmodell getestet. Zur Untersuchung der Bindung wurden die zuvor aufgelisteten Fremdstoffe ausgewählt, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Tabelle 4.1). Bei den Substanzen Haloperidol, Imipramin, Morphin und Nikotin handelt es sich um basisch bzw. schwach basische Substanzen mit  $pK_a$ -Werten über 7,4 für die – ausgehend von der Hypothese der verstärkten Einlagerung basischer Substanzen in pigmentierten Haaren - eine erhöhte Akkumulation in der Pigment produzierenden Zelllinie B16F1 vermutet wurde. Zum Vergleich wurde die saure Substanz Diazepam verwendet. Die Fremdstoffe unterscheiden sich darüber hinaus in der Molekülgröße und der Lipophilie voneinander. Die Simulation der Bindungsmöglichkeiten der Testsubstanzen im anagenen Haar wurde an verschiedenen immortalisierten Zelllinien durchgeführt. Für die Zellen des keratinisierten Haarschaftes wurden zum einen die Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet. Zum anderen wurden die Melanin produzierenden B16F1-Zellen murinen Ursprungs genutzt, die die Melanozyten des Haarschaftes simulieren

sollten. Anhand letztgenannter Zellen wurden auch die Bindungseigenschaften der Testsubstanzen an Melanin untersucht. Abschließend sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei dem verwendeten Modell um ein geeignetes *in vitro*-Zellkulturmodell zur Untersuchung der Fremdstoffaufnahme ins anagene Haar handelt und so grundlegende Fragestellungen der Fremdstoffeinlagerung in pigmentierten Haaren beantworten lässt.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit statt permanenter Zelllinien auch primäre Melanozyten und Keratinozyten isoliert werden können, und routinemäßig zur Untersuchung von Fremdstoffeinlagerung herangezogen werden können. Hierzu wurden sowohl Melanozyten und Keratinozyten aus der epidermalen Kopfhaut als auch aus dem Haarfollikel isoliert und charakterisiert. Zusätzlich wurde versucht, diese Zellpopulationen aus der Epidermis zu präparieren, um diese mit den im Haarfollikel vorkommenden Keratinozyten und Melanozyten zu vergleichen und die für das Zellkulturmodell best geeignete Zellpopulation zu ermitteln.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

3,4-Dihydroxyphenylamin (DOPA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<sup>3</sup> H-Diazepam	Perkin Elmer, Frankfurt, Deutschland
<sup>3</sup> H-Haloperidol	Perkin Elmer, Frankfurt, Deutschland
<sup>3</sup> H-Imipramine	Perkin Elmer, Frankfurt, Deutschland
<sup>3</sup> H-Morphin	Perkin Elmer, Frankfurt, Deutschland
<sup>3</sup> H-Nikotin	Perkin Elmer, Frankfurt, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cy3 (Indocarbocyanin)	Dianova, Hamburg, Deutschland
DAPI	Boehringer; Mannheim, Deutschland
Dispase II	Boehringer; Mannheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA 0,02 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Fluoromount	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama
Geneticin (G418 Sulfat)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KGM	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
MEM	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MGM	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
NaDoc	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaPy	Biochrom, Berlin, Deutschland
NEA	Biochrom, Berlin, Deutschland
NGS	Dianova, Hamburg, Deutschland

---

PBS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Steptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phenylthiocarbamide	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Soluene 350	Packard Bioscience, Groningen, Niederlande
Trichloressigsäure 20 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin / EDTA	Biochrom, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland

### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Centricon YM-30	Millipore, Eschborn, Deutschland
Dako-Pen	Dako, Hamburg, Deutschland
Desinfektionsmittel	Betaisodona, Mundipharma, Limburg
Kryoröhrchen	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Objekträger Superfrost <sup>®</sup> Plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Röhrchen (Falcon)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Szintillationsröhrchen (Mini-Vials)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Freezing Medium	Leica, Bensheim, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

- **PBS-Puffer, pH 7,4:**

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 11,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 g KHPO<sub>4</sub>
- ad 1 l Aqua dest

- **Zellysepuffer Ripa:**

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 150 mM NaCl,
- 1 % Nonidet P40
- 0,5 % Na-Deoxycholat
- 0,1 % SDS

- **Tris-HCL-Puffer:**

- 60,57 g Tris in 500 ml Aqua dest

- **Formaldehydlösung, 37 %:**

- zum Gebrauch mit Leitungswasser auf 3 % (v/v) verdünnt

- **Trypsin / EDTA-Lösung (0,1 %/0,02 %)**

- **Trypsin / EDTA-Lösung (0,025 %/0,01 %)**

- **Trypsin / EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)**

### 2.1.4 Zellkulturmedien

#### Zellkulturmedien für Zelllinien

##### Keratinocyten-Zelllinie HaCaT:

Die Proliferation und Fremdstoffexposition der HaCaT-Zellen erfolgte in Dulbecco's Modied Eagle's Medium mit 1000 mg Glukose, L-Glutamin NaHCO<sub>3</sub> und mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS).

**B16F1 - Melanoma-Zelllinie:**

Die Proliferation der B16F1-Zellen erfolgte in MEM-Earle's Salts-Medium mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS), 1mM Nonessential Amino Acids (NEA) sowie mit 0,2 % MEM-Vitaminzusatz. Die Fremdstoffexposition erfolgte in Dulbecco's MEM-Medium mit 10 % FCS.

**Zellkulturmedien für Zellkulturen aus humaner Kopfhaut / Haarfollikeln****- Transportmedium RPMI 1640:**

- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin-Lösung
- 1 % L-Glutamin

**Keratinocyte Growth Medium (KGM):**

- 0,125 ng/ml hEGF
- 5 µg/ml Insulin
- 0,33 µg/ml Hydrokortison
- 50 µg/ml Gentamicin
- 50 ng/ml Amphotericin-B
- 10 µg/ml Transferrin
- 0,39 µg/ml Epinephrin
- 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>

**Melanocyte Growth Medium (MGM):**

- 0,4 % BPE
- 1 ng/ml bFGF
- 5 µg/ml Insulin
- 0,5 µg/ml Hydrocortison
- 0,2 µg/ml Cholera toxin
- 10 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat
- 50 ng/ml Amphotericin B
- 50 µg/ml Gentamicin

**Fibroblastenmedium: FAD-Medium (DMEM : F12-Medium (3:1)):**

- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 10 % FCS
- 5 µg/ml Insulin
- 1 ng/ml EGF
- 10<sup>-10</sup> Cholera toxin
- 0,5 µg/ml Hydrocortison
- 24 ng/ml Adenin

### 2.1.5 Verwendete Kultivierungsgefäße

Kultivierungsgefäß	Hersteller	Volumen [ml]	Oberfläche [cm <sup>2</sup> ]
Tissue Culture Plate 6 WELL	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	3	9,6
Tissue Culture Plate 12 WELL	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	2	4
Tissue Culture Plate 24 WELL	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	1	2
Tissue Culture Dish Ø 3,5 cm	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	3	9,6
Tissue Culture Dish Ø 6 cm	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	5	28
Tissue Culture Dish Ø 10 cm	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	12	78
Cell Culture Tube (Leighton)	Renner, Darmstadt, Deutschland	10	10
Tissue Culture Flask	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	50	25
Tissue Culture Flask	NUNC, Wiesbaden, Deutschland	250	75

**Tab. 2.1:** Tabellarische Übersicht der verwendeten Kultivierungsgefäße;  
k. A.: keine Angaben

## 2.1.6 Geräte

Analysenwaage LA230S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Axiophot II Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Biofuge Pico	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Brutschrank mit CO <sub>2</sub> Begasung	Heraeus, Hanau, Deutschland
CCD-Kamera	Hamamatsu, Herrsching, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO 17 AC "inCusafe"	Sanyo, Wiesloch, Deutschland
Cryostat CM 3050	Leica, Bensheim, Deutschland
Gefrierschrank HFU 686 Basic	Heraeus, Hanau, Deutschland
Labofuge M	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminar Flow	Flow laboratories, Meckenheim, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG	IKA, Staufen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Mikroskop Leica DM IL HC Bio	Leica, Bensheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Henneberg-Sander GmbH, Giessen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Spectrophotometer UV 240	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Stereomikroskop MZ8	Leica, Bensheim, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Szintillationszähler (Tricarb 1600TR)	Packard Instruments, Frankfurt, Deutschland
Tischzentrifuge 5414	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Titertek Multiskan plus Elisa-Reader	Labsystems, Finnland
Ultraschallbad Bioblock 88169	Elma, Singen, Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Kehlheim, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Worms, Deutschland

## 2.2 Zellkultivierung

### 2.2.1 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsprüfung

Zur Bestimmung der Zellzahl der geernteten bzw. bei den Versuchen eingesetzten Zellen wurde ein Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer) verwendet, das aus vier großen Quadraten einer Fläche von  $1 \text{ mm}^3$  besteht. Zunächst wurde die Zellsuspension mit einer 0,5 % Trypanblau 1:10 verdünnt und gut durchmischt. Von dieser Suspension wurden  $10 \mu\text{l}$  zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung. Abgestorbene Zellen waren blau angefärbt. In vier der großen Quadrate wurden die lebenden Zellen ausgezählt und der Mittelwert aus Dreifachbestimmungen gebildet. Die Berechnung der Zellzahl in der Zellsuspension erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Volumens der Zellsuspension. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde gegebenenfalls eine bestimmte Zelldichte für die weiteren Verarbeitungsschritte (Aussaat, Experimente, Gefrierkonservierung etc) im jeweiligen Kulturmedium eingestellt.

### 2.2.2 Gefrierkonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung erfolgte während der exponentiellen Wachstumsphase der Zelllinie. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in sterile 15 ml Röhren überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 10 min) und Zellpellets mit je  $4 \times 10^6$  Zellen in 1 ml kaltem ( $4^\circ\text{C}$ ) Gefriermedium (jeweils komplettes Kulturmedium versetzt mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, in Kryoröhren überführt und sofort in einem Styroporbehälter bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren, um zytotoxische Wirkungen von DMSO sowie Schäden durch Eiskristallbildung zu vermeiden. Danach wurden die Zellröhren im flüssigen Stickstoff gebracht, wo sie für unbegrenzte Zeit aufbewahrt werden können.

### 2.2.3 Rekultivierung eingefrorener Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden in den Kryoröhrchen sehr rasch im Wasserbad (37°C) aufgetaut und in ein Falconröhrchen mit vorgewärmten (37°C) Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1000 rpm, 10 min). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet mit 10 ml PBS gewaschen und zentrifugiert. Nach dem 2. Waschschrift wurde das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein Kulturgefäß ausgesät und weiterkultiviert. Für eine 250 ml Kulturflasche mit 12 ml Kulturmedium betrug die Zellaussaat  $0,04 \times 10^6$  HaCaT Zellen/ml. B16F1-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $0,08 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät.

### 2.2.4 Mycoplasmentest

Die Zelllinien wurden regelmäßig mittels Mycoplasma-Detection-Kit (Roche, Mannheim) auf Mykoplasmenkontaminationen getestet. Der Test, der auf der Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert, erfasst die Spezies *M. arginini*, *M. hyorhins*, *A. laidlawii* und *M. orale*. Die Untersuchungen wurden auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Im ersten Arbeitsschritt wurden die Antimycoplasmen Wandantikörper durch Inkubation bei 37°C, 2 Stunden fixiert. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen (37°C, 30 min) und dreimaligen Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation mit den Proben (Medien aus Zellkulturflaschen; Positiv-Kontrolle: inaktivierte Mycoplasmen-Lösung; Negativ-Kontrolle: steriles Medium) bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligen Waschen wurde das wandfixierte Mycoplasmenantigen mit Biotin-markiertem Antikörper (37°C, 2 h) gekoppelt und erneut gewaschen (3 x PBS). Im vierten Arbeitsschritt wurde Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat an Biotin gebunden (37°C, 1 h). Nach erneutem Waschen (3 x PBS) wurde die in den Antigen-Antikörper-Komplexen gebundene Alkalische Phosphatase durch Umsetzung des Substrats 4-Nitrophenylphosphat visualisiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei  $\lambda=405$  nm mit dem Microplate-Reader (Labsystems, Finnland).

### **2.2.5 Zellkultivierung der B16F1 Melanomzelllinie**

Für die Passagierung der subkonfluent gewachsenen B16F1-Zellen wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS gespült und anschließend die Zellen mit 0,1 % Trypsin (5 min) im Brutschrank trypsinisiert. Zum Abstoppen der enzymatischen Trypsinwirkung wurde die Zellsuspension mit 10 ml PBS / FCS-Lösung versetzt und in ein Tube überführt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Nach der Zellzählung mittels Hämozytometrie (Abschnitt 2.2.1) wurden  $0,1 \times 10^6$  B16F1-Zellen pro 250 ml Flasche in 15 ml MEM-Medium ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit frischem Medium im Brutschrank weiter inkubiert.

Die B16F1-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. med. Frank Falkenberg, von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

### **2.2.6 Zellkultivierung der HaCaT-Zellen**

Für die Passagierung der subkonfluent gewachsenen HaCaT-Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Zum Lösen der desmosomalen Zell-Zellverbindungen wurde zunächst 5 min mit einer EDTA-Lösung (0,02 %) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Trypsinierung der Zellen mit Trypsin (0,1 % Trypsin / 0,05 % EDTA) für 5 min im Brutschrank. Zum Abstoppen der enzymatischen Trypsinwirkung wurde die Zellsuspension mit 10 ml PBS / FCS-Lösung versetzt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Nach der Zellzählung mittels Hämozytometrie (Abschnitt 2.2.1) wurden  $0,5 \times 10^6$  HaCaT-Zellen pro 250 ml Flasche ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 20 ml frischem Medium im Brutschrank weiter inkubiert.

Die HaCaT-Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. N. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden HaCaT-Zellen der Passagen P 36 bis P 70 verwendet.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der lysierten Zellen wurde der Micro BCA<sup>®</sup>-Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois) verwendet. Das Testprinzip besteht darin, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in Gegenwart von Bicinchonin-Säure (BCA) violettfarbene, lösliche Komplexe bilden, nachdem  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im alkalischen Milieu in Gegenwart von Proteinen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wurden. Die für die Einstellung der Eichkurve notwendigen Proteinstandards wurden aus einer Stammlösung (2 mg/ml Rinderserumalbumin) in Ripa-Puffer hergestellt. Mit den im Testkit enthaltenden Lösungen A (0,2 N NaOH; 1,6 % (w/v)  $\text{Na}_2$ -Tatrat; 8 % (w/v)  $\text{NaCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ ); B (4 % (w/v) Bicinchonin-Säure (BCA)  $\text{Na}_2$ -Salz) und C (4 % (w/v)  $\text{CaSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) wurde die Arbeitslösung (WS) im Verhältnis (A:B:C / 25:24:1) hergestellt. Die Überstände der Zellysate wurden mit Ripa-Puffer 1:10 bis 1:50 verdünnt. Jeweils 1 ml einer Probe oder Standard wurde mit 1 ml Arbeitslösung gut geschüttelt, danach im Wasserbad 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Absorptionen gegen Ripa-Puffer bei  $\lambda=562$  nm photometrisch bestimmt. Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch Interpolation auf der Eichgeraden wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

### 2.3.2 Melaninbestimmung

Die Melaninbestimmung erfolgte mittels Spektrophotometrie nach Ozeki *et al.* 1996. Aus den Versuchen zur Aufnahme der Fremdstoffe in die B16F1-Zellen wurde jeweils ein Zellpellet in 1 ml Soluene 350 (Packard Bioscience, Dreieich) gelöst und Verdünnungen von 1:10 bis 1:20 erstellt. Für die Erstellung der Eichkurve im Konzentrationsbereich von 0 – 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wurde synthetisches Melanin (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Jeweils 1 ml einer Probe oder des Standards wurde gevortext und danach im Wasserbad mindestens 2 Stunden bei 80°C bis zur völligen Auflösung des Pigments inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Absorptionen gegen Soluene 350 bei  $\lambda=500$  nm photometrisch (Shimadzu, Düsseldorf) bestimmt. Die Messungen wurden als

Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch Interpolation auf der Eichgeraden wurden die Melaninkonzentrationen ermittelt.

### **2.3.3 Zellproteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)**

Für die Ermittlung der an Zellproteine gebundenen  $^3\text{H}$ -Fremdstoffmoleküle wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Nach der Zelllyse mit Ripa-Puffer wurden 500  $\mu\text{l}$  des Überstandes abgenommen, mit 500  $\mu\text{l}$  20 % TCA versetzt und 1 Stunde auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) wurde das erhaltene Proteinpellet in 500  $\mu\text{l}$  5 % TCA suspendiert und erneut 1 Stunde auf Eis gestellt. Durch scharfe Zentrifugation (13000 rpm, 15 min) wurde das Proteinpellet abgetrennt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen, das Proteinpellet in 100  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer aufgenommen und für die LSS eingesetzt.

### **2.3.4 Untersuchungen an der Keratinozytenzelllinie HaCaT**

#### **2.3.4.1 Fremdstoffaufnahme / Akkumulation in HaCaT-Zellen**

Die Versuche zum zeitlichen Verlauf der Aufnahme der tritiierten Verbindungen wurden, unter Mitführung von Leerkontrollen, jeweils im dreifachen Ansatz in 50 ml Kulturflaschen (Fläche: 25  $\text{cm}^2$ ) vorgenommen. Pro Flasche wurden jeweils  $0,05 \times 10^6$  HaCaT-Zellen ausgesät. Die HaCaT-Zellen wurden 3 Tage nach Erreichen der Konfluenz mit steigenden Konzentrationen der jeweiligen Modellsubstanz (50 pmol/ml, 100 pmol/ml sowie 400 pmol/ml) im Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Die Experimente wurden mit den Modellsubstanzen Haloperidol, Imipramin, Nikotin, Morphin sowie Diazepam durchgeführt. Zusätzlich wurde zur *in vitro* Simulation eines kurzzeitigen Fremdstoffkontaktes der Keratinozyten im anagenen Haarfollikel der zeitliche Verlauf der Aufnahme der markierten Substanzen in die HaCaT-Zellen bei einer Fremdstoffkonzentration von 100 pmol/ml im Zellkulturmedium mit Messpunkten nach 10 min, 0,5, 1, 4, 12, 24, 48 sowie 72-stündiger Exposition verfolgt.

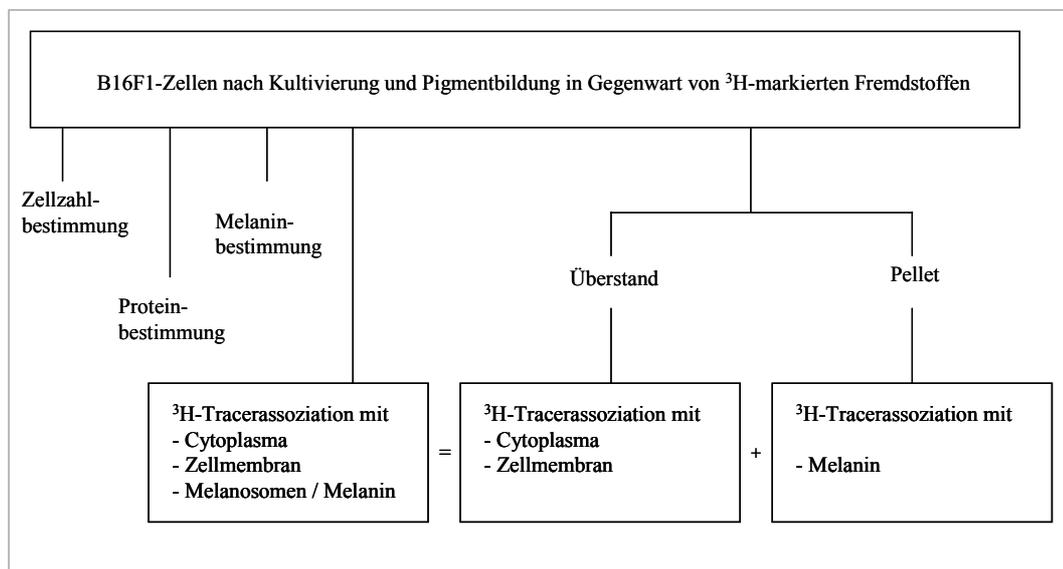
---

Nach der Fremdstoffexposition wurden die Zellen abgelöst und dreimal kurz mit eiskaltem PBS-Puffer (pH-Wert 7,4) gewaschen. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die Zellen aufgeteilt. Eine Zellportion wurde direkt für die Bestimmung der aufgenommenen Mengen an Modellsubstanzen ein weiteres Aliquot wurde durch Zugabe von 2 ml RIPA-Puffer lysiert. An diesem Zelllysate wurde eine Proteinbestimmung mit dem MicroBC-Kit durchgeführt sowie eine vergleichende Messung mit einem Aliquot intakter HaCaT-Zellen mittels Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie (LSS) vorgenommen.

## 2.3.5 Untersuchungen an der Pigmentzelllinie B16F1

### 2.3.5.1 Fremdstoffaufnahme und Akkumulation in B16F1-Zellen

Für jeweils einen Versuchsansatz wurden, nach Kultivierung der Zellen (B16F1-Zellzahl:  $>20 \times 10^6$ ) in B16F1-Proliferationsmedium, die Zellen bei ca. 90 % Konfluenz zunächst über Nacht in MEM-Medium, 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung während der Zellpigmentierung in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -beladenen Medien (100 pmol/ml) über 10 Tage.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Experimente zum Einschluss von  $^3\text{H}$ -markierten Fremdstoffen während der Melanogenese in das entstehende Pigment

Nach der Fremdstoffexposition wurden die Zellen geerntet und dreimal kurz mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Portionen von  $1 \times 10^6$  Zellen aufgeteilt und entsprechend Abbildung 2.1 weiterverarbeitet.

Eine Zellportion wurde für die Bestimmung der aufgenommenen  $^3\text{H}$ -Gesamtmenge an Modellsubstanz direkt eingesetzt. Hierfür wurden jeweils  $1 \times 10^6$  B16F1-Zellen mit 600  $\mu\text{L}$  1N NaOH bei 80°C, anschließend über Nacht bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Methanol sowie 200  $\mu\text{L}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung wurden die Proben über Nacht bei RT belassen, die entfärbten Proben

abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und die aufgenommene  $^3\text{H}$ -Tracermenge mittels Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie (LSS) bestimmt.

Weitere Aliquots wurden durch Zugabe von 1ml RIPA-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min.) wurde ein dunkel pigmentiertes Pellet erhalten, das abgetrennt wurde. Mit jeweils 100 $\mu\text{L}$  des Zelllysates wurde der  $^3\text{H}$ -Tracergehalt ermittelt sowie eine Proteinbestimmung mit dem MicroBC-Kit nach Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Für die Ermittlung des an Zellproteine gebundenen Fremdstoffanteils wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen, das Proteinpellet in 100 $\mu\text{L}$  PBS-Puffer aufgenommen und für die LSS eingesetzt. Das nach der Zelllyse mittels Ripa-Puffer erhaltene Melaninpellet wurde wie oben beschrieben oxidativ aufgelöst und die im entstandenen Pigment während der Melanogenese eingeschlossenen  $^3\text{H}$ -Haloperidolmoleküle an der farblosen Probe bestimmt. Anhand einer Bilanzierung wurde der durch fraktionierte Aufarbeitung ermittelte Fremdstoffgehalt mit dem Analysenwert nach alkalischer, oxidativer Zerstörung der B16F1-Zellen verglichen.

### **2.3.5.2 Fremdstoffadsorption an der Oberfläche reifer Melaningranula**

Aus differenzierten, pigmentierten B16F1-Zellen, die zunächst in Fremdstoff-freiem Kulturmedium 10 Tage kultiviert worden waren, wurden anschließend Melaningranula isoliert. Hierzu wurden nach der Kultivierung der B16F1-Zellen die Überstand abgenommen und zentrifugiert. Die isolierten Melaningranula wurden in Fremdstoff-haltigem Medium (100 pmol  $^3\text{H}$ -Haloperidol/ml Medium) über 24 Stunden weiterkultiviert. Nach der Fremdstoffexposition wurden die Zellen geerntet und dreimal kurz mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. An einer Zellportion wurde die Menge der aufgenommenen  $^3\text{H}$ -Tracermoleküle nach oxidativer, alkalischer Auflösung der B16F1-Zellen ermittelt. Die übrigen Zellen wurden mit Ripa-Puffer lysiert, das Melaninpellet abgetrennt und die Radioaktivität im Überstand gemessen.

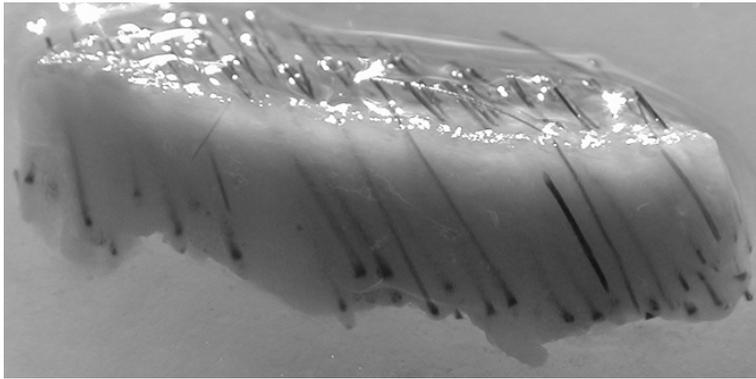
### **2.3.5.3 Fremdstoffaufnahme in Gegenwart des Tyrosinase-Inhibitors Phenylthiocarbamid**

Für die Untersuchungen zur Pigment abhängigen Aufnahme und Bindung der Fremdstoffe in die B16F1-Zellen wurde die Melanogenese mithilfe der Chemikalie Phenylthiocarbamid (PTC) inhibiert. Die Fremdstoffinkubation (50 pmol/ml) der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen in Gegenwart von 200µM N-Phenylthiocarbamid. Als Kontrolle wurden B16F1-Zellen mit Fremdstoff beladenen Medium ohne PTC inkubiert. Im Abstand von 24 Stunden bis zum Versuchsende wurden die Zellen, die in Suspension differenzierten, geerntet und dreimal kurz mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die Zellen aufgeteilt und für eine Melaninbestimmung sowie für die Ermittlung der aufgenommenen <sup>3</sup>H-Tracergesamtmenge eingesetzt.

