



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Entzündungsmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Thaçi

**Auswirkungen von UV-Bestrahlung und Diclofenac auf das
humane epidermale Entgiftungssystem von genetisch
unterschiedlichen Individuen im Hautorgankultur-Modell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Marieke Höhn
aus Lübeck

Lübeck, 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30. September 2020

Für meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	iv
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Die menschliche Haut.....	3
2.1.1 Struktur der menschlichen Haut	3
2.1.2 Die Epidermis.....	4
2.2 Ultraviolette Strahlung	5
2.3 Entgiftungssysteme der Haut	7
2.4 Diclofenac.....	8
2.4.1 Diclofenac und seine Metabolite.....	9
2.5 Apoptose in humaner Haut	10
2.5.1 Die Kaskade der Caspasen	11
2.5.2 Extrinsische und intrinsische Apoptose	11
2.5.3 Caspase 3.....	12
2.5.4 Sonnenbrand-Zellen	14
2.6 Das antioxidative Enzym Katalase	15
2.7 <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>	17
2.8 Das Hitzeschock-System	19
2.8.1 Hitzeschockprotein 70.....	19
2.8.2 Der Hitzeschockprotein 70-Zyklus	19
2.8.3 Hitzeschockprotein 90.....	21
2.8.4 Der Hitzeschockprotein 90-Zyklus	21
2.9 Zielsetzung.....	23
2.9.1 Überblick über das gesamte Projekt.....	23
2.9.2 Ziel dieser Arbeit.....	24
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Geräte	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
3.1.3 Reagenzien	30
3.1.4 Kits	32
3.1.5 Puffer und Lösungen	33
3.1.6 Medien.....	35

3.1.7	Antikörper	36
3.1.8	TaqMan Sonden	37
3.1.9	Software	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Studiendesign	39
3.2.1.1	Ethik	39
3.2.1.2	Probandenpopulation	39
3.2.1.3	Probandenrekrutierung.....	40
3.2.2	Blutentnahme	41
3.2.3	Festlegung des Gen Panels	42
3.2.4	Genetische Charakterisierung und Auswahl der Probanden für die Stanzbiopsien.....	42
3.2.5	Hautbiopsie-Entnahme	43
3.2.6	Hautorgankultur-Modell und Substanzbehandlung	44
3.2.6.1	Kultivierung der Hautbiopsien.....	44
3.2.6.2	Substanzbehandlung	46
3.2.7	mRNA Isolation	48
3.2.8	cDNA Synthese	49
3.2.9	TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	49
3.2.10	Immunhistochemie	50
3.2.10.1	Hämatoxylin/Eosin Färbung	50
3.2.10.2	Immunhistochemische Färbung von Katalase	52
3.2.10.3	Simultane Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67 und TdT-vermitteltes dUTP-biotin <i>nick end labeling</i>	53
3.2.10.4	Immunfluoreszenzfärbung von gespaltener Caspase 3, <i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> , Hitzeschockprotein 70 und 90	55
3.2.11	Statistische Analyse.....	58
3.2.11.1	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	58
3.2.11.2	Immunhistochemie.....	58
3.2.12	Generierung von genetisch definierten immortalisierten Keratinocyten-Zelllinien	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf die Morphologie und die Apoptose der Epidermis	60
4.1.1	UV-Bestrahlung sowie Inkubation mit Diclofenac schädigen die Haut	60
4.1.2	Behandlung mit UV-Licht und mit Diclofenac fördert Apoptose.....	62

4.1.3	Der Apoptosemarker Caspase 3 wird vor allem unter UV-Bestrahlung in der Epidermis gespalten	64
4.2	Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf das Entgiftungssystem der Epidermis ..	66
4.2.1	Die Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase wird durch UV-Bestrahlung herunterreguliert, die Proteinexpression jedoch erhöht	66
4.2.2	Der Transkriptionsfaktor <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> wird sowohl auf Gen- als auch Proteinebene unter UV-Licht und Diclofenac hochreguliert	69
4.2.3	Das Hitzeschockprotein-System wird auf Genebene vor allem durch Diclofenac hochreguliert	72
4.2.4	Die Proteine Hsp70 und 90 werden unter UV-Licht vermehrt und unter Diclofenac-Behandlung vermindert exprimiert	74
4.2.5	Hsp90 zeigt von allen untersuchten Entgiftungsproteinen die stärkste Genregulation	76
5	Diskussion	78
5.1	Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf die Morphologie und die Apoptose der Epidermis	78
5.1.1	Kultivierungsbedingte Morphologische Veränderungen der Epidermis.....	78
5.1.2	Einfluss von UV-Licht auf die Morphologie der Epidermis.....	79
5.1.3	Einfluss von Diclofenac auf die Morphologie der Epidermis.....	80
5.1.4	UV-Strahlung und Inkubation mit Diclofenac fördert die Apoptose.....	81
5.1.5	Der Apoptosemarker Caspase 3 wird vor allem unter UV-Bestrahlung in der Epidermis gespalten	83
5.2	Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf das Entgiftungssystem der Epidermis ..	85
5.2.1	Die Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase wird durch UV-Bestrahlung herunterreguliert, die Proteinexpression jedoch erhöht	85
5.2.2	Der Transkriptionsfaktor <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> wird sowohl auf Gen- als auch Proteinebene unter UV-Licht und Diclofenac hochreguliert	87
5.2.3	Das Hitzeschockprotein-System wird auf Genebene vor allem durch Diclofenac hochreguliert	88
5.3	Fazit und Ausblick.....	90

Anhang	91
Anhang 1: Ethikvotum vom 02.05.2017 (AZ 16-193).....	91
Anhang 2: Check-Liste zur Probandenrekrutierung und zur Überprüfung von Ein- und Ausschlusskriterien, sowie zum Erfassen von persönlichen und epidemiologischen Daten.	92
Anhang 3: Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung für Patienten zur Blut- und Hautprobenentnahme.....	93
Anhang 4: Ergebnisse der mRNA Isolation.	102
Anhang 5: Auswertung der Echtzeit-TaqMan-PCR.....	105
Anhang 6: Auswertung der Immunhistochemischen- und Immunfluoreszenzfärbungen	113
Literaturverzeichnis.....	127
Abkürzungsverzeichnis.....	135
Abbildungsverzeichnis	141
Tabellenverzeichnis	142
Danksagung.....	143

1 Zusammenfassung

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und bildet eine Barriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Die äußerste Schicht der humanen Haut, die Epidermis, ist täglich chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Umso wichtiger ist das Entgiftungssystem in der Epidermis. Dieses unterscheidet sich in der Bevölkerung jedoch individuell durch Einzelnukleotid-Polymorphismen. Diese genetischen Varianten werden in der Toxizitätstestung von Chemikalien (z.B. Kosmetika, Pharmazeutika, Reinigungsmittel) nicht berücksichtigt. Generell gibt es nur wenige Alternativen zu Tierversuchen für die Testung von Produkten hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung auf die menschliche Haut bevor sie an den Konsumenten verkauft werden.

Aus den genannten Gründen wurde zusammen mit den Hamburger Firmen Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH und acCELLerate GmbH, sowie dem Fraunhofer-Institut IME Hamburg, dieses Projekt ins Leben gerufen, um einen zellbasierten Toxizitäts-Assay von genetisch unterschiedlichen Individuen als Hochdurchsatz-System zu entwickeln.

Hierzu wurden 100 männliche Probanden rekrutiert, ihnen Blut abgenommen und dieses Blut genetisch analysiert. Anhand der genetischen Varianten, welche laut Literaturrecherche in mehr als 5% der europäischen Bevölkerung vorkommen, wurden 21 möglichst unterschiedliche Spender ausgewählt und ihnen vier Hautstanzen entnommen. Aus zwei Hautstanzen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein *ex vivo* Hautorgankultur-Modell für 21 Spenderproben etabliert, welches die schädigende Wirkung von zwei Alltagsstressoren [Ultraviolettes (UV)- Licht und Diclofenac repräsentativ für Xenobiotika] auf das Entgiftungssystem der Epidermis zeigt. Hierzu wurden durch Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, sowie Immunhistochemische- und Immunfluoreszenzfärbungen, drei Schlüssel-Detoxifizierungsprozesse untersucht: Antioxidatives Redox-System, *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* (Nrf2)-Phase-2-detoxifizierendes System und Hitzeschockprotein-System.

Es zeigte sich, dass sowohl UV-Licht (300 mJ/cm²) als auch Diclofenac (1 mM) die humane Epidermis schädigen und zu vermehrter Apoptose führen. Unter UV-Licht entstehen 24 Stunden nach Behandlung der Haut charakteristische Sonnenbrand-Zellen und der Apoptosemarker Caspase 3 wird fast ausschließlich durch den Einfluss von UV-Strahlung gespalten. Die Redox-Regulation durch das antioxidative Protein Katalase war innerhalb der Spender sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene sehr unterschiedlich, was ein Hinweis auf

die genetische Diversität sein könnte. Nrf2 ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren und aktiviert antioxidative Enzyme. Trotzdem konnte keine gemeinsame Regulation mit Katalase festgestellt werden. Die Genexpression von Nrf2 wird vor allem durch Diclofenac, die Proteinexpression durch UV-Licht erhöht. Die Hitzeschockproteine 70 (Hsp70) und 90 (Hsp90) zeigen sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene die gleiche Regulation, was für ihr Zusammenspiel unter Einfluss von UV-Licht und Diclofenac spricht. Jedoch ist die Genexpression von Hsp70 und 90, genau wie bei Nrf2, nach Inkubation mit Diclofenac erhöht, die Proteinexpression nach UV-Licht Bestrahlung. Den größten Einfluss hat Diclofenac auf die Genexpression von Hsp90.

Zusätzlich zum Hautorgankultur-Modell wurden aus den anderen beiden Hautstanzen von der Firma acCELLerate GmbH immortalisierte Keratinozyten-Zelllinien hergestellt. Auch diese Zelllinien wurden vor und nach der Immortalisierung hinsichtlich ihrer Entgiftung durch Stressoren getestet. In einem neuen Projekt müssen nun die Ergebnisse der Keratinozyten-Zelllinien direkt mit den Ergebnissen der *ex vivo* Hautmodelle verglichen werden, um festzustellen, wie stark die Aussagekraft der geplanten zellbasierten Toxizitäts-Assays in Bezug auf den Menschen ist.

Dieses Anschlussprojekt wird, neben der Fertigstellung des Toxizitäts-Testsystems, einmalige Einblicke in das Verhalten isolierter Keratinozyten und humaner Organkultur desselben Spenders bieten. Es wird außerdem neue Möglichkeiten zur alternativen Toxizitätstestung bieten, auch hinsichtlich der Vermeidung von Tierversuchen. Diese Doktorarbeit hat hierfür den Grundstein gelegt.

2 Einleitung

In diesem Teil der Arbeit werden der generelle Aufbau der menschlichen Haut, sowie der Einfluss von ultravioletter (UV)-Strahlung, erläutert. Da in dieser Arbeit der Einfluss von Diclofenac auf die Detoxifizierung in der Epidermis untersucht wurde, wird auch auf die Funktionalität des Entgiftungssystems und auf die Wirkung des Medikaments eingegangen. Zudem werden untersuchte Marker für die Aktivierung der Apoptose (mittels gespaltener Caspase 3), die Redox-Regulation (Katalase), die Abwehr von oxidativem Stress (über Nrf2), sowie für das Hitzeschockprotein-System (mittels Hsp70 und Hsp90), näher erklärt.

2.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist mit ca. 2 m² Fläche das größte Organ des Körpers (Fritsch, 2004) und fungiert als biologische Barriere zwischen Organismus und seiner Umwelt und hält dessen Homöostase aufrecht. Es schützt den Organismus vor der Invasion von Pathogenen, chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen, sowie dem Verlust von Wasser und darin gelösten wichtigen Substanzen. Die physische Barriere ist die wichtigste Funktion der Haut (Proksch *et al.*, 2008).

2.1.1 Struktur der menschlichen Haut

Die Haut besteht aus drei Schichten: Der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subkutis (Fettgewebe) (**Abb. 1**).

Die Epidermis ist ein geschichtetes, verhorntes Plattenepithel und besteht zu mehr als 90% aus Keratinozyten. Die Dermis besteht aus einem Fasergeflecht von Bindegewebe. Kollagen und elastische Fasern sorgen für die Elastizität und Festigkeit der Haut. Die unterste Schicht, die Subcutis, besteht aus subkutanem Fettgewebe, welches in Lappchen angeordnet ist (Fritsch, 2004; Proksch *et al.*, 2008).

Die Haut ist zwischen 1,5 und 4 mm dick (ohne Subcutis), abhängig von der anatomischen Lage (Fritsch, 2004).

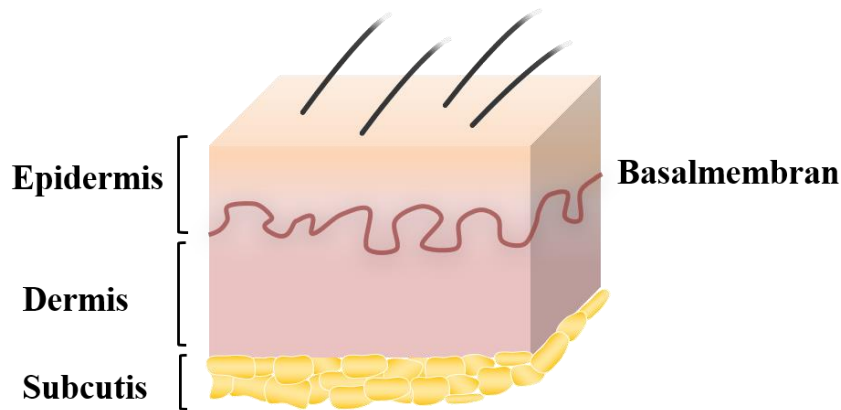


Abbildung 1: Struktur der menschlichen Haut. Die Haut besteht aus drei Hauptschichten: Der Epidermis, der Dermis und der Subcutis. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten und bildet eine physische Barriere zwischen Organismus und Umwelt. Die Dermis ist ein fibroelastisches Bindegewebe und sorgt für die Reißfestigkeit und Dehnbarkeit der Haut. Die unterste Schicht wird als Subcutis bezeichnet und bildet das subkutane Fettgewebe.

2.1.2 Die Epidermis

Wie schon erwähnt sind der Hauptbestandteil der Epidermis Keratinozyten. Sie entstehen durch Mitose von Stammzellen in der untersten Schicht der Epidermis, der Basalschicht (Cotsarelis *et al.*, 1989; Green, 1980). Sie durchwandern die Epidermis und unterstehen dabei einem streng regulierten Differenzierungsprozess. So kommt auch die Struktur der Epidermis zu Stande. Sie besteht aus vier Schichten, welche den Differenzierungsstadien entsprechen (**Abb. 2**): Dem *Stratum basale* (Basalzellschicht), dem *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), dem *Stratum granulosum*, (Körnerschicht) und dem *Stratum corneum* (Hornschicht). Die Zellen besitzen in jeder Schicht besondere morphologische und funktionelle Charakteristika (Fritsch, 2004).

Das *Stratum basale* sitzt der Basalmembran auf, welche die Epidermis von der Dermis trennt. Hier proliferieren Keratinozyten, um die Haut zu regenerieren. Des Weiteren liegen hier auch die Melanozyten, welche Melanin produzieren und dieses an die Keratinozyten abgeben. Melanin ist ein Pigment, das für die Farbe der Haut und der Haare verantwortlich ist. Hauptsächlich dient es dem Schutz vor UV-Strahlung. Im *Stratum spinosum* differenzieren die Keratinozyten weiter, bevor sie im *Stratum graulosum* ausdifferenziert sind. Hier beginnt zudem die Verhornung der Zellen durch die Bildung sogenannter *cornified envelopes* (**Abb. 2**) (Cotsarelis *et al.*, 1989; Green, 1980). Diese bestehen aus einer Protein- und einer Lipidhülle. Die Proteinhülle entsteht durch Quervernetzung spezieller Strukturproteine. Eine Lipidschicht liegt der Proteinhülle auf und bildet gewissermaßen eine Art Zellmembran. Nach Abbau

sämtlicher Zellorganellen, inklusive Zellkern, entsteht am Ende aus Hornzellen das *Stratum corneum*. Sie bildet den Hauptteil der physiologischen Barriere (Proksch *et al.*, 2008).

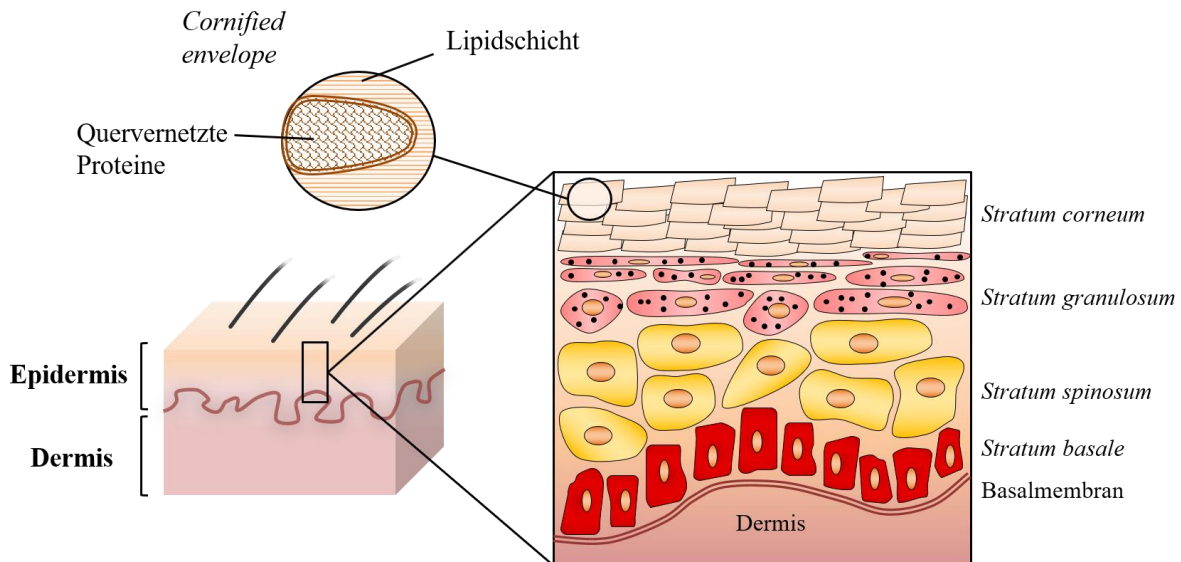


Abbildung 2: Schichten der Epidermis. Die Epidermis besteht aus vier verschiedenen Schichten: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*. Die Epidermis wird durch die Basalmembran von der Dermis getrennt. Keratinozyten proliferieren im *Stratum basale* und differenzieren im *Stratum spinosum*. Sie wandern weiter in das *Stratum granulosum*, wo sie als fertig differenzierte Keratinozyten *cornified envelopes* bilden, die aus Lipiden und quervernetzten Proteinen bestehen. Diese bilden das *Stratum corneum*.

2.2 Ultraviolette Strahlung

Ultraviolettes (UV) Licht ist eine Form von elektromagnetischer Energie und beinhaltet Vakuum UV (100-200 nm), UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) und UVA (320-400 nm) (**Abb. 3**). Vakuum UV (100-200 nm) wird komplett von der Atmosphäre absorbiert und hat somit keinen messbaren biologisch relevanten Einfluss auf die Erde. Auch UVC-Strahlung (200-290 nm) wird absorbiert. Es ist bekannt, dass UVC-Strahlung unter experimentellen Bedingungen verheerende Effekte auf die menschliche Haut haben kann. Auch UVB-Strahlung (290-320 nm) wird teilweise von der Atmosphäre absorbiert. Dennoch kann sie erheblichen Schaden auf und in der menschlichen Haut hervorrufen. UVA-Strahlung penetriert am besten die Atmosphäre, jedoch hat sie einen geringeren Einfluss auf die Hautschädigung als UVB- und UVC-Strahlung (Goldsmith, 1991; Slominski, 1998; Slominski und Wortsman, 2000).

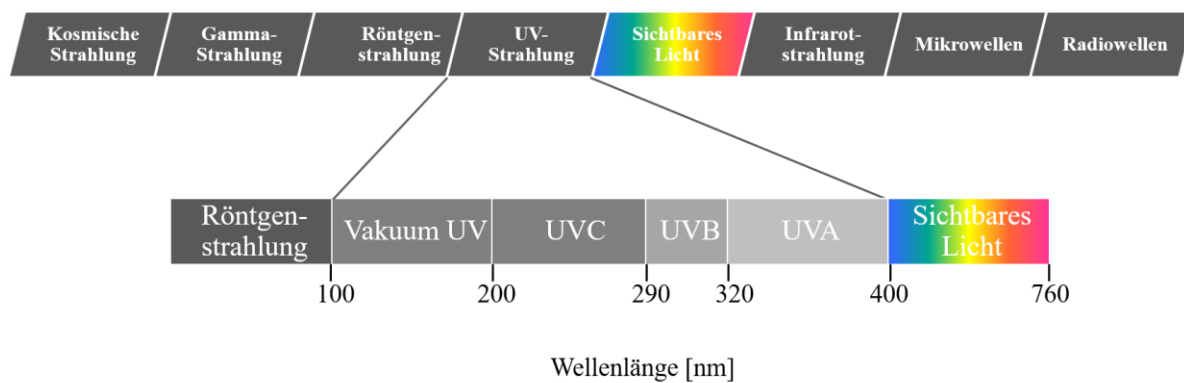


Abbildung 3: Das elektromagnetische Spektrum. Ultraviolette Strahlung (UV) ist eine Form der elektromagnetischen Energie und besteht aus Vakuum UV (100-200 nm), UVC (200-290 nm), UVB (290-320) und UVA (320-400 nm). Vakuum UV- und UVC-Strahlung werden von der Atmosphäre absorbiert, während UVB- und UVA-Strahlung einen Effekt auf die Erde haben. UVC: Kurzwelliges UV-Licht, UVB: Mittelwelliges UV-Licht, UVA: Langwelliges UV-Licht.

In der menschlichen Haut wird UVB-Strahlung hauptsächlich durch das *Stratum corneum* absorbiert. Auch wenn nur ein Bruchteil der Strahlung die Epidermis und auch die Dermis erreicht, sind die Schäden in der Haut jedoch enorm. UVB-Strahlung ist vor allem verantwortlich für die Entstehung von Sonnenbränden und Hautkrebs und reagiert vornehmlich mit Keratinozyten der Epidermis (Berneburg *et al.*, 2000). UVA-Strahlung hingegen penetriert tiefer als UVB-Strahlung und ca. 50% der Energie erreichen sogar die Dermis. Diese Strahlung interagiert sowohl mit Keratinozyten der Epidermis als auch mit Fibroblasten der Dermis (Berneburg *et al.*, 2000; Bernerd und Asselineau, 1998). Beachtet werden muss hierbei allerdings stets die individuelle Beschaffenheit und Reaktion der Haut. Auch wenn UVA-Strahlung biologisch nicht so aktiv ist wie UVB-Strahlung, trägt sie trotzdem zur Hautreaktion bei. Diese Art von Strahlung wird vor allem für die Hautalterung verantwortlich gemacht (Slominski und Wortsman, 2000).

Melanin-Pigmentierung in der Haut schützt vor schädlicher Strahlung, indem sie UV-Licht absorbiert und dieses in Wärme umwandelt (Fritsch, 2004). Yamaguchi *et al.*, 2006, zeigten, dass stärker pigmentierte Haut weniger anfällig ist für UV-induzierte DNA-Schädigung in der Epidermis im Gegensatz zu nicht so stark pigmentierter Haut. Dies zeigt, dass die Pigmentierung der Haut ein effektiver UV-Filter ist.

2.3 Entgiftungssysteme der Haut

In welchem Ausmaß eine Substanz giftig ist, hängt unter anderem davon ab, in welcher Form die Substanz von den Hautzellen aufgenommen, transportiert, metabolisiert und ausgeschieden wird, sowie von der Aktivierung des zellulären Stresssystems. Der Begriff ADME-Tox beschreibt die Absorption (Aufnahme), Distribution (Transport), den Metabolismus (Verstoffwechslung) und die Elimination (Ausscheidung) und toxischen Eigenschaften (Tox) einer verabreichten Substanz und bildet eine interdisziplinäre Verbindung (Tsaïoun, 2016).

Für die Verstoffwechslung von Medikamenten und Xenobiotika sind Enzyme in zwei verschiedenen Phasen zuständig. **Phase I** Enzyme katalysieren oxidative, reduktive oder Hydrolyse-Reaktionen. Sie fügen funktionelle Gruppen an das Molekül. In **Phase II** werden konjugative Prozesse von Enzymen katalysiert. Hier werden die Moleküle über ihre funktionellen Gruppen an lösliche Moleküle gebunden, um so ausgeschieden zu werden. Die Hauptaufgabe von Phase II Enzymen ist die metabolische Eliminierung und Detoxifizierung.

Das häufigste Enzymsystem in der **Phase I** ist Cytochrom P450 (CYP). Seine Aufgabe besteht darin, polare funktionelle Gruppen in nicht polare umzuwandeln. CYP sind oxidative Enzyme, welche eine Häm-Gruppe besitzen. Hier binden und aktivieren sie Sauerstoff. Das abzubauenende Substrat wird im aktiven Zentrum der CYP gebunden, um Sauerstoff zu übertragen. Als Reduktionsmittel dient oftmals Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH).

Wichtige **Phase II** Enzyme sind UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT) und Glutathion S-Transferasen (GST). Sie werden auch in humaner Epidermis exprimiert (Manevski *et al.*, 2015).

Diese Biotransformation ist notwendig, damit potenziell schädliche und nicht ausscheidbare Stoffe aus dem Körper gelangen und somit unschädlich gemacht werden können. Phase 2 Enzyme werden vor allem durch Umweltfaktoren aktiviert (z.B. UV-Strahlung) (Piao *et al.*, 2012).

Somit besitzt die Haut ein einzigartiges und effizientes Detoxifizierungssystem, welches aus einer Vielzahl an Proteinen und Enzymen besteht. Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten schützt die Haut vor schädigenden Faktoren.

2.4 Diclofenac

Diclofenac ist ein nichtsteroidales antiinflammatorisches Medikament (NSAID), welches entzündungshemmend und schmerzstillend wirkt. Es ist ein kleines Molekül, sodass es schnell durch die Haut diffundieren kann. Es agiert als Cyclooxygenase-Inhibitor und verhindert so, dass Arachidonsäure metabolisiert wird. Metabolite der Arachidonsäure sind Prostaglandine und vermitteln u.a. Entzündungs- und Schmerzprozesse. Sowohl Cyclooxygenase-1 als auch -2 (COX-1/-2) werden durch Diclofenac inhibiert (**Abb. 4**). COX-1 wird in allen Geweben exprimiert, während COX-2 unter physiologischen Bedingungen kaum detektierbar ist. Es wird hochreguliert, sobald eine Verletzung entsteht (Zacher *et al.*, 2008).