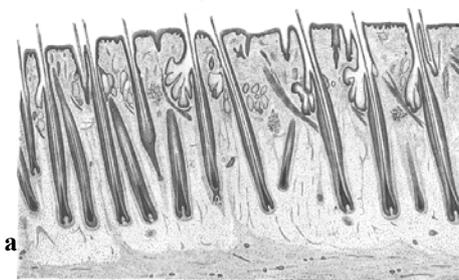
### **2.3.6 Isolierung und Langzeitkultivierung humaner Zellpopulationen aus Kopfhautpräparaten**

Für die Untersuchungen standen Kopfhautstückchen (n=20) zur Verfügung, die aus medizinischen Gründen in der chirurgischen Abteilung der Poliklinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen worden waren. Das Alter der Patienten umfasste eine Spanne von 27 bis 84 Jahren, das Altersmittel betrug 59 Jahre. Die Zustimmung für die Verwendung des Materials für wissenschaftliche Untersuchungen wurde eingeholt. Vor der Präparation wurde eine Antibiotika- / Antimykotika-haltige wässrige Lösung (1 % Amphotericin, 1 % Penicillin, 0,1 % Ciprofloxacin in PBS-Puffer) aufgetragen, das entnommene Kopfhautpräparat (1 – 25 cm<sup>2</sup>) in RPMI-Medium (1 % Amphotericin, Penicillin) gelegt und zum Zelllabor transportiert. Die Aufarbeitung erfolgte umgehend, spätestens innerhalb von 48 Stunden, nachdem die Transportröhrchen bei 4°C zwischengelagert worden waren.

Zunächst wurde das subkutane Fettgewebe entfernt und in ca. 4 - 9 mm<sup>2</sup> große Gewebestücke unterteilt (Abbildung 2.2). Danach wurde die Epidermis entfernt und für die Isolierung epidermaler Zellen (Melanozyten / Keratinozyten) in RPMI-Zellmedium gesammelt.

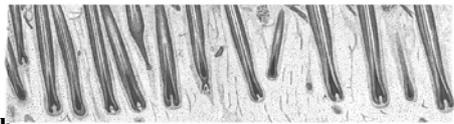


**Abb. 2.2:** Kopfhautpräparat mit Haarfollikeln.



**a**

**a:** Schematische Darstellung eines Kopfhautpräparates vor der Präparation.



**b**

**b:** Nach Entfernung der Epidermis und des subkutanen Fettgewebes (siehe auch Abb. 2.1)



**c**

**c:** Präparation der Haarfollikel nach der Behandlung mit Dispase

**Abb. 2.3 a-c:** Schematische Darstellung der Isolierung von Primärzellkulturen aus Kopfhautbiopsien

Die verbliebene Coriumschicht (Abbildung 2.3 b) wurde mit Dispase-Lösung (Boehringer, Mannheim) (4U/ml) im Brutschrank (37°C, 1 h) inkubiert. Anschließend wurden die Haarfollikel mithilfe von sterilen Pinzetten aus dem Gewebe herauspräpariert und in RPMI-Kulturmedium überführt. Für die getrennte Isolierung von amelanotischen Melanozyten aus der äußeren Wurzelscheide und den Pigment-produzierenden Melanozyten aus peripapillären Regionen des Haarfollikels wurden die Haarpräparate unter einem Stereomikroskop (Leica,

Bensheim) oberhalb der Auber'schen Linie durchtrennt und separat gesammelt (Abbildung 2.3 c).

### **2.3.6.1 Isolierung epidermaler Melanozyten / Keratinozyten**

Die Kopfhautproben (Kantenlänge: 2 - 3 mm) wurden in einer Petrischale über Nacht bei 4°C mit 0,25 % Trypsin inkubiert. Danach konnte die Epidermisschicht mit einer Pinzette leicht abgenommen werden. Nach zweimaligem kurzem Waschen in PBS-Puffer wurden die Epidermisschichten in einem Röhrchen mit Zellkulturmedium (MGM) gesammelt. Durch vorsichtiges, mehrmaliges Aufziehen mit einer Pasteurpipette wurden die Zellen suspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in MGM aufgenommen, in einer Dichte von  $0,1 - 0,2 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Petrischalen ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Der erste Wechsel des Mediums erfolgte am 2. Tag. Bis zum Erreichen der Konfluenz der Zellen wurde das Zellkulturmedium alle 2 - 3 Tage erneuert. Zur Elimination von Fibroblasten wurden die Kulturen mit 100 µg Geneticin/ml Medium zwei Tage kultiviert.

#### **Epidermale Melanozyten-Kulturen:**

Die Trennung der epidermalen Melanozyten von den epidermalen Keratinozyten erfolgte durch selektive Trypsinierung. Nach einer Behandlung der Primärkulturen mit 0,025 % Trypsin für 60 sec lösten sich die Melanozyten ab. Nach Zugabe von 10 % FCS-Lösung wurden sie abgenommen, gewaschen, die Zellzahl bestimmt und  $0,008 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in MGM, der Medienwechsel erfolgte im Abstand von 2 – 3 Tagen. Die Proliferation und Differenzierung der Zellen wurde mikroskopisch verfolgt. Gegebenenfalls erfolgte beim Persistieren von Keratinozyten in der Melanozytenkultur bei Subkonfluenz eine weitere selektive Trypsinierung vor der Passagierung der Zellen.

#### **Epidermale Keratinozyten-Kulturen:**

Zur Isolierung der epidermalen Keratinozyten wurde ein Teil der Epidermisproben, die über Nacht bei 4°C mit Trypsin (0,25 %) inkubiert wurden, benutzt. Nach Inaktivierung der Trypsinierung mit 10 % FCS-haltigem PBS-

Puffer wurden in einem Röhrchen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pasteurpipette die Zellen suspendiert und anschließend 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in KGM-Medium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und in einer Dichte von  $0,05 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Petrischalen ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 4 - 5 Tagen waren die ersten Zellklone zu erkennen und das Medium wurde erstmalig gewechselt. Bis zum Erreichen der Subkonfluenz wurde das Medium alle 2 - 3 Tage gewechselt. Zum Passagieren der Keratinozyten wurden die Zellen 5 min mit Trypsin / EDTA-Lösung (0,1 %, 0,02 %) bei 37°C trypsiniert, zentrifugiert und in neuen Kulturflaschen ausgesät.

### **2.3.6.2 Isolierung von Melanozyten aus der äußeren Wurzelscheide (ORS)**

Zur Isolierung der amelanotischen Melanozyten aus dem Bereich der äußeren Wurzelscheide wurden die intradermalen Haarsegmente oberhalb der Papillenregion mit PBS-Puffer gewaschen und mit 5 ml Trypsin (0,05 %) 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml 10 % FCS-Lösung wurden die Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren mithilfe einer Pasteurpipette vom Haarschaft gelöst. Die Zellsuspension wurde abgenommen, mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen in MGM aufgenommen. Die Zellaussaat ( $0,1 - 0,2 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>) erfolgte auf 6-Well-Platten. Das Kulturmedium wurde jeweils nach 2-3 Tagen gewechselt. Die Abtrennung der Melanozyten von den Keratinozyten der ORS sowie die Weiterkultivierung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben.

### **2.3.6.3 Isolierung peripapillärer Melanozyten**

Die Haarwurzeln wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit 0,05 % Trypsinlösung bei 37°C 10 min inkubiert. Nach Zugabe eines gleichen Volumens 10 % FCS-Lösung wurden die Zellen wie oben beschrieben suspendiert, gewaschen, in MGM aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Kultivierung erfolgte in 6-Well-Platten, jeweils  $0,1 - 0,2 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Nach 2 Tagen erfolgte der erste Wechsel des Kulturmediums, danach wurde im Abstand von 2 - 3 Tagen das Kulturmedium erneuert. Die Trennung der

Melanozyten von den Keratinozyten des Haarbulbus erfolgte wie oben beschrieben (Abschnitt 2.3.6.1).

#### **2.3.6.4 Kultivierung folliculärer Keratinozyten**

Bei einem Teil der zuvor präparierten intradermalen Haarsegmente (ca. 15 Haarfollikel) wurden die Keratinozyten der ORS isoliert. Die Haarsegmente (Abbildung 2.3 c) wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit 2 ml Trypsin / EDTA (0,1/0,02 %) 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml FAD-Medium wurden die Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren mithilfe einer Pasteurpipette vom Haarschaft gelöst, die Zellsuspension abgenommen und die Zellzahl bestimmt. Jeweils  $1,5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden auf 3 Petrischalen (Ø 3,5 cm) verteilt und im Brutschrank inkubiert. Der Boden des Kultivierungsgefäßes war für die Kultivierung der Keratinozyten zuvor mit einem so genannten Feederlayer aus Fibroblasten beschichtet worden. Sobald sich die ersten Keratinozyten-Klone auf den Zellkulturschalen gebildet hatten, wurde das Medium gewechselt. Anschließend wurde das Kulturmedium im Abstand von 2 - 3 Tagen erneuert. Die Keratinozyten wurden bei Subkonfluenz gesplittet und weiter kultiviert

### **2.3.7 Herstellung mikroskopischer Präparate für immunhistologische Untersuchungen**

#### **2.3.7.1 Gefrierschnitte humaner Kopfhaut**

Für die immunhistologischen Färbungen wurden am Cryostat CM 3050 (Leica, Bensheim) von den Kopfhautpräparaten 5 - 7 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt. Dazu wurden zunächst die Gewebeproben in mit flüssigem Stickstoff gekühltes (-196°C) Isopropanol gelegt und über Nacht bei -80°C tiefgefroren. Die Gewebeproben wurden in Längsrichtung der Haarfollikel zur Schnittebene mit Tissue-Freezing Medium (Leica, Bensheim) bei -15°C auf einer Objektplatte eingebettet. Es wurden 6 µm dicke Seriengewebeschnitte im Cryostat bei -15 bis -20°C hergestellt und auf Objektträger Superfrost® Plus (Menzel, Braunschweig)

aufgenommen. Die Schnitte wurden in Aceton (-20°C) 10 min im Gefrierschrank fixiert, luftgetrocknet und bis zur Färbung bei -80°C (Heraeus, Hanau) gelagert.

### **2.3.7.2 Melanozyten-Zellkulturpräparate**

Zur immunhistologischen Färbung an den kultivierten Zellen wurden Deckglaspräparate angefertigt. Zunächst wurden die in Kulturgefäßen kultivierten Melanozyten zweimal kurz mit PBS gewaschen und mit Trypsin / EDTA-Lösung (0,025/0,01 %) 1 min trypsiniert, resuspendiert und in 2 ml FCS-Lösung (10 %) aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (Abschnitt 2.2.1) und die Einstellung der Zellzahl mit MGM-Medium auf  $0,006 \times 10^6$  Zellen/ml. Jeweils 200 µl der Suspension wurden auf die Deckgläser pipettiert, zwei Stunden im Brutschrank inkubiert und dann mit Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation im Brutschrank von 4-5 Tagen wurden die Zellen kurz mit PBS gespült, die Deckgläser für 5 min in kaltes Methanol (-20°C) und abschließend 15 sec in kaltem Aceton (-20°C) überführt. Bis zur Färbung der Zellen wurden die Deckgläser bei -80°C gelagert.

### **2.3.7.3 Keratinozyten / Melanozyten Kokultur-Präparate**

Für die immunhistologischen Untersuchungen der Kokulturen wurden Deckglaspräparate mit Keratinozyten und Melanozyten angefertigt. Dazu wurden zunächst die kultivierten Keratinozyten zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin / EDTA-Lösung (0,1/0,02 %) 5 min trypsiniert, resuspendiert und in FCS-Lösung (10 %) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (Abschnitt 2.2.1) und die Einstellung der Zellzahl mit KGM auf  $0,06 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Zellsuspension wurde dann auf die Deckgläser pipettiert, zwei Stunden inkubiert, mit Medium aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Melanozyten-Suspension mit  $0,003 \times 10^6$  Zellen/ml in KGM hergestellt, auf die mit Keratinozyten bewachsenen Deckgläser pipettiert und im Brutschrank inkubiert. Nach 3 - 4 Tagen wurden die Zellen kurz mit PBS gespült, die Deckgläser für 5 min in kaltes Methanol (-20°C) und anschließend 15 sec in kaltes Aceton (-20°C) gebracht. Bis zur Färbung der Zellen wurden die Deckgläser bei -80°C gelagert.

### 2.3.8 Immunhistologische Melanozyten-Identifizierung

Die Charakterisierung der Melanozyten in Zellkulturpräparaten sowie in Kopfhautschnitten erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmethode. Zunächst wurden die Objektträger in einer abgedunkelten feuchten Kammer aufgetaut und die Inkubations- / Reaktionsfläche durch eine Markierung (Dako-Pen, Dako) begrenzt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit einer Lösung (2 % NGS (Normal Goat Serum), 0,1 % Triton X-100) 15 min bei RT geblockt. Nach Abnahme der Lösung erfolgte die Inkubation (30 min, RT) jeweils mit dem unmarkierten Primärantikörper (Tabelle 2.2). Als Negativkontrollen wurde für jeden Primärantikörper ein Präparat mit PBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Färbungen mit dem Sekundärantikörper zu erfassen.

Die Objektträger wurden mit PBS-Puffer bei RT gewaschen (3 x 5min), anschließend der Indocarbocyanin-markierte Sekundärantikörper (Cy3, Dianova, Hamburg, 1:500) auf die Präparate aufgetragen und erneut 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS-Puffer wurden die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Boehringer Mannheim, Mannheim) (Verdünnung 1:5000, 3 min, 4°C) als Markierungshilfe für die Auswertung angefärbt. Danach wurden die Präparate jeweils 2 min mit PBS-Puffer und Aqua dest. gespült, mit Alkohol (100 %) dehydriert, luftgetrocknet und mit Fluoromount (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama) eingebettet.

Primärantikörper	Hersteller	Charakteristika	Arbeitverdünnung
HMB45	Immunotech, Marseille, Frankreich	erfasst Antigen auf unreifen Melanosomen	unverdünnt
NKI/beteb	CellSystems, St.-Katharinen, Deutschland	erfasst 100/7 kD prämelanosomales Glycoprotein; reagiert mit Melanomzellen, normalen Melanozyten und Nävi	1:5
Melan A	Novocastra, Newcastle upon Tyne, England	erfasst ein Antigen das von Melanomzellen, sowie von normalen Melanozyten exprimiert wird; Produkt vom MART-1 Gen	1:10

**Tab. 2.2: Tabelle der verwendeten Primärantikörper.** Alle verwendeten Primärantikörper sind gegen das IgG (Immunglobulin G) gerichtet und stammen von der Maus.

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot II, Zeiss, Göttingen), das mit Filtern zur Detektion der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Cy3:  $\lambda=550/570\text{nm}$ ; DAPI:  $\lambda=340/488\text{nm}$ ) ausgerüstet war. Die Computer gestützte Dokumentation der Färbungen erfolgte mittels CCD-Kamera (Hamamatsu, Herrsching) und der Software Openlab 2.0.4 (Improvision, Coventry, England).

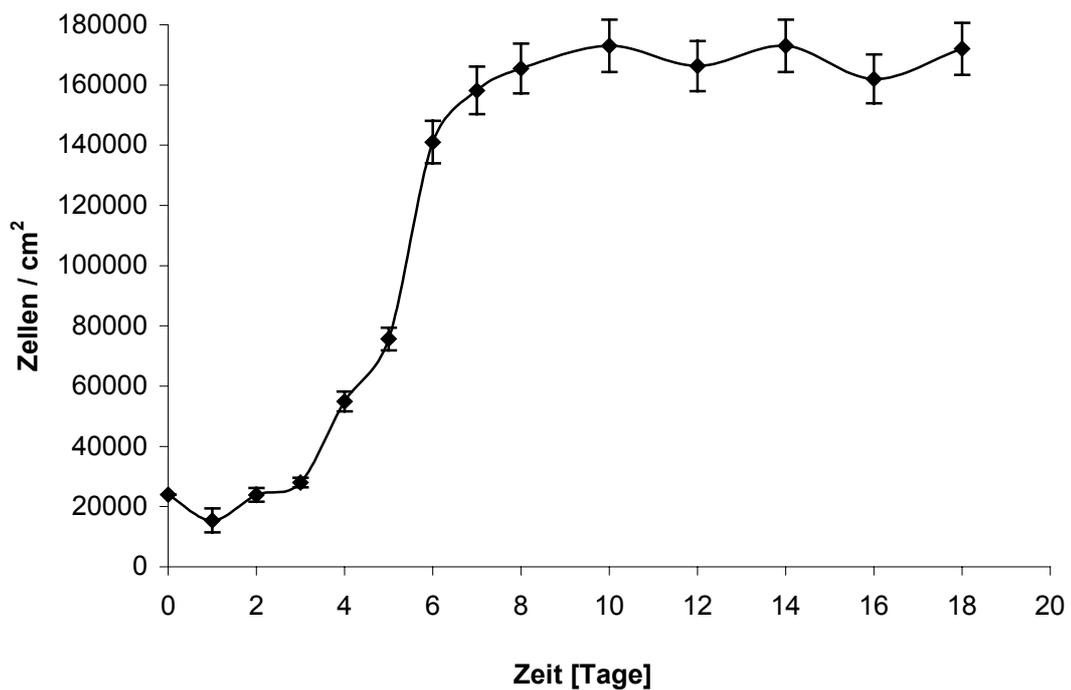
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen an der Keratinozytenzelllinie

#### HaCaT

##### 3.1.1 Proliferationskinetik der HaCaT-Zelllinie und Wachstumshemmung durch die Fremdstoffe

Zur Bestimmung der Proliferationseigenschaften der HaCaT-Zellen wurden  $0,025 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 50 ml Zellkulturflaschen (n=15) ausgesät. Für die Messzeitpunkte im Abstand von 24 Stunden bzw. 2 Tagen wurde mittels Hämocytometrie jeweils die Zellzahl ermittelt (n = 3).



**Abb. 3.1:** Proliferationskinetik der HaCaT-Zelllinie.

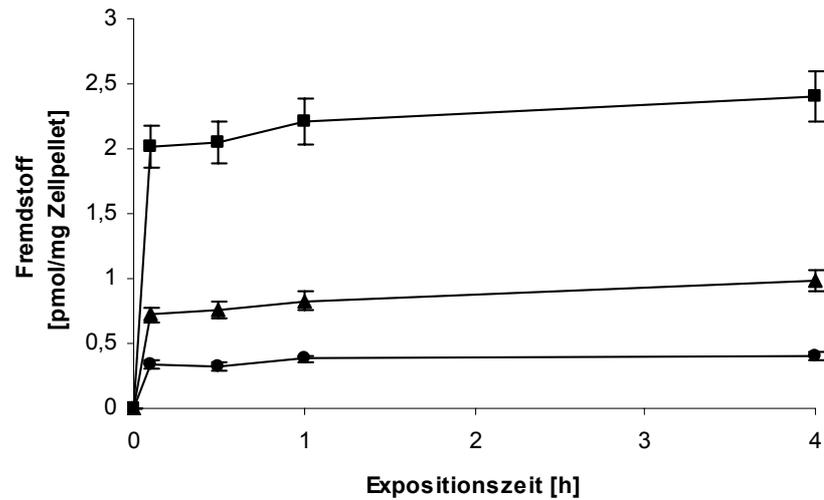
Bei der ersten Zellzahlbestimmung nach 24 Stunden wurde ein Rückgang der Zellzahl festgestellt. Ein Teil der ausgesäten HaCaT-Zellen war nicht angewachsen bzw. war abgestorben und schwamm im Kulturmedium. Nach einer Anpassungsphase lag eine logarithmische Wachstumsphase vor, in der die Verdopplung der Zellzahl nach 24-28 Stunden erfolgte (Abbildung 3.1). Mit

Erreichen der Konfluenz der HaCaT-Zellen nach 8-10 Tagen trat die stationäre Phase ein, in der die Zellzahl bei  $0,16 - 0,18 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> lag.

Es wurde die Hemmung der untersuchten Fremdstoffe auf die Proliferation von HaCaT-Zellen untersucht. Alle Fremdstoffe hemmten erst ab einer Konzentration von 10 µmol/l also einer 25fach höheren Konzentration, als die in der nachfolgenden Untersuchungen maximal eingesetzten Konzentrationen.

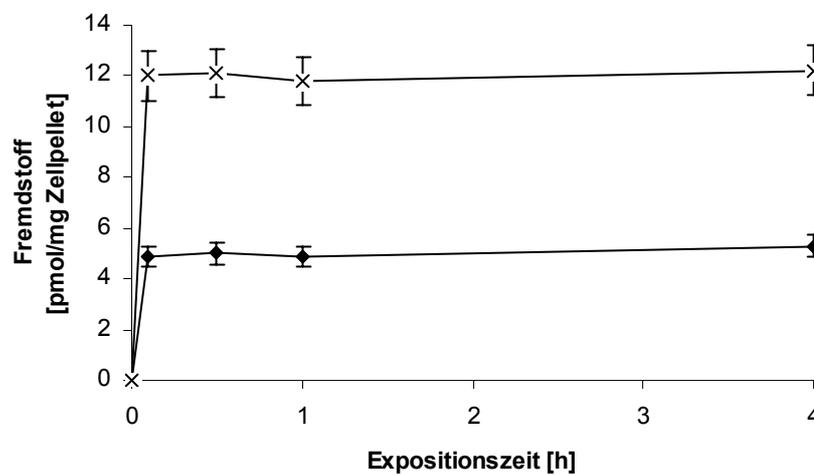
### **3.1.2 Fremdstoffaufnahme und -Akkumulation in HaCaT-Zellen**

Wird der Fremdstoffgehalt zeitabhängig in der ganzen Zelle gemessen, so ist dies ein Resultat aus Fremdstoffaufnahme und -Akkumulation. Es wurde eine Sättigungskurve erwartet, wobei der Sättigungsbereich das Ausschöpfen des Bindungspotenzials darstellt und ein Gleichgewicht zwischen externer und zyttoplasmatischer Konzentration erreicht ist. Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Fremdstoffaufnahme in die HaCaT-Zelllinie wurden die Zellen jeweils mit den unterschiedlichen Testsubstanzen inkubiert. Für alle <sup>3</sup>H-markierten Testsubstanzen wurde eine rasche Einstellung des Gleichgewichtes in den Keratinozyten festgestellt (Abbildung 3.2 und 3.3). Alle Stoffe wurden sehr schnell aufgenommen. Bereits nach 10 min wurden nahezu die Höchstkonzentrationen für die Fremdstoffaufnahme in die HaCaT-Zellen erreicht und es lagen für die Fremdstoffe Diazepam, Nikotin, Morphin, Haloperidol und Imipramin eine Gleichgewichtseinstellung zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Fremdstoffkonzentration vor. Dieses Konzentrationsplateau blieb auch bei Langzeitinkubationen bis zu 72 Stunden für alle Fremdstoffe konstant (Abbildung 3.4 und 3.5).



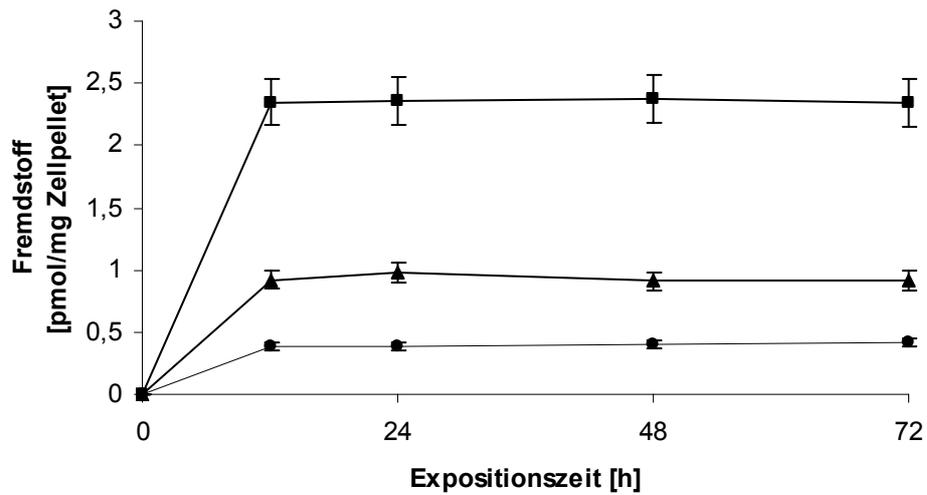
**Abb. 3.2: Vergleich der zeitabhängigen Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen (Kurzzeitexposition).** Inkubation der HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Fremdstoffen bei konstanter Konzentration von 100 pmol/ml Inkubationsmedium mit variierenden Inkubationszeiten: 10 min, 30 min, 1 h und 4h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten mit Standardabweichung dargestellt.

-■- Morphin; -▲- Nikotin; -●- Diazepam



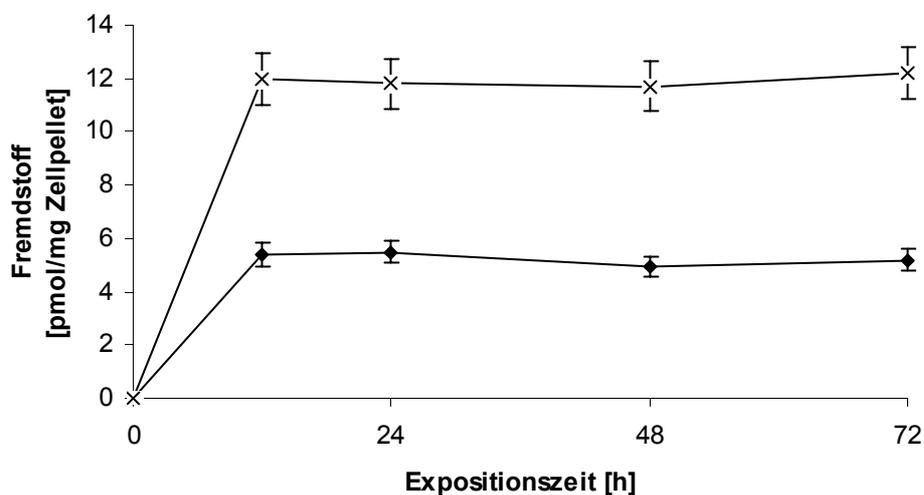
**Abb. 3.3: Vergleich der zeitabhängigen Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen (Kurzzeitexposition).** Inkubation der HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Fremdstoffen bei konstanter Konzentration von 100 pmol/ml Inkubationsmedium mit variierenden Inkubationszeiten: 10 min, 30 min, 1 h und 4h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten mit Standardabweichung dargestellt.

-x- Imipramin; -◆- Haloperidol



**Abb. 3.4: Vergleich der zeitabhängigen Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen (Langzeitexposition).** Inkubation der HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Fremdstoffen bei konstanter Konzentration von 100 pmol/ml Inkubationsmedium mit variierenden Inkubationszeiten: 12, 24, 48 und 72 h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten mit Standardabweichung dargestellt.

-■- Morphin; -▲- Nikotin; -●- Diazepam



**Abb. 3.5: Vergleich der zeitabhängigen Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen (Langzeitexposition).** Inkubation der HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Fremdstoffen bei konstanter Konzentration von 100 pmol/ml Inkubationsmedium mit variierenden Inkubationszeiten: 12, 24, 48 und 72 h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten mit Standardabweichung dargestellt.

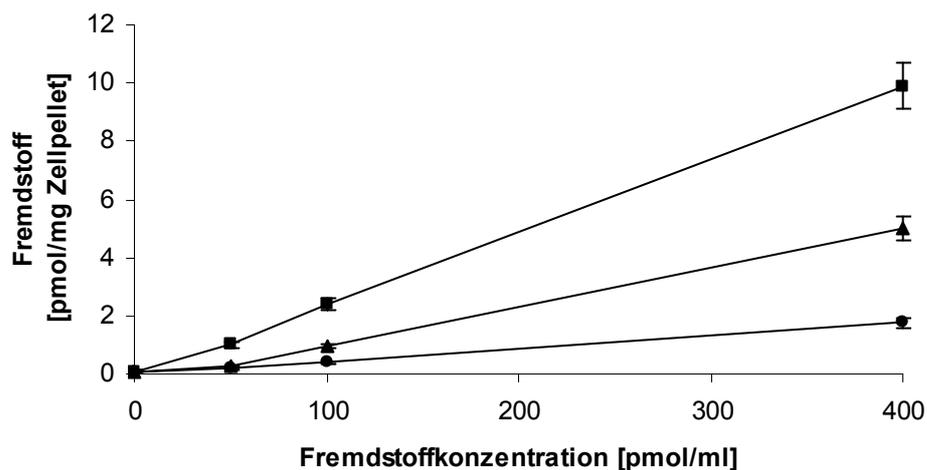
-×- Imipramin; -◆- Haloperidol

Für die Akkumulation der Fremdstoffe in die HaCaT-Zellen wurden deutliche Konzentrationsunterschiede ermittelt. Für den Fremdstoff Imipramin wurden die höchsten Konzentrationen von 12,2 pmol/mg Zellpellet, für Diazepam die niedrigste Konzentration von 0,4 pmol/mg Zellpellet nachgewiesen. Für die anderen verwendeten Fremdstoffe wurden folgende Werte ermittelt: Haloperidol: 5,5 pmol/mg, Morphin 2,4 pmol/mg und Nikotin: 0,98 pmol/mg Zellpellet. Die Höhe des eingestellten Konzentrationsplateaus im Sinne eines Verteilungsgleichgewichtes war stark von den Testsubstanzen abhängig. Es ergab sich folgende Reihung:

Imipramin > Haloperidol > Morphin  $\geq$  Nikotin > Diazepam.

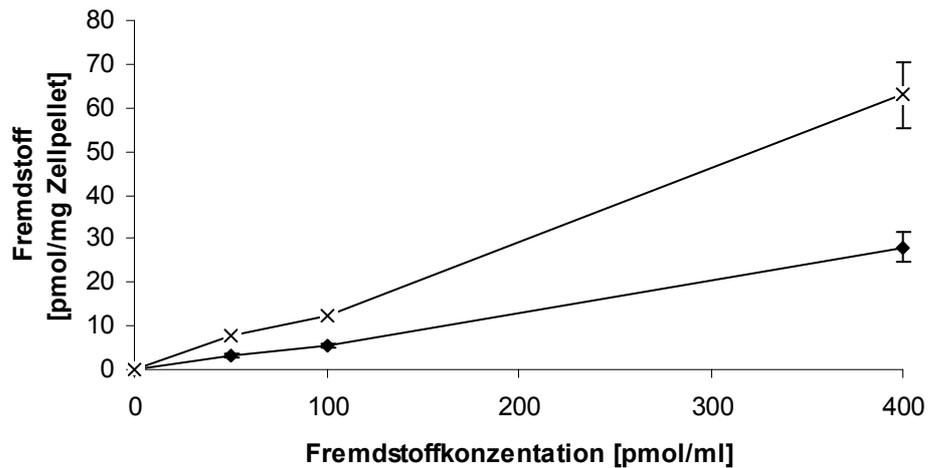
### 3.1.3 Konzentrationsabhängige Fremdstoffaufnahme in die HaCaT-Zellen

Es wurde der Fremdstoffgehalt der Zelle nach 24 stündiger Einwirkzeit in Abhängigkeit der Fremdstoffkonzentration gemessen. Für alle Fremdstoffe ergab sich ein linearer Fremdstoffeinbau (Abbildung 3.6 und 3.7). Die Konzentration in den Zellen war für Imipramin am größten (98 pmol  $^3\text{H}$ -Tracer/mg Protein) und für Diazepam am geringsten (0,35 pmol  $^3\text{H}$ -Tracer/mg Protein).



**Abb. 3.6: Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen.** Expositionskonzentration 50, 100 und 400 pmol/ml, Inkubationszeit: 24h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten dargestellt. Die Standardabweichung beträgt ca.  $\pm 10\%$ .

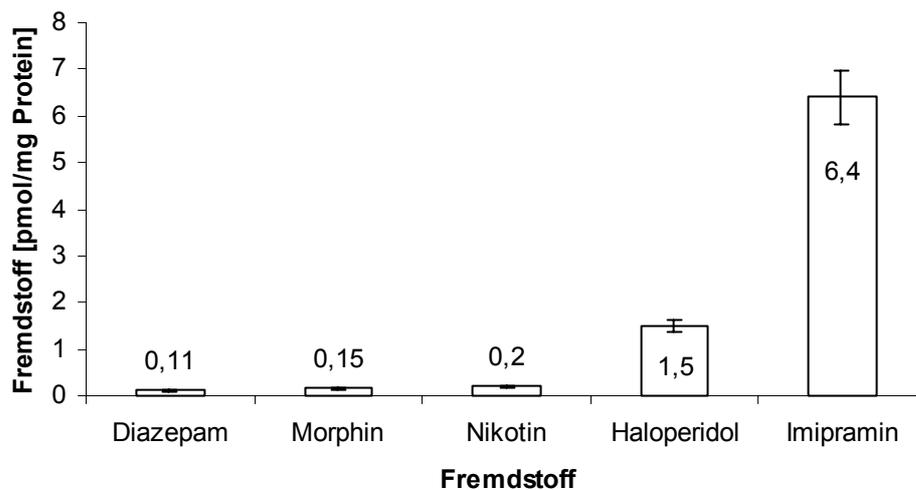
-■- Morphin; -▲- Nikotin; -●- Diazepam



**Abb. 3. 7: Fremdstoffaufnahme in HaCaT-Zellen.** Expositionskonzentration 50, 100 und 400 pmol/ml, Inkubationszeit: 24h. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten dargestellt. Die Standardabweichung beträgt ca.  $\pm 10\%$ .  
-x- Imipramin; -♦- Haloperidol

### 3.1.4 Proteinbindung der Fremdstoffe in HaCaT-Zellen

Es wurde untersucht wie viel Fremdstoff am Zellprotein der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gebunden wurde. Dazu wurden die HaCaT-Zellen mit je 100 pmol/ml über einen Zeitraum von 24 Stunden mit den Fremdstoffen inkubiert, das Protein isoliert und die Fremdstoffkonzentrationen / Protein ermittelt.



**Abb. 3.8: Vergleich der Protein gebundenen Fremdstoffe.** Inkubation der HaCaT-Zellen mit je 100 pmol/ml Fremdstoff. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten dargestellt.

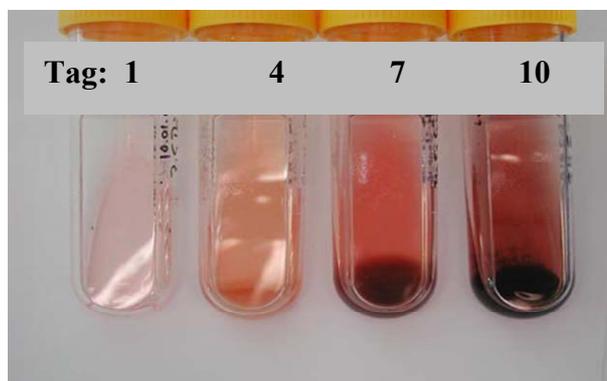
---

In Abbildung 3.8 sind die Protein gebundenen Fremdstoffkonzentrationen angegeben. Die höchsten Protein gebundenen Fremdstoffkonzentration wurde für Imipramin (6,4 pmol/mg Protein), die niedrigste für Diazepam (0,11 pmol/mg Protein).

## 3.2 Untersuchungen an der Pigmentzelllinie B16F1

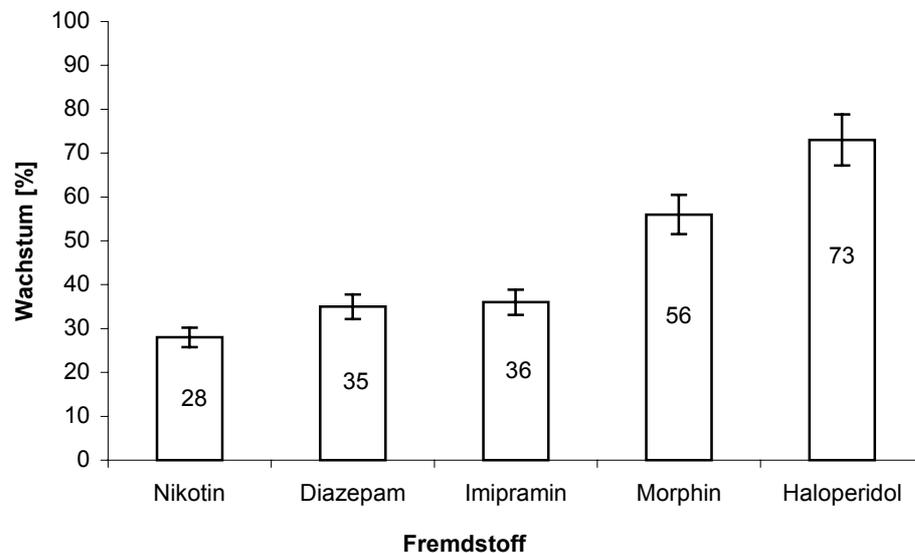
### 3.2.1 Pigmentbildung und Proliferationshemmung von B16F1-Zellen

Bei den Melanin bildenden B16F1-Zellen handelt es sich um Zellen mit einer wachstumsabhängigen Melanogenese. Bei einer 10tägigen Inkubation der B16F1-Zellen zeigt sich, dass die Melaninbildung nach dem 4. Wachstumstag einsetzt (Abbildung 3.9). Nach Einsetzen der Pigmentierung wurde eine Verminderung der Proliferation festgestellt.



**Abb. 3.9:** Zeitlicher Verlauf der Pigmentbildung von B16F1-Zellen am 1., 4., 7. und 10. Tag des Wachstums.

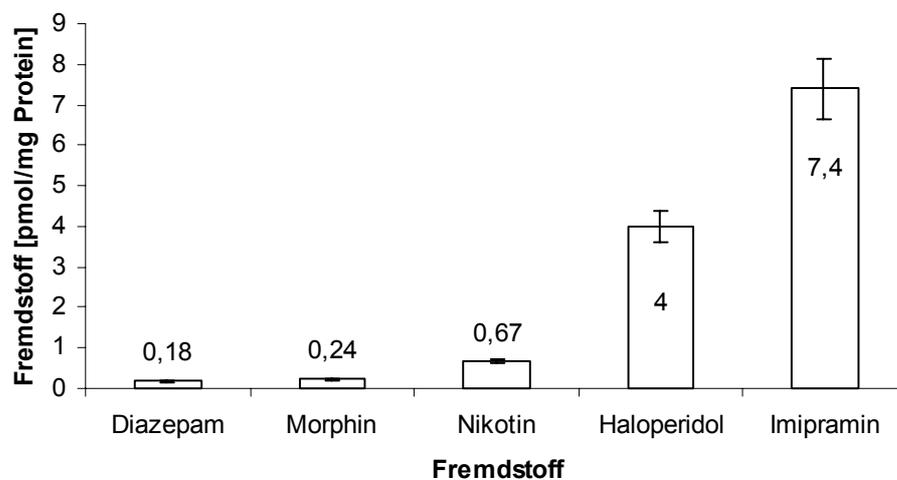
Es wurde untersucht, inwieweit die eingesetzten Fremdstoffe das Wachstum der B16F1-Zellen hemmten. Die Inkubation der B16F1-Zellen mit den Fremdstoffen über den Zeitraum von 10 Tagen hatte Einfluss auf die Proliferationseigenschaften. Alle verwendeten Fremdstoffe zeigten eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der B16F1-Zellen (Abbildung 3.10). Der größte Effekt wurde bei der Inkubation mit Nikotin (72 %) der geringste bei der Inkubation mit Haloperidol (27 %) festgestellt.



**Abb. 3.10:** Vergleich der Proliferationshemmung nach 10 Tagen auf die B16F1-Zellen. Es wurden jeweils 100 pmol/ml Fremdstoff eingesetzt. Zur Kontrolle wurden die B16F1-Zellen mit Medium inkubiert (=100 %).

### 3.2.2 Proteinbindung der Fremdstoffe in B16F1-Zellen

Wie in den Versuchen mit den HaCaT-Zellen wurden die B16F1-Zellen - bevor die Pigmentierung einsetzte - 24 h mit fremdstoffhaltigem Medium inkubiert. Zur Untersuchung der Fremdstoffbindung wurde der Protein-gebundene Anteil der Fremdstoffe ermittelt.

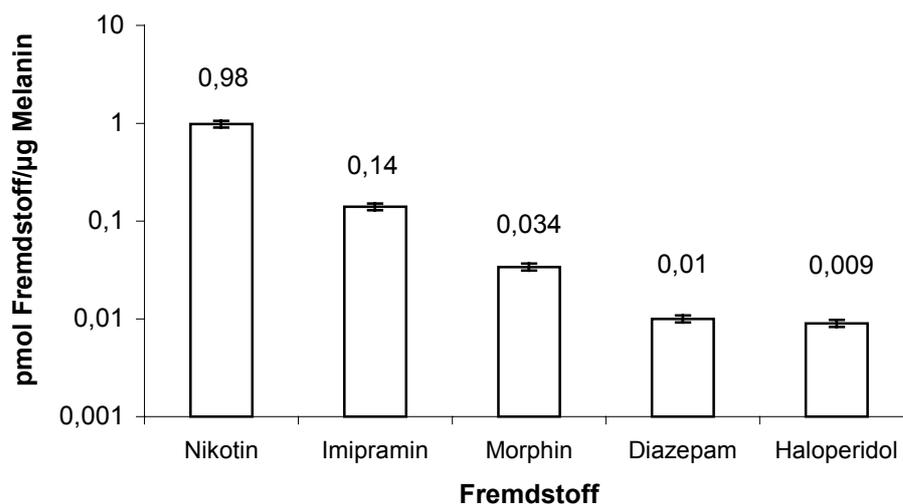


**Abb. 3.11:** Vergleich der Protein gebundenen Fremdstoffe. Inkubation (24 h) der B16F1-Zellen mit je 100 pmol/ml Fremdstoff. Es wurde der Mittelwert aus 3 Parallelwerten dargestellt.

In Abbildung 3.11 sind die Protein gebundenen Fremdstoffkonzentrationen angegeben. Die höchsten Protein gebundenen Konzentration wurde für den Fremdstoff Imipramin (7,4 pmol/mg Protein), die niedrigste für Diazepam (0,18 pmol/mg Protein) ermittelt. Damit ergab sich ein Unterschied von der stärksten zur schwächsten Proteinbindung um einen Faktor von  $F = 41$ .

### 3.2.3 Fremdstoffbindung am Melanin in B16F1-Zellen

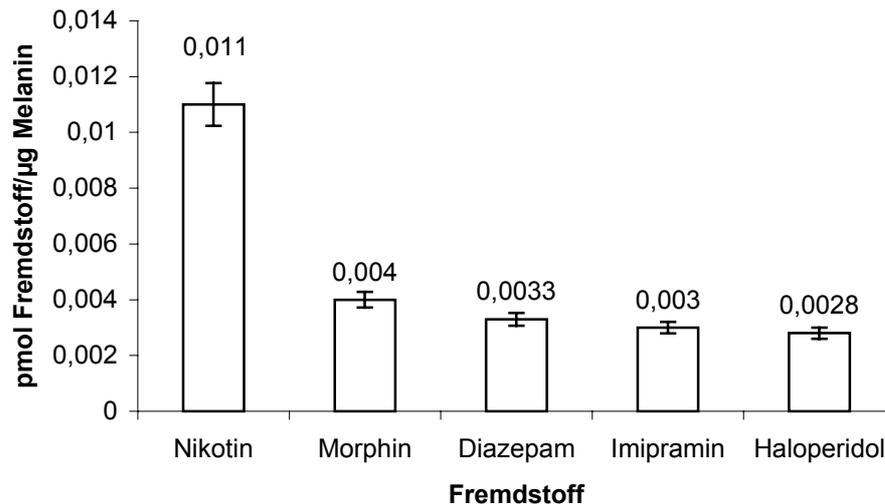
Im Anschluss an die zehntägige Inkubation wurde der Anteil der während der Melanogenese im Melanin eingebauten Fremdstoffanteile ermittelt. Hierzu wurden die Zellen lysiert, zentrifugiert und das im Pellet enthaltene Melanin hinsichtlich Melaningehalt und  $^3\text{H}$ -Gehalt bestimmt. Die verwendeten Fremdstoffe zeigten unterschiedliche Bindungseigenschaften am Melanin (Abbildung 3.12). Die höchste gemessene Fremdstoffkonzentration wurde mit 0,98 pmol/ $\mu\text{g}$  Melanin für Nikotin ermittelt. Die geringsten Melanin gebundenen Fremdstoffkonzentrationen wurden für die Substanzen Diazepam (0,01 pmol/ $\mu\text{g}$  Melanin) und Haloperidol (0,009 pmol/ $\mu\text{g}$  Melanin) festgestellt. Aus diesen Versuchen ergaben sich unterschiedliche Melaninaffinitäten für die verwendeten Fremdstoffe.



**Abb. 3.12: Fremdstoffbindung am Melanin der B16F1-Zellen.** Darstellung der an Melanin gebundenen Fremdstoffe nach einer 10-tägigen Inkubation der B16F1-Zellen mit jeweils 100 pmol/ml  $^3\text{H}$ -Fremdstoff.

### 3.2.4 Fremdstoffbindung an Melaningranula

In diesem Versuch wurden die an der Oberfläche reifer Melaningranula gebundenen Fremdstoffkonzentrationen ermittelt. Dazu wurden jeweils die aus reifen B16F1-Zellen isolierten Melaningranula 24 Stunden mit verschiedenen Fremdstoffen inkubiert und die an der Oberfläche gebundenen Anteile ermittelt.



**Abb. 3.13: Fremdstoffadsorption an Melaningranula.** Darstellung der Fremdstoffkonzentrationen auf der Oberfläche reifer Melaningranula. 24 h Inkubation

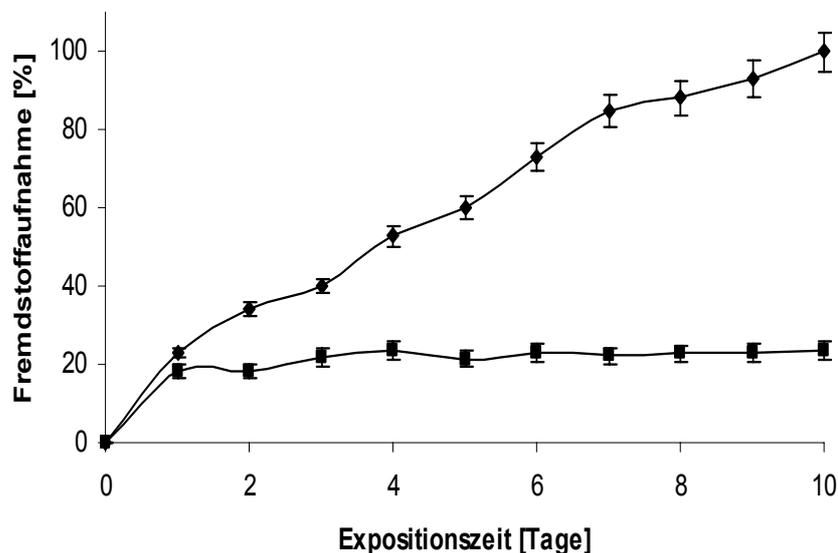
Im Vergleich zu den zuvor ermittelten Melanin gebundenen Fremdstoffkonzentrationen zeigten sich bei den auf der Oberfläche gebundenen Fremdstoffen eine andere Verteilung. Die höchste, auf der Melaninoberfläche gebundene Fremdstoffkonzentration, wurden mit 0,011 pmol/µg Melanin für Nikotin ermittelt. Die geringsten Melanin gebundenen Fremdstoffkonzentrationen wurden für die Substanzen Imipramin (0,003 pmol/µg Melanin) und Haloperidol (0,0028 pmol/µg Melanin) festgestellt.

### 3.2.5 Fremdstoffaufnahme / Akkumulation in Gegenwart des Tyrosinase-Inhibitors Phenylthiocarbamid

Es wurde untersucht, inwieweit die Fremdstoffaufnahme / Akkumulation vom Melaningehalt in B16F1-Zellen abhängt. Hierzu wurde durch den Tyrosinase-Inhibitors Phenylthiocarbamid (PTC) die Melanogenese der B16F1-Zellen stark

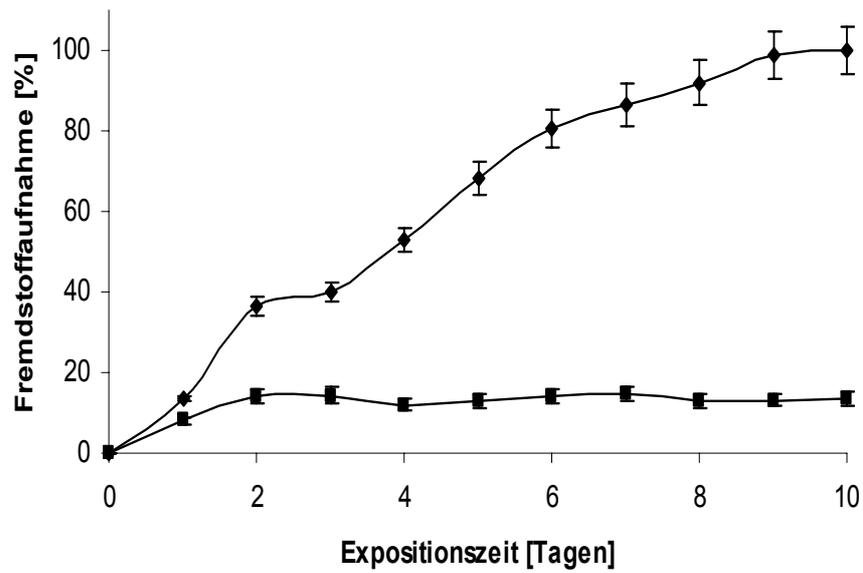
inhibiert, so dass sich der Melaningehalt der Zellen um 83 %, gegenüber den Kontrollen ohne PTC-Zusatz (=100 %), verringerte. Nach 3 Tagen lagen  $2 \mu\text{g}$  Melanin/ $10^6$  Zellen in Melanogenese-gehemmten B16F1-Zellen vor und blieb über den Versuchszeitraum von 10 Tagen konstant. Die Zellzahl der adhärennten B16F1-Zellen in den Versuchsansätzen mit PTC-Zusatz war dreifach höher als in den Kontrollen ohne PTC.

Zur Bestimmung der Melanin-abhängigen Akkumulation von Fremdstoffen in Pigment produzierenden Zellen wurden die B16F1-Zellen mit und ohne PTC in Gegenwart der Fremdstoffe Haloperidol bzw. Imipramin inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 und 3.15 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Fremdstoffaufnahme in nicht gehemmten Zellen linear über den gemessenen Zeitraum von 10 Tagen verlief, während in den Melanogenese-gehemmten Zellen schon nach einem Tag eine Sättigung der Fremdstoffaufnahme erfolgte. Nach 10 Tagen wurden in den gehemmten Zellen ca. 20 % (Haloperidol) und 15 % Imipramin im Vergleich zu den nicht gehemmten Zellen gemessen.



**Abb. 3.14: Haloperidolgehalt (50 pmol/ml) in B16F1-Zellen.** Aufnahme / Akkumulation von Haloperidol in Pigment bildenden Zellen über 10 Tage mit und ohne Tyrosinase-Inhibitor PTC.

-■- B16F1 + PTC; -◆- ohne PTC



**Abb. 3.15: Imipramingehalt (50 pmol/ml) in B16F1-Zellen.** Vergleich der Aufnahme von Imipramin in Pigment bildenden Zellen über 10 Tage mit und ohne Tyrosinase-Inhibitor PTC.