Des Weiteren gehört Diclofenac zu den sogenannten DILI-Substanzen (*drug-induced liver injury*) (Teschke, 2018). Diese Art von Substanzen können bzw. führen zu Leberschädigung. Es wird vermutet, dass reaktive Metabolite des Wirkstoffs direkt mit den Leberzellen interagieren und oxidativen Stress auslösen (HoltundJu, 2006; Usui *et al.*, 2009). Hier wird u.a. durch Schädigung der Mitochondrien die intrinsische Apoptose und die *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* (Nrf2) gekoppelte Stressantwort initiiert (Fredriksson *et al.*, 2014). Die Zytotoxizität korreliert mit der Bildung von Diclofenac-Metaboliten (u.a. 5-Hydroxydiclofenac) (Bort *et al.*, 1999). Durch die direkte Leberschädigung werden auch Immunzellen aktiviert, welche Entzündungsprozesse aktivieren. Wie aber genau das Medikament dies bewirkt ist noch unklar (Holt und Ju, 2006; Usui *et al.*, 2009).

Oftmals wird die Reaktion auf Medikamente von Hautausschlag und Juckreiz begleitet. Bei 12% bzw. 14% aller DILI-Patienten wurde ein Hautausschlag bzw. Juckreiz beobachtet (Takikawa *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass DILI-assoziierte Gene nach Behandlung mit Diclofenac in humanen Keratinozyten, sowie in Hepatozyten vermehrt exprimiert werden (Hirashima *et al.*, 2017). DILI und Medikamenten-induzierte Toxizität in der Haut hängen also zusammen.

Diclofenac wird ebenfalls in der Behandlung von aktinischen Keratosen verwendet. Aktinische Keratosen sind Hautveränderungen, die vor allen unter Einfluss von UV-Licht entstehen. Sie zeichnen sich durch unregelmäßige, schuppige und rötliche Stellen aus und zeigen histologisch Hyperkeratosen (Peters und Foster, 1999). Aktinische Keratosen stellen oftmals eine frühe Form von invasiven Plattenepithelkarzinomen dar (Quatresooz *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass Diclofenac proapoptotische Effekte in Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen hat, indem es die Induktion der extrinsischen Apoptose über Liganden des Todesrezeptors verstärkt (Fecker *et al.*, 2010).

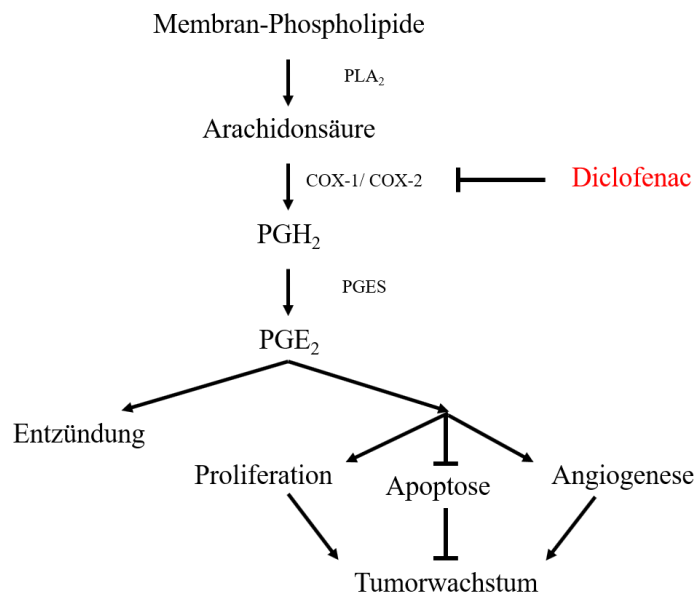


Abbildung 4: Wirkung von Diclofenac. Das Enzym Phospholipase A₂ (PLA₂) katalysiert die Synthese von Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden. Durch Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1/ COX-2) entsteht hieraus Prostaglandin H₂ (PGH₂). Mit Hilfe von Prostaglandin-Synthasen (PGES) werden verschiedene Arten von Prostaglandinen gebildet. Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist für Entzündungsprozesse, sowie Proliferation, Angiogenese und Inhibierung der Apoptose verantwortlich. Dies begünstigt das Tumorstadium. Diclofenac inhibiert COX-1 und COX-2 (Fecker *et al.*, 2007).

2.4.1 Diclofenac und seine Metabolite

Hauptsächlich wird Diclofenac im menschlichen Körper durch CYP3A4 zu 5-OH-Diclofenac und durch CYP2C9 zu 4-OH-Diclofenac in Phase I der Entgiftung hydroxyliert. In Phase II wird Diclofenac hauptsächlich durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) an ein lösliches Molekül gebunden, damit Diclofenac-Acylglucuronide ausgeschieden werden können. Sowohl Phase I als auch Phase II Metabolite können sehr schädlich sein und u.a. zu mitochondrialer Toxizität, Apoptose und Schädigung von Enzymen und Proteinen führen (**Abb. 5**). Proteine wie Diclofenac-Acylglucuronide können Proteine transacylieren oder glykieren (Lazarska *et al.*, 2018; Manevski *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2017).

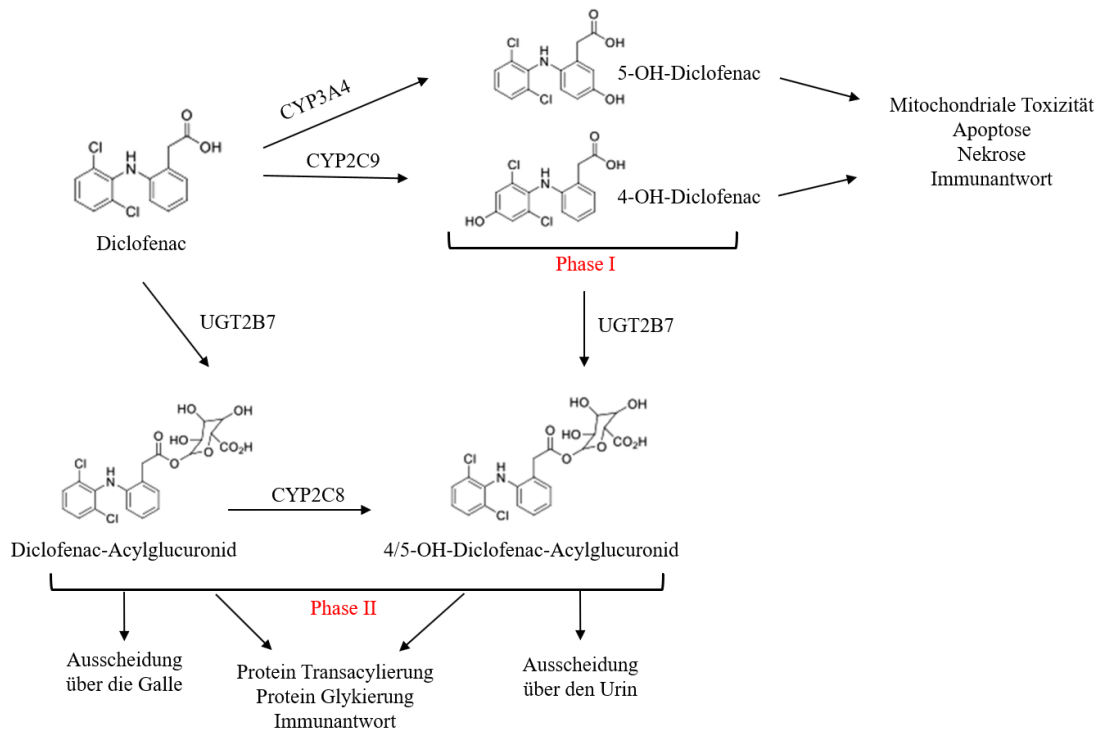


Abbildung 5: Abbau von Diclofenac. Diclofenac wird über Cytochrom P450 (CYP3A4 und CYP2C9) zu 5-OH- bzw. 4-OH-Diclofenac metabolisiert. Diese Metabolite können toxisch wirken, weshalb sie durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) zu Diclofenac-Acylglucuroniden verstoffwechselt werden. Auch diese Metabolite können andere Proteine acylieren oder glykieren und eine Immunantwort auslösen, wenn sie nicht über Galle oder Urin ausgeschieden werden. Modifiziert nach Lazarska *et al.*, 2018; Sarkar *et al.*, 2017.

2.5 Apoptose in humaner Haut

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Dieser erfolgt, um nicht erwünschte Zellen zu eliminieren. Diese Zellen müssen nicht unbedingt schädlich sein. Apoptose findet sowohl in der menschlichen Entwicklung als auch zur Aufrechterhaltung der Homöostase statt. Eine wichtige Rolle spielt die Apoptose jedoch hinsichtlich potenziell maligner Zellen (Elmore, 2007).

Während der Apoptose widerfährt der Zelle eine Reihe morphologischer Veränderungen. Diese Veränderungen sind bei fast allen Zelltypen und Spezies gleich (Hockenbery, 1995). Ein signifikantes Merkmal apoptotischer Zellen ist der kondensierte Nukleus. Außerdem sind apoptotische Zellen geschrumpft und besitzen ein dichtes Zytoplasma. Sie erscheinen als runde oder ovale Masse mit eosinophilem Zytoplasma und dunklen nukleären Chromatinfragmenten.

Die Apoptose verläuft entzündungsfrei, da apoptotische Zellen ihren Inhalt nicht in das umgebene Gewebe abgeben, schnell durch Makrophagen phagozytiert werden und keine antiinflammatorischen Zytokine produzieren. Apoptose kann durch eine Vielzahl von Ereignissen ausgelöst werden, z.B. durch physikalische oder toxische Einflüsse aber auch durch immunologische Mechanismen. Dies geschieht durch unterschiedliche Signalwege, welche am Ende im Signalweg der Apoptose resultieren (Hockenbery, 1995; Kerr *et al.*, 1972; Weedon *et al.*, 1979).

2.5.1 Die Kaskade der Caspasen

Caspasen sind Schlüsselenzyme für die Induktion des programmierten Zelltodes. Sie sind Cystein-Proteasen, welche ihre Substrate nach Aspartat-Resten schneiden. Man unterscheidet generell zwei Klassen von Caspasen: 1. *Upstream* Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) und 2. *Downstream* Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7).

Im inaktivierten Zustand liegen die Effektor-Caspasen in einer Proform (Zymogen) vor. Sie enthalten aminoterminal eine Prodomäne unterschiedlicher Länge, welche wiederum verschiedene Domänen beinhaltet, u.a. für eine Protein-Protein-Interaktion, eine Todes-Effektor-Domäne (*death effector domain*; DED, z.B. Caspase 8), sowie eine Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD, z.B. Caspase 9). Diese Domänen haben zwei Aufgaben: Sie vermitteln die Oligomerisierung von Procaspasen der Klasse 1 und somit die autokatalytische Aktivierung und/oder sie rekrutieren Zymogene der Klasse 2 zum Komplex.

Aktivierte Initiator-Caspasen schneiden Zymogene von Effektor-Caspasen, sodass diese aktiviert werden. Die aktivierten Effektor-Caspasen wiederum spalten Zielproteine und führen somit zum programmierten Zelltod (Kumar, 1999).

2.5.2 Extrinsische und intrinsische Apoptose

Generell müssen zwei Wege der Apoptose unterschieden werden: Der extrinsische Weg und der intrinsische Weg.

Beim **extrinsischen Weg** erfolgt die Aktivierung der Apoptose über einen Todesrezeptor in der Zellmembran (Fas/CD95/APO-1, TNFR1, etc.). Diese Rezeptoren sind alle Mitglieder der *tumor necrosis factor/nerve growth factor*- (TNF/NGF) Rezeptor-Familie und besitzen eine zytoplasmatische Domäne, die sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD). Hier binden Adaptermoleküle, z.B. Fas-assoziierte Proteine mit einer Todesdomäne (*Fas*-

associated death domain, FADD), welche wiederum Initiator-Caspasen rekrutieren (z.B. Procaspase 8) und über DED binden. Procaspase 8 besitzt zwei DED zur Bindung an FADD und zur Oligomerisierung. Durch die Oligomerisierung mehrerer Procaspasen erfolgt eine autokatalytische Spaltung der Prodomänen und somit die Aktivierung der Procaspasen. Die aktivierten Caspasen spalten nun Effektor-Procaspasen (z.B. Procaspase 3) und aktivieren diese wiederum (E. Slee *et al.*, 1999).

Der **intrinsische Weg** erfolgt über die Ausschüttung von Zytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Cytosol durch z.B. DNA-Schädigung oder oxidativen Stress. Zytochrom *c* bindet das Adaptermolekül apoptotische Protease aktivierender Faktor 1 (Apaf1), welches durch Konformationsänderung seine CARD Domäne frei gibt und Procaspase 9 binden kann (E. A. Slee *et al.*, 1999). Mehrere Apaf1-Procaspase 9 Komplexe oligomerisieren, sodass Procaspase 9 autokatalytisch gespalten und aktiviert wird. Caspase 9 kann nun Effektor Caspasen prozessieren (z.B. Procaspase 3) und somit die Zelle zur Apoptose führen (E. A. Slee *et al.*, 1999).

Kontrolliert wird die Caspase-Kaskade von Proteinen der B-Zell Lymphom 2 (Bcl-2) Familie. Bcl-2 und B-Zell Lymphom *extra-large* (Bcl-XL) sind antiapoptotische Proteine und verhindern die Freisetzung von Zytochrom *c* aus den Mitochondrien und verhindern so die Apaf1 vermittelte Aktivierung von Procaspase 9 (**Abb. 6**) (Porter und Jänicke, 1999).

2.5.3 Caspase 3

Caspase 3 ist eine wichtige Effektor-Caspase und wird sowohl über den extrinsischen als auch intrinsischen Weg aktiviert. Sie aktiviert wiederum Caspase 2, 6, 8 und 10. Es besteht außerdem eine positive Rückkopplung zur Caspase 9 (E. A. Slee *et al.*, 1999). Caspase 3 wird außerdem benötigt für die DNA-Fragmentierung und morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose. Sie schneidet und deaktiviert Strukturproteine, die für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des Zytoplasmas und des Nucleus verantwortlich sind (Jänicke *et al.*, 1998). Außerdem hat Caspase 3 einen proapoptotischen Effekt, indem sie Bcl-2 spaltet und somit die Freisetzung von Zytochrom *c* aus den Mitochondrien bewirkt.

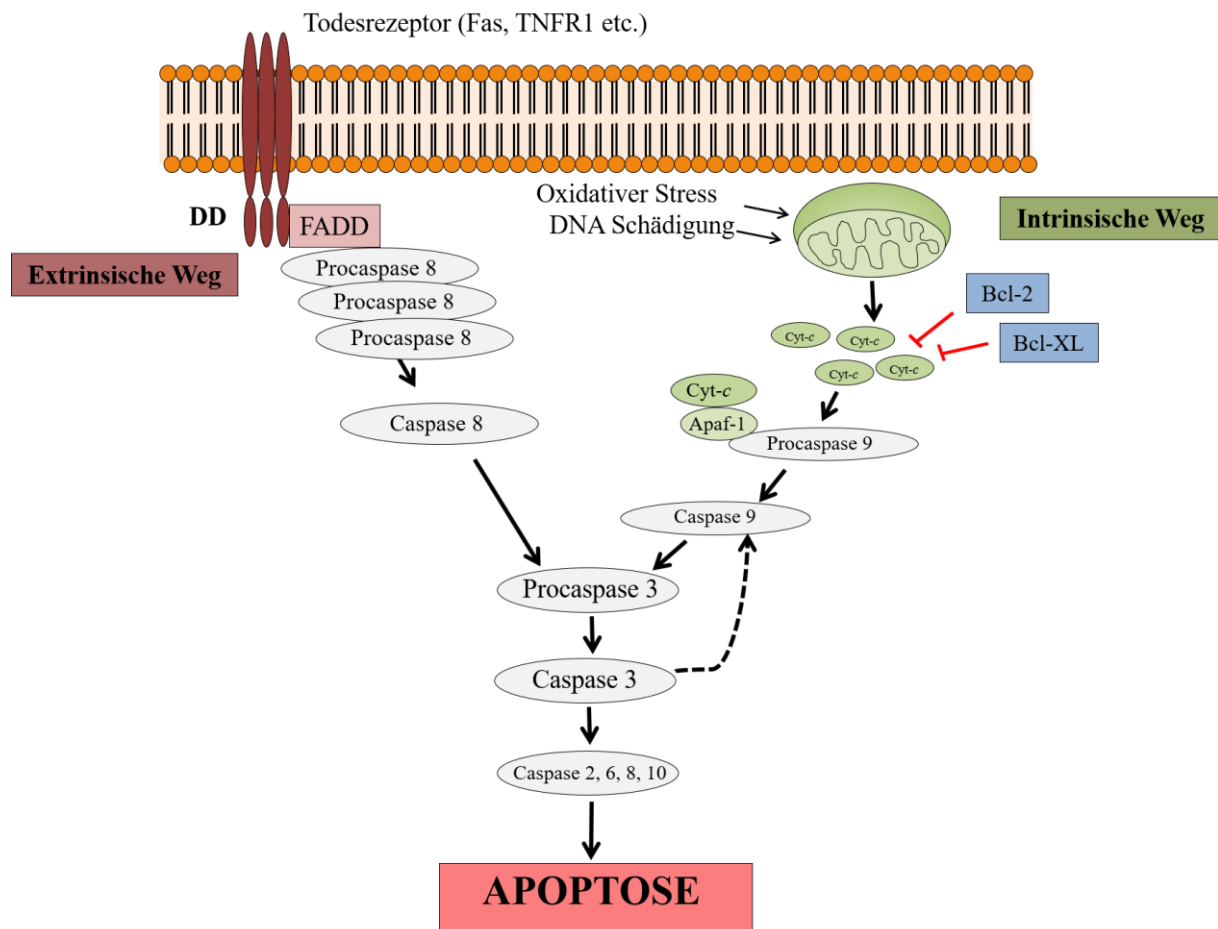


Abbildung 6: Die Kaskade der Caspasen. Apoptose kann durch zwei Wege ausgelöst werden: Dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg wird über Oberflächenrezeptoren mit zytosolischem Anteil, die sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD), ausgelöst. Diese Domäne rekrutiert mit Hilfe des Adaptermoleküls Fas-assoziierte Proteine mit einer Todesdomäne (*Fas-associated death domain* FADD) Procaspase 8, welche durch Oligomerisierung autokatalytisch aktiviert wird. Caspase 8prozessiert die Initiator-Procaspase 3, welche wiederum die Initiator- und Effektor-Caspasen 2, 6, 8 und 10 aktiviert. Der intrinsische Weg wird durch die Ausschüttung von Cytochrom *c* (Cyt *c*) aus den Mitochondrien in das Zytosol ausgelöst. Der apoptotische Protease aktivierender Faktor 1 (Apaf1) hilft Cytochrom *c* Procaspase 9 zu binden und diese autokatalytisch zu spalten. Caspase 9prozessiert wiederum Procaspase 3, um die Apoptose in die Wege zu leiten. B-Zell Lymphom 2 (Bcl-2) und B-Zell Lymphom *extra-large* (Bcl-X_L) sind antiapoptotische Proteine, welche die Ausschüttung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien und somit die Prozessierung von Procaspase 9 verhindern.

2.5.4 Sonnenbrand-Zellen

Histologisch und morphologisch können Sonnenbrand-Zellen (oder *sunburn cells*) als individuelle Keratinozyten, welche durch UV-Schädigung der Haut in die Apoptose gehen, beschrieben werden. Sie stellen eine spezielle Form der Apoptose dar (Daniels *et al.*, 1961; Danno und Horio, 1987).

Sunburn cells zeichnen sich im frühen Stadium durch einen geschrumpften, kondensierten und pyknotischen Zellkern, sowie ein homogenisiertes, verkleinertes und eosinophiles Zytoplasma aus. Im späten Stadium erfolgt die Fragmentierung des Nukleus und die Vakuolisierung des Zytoplasmas, sowie der Verlust von Desmosomen (Daniels *et al.*, 1961; Danno und Horio, 1987; G Murphy *et al.*, 2001). Diese Merkmale können sehr leicht mit einer Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung nachgewiesen werden (**Abb. 7**).

Vor allem durch UV-Strahlung und die dadurch resultierende Schädigung der DNA entstehen diese apoptotischen Zellen. Somit wird die Bildung von potenziell malignen Zellen verhindert. Sowohl UVA- als auch UVB- und UVC-Strahlung können Sonnenbrand-Zellen hervorrufen, wobei UVB-Licht aufgrund seiner Wellenlänge am effektivsten ist (G Murphy *et al.*, 2001).

Die genauen Signalwege, welche zur Bildung von Sonnenbrand-Zellen führen, sind noch nicht geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich Zellen in den individuellen Zelltod gehen, die nicht mehr in der Lage sind, ihre geschädigte DNA zu reparieren (Brenner und Gschnait, 1979). Außerdem spielen auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Sonnenbrand-Zellen (Miyachi *et al.*, 1983).

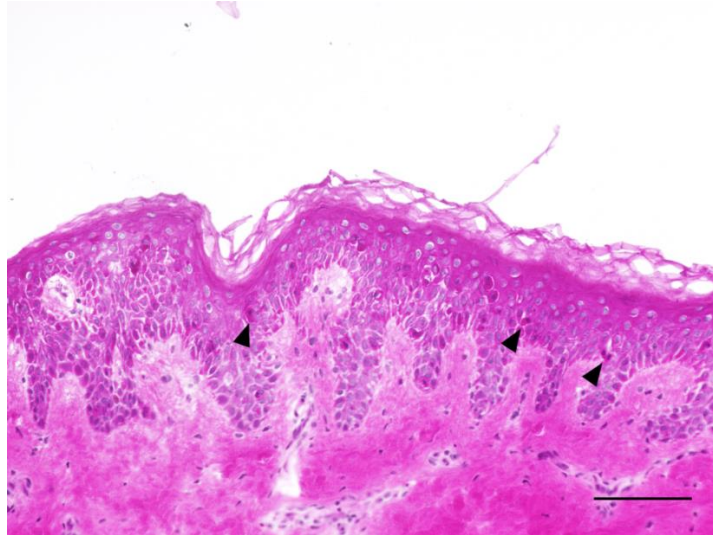


Abbildung 7: Sonnenbrand-Zellen in der Epidermis. Die Epidermis wurde mit 300 mJ/cm^2 ultraviolettem Licht bestrahlt. Die Pfeile deuten auf Sonnenbrand-Zellen, welche sich durch einen pyknotischen Zellkern, sowie homogenisiertes, eosinophiles Zytoplasma auszeichnen. Skala = $100 \mu\text{m}$.

2.6 Das antioxidative Enzym Katalase

Katalase ist ein wichtiges Häm-enthaltendes Enzym, welches die Zelle vor dem toxischen Einfluss von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) schützt. H_2O_2 entsteht z.B. bei „normalen“ Prozessen in der Zelle. Molekularer Sauerstoff (O_2) wird in den Mitochondrien zu Wasser (H_2O) reduziert. Es kann jedoch passieren, dass auch ein Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) entsteht und nicht neutralisiert wird. Diese ROS sind für Zellen äußerst gefährlich, da sie u.a. die DNA schädigen können. Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) wandelt das Radikal in H_2O_2 um (**Abb. 8a**). Nun kann Katalase H_2O_2 neutralisieren, indem ein Sauerstoffmolekül mit der Häm-Gruppe reagiert und ein Doppelstrangbruch zwischen den beiden Sauerstoffmolekülen des Wasserstoffperoxids erzeugt wird. Ein zweites H_2O_2 -Molekül dient als Reduktionsmittel, sodass Wasser und molekularer Sauerstoff entstehen und Katalase wieder in seiner Ausgangsform vorliegt (**Abb. 8b**) (Goyal und Basak, 2010; Sancho *et al.*, 2003; Sepasi Tehrani und Moosavi-Movahedi, 2018).

Nicht nur bei regulären zellulären Prozessen entsteht H_2O_2 , sondern auch durch oxidativen Stress, ausgelöst z.B. von UV-Strahlung durch Generierung von ROS.

Somit schützt Katalase als direktes antiapoptotisches Protein vor Apoptose und Mutagenese. Unter besonderen Umständen kann Katalase jedoch auch indirekt als proapoptotisches Protein fungieren, indem es Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) inhibiert und über

die Ausschüttung von Zytocrom *c* aus den Mitochondrien Caspase 3 aktiviert (Sancho *et al.*, 2003). In humanen Geweben ist die Katalase-Aktivität in der Leber und in Erythrozyten am höchsten. Da die Haut die erste Schutzbarriere des Körpers bildet, ist Katalase natürlich auch hier vorhanden.

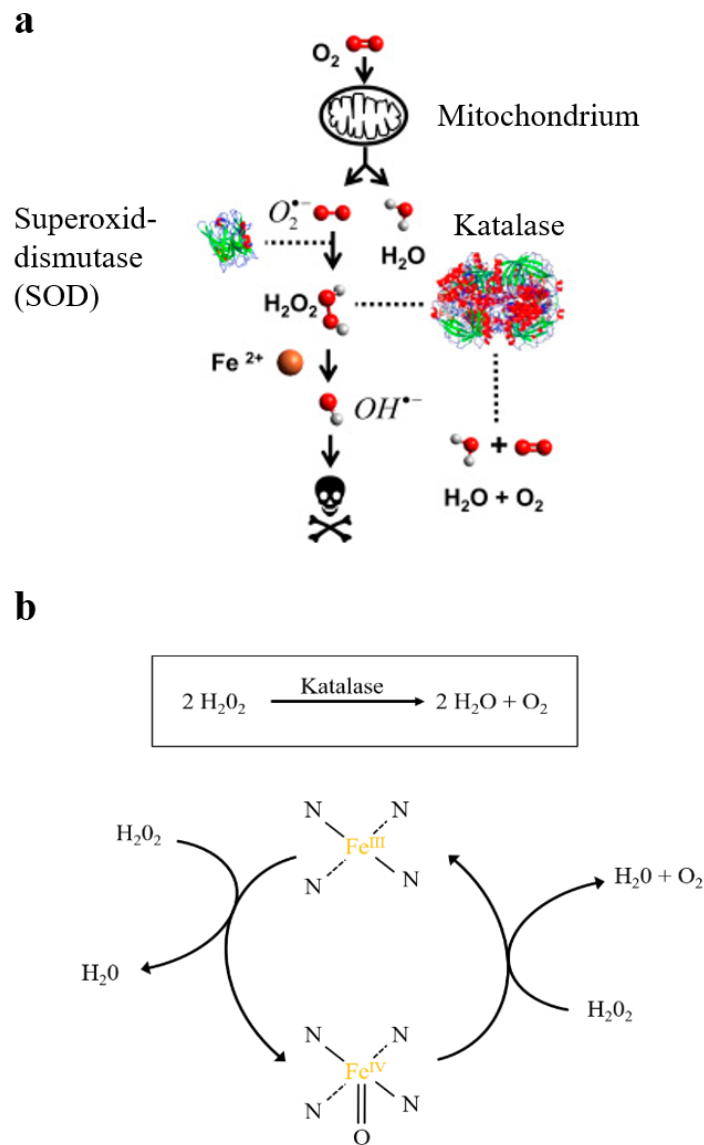


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Entstehung von Sauerstoffradikalen, sowie die Neutralisation von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Katalase. (a) Sauerstoff (O_2) wird in den Mitochondrien abgebaut und verwertet. Dabei kann es passieren, dass ein Sauerstoffradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) „entwischt“. Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt dieses Radikal in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. Würde Katalase nicht agieren und H_2O_2 in Wasser (H_2O) und O_2 spalten, würde dies den Tod der Zelle bedeuten, da H_2O_2 verheerende Schäden anrichten kann (Sepasi Tehrani und Moosavi-Movahedi, 2018). (b) Katalase ist ein Enzym, welches eine Häm-Gruppe mit einem Eisen-Ion als Zentralatom enthält (Fe^{III}). Das Eisenion der Häm-Gruppe reagiert mit einem Sauerstoffmolekül von H_2O_2 und bildet ein Zwischenprodukt, sowie H_2O . Damit Katalase wieder in seinen Ausgangszustand zurück gelangt, ist ein zweites H_2O_2 -Molekül nötig. Dieses dient als Reduktionsmittel und es entsteht H_2O und O_2 .