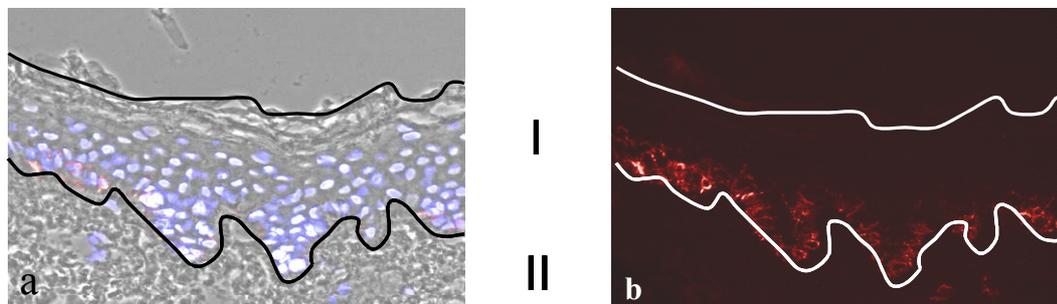
-■- B16F1 + PTC; -◆- ohne PTC

### 3.3 Untersuchungen an humaner Kopfhaut / Haarfollikeln

#### 3.3.1 Epidermale Melanozyten und Keratinozyten

##### 3.3.1.1 Immunhistologischer Nachweis epidermaler Melanozyten

Zur Lokalisation der Melanozyten in der humanen Epidermis wurden epidermale Gefrierschnitte hergestellt und mit den Antikörpern HMB 45, sowie mit NKI/beteb und Melan A angefärbt.



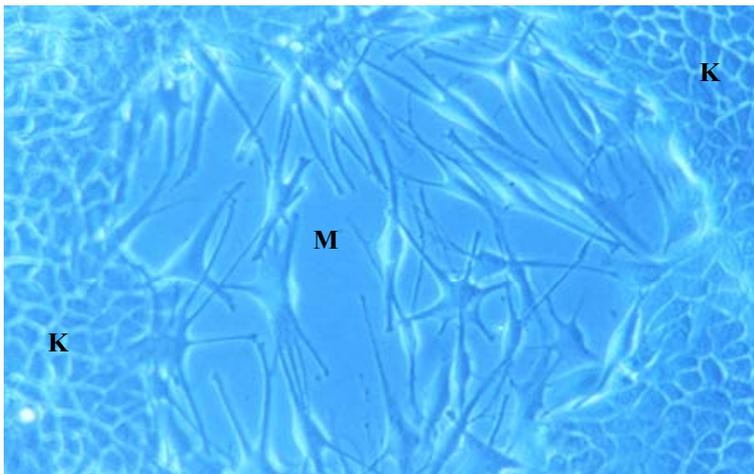
**Abb. 3.16: Nachweis epidermaler Melanozyten.** **a:** Phasenkontrastaufnahme mit Kernfärbung (blau) und Melanozyten (rot). **b:** Färbung der epidermalen Melanozyten mit dem Antikörper HMB 45 (Fluoreszenzmikroskopie). Die schwarzen (a) bzw. weißen (b) Grenzlinien wurden zur Lokalisation der Epidermis in die Abbildungen eingefügt.

Abbildung 3.16 zeigt einen Gewebeschnitt der humanen Haut, die sich in Epidermis (Oberhaut; I) und Dermis (Lederhaut; II) unterteilt. Die Epidermis besteht aus vier übereinander liegende Zellschichten, (*Stratum basale*, *S. spinosum*, *S. granulosum* und *S. corneum*) in denen die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten verläuft. In der Basalschicht (*Stratum basale*) befinden sich die proliferierenden Keratinozyten (ca. 90 %), Langerhanszellen, Merkelzellen sowie die pigmentbildenden Melanozyten (b).

### 3.3.1.2 Herstellung primärer epidermaler Melanozyten- und Keratinozytenkulturen

Bei der Isolierung von Melanozyten aus epidermalen Gewebeproben konnten bei ca. 64 % der Präparate erfolgreich Primärkulturen angelegt werden. Nach der Präparation der Kopfhautpräparate standen im Durchschnitt zwischen 0,5 und  $1 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> Epidermis für die Primäraussaat der Zellen zur Verfügung. Etwa 4 - 6 Tage nach Aussaat der Primärkulturen konnten in den Kulturgefäßen zwei Zellpopulationen anhand ihrer Morphologie lichtmikroskopisch gut voneinander unterschieden werden (Abbildung 3.17).

Zunächst ließen sich nach etwa 2 – 3 Tagen die Keratinozyten identifizieren. Die Keratinozyten hatten eine rundliche Gestalt und bildeten keine Zellausläufer. Die Melanozyten konnten anhand ihrer charakteristischen Zellausläufer erst 1 – 2 Tage später als die Keratinozyten eindeutig identifiziert werden (Abbildung 3.17).

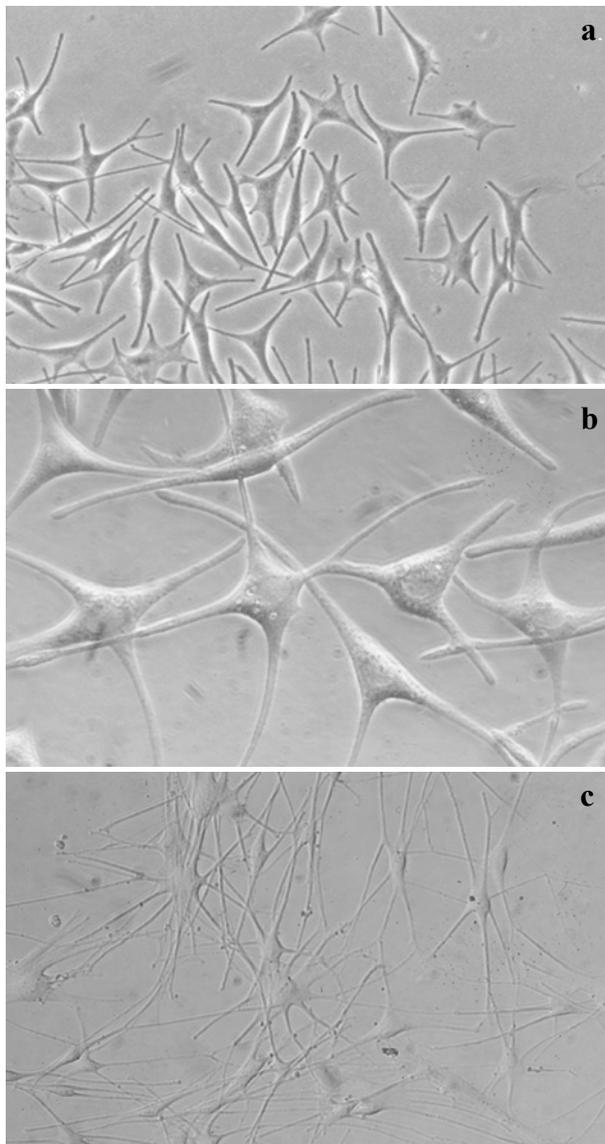


**Abb. 3.17: Epidermale Primärkultur.** Isolierung von epidermalen Keratinozyten (K) und Melanozyten (M). Identifizierung anhand morphologischer Merkmale. Zellen drei Wochen nach Aussaat. Lichtmikroskopie.

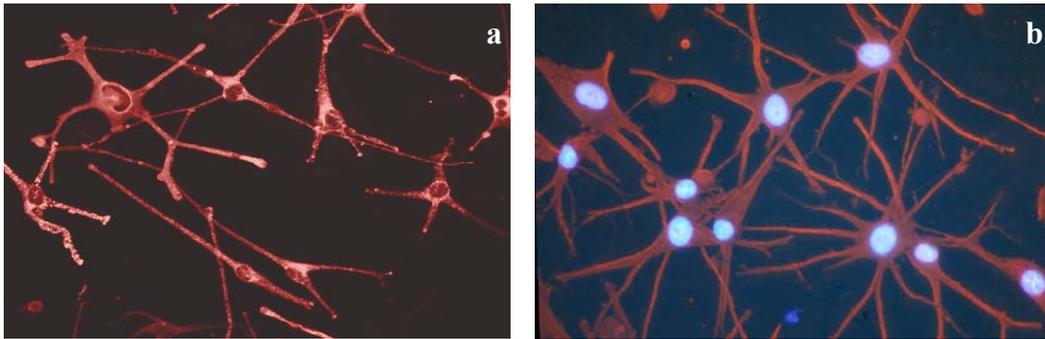
Wie in Abbildung 3.17 dargestellt wuchsen die Melanozyten in den Primärkultur in den Freiräumen zwischen, aber auch vereinzelt auf den Keratinozyten. Bevor die Kulturschalen konfluent bewachsen waren (im Durchschnitt nach 27 Tagen) und die Zellen differenzierten, wurden nach 21 - 24 Tagen die Melanozyten selektiv trypsiniert und in neuen Kulturschalen ausgesät. Von knapp der Hälfte (56 %) der Kopfhautpräparate konnten Melanozytenkulturen der ersten Passage hergestellt werden (Abbildung 3.18). Die Ausbeute der Melanozyten nach der

ersten Passage betrug  $0,04 - 0,08 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> präparierter Epidermis. Nach etwa 18 – 20 Tagen wurde die Melanozytenkultur wieder passagiert und die Zellkulturen der 2. Passage waren frei von Keratinozyten.

*In vitro* zeigten die Melanozyten der Epidermis eine moderate Pigmentierung. Die Zellen hatten einen ausgeprägten polydendritischen Charakter. Die eindeutige Identifizierung der isolierten Zellpopulationen gelang mittels immunhistologischer Färbungen mit Melanozyten-spezifischen-Antikörpern (Abbildung 3.19). Die isolierten Melanozyten von Hautpräparaten des Hauttyps VI waren deutlich stärker pigmentiert.



**Abb. 3.18: Passagierte Melanozyten.** Isolierte epidermale Melanozyten in Reinkultur. Die epidermalen Melanozyten sind gut anhand ihres polydendritischen Charakters zu identifizieren. **a:** Isolierte Melanozytenkultur eine Woche nach Aussaat. **b:** Vergrößerte Darstellung der Melanozyten in Kultur. **c:** Melanozyten nach Langzeitkultivierung (5 Wochen). Deutliche Zunahme der Dendritenbildung.



**Abb. 3.19:** Immunhistologische Identifizierung epidermaler Melanozyten mittels **a:** NKI/beteb Antikörper (rot); **b:** Melan A Antikörper (rot). Zellkernfärbung (DAPI). (Zellen 5 Tage kultiviert)

Mithilfe der Melanozyten-spezifischen Antikörper konnten die Zellen in Kultur eindeutig identifiziert werden. In der Abbildung 3.19 sind die morphologischen Charakteristika der isolierten epidermalen Melanozyten wie der Zellkern und die weit verzweigten Zellausläufer zu erkennen. In der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper NKI/beteb ist eine Häufung der Melanosomen um den Zellkern und Verteilung bis in die Spitzen der Dendriten erkennbar (Abbildung 3.19 a). In der Abbildung 3.19 b sind die Melanozyten mit dem Antikörper Melan A gleichmäßig angefärbt.

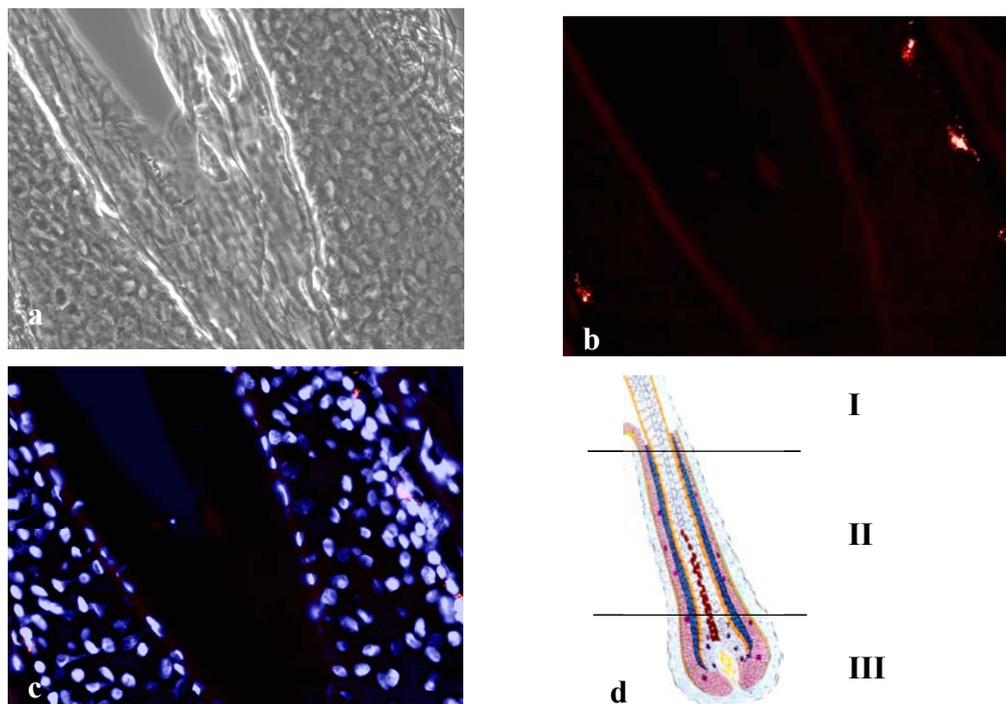
Im Vergleich der beiden Abbildungen 3.18 a und c fällt die erhöhte Anzahl der Dendriten in Abhängigkeit zur Kultivierungsdauer auf. Mit fortschreitender Anzahl der Passagen wurden die Zeitabstände zwischen den Passagen verringert, da die Proliferation der Melanozyten zum Erliegen kam und die Zellen ausdifferenzierten. Durch das Umsetzen der Zellen sollte ein erneuter Proliferationsimpuls und somit eine Erhöhung der Gesamtzellzahl erzielt werden. Trotz der verkürzten Kultivierungsdauer einer Passage differenzierten die Melanozyten und die Zellausbeute der proliferierenden Melanozyten verringerte sich kontinuierlich. Mit zunehmender Dendritenbildung mussten die Trypsinierungszeiten zum Lösen der Melanozyten von 30 Sekunden auf bis zu 3 Minuten erhöht werden. Auch die zusätzliche Applikation von Cholera toxin (0,2 µg/ml), neben dem im Medium enthaltenen TPA, löste keinen erhöhten Proliferationsreiz der Melanozyten aus.

Die Kultivierung epidermaler Melanozyten bis zur 5. Passage gelang nur in ca. 20 % bezogen auf die präparierten Gewebeproben. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten beschränkte sich ebenfalls auf 5 Passagen.

### 3.3.2 ORS-Melanozyten und -Keratinozyten

#### 3.3.2.1 Immunhistologischer Nachweis der ORS-Melanozyten

Der Nachweis der Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide (ORS) erfolgte an pigmentierten Haarfollikeln, von präparierten Gewebeschnitten der Kopfhaut, mithilfe der Antikörper NKI/beteb (Abbildung 3.20) und Melan A. Diese Melanozyten besaßen einen bipolaren Charakter und im Vergleich zu den Melanozyten der Epidermis wurden nur sehr wenige Zellen identifiziert. Die Melanozyten in der äußeren Wurzelscheide konnten mithilfe des Antikörpers gegen Tyrosinase nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3.20: Nachweis der ORS-Melanozyten.** **a:** Längsschnitt eines Haarfollikels (Phasenkontrastaufnahme) **b:** Färbung der ORS-Melanozyten mit dem Antikörper NKI/beteb (rot), Fluoreszenzmikroskopie. **c:** Zellkernfärbung zur Darstellung der ORS-Zellen (blau); Melanozyten (rot). **d:** Schematische Übersicht zur Lokalisation der Melanozyten im Haarfollikel.

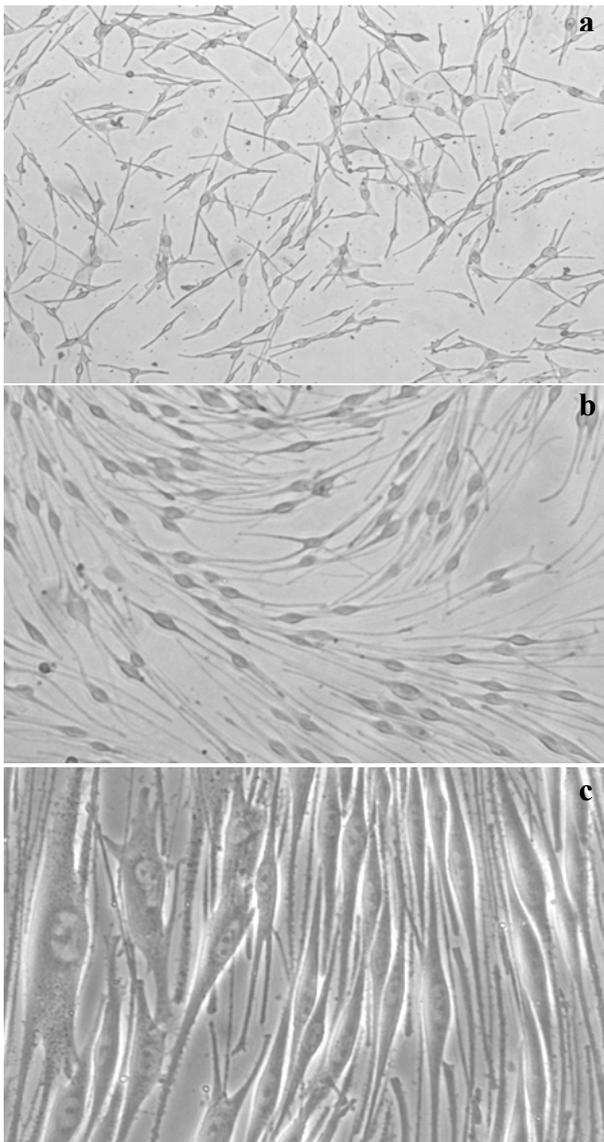
### 3.3.2.2 Melanozyten- und Keratinozytenkulturen aus der äußeren Wurzelscheide (ORS)

Bei der Isolierung der Melanozyten aus der äußeren Wurzelscheide (ORS) konnten bei 56 % der Präparate erfolgreich Primärkulturen angefertigt werden. Nach einer Kultivierungsdauer von 4 - 6 Tagen nach Aussaat der Primärkulturen konnten in den Kulturgefäßen zwei Zellpopulationen anhand ihrer Morphologie lichtmikroskopisch gut voneinander unterschieden werden.

Bei der Ermittlung der optimalen Trypsinierungszeit der Haarfollikel bewährte sich die 10-minütige Trypsinierung. Kürzere Trypsinierungszeiten (1 - 5 min) führten zu keinen bzw. geringen Ausbeuten von Melanozyten. Längere Trypsinierungszeiten von 20 oder 30 Minuten zeigten nicht den gewünschten Erfolg einer erhöhten Zellausbeute. Stattdessen verringert sich durch eine verlängerte Trypsinierungszeit die Anzahl der passagierbaren Melanozyten und die Kulturen enthielten eine hohe Anzahl unerwünschter Fibroblasten. Bei der Präparation der Zellen aus den Haarfollikeln ließ sich die durchschnittliche Zellzahl nicht genau bestimmen, da die Anzahl von depigmentierten Haaren variierte und diese Haare bei der Präparation nicht berücksichtigt wurden. Bei Präparaten mit durchgängig pigmentierten Haaren war die Zellausbeute von 0,4 und  $0,8 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> mit denen der Epidermis vergleichbar. Bei der Ermittlung der Zelldichte zur Aussaat der Zellen bei der Präparation aus den Haarfollikeln wurde eine Zellzahl von  $0,025 - 0,05 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ermittelt.

Wie zuvor bei der Präparation der Zellen aus der Epidermis beobachtet, wurden zunächst nach 2 – 3 Tagen die Keratinozyten in den Kulturgefäßen identifiziert und anschließend, mit einer zeitlichen Verzögerung von 1 – 2 Tagen, die Melanozyten. In den Primärkulturen wuchsen die Melanozyten ebenfalls in den Freiräumen zwischen, aber auch vereinzelt auf den Keratinozyten. Obwohl die Kultivierung der Zellen in Melanozyten-spezifischem Medium erfolgte, handelte es sich beim überwiegenden Teil der in Primärkultur befindlichen Zellen um Keratinozyten ( $\geq 90$  %) und nur ein geringerer Anteil entfiel auf die Melanozyten (ca. 5 %). Dies zeigt deutlich die natürlichen Verhältnisse der Zellpopulationen im Haarfollikel.

Darüber hinaus wurde in den Kulturgefäßen bei der Präparation der ORS-Melanozyten häufiger als bei den epidermalen Melanozytenkulturen das Vorhandensein von Fibroblasten beobachtet. Aufgrund der morphologischen Übereinstimmungen bei Fibroblasten und Melanozyten konnten bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Kulturen die beiden Zellarten zunächst nicht sicher unterschieden werden und die Kontrolle der Kulturen mit Melanozyten-spezifischen Antikörpern war unerlässlich.

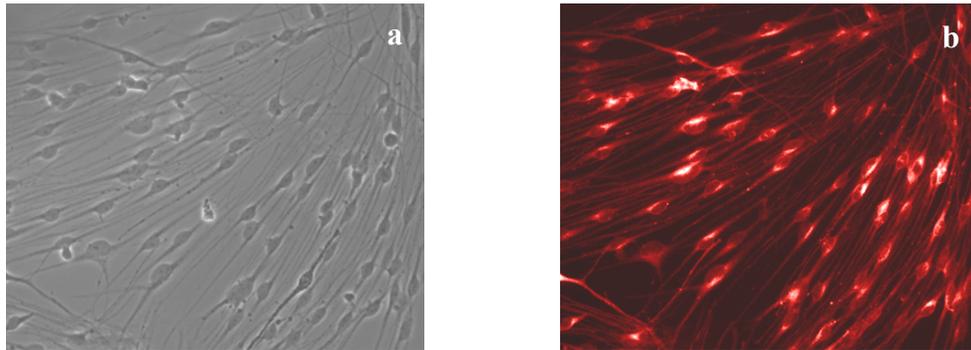


**Abb. 3.21: Passagierte ORS-Melanozyten.**

Reinkulturen der ORS-Melanozyten, mit der *in vitro* charakteristischen bipolaren Morphologie sowie "fischzugartigen" Anordnung der Zellen. **a:** Melanozyten ca. 7 Tage nach Aussaat. **b:** Proliferierende ORS-Melanozyten 12 Tage nach der Zellaussaat. Leichte Pigmentierung der Zellen in den Dendriten erkennbar. **c:** Melanosomen-haltige Dendriten der bipolaren ORS-Melanozyten. Lichtmikroskopie.

Bei der Kultivierung der Melanozyten konnte eine für diese Zellen charakteristische Verteilung in den Kulturschalen beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Keratinozyten, die eine rundliche Gestalt besitzen und von einigen Zellen ausgehend konzentrisch in Klonen wuchsen, zeigten die

Melanozyten aufgrund ihrer Morphologie ein anderes Verteilungsmuster *in vitro*. Bei den isolierten ORS-Melanozyten wurde eine parallele Anordnung der Zellen beobachtet (Abbildung 3.21 b und c). In den Melanozyten konnten lichtmikroskopisch Zellorganellen beobachtet werden, die anschließend mithilfe von Melanozyten-spezifischen Antikörpern eindeutig als Melanosomen identifiziert wurden.

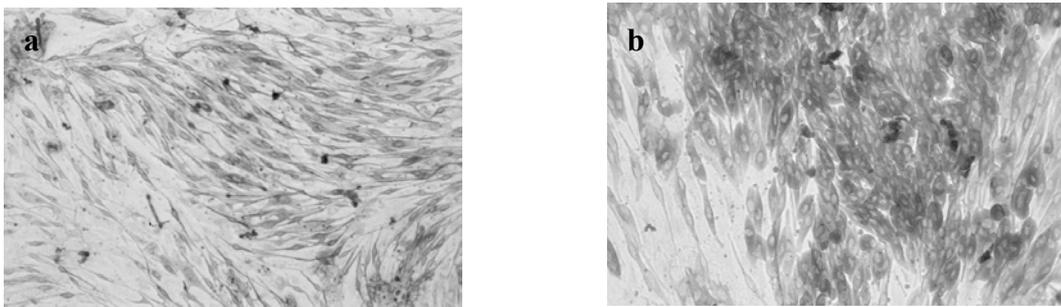


**Abb. 3.22:** Präparat von isolierten Zellkulturen aus humanen Haarfollikeln. **a:** Phasenkontrast. **b:** Immunhistologische Färbung und Identifizierung der ORS-Melanozyten mit dem Melanozyten-spezifischen Antikörper Melan A. Fluoreszenzmikroskopie.

Das Auftreten von unterschiedlichen Zellpopulationen in den Primärkulturen wie Keratinozyten und Fibroblasten machte ein frühzeitiges Passagieren der Melanozyten erforderlich, da die höhere Zellzahl und die höhere Proliferationsgeschwindigkeit der anderen Zellen zum Verdrängen der Melanozyten führte. Vor Erreichen der Subkonfluenz der Zellen in den Kulturschalen (im Durchschnitt nach 22 Tagen) und vor Einsetzen der Differenzierung der Zellen, wurden nach 17 - 19 Tagen die Melanozyten selektiv trypsiniert und in neuen Kulturschalen ausgesät. Von etwa 48 % der Kopfhautpräparate konnten Melanozytenkulturen der ersten Passage hergestellt werden (Abbildung 3.22). Nach etwa 14 – 17 Tagen wurde die Melanozytenkultur erneut passagiert und die Zellkulturen der 3. Passage waren frei von Keratinozyten. Im Gegensatz zur Morphologie der epidermalen Melanozyten hatten die isolierten ORS-Melanozyten einen bipolaren Charakter und waren nur geringgradig pigmentiert (Abbildung 3.21 c). Waren nach dem Passagieren der Melanozyten noch Fibroblasten in den Kulturen vorhanden, wurde dem Medium 100 µg/ml Geneticin zugesetzt und die Zellen zwei Tage lang weiter kultiviert. Mit dem Antibiotikum, das auf die proliferierenden Zellen wirkt, sollte das

Überwuchern der Kultur mit Fibroblasten vermieden werden. Trotz dieser Maßnahme konnte nicht in allen Zellkulturen das Fibroblastenwachstum ausreichend gehemmt und die Kulturen weiter kultiviert werden. Eine ORS-Melanozytenkultivierung gelang in ca. 20 % der präparierten Gewebeproben bis zur 4. Passage.

Zur Pigmentierung der ORS-Melanozyten wurden die Zellen der 2. Passage über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen in Medium mit 50 nM IBMX kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig in Abständen von drei Tagen gewechselt und die Zellen wurden nicht passagiert. Die Zelldifferenzierung, erkennbar an der Pigmentierung, setzte nach ca. 7 Tagen ein. Nach etwa 14 Tagen waren die ORS-Melanozyten überwiegend stark pigmentierte.

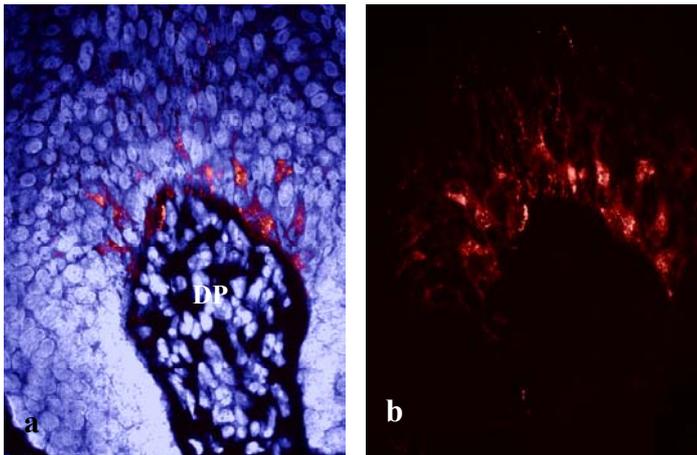


**Abb. 3.23: Kultivierung von ORS-Melanozyten.** Zellen mit zunehmender Pigmentierung in Abhängigkeit der Zeit. **a:** Zellen 8 Tage nach Aussaat. **b:** Zellen 14 Tage nach Aussaat.

### 3.3.3 Peripapilläre Melanozyten

#### 3.3.3.1 Immunhistologischer Nachweis peripapillärer Melanozyten

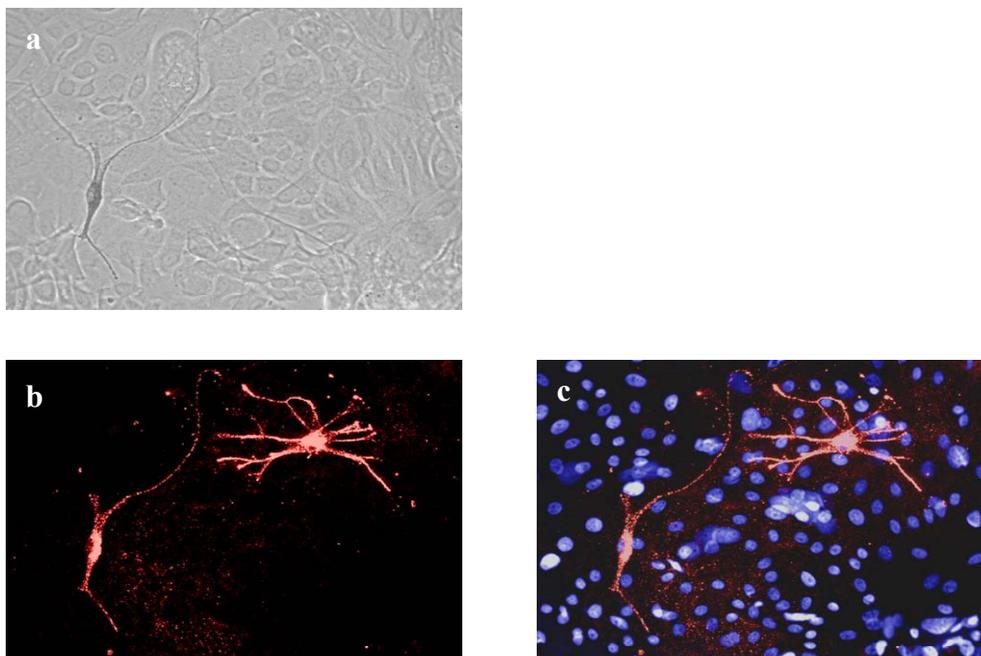
Im Gegensatz zu den bipolaren Melanozyten der ORS waren die peripapillären Melanozyten stark pigmentiert, hatten mehrere Dendriten und konnten bereits lichtmikroskopisch lokalisiert werden.



**Abb. 3.24: Nachweis der peripapillären Melanozyten.** Gefrierschnitt der dermalen papillenregion eines menschlichen Haarfollikels. DP: dermale Papille **a**: Übersicht mit Zellkernfärbung (blau) und Melanozyten (rot) **b**: Peripapilläre Melanozyten (HMB45; rot). Fluoreszenzmikroskopie.

### 3.3.3.2 Kultivierung peripapillärer Melanozyten

Bei der Isolierung der peripapillären Melanozyten aus Haarfollikeln konnten bei ca. der Hälfte der Präparate erfolgreich Primärkulturen angelegt werden. Trotz selektiver Trypsinierung mit dem Ziel der Gewinnung von Reinkulturen konnten keine Melanozyten weiter kultiviert werden. Die Melanozyten aus dem Abschnitt oberhalb der dermalen Papille, die für die Pigmentierung der Haare verantwortlich sind, waren bereits nach den ersten Tagen der Zellkultivierung in den Kulturschalen in Kokultur mit den Keratinozyten zu erkennen. Für diese Melanozytenpopulation war von Beginn der Kultivierung an ein dendritischer Charakter sowie eine starke Pigmentierung typisch (Abbildung 3.25). Im Vergleich zu den isolierten epidermalen Melanozyten und ORS-Melanozyten war die Zellausbeute bei den peripapillären Melanozyten deutlich geringer. Im Lichtmikroskop konnten nur vereinzelte Zellen festgestellt werden. Ein Teil dieser adhärennten Melanozyten löste sich nach etwa einer Woche ab. Eine Kultivierung der peripapillären Melanozyten war nur in den Primärkulturen erfolgreich. Nach der Trypsinierung der Zellen zum Passagieren, gelang es nicht die Melanozyten umzusetzen und weiter zu kultivieren.



**Abb. 3.25: Primärkultur peripapillärer Zellen. a:** Phasenkontrastaufnahme mit Keratinozyten und Melanozyten. **b:** Immunhistologische Lokalisation der Melanozyten mit Melanozyten-spezifischem Antikörper NKI/beteb. **c:** Zellkernfärbung zur Darstellung der benachbarten Keratinozyten (DAPI).

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchungen an HaCaT-Zellen und B16F1-Zellen

In unterschiedlichen *in vivo* Studien wurde anhand verschiedener Fremdstoffe gezeigt, dass in Haaren nachgewiesene Konzentrationen basischer Fremdstoffe in pigmentierten und unpigmentierten Haaren variieren. In diesen Studien wurden in pigmentierten Haarproben deutlich höhere Fremdstoffkonzentrationen im Vergleich zu unpigmentierten Haaren ermittelt, wobei als Ursache eine Melanin-abhängige Assoziation dieser Xenobiotika vermutet wurde. So geht aus mehreren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Uematsu hervor, dass diverse Fremdstoffe in Abhängigkeit der Haarfarbe eingelagert wurden. In einer dieser Studien wurden zehnfach höhere Haloperidolkonzentrationen in schwarzen Haaren gegenüber weißen Haaren, bei gleichen Plasmakonzentrationen der Probanden, nachgewiesen [Uematsu *et al.*, 1990] und später auch eine zehnfach niedrigere Fremdstoffkonzentration in weißen Haaren für das Neuroleptikum Chlorpromazin [Sato *et al.*, 1993]. In weiteren Veröffentlichungen wurde die Assoziation von Fremdstoffen an Melanin auch für Clenbuterol [Dürsch *et al.*, 1995], Kokain [Reid *et al.*, 1996; Hubbard *et al.*, 2000], Methadon [Green und Wilson, 1996], Codein [Gygi *et al.*, 1997; Pötsch *et al.*, 1997 a] und Ofloxacin [Pötsch *et al.*, 1997 b] nachgewiesen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Fremdstoffe, wie dem Neuroleptikum Haloperidol, dem Antidepressivum Imipramin, sowie Nikotin wurde auch die Anreicherung in melaninhaltigen Geweben dokumentiert [Salazar *et al.*, 1976, Uematsu *et al.*, 1990; Mizuno *et al.*, 1993; Gygi *et al.*, 1996 b].

Der Nachweis von insbesondere basischen Fremdstoffen im Haar lässt vermuten, dass Bindungen am überwiegend sauren Melanin und Keratin bei der Einlagerung im Haar eine Rolle spielen. Folgender Mechanismus wird vermutet: Bei den folliculären Melanozyten handelt es sich um stationäre Zellen, die im Kontakt mit dem Blutsystem des Organismus stehen und so die gelösten Fremdstoffe aufnehmen können. Während der gesamten anagenen Wachstumsphase produzieren diese Melanozyten Melanin und transferieren es in den Melanosomen an die Keratinozyten der keratogenen Zone. Durch die Bindung der basischen Fremdstoffe an Melanin wird permanent ein Konzentrationsgradient

aufrechterhalten, der zu einem erhöhten Einstrom dieser Fremdstoffe führt. Da Melanozyten im Gegensatz zu Keratinozyten der Matrixregion ortständig sind, besteht bei chronischer Substanzeinnahme eine kontinuierliche Fremdstoffexposition während der Reifung der Melanosomen [Larsson und Tjälve, 1979 b]. Über den Transfer der Melanosomen an die Keratinozyten aus der Haarmatrixregion können auch die eingelagerten Fremdstoffe in den wachsenden Haarschaft gelangen und so zu einem positiven Haaranalyseergebnis führen, das vom Melaningehalt abhängig ist. Nach der Differenzierung der Matrixzellen, erkennbar an der Dehydratisierung der Zellen, ist die Rückdiffusion der Fremdstoffe in den Blutkreislauf nicht wahrscheinlich und aufgrund des Verschwindens von Zellorganellen und dem Abbau der Nukleinsäuren während des Keratinisierungsvorganges scheiden diese als mögliche Bindungsstellen für Fremdstoffe aus. Die Assoziation von Fremdstoffen im keratinisierten Haar ist nur an Haarproteinen, dem Zellmembrankomplex sowie am Haarpigment möglich. Während die Bindung verschiedener Fremdstoffe an Melanin anhand von *in vitro*-Studien untersucht und bestätigt wurden [Lindquist, 1973; Larsson, 1993; Joseph *et al.*, 1996; Claffey *et al.*, 2001], liegen aus Zellkulturversuchen nur wenige Daten für die Bindung von Fremdstoffen an Haarproteine vor. Im Wesentlichen wären hier die vergleichenden Studien von Borges und Pötsch zu nennen, die sich in ihren Arbeiten mit der Aufnahme von Fremdstoffen in Keratinozyten-Zelllinie und Pigment produzierenden Zellen beschäftigten. Borges und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Arbeit die Aufnahme von Amphetamin und N-Acetylamphetamin in eine immortalisierte humane Keratinozyten-Zelllinie und verglichen sie mit der Pigment produzierenden Zelllinie Melan-A murinen Ursprungs [Borges *et al.*, 2002]. Pötsch und Mitarbeiter verglichen in ihrer Arbeit anhand der Zelllinie HaCaT und der Pigment produzierenden Zelllinie Sk-Mel-1 die Aufnahme von <sup>3</sup>H-Haloperidol in die Zellen [Pötsch *et al.*, 2001].

Die Aufnahme und Akkumulation von Xenobiotika in Zellen wird von verschiedenen Parametern beeinflusst. Die Aufnahme von Fremdstoffen ist hauptsächlich durch die Eigenschaften der Fremdstoffe, unter anderem die Lipophilität ( $\log P_{ow}$ ), dem Ionisierungsgrad der Substanz, der Proteinbindung und der Größe des Moleküls geprägt. Daneben ist das Verhältnis an dissoziierten und

undissoziierten Molekülen bei der Diffusion über die Zellmembran wichtig und ist neben dem pH-Wert entscheidend an der Aufnahme in die Zelle beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Fremdstoffakkumulation im keratinisierten Haar wurden die Testsubstanzen Diazepam, Haloperidol, Imipramin, Morphin und Nikotin aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Parameter verwendet. Wesentliche Parameter dieser Verbindungen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Testsubstanzen	Molekulargewicht	log P <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>
Haloperidol	375,9	4,1	8,3
Imipramin	280,4	2,5	9,5
Nikotin	162,2	0,7	8,0
Diazepam	284,7	3,8	3,4
Morphin	285,3	1,3	8,1

**Tab. 4.1: Physikochemische Parameter der verwendeten Testsubstanzen.**  
[SciFinder, 2004].

Nicht nur bei der Aufnahme der Fremdstoffe spielen pK<sub>a</sub>-Werte eine bedeutsame Rolle, sondern auch bei ihrer Bindung an Biomoleküle. Beim Melanin handelt es sich um ein polyanionisches Polymer mit einem hohen Anteil an negativ geladenen Carboxylgruppen und O-Semichinonen (Ito, 1986; Felix *et al.*, 1992). Bei physiologischen pH-Wert können kationische Fremdstoffe an diesen negativ geladenen Stellen der Melaninpolymere über ionische Bindungen binden [Hubbard *et al.*, 2000]. Auch nicht ionische Bindungen, wie die über van-der-Waals-Bindungen sind an der Bindung der Fremdstoffe im Haar beteiligt [Larsson und Tjälve, 1979 b]. Fremdstoffe mit saurer oder neutraler Ladung können dagegen nur schwach über van-der-Waals-Bindungen an Melanin binden. Für solche Substanzen sind keine Pigment abhängigen Einlagerungen in der Haaranalyse bekannt [Gygi *et al.*, 1997]. Obwohl die Bindung am Melanin ein wichtiger Faktor bei der Einlagerung von Fremdstoffen im Haar ist, gibt es noch die Möglichkeit der Bindung an die Haarproteine. Dies zeigten die Pigment unabhängigen Nachweise von negativ geladenen Substanzen wie THC [Cirimele *et al.*, 1995] und Testosteron [Höld *et al.*, 1999] die auch in unpigmentierten Haaren nachgewiesen wurden.

Für die Simulation der Aufnahme von Fremdstoffen ins Haar und ihrer Akkumulation in der Zelle wurden die Pigment-produzierende Melanomzelllinie B16F1 und die Keratinozytenzelllinie HaCaT genutzt. Aufgrund der Reproduzierbarkeit und der guten Kultivierungseigenschaften eigneten sich die Zelllinien gut für die durchzuführenden Tests. Die HaCaT-Zelllinie wurde als Untersuchungsmodell gewählt, da sie von allen bekannten epidermalen Zelllinien das höchste Differenzierungspotenzial aufweist. HaCaT-Zellen exprimieren bei geringer Zelldichte die Keratine K7, K8, K18 und K19, deren Konzentrationen nach Erreichen der Konfluenz zugunsten eines Anstieges der Keratine K1, K10/11 abnehmen [Boukamp *et al.*, 1988]. Damit ist die Möglichkeit gegeben, die Bindung der untersuchten Fremdstoffe an Keratine abzuschätzen. Borges und Mitarbeiter machten in einer Studie die Beobachtung einer fünffach erhöhten Proteinkonzentrationen in verwendeten Keratinozyten im Vergleich zu Pigment produzierenden Zellen [Borges *et al.*, 2002]. Die von mir nachgewiesene bis zu fünffach höhere Proteinkonzentration in den Keratinozyten im Vergleich zu Melanozyten deuten darauf hin, dass diese Proteine hauptsächlich Keratine darstellen und somit die Proteinbindung der Fremdstoffe an den Keratinen abgeschätzt werden kann.

Ein weiterer Unterschied der Zelllinien ist die Melaninproduktion ausschließlich in B16F1-Zellen, anhand derer die Bindung der Fremdstoffe an Melanin gemessen werden kann. Um die Aufnahme der Fremdstoffe in die Zellen trotz der unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten der beiden Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde die aufgenommenen Fremdstoffe sowohl auf den Proteingehalt der Zellen als auch bei B16F1-Zellen auf die Bindung an Melanin bezogen.

Bei der Inkubation mit den verwendeten Fremdstoffen wurde ein inhibierender Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien beobachtet. Dieser Effekt war bei den Pigment produzierenden B16F1-Zellen am deutlichsten zu erkennen (Abbildung 3.10). Dabei ging der höchste proliferationshemmende Effekt mit 72 % vom Nikotin (100 pmol/ml), der niedrigste mit 27 % vom Haloperidol aus. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Inoue und Mitarbeitern bei der Kultivierung von Melanomzellen mit dem zur Malariaphylaxe eingesetzten Mittel Chloroquin

gemacht [Inoue *et al.*, 1993]. Dagegen wurde bei der Inkubation der HaCaT-Zellen ein zytotoxischer Effekt der verwendeten Fremdstoffe erst in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  festgestellt. Diese konzentrationsbedingten Unterschiede, der zytotoxischen Wirkung in beiden Zelllinien, deuten auf eine höhere Sensitivität der Pigment produzierenden Zellen hin, die möglicherweise mit der Melaninaffinität der Fremdstoffe einhergehen. So zeigte sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit für Nikotin nicht nur eine höhere Bindung an Melanin, Nikotin verursachte auch den höchsten zytotoxischen Effekt auf die Pigment produzierenden Zellen. Dagegen wurde für Haloperidol die geringste Melaninaffinität bei gleichzeitig geringstem zytotoxischem Effekt gemessen. Eine positive Korrelation zwischen Melaninbindung und Zytotoxizität - wie für Nikotin gefunden - deutet daraufhin, dass die wachstumshemmende Wirkung durch die Bindung nicht aufgehoben wird. Dies steht im Widerspruch zu Larsson, der dem Melanin u. a. die Funktion eines schützenden chemischen Filters zuschreibt, wodurch zellschädigende Bestandteile gebunden werden und den Organismus so vor den schädigenden Eigenschaften der Fremdstoffe schützt [Larsson, 1998].

Die vorliegenden Untersuchungen auf zellulärer Ebene zeigten, dass die Aufnahme und Akkumulation der Testsubstanzen in die Keratinozyten schnell erfolgte und sich schnell ein Verteilungsgleichgewicht zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Fremdstoffkonzentration einstellte (Abbildung 3.2 und 3.3). Bereits innerhalb der ersten Minuten der Inkubation erfolgte die Fremdstoffaufnahme in die HaCaT-Zellen und die Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichtes war für alle verwendeten Modellverbindungen innerhalb der ersten Stunden der Inkubation erreicht. Nach Einstellung dieses Gleichgewichts wurden keine Veränderungen der extra- und intrazellulären Fremdstoffkonzentrationen, bis zum Ende der Versuchsdurchführungen nach zehn Tagen, beobachtet. Auch Borges und Mitarbeiter [2002] beobachteten bei der Aufnahme des Fremdstoffs Amphetamin in Keratinozyten das Erreichen einer Gleichgewichtseinstellung innerhalb der ersten Minuten. Pötsch *et al.* [2001] konnten ebenfalls innerhalb der ersten Stunden der Inkubation die schnelle Aufnahme von Haloperidol und eine Gleichgewichtseinstellung in HaCaT-Zellen messen. Sie hatten die Messungen auf einen Zeitraum von vier Wochen ausgedehnt, in diesem Zeitraum änderte sich der Haloperidolgehalt nicht.

Das Ergebnis, der Gleichgewichtseinstellung zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Fremdstoffkonzentration in Keratinozyten, lässt sich mit Beobachtungen unter steady-state Bedingungen beim Menschen [Uematsu *et al.*, 1990; Pragst *et al.*, 1998; Kronstrand *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001] und mit Befunden tierexperimenteller Studien [Gygi *et al.*, 1996 b] in Einklang bringen. In diesen Untersuchungen wurde bei konstanten Fremdstoffkonzentrationen im Plasma eine Korrelation mit der im Haar nachgewiesenen Fremdstoffkonzentrationen festgestellt.

Der Fremdstoffgehalt in den Zellen ergab große Unterschiede. So wurde ca. 80 mal mehr Imipramin als Diazepam in HaCaT-Zellen eingelagert. Der Fremdstoffgehalt in der Zelle korrelierte dabei exakt mit den  $pK_a$ -Werten der einzelnen Fremdstoffe: Imipramin > Haloperidol > Morphin  $\geq$  Nikotin > Diazepam. Eine Korrelation mit der Lipophilität der Substanzen existiert hingegen nicht. So wurde der Fremdstoff Nikotin mit einem hydrophilen Charakter von  $\log P_{ow}$  0,7 ebenso schnell in die Zellen aufgenommen wie Haloperidol mit seinem lipophilen Charakter mit einem  $\log P_{ow}$ -Wert von 4,1. Die Ergebnisse deuten also daraufhin, dass ausschließlich die Bindung an Säuregruppen von Proteinen eine Bedeutung für den Fremdstoffgehalt haben, während unterschiedliche Aufnahmegeschwindigkeiten kaum eine Rolle spielen. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch eine schnelle Bindung der Fremdstoffe an saure Proteine freie Fremdstoffmoleküle dem Cytoplasma entzogen und somit aus dem Gleichgewicht extra- / intrazelluläre Konzentration entfernt werden. Dadurch kann die Diffusion der Fremdstoffmoleküle enorm beschleunigt werden, sodass selbst bei hydrophilen Substanzen die Aufnahme in die Zelle nicht zum limitierenden Faktor wird.

In B16F1-Zellen bestehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten der Fremdstoffbindung, zum einen an die Proteine wie bei den HaCaT-Zellen, zum anderen zusätzlich an den Melanosomen. Durch Abtrennen der Melanosomen konnte die Proteinbindung isoliert betrachtet und mit den Keratinozyten verglichen werden. Beim Vergleich der Bindung der Fremdstoffe an Zellproteine ergaben sich für beide Zelllinien vergleichbare Werte, sowohl absolut als auch hinsichtlich der Reihung: Imipramin > Haloperidol > Nikotin > Morphin >

Diazepam (Tab. 4.2). Die Fremdstoffbindung an Protein hing somit maßgeblich vom jeweiligen  $pK_a$ -Wert der Testsubstanzen (Imipramin:  $pK_a = 9,5$ ; Haloperidol:  $pK_a = 8,3$ ; Morphin:  $pK_a = 8,1$ ; Nikotin:  $pK_a = 8,0$ ; Diazepam:  $pK_a = 3,4$ ) ab. Wird berücksichtigt, dass Keratinozyten weit mehr Protein besitzen als Melanozyten, so wird deutlich, dass die Bindungskapazität der Keratinozyten im Falle von Diazepam und Haloperidol in der selben Größenordnung wie bei den Melanozyten liegt (Tab. 4.2).

Die Fremdstoffe können nicht nur zusätzlich auf der Oberfläche der Melaningranula binden, vielmehr besteht auch die Möglichkeit des Einbaus im Melanin während der Melanogenese. So konnten Larsson und Mitarbeiter mithilfe von i. p. applizierten  $^{14}C$ -markierten Nikotin bei schwangeren Mäusen im retinalen Pigment der Föten fünffach höhere Konzentrationen des Fremdstoffs nachweisen im Vergleich zum mütterlichen Pigment [Larsson *et al.*, 1979 a]. Larsson führte die erhöhte Akkumulation vom Nikotin im Pigment auf die chemische Strukturhomologie zum Indolchinon, einem Zwischenprodukt der Melanogenese, zurück. Damit kann Nikotin bei der Biosynthese von Melanin eingebaut werden, während bei fertig synthetisiertem Melanin ausschließlich eine adsorptive Bindung auf der Melaninoberfläche stattfinden kann. Meine Ergebnisse aus den Versuchen zur Bindung der Fremdstoffe an Melaningranula bestätigten dies. Hier wurden geringere Fremdstoffkonzentrationen an der Oberfläche des fertig synthetisierten Melanins im Vergleich zur Bindung an Melaninen, die während ihrer Synthese mit Nikotin inkubiert wurden, gemessen. Des Weiteren konnte die melaninabhängige Fremdstoffaufnahme / -akkumulation in die Zelllinien auch durch die Versuche mit dem Tyrosinaseinhibitor PTC bestätigt werden. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die mit PTC inkubierten B16F1-Zellen deutlich geringere Konzentrationen der Fremdstoffe Haloperidol und Imipramin aufgenommen hatten, im Vergleich zu den B16F1-Zellen mit uneingeschränkter Melanogeneseaktivität (Abbildung 3.14 und 3.15). Die in den Experimenten festgestellten substanzspezifischen Unterschiede der Fremdstoffaufnahme decken sich im Prinzip mit Erfahrungswerten aus der Haaranalytik, in denen Haare pigmentierter und unpigmentierter Fellareale eines jeweiligen Tieres untersucht wurden, und der Fremdstoffgehalt in den weißen, unpigmentierten Haaren stets geringer war [Dürsch *et al.*, 1995, Gerstenberg *et*

*al.*, 1995, Gleixner *et al.*, 1996, Pötsch *et al.*, 97a und 97c]. Auch bei menschlichen Haaren berichteten Rothe und Mitarbeiter [1997] über deutlich niedrigere Fremdstoffkonzentrationen in weißen Haaren im Vergleich zu pigmenthaltigen Haaren einer Person.