2.7 Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2

Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren zum Schutz vor oxidativem Stress. Es reguliert die Expression von wichtigen antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen, u.a. auch Phase II Enzymen.

Nrf2 ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Eine Domäne kontrolliert die zelluläre Lokalisation, eine andere die Interaktion mit *kelch-like* ECH-assoziiertes-Protein (Keap1), welches ein im Zytosol lokalisierter Repressor ist. Nrf2 gehört zur sogenannten *cap 'n' collar*-Familie. Diese Proteinfamilie besitzt einfache Leucin-Reißverschluss-Motive. Diese Domäne des Nrf2 Proteins ist für die Bindung an das *antioxidant response element* (ARE) zuständig. ARE sind verstärkende Sequenzen in der regulatorischen Region von Nrf2-Zielgenen (Bellezza *et al.*, 2018; Gęgotek und Skrzydlewska, 2015; Keum, 2012; Tonelli *et al.*, 2018). Keap1 bindet und inhibiert somit Nrf2 und dient gleichzeitig als Adapter für die Ubiquitin Ligase Cullin3 (Cul3), welche die Ubiquitinierung von Nrf2 katalysiert und somit zum Abbau von Nrf2 durch das Proteasom beiträgt. Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 permanent exprimiert und wieder abgebaut (Kokot *et al.*, 2009).

Oxidative Zustände in der Zelle führen zu einer Oxidation von Keap1. Das Protein ändert sein Konformation und gibt Nrf2 frei. Da freies Nrf2 nicht abgebaut werden kann, transloziert es in den Nukleus, wo es ein Heterodimer mit dem kleinen *musculoaponeurotic fibrosarcoma protein* (Maf) bildet. Dieser Komplex ist in der Lage ARE zu erkennen und zu binden. Dies ist ein wichtiger Schritt für die Rekrutierung von anderen Transkriptionsfaktoren und Initiierung der Transkription antioxidativer Proteine (Gęgotek und Skrzydlewska, 2015; Tonelli *et al.*, 2018) (**Abb. 9**). Zu hohe Level an ROS führen jedoch direkt zur Apoptose. Nrf2 wirkt außerdem als Stimulanz auf antiapoptotische Proteinen aus der Bcl-2 Familie (Bellezza *et al.*, 2018). Nrf2 kontrolliert die Expression von ca. 500 Genen für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes, Entgiftung (hauptsächlich Phase II detoxifizierende Enzyme), Stressantwort und Metabolisierung der Zelle (Gęgotek und Skrzydlewska, 2015).

UV-Strahlung, Xenobiotika und andere Umwelteinflüsse schädigen die Zelle und induzieren somit die Nrf2 Expression. UVA-Licht aktiviert Nrf2 in Keratinozyten über die Bildung von ROS (Tian *et al.*, 2011). Auch in der Keratinozytendifferenzierung spielt Nrf2 eine wichtige Rolle. Hier verhindert es die Bildung von potentiell mutagenen Zellen während der Differenzierung und aktiviert die Transkription von detoxifizierenden Phase 2 Enzymen (Piao *et al.*, 2012).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Nrf2 ein wichtiges Schlüsselprotein hinsichtlich der Vermeidung von oxidativen Schäden in der Zelle ist. Eine erhöhte Aktivität schützt die Zelle vor oxidativen Schäden durch z.B. UV-Strahlung oder Chemikalien. Vor allem die Haut ist täglich direkt Umwelteinflüssen ausgesetzt. Eine umso wichtigere Rolle spielt hier Nrf2.

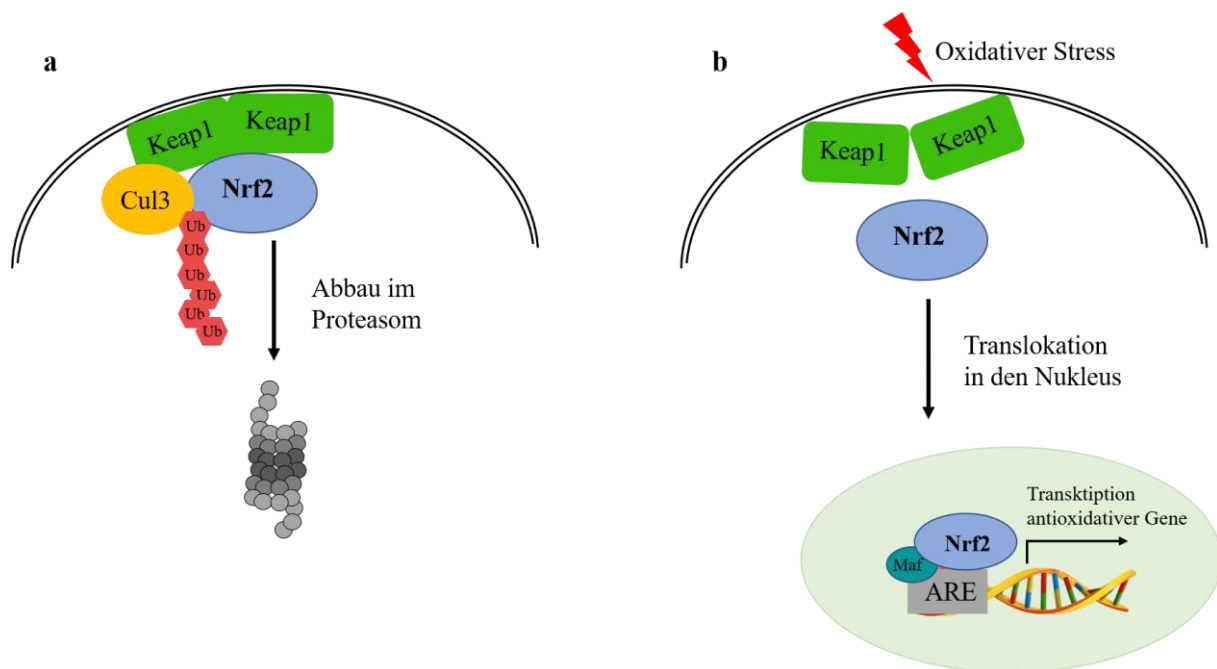


Abbildung 9: Aktivierung von nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2). (a) Unter normalen physiologischen Bedingungen bindet *kelch-like ECH-assoziierte-Protein* (Keap1) Nrf2. Die Ubiquitinligase Cullin3 (Cul3) kann somit die Ubiquitinierung (Ub) von Nrf2 katalysieren, was zu deren Abbau im Proteasom führt. (b) Durch oxidativen Stress erfolgt eine Konformationsänderung von Keap1 und Nrf2 wird frei gegeben. Es transloziert in den Nucleus, wo es mit Hilfe des *musculoaponeurotic fibrosarcoma protein* (Maf) das *antioxidant response element* (ARE) erkennt und bindet. Nrf2 induziert somit die Expression antioxidativer Gene.

2.8 Das Hitzeschock-System

Hitzeschockproteine gehören zu den Chaperonen. Sie unterstützen und katalysieren die Faltungsreaktion und den Zusammenbau neu synthetisierter Proteine und verhindert somit eine falsche Faltung, eine falsche Struktur oder Aggregation. Außerdem erfolgt während der katalysierten Faltungsreaktion eine Prüfung der neu synthetisierten Proteine. Falsch gefaltete Proteine werden zum Abbau angeregt.

Der Chaperonzyklus ist ATP-getrieben und wird von Co-Chaperonen kontrolliert. Sie bringen z.B. Hsp70 zum Zielprotein.

2.8.1 Hitzeschockprotein 70

Hsp70 kontrolliert vor allem die Faltung neu synthetisierter Proteine, interagiert mit signaltransduzierenden Proteinen und nimmt somit Einfluss auf Homöostase, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle. Regulatorische Proteine werden von Hsp70 inhibiert und, sobald sie ein adäquates Signal über den passenden Signalweg bekommen, aktiviert. Hsp70 besitzt eine 45 kDa *N*-terminale ATPase- (Adenosintriphosphatase) Domäne und *C*-Terminal eine 25 kDa Substratbindungs-Domäne.

2.8.2 Der Hitzeschockprotein 70-Zyklus

Der Hsp70-Zyklus wird durch zwei Zustände von Hsp70 gesteuert: Niedrige Affinität [Adenosintriphosphat (ATP) ist gebunden] und hohe Affinität [Adenosindiphosphat (ADP) ist gebunden]. Dieser Zyklus wird von Co-Chaperonen der J-Domänen-Protein (JDP) Familie gesteuert. Außerdem bringen J-Proteine Substrate zum Hsp70 Komplex, können aber auch Hsp70 zum Substrat an spezifische Orte dirigieren (Kampinga und Craig, 2010).

Die hoch flexible ATPase-Domäne ermöglicht das Öffnen und Schließen der Substratbindestelle. J-Proteine dirigieren das Substrat zu Hsp70 und ermöglichen ein Binden an der Substratbinde-Domäne. Die Hydrolyse von ATP, vermittelt durch JDP, triggert das Schließen der Substratbindestelle, JDP, ADP und Phosphat werden entlassen und ATP bindet erneut. Ist ATP gebunden, besitzt Hsp70 eine niedrige Affinität zum gebundenen Substrat und entlässt dieses (Mayer und Bukau, 2005) (**Abb. 10**). Hsp70 besitzt eine Korrektur-Funktion, um Mutationen vorzubeugen. Es kann falsch gefaltete Proteine korrigieren oder sie abbauen lassen.

Hsp70 wird kontinuierlich in humaner Epidermis exprimiert und hochreguliert, sobald die Zelle Stress ausgesetzt ist, wie z.B. Einwirkung von Noxen oder UV-Strahlung (Trautinger *et al.*, 1993). Hsp70 schützt die Epidermis vor UVB-Licht-induzierter Schädigung durch antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte, sowie durch Verminderung von DNA-Schädigung (Matsuda *et al.*, 2010).

Da jedes Chaperon ausgewählte Substrate bedient, ist für spezifische Aufgaben ein anderes Chaperon notwendig oder der Zyklus von Hsp70 an andere Chaperone gekoppelt, z.B. Hsp90 (Mayer und Bukau, 2005).

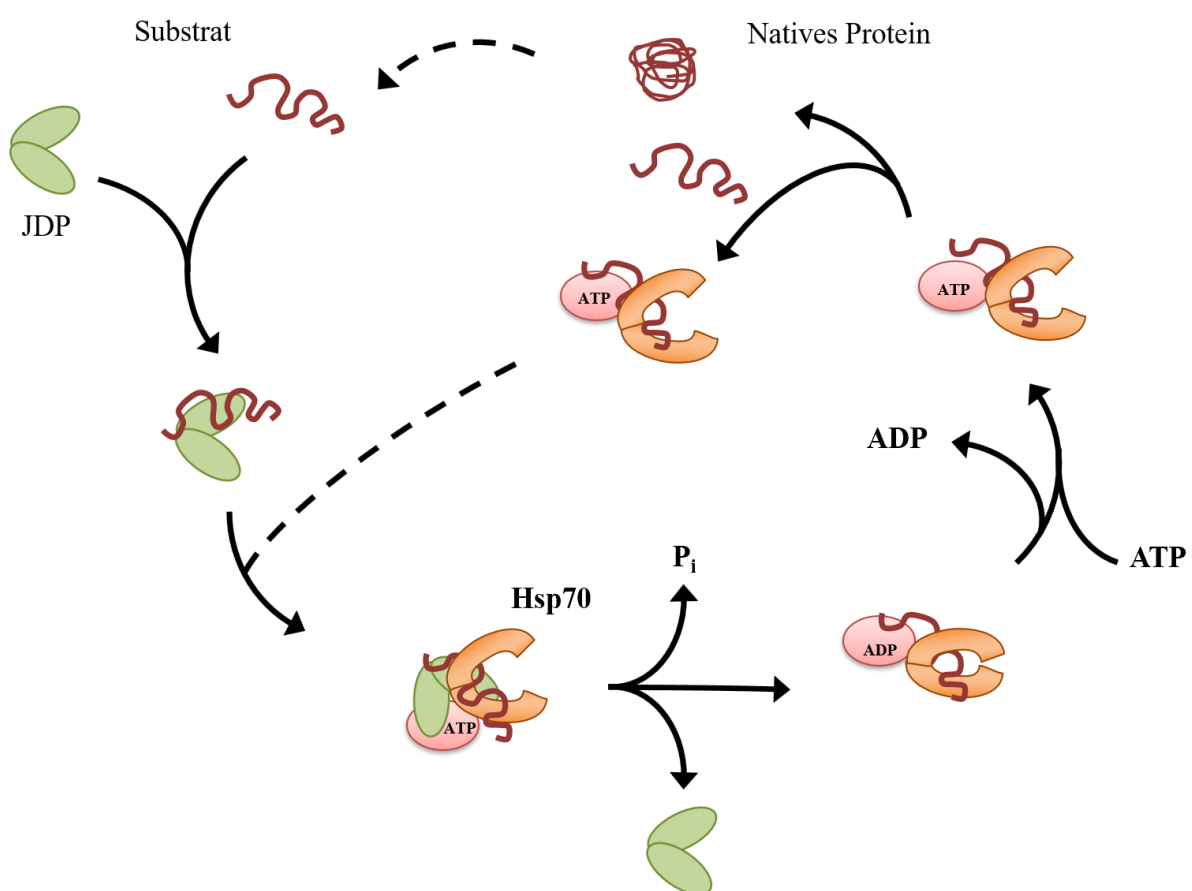


Abbildung 10: Der Zyklus des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70). Bei Hsp70 wird die Substratbindung durch sogenannte J-Domänen-Proteine (JDP) kontrolliert. Ein Substrat kann z.B. ein falsch gefaltetes oder fehlerhaftes Protein sein. Durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) gelangt Hsp70 in einen hohen Affinitätszustand für sein Substrat. Durch Konformationsänderungen wird dieses eingeschlossen und prozessiert. Durch die erneute Bindung von ATP und das Entlassen von ADP sinkt die Affinität zum nativen Protein und wird durch Konformationsänderung von Hsp70 entlassen.

2.8.3 Hitzeschockprotein 90

Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) ist ein 90 kDa schweres Protein, welches eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflusst. Es ist ein Schlüsselprotein in der Regulation der Proteostase unter normalen physiologischen Bedingungen, sowie unter Stress. Es ist, genau wie Hsp70, verantwortlich für die richtige Faltung von Proteinen und DNA-Reparatur. Hsp90 ist außerdem auch abhängig von vielen Co-Chaperonen, welche je nach Konformation binden. In Säugetieren existieren zwei Isoformen: Hsp90 α und Hsp90 β . Hsp90 β wird konstitutiv exprimiert, während Hsp90 α induziert werden kann (Shen *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999). Beide Formen haben eine Sequenzähnlichkeit von ca. 85% (Johnson, 2012).

Hsp90 besteht aus drei Domänen, einer N-terminalen Domäne (NTD), einer mittleren Domäne (MD) und einer C-terminalen Domäne (CTD). Außerdem funktioniert es als Dimer. Die NTD wird durch eine flexible Region mit der MD verbunden. Jede Domäne hat spezifische Aufgaben: Die NTD bindet ATP (Nukleotidbindestelle), die MD ist wichtig für die ATP-Hydrolyse und die Bindung von Substraten und CTD ist für die Dimerisierung und die Interaktion mit Co-Chaperonen verantwortlich (Hoter *et al.*, 2018; Schopf *et al.*, 2017).

2.8.4 Der Hitzeschockprotein 90-Zyklus

In Abwesenheit von ATP befindet sich Hsp90 in einer V-förmigen Konformation. Binden ein Substrat und ATP, findet eine Konformationsänderung statt, sodass die beiden NTD dimerisieren und jeweils mit der MD interagieren, sodass ATP autokatalytisch gespalten wird. Nach ATP Hydrolyse dissoziieren die NTD, das ADP und Phosphat, sowie das aktivierte Substrat. Hsp90 liegt nun wieder in einer offenen Konformation vor (**Abb. 11a**).

Ein wichtiger Co-Faktor ist das Hsp90-organisierende Protein (HOP). Dieses Protein dient als Adapter zwischen Hsp90 und Hsp70 und transportiert Substrate zwischen den beiden Chaperonen. Es kann beide Proteine gleichzeitig binden und verbindet somit diese beiden wichtigen Chaperone. Außerdem hemmt es die ATPase Aktivität von Hsp90 und hält es so in einer offenen Stellung. Das Substrat ist von Hsp70 (im ADP-Zustand) gebunden. Durch das Entlassen von ADP und Binden von ATP bindet Hsp90 durch die Vermittlung von HOP das Substrat. Je nachdem um welches Substrat es sich handelt, werden weitere spezifische Co-Chaperone benötigt. Hsp70 und HOP dissoziieren und die Bindung von ATP an die NTD von Hsp90 schließt den Komplex, sodass das Substrat prozessiert werden kann (Hoter *et al.*, 2018; Schopf *et al.*, 2017; Wandinger *et al.*, 2008) (**Abb. 11b**).

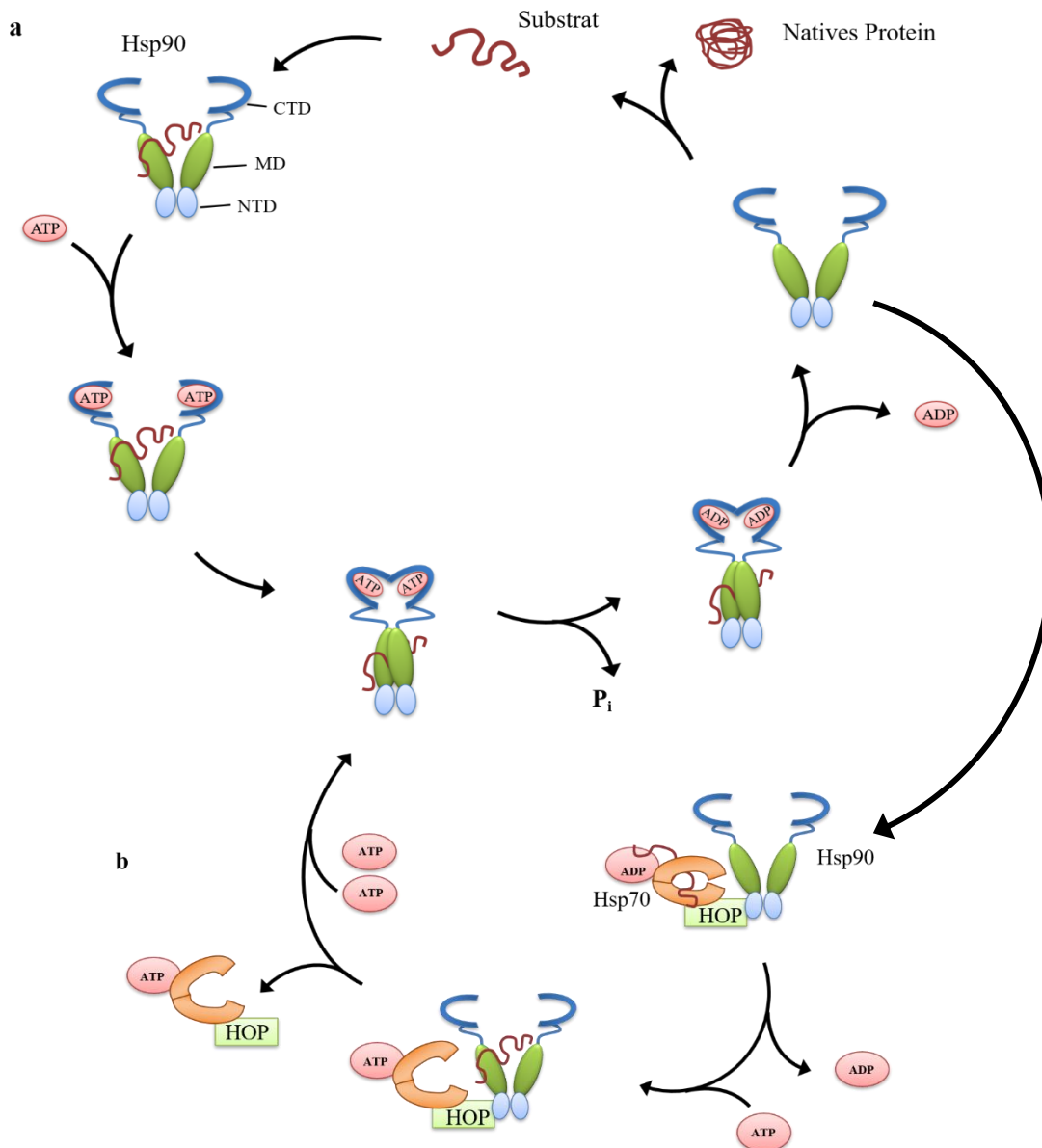


Abbildung 11: Der Hitzeschockprotein 70/90 (Hsp70/90) Zyklus. (a) Hsp90 reagiert als Dimer. Jedes Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut: Einer N-terminalen Domäne (NTD), diese besitzt eine Nukleotidbindestelle, einer mittleren Domäne (MD), verantwortlich für die autokatalytische Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse und Bindung von Substraten, und einer C-terminalen Domäne (CTD) für die Dimerisierung und Bindung von Co-Chaperonen. Die NTD wird durch eine flexible Region mit der MD verbunden. Bindet ATP an die CTD findet eine Strukturänderung bei Hsp90 statt. Das gebundene Substrat kann so prozessiert werden. Durch die Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) gelangt Hsp90 wieder in seine V-förmige Ausgangskonformation und das native Protein wird entlassen. (b) Der Zyklus von Hsp90 kann auch an den von Hsp70 gekoppelt sein. Hsp70 befindet sich in einem ADP gebundenen Zustand, d.h. es hat eine hohe Affinität zu seinem Substrat. Das Hsp90-organisierende Protein (HOP) dient als Adapter zwischen Hsp70, sowie Hsp90. Durch Entlassung von ADP und Binden von ATP unterliegt Hsp70 einer Konformationsänderung und gibt aufgrund der geringen Affinität das Substrat frei. Hsp70 und HOP dissoziieren und ATP bindet an Hsp90. Das Dimer schließt sich darauf hin und kann das Substrat weiter prozessieren.

2.9 Zielsetzung

2.9.1 Überblick über das gesamte Projekt

Ziel des gesamten Kooperations-Projektes ist die Entwicklung eines zellbasierten Toxizitäts-Assays als Hochdurchsatz-System zur toxikologischen Testung von chemischen Substanzen, welches genetische Varianten [*single nucleotide polymorphism* (SNPs)] in Detoxifizierungs-Stoffwechselwegen (ADME-Tox) der Europäischen Bevölkerung berücksichtigt. Dieser Toxizitäts-Assay soll die Grundlage für eine individualisierte und fundierte Aussage über die Haut-Verträglichkeit einer chemischen Substanz bilden. Somit könnten hautzelltoxische Wirkungen von chemischen Substanzen schnell, kostengünstig, reproduzierbar und aussagekräftig vor der Inverkehrbringung untersucht werden.

Hierzu werden aus 21 Hautbiopsien von genetisch charakterisierten Probanden sowohl humane immortalisierte Keratinozyten-Zelllinien für die Entwicklung des zellbasierten Toxizitäts-Assays entwickelt, als auch 21 individuelle *ex vivo* Hautmodelle angesetzt. Die Zellen bzw. Haut sollen hinsichtlich ihrer Entgiftung durch Stressoren getestet werden. Zur Validierung der Übereinstimmung werden die Ergebnisse der Keratinozyten-Zelllinien direkt mit den Ergebnissen der *ex vivo* Hautmodelle verglichen, um das Maß der Übereinstimmung festzustellen. Je höher das Maß der Übereinstimmung der Zelllinienergebnisse mit den Hautmodellergebnissen ist, desto stärker ist die Aussagekraft der geplanten zellbasierten Toxizitäts-Assays in Bezug auf den Menschen.

Im letzten Schritt werden bis zu fünf repräsentative Zelllinien und entsprechende Stoffwechselwege, die einen erheblichen Einfluss auf die spenderindividuelle Sensitivität haben, ausgewählt, die einen möglichst breiten Querschnitt der Gen-Charakterisierung repräsentieren. Aus diesen fünf repräsentativsten Zelllinien werden schließlich die zellbasierten Toxizitäts-Assays zur Untersuchung der dermatologischen Toxizität hergestellt.

2.9.2 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen des Projektes ist das Ziel dieser Arbeit insgesamt 100 männliche Probanden zu rekrutieren, ihnen Blut abzunehmen und von 21 genetisch unterschiedlichen Spendern Hautproben zu entnehmen. Diese Probanden unterscheiden sich hinsichtlich wichtiger ADME-Tox-Gene [Einzelnukleotid-Polymorphismus/*single-nucleotide polymorphism* (SNP)]. Hieraus soll ein individuelles *ex vivo* Hautmodell *in vitro* etabliert werden zur Untersuchung der Entgiftungsprozesse von 21 individuellen Spenderhautproben. Hierzu wird die Wirkung von UV-Licht und Diclofenac auf die Epidermis anhand von drei Schlüssel-Detoxifizierungsprozessen untersucht: Antioxidatives Redox-System, Nrf2-Phase-2-detoxifizierendes System und Hitzeschockprotein-System. Es soll eine Methode etabliert werden, um aus Kleinstmengen Epidermis mRNA zu isolieren und diese in einer TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hinsichtlich der eben genannten Parameter auf genetischer Ebene zu prüfen. Um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu vergleichen, soll durch Immunhistochemische- und Immunfluoreszenzfärbungen die Detoxifizierungskapazität der Hautmodelle untersucht werden.

Zusammenfassend sollen auf Gen- und Proteinebene Erkenntnisse darüber erlangt werden, inwiefern UV-Licht und Diclofenac die Haut von Europäischen Individuen schädigen und ob bzw. inwiefern sich die Haut in der Antwort auf Standard-Stressoren bei genetisch unterschiedlichen Probanden unterscheidet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Biologisches Sicherheitskabinett Klasse II	NuAir, Plymouth, UK
C1000 Thermocycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Dewar Transportgefäß TypB	KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage ABT 100-5 NM	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Färbekammer M920	Simport, Bernard-Pilon, Kanada
Gefrierschrank 4°C und –20°C	Liebherr- International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Gefrierschrank –80°C	SANYO Electric Co., Japan
Kryostat CM 3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer Basic RH2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrozentrifuge	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Optisches Mikroskop	Bresser GmbH, Rhede, Deutschland
pH-Meter inoLab 7110	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipetten: 100 - 1000 μL , 20 - 200 μL , 2 - 20 μL , 0,5 - 10 μL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettus Accujet-pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Precision balance KERN 572	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
StepOnePlus Real Time System	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
UVC/T-AR DNA/RNA UV cleaner Box	BioSan, Riga, Lettland
UV-Meter	Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen- Schwenningen, Deutschland
UV Transluminator 2000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Vortex Mixer VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad 1104	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
6-Well Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96 Fast PCR Platte Halbrand	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
BeeSana sterile Wundkompressen	Meditrade GmbH, Kiefersfelden GmbH, Deutschland
Cryo Tube vials 1,8 mL	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Cutasept F	BODE Chemie, Hamburg, Deutschland
Dako-Pen Fettstift	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser (24×60 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal-Biopsiestanze 6 mm	Pfm medical AG, Köln, Deutschland
Einweg-Skalpell	Feather® Safety Razor Co., Osaka, Japan
Fixomull	BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Gentle skin OP-Handschuhe	Meditrade GmbH, Kiefersfelden GmbH, Deutschland
Glasmörser 0,5 mL (Sonderanfertigung)	Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland
Handschuhe Peha-soft nitrile FINO	Paul Hartmann AG, HHeidenheim, Deutschland
LABSOLUTE Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere, steril: 1000 µL, 200 µL, 0,1-10 µL	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

LABSOLUTE Reaktionsgefäße 1,5 mL, DNase-, RNase-, Pyrogenfrei	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Menzel-Gläser Superfrost Plus Objektträger (25×75 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ Optische Klebefolie	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Mikrotomklingen Leica 819	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Octenisept	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Ohrbügel Gesichtsmaske	3M Helth Care, Neuss, Deutschland
PCR SingleCap 8er SoftStips 0,2 mL DNA, DNase-, RNasefrei	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen: 60 mm, 92 mm, 150 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen: 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polyhexanid Macrogol Salbe 0,04%	Apotheke UKSH, Lübeck, Deutschland
Prolene 4-0 monofil chirurgisches Nahtmaterial	Johnson & Johnson GmbH, Neuss, Deutschland
Reagiergefäße: 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße: 15 mL, 50 mL,	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rührspatel	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Scandicain Injektionslösung	Aspen GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland

Schraubdeckeldosen Aponorm 5 g	Dürrmann GmbH & Co. KG, Hillscheid, Deutschland
Serologische Pipetten: 10 mL, 25 mL	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sicherheitsinjektionskanülen BD Eclipse	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sicherheitsspritzen 1 mL, 5 mL	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
S-Monovette EDTA K, 2,6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten 3,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Wundversorgungsset	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Zelluloseputzer Pur-Zellin	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol min. 98%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	Avantor Performance Materials, Deventer, Niederlande
Antikörperverdünnung	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Cryomatrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dako Waschpuffer 10x	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DAPI Fluoromount-G Medium	Southern Biotech, Birmingham, USA
Diclofenac Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	ApliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Reagent Plus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dispase II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eukitt Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fluoromount-G Medium	Southern Biotech, Birmingham, USA

Mayers Hämalaun Lösung	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase Away	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti-Histofix 4% säurefrei pH 7	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan Fast Advanced Mastermix	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Ziegennormalserum	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NovaRED Peroxidase (HRP) Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Freies DNase Set (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tyramide Signal Amplification (TSA) Fluorescein System	PerkinElmer, Massachusetts, USA
VECTASTAIN Elite ABC HRP Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung	Hersteller
0,3% Triton X-100	Triton X-100 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1×)	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
3% Wasserstoffperoxid	1 mL 30% Wasserstoffperoxid 9 mL PBS (1x)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
1 N NaOH	40 g/L in doppelt destilliertem Wasser (ddH ₂ O)	Avantor Performance Materials, Deventer, Niederlande
Dako Waschpuffer (10x)	1x in ddH ₂ O	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanol absolut	70%, 80%, 96%, 100% in ddH ₂ O	Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Ethanol- Essigsäure (Eisessig)	2:1	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 1%	Formaldehyd min. 37% in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	1% in ddH ₂ O	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Phosphat-gepufferte Salzlösung 1× (PBS)	ohne Ca und Mg	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS, pH 7,2 in 1000 mL ddH ₂ O	1,8 g NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O 8,0 g NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-NaCl-Blockierpuffer (TNB), pH 7,5 in 1000 mL ddH ₂ O	15,760 g Tris-HCl 8,766 g NaCl 5,000 g Blockierreagenz	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland PerkinElmer, Massachusetts, USA
Tris-NaCl-Tween 20 Puffer (TNT), pH 7,5 in 1000 mL ddH ₂ O	15,760 g Tris-HCl 8,766 g NaCl 500 µL Tween 20	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Medien

Tabelle 6: Verwendete Medien

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Hydrokortison	1 mg/mL in 100% Ethanol + 19 mL Williams' Medium E	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Insulin	100 mg/10 in mL ddH ₂ O + 100 µL Aceton (steril)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isolationsmedium	50 mL Williams' Medium E 500 mL Antimykotische Mischung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kulturmedium	50 mL Williams' Medium E 500 µL L-Glutamin 500 µL Penicillin- Streptomycin 50 µL Insulin 10 µL Hydrocortison	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicilin- Streptomycin	10 µg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Williams' Medium E	mit 2,2 g/L NaHCO ₃ , ohne L-glutamine	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

3.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller
Gespaltene Caspase 3	1:400	Kaninchen anti-human gespaltene Caspase 3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)	1:400	Maus anti-human Hsp70	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Hitzeschockprotein 90 (Hsp90)	1:200	Kaninchen anti-human Hsp90	Abcam, Cambridge, England
Katalase	1:200	Kaninchen anti-human Katalase	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland
Ki-67 Klon: MIB-1	Gebrauchsfertig	FLEX Maus anti-human Ki-67 Antigen	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)	1:100	Kaninchen anti-human Nrf2	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper

Fluorochrom	Verdünnung	Beschreibung	Hersteller
Alexa Fluor 488	1:200	Ziege anti-Kaninchen	Abcam, Cambridge, England
Alexa Fluor 488	1:800	Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen, Carlsbad, USA
Biotiniliert	1:200	Ziege anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Inc., West Baltimore Pike, USA
Biotiniliert	Gebrauchsfertig	Ziege anti-Maus	Abcam, Cambridge, England
Rhodamine Red	1:200	Ziege anti-Maus	Jackson ImmunoResearch Inc., West Baltimore Pike, USA

3.1.8 TaqMan Sonden

Tabelle 9: Verwendete TaqMan Sonden

Gen	Protein	Nummer	Spezies	Hersteller
CAT	Katalase	Hs00156308_m1	Human	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
GAPDH	GAPDH	Hs99999905_m1	Human	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
HSPA4	Hsp70	Hs00382884_m1	Human	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
HSP90AA1	Hsp90	Hs00743767_SH	Human	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
NFE2L2	Nrf2	Hs00975960_m1	Human	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

3.1.9 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Name	Hersteller
BZ-II-Analyzer Software	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
BZ-II-Viewer Software	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.52q	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop 2000 / 2000c Operating Software, Version 1.6	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
PCR Mastercycler® realplex Software	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
StepOnePlus Version 2.3	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

3.2.1.1 Ethik

Dem Antrag zur Durchführung des vorliegenden Projektes wurde nach Prüfung berufsethischer, medizinisch-wissenschaftlicher und berufsrechtlicher Gesichtspunkte von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Vorsitzender: Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic) im Schreiben vom 02.05.2017 (AZ 16-193) ohne Bedenken zugestimmt (**siehe Anhang 1**).

3.2.1.2 Probandenpopulation

Insgesamt wurden 100 kaukasische, gesunde männliche Probanden im Alter von 21 bis 45 Jahren in die Studie eingeschlossen. Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien erklärten die Probanden ihre Freiwilligkeit nach eingehender mündlicher und schriftlicher Aufklärung durch Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung.

Nicht eingeschlossen werden konnten Männer unter 21 Jahren (aufgrund der kompletten Volljährigkeit) und über 45 Jahren (aufgrund der Altersmerkmale der Haut), sowie Frauen im Allgemeinen (aufgrund des hormonellen Status). Weitere Ausschlusskriterien waren der vermehrte Konsum von Tabak (≥ 5 Zigaretten pro Tag) und Alkohol (≥ 1 Drink-Units pro Tag, d.h. ≥ 1 Bier (0,5 L) oder 1 Glas Wein (0,25 L) pro Tag) und Drogenkonsum. Zusätzlich durfte keine regelmäßige Medikamenteneinnahme erfolgen. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 27,83 Jahren (**Abb. 12**).

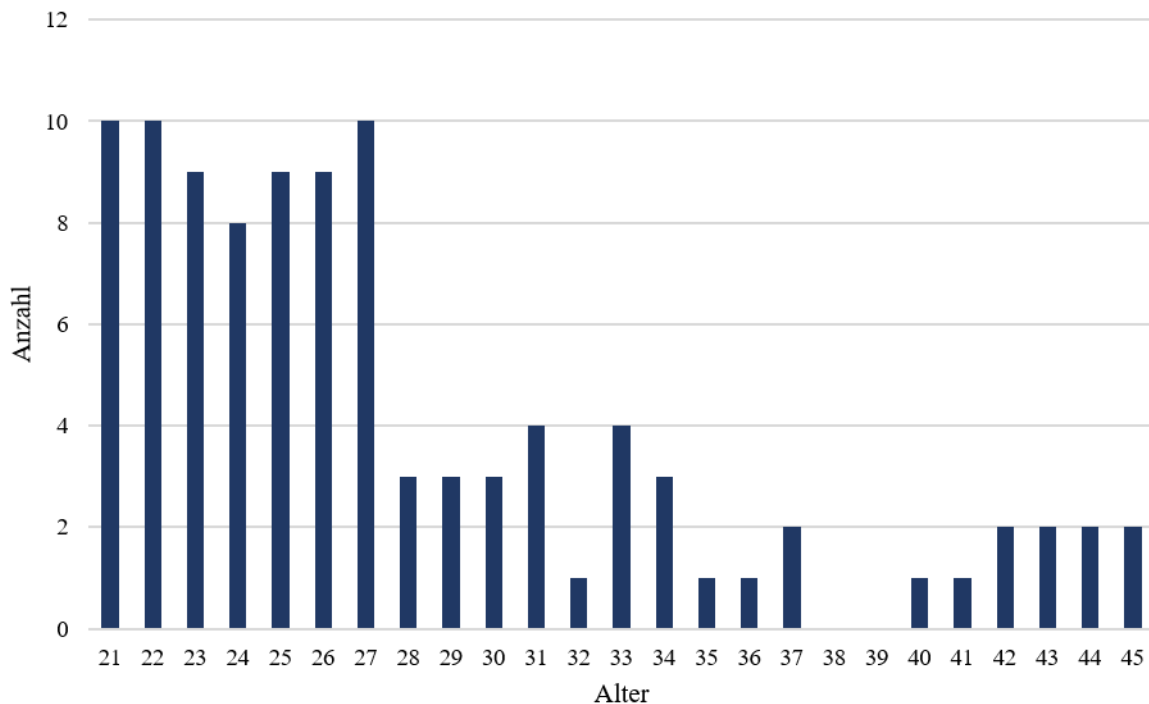


Abbildung 12: Altersverteilung der Probanden. Eingeschlossen wurden nur Probanden im Alter von 21 bis 45 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 27,83 Jahren.

3.2.1.3 Probandenrekrutierung

Die Rekrutierung der Probanden begann am 01.08.2017 und endete am 27.02.2018. Für die Rekrutierung wurden passende Probanden aus vorangegangenen Studien kontaktiert, Anzeigen und Kurztexte im Internet, sowie lokalen Zeitungen geschaltet, regelmäßig über den E-Mail Verteiler der Universität zu Lübeck Anfragen versendet, Aushänge auf dem Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und der Lübecker Innenstadt gemacht, sowie Flyer verteilt (**Abb. 13**).

Potenzielle Interessenten wurden vor dem Termin zur Blutentnahme zunächst telefonisch oder per E-Mail über die Ein- und Ausschlusskriterien mittels einer eigens zusammengestellten Check-Liste abgefragt (**siehe Anhang 2**). Passende Probanden wurden zu einem Aufklärungstermin bestellt. Zunächst wurden erneut die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft und die persönlichen und epidemiologischen Daten erfasst. Nach umfassender mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Maßnahmen mittels eines sechs-seitigen Aufklärungsbogens (**siehe Anhang 3**), erhielten die Probanden eine individuelle Bedenkzeit von 24 Stunden. Nach endgültiger Zusage des Probanden und Unterschreiben der Einverständniserklärung (**siehe Anhang 3**) konnte die Blutentnahme erfolgen.

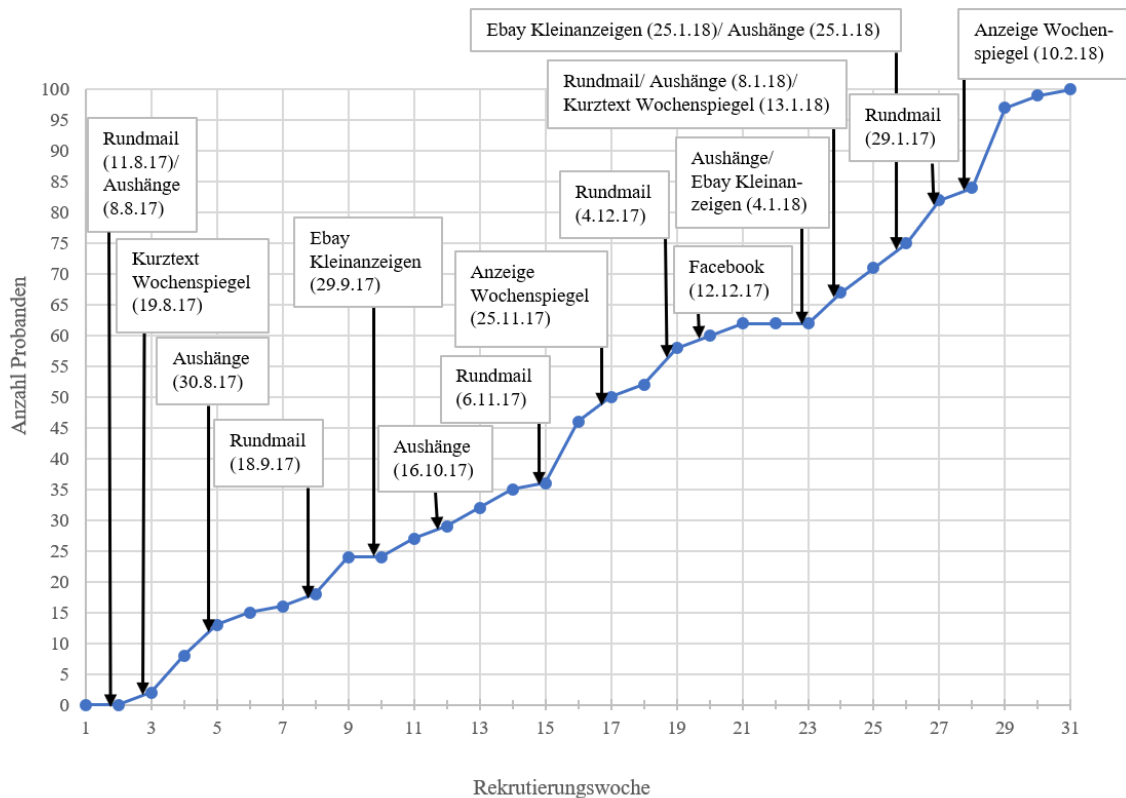


Abbildung 13: Darstellung der Anzahl an rekrutierten Probanden pro Woche. Insgesamt hat es 31 Wochen gedauert um 100 Probanden in das Projekt einschließen zu können. Die Probanden wurden rekrutiert über den E-Mail-Verteiler der Universität zu Lübeck (Rundmail), Kurztexte im Internet, sowie lokalen Zeitungen und Aushängen.

3.2.2 Blutentnahme

Nach zweimaliger Hautdesinfektion der Ellenbeuge wurden durch Kanülenpunktion der Armvene zwei EDTA Monovetten Blut in der Gesamtmenge von ca. 7 mL entnommen.

Eine dieser Monovetten wurde für die genetische Charakterisierung zur Firma Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH geschickt, die zweite verblieb als Backup im Labor der Entzündungsmedizin.

3.2.3 Festlegung des Gen Panels

Zu Beginn des Projektes wurden Gene festgelegt, welche in der Entstehung und Abwehr von toxikologischen Reaktionen in Keratinozyten eine wichtige Rolle spielen. Durch eine softwaregestützte Literaturrecherche zu regulatorischen Genen in Keratinozyten der menschlichen Haut konnten vom Fraunhofer-Institut IME, Hamburg, 402 Gene in Literaturstellen identifiziert werden. Durch Anwendung weiterer Ein- und Ausschlusskriterien konnte die Auswahl von Literaturstellen auf 61 begrenzt werden. Beim genauen Sichten dieser Literaturstellen konnten 501 relevante Gene identifiziert und mit den bereits 402 Genen aus der vorherigen Literaturrecherche kombiniert werden. Daraus ergaben sich insgesamt 901 identifizierte Gene in der Haut. Da aber nicht alle in relevante Detoxifizierungsprozesse involviert sind, wurde durch manuelle Auswahl die Anzahl an Genen auf 311 reduziert.

Ziel des Projektes ist es, Genvarianten [*Single nucleotide Polymorphism* (SNPs)] bei verschiedenen Menschen, und die dadurch bedingten unterschiedlichen Fähigkeiten in den Entgiftungsprozessen der Haut, zu betrachten. Dazu wurden zu den 311 Genen entsprechende SNPs mit einem *Global minor allele frequency* (MAF) $> 0,05$ und ohne klinische Relevanz aus der Datenbank *The Database of Short Genetic Variation* (dbSNP) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) herausgesucht. Der Global MAF zeigt die Häufigkeit, mit der das zweithäufigste Allel in einer Population auftritt. Der MAF liefert Informationen, um zwischen häufigen und seltenen Genvarianten zu differenzieren. Hieraus ergaben sich 874 relevante SNPs.

3.2.4 Genetische Charakterisierung und Auswahl der Probanden für die Stanzbiopsien

Um so viele Menschen wie möglich in der Unterschiedlichkeit ihrer Entgiftung abzubilden, wurden von insgesamt 100 Probanden 21 Personen ausgewählt, die möglichst alle Genvarianten in den ADME-Tox Stoffwechselwegen repräsentieren. Berücksichtigt wurden Genvarianten, welche mit einer Häufigkeit von über 5% in der europäischen Bevölkerung vorkommen.

Hierzu führte die Firma Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH, Hamburg, eine Sequenzanalyse der 874 SNPs im Blut der Patienten durch und konnte 758 SNPs (87%) experimentell analysieren.

Zunächst wurde aus dem Blut DNA isoliert und eine *Next-Generation Sequencing* (NGS) Analyse durchgeführt. Nach Durchführung der NGS-Analyse erfolgte die

bioinformatische Auswertung der Sequenzdaten. Aus diesen wurden die Polymorphismen ausgewertet, die mit einer Häufigkeit von mehr als 5% in unserer Bevölkerung vorkommen. Anhand dieser Genvarianten wurden aus den 100 Probanden 21 Personen so ausgewählt, dass sich die genetischen Profile hinsichtlich dieser Genvarianten möglichst unterscheiden und möglichst viele dieser Genvarianten in dem Kollektiv vertreten sind.

Dazu wurden die 100 Probanden in Gruppen eingeteilt aufgrund der Ähnlichkeit der kodierenden Genstrings. Es ergaben sich 36 Gruppen mit ein bis maximal sechs Personen. Zuletzt wurden aus den verschiedenen Gruppen 21 Probanden per Zufall ausgesucht, sodass aus jeder Gruppe mindestens eine Probe vorhanden war.

3.2.5 Hautbiopsie-Entnahme

Nach Auswahl der 21 potenziellen Hautspender wurden diese erneut kontaktiert. Beim Termin erfolgten abermals eine Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien, sowie eine spezifische Aufklärung zur operativen Entnahme der Hautprobe mündlich und schriftlich durch den Arzt/die Ärztin. Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurden 4 Hautstanzen à 6 mm Durchmesser von der Gesäßhaut entnommen (**Abb. 14**).

Die Gesäßhaut wurde drei Mal desinfiziert. Danach erfolgte die Injektion von ca. 3 – 5 mL eines Lokalanästhetikums. Nach Wirkung der Lokalanästhesie erfolgte die Gewinnung von vier runden Hautbiopsien mittels Stanze (6 mm Durchmesser), möglichst ohne Fettgewebe. Nach der Gewebeentnahme wurden die vier Wunden jeweils mit Nähten verschlossen und mit sterilen Verbandstreifen abgedeckt. Zur Vermeidung von Infektionen wurde Polyhexanid auf die Verbandstreifen gegeben. Als letztes erfolgte ein steriler Abschlussverband mit einer Kompresse und einem selbstklebenden Verbandsflyes.

Nach 10 bis 14 Tagen wurde die Wunde kontrolliert und das Fadenmaterial gezogen. Insgesamt wurden Proben von 21 Spendern entnommen. Zwei Stanzen wurden gekühlt und in Williams' Medium E per Kurier-Dienst am selben Tag an die Firma acCELLerate GmbH, Hamburg, zur Keratinozyten-Zelllinien-generierung geschickt, die anderen beiden Stanzen verblieben im Labor der Entzündungsmedizin.

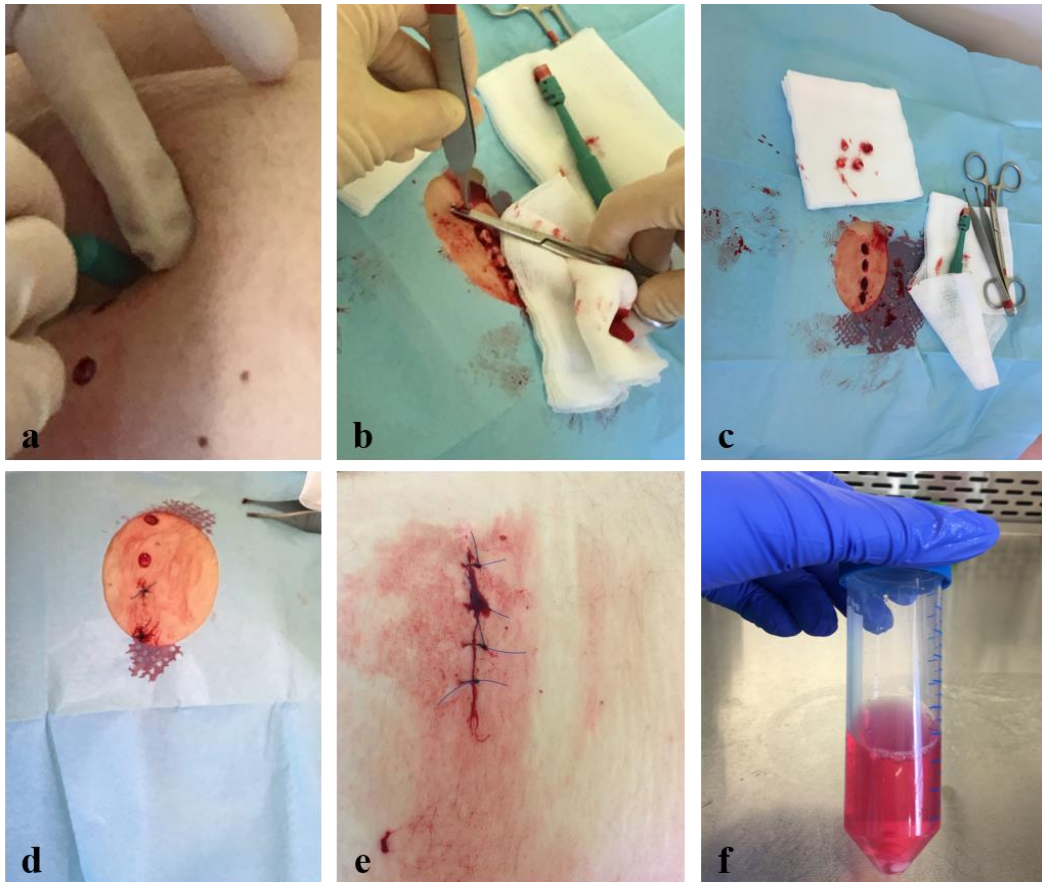


Abbildung 14: Entnahme der Hautbiopsien. (a, b, c) Mit Hilfe einer Stanze wurden vier Hautbiopsien à 6 mm Durchmesser von der Gesäßhaut entnommen. (d, e) Die Wunden wurden mit Nähten verschlossen und mit einem Abschlussverband versehen. (f) Die Hautstanzen wurden in Williams' Medium E in das Labor der Entzündungsmedizin transportiert.

3.2.6 Hautorgankultur-Modell und Substanzbehandlung

3.2.6.1 Kultivierung der Hautbiopsien

Die Kultivierung der Hautstanzen beruht auf dem Hautorgankultur-Modell von Kleszczyński und Fischer und wurde in 5% CO₂ bei 37°C durchgeführt (Kleszczyński und Fischer, 2012). Zunächst wurden die zwei Stanzen in Isolationsmedium gelagert und ggf. von Fettgewebe befreit (**Abb. 15a, b**). Da nur zwei Stanzen zur Verfügung standen, zusätzlich zur UV- und Diclofenac-behandelten Haut noch eine Kontrolle benötigt wurde, wurde nach vorsichtiger Säuberung der Haut durch Tupfen auf einem Papiertuch ca. ein Drittel von jeder Stanze per Skalpell entfernt (**Abb. 15c, d**). Die Hautproben wurden mit der Epidermis nach oben in einer 6-Well Platte positioniert (**Abb. 15e**). Um sich vom präparations-induzierten Stress zu erholen, wurden die Hautbiopsien ohne Substanzbehandlung für 24 Stunden bei 37°C in 2 mL Kulturmedium kultiviert.