Fremdstoff	Zelllinie B16F1		Zelllinie HaCaT
	Fremdstoff / Melanin	Fremdstoff / Protein	Fremdstoff / Protein
Diazepam	1 ±0,08	0,18 ±0,02	0,11 ±0,009
Morphin	34 ±2,9	0,24 ±0,019	0,15 ±0,02
Nikotin	980 ±88	0,67 ±0,063	0,2 ±0,016
Haloperidol	9 ±1,2	4 ±0,3	1,5 ±0,18
Imipramin	140 ±16	7,4 ±0,82	6,4 ±0,72

**Tab. 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse.** Angaben in pmol Fremdstoff/mg Protein bzw. / mg Melanin; ermittelt im Sättigungsbereich.

Zusätzlich zur Ermittlung des Protein gebundenen Anteils der Fremdstoffe in den Zelllinien wurde bei den Melanogenese aktiven B16F1-Zellen der am Melanin gebundene Fremdstoffanteil ermittelt. Zunächst fällt auf, dass die Melaninbindung weit höher liegt als die Proteinbindung, und zwar um den Faktor  $F=2$  (bei Haloperidol) bis zu  $F=1400$  (bei Nikotin) (Tab.4.2). Im Gegensatz zu den Protein gebundenen Fremdstoffen, ergab sich für die am Melanin gebundenen Fremdstoffe eine andere Verteilung. Die extreme Bindung von Nikotin an Melanin stellt eine Sonderstellung dar. Für die Aufnahme und Bindung von Nikotin im Haar liegen eine Reihe von Studien vor. So konnten Gerstenberg und Mitarbeiter in einer Untersuchung an pigmentierten- und Albino-Ratten, nach systemischer Aufnahme von Nikotin, 20fach höhere Konzentrationen des Fremdstoffes in pigmentierten Fellarealen im Vergleich zu weißen Haaren nachweisen [Gerstenberg *et al.*, 1995]. Stout und Ruth wiesen 1999 in Untersuchungen mit  $^3\text{H}$ -markierten Nikotin den Einbau des Fremdstoffs in Melanosomen von Mäusehaaren nach. In einer weiteren Veröffentlichung wurde für den Fremdstoff Nikotin ebenfalls ein Pigment assoziierter Bezug der Fremdstoffaufnahme in humanen Haarproben berichtet [Uematsu *et al.*, 1995]. In

diesem Fall war der Nikotingehalt in weißen Haaren um ca. 75 % geringer als in schwarzen Haaren. Es wird vermutet, dass diese hohe Affinität in der Strukturhomologie zum Indolchinon begründet ist [Larsson *et al.*, 1979a]. Wird eine Reihenfolge der Melaninaffinität erstellt (Nikotin > Imipramin > Morphin > Diazepam > Haloperidol) so zeigt sich, dass die Melaninbindung nicht mit dem  $pK_a$ -Wert der gebundenen Substanzen korreliert. Möglicherweise spielt hier auch räumliche Strukturen wie für - Nikotin vermutet - eine Rolle.

Im Vergleich zur Aufnahme / Akkumulation in die Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde in den Versuchen mit der B16F1-Zelllinie ebenfalls eine schnelle Aufnahme / Akkumulation der Fremdstoffe in die / den Zellen ermittelt. Bei den Ergebnissen mit den B16F1-Zellen fiel jedoch der zeitliche Verlauf der Fremdstoffaufnahme auf. Im Gegensatz zur Fremdstoffaufnahme in die Zellen der Keratinozytenzelllinie, bei denen eine Gleichgewichtseinstellung bereits nach einer Stunde festgestellt wurde, wurde für die Pigment produzierenden Zellen eine nahezu lineare Aufnahme / Akkumulation der Fremdstoffe über einen Zeitraum von 10 Tagen ermittelt (Abbildung 3.14 und 3.15). In Zellkulturversuchen mit anderen Pigment produzierenden Zelllinien konnte für Haloperidol [Pötsch *et al.*, 2001] und Amphetamin [Borges *et al.*, 2002] ebenfalls eine schnelle Aufnahmen bereits innerhalb der ersten Minuten nachgewiesen werden. Die Untersuchungen von Borges erstreckten sich jedoch nur über einen Zeitraum von vier Stunden, so dass der Einbau der Fremdstoffe während der Melanogenese nicht untersucht werden konnte. Der zeitliche Verlauf der Fremdstoffaufnahme kann auf die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten für die Fremdstoffe in den beiden Zelllinien zurückgeführt werden. Die B16F1-Zellen sind Melanogenese aktive Zellen, die über den Versuchszeitraum (10 Tage) kontinuierlich Pigment produzierten (Abbildung 3.9). Dadurch erhöhte sich die Bindungsmöglichkeiten und somit die Aufnahmekapazität der Zellen für die Fremdstoffe. Möglicherweise ist also im Gegensatz zu Keratinozyten die kontinuierliche Aufnahme / Akkumulation in Melanozyten auf die zeitlich zunehmende Melaninbildung zurückzuführen. Diese Hypothese wird auch dadurch bestätigt, dass in B16F1-Zellen, in denen die Melanogenese inhibiert wurde, die Fremdstoffaufnahme / Akkumulation vergleichbar zu den Keratinozyten verlief. Es wurde eine Sättigung des Fremdstoffgehaltes nach einer Stunde beobachtet.

Das Modell der Inkubation der Zelllinien mit Fremdstoffen erscheint als ein geeignetes *in vitro* Experiment, um die Aufnahmemechanismen in die Zellen zu untersuchen. Bei den Zelllinien handelt es sich um Zellen, die durch ihr permanentes Wachstum gute Voraussetzungen für vergleichende und reproduzierbare Versuchsanordnungen schaffen. Mithilfe dieses Testsystems lassen sich bereits *in vitro* die Aufnahme / Akkumulation unterschiedlicher Testsubstanzen in die Zelle untersuchen. Im Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass es zu unterschiedlichen Aufnahme- / Bindungskapazitäten in den verschiedenen Zelllinien kommt. Die Aufnahmekapazität der Pigment produzierenden Zelllinien lag über der unpigmentierten Keratinozytenzelllinie. Dieses Resultat stimmt mit Befunden aus Experimenten überein, in denen Haare pigmentierter und unpigmentierter Fellareale eines jeweiligen Tieres untersucht wurden, und der Fremdstoffgehalt in den weißen, unpigmentierten Haaren stets geringer war [Dürsch *et al.*, 1995, Gerstenberg *et al.*, 1995, Gleixner *et al.*, 1996, Pötsch *et al.*, 97a und 97c]. Auch bei menschlichen Haaren berichteten Rothe und Mitarbeiter [1997] über deutlich niedrigere Fremdstoffkonzentrationen in weißen Haaren im Vergleich zu pigmenthaltigen Haaren einer Person.

Die *in vivo*-Beobachtungen, der erhöhten Akkumulation basischer Fremdstoffe im Haar im Vergleich zu sauren Substanzen [Pragst *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2001] konnten *in vitro* im Wesentlichen verallgemeinert werden. So war die Bindungskapazität der sauren Substanz Diazepam durchweg sehr gering, sowohl was die Proteinbindung als auch die Melaninbindung anlangt. Auch waren die Bindungsstärken der beiden Substanzen mit den höchsten  $pK_a$ -Werten (Imipramin und Haloperidol) hinsichtlich der Zell- und Proteinbindung in Keratinozyten, sowie der Proteinbindung in B16F1-Zellen am höchsten. Die Bindung an Melaningranula hingegen lag für Diazepam im vergleichbaren Bereich wie für Imipramin und Haloperidol.

Das vorliegende Zellkulturmodell kann hilfreich bei der Erforschung von Aufnahmemechanismen von Fremdstoffen ins Haar sein. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen insbesondere, dass mithilfe von Zelllinien ein qualitativer Vergleich der Akkumulation unterschiedlicher Fremdstoffe möglich wird. Die

Grenzen dieses Modells werden jedoch durch die limitierte Aussagekraft des Kulturmodells im Vergleich zu *in vivo*-Modellen gesetzt, da im vorliegenden Fall keine zellulären Interaktionen zwischen den verwendeten Zelltypen vorlagen, die die Aufnahme ins Haar beeinflussen können. Schon allein die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften und Einbauraten der Zelllinien im Vergleich zum humanen Haarschaft können die Ergebnisse entscheidend beeinflussen.

## 4.2 Zellisolierung aus humaner Kopfhaut / Haarfollikeln

Aus der Einleitung der Arbeit geht das Interesse zur Kultivierung von primären Haut- und Hautanhangszellen, sowohl in der forensischen Medizin, als auch in den Disziplinen der Transplantationsmedizin, und zur Deckung von krankhaften Hautdepigmentierungen (Vitiligo) hervor [Rheinwald und Green, 1975; Falabella *et al.*, 1992; Olsson und Juhlin, 1995]. Des Weiteren werden isolierte Zellen epidermalen Ursprungs für die Züchtung von *in vitro* Hautäquivalenten [Topol *et al.*, 1986; Archambault *et al.*, 1995] genutzt anhand derer Wirkstoffe auf ihre Hautverträglichkeit und Penetrationsgeschwindigkeit getestet werden. In dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit die Haar bildenden Zellpopulationen, sowie die Zellen epidermalen Ursprungs isoliert und kultiviert werden können, um anhand dieser Zellen *in vitro* die Aufnahme- und Bindungsmechanismen von Fremdstoffen ins anagene Haar zu untersuchen. Zu den isolierten Zellpopulationen gehörten:

- die Pigment gebenden Melanozyten oberhalb der dermalen Papille,
- die Keratinozyten und Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide,
- die Melanozytenpopulation der Epidermis.

Zur Isolierung der Melanozyten wurde die von Tobin und Mitarbeiter beschriebene Methode verwendet, die sich in einzelnen Schritten der Isolierung unterschied [Tobin *et al.*, 1995].

Bei der Isolierung der verschiedenen follikulären und epidermalen Melanozytenpopulationen wurden Unterschiede zwischen den Zellpopulationen festgestellt. Die drei Melanozytenpopulationen unterschieden sich in der Pigmentierung, in ihrer Morphologie und in den *in vitro* Wachstumseigenschaften. Bereits in den Färbungen der kryokonservierten

Präparate fielen die stark pigmentierten Melanozyten oberhalb der dermalen Papille auf (Abbildung 3.24). Diese Melanozytenpopulation ist für die natürliche Farbgebung der Haare verantwortlich. Sie transferieren ihre Melanosomen an die Haar bildenden Keratinozyten der keratogenen Zone. Dies erklärt auch den ausgeprägten immunhistologischen Befund mit dem Antikörper HMB45 in dieser Arbeit (Abbildung 3.24). Zur Identifizierung der Melanozyten eigneten sich besonders die Antikörper HMB45 und NKI/beteb mit denen die zelleigenen Melanosomen angefärbt werden [Gown *et al.*, 1986; Holbrook *et al.*, 1989; Medalie *et al.*, 1998]. NKI/beteb und HMB45 erfassen dasselbe prämelanosomale Protein. Mit NKI/beteb wird jedoch auf der zytosolischen Seite der Melanosomen im Stadium I ein etwa 100 kDa großes Epitop erfasst [Vennegoor *et al.*, 1988; Kushimoto *et al.*, 2001]. Mit HMB45 wird in Melanosomen des Stadium II ein 45 kDa großes Fragmente des Epitops erfasst [Watabe *et al.*, 2004]. Auch nach der Isolierung dieser Melanozytenpopulation fiel die starke Pigmentierung der Zellen *in vitro* auf. Diese Melanogenese aktiven Melanozyten des Haarbulbus besitzen mehr Dendriten und produzieren größere Mengen an Melanosomen im Vergleich zu den beiden anderen isolierten Melanozytenpopulationen. Bei der Kultivierung der isolierten Melanozyten fiel ebenfalls die geringe Zellausbeute in der Primärkultur auf (Abbildung 3.25). Dies lässt sich zum einen aufgrund des geringen natürlichen Vorkommens der Melanozyten im humanen Haarschaft gut erklären. Die Versuche, diese Melanozytenpopulation in der Folge umzusetzen und weiter zu kultivieren, misslangen. Auch Tobin und Mitarbeiter verzeichneten eine geringe Proliferationsrate dieser Zellpopulation, die nicht über die dritte Passage hinaus kultiviert werden konnte [Tobin *et al.*, 1995]. Sowohl die geringe, natürlich vorkommende Zellzahl der ortständigen Melanozyten als auch die starke Stoffwechselaktivität, dürften die Ursache für eine terminale Differenzierung dieser Melanozyten sein und damit die proliferative Weiterkultivierung *in vitro* verhindern.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen peripapillären Melanozyten wurde eine weitere folliculäre Melanozytenpopulation aus der Äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel isoliert. Diese Melanozytenpopulation wurde mithilfe des Antikörpers NKI/beteb in immunhistologischen Färbungen identifiziert (Abbildung 3.20). Bereits vor der Isolierung dieser Zellpopulation fielen die

morphologischen Unterschiede zu den peripapillären Melanozyten *in vivo* auf. Die Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide besitzen *in vivo* einen bipolaren Charakter. Die morphologische Erscheinung der Melanozyten wurde auch in Studien an humanen Haarfollikeln beschrieben [Horikawa *et al.*, 1996; Tobin und Bystry, 1996]. Die Rolle dieser amelanotischen Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide ist nicht genau bekannt, aber es wird vermutet, dass es sich hierbei um einen Pool von ruhenden Melanozyten handelt [Staricco, 1963; Tobin *et al.*, 1995; Horikawa *et al.*, 1996]. Ortonne und Cui vermuten, dass im Fall der Vitiligo aus diesem Pool der Melanozytenpopulation die Zellen in die angrenzende Epidermis wandern und für die beobachtete Repigmentierung im Bereich um die Haarfollikel verantwortlich sind [Ortonne *et al.*, 1980; Cui *et al.*; 1991]. Die Tatsache, dass diese Zellen nur mit dem melanosomalen Antikörper NKI/beteb (Abbildung 3.20) und HMB45, nicht mit Melanogenese spezifischen Antikörpern wie den für Tyrosinase angefärbt werden konnten, sprechen für die Annahme, dass es sich hierbei um ruhende Melanozyten mit Melanosomen des Stadium I und II handelt. Bei der Isolierung der ORS-Melanozyten zeigten sich im Vergleich zu den peripapillären Melanozyten aufgrund ihrer guten Proliferation wesentlich bessere Kultivierungseigenschaften. Diese beschriebenen morphologischen Charakteristika der Melanozyten *in vitro* stimmen gut mit dem *in vivo* Erscheinungsbild dieser Zellen überein, in denen diese Melanozyten als ruhende Zellen beschrieben werden. Die Zellen dieser Melanozytenpopulation produzieren *in vitro* wenig Melanin und bilden weniger Dendriten aus (bipolare Morphologie) [Tobin *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2004]. Im Gegensatz zu den Melanozyten oberhalb der dermalen Papille, konnten die Melanozyten der ORS gut weiterkultiviert werden und in der Folge konnte unter geeigneten Kultivierungsbedingungen diese Zellpopulation zur Pigmentierung stimuliert werden (Abbildung 3.23).

Neben den oben beschriebenen Versuchen zur Isolierung und Kultivierung der follikulären Melanozyten wurde zusätzlich die Melanozyten der Epidermis isoliert und kultiviert, um die Wachstumseigenschaften der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen. Bei den epidermalen Primärkulturen fielen gegenüber den follikulären Melanozyten die besseren Wachstumseigenschaften auf. Bei den epidermalen Melanozyten wurden bis zu 20 % höhere Zellausbeuten ermittelt und

beim Passagieren der Zellen ein besseres Ergebnis erzielt (bis 5. Passage). Sowohl bei der Isolierung der folliculären als auch bei den epidermalen Primärkulturen, waren in den Kulturgefäßen neben den Melanozytenpopulationen auch Keratinozyten vorhanden. Nach der Isolierung der Melanozytenpopulationen - spätestens in der 2. Passage - waren keine Keratinozyten mehr in den Kultivierungsgefäßen vorhanden. Nach dem Umsetzen der Zellen fiel die geringe Proliferationsrate der Melanozyten auf. Auch eine Erhöhung der Zellzahl bei der Aussaat zur Proliferationserhöhung, zeigte keinen Erfolg. Aus der Literatur ist bekannt, dass exogene Faktoren der Keratinozyten Einfluss auf das Wachstum der Melanozyten haben [De Luca *et al.*, 1988 a; Nakazawa *et al.*, 1995]. Zu diesen wachstumsfördernden Faktoren zählt unter anderem alpha-MSH [De Luca *et al.*, 1993], bFGF [Halaban *et al.*, 1988 b] und NGF [Yaar *et al.*, 1991]. Das Fehlen der Keratinozyten exponierten Wachstumsfaktoren in der Kultur, sollte durch den Zusatz von Cholera-toxin als alternative Proliferation fördernde Substanz ausgeglichen werden. Diese Maßnahme führte zu keiner vermehrten Proliferation der verwendeten Zellen. Zum Nachweis des Transfers des Melanins von den Melanozyten an die Keratinozyten wurden Kokulturen der beiden Zellpopulationen hergestellt. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden dazu die epidermalen Melanozytenpopulation gemeinsam mit den ORS-Keratinozyten kultiviert. Der Einsatz von ORS-Keratinozyten hat den Vorteil, dass es sich bei den ORS-Zellen um undifferenzierte Keratinozyten handelt. Diese Zellpopulationen der ORS wurden beschrieben als Zellen mit einer hohen Proliferationsrate und Stammzeleigenschaften [Moll, 1995; Rochat *et al.*, 1994]. Die ORS-Zellpopulationen können gut kultiviert werden [Limat *et al.*, 1989; Moll, 1996]. Bei der Kokultivierung der Zellpopulationen mit den Melanozyten der Epidermis und den Keratinozyten der ORS konnten die Melanosomen beladenen Dendriten eindeutig identifiziert werden. In den Keratinozyten konnte die Aufnahme von Melanosomen nachgewiesen werden. In verschiedene Studien wurde der *in vitro* Transfer von Melanin an Keratinozyten dokumentiert [Topol *et al.*, 1986; De Luca *et al.*, 1988 b; Valyi-Nagy *et al.*, 1990; Limat *et al.*, 1999]. Diese Zellpopulationen eignen sich für die Kokultivierung und die Untersuchungen des Transfers von Melanin gebundenen Fremdstoffen.

Für das *in vitro*-Modell zur Einlagerung häufig verwendeter Versuchskemikalien sollten die Pigment bildenden Melanozyten der Matrixregion aus humanen Haarfollikeln isoliert werden. An diesen Melanozyten sollte die Aufnahme in die Zellen, die Bindung an Melanin und der Transfer an isolierte Keratinozyten untersucht werden. Nach der Isolierung der Melanozyten stellte sich heraus, dass sich die Zellen dieser Population aufgrund der geringen Zellzahl und angesichts ihrer geringen Proliferation, nicht für die angestrebten Untersuchungen eigneten. Erfolgreicher für die Untersuchungen erscheint die Anwendung der isolierten und kultivierten epidermalen und ORS-Melanozyten. Der Vorteil der epidermalen Melanozytenpopulation liegt in der Pigmentbildung der Zellen *in vitro*. Die Zellen der ruhenden Melanozytenpopulation der ORS zeichnen sich durch ihre guten Proliferationseigenschaften aus. Nach Applikation von Pigment stimulierenden Faktoren wie TPA, IBMX oder nach UV-Bestrahlung, können diese Zellen vermehrt Pigment produzieren. Dadurch stehen genügend Zellen zur Verfügung, anhand derer die Untersuchungen zur Einlagerung von Fremdstoffen mit isolierten human Kulturen durchgeführt werden können. Für die weiteren Untersuchungen zum Transfer des Melanins eignen sich die Keratinozyten der ORS, die gut kultiviert werden konnten.

Ein großer Vorteil von *in vitro* Modellen, die Zellen humanen Ursprungs verwenden, ist es, dass aus diesen Zellkulturen Rückschlüsse auf das *in vivo* System gewonnen werden können. Die Vorzüge bei derartigen *in vitro* Untersuchungen liegen in ihrer Reproduzierbarkeit unter konstanten Versuchsparametern und der Auswahl definierter Zellpopulationen für diese Versuche. Im übrigen werden dadurch *in vivo* Untersuchungen minimiert, in denen verschiedene Testsubstanzen Tieren appliziert werden. Dagegen werden im vorliegenden Zellkulturmodell nicht die selben Keratine wie im anagenen Haar exprimiert, die mögliche Bindungsstellen für Fremdstoffe liefern.

## 5 Zusammenfassung

In der Forensik sind Haarspuren zur Feststellung von Individualmerkmalen, die Zuordnung zu einer bestimmten Person oder deren Ausschluss als Spurenleger ein aufschlussreiches Untersuchungsmaterial. So kann nicht nur die chemische Belastung des menschlichen Organismus anhand von Haarproben untersucht werden, sondern auch der Nachweis von Drogen oder Medikamenten in Haaren von lebenden Personen oder Verstorbenen geführt werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, von welchen Faktoren die Einlagerung von Fremdstoffen in pigmentierten und unpigmentierten Haaren abhängen. Insbesondere wurde die Hypothese einer erhöhten Akkumulation basischer Fremdstoffe in Pigment produzierenden Zellen anhand der Substanzen Diazepam, Haloperidol, Imipramin, Morphin und Nikotin untersucht. Weiterhin wurde untersucht inwieweit primäre Isolate von Keratinozyten und Melanozyten aus menschlicher Kopfhaut geeignet sein können, um interaktive Untersuchungen beider Zelltypen hinsichtlich von Fremdstoffeinlagerungen zu ermöglichen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Einlagerung von Fremdstoffen an immortalisierten Zelllinien, die den Haarschaft simulieren, vorgenommen. Für die Zellen des keratinisierenden Haarschaftes wurden zum einen die Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet, zum anderen wurden die Pigment produzierenden B16F1-Zellen murinen Ursprungs genutzt, die die Melanozyten des Haarschaftes simulieren.

Die Untersuchungen an HaCaT-Zellen ergaben folgende Ergebnisse:

- Die Aufnahme / Akkumulation der Fremdstoffe erfolgte innerhalb der erste Stunde. Danach war die Sättigungsgrenze erreicht.
- Die Akkumulation der Fremdstoffe und die Bindung an die Zellproteine waren bei Imipramin am Stärksten und bei Diazepam am Schwächsten und unterschieden sich um mehr als eine Zehnerpotenz.
- Die gemessene Menge an Fremdstoff pro Zelle und pro Protein korrelierte mit den  $pK_a$ -Werten der Fremdstoffe, nicht jedoch mit den  $\log P_{ow}$  - Werten. Dies deutet darauf hin, dass die Akkumulation der Fremdstoffe nicht von deren Aufnahme in die Zelle, sondern von deren Proteinbindungsfähigkeit abhängt.

Die Untersuchungen an B16F1-Zellen ergaben folgende Ergebnisse:

- Die Zellen erwiesen sich sensitiv gegenüber den untersuchten Fremdstoffen. So wurde das Wachstum bei untoxischen Konzentrationen in Keratinozyten hier bis zu 70 % gehemmt.
- Die Akkumulation der Fremdstoffe verlief über den untersuchten Zeitraum von 10 Tagen linear, was mit der fortschreitenden Melaninbildung dieser Zellen erklärt werden kann.
- Die Bindung der Fremdstoffe an Melanin war wesentlich stärker als an zelleigenen Proteinen (bis zu  $F=1\ 400$ ).
- Die Proteinbindung war quantitativ vergleichbar mit der Proteinbindung in Keratinozyten. und korrelierte mit der Basizität der Fremdstoffe, nicht aber mit der Lipophilität.
- Die Bindung an Melanin war in der Regel durch basische Fremdstoffe höher als durch den untersuchten sauren Wirkstoff Diazepam. Für die Bindung an Melaningranula traf dies nicht zu.

Insgesamt ergaben sich unterschiedliche Bindungskinetiken der Fremdstoffe in Keratinozyten und Melanozyten resultierend in unterschiedlichen Einlagerungsmechanismen in das weiße und pigmentierte Haar. Es erscheint dringend erforderlich, bei qualitativen Analysen die Haarfarbe zu berücksichtigen. Um zu validen Aussagen der Fremdstoffablagerung im Haar zu kommen, sind weitere Untersuchungen zur Interaktion von Keratinozyten und Melanozyten notwendig.

Als Voraussetzung hierzu wurden im zweiten Teil der Arbeit Zellpopulationen des anagenen Haares isoliert und kultiviert und zwar

- die Pigment bildenden Melanozyten oberhalb der dermalen Papille,
- die Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide und
- die Keratinozyten

Zusätzlich wurde die epidermale Melanozytenpopulation präpariert, um diese mit denen im Haarfollikel vorkommenden Melanozyten zu vergleichen, um die für das *in vitro* Modell best geeigneten Zellen zu ermitteln. Bei der Isolierung der peripapillären Melanozyten, die für die Pigmentierung des Haares verantwortlich sind, wurden nur wenige Zellen gewonnen, die wegen der starken Pigmentierung

nicht weiter kultiviert werden konnten. Aufgrund der Differenzierung dieser Zellpopulationen eigneten sich diese Melanozyten nicht für das angestrebte *in vitro*-Modell. Für die Untersuchungen eignen sich besser epidermale Melanozyten bzw. Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide, die isoliert und kultiviert werden konnten. Die epidermalen Melanozyten konnten gut passagiert werden (bis 5. Passage), die Melanozyten der Äußeren Wurzelscheide zeichneten sich durch ihre guten Proliferationseigenschaften aus. Für die weiteren Untersuchungen zum Transfer des Melanins eignen sich die Keratinozyten der Äußeren Wurzelscheide. Diese Zellpopulationen können die immortalisierten Zelllinien im *in vitro*-Modell ersetzen, an denen die Untersuchungen zur Einlagerung von Fremdstoffen durchgeführt werden können.

## 6 Summary

In forensic medicine, hair analysis is a revealing method for finding individual features, a specific person's assignment or his or her exclusion. By means of hair analysis, evidence of chemical substances in the human organism can be provided. In addition to that, it is possible to furnish proof of legal and illegal drugs in hair. In this study, factors influencing the incorporation of drugs in white and pigmented hair were examined. Especially the hypothesis of enhanced drug accumulation of alkaline chemical compounds in pigment-producing cell lines was tested using diazepam, haloperidol, imipramine, morphine, and nicotine. Furthermore, it was examined if the isolation and cultivation of primary keratinocytes and melanocytes are possible and suitable for measuring interactions of both cell types in respect to drug accumulation.