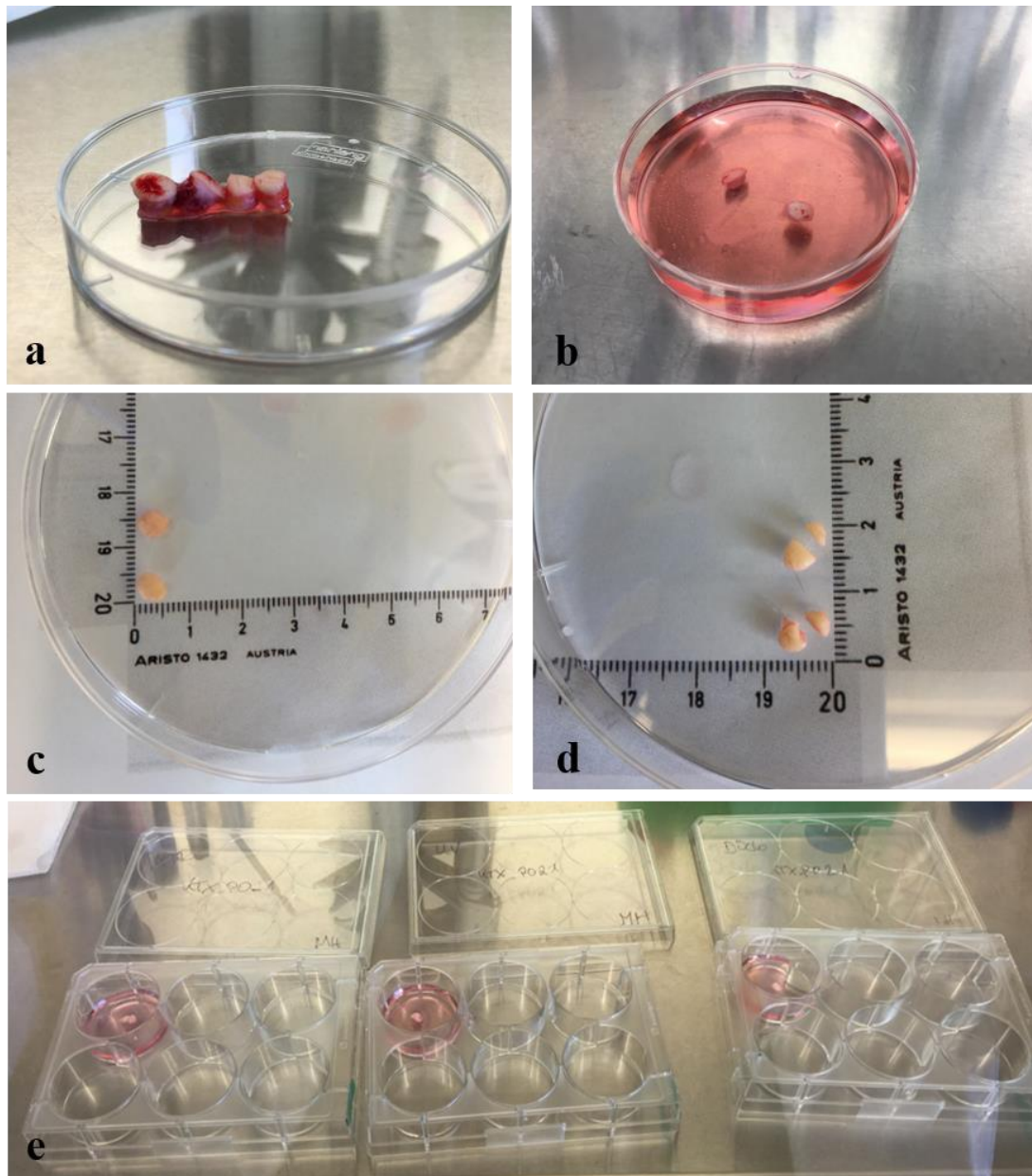


Abbildung 15: Zurechtschneiden der Hautbiopsien. (a) Zwei der vier Hautbiopsien wurden an die Firma acCELLerate zur Keratinozyten-Zelliniengenerierung geschickt, (b) die anderen beiden Stenzen wurden in Isolutionsmedium gelagert und ggf. entfettet. (c, d) Circa ein Drittel wurde von jeder Stanze abgeschnitten und (e) als Kontrollgewebe benutzt (links). Die anderen beiden Stücke waren für die UV- (Mitte) und Diclofenac-Behandlung (rechts) vorgesehen. Vor der Behandlung ruhten die Biopsien jeweils in 2 mL Kulturmedium für 24 Stunden bei 37°C.

3.2.6.2 Substanzbehandlung

Zu Beginn wurde das Kulturmedium entfernt und alle Proben mit 1 mL Phosphatgepufferter Salzlösung [PBS (1x)] gewaschen, um Rückstände des Kulturmediums zu entfernen.

Zu der Kontrolle und der UV-Probe wurden 1 mL PBS (1x) gegeben. Die UV-Probe wurde durch den Bio-Rad UV Transluminator 2000 mit einer Dosis von 300 mJ/cm² UV bestrahlt (Fischer *et al.*, 2013). Dieses Gerät wurde validiert und kalibriert durch Piazena Biolabs (Berlin, Deutschland). Die UV-Quelle emittiert hauptsächlich UVB (280–320 nm; ca. 60%), weniger UVA (320–400 nm; ca. 30%) und kaum UVC (120–280 nm: ca. 10%). Nach der UV-Bestrahlung wurde das PBS entfernt und die Haut erneut für 24 Stunden bei 37°C in 2 mL Kulturmedium kultiviert (**Abb. 16a, b**).

Diclofenac wurde in einer Konzentration von 1 mM dem Kulturmedium zugesetzt. Zusätzlich wurden 0,1% Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben. Die Haut wurde mit der Epidermis nach unten schwimmend in 4 mL dieser Substanz für 24 Stunden bei 37°C inkubiert (**Abb. 16c**).

Nach Ende der Behandlungszeit wurde jeweils ein Drittel des kultivierten Gewebes in Cryomatrix eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die eingebettete Hautstanze wurde am Leica CM 3050S Kryostat in 6 µm dicke Gefrierschnitte geschnitten und bei -80°C gelagert (**Abb. 16e, f, g, h**).

Die übrigen zwei Drittel der Hautstanze wurden in 0,1% Dispase II in Kulturmedium für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dies bewirkte die Ablösung der Epidermis von der Dermis. Beide wurden getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (**Abb. 16i**).

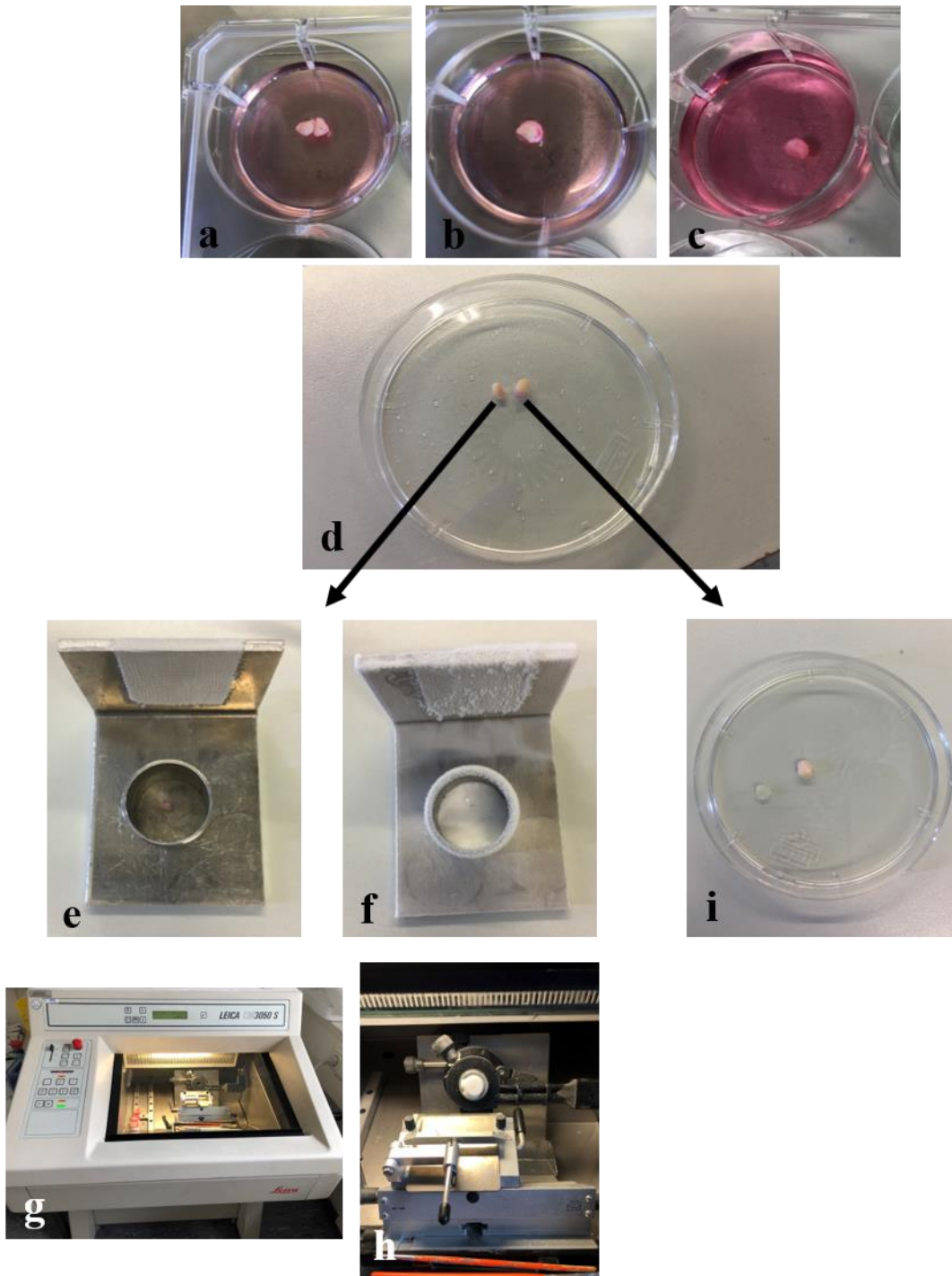


Abbildung 16: Aufteilung der Hautbiopsien. (a) Von der Kontroll-Hautbiopsie wurde das kleinere Stück für die Proteinanalyse verwendet. (b, c, d) Von der UV-bestrahlten und in Diclofenac kultivierten Hautbiopsie wurde ca. 1/3 abgeschnitten, (e, f) um es in Cryomatrix für Proteinanalysen einzufrieren und (g, h) es später am Cryostat zu schneiden und auf Objektträger zu bringen. (i) Vom größeren Stück wurde die Epidermis mittels Dispase II abgelöst und für mRNA Isolation und Genanalysen verwendet.

3.2.7 mRNA Isolation

Aus der Epidermis der Hautstanzen wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits von Qiagen mRNA isoliert. Alle Isolationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Hierzu wurde die tiefgefrorene Epidermis nach dem Protokoll von Qiagen und mit Hilfe eines maßgefertigten Glasmörsers, sowie einer QIAShredder Säule, in 350 μ L RLT Puffer (versetzt mit 10 μ L β -Mercaptoethanol auf 1 mL RLT Puffer) homogenisiert und lysiert (2 min Zentrifugation bei voller Kraft). Anschließendes Zentrifugieren des Lysats auf einer gDNA Eliminator-Säule (30 s bei ≥ 10.000 rpm) war der erste Schritt zur Vermeidung von genomischen DNA (gDNA) Verunreinigungen. Der Durchfluss wurde mit 350 μ L 70% Ethanol versetzt und auf die RNeasy MinElute Säule pipettiert. Die Säule wurde 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule mit 350 μ L RW1 Puffer und erneutes Zentrifugieren gewaschen. Es folgte der zweite Schritt zur Vermeidung von gDNA Verunreinigungen mit Hilfe eines DNase-Verdau. Die in RNase freiem Wasser gelöste DNase I wurde 1:8 in RDD Puffer verdünnt (Kit RNase-Free DNase, Qiagen). 80 μ L wurden direkt auf die Säule pipettiert und für 20 min inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 350 μ L RW1 Puffer. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 μ L RPE Puffer auf die Säule gegeben, 15 s bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Die Säulenmembran wurde mit 500 μ L 80% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 2 min bei ≥ 10.000 rpm), bevor sie auf ein neues 2 mL Röhrchen gesetzt und offen für 5 min bei voller Kraft zentrifugiert wurde, um zu trocknen. Die Säule wurde auf ein RNase freies 1,5 mL Reagiergefäß gesetzt und die mRNA mit 20 μ L RNase freiem Wasser eluiert (2 min Inkubation, Zentrifugation 1 min bei voller Kraft). Das Eluat wurde erneut auf die Membran der Säule gegeben, 2 min inkubiert und erneut 1 min bei voller Kraft eluiert. Nach Messung der mRNA-Konzentration am NanoDrop wurde die mRNA im Anschluss in cDNA umgeschrieben.

3.2.8 cDNA Synthese

Bei Proben mit einer mRNA Konzentration über 100 ng/μL wurde die mRNA 1:2 in RNase freiem Wasser verdünnt. Proben mit einer geringeren Konzentration wurden ohne Verdünnung verwendet. Für die cDNA Synthese wurde ein 2x RT-Mastermix nach Herstellerangaben aus RNase freiem Wasser, 10x Reverse Transkriptase Puffer, 25x Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix, 10x Reverse Transkriptase Random Primer und Reverser Transkriptase angesetzt. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Zu 10 μL 2x Reverse Transkriptase-Mastermix wurden 10 μL mRNA (1x Volumen) gegeben, vorsichtig gemischt und wie folgt im Thermocycler von Bio-Rad inkubiert: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min, 4°C ∞. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.9 TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine verbesserte Form der herkömmlichen Echtzeit-PCR. Anstatt interkalierender Farbstoffe nutzt TaqMan eine für das Zielgen spezifische fluorogene Oligonucleotidsonde. Hierbei sind die Spezifität und Reproduzierbarkeit sehr hoch. Die Fluoreszenz des Farbstoffs (am 5'-Ende) wird so lange von einem Quencher (am 3'-Ende) unterdrückt, bis die 5'-Nucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase die Sonde spaltet und der Farbstoff sich vom Quencher entfernt. Die Fluoreszenzintensität erhöht sich proportional zur Menge des erzeugten Amplikons.

Die TaqMan RT-PCR wurde in Triplikaten in 96-Well Platten am StepOnePlus von Thermo Fisher durchgeführt. Es wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Haushaltsgen verwendet.

Es wurden 10 ng cDNA pro Reaktionsansatz eingesetzt. Pro Well wurden 20 μL Reaktionsmix verwendet. Der TaqMan Fast Advanced Mastermix wurde mit den jeweiligen Sonden angesetzt (pro Reaktion 1 μL Sonde und 10 μL Mastermix). Pro Well wurden 11 μL Mastermix/Sonde vorgelegt und 9 μL cDNA (10 ng in Nuklease freiem Wasser) hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde gemischt ohne Luftblasen zu erzeugen. Zum Schluss wurde die Platte mit einer optischen Folie abgedeckt, zum Schutz vor Verdunstung während der Reaktion, und kurz zentrifugiert. Die PCR wurde wie in **Tabelle 11** dargestellt durchgeführt.

Die relative Expression der Gene wurde durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode berechnet, mit der Expression von GAPDH als Haushalts-Gen.

Tabelle 11: Programm für die TaqMan Echtzeit-PCR mit dem Fast Advanced Mastermix am StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific)

Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zyklen	Beschreibung
120	50	Halten	Uracil- <i>N</i> -Glycosilase (UNG) Inkubation
20	95	Halten	Polymeraseaktivierung
1	95	40	Denaturierung
20	60		Anlagerung/Verlängerung

3.2.10 Immunhistochemie

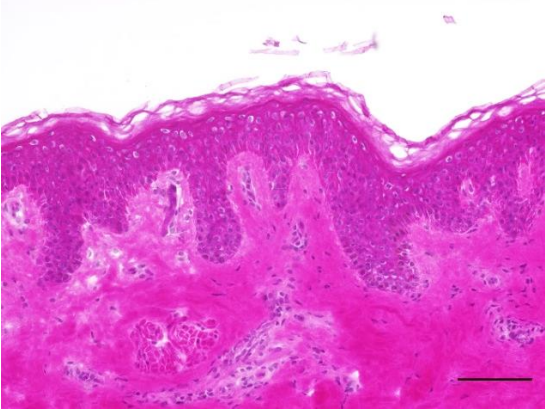
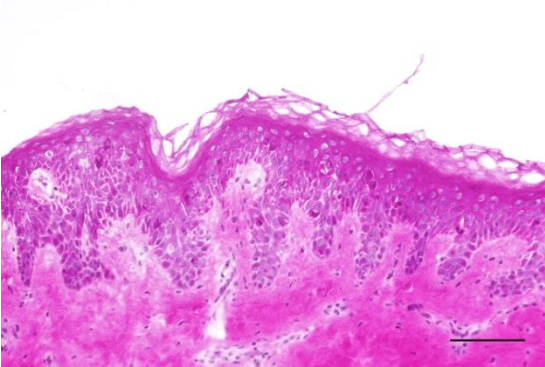
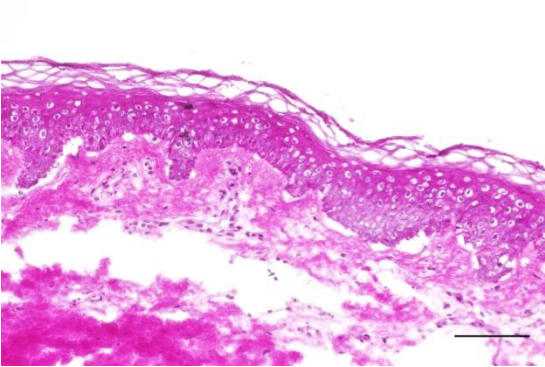
3.2.10.1 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Um die Morphologie und strukturelle Veränderungen der Haut bewerten zu können, wurden die Gefrierschnitte mittels Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

Hierzu wurden die Schnitte zunächst 10 min bei RT getrocknet, bevor sie 10 min in eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert wurden. Es folgte ein kurzes Waschen in destilliertem Wasser und die Färbung in Hämalaun nach Roth für 10 min bei RT, sowie das Bläuen der Zellkerne unter fließendem Leitungswasser für 15 min bei RT. Dem wässrigen Eosin (0,5%) wurde ein Tropfen Eisessig auf 200 mL Lösung zugesetzt und die Schnitte in dieser Lösung 30 s gefärbt. Durch die anschließende aufsteigende Alkoholreihe [70% > 96% > 96% > 100% (1 min) > 100% (1min)] erfolgte die Dehydrierung und durch zweimalige Inkubation in Roti-Histol (jeweils 2 min) die Überleitung zum Wasser-freien Eindeckmittel. Zum Schluss wurden die Schnitte mittels Entellan und Deckgläsern eingedeckt und bei RT gelagert.

Die HE-Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Um den Grad der Schädigung zu bestimmen wurde ein Scoring-System festgelegt. Von allen 21 Patienten wurden pro Bedingung (Kontrolle, 300 mJ UV, 1mM Diclofenac) ein bis sieben Fotos der Epidermis am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Jedes Bild wurde verblindet nach folgendem Score bewertet:

Tabelle 12: Score zur Bewertung der epidermalen Schädigung. Skala = 100 μm .

Beispiel	Grad der Schädigung	Kriterien
	1	<ul style="list-style-type: none"> • Die Epidermis ist voll intakt • Es gibt keine strukturellen Auffälligkeiten
	2	<ul style="list-style-type: none"> • Die Epidermis beginnt sich vereinzelt von der Dermis zu lösen • Die Epidermis scheint aufgelockert, einzelne apoptotische bzw. Sonnenbrand-Zellen sind zu erkennen • Einige akantolytische Zellen sind vorhanden
	3	<ul style="list-style-type: none"> • Es findet eine subepidermale Spaltbildung statt • Die Anzahl an apoptotischen bzw. Sonnenbrand-Zellen hat deutlich zugenommen • Es sind mehrere akantolytische Zellen vorhanden • Die Epidermis beginnt dünner zu werden

3.2.10.2 Immunhistochemische Färbung von Katalase

Um die Redox-Regulation von Katalase in der Epidermis zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Gefrierschnitte zunächst 10 min bei RT getrocknet und für 10 min bei -20°C in eiskaltem Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Dako Waschpuffer (1x), je 5 min, wurde die endogene Peroxidase durch 3% Wasserstoffperoxid in destilliertem Wasser gehemmt (15 min). Nach erneutem Waschen folgte erst die Umrandung der Gefrierschnitte mit dem Dako-Fettstift und dann die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C (Kaninchen anti-human Katalase 1:200 in Antikörperverdünnung).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal je 5 min in Dako Waschpuffer (1x) gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden (Ziege anti-Kaninchen-biotiniliert 1:200 in Antikörperverdünnung). Zur Detektion des Antikörpers wurde die Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC Methode) genutzt. Hierzu wurden die Schnitte, nach drei weiteren Waschschritten mit Dako Waschpuffer (1x), mit Avidin-Biotin-Komplex Peroxidase in PBS mit 0,1% Tween 20 30 min bei RT inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem Substrat Nova Red. Dieses produziert ein rot-bräunliches Reaktionsprodukt, wenn es von der Peroxidase des ABC Komplexes umgesetzt wird. Auf eine Gegenfärbung der Zellkerne wurde hinsichtlich auswertungstechnischer Gründen verzichtet.

Nachdem die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und die Überleitung zum Wasser-freien Eindeckmittel durch Roti-Histol hergestellt wurde [50% > 70% (30 s) > 90% (1 min) > 100% (1 min) > 100% (1 min) > Roti-Histol (5 min) > Roti-Histol (5 min)], konnten sie mit Eukitt eingedeckt werden. Die Objektträger wurden bei RT gelagert.

Die Katalase-Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen (**Abb. 17**).

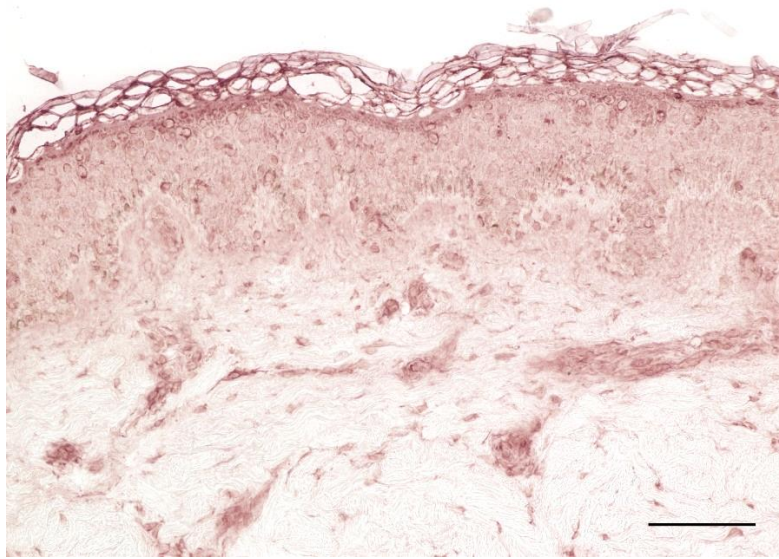


Abbildung 17: Beispielbild für die immunhistochemische Färbung von Katalase. Die Gefrierschnitte wurden in Aceton (-20°C) fixiert, in 3% Wasserstoffperoxid gehemmt und der Primärantikörper (Kaninchen anti-human Katalase 1:200 in Antikörperverdünnung) mittels Avidin-Biotin-Komplex Methode (ABC Methode) detektiert. Skala = 100 μm .

3.2.10.3 Simultane Immunfluoreszenzfärbung von Ki-67 und TdT-vermitteltes dUTP-biotin nick end labeling

Um proliferative und apoptotische Zellen darzustellen und Rückschlüsse auf den Grad der Hautschädigung zu ziehen, wurde eine Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67, sowie apoptotischer Zellkerne mittels TdT-vermitteltes dUTP-biotin *nick end labeling* (TUNEL), durchgeführt.

Zunächst wurden die unfixierten Gefrierschnitte 10 min bei RT getrocknet und 10 min bei RT in 1% Formaldehydlösung in PBS fixiert. Darauf wurden sie dreimal je 5 min in PBS gewaschen und in Ethanol-Eisessig (Verhältnis 2:1) für 5 min bei -20°C post-fixiert, bevor eine erneute dreimalige Waschung mit PBS durchgeführt wurde. Nun erfolgte die Umrandung der Gefrierschnitte mit einem Dako-Fettstift bevor sie mit je 20 μL Equibrilierungspuffer für 5 min bei RT inkubiert wurden. Danach wurden die Schnitte für die TUNEL Färbung mit dem TdT Enzym inkubiert. Hierzu wurde eine Reaktionslösung im Verhältnis 70% Reaktionspuffer und 30% TdT-Enzym angesetzt. Auf die Negativkontrolle wurde nur Reaktionspuffer gegeben. Es wurden 20 μL Enzym auf die Schnitte gegeben, mit *Coverslips* bedeckt und für 60 min bei 37°C (Wärmeschränk) inkubiert. Es empfiehlt sich die Stoppuffer-Lösung (68 mL destilliertes Wasser und 2 mL Stoppuffer) gleich mit in den Wärmeschränk zu stellen, um sie auf 37°C zu erwärmen. In dieser Stoppuffer-Lösung wurden die Schnitte 10 min bei 37°C inkubiert. Danach

fanden drei Waschschritte in PBS (jeweils 5 min bei RT), sowie die Präinkubation mit Ziegennormalserum (10% in PBS), statt. Die Inkubation des Maus anti Human Ki-67-Primärantikörpers bzw. der Negativkontrolle (2% Ziegennormalserum in PBS) erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am darauffolgenden Tag wurde der Antikörper durch dreimal Waschen in PBS (je 5 min) entfernt und die Schnitte mit dem ersten sekundären Fluorescein-markierter-anti-Digoxigenin-Antikörper inkubiert (48,7% Blockierlösung und 51,3% Antikörperlösung, 28 µL pro Schnitt, 30 min bei RT). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Ziege anti-Maus *Rhodamine Red* gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in PBS mit 2% Ziegennormalserum). Nach 45-minütiger Inkubationszeit wurde der Antikörper abgewaschen (dreimal je 5 min) und die Schnitte mit 4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)-Fluoromount G Medium eingebettet. Nachdem das Medium getrocknet war, konnte der Objektträger bei -20°C gelagert werden.

Alle Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen (**Abb. 18**).

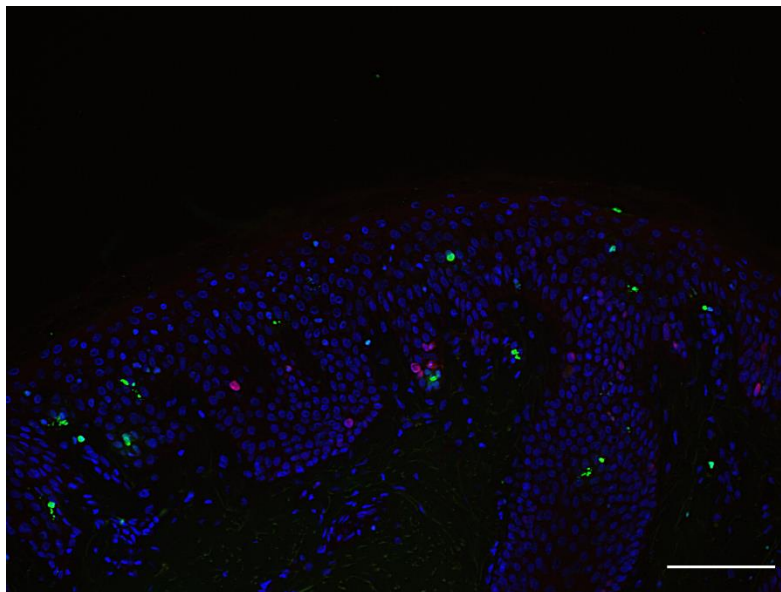


Abbildung 18: Beispielbild für die Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 (rot) und apoptotischer Zellen (grün; TUNEL). Die Gefrierschnitte wurden nach Trocknung erst in 1% Formaldehydlösung und dann in Ethanol-Eisessig (2:1) fixiert. Die TUNEL-Färbung erfolgte nach Hersteller-Anleitung mit dem ApopTag Fluorescein *In Situ Apoptosis Detection* Kit (Merck). Der Primärantikörper Ki-67 (gebrauchsfertig) wurde mittels *Rhodamine Red* (1:200 in PBS mit 2% Ziegennormalserum) detektiert. TUNEL = TdT-vermitteltes dUTP-biotin *nick end* labeling, TdT = terminale deoxynucleotidyl Transferase, dUTP = Desoxyuridintriphosphat, Skala = 100 µm.

3.2.10.4 Immunfluoreszenzfärbung von gespaltener Caspase 3, *nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*, Hitzeschockprotein 70 und 90

Um den Einfluss von Stress auf die Aktivierung der Apoptose (mittels gespaltene Caspase 3), die Abwehr von oxidativem Stress (über Nrf2), sowie das Hitzeschockprotein-System (mittels Hsp70 und Hsp90) auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der eben genannten Parameter durchgeführt.

Hierzu wurden die unfixierten Gefrierschnitte aus -80°C für 10 min bei RT getrocknet, bevor sie 10 min fixiert (gespaltene Caspase 3 bei -20°C in Aceton, Nrf2 bei RT in Roti-Histofix 4%) und dreimal mit PBS (gespaltene Caspase 3) bzw. Dako Waschpuffer (1x) (Nrf2) jeweils 5 min gewaschen wurden. Nachdem die Schnitte mit einem Dako-Fettstift umrandet wurden, folgte für gespaltene Caspase 3 eine Präinkubation mit Ziegennormalserum (5%) in PBS und 0,3% Triton X-100 für 60 min bei RT. Der Primärantikörper Kaninchen anti-human gespaltene Caspase 3 wurde 1:400 in PBS und 0,3% Triton X-100 verdünnt. Der Primärantikörper Kaninchen anti-human Nrf2 wurde 1:100 in Dako Antikörperverdünnung verdünnt. Beide Antikörper inkubierten über Nacht bei 4°C.

Darauf folgten drei Waschschrte je 5 min mit PBS bzw. Dako Waschpuffer, bevor der Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen AlexaFlour 488 auf die Schnitte gegeben wurde (gespaltene Caspase 3 1:800 in PBS mit 0,3% Triton X-100 und 2% Ziegennormalserum für 90 min bei RT; Nrf2 1:200 in Dako Antikörperverdünnung für 60 min bei RT). Nach erneutem dreimaligem Waschen à 5 min erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI (1µg/mL) für 1 min bei RT und erneut drei Waschschrte, bevor die Schnitte am Ende mit Fluoromount Medium eingedeckt werden konnten.

Die Immunfluoreszenzfärbung von Hsp70 und Hsp90 wurde mit Hilfe der Tyramid Signal Amplifikation durchgeführt. Hierzu erfolgte, nach dem Trocknen der Gefrierschnitte bei RT, der Fixierung in Roti-Histofix 4% bei RT für je 10 min und dreimaligem Waschen à 5 min mit Tris-NaCl-Tween 20 Puffer (TNT), die Hemmung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS für 15 min bei RT. Nach erneutem Waschen erfolgte die Umrandung der Gefrierschnitte mittels Dako-Fettstift, dann die Inkubation mit Avidin (15 min bei RT), dreimaliges Waschen je 5 min, die Inkubation mit Biotin (15 min bei RT) und wieder dreimaliges Waschen je 5 min, bevor die Schnitte mit 2% Ziegennormalserum in Tris-NaCl Blockierpuffer (TNB) für 30 min bei RT präinkubiert wurden. Der Primärantikörper Maus anti-human Hsp70 bzw. Kaninchen anti-human Hsp90 wurde 1:400 bzw. 1:200 in TNB und 2% Ziegennormalserum verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte nach drei Waschschritten (jeweils 5 min) mit TNT die Inkubation des Sekundärantikörpers für 45 min bei RT (Ziege anti-Maus-biotiniliert gebrauchsfertig bzw. Ziege anti-Kaninchen, 1:200 in TNB und 2% Ziegennormalserum). Nachdem die Schnitte erneut dreimal in TNT gewaschen wurden, erfolgte die Entwicklung der Färbung nach Angaben des Herstellers wie folgt: Inkubation mit Streptavidin konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) (1:100 in TNT) für 30 min bei RT, dreimal waschen mit TNT jeweils 5 min, Amplifikation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Tyramid (1:50 in Amplifikationsreagenz) für 5 min bei RT und erneutes Waschen mit TNT. Zum Schluss erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI (1 µg/mL) für 1 min bei RT und abschließend drei Waschschritte mit TNT, bevor die Schnitte mit Fluoromount Medium eingedeckt wurden. Nach Trocknen des Mediums wurden die Objektträger bei -20°C gelagert.

Alle Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung aufgenommen (**Abb. 19**).

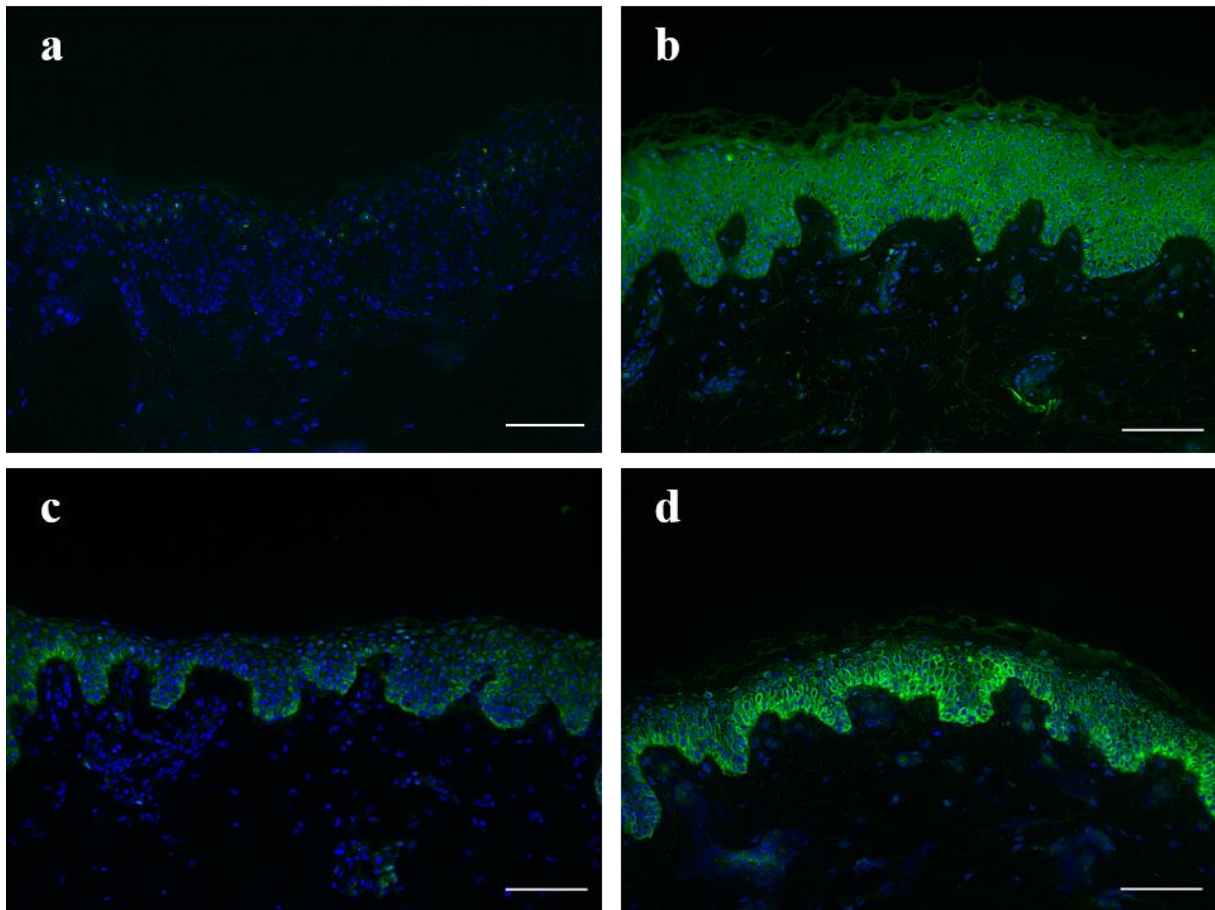


Abbildung 19: Beispielbilder für die Immunfluoreszenzfärbung von (a) Gespalteener Caspase 3, (b) Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2), (c) Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), (d) Hitzeschockprotein 90 (Hsp90). Gespaltene Caspase 3 und Nrf2: Die Gefrierschnitte wurden nach Trocknung erst in Aceton (-20°C) bzw. in 4% Roti-Histofix fixiert. Nach Präinkubation mit Ziegennormalserum (5% in PBS und 0,3% Triton X-100) erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers (Kaninchen anti-human gespaltene Caspase 3 1:400 in PBS und 0,3% Triton X-100; Kaninchen anti-human Nrf2 1:100 in Dako Antikörperverdünnung). Der Primärantikörper wurde mittels AlexaFlour 488 detektiert (gespaltene Caspase 3 1:800 in PBS mit 0,3% Triton X-100 und 2% Ziegennormalserum; Nrf2 1:200 in Dako Antikörperverdünnung). Hsp 70 und 90: Die Gefrierschnitte wurden nach Trocknung zunächst in 4% Roti-Histofix fixiert und dann die endogene Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid gehemmt. Es folgte eine Inkubation mit Avidin und Biotin, bevor die Schnitte in 2% Ziegennormalserum in Tris-NaCl Blockierpuffer (TNB) prä-inkubiert wurden. Die Detektion des Primärantikörpers (Maus anti-human Hsp70 bzw. Kaninchen anti-human Hsp90 1:400 bzw. 1:200 in TNB und 2% Ziegennormalserum) durch den Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus-biotiniliert gebrauchsfertig bzw. Ziege anti-Kaninchen, 1:200 in TNB und 2% Ziegennormalserum) wurde mit dem Tyramid Signal Amplifikations Kit nach Anleitung des Herstellers verstärkt. Skala = 100 µm.

3.2.11 Statistische Analyse

3.2.11.1 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Daten der Echtzeit-PCR werden als x-fache Änderung der Genexpression durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode dargestellt in Bezug auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH. Es wurden Triplikate von 19 Probanden verwendet.

Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Shapiro-Wilk- oder Kolmogorow-Smirnow-Test, abhängig von der Probengröße. Bei vorhandener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels *One Way ANOVA* und anschließendem Tukey's *multiple comparison* Test analysiert. Bei nicht-normalverteilten Proben erfolgte die Testung auf Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's *multiple comparison* Test.

Die Standardabweichung wird als + *standard error of the mean* (S.E.M.) dargestellt. Statistisch Signifikante Ergebnisse werden wie folgt gezeigt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ und **** $P < 0,0001$.

3.2.11.2 Immunhistochemie

Von der HE- und Immunfluoreszenzfärbung für gespaltene Caspase 3 und Ki-67/TUNEL wurden von allen 21 Probanden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung drei bis sieben Fotos pro Bedingung von der Epidermis gemacht, je nachdem wie groß die Hautprobe war. Die HE-Färbung wurde mittels eines Scores bewertet (**Tab. 12**). Gespaltene Caspase 3 und Ki-67/TUNEL positive Zellen wurden gezählt. Für die Quantifizierung der Fluoreszenz von Nrf2, Hsp70 und Hsp90, sowie der immunhistochemischen Färbung von Katalase, wurden von allen 21 Probanden am Fluoreszenzmikroskop BIOREVO BZ-9000 in 200-facher Vergrößerung zwei bis sieben Fotos der Epidermis pro Bedingung aufgenommen. Von jedem Foto wurde mittels der Software ImageJ 1.52q die Fluoreszenz- bzw. Farbintensität in sechs definierten Bereichen gemessen.

Die Daten wurden in GraphPad Prism 7 statistisch ausgewertet. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte durch den Kolmogorow-Smirnow-Test. Bei vorhandener Normalverteilung wurde die Signifikanz mittels *One Way ANOVA* und anschließendem Tukey's *multiple comparison* Test analysiert. Bei nicht-normalverteilten Proben erfolgte die Testung auf Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunn's *multiple comparison* Test. Die Standardabweichung wird als + *standard error of the mean* (S.E.M.) dargestellt. Statistisch Signifikante Ergebnisse werden wie folgt gezeigt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ und **** $P < 0,0001$.

3.2.12 Generierung von genetisch definierten immortalisierten Keratinozyten-Zelllinien

Aus den beiden anderen Stanzbiopsien der Probanden isolierte die Firma acCELLerate GmbH durch Kollagenaseverdau möglichst reine Populationen von Keratinozyten aus der Epidermis. Diese wurden über 1-2 Passagen kultiviert und unter kontrollierten Bedingungen kryokonserviert und bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert (Masterzellbank der primären Keratinozyten).

Die Immortalisierung dieser primären Keratinozyten wurde von der Firma Upcyte Technologies GmbH durch lentivirale Transduktion mit verschiedenen, von Upcyte Technologies empirisch ausgewählten, wachstumsstimulierenden und die Genexpression stabilisierenden Genen durchgeführt. In Studien von Upcyte wurde an Leberzellen gezeigt, dass diese Methode die Expression, der für dieses Projekt relevanten Enzym- und Transportergene, besonders gut konserviert. Eine Eignung der Methode für Keratinozyten wurde ebenfalls gezeigt (Levy *et al.*, 2015). Leider wuchsen sechs der 21 Keratinozytenzelllinien nach der Isolierung nicht an oder konnten nicht immortalisiert werden, sodass eine weitere Verwendung nicht möglich war.

Die transduzierten Zellen wurden wieder an die Firma acCELLerate GmbH übergeben, welche daraufhin mittels Immunfluoreszenzmarkierung Keratinozyten-spezifischer Marker sicherstellten, dass die Zelllinien ihren Ursprung in Keratinozyten haben (und nicht in z.B. kontaminierenden Fibroblasten) und noch deren wesentliche Eigenschaften aufweisen. Anschließend wurden die Zelllinien für 25 weitere Zellverdopplungen kultiviert, um die Immortalisierung der Zellen zu bestätigen.

Um mögliche spenderabhängige Unterschiede in den Entgiftungsstoffwechselwegen der 21 Keratinozyten-Zelllinien zu identifizieren, wurde die Aktivierung des Signalwegs für oxidativen Stress über Nrf2 unter Einfluss von Diclofenac untersucht. Für den Nrf2-Aktivierungsassay wurden die Zellen mit einem Reporterplasmid transient transfiziert. Das Plasmid ermöglicht eine durch Nrf2 aktivierte Expression von Luciferase in den Zellen. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Referenzsubstanzen behandelt und die Stärke der Luciferase als Maß der dosisabhängigen Stressantwort gemessen. Parallel dazu wird die Toxizität der Substanzen durch Messung der metabolischen Aktivität der Zellen als Maß für deren Vitalität bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf die Morphologie und die Apoptose der Epidermis

4.1.1 UV-Bestrahlung sowie Inkubation mit Diclofenac schädigen die Haut

Ziel war es ein Hautorgankultur-Modell zu entwickeln, in dem die Epidermis der Probanden durch die Noxe Diclofenac zwar geschädigt wird, der größte Teil der Zellen jedoch vital bleibt und nicht in die Apoptose geht.

Drei bis sieben immunhistochemische Bilder der HE-gefärbten Epidermis von jedem der 21 Probanden wurden verblindet nach einem festgelegten Score bewertet (**Tab. 12**). Die Testung der 21 Mittelwerte pro Bedingung mit dem Kruskal-Wallis-Test ergab eine Signifikanz der Gesamtwerte (** $P < 0,01$).

Der durchschnittliche Score des nicht behandelten Kontrollgewebes liegt bei 1,3. Ein Wert von 1 bedeutet, dass die Epidermis vollkommen intakt ist. Durch die Kultivierung über 48 h entstehen also keine nennenswerten Schädigungen hinsichtlich der epidermalen Morphologie. Im Gegensatz dazu zeigt UV-bestrahlte Epidermis eine erhöhte Anzahl apoptotischer bzw. Sonnenbrand-Zellen, sowie strukturelle Veränderungen. Ein Wert im Score-System von 1,7 zeigt, dass eine signifikante Schädigung der Epidermis stattgefunden hat (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$).

Diclofenac weist mit einem Wert von 1,9 eine etwas höhere, aber nicht signifikante, Schädigung auf als UV-bestrahlte Epidermis. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Epidermis durch die Inkubation mit Diclofenac jedoch signifikant geschädigt (Dunn's *multiple comparison* Test ** $P < 0,01$) (**Abb. 20**).

Die Auswertung der HE-Färbung für die einzelnen Probanden befindet sich im **Anhang 6**. Hier wiesen 16 von 21 Proben (76,2%) eine erhöhte Schädigung nach UV-Bestrahlung auf im Vergleich zur Kontrolle. Auch unter Behandlung mit Diclofenac zeigten 17 der 21 (81%) Proben eine höhere Schädigung. Vier Hautproben zeigten jeweils eine gleiche Schädigung unter UV-Einfluss oder Diclofenac im Vergleich zur Kontrolle (UV-Behandlung: Proband 059, 072, 084, 089; Diclofenac: Proband 031, 072, 078, 084). Lediglich Proband 051 wies tendenziell eine geringere Schädigung unter UV-Behandlung auf im Vergleich zur Kontrolle auf. Proband 088 zeigte unter Diclofenac eine geringere Schädigung (nicht signifikant).

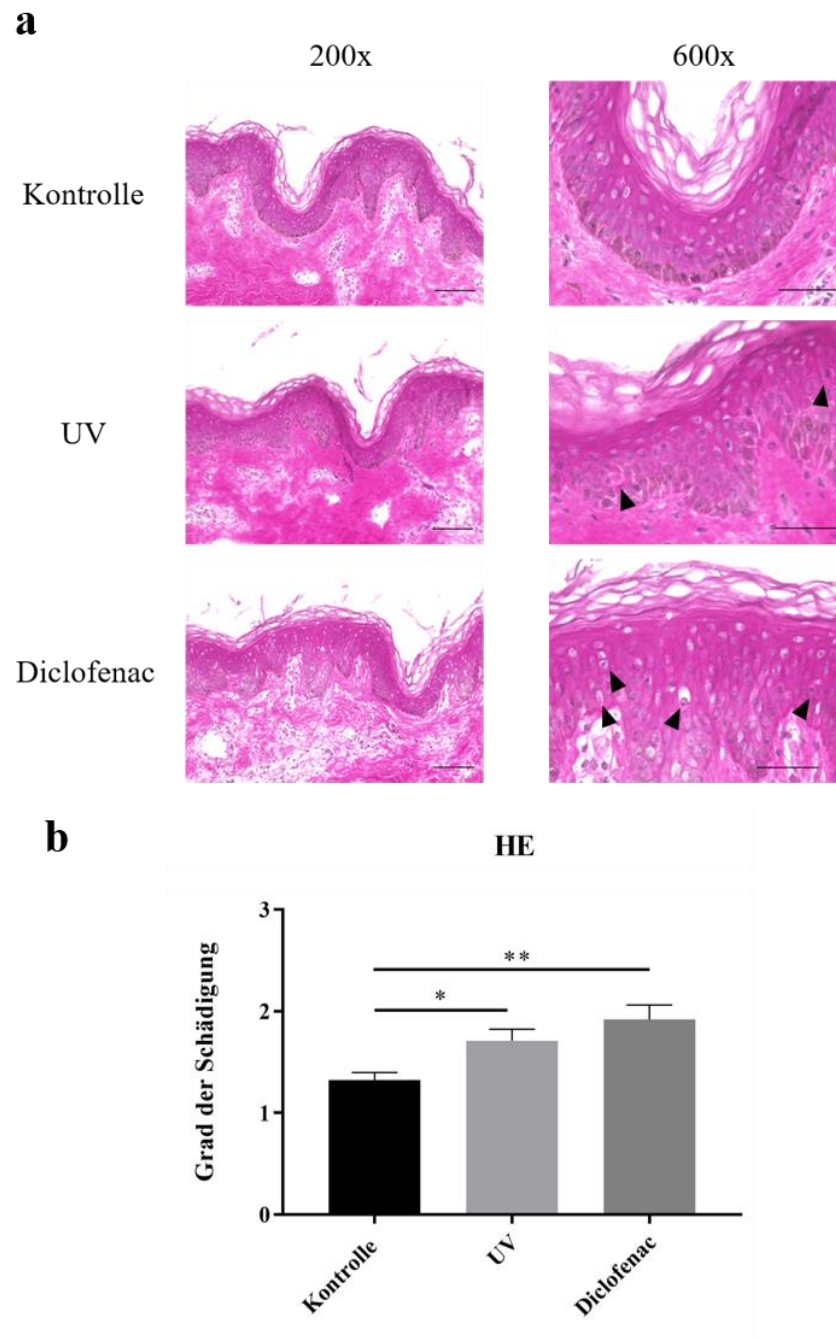


Abbildung 20: Grad der Epidermisschädigung durch die Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Behandlung mit Diclofenac. (a) Visualisierung der schädigenden Effekte von UV-Licht (300 mJ/cm²) und Diclofenac (1 mM) auf die Epidermis durch eine Hämatoxylin/Eosin (HE) Färbung in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Man erkennt eine Veränderung der Struktur im Gegensatz zur Kontrolle hinsichtlich der Auflockerung des Gewebes, apoptotischer Zellen/Sonnenbrand-Zellen und subepidermaler Spaltbildung (▲). Skala = 100 µm (200-fach) bzw. 50 µm (600-fach). (b) Bewertet wurde die strukturelle Veränderung der Epidermis verblindet nach einem Score mit den Werten 1 (für intakte Epidermis) bis 3 (stark geschädigte Epidermis) von zwei bis sieben Bildern pro Bedingung und Proband; n = 21, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Test auf Signifikanz durch Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (** P < 0,01). UV-Bestrahlung und Inkubation mit Diclofenac zeigten eine signifikante Schädigung der Epidermis im Vergleich zur Kontrolle (Dunn's *multiple comparison* Test * P < 0,05 bzw. ** P < 0,01).

4.1.2 Behandlung mit UV-Licht und mit Diclofenac fördert Apoptose

Durch die Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 und durch TdT-vermitteltes dUTP-biotin *nick end labeling* (TUNEL) sollten die Auswirkungen von UV-Licht und Diclofenac auf die Epidermis hinsichtlich Proliferation und Apoptose untersucht werden.

Die Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen wurden in drei bis sieben Immunfluoreszenzbildern (Ki-67/TUNEL) für jeden Probanden in der Epidermis gezählt. Die Mittelwerte der 21 Probanden wurden pro Bedingung mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch getestet und ergaben eine Signifikanz von **** P < 0,0001.

In der Kontrolle sind mehr proliferative und nur vereinzelt apoptotische Zellen zu erkennen (** P < 0,001). Außerdem befinden sich hier weniger apoptotische als proliferative Zellen im Vergleich zur UV- (** P < 0,001) oder Diclofenac-Behandlung (** P < 0,01). Tendenziell nimmt die Anzahl an proliferativen Zellen im Vergleich zur Kontrolle unter Einfluss von Diclofenac ab (nicht signifikant), unter UV-Bestrahlung bleibt sie annähernd gleich. Unter UV-Licht-Behandlung steigt die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle tendenziell an, wenn auch nicht signifikant. Die Behandlung mit Diclofenac zeigte eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle (**** P < 0,0001). Hier wurden mehr apoptotische Zellen gezählt als unter UV-Licht-Behandlung (* P < 0,05) (**Abb. 21**).

Eine Übersicht der Ki-67/TUNEL-Färbung aller Probanden befindet sich im **Anhang 6**. Hier zeigten sich im nicht behandelten Gewebe bei allen Probanden mehr proliferative als apoptotische Zellen. Bei 12 von 21 Proben (57,1%) nimmt die Zahl an proliferativen Zellen unter UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle ab, bei den restlichen 9 (42,9%) nimmt sie zu oder bleibt gleich. Auch nach Behandlung mit Diclofenac zeigten 11 von 21 Proben (52,4%) eine abnehmende Anzahl an proliferativen Zellen im Vergleich zur Kontrolle, 10 (47,6%) hingegen eine zunehmende Anzahl.

Bei der Mehrheit der Probanden (17 von 21, 81%) waren unter UV-Licht mehr apoptotische Zellen vorhanden als im Kontrollgewebe. Bei Proband 014, 031, 036 und 088 wurden weniger apoptotische Zellen detektiert. Bei Diclofenac zeigte sich ein ähnliches Bild, 18 von 21 Proben (85,7%) wiesen mehr apoptotische Zellen auf, lediglich drei Probanden (021, 078 und 088; 14,3%) zeigten eine geringere oder gleiche Anzahl von apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

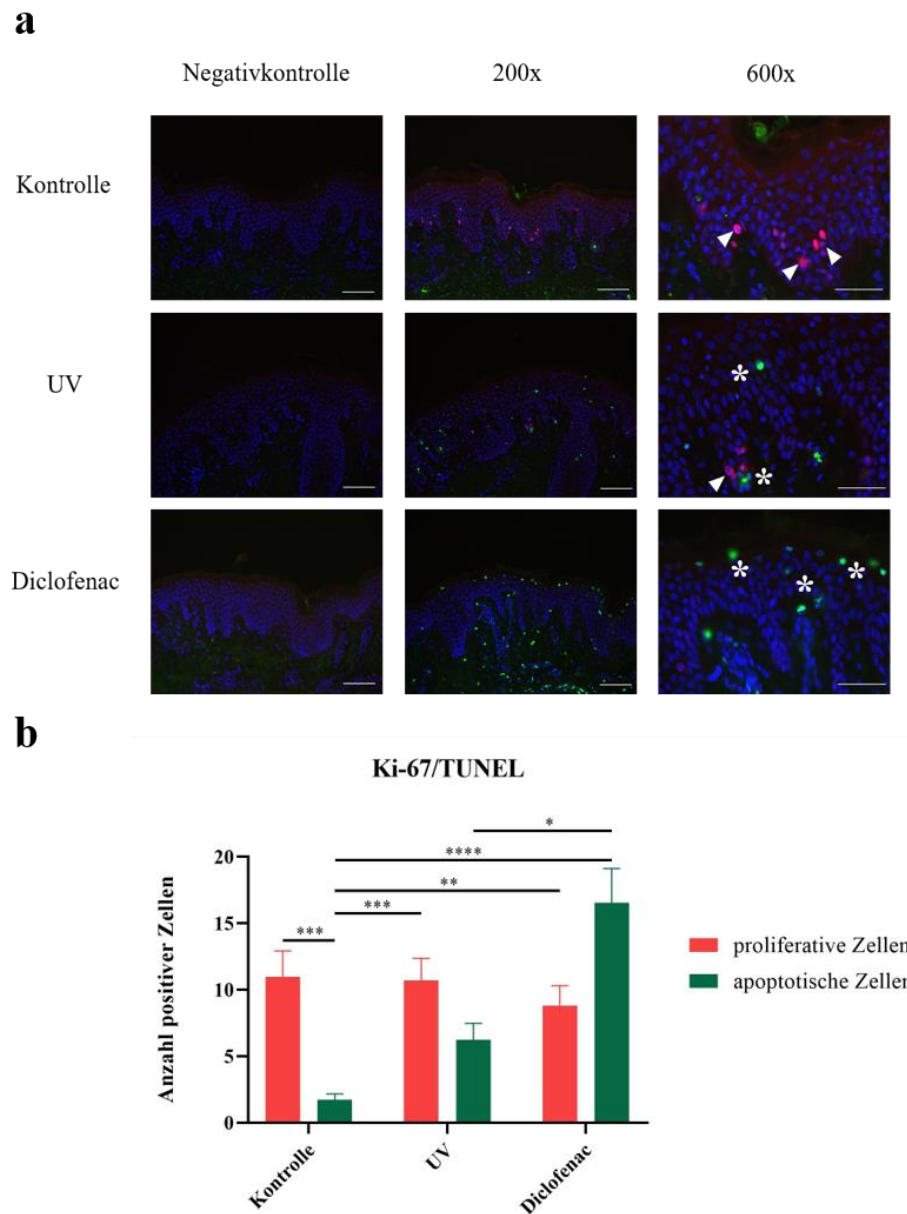


Abbildung 21: Förderung der Apoptose in der Epidermis durch die Behandlung mit ultravioletter (UV) Licht und Diclofenac. (a) Visualisierung von proliferativen (rot Δ), sowie apoptotischen (grün $*$) Zellen in der Epidermis unter UV-Licht-Behandlung (300 mJ/cm^2) und Diclofenac-Behandlung (1 mM) durch die Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 bzw. durch TdT-vermitteltes dUTP-biotin *nick end labeling* (TUNEL) in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Negativkontrolle ohne Primärantikörper. TdT = Terminale deoxynucleotidyl Transferase, dUTP = desoxyuridintriphosphat, Skala = $100 \mu\text{m}$ (200-fach) bzw. $50 \mu\text{m}$ (600-fach). (b) Pro Bedingung und Proband wurden in zwei bis sieben Immunfluoreszenzbildern die positiven Zellen gezählt; $n = 21$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Test der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). In der Kontrolle sind mehr proliferative als apoptotische Zellen vorhanden (Dunn's *multiple comparison* Test *** $P < 0,001$). Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die Diclofenac-Behandlung die meisten apoptotischen Zellen (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). Unter UV-Bestrahlung entstehen weniger apoptotische Zellen als bei der Behandlung mit Diclofenac (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$).