The first part of the thesis comprises examinations of the incorporation of xenobiotics, which initially were carried out with immortalized cell lines simulating human hair. The human cell line HaCaT was taken to simulate the matrix keratinocytes, whereas the murine pigment-producing cells B16F1 were used to simulate the melanocytes of the human hair.

For HaCat cells the following results were obtained:

- The uptake/accumulation of xenobiotics took place during the first hour. No additional increase was observed thereafter.
- The accumulation of the xenobiotics within the cells as well as their protein-binding capacity differed more than ten-fold. Imipramine showed the highest and diazepam the lowest accumulation / binding activity.
- The xenobiotic content per cell and per protein correlated with the  $pK_a$  values of the xenobiotics but not with their  $\log P_{ow}$  values. This means that accumulation of the drugs did not depend on their uptake through the membrane but on their potency of protein binding.

For B16F1 cells the following results were obtained:

- The cells were more sensitive than HaCaT cells. Growth inhibition up to 70 % was observed in concentrations which were nontoxic in HaCaT cells.
- Xenobiotics were accumulated in a linear way during ten days of incubation.
- The binding of the xenobiotics to melanin within the cell was much stronger than that to proteins (up to 1,400-fold)
- The quantitative protein binding was similar to that in HaCat cells. It correlated with the  $pK_a$  values of the drugs.
- In contrast to the binding to melanin granula the melanin binding within the cell was generally higher by alkaline drugs than by diazepam.

A comparison of HaCat and B16F1 revealed different kinetics of drug binding resulting in different mechanisms of accumulation in pigmented and nonpigmented hairs. As a consequence for hair analysis, pigmentation of the hair has to be considered if quantitative statements on drug consumption are to be made.

To simulate the *in vivo* situation of xenobiotic accumulation in hairs, further examinations in respect to interactions of keratinocytes and melanocytes are required. As a prerequisite for these examinations hair cell populations were isolated and cultivated in the second part of this study, especially

- Pigment-producing melanocytes in the matrix,
- melanocytes of the outer root sheath
- keratinocytes.

In addition, epidermal melanocytes were isolated and compared with the hair follicle melanocyte populations in order to find out the optimal cell population for the *in vitro* model. Only few pigmented melanocytes, which are responsible for the pigmentation of hair, could be isolated. These cells could not be cultivated due to their strong pigmentation. As a result of the differentiation of the cell population, these primary melanocytes were not suitable for the intended *in vitro* model. For further investigation the epidermal melanocytes or rather the ORS-melanocytes were more suitable, since they could be isolated and cultivated. Epidermal melanocytes could be passaged well (5 passages) and the ORS-

melanocytes stood out owing to their good proliferation. The keratinocytes of the ORS are suited for further examinations of the melanin transfer. For the examinations of drug incorporation in the *in vitro* model these isolated primary cell populations are able to replace the immortalized cell line.

## 7 Literatur

Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ (1995): Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1789-1793.

Agin PP, Sayre RM, Chedekel MR (1980): Photodegradation of phaeomelanin: an in vitro model. *Photochem. Photobiol.* **31**, 359-362.

Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA (1995): Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 859-867.

Balabanova S, Buhler G, Schneider E, Boschek HJ, Schneitler H (1992): Nicotine excretion by the apocrine and eccrine sweat in smokers and passive smokers. *Hautarzt.* **43**, 73-76.

Bell M (1967): Ultrastructure of differentiation hair follicles. In: *Advances in Biology of Skin, Hair Growth.* (Montagna W, Dobson RL, Eds.) Vol. 9, Pergamon Press, Oxford, 61-81.

Bhardwaj R, Hadley ME, Dorr RT, Dvorakova K, Brooks C, Blanchard J (2000): Pharmacologic response of a controlled-release PLGA formulation for the alpha-melanocyte stimulating hormone analog, Melanotan-I. *Pharm. Res.* **17**, 593-599.

Bhardwaj R, Luger TA (1994): Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 85-90.

Birbeck MSC, Mercer EH (1957): The electron microscopy of the human hair follicle. Introduction and the hair cortex. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 202-214.

Boissy RE, Nordlund JJ (1997): Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. *Pigment Cell Res.* **10**, 12-24.

Borges CR, Martin SD, Meyer LJ, Wilkins DG, Rollins DE (2002): Influx and efflux of amphetamine and N-acetylamphetamine in keratinocytes, pigmented melanocytes, and nonpigmented melanocytes. *J. Pharm. Sci.* **91**, 1523-1535.

Borges CR, Wilkins DG, Rollins DE (2001): Amphetamine and N-Acetylamphetamine incorporation into hair: an investigation of the potential role of drug basicity in hair color bias. *J. Anal. Toxicol.* **25**, 221-227.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE (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**, 201-214.

Brown DA (2001): Skin pigment enhancers. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 148-161.

Casper JL (1857): *Practisches Handbuch der gerichtlichen Medicin*. Hirschwald, Berlin.

Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M (1998): Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **11**, 206-212.  
Chedekel MR, Zeise L (1988): Sunlight, melanogenesis and radicals in the skin. *Lipids.* **23**, 587-591.

Cirimele V, Kintz P, Mangin P (1995): Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci. Int.* **70**, 175-182.

Claffey DJ, Stout PR, Ruth JA (2001): <sup>3</sup>H-Nicotine, <sup>3</sup>H-Flunitrazepam, and <sup>3</sup>H-Cocaine incorporation into melanin: A model for the examination of drug-melanin interactions. *J. Anal. Toxicol.* **25**, 607-611.

Cone EJ, Hillsgrove MJ, Jenkins AJ, Keenan RM, Darwin WD (1994): Sweat testing for heroin, cocaine, and metabolites. *J. Anal. Toxicol.* **18**, 298-305.

Coulombe PA (1993): The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 17-29.

Courtois M, Loussouanrn G, Hourseau C, Grollier JF (1995): Ageing and hair cycles. *Br. J. Dermatol.* **132**, 86-93.

Cui J, Shen LY, Wang GC (1991): Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 410-416.

De Luca M, D'Anna F, Bondanza S, Franzi AT, Cancedda R (1988 a): Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *J. Cell Biol.* **107**, 1919-1926.

De Luca M, Franzi AT, D'Anna F, Zicca A, Albanese E, Bondanza S, Cancedda R (1988 b): Coculture of human keratinocytes and melanocytes: differentiated melanocytes are physiologically organized in the basal layer of the cultured epithelium. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 176-180.

De Luca M, Siegrist W, Bondanza S, Mathor M, Cancedda R, Eberle AN (1993): Alpha melanocyte stimulating hormone (alpha MSH) stimulates normal human melanocyte growth by binding to high-affinity receptors. *J. Cell Sci.* **105**, 1079-1084.

Diment S, Eidelman M, Rodriguez GM, Orlow SJ (1995): Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 4213-4215.

Dürsch I, Meyer HHD, Karg H (1995): Accumulation of the  $\beta$ -Agonist clenbuterol by pigmented tissues in rat eye and hair of veal calves. *J. Anim. Sci.* **73**, 2050-2053.

Eisinger M, Marko O (1982): Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 2018-2022.

Eller MS, Ostrom K, Gilchrest BA (1996): DNA damage enhances melanogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 1087-1092.

Eser HP, Pötsch L, Skopp G, Moeller MR (1997): Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. *Forensic Sci. Int.* **84**, 271-279.

Falabella R, Escobar C, Borrero I (1992): Treatment of refractory and stable vitiligo by transplantation of in vitro cultured epidermal autografts bearing melanocytes. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 230-236.

Felix CC, Hyde JS, Sarna T and Sealy RC (1978): Interactions of melanin with metal ions: Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3922-3926.

Fidler IJ (1973): Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nat. New Biol.* **242**, 148-149.

Fidler IJ (1975): Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* **35**, 21-24.

Fitzpatrick T, Breathnach A (1963): Das epidermale Melanin-Einheit. *Dermatol. Wochenschr.* **147**, 481-489.

Frenck E, Schellhorn JP (1969): Zur Morphologie der epidermalen Melanineinheit. *Dermatologica*. **139**, 271-277.

Fuller BB, Niekrasz I, Hoganson GE (1990): Down-regulation of tyrosinase mRNA levels in melanoma cells by tumor promoters and by insulin. *Mol. Cell Endocrinol.* **72**, 81-87.

Fuller BB, Spaulding DT, Smith DR (2001): Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. *Exp. Cell Res.* **262**, 197-208.

Furumura M, Sakai C, Abdel-Malek Z, Barsh GS, Hearing VJ (1996) The interaction of agouti signal protein and melanocyte stimulating hormone to regulate melanin formation in mammals. *Pigment Cell Res.* **9**, 191-203.

Gerstenberg B, Schepers G, Voncken P, Völkel H (1995): Nicotine and cotinine accumulation in pigmented and unpigmented rat hair. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 143-148.

Gibbs S, Murli S, De Boer G, Mulder A, Mommaas AM, Ponc M (2000): Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis-effect of ultraviolet radiation and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine on melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **13**, 458-466.

Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA (1991): Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* **9**, 435-445.

Gleixner A, Sauerwein H, Meyer HD (1996): Accumulation of the  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist clenbuterol in calf hair of different pigmentation. *Arch. Lebensmittelhyg.* **47**, 129-152.

Goldblum RW, Goldbaum LR, Piper WN (1954): Barbiturate concentration in the skin and hair of guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* **22**, 121-128.

Gormar FE, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Holzmann H (1990): A new model of epidermal differentiation: induction by mechanical stimulation. *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 22-32.

Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA (1986): Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am. J. Pathol.* **123**, 195-203.

Green SJ, Wilson JF (1996): The effect of hair color on the incorporation of methadone into hair in the rat. *J. Anal. Toxicol.* **20**, 121-123.

Gygi SP, Colon F, Raftogianis RB, Galinsky RE, Wilkins DG, Rollins DE (1996 a): Dose-related distribution of codeine and its metabolites into rat hair. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 282-287.

Gygi SP, Joseph RE, Cone EJ, Wilkins DG, Rollins DE (1996 b): Incorporation of codeine and metabolites into hair. Role of pigmentation. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 495-501.

Gygi SP, Wilkins DG, Rollins DE (1997): A comparison of phenobarbital and codeine incorporation into pigmented and nonpigmented rat hair. *J. Pharm. Sci.* **86**, 209–214.

Hakozaki T, Minwalla L , Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, Greatens A, Hillebrand GG, Bissett DL, Boissy RE (2002): The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br. J. Dermatol.* **147**, 20–31.

Halaban R (2000): The regulation of normal melanocytes proliferation. *Pigment Cell Res.* **13**, 4-14.

Halaban R, Alfano FD (1984): Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes. *In Vitro* **20**, 447-450.

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J (1988 a): Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **548**, 180-190.

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J (1988 b): Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *Cell Biol.* **107**, 1611-1619.

Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrest BA (2000): Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 438-443.

Hara M, Yaar M, Gilchrest BA (1995): Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 744-748.

Harkey MR (1993): Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* **63**, 9-18.

Henderson GL (1993): Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci.* **63**, 19-29.

Hirobe T, Abe H (1999): Genetic and epigenetic control of the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in culture. *Pigment Cell Res.* **12**, 147-163.

Hirobe T, Takeuchi T (1977): Induction of melanogenesis in the epidermal melanoblasts of newborn mouse skin by MSH. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **37**, 79-90.

Hoganson GE, Ledwitz-Rigby F, Davidson RL, Fuller BB (1989): Regulation of tyrosinase mRNA levels in mouse melanoma cell clones by melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP. *Somat. Cell Mol. Genet.* **15**, 255-263.

Holbrook KA, Underwood RA, Vogel AM, Gown AM, Kimball H (1989): The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45. *Anat. Embryol.* **180**, 443-455.

Höld KM, Borges CR, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE (1999): Detection of nandrolone, testosterone, and their esters in rat and human hair samples. *J. Anal. Toxicol.* **23**, 416-423.

Horikawa T, Norris DA, Johnson TW, Zekman T, Dunscomb N, Bennion SD, Jackson RL, Morelli JG (1996). DOPA-negative melanocytes in the outer root sheath of human hair follicles express premelanosomal antigens but not a melanosomal antigen or the melanosome-associated glycoproteins tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. *J. Invest. Dermatol.* **106**, 28-35.

Hubbard DL, Wilkins DG, Rollins DE (2000): The incorporation of cocaine and metabolites into hair: effects of dose and hair pigmentation. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1464-1469.

Hunt G, Kyne S, Ito S, Wakamatsu K, Todd C, Thody AJ (1995): Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res.* **8**, 205-211.

Inoue S, Hasegawa K, Ito S, Wakamatsu K, Fujita K (1993): Antimelanoma activity of chloroquine, an antimalarial agent with high affinity for melanin. *Pigment Cell Res.* **6**, 354-358.

Iozumi K, Hoganson GE, Pennella R, Everett MA, Fuller BB (1993): Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 806-811.

Ishiyama I, Nagai T, Toshida S (1983): Detection of basic drugs (methamphetamine, antidepressants, and nicotine) from human hair. *J. Forensic Sci.* **28**, 380-385.

Ito S (1986): Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim. Biophys. Acta.* **883**, 155–161.

Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H (1993): Spectrophotometric assay of eumelanin in tissue samples. *Anal. Biochem.* **215**, 273-277.

Jimbow K, Gomez PF, Toyofuku K, Chang D, Miura S, Tsujiya H, Park JS (1997): Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res.* **10**, 206-213.

Jimbow K, Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabo G (1976): Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J. Invest. Dermatol.* **67**, 72-89.

Jimbow K, Sugiyama S, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP (1998) In: *The pigmentary system. Physiology and pathophysiology.* (Nordlund BH, King RA, Boissy RE, Eds.) Oxford University Press, New York, 107-114.

Jimbow M, Marusyk H, Jimbow K (1995): The in vivo melanocytotoxicity and depigmenting potency of N-2,4-acetoxyphenyl thioethyl acetamide in the skin and hair. *Br. J. Dermatol.* **133**, 526-536.

Jiménez M, Kameyama K, Maloy WE, Tomita Y (1988): Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 3830-3834.

Jones K, Hughes J, Hong M, Jia Q, Orndorff S (2002): Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res.* **15**, 335-340.

Joseph RE, Su TP, Cone EJ (1996): In vitro binding studies of drugs to hair: influence of melanin and lipids on cocaine binding to caucasoid and africoid hair. *J. Anal. Toxicol.* **20**, 338-344.

Kao CH, Yu HS (1992): Comparison of the effect of 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus UVA (PUVA) on human melanocytes in vitiligo vulgaris and in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **98**, 734-740.

Kijewski H (1993): Die forensische Bedeutung der Mineralstoffgehalte in menschlichen Kopfharen. (Berg S, Brinkmann B, Eds.) Schmidt-Römhild, Lübeck.

Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G, Hearing VJ (1995): Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell Sci.* **108**, 2301-2309.

Köhne A (1996): Zusammensetzung und Metabolismus zellulärer Lipide kultivierter HaCaT-Zellen und normaler Keratinozyten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Korytowski W, Kalyanaraman B, Menon IA, Sarna T, Sealy RC (1986): Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **882**, 145-153.

Kronstrand R, Andersson MC, Ahlner J, Larson G (2001): Incorporation of selegiline metabolites into hair after oral selegiline intake. *J. Anal. Toxicol.* **25**, 594-601.

Kronstrand R, Forstberg-Peterson S, Kagedal B, Ahlner J, Larson G (1999): Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clin. Chem.* **45**, 1485 – 1494.

Kushimoto T, Basur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD, Ferrans VJ, Muller J, Appella E, Hearing VJ (2001): A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10698-10703.

Lademann J, Otberg N, Richter H, Jacobi U, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W (2003): Follicular penetration. An important pathway for topically applied substances. *Hautarzt.* **54**, 321-323.

Lambert J, Onderwater J, Haeghen YV, Vancoillie G Koerten HK, Mommaas AM, Naeyaert JM (1998): Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 835-840.

Larsson B, Olsson S, Szüts T, Ullberg S (1979 a): Incorporation of [<sup>14</sup>C]-nicotine into growing melanin. *Toxicology Letters.* **4**, 199-203.

Larsson B, Tjälve H (1979 b): Studies on the mechanism of drug-binding to melanin. *Biochemical. Pharmacology* **28**, 181-187.

Larsson BS (1993): Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res.* **6**, 127-133.

Larsson BS (1998) The toxicology and pharmacology of melanins. In: *The pigmentary system. Physiology and pathophysiology.* (Nordlund BH, King RA, Boissy RE, Eds.) Oxford University Press, New York, 373-389.

Lerner AB, McGuire JS (1961): Effect of alpha- and beta-melanocyte stimulating hormone on the skin colour of man. *Nature* **189**, 176-179.

Lerner AB, McGuire JS (1964): Melanocyte-stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone. Their relation to pigmentation. *N. Engl. J. Med.* **270**, 539-546.

Levine N, Sheftel SN, Eytan T, Dorr RT, Hadley ME, Weinrach JC, Ertl GA, Toth K, McGee DL, Hruby VJ (1991): Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin. *JAMA* **266**, 2753-2754.

Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K, Noser F (1989): Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 758-762.

Limat A, Salomon D, Carraux P, Saurat JH, Hunziker T (1999): Human melanocytes grown in epidermal equivalents transfer their melanin to follicular outer root sheath keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 325-332.

Lindquist NG (1973): Accumulation of drugs on melanin. *Acta. Radiol.* **325**, 1-92.

Lunec J, Pieron C, Sherbet GV, Thody AJ (1990): Alpha-melanocyte-stimulating-hormone immunoreactivity in melanoma cells. *Pathobiology* **58**, 193-197.

Lyden A, Larsson B, Lindquist NG (1982): Studies on the melanin affinity of haloperidol. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **259**, 230-243.

Madea B, Mußhoff F (2004): *Haaranalytik Technik und Interpretation in Medizin und Strafrecht.* Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Maeda K, Fukuda M (1996): Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 765-769.

Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC (1998): Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139-146.

Medalie DA, Tompkins RG, Morgan JR (1998): Characterization of a composite tissue model that supports clonal growth of human melanocytes in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 810-816.

Mengeaud V, Ortonne JP (1996): PUVA (5-methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **107**, 57-62.

Menter JM, Etemadi AA, Chapman W, Hollins TD, Willis I (1993): In vivo depigmentation by hydroxybenzene derivatives. *Melanoma Res.* **3**, 443-449.

Mizuno A, Uematsu T, Oshima A, Nakamura M, Nakashima M (1993): Analysis of nicotine content of hair for assessing individual cigarette-smoking behavior. *Ther. Drug Monit.* **15**, 99-104.

Moll I (1995): Proliferative potential of different keratinocytes of plucked human hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 14-21.

Moll I (1996): Differential epithelial outgrowth of plucked and microdissected human hair follicles in explant culture. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 604-610.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* **31**, 11-24.

Moyer TP (2002): Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin. Chem.* **48**, 1460-1471.

Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park HY, Gilchrist BA (1991): Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol.* **125**, 297-303.

Nakahara Y, Takahashi K, Kikura R (1995): Hair analysis for drugs of abuse. X. Effect of physicochemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1223-1227.

Nakazawa K, Nakazawa H, Collombel C, Damour O (1995): Keratinocyte extracellular matrix-mediated regulation of normal human melanocyte functions. *Pigment Cell Res.* **8**, 10-18.

Nordlund JJ, Ackles AE, Traynor EF (1981): The proliferative and toxic effects of ultraviolet light and inflammation on epidermal pigment cells. *J. Invest. Dermatol.* **77**, 361-368.

Olsson MJ, Juhlin L (1995): Transplantation of melanocytes in vitiligo. *Br. J. Dermatol.* **132**, 587-591.

Okazaki K, Uzuka M, Morikawa F, Toda K, Seiji M (1976): Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J. Invest. Dermatol.* **67**, 541-547.

Orfanos C, Ruska H (1968): Die Feinstruktur des menschlichen Haares. III Das Haarpigment. Arch. Klin. Exp. Dermatol. **231**, 279-292.

Ortonne JM, Prota G (1993): Hair melanins and hair color: Ultrastructural and biochemical aspects. J. Invest. Dermatol. **101**, 82-89.

Ortonne JP, Schmitt D, Thivolet J (1980): PUVA-induced repigmentation of vitiligo: scanning electron microscopy of hair follicles. J. Invest. Dermatol. **74**, 40-42.

Ozeki H, Ito S, Wakamatsu K, Thody AJ (1996): Spectrophotometric characterisation of eumelanin and pheomelanin in hair. Pigment Cell Res. **9**, 265-270.

Passi S, Nazzaro-Porro M (1981): Molecular basis of substrate and inhibitory specificity of tyrosinase: phenolic compounds. Br. J. Dermatol. **104**, 659-665.

Patil PN (1972): Cocaine-binding by the pigmented and the nonpigmented iris and its relevance to the mydriatic effect. Invest. Ophthalmol. **11**, 739-746.

Pötsch L, Emmerich P, Skopp G (2001): Preliminary approach to elucidate the role of pigment as a binding site for drugs and chemicals in anagen hair: differential uptake of 3H-haloperidol by pigment-producing compared to non-pigment-producing cell lines. Int. J. Legal Med. **116**, 58-61.

Pötsch L, Skopp G (2004): Inkorporation von Fremdsubstanzen. In: Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht. (Madea B, Mußhoff F, Eds.) Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 31-87.

Pötsch L, Skopp G, Eser HP, Moeller MR (1996): Zum Suchtmittelnachweis in Kopfharen. I. Die Abschätzung und Bedeutung des individuellen Haarwachstumsfensters und des intradermalen Abschnittes anagener Haare bei der segmentweisen Haaranalyse. Rechtsmedizin **6**, 156-160.

Pötsch L, Skopp G, Moeller MR (1997 a): Influence of pigmentation on the codeine content of hair fibers in guinea pigs. J. Forensic Sci. **42**, 1095-1098.

Pötsch L, Skopp G, Moeller MR (1997 c): Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation. Forensic Sci. Int. **84**, 25-35.

Pötsch L, Skopp G, Zörntlein S, Becker J (1997 b): Zum Suchtmittelnachweis in Haaren IV. Einfluß der Pigmentierung auf den Ofloxacingehalt in Haaren von Meerschweinchen. Rechtsmedizin **7**, 147-151.

Powell BC, Rogers GE (1990): Hard Keratin IF and associated proteins. In: Cellular and molecular biology of intermediate filaments. (Goldman RD, Steinert PM, Eds.) Plenum Press, New York, 81-146.

Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Spokert F (1998): Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments – a time table of drug exposure? *Forensic Sci. Rev.* **10**, 81-111.

Püschel K, Thomasch P, Arnold W (1983): Opiate levels in Hair. *Forensic Sci. Int.* **21**, 181-186.

Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabo G, Jimbow K (1987): Biology of melanocytes. In: *Dermatology in general medicine.* (Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freeberg IM, Austen KF, Eds.) McGraw-Hill, New York, 224-251.

Reichl FX (2002): *Taschenatlas der Toxikologie. Substanzen, Wirkungen, Umwelt.* Thieme, Stuttgart. 2. Aufl., 148-151,

Reid RW, O'Connor FL, Deakin AG, Ivery DM, Crayton JW (1996): Cocaine and metabolites in human graying hair: pigmentary relationship. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **34**, 685–690.

Rheinwald JG, Green H (1975): Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* **6**, 331-343.

Robbins CR (2002): *Chemical and physysical behavior of human hair.* Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y (1994): Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell.* **76**, 1063-1073.

Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R (1996): Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 28052-28056.

Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Ballotti R (1997): Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**, 635-642.

Rothe M, Pragst F, Thor S, Hunger J (1997): Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects. *Forensic Sci. Int.* **84**, 53-60.

Ryle C, Breitkreuz D, Stark HJ, Leigh I, Steinert P, Roop D und Fusenig NE (1989): Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCat and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*. **40**, 42-54.

Saeki H, Oikawa A (1983): Stimulation by ionophores of tyrosinase activity of mouse melanoma cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* **85**, 423-425.

Salazar M, Rahwan RG, Patil PN (1976): Binding of <sup>14</sup>C-imipramine by pigmented and non-pigmented tissues. *Eur. J. Pharmacol.* **38**, 233-241.

Sarna T, Sealy RC (1984): Free radicals from eumelanins: quantum yields and wavelength dependence. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 574-578.

Sato H, Uematsu T, Yamada K, Nakashima M (1993): Chlorpromazine in human scalp hair as an index of dosage history: comparison with simultaneously measured haloperidol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **44**, 439-444.

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE (1999): Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 343-353.

SciFinder, S & F Scholar (Eds. 2004) American Chemical Society.

Seiji M (1981): Melanosomes. In: *Pigment Cell. Phenotypic expression in pigment cells.* (Seiji M, Eds.) University of Tokyo Press, Tokyo 3-13.

Seiji M, Iwashita S (1965): Intracellular localization of tyrosinase and site of melanin formation in melanocyte. *J. Invest. Dermatol.* **45**, 305-314.

Slawson MH, Wilkins DG, Rollins DE (1998): The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J. Anal. Toxicol.* **22**, 406-413.

Slominski A, Costantino R (1991): Molecular mechanism of tyrosinase regulation by L-dopa in hamster melanoma cells. *Life Sci.* **48**, 2075-2079.

Slominski A, Moellmann G, Kuklinska E, Bomirski A, Pawelek J (1988): Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa. *J. Cell Sci.* **89**, 287-296.

Slominski A, Paus R (1993): Melanogenesis is coupled to murine anagen: toward new concepts for the role of melanocytes and the regulation of melanogenesis in hair growth. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 90-97.

Smith CJ, O'Hare KB, Allen JC (1988): Selective cytotoxicity of hydroquinone for melanocyte-derived cells is mediated by tyrosinase activity but independent of melanin content. *Pigment Cell Res.* **1**, 386-389.

Spritz RA, Strunk KM, Hsieh CL, Sekhon GS, Francke U (1991): Homozygous tyrosinase gene mutation in an American black with tyrosinase-negative (type IA) oculocutaneous albinism. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 318-324.

Staricco RG (1959): Amelanotic melanocytes in the outer sheath of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* **33**, 295-297.

Staricco RG (1963): Amelanotic melanocytes in the outer sheath of the human hair follicle and their role in the repigmentation of regenerated epidermis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **100**, 239-255.

Staricco RJ, Pinkus H (1957): Quantitative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **28**, 33-45.

Steinert PM (1993): Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 729-734.

Stout PR, Ruth JA (1999): Deposition of [<sup>3</sup>H]cocaine, [<sup>3</sup>H]nicotine, and [<sup>3</sup>H]flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 731-735.

Swope VB, Abdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ (1991): Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 180-185.

Szabo G (1959): Quantitative histological investigations on the melanocyte system of human epidermis. In: *Pigment Cell Biology* (Gordon M, Eds.) Academic Press, New York.

Szabo G (1967): Photobiology of melanogenesis: cytological aspects with special reference to differences in racial coloration. In: *Advances in Biology of Skin – The Pigmentary System* (Montagna W, Hu F, Eds.) Vol. 8. Pergamon Press, London.

Tada A, Suzuki I, Im S, Davis MB, Cornelius J, Babcock G, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA (1998): Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth. Differ.* **9**, 575-584.

Theilig C, Bernd A, Ramirez-Bosca A, Gormar FF, Bereiter-Hahn J, Keller-Stanislawski B, Sewell AC, Rietbrock N, Holzmann H (1994): Reactions of

human keratinocytes in vitro after application of nicotine. *Skin Pharmacol.* **7**, 307-315.

Thody AJ, Higgins EM, Walkmatsu K, Ito S, Burchill SA, Marks JM (1991): Phaeomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 340-344.

Thorneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C (2000): Tyrosinase-mediated formation of a reactive quinone from the depigmenting agents, 4-tert-butylphenol and 4-tert-butylcatechol. *Pigment Cell Res.* **13**, 33-38.

Tobin DJ, Bystryn JC (1996): Different populations of melanocytes are present in hair follicles and epidermis. *Pigment Cell Res.* **9**, 304-310.

Tobin DJ, Colen SR, Bystryn JC (1995): Isolation and long-term culture of human hair-follicle melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 86-89.

Topol BM, Haimes HB, Dubertret L, Bell E (1986): Transfer of melanosomes in a skin equivalent model in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 642-647.

Uematsu T, Mizuno A, Nagashima S, Oshima A, Nakamura M (1995): The axial distribution of nicotine content along hair shaft as an indicator of changes in smoking behaviour: evaluation in a smoking-cessation programme with or without the aid of nicotine chewing gum. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **39**, 665-669.

Uematsu T, Sato R, Fujimori O, Nakashima M (1990): Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: a possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. *Arch. Dermatol. Res.* **282**, 120-125.

Valyi-Nagy IT, Murphy GF, Mancianti ML, Whitaker D, Herlyn M (1990): Phenotypes and interactions of human melanocytes and keratinocytes in an epidermal reconstruction model. *Lab. Invest.* **62**, 314-324.

Vennegoor C, Hageman P, Van Nouhuijs H, Ruitter DJ, Calafat J, Ringens PJ, Rumke P (1988): A monoclonal antibody specific for cells of the melanocyte lineage. *Am. J. Pathol.* **130**, 179-192.

Watabe H, Valencia JC, Yasumoto K, Kushimoto T, Ando H, Muller J, Vieira WD, Mizoguchi M, Appella E, Hearing VJ (2004): Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 7971-7981.

Whiting DA (2000): Hair and nail histology. In: *Atlas of hair and nails.* (Hordinsky MK, Sawaya ME, Scher RK, Eds.) Churchill Livingstone, Philadelphia, 10-11.

Williams J, Patsalos PN, Mei Z, Schapel G, Wilson JF, Riebens A (2001): Relation between dosage of carbamazepine and concentration in hair and plasma samples from a compliant inpatient epileptic population. *Ther. Drug Monit.* **23**, 15-20.

Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA (1997): Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vivo. *J. Cell Biol.* **143**, 1899-1918.

Yaar M, Grossman K, Eller M, Gilchrist BA (1991): Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell Biol.* **115**, 821-828.

Zahn H (1988): Das Haar aus Sicht des Chemikers. *Chemie unserer Zeit.* **23**, 141-150.

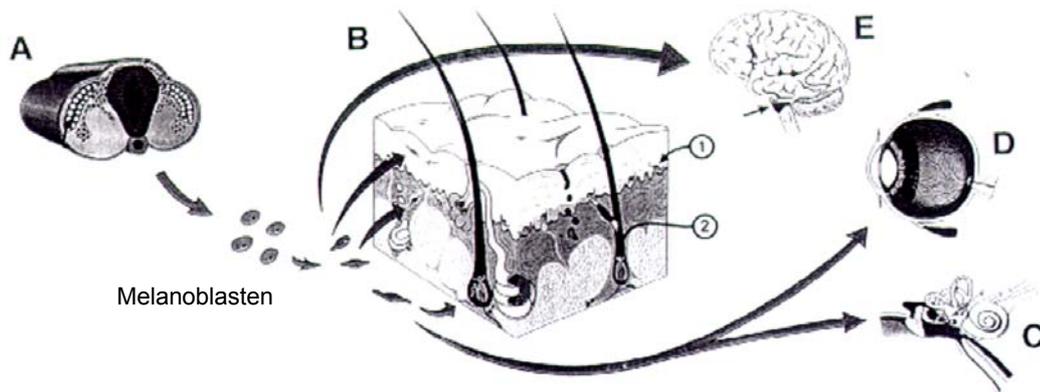
Zhou BK, Boissy RE, Pifko-Hirst S, Moran DJ, Orlow SJ (1993): Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 110-114.

Zhu WY, Zhang RZ, Ma HJ, Wang DG (2004): Isolation and culture of amelanotic melanocytes from human hair follicles. *Pigment Cell Res.* **17**, 668-673.

## 8 Anhang

### 8.1 Melanozyten im Epidermalkomplex

Die Melanoblasten – Vorläufer der Melanozyten - wandern im Laufe des dritten Fetalmonats von der Neuralleiste u. a. in die Epidermis und in die Haarfollikel ein (Abbildung 8.1). In der Haut lagern sich die Melanoblasten in die Basalschicht der Epidermis ein und persistieren dort [Quevedo *et al.*, 1987]. Die Melanozytendichte ist variabel und lokalisationsabhängig. Im Gesicht befinden sich durchschnittlich 1100 – 1500 Melanozyten, die mit ihren Zellausläufern, den Dendriten, ca. 36 benachbarte Keratinozyten je Melanozyt mit Melanosomen versorgen [Fitzpatrick und Breathnach, 1963; Frenck und Schellhorn, 1969]. Die Haut- und Haarpigmentierung soll in erster Linie den Körper vor schädlicher Sonnenstrahlung schützen.

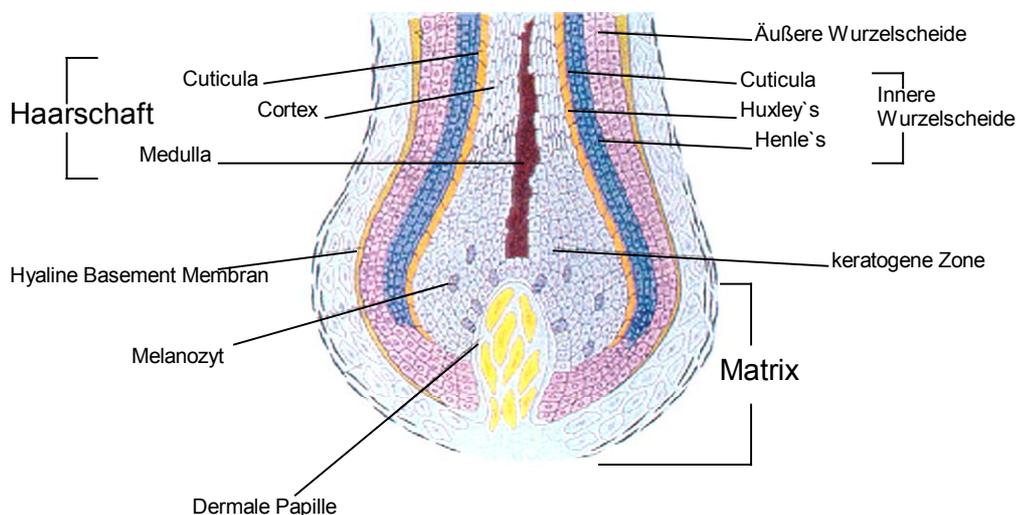


**Abb. 8.1: Gewebslokalisierung der Melanozyten beim Menschen.** Die Melanoblasten wandern während der Embryogenese in die Bestimmungsorte (A-E) ein. A: Neuralleiste, B: Epidermis mit Haarfollikeln 1: epidermale Melanozyten, 2: folliculäre Melanozyten, C: Innenohr (Stria vascularis) D: Auge (Aderhaut) E: Gehirn (Substantia nigra) [Boissy und Nordlund, 1997].

### 8.2 Melanozyten im Haarfollikel

Die Melanozyten im Haarfollikel sind oberhalb der dermalen Papille lokalisiert, transferieren ihre Melanosomen in die vorbei wandernden Keratinozyten und sind für die individuelle Haarfarbe verantwortlich (Abbildung 8.2). Im Haarfollikel beträgt das Verhältnis Melanozyten zu Keratinozyten 1:5 [Bell, 1967]. Die Melanogenese und der Transfer des Melanins in die Keratinozyten dieser

Melanozyten ist an den Haarzyklus (Abschnitt 8.3) gekoppelt und findet in der Wachstumsphase (Anagenphase) des Haarfollikels statt. Die melanogenese aktive Zellpopulation der Melanozyten befinden sich oberhalb der dermalen Papille, im Bereich der keratogenen Zone, in der sich die proliferierenden Keratinozyten befinden. Zusätzlich befinden sich im Haarfollikel im Bereich der äußeren Wurzelscheide Melanozyten mit bipolaren Charakter, die melanogenetisch nicht aktiv sind [Staricco 1959; Horikawa *et al.*, 1996]. Diese können unter UV-Strahlung pigmentieren und in die angrenzende Epidermis wandern [Ortonne *et al.*, 1980].



**Abb. 8.2: Haarfollikel.** Längsschnitt eines Haarfollikels mit Lokalisation der Melanozyten. [nach Whiting, 2000]

### 8.3 Haarzyklus

Das Wachstum menschlicher Kopfhare verläuft zyklisch. Es können drei unterschiedliche Phasen, die Anagen-, Katagen- und Telogenphase unterschieden werden [Courtois *et al.*, 1995].

In der Anagenphase, der Wachstumsphase, die ca. sechs Jahre andauert, befinden sich etwa 80 % der Terminalhaare. Sie wird in sechs Phasen unterteilt. Der Beginn der Anagenphase ist gekennzeichnet durch eine hohe Zellteilung der Stammzellen in der Wulstregion. Im Anschluss wachsen die proliferierenden Epithelien entlang der mesenchymalen Wurzelscheide in Richtung der dermalen Papille. Ab dem dritten Stadium der Anagenphase, in dem ein neuer Bulbus

ausgebildet wird und die endgültige Form des Haarschaftes zu erkennen ist, produzieren die Melanozyten das Haarpigment [Ortonne und Prota, 1993; Slominski und Paus, 1993]. An die Anagenphase schließt sich die Übergangsphase, die Katagenphase an, die nur einige Wochen dauert und in der sich ca. 1 – 2 % der Haare befinden. In dieser Zeit wird die Nährstoffversorgung unterbrochen, die Haarfollikel bilden sich zurück und die Melanogenese erlischt. Die Melanozyten schrumpfen in ihrer Größe und persistieren in einer adendritischen Form. Der kolbenförmige Haarschaft (Kolbenhaar) und die umschließenden Zellen der äußeren Wurzelscheide verhornen vollständig. In der darauf folgenden Telogenphase (ca. 18 – 19 %), die bis zu vier Monate dauert, ist keine Stoffwechselaktivität nachweisbar. Die sich im Zyklus wieder anschließende Anagenphase markiert mit der Induktion eines neuen Haarwachstums und dem Herausschieben des telogenen Haarschaftes aus dem Haarkanal das Ende der Telogenphase.

## 8.4 Keratinisierung

Das keratinisierte Haar ist mit seiner Haarwurzel bis in die Dermis eingebettet und wird von den Haarmatrixzellen, den Trichozyten gebildet. In der Wachstumszone des Haares ist der untere Bereich des Bulbus eingebuchtet und steht im Kontakt mit Blutgefäßen, die die Haarmatrixzellen mit Nährstoffen versorgt. Die im Blutstrom gelösten organischen und anorganischen Fremdstoffe können an dieser Stelle an die Matrixzellen transferiert und in die Zellen des keratinisierten Haares eingelagert werden. Die Keratinozyten haben eine hohe Zellteilungsrate mit einer Proliferationszeit von ca. 12 Stunden und zählen zu den am schnellsten proliferierenden Zellen des Menschen. Während dieser Wachstumsphase nimmt die Länge des Haares um 0,32 – 0,46 mm pro Tag [Pötsch *et al.*, 1996] zu, was einem Längenwachstum von 1,0 – 1,3 cm pro Monat entspricht. Gleichzeitig verlieren die Keratinozyten in dieser Phase des Wachstums Zellkern und Zellwasser (Dehydratisierung) und lagern das Melanin ein. Durch die nachwachsenden Zellen wird das keratinisierte Haar aus dem Haarkanal herausgeschoben. Das keratinisierte Haar besteht zu 65-95 % aus Proteinen, bis zu 9 % aus Lipiden und zu 0,1-5 % aus Melanin [Harkey, 1993].

Die Struktur des Haares wird durch das Skleroprotein  $\alpha$ -Keratin geprägt. Keratine sind die molekularen Bausteine der Intermediärfilamente (IMF) und werden aus bis zu 21 Aminosäuren aufgebaut [Robbins, 2002]. Die Keratinproteine können in zwei Gruppen unterteilt werden: die sauren Typ-I-Keratine und die basischen Typ-II-Keratine [Moll *et al.*, 1982]. Das Keratinfilament besteht aus einem Heteropolymer, das zu gleichen Teilen aus Typ-I und Typ-II-Keratinen besteht [Coulombe, 1993; Steinert, 1993]. Sie werden durch Peptidbindungen zu langen Proteinmolekülen mit Molmassen von 40 - 70 kDa verknüpft. Den größten Anteil der Aminosäuren im Haar stellen die Aminosäuren mit aliphatischen hydrophoben Resten dar. Der isoelektrische Punkt des Haares liegt bei ca. pH 4, was aufgrund der überwiegend negativen Ladungsträger die Einlagerung von organischen und anorganischen Kationen begünstigt. Neben den genannten elektrostatischen Kräften können aber auch Wechselwirkungen wie van-der-Waals Kräfte an der Bindung von Fremdstoffen im Haar beteiligt sein. Man unterscheidet im menschlichen Haar 10 unterschiedliche Keratine mit basischem oder saurem Charakter, die durch parallele Paarbildung zu Dimeren verknüpft sind. Durch den hohen Anteil von Cystein sind die Keratine über die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zu langen Eiweißketten miteinander verbunden, wodurch die Haare ihre Reißfestigkeit erhalten.

Die Haarfarbe beruht auf der Einlagerung der Melaningranula im Haar. Die Melaningranula werden vor allem zwischen den Makrofibrillen im Cortex lokalisiert, wo sie parallel zur Faserachse in Gruppen angeordnet sind. Gelegentlich befinden sich Melaningranula auch in der Endocuticula. Die Dichte der Melaningranula von schwarzen Haaren beträgt  $1,72 \text{ g/cm}^3$  und der Gewichtsanteil am Haar beträgt etwa 3,5 % des Trockengewichtes [Zahn, 1988]. Die Melaningranula bestehen aus einer Proteinmatrix, die die Melanine miteinander vernetzt und zusammenhält. Im Vergleich zu den epidermalen Melaningranula sind die Melaningranula des Cortex größer und kommen auch extrazellulär vor [Orfanos und Ruska, 1968]. Elektronenmikroskopisch lassen sich die Melaningranula anhand der Form und der Größe voneinander unterscheiden. Bei den  $0,35 \times 1,0 \text{ }\mu\text{m}$  großen, ovoiden Granula, die eine regelmäßige, feingekörnte Oberfläche mit einer homogenen Masse aufweist, handelt es sich um Eumelaningranula. Dagegen sind Phaeomelanin enthaltende Granula etwa  $0,2 \times$

0,7  $\mu\text{m}$  groß und ihre Form ist länglich, zum Teil stäbchenförmig und ihre Oberfläche ist unregelmäßig. Diese Granula bestehen aus einer oder mehreren osmiophoben, 20-25  $\mu\text{m}$  breiten Spiralbändern, die von ca. 10 nm schmalen Zwischenschichten voneinander getrennt werden. Die Masse des Endgranulums ist dadurch nicht homogen [Orfanos und Ruska, 1968].

Neben den oben genannten Möglichkeiten der Fremdstoff-Akkumulation an Keratine spielt die Bindung der Xenobiotika an Melanine augenscheinlich eine große Rolle. Auch bei den Melaninpolymeren überwiegen negative Ladungsträger, die die Akkumulation von schwachen Basen gegenüber Säuren begünstigt [Ishiyama *et al.*, 1983].

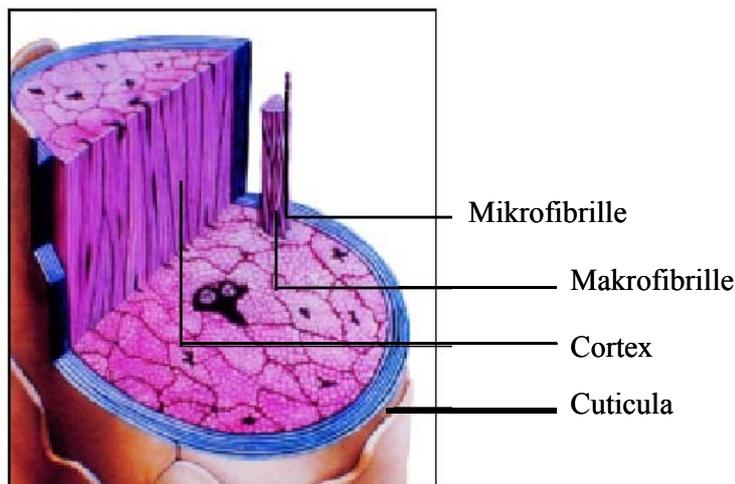
## 8.5 Haaraufbau

Die Haare sind in der Epidermis eingelagerte Anhangsgebilde der Haut. Der ganze Körper ist im Bereich der Felderhaut mit feinen Haaren versehen, die unterschiedlich strukturiert sind. Das keratinisierte Haar, der Haarschaft des Menschen ist in drei konzentrische Regionen gegliedert. Von außen nach innen sind dies: Cuticula, Cortex und Medulla (Abbildung 8.3). Die Cuticula-Zellen bilden die Oberfläche der Haare. Sie sind in einem charakteristischen Schuppenmuster auf der Oberfläche der Haare angeordnet und werden aus 4 – 8 Zellschichten gebildet, die eine Breite von ca. 2-4  $\mu\text{m}$  ausmachen. Sie bieten dem Haar Schutz vor chemischen und physikalischen Einflüssen.

Der Cortex ist die Hauptkomponente (ca. 80 %) des Haares. Die Keratinisierung der Cortexzellen beginnt im Haarbulbus. Der zylindrisch angeordnete Strang besteht aus ca. 60 - 110  $\mu\text{m}$  langen, etwa 3-5  $\mu\text{m}$  dicken spindelförmigen Zellen, die parallel zur Haarrichtung verlaufen. [Zahn, 1988]. Die Zellen des Cortex sind durch einen filamentären Aufbau in fibrilläre Strukturen gekennzeichnet [Birbeck und Mercer, 1957] und geben mit dieser Formgebung dem Haar Festigkeit. Während der Synthese des Haares füllen sich die Räume zwischen den Strukturproteinen aus und werden durch die Oxidation von Thiolgruppen zu einer widerstandsfähigen Struktur vernetzt [Powell und Rogers, 1990]. Innerhalb dieser Zellen liegt das Melanin, das beim Vorbeiwandern an den Melanozyten

aufgenommen wird. Die Cortexzellen selbst bestehen aus langgestreckten Fasern, den Makrofibrillen (Abbildung 8.3), die wiederum aus hunderten miteinander verbundenen Mikrofibrillen bestehen und aus helikal angeordneten Keratinen zusammengesetzt sind. Die Anordnung der hydrophilen Aminosäuren Glutamin und Asparaginsäure nach außen sind für die hohe Wasseraufnahme der Haare von bis zu 30 % des Eigengewichts verantwortlich [Zahn, 1988].

Die Medulla (Markstrang) verleiht der Haarfaser zusätzliche Stabilität und wird vom Cortex durch eine Zona occludens abgetrennt. Sie wird von den oberhalb der Papillenkuppe liegenden Markzellen gebildet, die aus elektronendichtem Material mit dazwischen liegenden Vakuolen bestehen.



**Abb. 8.3: Haarquerschnitt.** Haaraufbau mit Cuticula und Cortex. In der Mitte des Querschnittes befindet sich die Medulla (schwarz).

## 8.6 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AUC	area under curve
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Bovine Serum Albumine
BZE	Benzoyllecgonin
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
CCD-Kamera	Charge Coupled Device-Kamera
CT	Choleratoxin
Cy3	Indocarbocyanin
d	Tag
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	und Mitarbeiter
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
GC / MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie
h	Stunde(n)
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocytes
hEGF	human Epidermal Growth Factor
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal, Applikation in den Bauchraum
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin

---

IMF	Intermediärfilament
IgG	Immunglobulin G
K	Keratin
kDa	Kilodalton
KGM	Keratinocyte Growth Medium
Konz.	Konzentration
L	Liter
M	mol/l
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum Essential Medium
MGF	Mast Cell Growth Factor
MGM	Melanocyte Growth Medium
min	Minute (n)
Mio	Million
MSH	Melanocyte Stimulating Hormon
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Messwerte
N-Ac-4-S-CAP	N-acetyl-4-S-cysteaminylphenol
NEA	Non Essential Aminoacids
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ORS	Outer root sheath
PBS	Phosphate Buffered Saline
PTC	Phenylthiocarbamid
PUVA	Psoralen UVA-Therapie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
SC	Stratum corneum
SDS	Sodiumdodecylsulfate
sec	Sekunde (n)

---

Tab.	Tabelle
TBC	4-Tert-butylcatechol
TBP	4-Tert-butylphenol
TCA	Trichloressigsäure
THC	Tetrahydrocannabinol
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRP	Tyrosinase Related Protein
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
v/v	Prozentangabe Volumen je Volumen

## 8.7 Danksagung

Frau Prof. Dr. I. Witte danke ich recht herzlich für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Danke auch für die vielen interessanten Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft mich mit Rat und Tat zu unterstützen.

Frau Prof. Dr. I. Moll danke ich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. J. Brandner danke ich für die Anregungen und Diskussionen, die am Anfang dieser Arbeit standen und mir halfen aus den Startlöchern zu kommen. Vielen Dank auch für eine immer gute Stimmung, die das Fragen leicht machten.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Zellbiologischen Labors in Hamburg für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt hierbei Sabine Kief, die mich mit der Isolierung der Zellen vertraut gemacht hat und mir bei meiner Arbeit immer unterstützend zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. L. Pötsch für die Möglichkeit im Institut für Rechtsmedizin in Mainz meine Doktorarbeit weiter zu führen und für die Tipps, die mir den Umgang mit der Wissenschaft erleichtert haben.

Herrn Dr. E. Schlichting möchte ich dafür danken, dass er meine Arbeit mehr als einmal Korrektur gelesen hat und für die vielen Denkanstöße, die nicht nur die Arbeit betrafen. Dank auch der gesamten Familie Schlichting die mich nicht nur in ihr Haus aufgenommen hat.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden möchte ich für Ihre Unterstützung und Ihre Geduld danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Julia bedanken, die immer an mich glaubt und mich dadurch immer wieder in meiner Arbeit unterstützt hat. Auch dafür, dass Du diese Zeit mit allen Untiefen mit mir durchquert und durchlebt hast.

## 8.8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Dino Magnani

geboren am: 28.10.1970 in Itzehoe

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

- 1977 – 1981 Grundschule Wallschule, Oldenburg  
1981 – 1983 Orientierungsstufe am Flötenteich, Oldenburg  
1983 – 1987 Realschule im Schulzentrum am Flötenteich,  
Oldenburg  
1987 – 1991 Neues Gymnasium, Oldenburg

### Wehrdienst

- 1991 – 1992 Grundwehrdienst im Panzerbataillon, Oldenburg

### Hochschulbildung

- 1992 – 1995 Grundstudium der Biologie an der Carl von  
Ossietsky Universität, Oldenburg
- 1995 – 1999 Hauptstudium der Biologie an der Carl von Ossietsky Universität,  
Oldenburg  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie und  
Angewandte Biologie
- 1998 – 1999 Diplomarbeit an der Carl von Ossietsky Universität, Oldenburg  
Thema der Arbeit: Zyto- und gentoxische Kombinationswirkungen  
von Kanzerogenen mit nicht gentoxisch wirkenden Chemikalien in  
Säugerzellen
- 1999 – 2001 Beginn der Promotion in der Klinik für Dermatologie und  
Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,  
Arbeitsgruppe Zellbiologie
- seit Okt. 2001 Promotion am Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz  
Thema der Arbeit: Untersuchungen der Fremdstoffbindung in  
permanenten Keratinozyten- und Melanozyten-Zelllinien sowie die  
Eignung von Primärkulturen aus humanen Haarfollikeln zur In-vitro-  
Messung der Fremdstoffaufnahme im Haar

## 8.9 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass diese Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, 20.09.2005

.....

Dino Magnani