4.1.3 Der Apoptosemarker Caspase 3 wird vor allem unter UV-Bestrahlung in der Epidermis gespalten

Durch den Apoptosemarker gespaltene Caspase 3 sollte der Apoptosesignalweg unter UV-Licht- und Diclofenac-Behandlung untersucht werden. Caspase 3 wird unter Einwirkung von Stressoren im Rahmen der extrinsischen oder intrinsischen Apoptose gespalten.

In drei bis sieben Immunfluoreszenzbildern pro Probanden und Bedingung wurde die Anzahl der positiven Zellen (gespaltene Caspase 3) in der Epidermis gezählt. Alle Mittelwerte der 21 Probanden wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch getestet und ergaben eine Signifikanz von **** $P < 0,0001$.

Gespaltene Caspase 3 wird kaum in unbehandelter Haut detektiert, jedoch unter UV-Strahlung (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). Generell wird mehr gespaltene Caspase 3 unter UV-Bestrahlung generiert als bei Behandlung mit Diclofenac (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). Unter Behandlung mit Diclofenac wird, ähnlich zur Kontrolle, kaum gespaltene Caspase 3 detektiert (**Abb. 22**).

Die Auswertung der gespaltenen Caspase 3-Färbung für die einzelnen Probanden befindet sich im **Anhang 6**. Alle 21 Probanden wiesen keine oder eine sehr geringe Anzahl an Zellen mit positivem Signal für gespaltene Caspase 3 im Kontrollgewebe auf. Bei allen Probanden wurde die Anzahl an positiven Zellen unter UV-Licht deutlich erhöht. Unter Behandlung von Diclofenac wiesen jedoch nur 11 Probanden (52,4%) eine sehr geringe Anzahl von positiven Zellen auf, acht davon (72,7%) mehr im Vergleich zur Kontrolle.

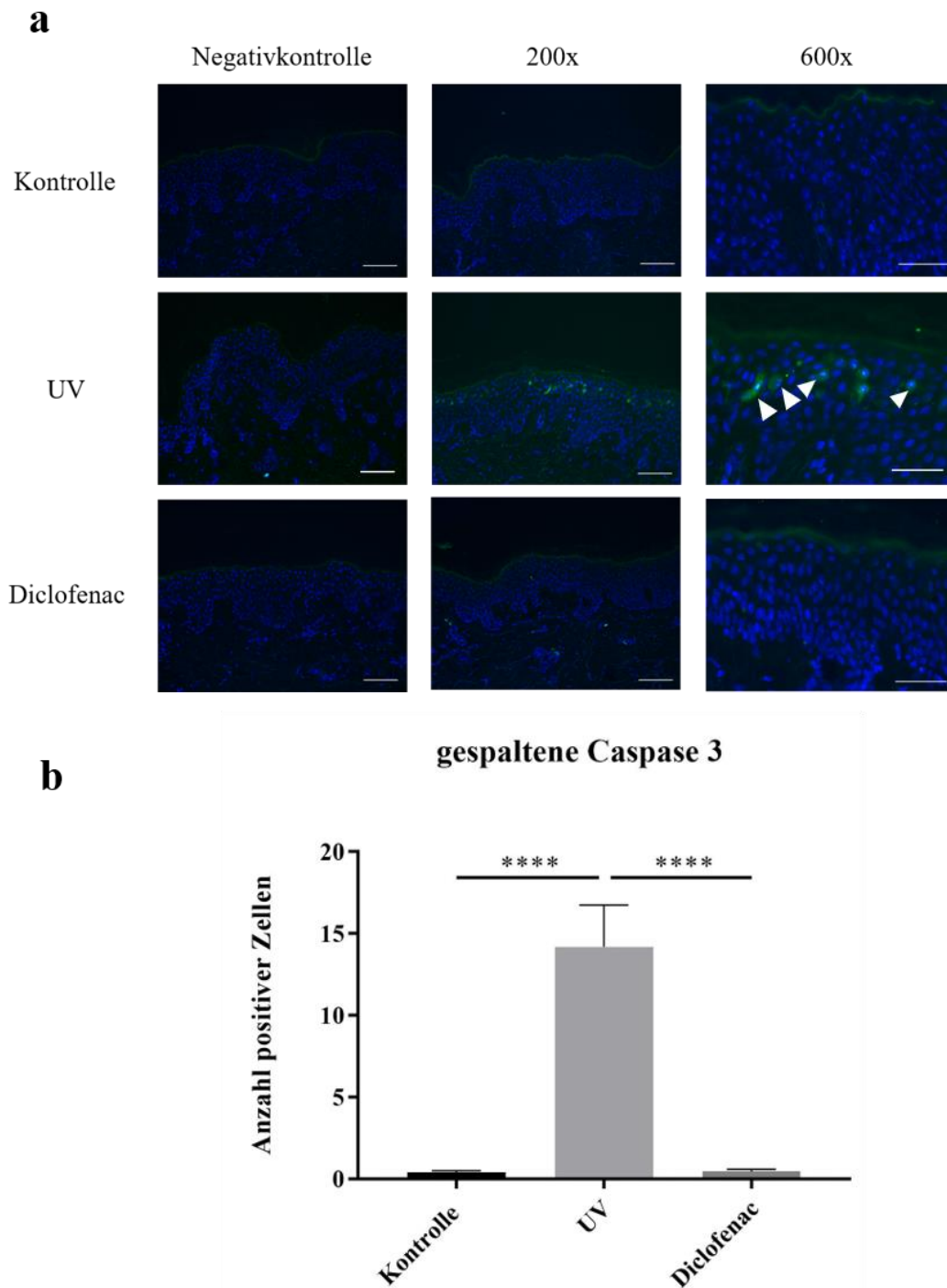


Abbildung 22: Caspase 3 wird vorwiegend unter UV-Bestrahlung gespalten. (a) Färbung von gespaltenen Caspase 3 (Δ) in der Epidermis unter UV-Licht (300 mJ/cm^2) und Diclofenac-Behandlung (1 mM) in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Skala = $100 \mu\text{m}$ (200-fach) bzw. $50 \mu\text{m}$ (600-fach). Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (b) Pro Bedingung und Proband wurden in zwei bis sieben Immunfluoreszenzbildern die positiven Zellen gezählt; $n = 21$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Test der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). Im Vergleich zur Kontrolle wird Caspase 3 vorwiegend unter Einfluss von UV-Licht gespalten (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). Die Diclofenac-Behandlung zeigt eine geringere Anzahl an positiven Zellen als unter UV-Behandlung (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$).

4.2 Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf das Entgiftungssystem der Epidermis

Die Expression von Katalase, Nrf2, Hsp70 und Hsp90 wurde nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf Genebene mittels Echtzeit-PCR bestimmt. Hier wurden die Gene CAT (Katalase), NFE2L2 (Nrf2), HSPA4 (Hsp70) und HSP90AA1 (Hsp90) untersucht.

Zwei der 21 Proben (014 und 088) sind in der mRNA Isolation ausgefallen. Die Konzentration und Reinheit der mRNA nach Isolation für 19 Probanden befinden sich im **Anhang 4**. Der Wert 260/280 gibt Rückschlüsse auf die Reinheit der isolierten RNA bezüglich Verunreinigungen mit gDNA und/oder Proteinen. Bei reiner RNA liegt das Verhältnis ca. bei 2,0.

4.2.1 Die Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase wird durch UV-Bestrahlung herunterreguliert, die Proteinexpression jedoch erhöht

Katalase ist ein antioxidatives Enzym und schützt die Zelle vor Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies. Diese entstehen durch den Einfluss von UV-Strahlung und dem Abbau von Xenobiotika. Durch die Untersuchung von Katalase sollten Rückschlüsse auf das Verhalten des Redox-Systems unter Einwirkung dieser Stressoren gezogen werden.

Mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode konnte festgestellt werden, dass unter Einfluss von UV-Licht und Diclofenac eine signifikante Änderung der relativen Genexpression von Katalase erfolgt (Kruskal-Wallis-Test **** P < 0,0001). Im Vergleich zur Kontrolle wird Katalase unter UV-Licht-Behandlung 0,4-fach herunter- bzw. unter Diclofenac tendenziell 0,2-fach hochreguliert (Dunn's *multiple comparison* Test **** P < 0,0001). Die Behandlung mit Diclofenac oder UV-Licht zeigt einen signifikanten Unterschied (Dunn's *multiple comparison* Test **** P < 0,0001) (**Abb. 23**).

Eine Darstellung der PCR-Ergebnisse für alle 19 Probanden befindet sich im **Anhang 5**. Lediglich Proband 021 zeigte in der Genexpression tendenziell eine Erhöhung von Katalase unter UV-Bestrahlung (0,9-fach, nicht signifikant), ansonsten ist die Expression von Katalase bei allen Probanden reduziert.

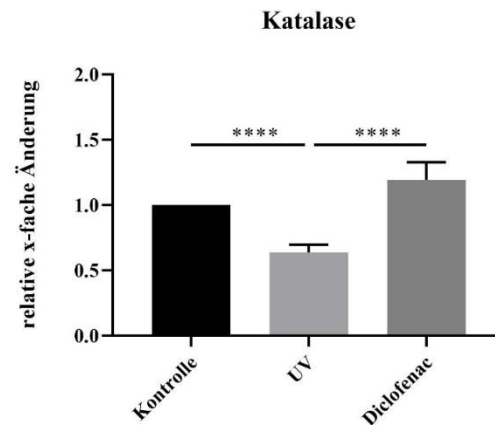


Abbildung 23: Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac. Die TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde mit dem *Fast Advanced* Mastermix (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode in Bezug auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es wurden Triplikate verwendet; $n = 19$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow Test, Überprüfung der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). Unter UV-Licht (300 mJ/cm^2) wird Katalase 0,4-fach herunter-, unter Diclofenac (1 mM) tendenziell 0,2-fach hochreguliert (*Dunn's multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$).

Ein anderes Bild zeigte sich jedoch auf Proteinebene. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung der Katalase-Expression wurde in zwei bis sieben Bildern pro Bedingung und Proband mittels der Software ImageJ 1.52q in sechs definierten Bereichen pro Bild gemessen und auf die Kontrolle normalisiert. Die Testung aller sechs Werte pro Bild von 21 Probanden ergab mit dem Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz von * $P < 0,05$.

Im Gegensatz zur Genregulation zeigt sich bei der Untersuchung der Proteinexpression unter UV-Bestrahlung eine signifikante Erhöhung von Katalase um 1,3% (*Dunn's multiple comparison* Test * $P < 0,05$). Die Expression bei Behandlung mit Diclofenac ist um 4,6% höher, jedoch nicht signifikant (**Abb. 24**).

Eine Darstellung der nicht normalisierten Werte der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbung für alle 21 Probanden befindet sich im **Anhang 6**. Proband 006, 051, 059, 072 und 079 zeigen in der Kontrolle eine vermehrte Immunreaktivität von Katalase.

Es ist auffällig, dass unter Behandlung mit Diclofenac Katalase sowohl in der Gen-, als auch Proteinexpression eine sehr individuelle Regulation innerhalb der Probanden zeigt.

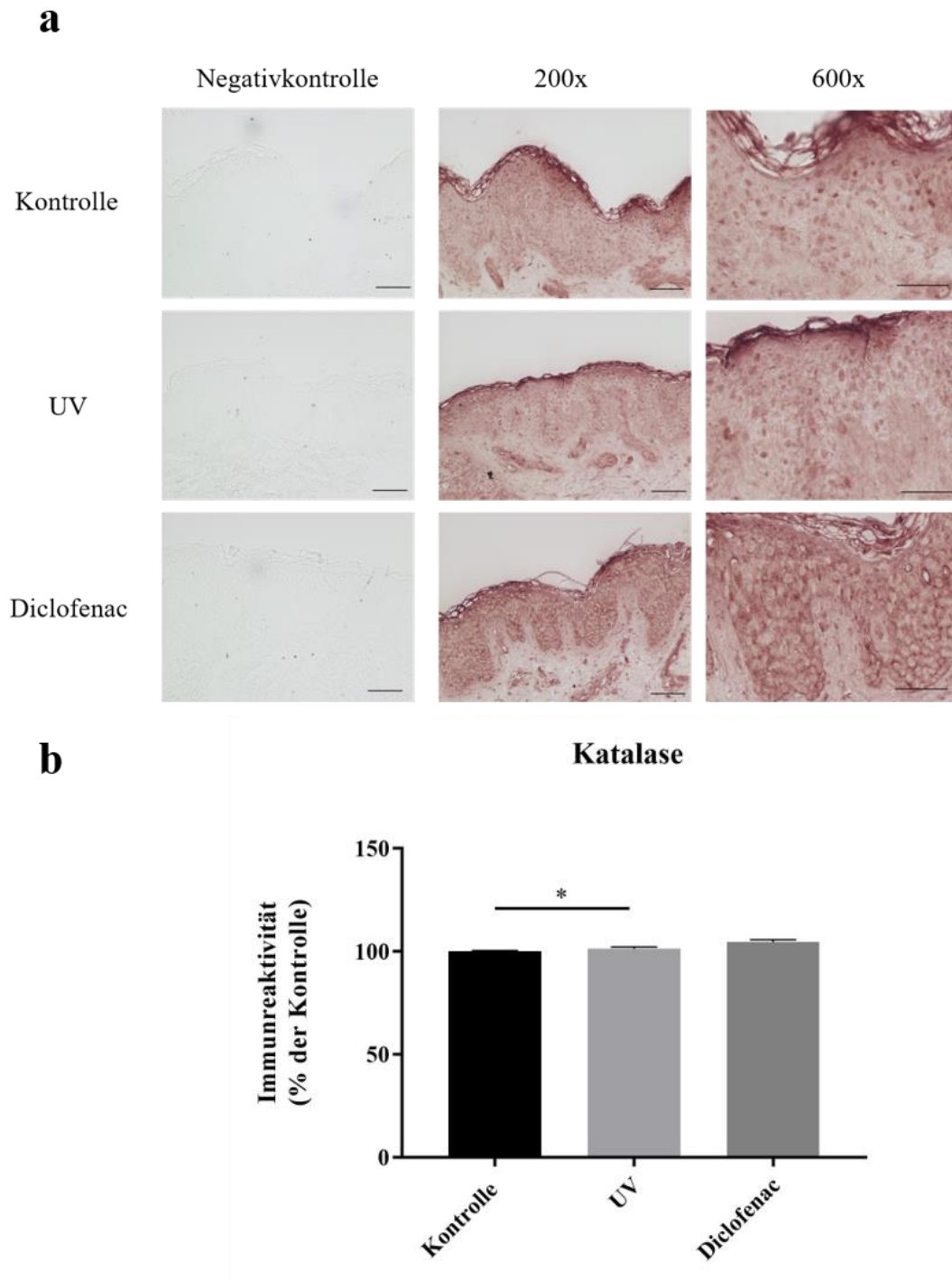


Abbildung 24: Erhöhung der Proteinexpression des antioxidativen Enzyms Katalase in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht und Diclofenac. (a) Immunhistochemische Färbung von Katalase unter Einfluss von UV-Licht (300 mJ/cm²) bzw. Diclofenac (1 mM) in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Skala = 100 µm (200-fach) bzw. 50 µm (600-fach). Negativkontrolle ohne Primäntikörper. (b) Pro Bedingung wurde bei drei bis sieben immunhistochemischen Bildern in sechs definierten Bereichen pro Proband die Intensität der Fluoreszenz mittels der Software ImageJ 1.52q gemessen; n = 21, + SEM, Test auf Normalverteilung der Einzelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Test der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** P < 0,0001). Unter UV-Licht-Behandlung wird die Expression von Katalase um 1,3% erhöht (Dunn's *multiple comparison* Test * P < 0,05), unter Diclofenac um 4,6% (Dunn's *multiple comparison* Test nicht signifikant).

4.2.2 Der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* wird sowohl auf Gen- als auch Proteinebene unter UV-Licht und Diclofenac hochreguliert

Nrf2 ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren. Er schützt die Zelle vor oxidativem Stress und reguliert die Expression wichtiger antioxidativer und detoxifizierender Proteine, wie z.B. Phase II Enzyme. Deshalb wurde die Gen- und Proteinexpression von Nrf2 untersucht.

Die Triplikate der TaqMan Echtzeit-PCR wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode ausgewertet und mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz überprüft (**** $P < 0,0001$).

Die Genexpression von Nrf2 wird durch UV-Bestrahlung 0,2-fach hochreguliert (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$), durch die Behandlung mit Diclofenac 1,7-fach (**** $P < 0,0001$). Diclofenac zeigt im Vergleich zu UV-Licht eine höhere Genregulation von Nrf2 (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$) (**Abb. 25**).

Eine Darstellung der PCR-Ergebnisse aller 19 Probanden befindet sich im **Anhang 5**. Proband 006 zeigte eine verminderte Nrf2-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle unter Behandlung mit UV-Licht und Diclofenac, ebenso Proband 059.

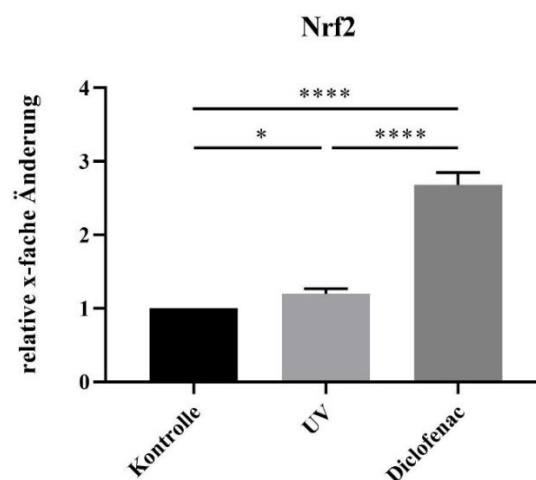


Abbildung 25: Genexpression des nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac. Die TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde mit dem *Fast Advanced Mastermix* (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode in Bezug auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es wurden Triplikate verwendet; $n = 19$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow Test, Überprüfung der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). Unter UV-Licht (300 mJ/cm^2) wird Nrf2 0,2-fach (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$) und durch Behandlung mit Diclofenac (1 mM) 1,7-fach (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$) hochreguliert.

Auf Proteinebene zeigte sich eine ähnliche Regulation von Nrf2 wie auf Genebene. Die Intensität der Immunreaktivität wurde in zwei bis sieben Bildern pro Bedingung und pro Proband mittels der Software ImageJ 1.52q in sechs definierten Bereichen gemessen und auf die Kontrolle normalisiert. Die Testung aller sechs Werte pro Bild von 21 Probanden ergab mit dem Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz von **** $P < 0,0001$.

Auch hier wird Nrf2 unter UV-Bestrahlung und Diclofenac-Inkubation vermehrt exprimiert. Durch UV-Bestrahlung zeigt sich ein Anstieg der Immunreaktivität von 17,9% (Dunn's *multiple comparison* Test ** $P < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Diclofenac bewirkt ebenfalls eine höhere Immunreaktivität von 9,9% (Dunn's *multiple comparison* Test nicht signifikant) im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 26**). Die Behandlung mit Diclofenac oder UV-Licht zeigt auch auf Proteinebene einen signifikanten Unterschied (Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$)

Im **Anhang 6** befindet sich die Auswertung nicht normalisierter Ergebnisse der Nrf2-Färbung aller 21 Probanden.

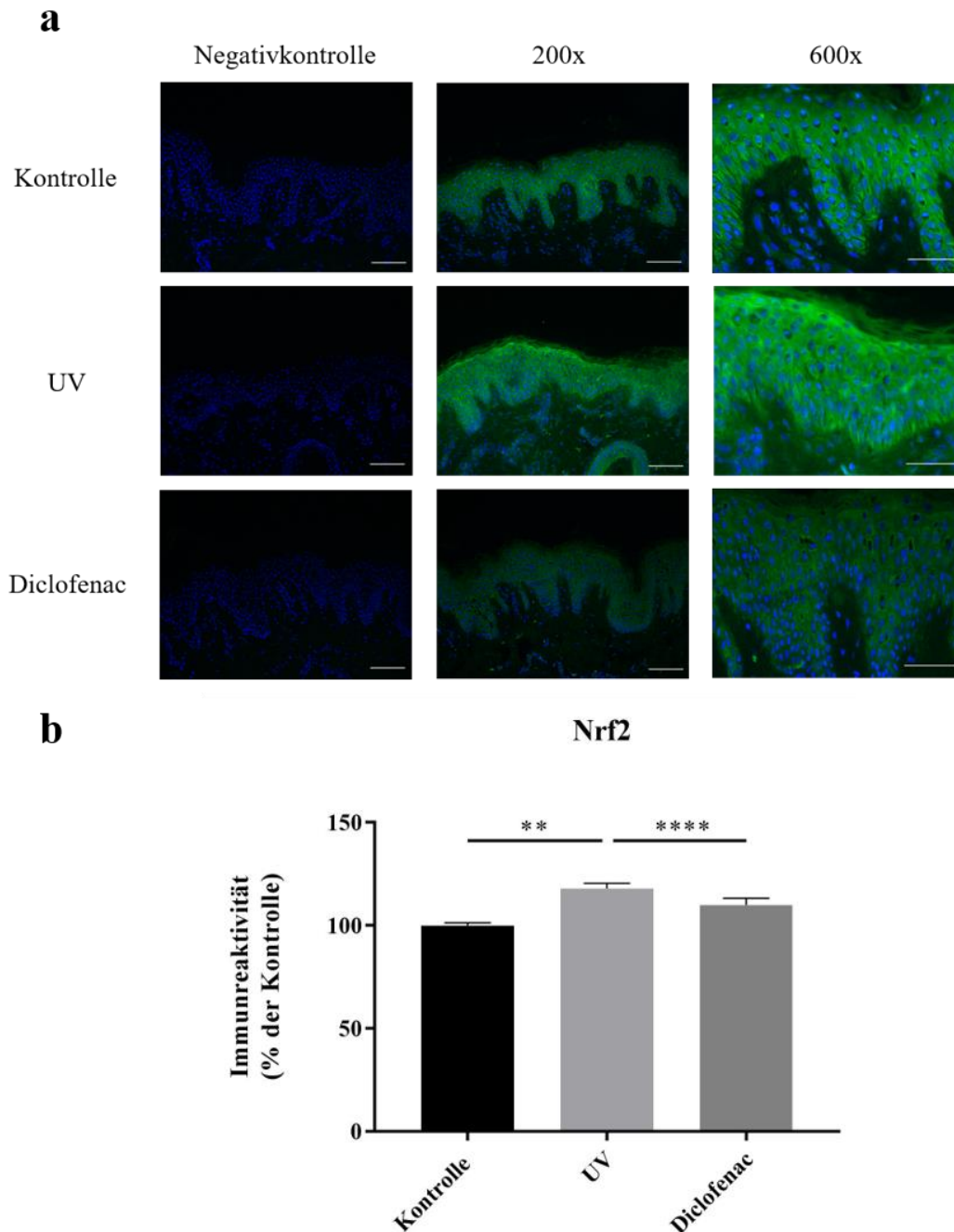


Abbildung 26: Erhöhung der Proteinexpression des nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht und Diclofenac. (a) Visualisierung der Immunfluoreszenzfärbung von Nrf2 unter Einfluss von UV-Licht (300 mJ/cm^2) und Diclofenac (1 mM) in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Skala = $100 \mu\text{m}$ (200-fach) bzw. $50 \mu\text{m}$ (600-fach). Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (b) Pro Bedingung und Proband wurde bei drei bis sieben Immunfluoreszenzbildern in sechs definierten Bereichen die Intensität der Fluoreszenz mittels der Software ImageJ 1.52q gemessen; $n = 21$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Einzelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Testung der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). Unter UV-Licht wird die Expression von Nrf2 um 17,9% erhöht (Dunn's *multiple comparison* Test ** $P < 0,01$), unter Diclofenac um 9,9% (Dunn's *multiple comparison* Test nicht signifikant).

4.2.3 Das Hitzeschockprotein-System wird auf Genebene vor allem durch Diclofenac hochreguliert

Hsp70 und Hsp90 sind Mitglieder des Hitzeschockprotein-Systems und nehmen Einfluss auf Homöostase, Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle. Sie sind verantwortlich für die Faltung neu synthetisierter Proteine und Interaktion mit signaltransduzierenden Proteinen. Deshalb gibt die Untersuchung dieser Hitzeschockproteine einen Aufschluss über die Reaktion der Epidermis auf Stressoren wie UV-Licht und Diclofenac.

Die Triplikate der TaqMan Echtzeit-PCR wurden mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode ausgewertet und sowohl für Hsp70 als auch Hsp90 mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz über alle Werte überprüft (jeweils **** P < 0,0001).

Die Genexpression von Hsp70 und Hsp90 zeigt unter UV-Licht- und Diclofenac-Behandlung eine ähnliche Regulation, wobei Hsp90 deutlich stärker exprimiert wird. Bei Bestrahlung der Epidermis mit UV-Licht erfolgte eine 0,8-fache Erhöhung der Genexpression von Hsp70 (Dunn's *multiple comparison* Test ** P < 0,01), sowie eine zwar höhere, aber nicht signifikante 0,5-fache Erhöhung der Hsp90 Genexpression. Unter Einfluss von Diclofenac erfolgte sowohl für Hsp 70, als auch Hsp90 die größere Erhöhung der Genexpression im Vergleich zur UV-Bestrahlung (jeweils Dunn's *multiple comparison* Test **** P < 0,0001). Vergleicht man die Änderung der Genexpression unter Einfluss von Diclofenac mit der Kontrolle, lässt sich sowohl für Hsp70 als auch Hsp90 eine eindeutige Hochregulation feststellen. Hsp70 wird 5,1-fach und Hsp90 31,4-fach erhöht (jeweils Dunn's *multiple comparison* Test **** P < 0,0001) (**Abb. 27**).

Im **Anhang 5** befindet sich eine genaue Auswertung der Echtzeit-PCR für Hsp70 und Hsp90 aller 19 Probanden. Hier ist zu erkennen, dass die Genexpression von Hsp70 im Vergleich zur Kontrolle unter Diclofenac bei allen Probanden, außer Proband 006, erhöht ist. Die Genexpression bei Diclofenac-Behandlung ist auch im Vergleich zur UV-Behandlung immer höher, nur bei Proband 078 nicht. In Bezug auf die Kontrolle wird Hsp90 unter Diclofenac immer vermehrt exprimiert und zeigt auch eine höhere Genexpression, als unter UV-Behandlung. Bei acht von 19 Proben wird Hsp90 unter UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle vermindert exprimiert.

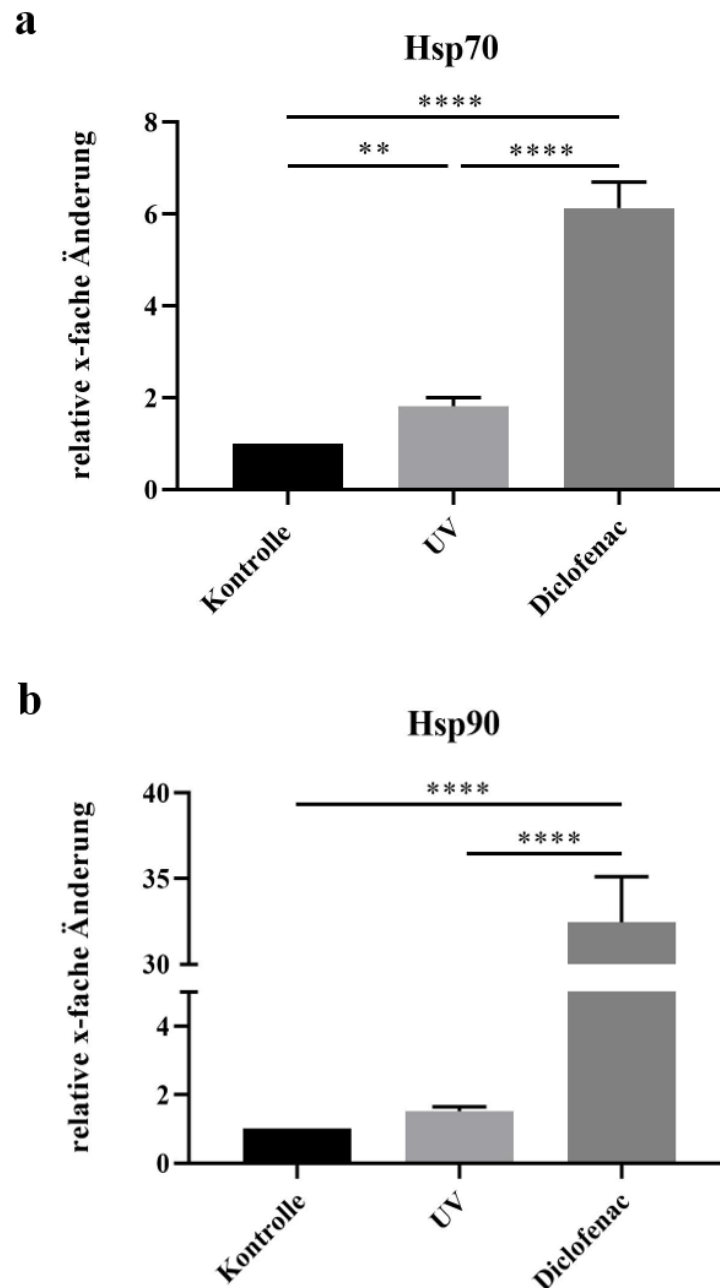


Abbildung 27: Genexpression der Hitzeschockproteine 70 und 90 (Hsp70 und 90) in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac. Die TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde mit dem *Fast Advanced Mastermix* (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode in Bezug auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es wurden Triplikate verwendet; $n = 19$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Mittelwerte durch Kolmogorow-Smirnow Test, Überprüfung der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (**** $P < 0,0001$). **(a)** Unter UV-Licht (300 mJ/cm^2) wird Hsp70 0,8-fach hochreguliert (Dunn's *multiple comparison* Test ** $P < 0,01$). Im Vergleich zur Kontrolle wird unter Behandlung mit Diclofenac (1 mM) die Genexpression von Hsp70 signifikant erhöht (5,1-fach Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). **(b)** Im Vergleich zur Kontrolle wird unter Behandlung mit Diclofenac auch die Genexpression von Hsp90 signifikant erhöht (31,4-fach Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$).

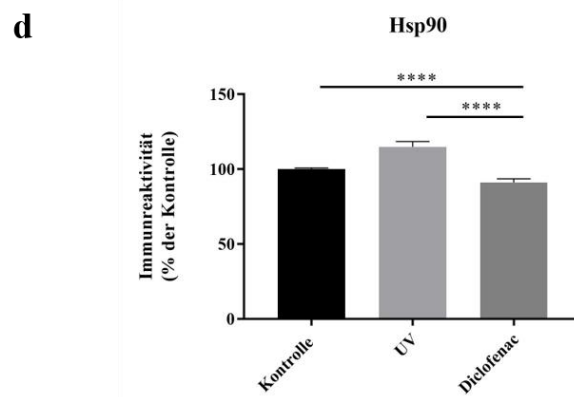
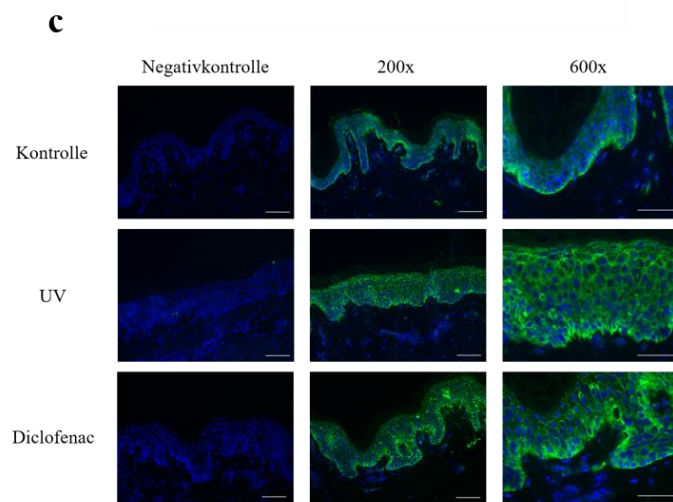
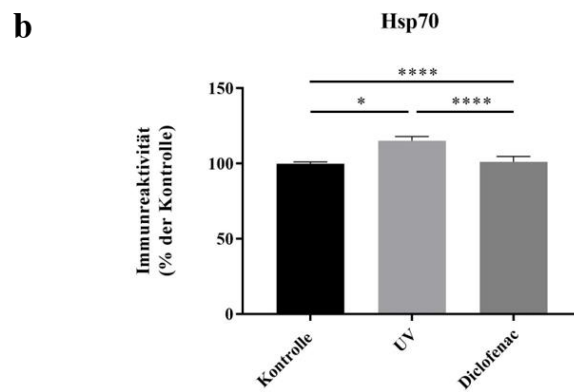
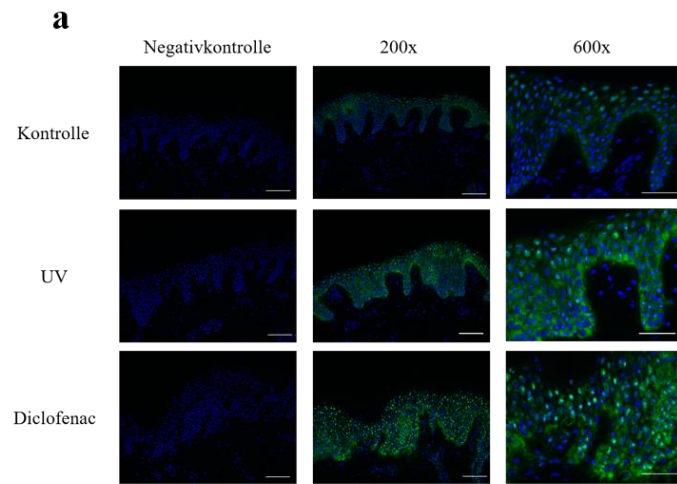
4.2.4 Die Proteine Hsp70 und 90 werden unter UV-Licht vermehrt und unter Diclofenc-Behandlung vermindert exprimiert

Die Intensität der Immunfluoreszenz wurde in zwei bis sieben Bildern pro Bedingung und Proband mittels der Software ImageJ 1.52q in sechs definierten Bereichen gemessen und auf die Kontrolle normalisiert. Die Testung aller sechs Werte pro Bild von 21 Probanden ergab sowohl für Hsp70 als auch Hsp90 mit dem Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz von **** $P < 0,0001$.

Betrachtet man die Proteinexpression von Hsp70 und 90 zeigt sich nach UV-Bestrahlung ein ähnliches Bild wie in der Genexpression. Hsp70 wird im Vergleich zur Kontrolle um 15,2% vermehrt exprimiert (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$). Hsp90 zeigt ebenfalls eine tendenziell höhere Expression (15,0%, nicht signifikant). Die Behandlung mit Diclofenac wirkt jedoch anders auf die Proteinexpression als auf die Genexpression. Im Vergleich zur Kontrolle wird Hsp70 nur um 1,0% hochreguliert und Hsp90 sogar um 9,9% herunterreguliert (jeweils Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$). Sowohl bei Hsp70 als auch Hsp90 zeigt die Behandlung mit UV-Licht eine signifikant andere Regulation als die mit Diclofenac (**Abb. 28, nächste Seite**).

Im **Anhang 6** befindet sich eine Ergebnis-Übersicht der Hsp70 und Hsp90 Färbung für jeden einzelnen Probanden (nicht normalisierte Werte).

Abbildung 28: Erhöhung der Proteinexpression der Hitzeschockproteine 70 und 90 (Hsp 70 und 90) in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht. (a, b) Visualisierung der Immunfluoreszenzfärbung von Hsp 70 und 90 unter Einfluss von UV-Licht (300 mJ/cm^2) bzw. Diclofenac (1 mM) in 200- bzw. 600-facher Vergrößerung. Skala = $100 \mu\text{m}$ (200-fach) bzw. $50 \mu\text{m}$ (600-fach). Negativkontrolle ohne Primärantikörper. (c, d) Pro Bedingung und Proband wurde bei drei bis sieben Immunfluoreszenzbildern in sechs definierten Bereichen die Immunreaktivität mittels der Software ImageJ 1.52q gemessen; $n = 21$, + SEM, Test auf Normalverteilung der Einzelwerte durch Kolmogorow-Smirnow, Testung der Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test über alle Werte (jeweils **** $P < 0,0001$). Durch UV-Bestrahlung wird die Expression von Hsp70 um 15,2% (Dunn's *multiple comparison* Test * $P < 0,05$), von Hsp90 um 15,0% erhöht (Dunn's *multiple comparison* Test nicht signifikant). Hsp70 zeigt durch die Behandlung mit Diclofenac eine um 1% erhöhte Proteinexpression, Hsp90 zeigt eine um 9,9% verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle (jeweils Dunn's *multiple comparison* Test **** $P < 0,0001$).



4.2.5 Hsp90 zeigt von allen untersuchten Entgiftungsproteinen die stärkste Genregulation

Die **Abb. 29** zeigt die Zusammenfassung der Einzelwerte für die Gen- und Proteinexpression aller Probanden (19 für Gen-, 21 für Proteinexpression) hinsichtlich der vier untersuchten Entgiftungsparameter Katalase, Nrf2, Hsp70 und Hsp90. Der Übersicht halber wurde auf die Darstellung und Überprüfung der einzelnen Signifikanzen verzichtet. Details können den vorherigen Abbildungen entnommen werden.

Unter UV-Bestrahlung sind die Genexpression von Hsp70 und die Proteinexpression von Nrf2 am stärksten hochreguliert. Den deutlichsten Effekt zeigt jedoch Hsp90 nach der Behandlung mit Diclofenac. Hier erfolgen die drastischste Hochregulation der Genexpression im Vergleich zu den anderen Parametern und eine Runterregulation der Proteinexpression von Hsp90.

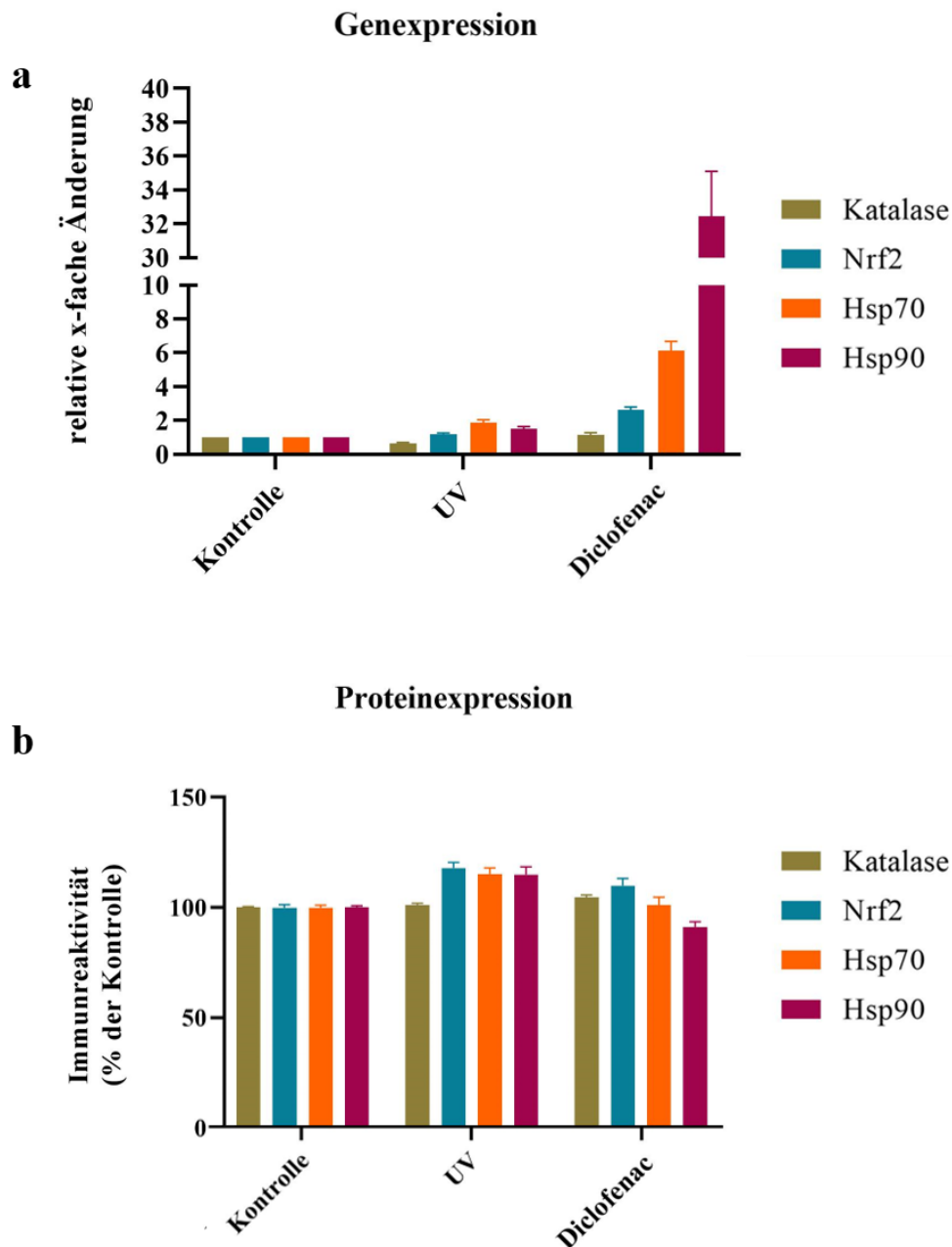


Abbildung 29: Übersicht der Gen- und Proteinexpression von Katalase, Nrf2, Hsp90, und Hsp70 in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac. Diese Grafiken dienen dem Überblick. Der Übersicht halber wurde auf die Überprüfung und Darstellung einzelner Signifikanzen verzichtet. Diese können den vorangegangenen Grafiken entnommen werden. UV-Licht = 300 mJ/cm², Diclofenac = 1 mM. **(a)** Zur Untersuchung der Genexpression wurde die TaqMan Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit dem *Fast Advanced* Mastermix (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode in Bezug auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es wurden Triplikate verwendet; n = 19, + SEM. **(b)** Zur Analyse der Proteinexpression wurden von Katalase immunhistochemische und von Nrf2, Hsp70 und 90 immunfluoreszenz Färbungen angefertigt. Pro Bedingung und Proband wurden drei bis sieben Immunfluoreszenzbilder aufgenommen und die Intensität der Fluoreszenz jeweils in sechs definierten Bereichen mittels der Software ImageJ 1.52q gemessen; n = 21, + SEM.

5 Diskussion

Die Haut bildet die äußere Barriere des Körpers und bietet dem Organismus Schutz vor Pathogenen, sowie chemischen und physikalischen Einflüssen. Die Epidermis bildet die äußerste Schicht und ist somit direkt den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt. Sie besteht zu mehr als 90% aus Keratinozyten und sorgt mittels Kollagen und elastischen Fasern für die Elastizität und Reißfestigkeit der Haut (Fritsch, 2004; Proksch *et al.*, 2008). Die Epidermis besteht aus vier Schichten, welche den Differenzierungsstadien der Keratinozyten entsprechen: Dem *Stratum basale* (Basalzellschicht), dem *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), dem *Stratum granulosum* (Körnerschicht) und dem *Stratum corneum* (Hornschicht) (Fritsch, 2004).

5.1 Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf die Morphologie und die Apoptose der Epidermis

5.1.1 Kultivierungsbedingte Morphologische Veränderungen der Epidermis

Die Kultur der Hautbiopsien wurde serumfrei nach Kleszczyński und Fischer, 2012, durchgeführt. Kleszczyński und Fischer zeigten, dass erste kulturbedingte strukturelle Veränderungen 48 Stunden nach Beginn der Hautorgankultur auftreten. Diese Änderungen zeigten sich u.a. durch kondensierte Zellen bzw. Kondensation des Nukleus, durch subepidermale Spaltbildung, sowie durch eine dünner werdende Epidermis. Apoptosemarker (gespaltene Caspase 3) und apoptotische Zellen stiegen erst 72 Stunden nach Beginn der Kultur signifikant an. Nach 72 Stunden fand auch eine Änderung des Gleichgewichts zwischen proliferativen und apoptotischen Zellen statt. Lu *et al.* zeigten, 2007, dass humane Kopfhaut unter serumfreien Bedingungen mehr als zwei Wochen kultiviert werden kann. Nach 120 Stunden jedoch nahmen die Dicke der Epidermis ab und Hyperkeratosen zu. Außerdem wurden weniger als 1% proliferative Zellen detektiert, dafür aber mehr apoptotische Zellen.

Ziel des Projektes war es, ein Hautorgankultur-Modell zu etablieren, in welchem die Haut unter Einfluss von verschiedenen Stressoren mindestens 48 Stunden vital bleibt. Die kulturbedingte Schädigung sollte dabei minimal sein, sodass das Kontrollgewebe intakt ist und eine eindeutige Schädigung des gestressten Gewebes nachgewiesen werden kann. Um sich vom präparationsinduzierten Stress zu erholen ruhten die Hautstanzen für 24 Stunden im Kulturmedium. Danach wurden sie mit UV-Licht bestrahlt und weitere 24 Stunden kultiviert bzw. für 24 Stunden mit Diclofenac inkubiert. Die Auswertung der morphologischen

Epidermisveränderung durch einen Score mit den Werten 1 (intakte Epidermis) bis 3 (stark veränderte Epidermis) ergab für die Kontroll-Haut 1,3 (**Abb. 20**). Dies bedeutet, dass nur eine minimale strukturelle Veränderung der Epidermis allein durch die Hautorgankultur stattgefunden hat. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Kleszczyński und Fischer überein, auch sie hatten eine beginnende Veränderung nach 48 Stunden erfasst. Ich konnte somit ein Hautorgankultur-Modell etablieren, in welchem die Haut vital bleibt und nur eine sehr geringe kulturbedingte Grundschädigung der Epidermis auftritt. Dies ist wichtig, um die Auswirkungen der stressinduzierten Schädigung beurteilen zu können.

5.1.2 Einfluss von UV-Licht auf die Morphologie der Epidermis

UVB- und UVA-Strahlung können der Haut erheblichen Schaden zufügen. Die kurzwelligere UVB-Strahlung (290-320 nm) wird teilweise von der Atmosphäre bzw. in der menschlichen Haut durch die Hornschicht absorbiert. Jedoch kann die Strahlung die Haut penetrieren und die Epidermis schädigen. Je kurzwelliger die Strahlung, desto energiereicher ist sie. UVB-Strahlung ist hauptsächlich verantwortlich für die Entstehung von Sonnenbränden und Hautkrebs durch Schädigung der DNA (Goldsmith, 1991; Slominski, 1998; Slominski und Wortsman, 2000). UVA- ist langwelliger als UVB-Strahlung (320-400 nm) und penetriert besser die Atmosphäre. UVA-Licht gelangt tiefer in die Haut und erreicht sogar die Dermis. Biologisch ist diese Form der Strahlung jedoch nicht so aktiv wie UVB-Strahlung, trägt aber dennoch zur Schädigung der Haut bei (Berneburg *et al.*, 2000).

Durch Behandlung der Haut mit UV-Licht treten sogenannte Sonnenbrand-Zellen auf. Sie stellen eine spezielle Form der Apoptose dar und zeichnen sich durch einen geschrumpften, kondensierten und pyknotischen Zellkern, sowie ein homogenisiertes, verkleinertes und eosinophiles Zytoplasma aus (Daniels *et al.*, 1961; Danno und Horio, 1987; G Murphy *et al.*, 2001). Studien an Mäusen zeigten Sonnenbrand-Zellen schon 8 Stunden nach UV-Bestrahlung mit einer maximalen Anzahl zwischen 24 und 48 Stunden. Auch in humaner Epidermis treten Sonnenbrand-Zellen bereits vereinzelt kurz nach der Bestrahlung auf, vor allem durch UVB-Licht (Bayerl *et al.*, 1995). Bernerd und Asselineau, 1997, beobachteten in menschlicher Epidermis 24 Stunden nach UV-Bestrahlung eine deutliche histologische Veränderung der Keratinozyten. Auch ich konnte eine Zunahme an Sonnenbrand-Zellen 24 Stunden nach UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Wie genau Sonnenbrand-Zellen entstehen ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass hauptsächlich DNA-Schädigung dafür verantwortlich ist.

Die DNA ist das Hauptziel von UV-Strahlung (Murphy *et al.*, 2001; Slominski und Wortsman, 2000) und es können sogenannte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) entstehen. Hierbei handelt es sich um dimere Fotoprodukte von zwei benachbarten Pyrimidinbasen. Stege *et al.*, 2000, konnten 24 Stunden nach UV-Bestrahlung CPD beobachten. Ich habe ebenfalls in meiner Masterarbeit einen sprunghaften Anstieg an CPD in UV-bestrahlter humaner Haut nach 24 Stunden feststellen können (Stegmann, 2016, Daten nicht veröffentlicht).

In meinen Ergebnissen ist eine deutlich höhere Schädigung der Epidermis durch UV-Licht im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (im Score ein Wert von 1,7; **Abb. 20**). UV-Strahlung kann sowohl direkt an der DNA wirken, als auch indirekt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Fritsch, 2004; Miyachi *et al.*, 1983). Hauptsächlich trägt UVA-Licht durch die Entstehung von ROS zur Schädigung der Zelle bei. Diese freien Radikale führen z.B. zu DNA-Doppelstrangbrüchen oder Peroxidation von Lipiden (Berneburg *et al.*, 2000). Interessanterweise können aber sowohl durch UVA- als auch UVB-Strahlung CPD entstehen (Mouret *et al.*, 2006). Die DNA-Schädigung in Form von CPD tritt unter UV-Strahlung jedoch häufiger auf als oxidative Schäden (Mouret *et al.*, 2006). All diese Ereignisse können zur Schädigung und im schlimmsten Fall zur Apoptose der Zelle führen. In meinem Experiment konnte ich zeigen, dass UV-Strahlung durch seine schädigende Wirkung die Epidermis morphologisch verändert. Es treten Sonnenbrand-Zellen auf und durch die Induktion der Apoptose beginnen die Zellen zu schrumpfen. Es kommt zur Akantholyse (Auflösung des Zellverbandes von Keratinozyten) und die Epidermis von UV-bestrahltem Gewebe scheint aufgelockerter im Vergleich zu nicht bestrahltem Gewebe.

5.1.3 Einfluss von Diclofenac auf die Morphologie der Epidermis

Diclofenac ist ein entzündungshemmendes und schmerzstillendes Medikament (Zacher *et al.*, 2008), welches zur Gruppe der DILI-Substanzen (*drug-induced liver injury*) gehört (Teschke, 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Inkubation mit Diclofenac die Epidermis mehr schädigt als UV-Bestrahlung. Es ist bekannt, dass Diclofenac zytotoxisch auf Leberzellen wirkt. Wie genau der Mechanismus funktioniert ist noch nicht geklärt. Man vermutet aber, dass sich toxische Metabolite an die Leberzellen heften und diese schädigen. Die *in vitro* Toxizität korrelierte in einem Experiment mit der Formation von Diclofenac-Metaboliten (Bort *et al.*, 1999). Des Weiteren zeigt Diclofenac eine proapoptotische Wirkung in Zellen von an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten (Singh *et al.*, 2011), sowie in der Behandlung von

aktinischen Keratosen (Çayirli *et al.*, 2013). Hirashima *et al.*, 2017, konnten außerdem zeigen, dass DILI-assoziierte Gene nach Behandlung mit Diclofenac in humanen Keratinozyten und in Hepatozyten vermehrt exprimiert werden. Dies deutet zumindest darauf hin, dass Diclofenac auch in der Haut toxisch wirken könnte. Meine Ergebnisse zeigen eine deutliche Zunahme von apoptotischen und diskeratotischen Zellen, sowie eine Veränderung der Epidermisbeschaffenheit (im Sore ein Wert von 1,9; **Abb. 20**), was die Theorie von Hirashima *et al.* unterstützen würde. Ich vermute, dass Metabolite von Diclofenac auch in der Haut toxisch wirken und sie schädigen. Meines Wissens nach wurde jedoch noch nie die potenziell schädliche Wirkung von Diclofenac (1 mM) in gesunder humaner Epidermis gezeigt. Ich konnte zeigen, dass Diclofenac eine potenziell schädigende Wirkung hat.

Damit Diclofenac leichter in die Haut eindringen konnte, wurde es in 0,1% DMSO mit Kulturmedium gelöst, sodass die Hautbiopsien in 4 mL Lösung komplett von Diclofenac umgeben waren. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel und kann konzentriert zytotoxisch wirken (Malten und den Arend, 1978; Rubin, 1975). Außerdem wurde mittlerweile auch eine retinale Toxizität bei kleinen Mengen DMSO festgestellt (Galvao *et al.*, 2014). Die epidermale Schädigung mit einem Wert von 1,9 im Score-System kommt jedoch nicht vom DMSO. Im Vorwege dieses Projektes wurden hierzu Tests mit verschiedenen DMSO Konzentrationen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche ergaben, dass eine Konzentration von 0,1% unbedenklich für das Hautorgankultur-Modell ist.

5.1.4 UV-Strahlung und Inkubation mit Diclofenac fördert die Apoptose

Mit Hilfe der HE-Färbung konnte optisch schon eine Veränderung der Epidermisstruktur 24 Stunden nach Behandlung mit Diclofenac und UV-Licht im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden u.a. durch die Zunahme an apoptotischen bzw. Sonnenbrand-Zellen. Durch die Markierung von DNA-Strangbrüchen im Zellkern mittels TdT-vermitteltem dUTP-biotin *nick end labeling* (TUNEL) konnte ich zeigen, dass nach der Behandlung mit UV-Licht bzw. Diclofenac mehr apoptotische Zellen vorhanden waren als im nicht behandelten Gewebe (**Abb. 21**). Bei einer Untersuchung an *human adult low calcium high temperature keratinocytes* (HaCaT) zeigten sich bereits zwei Stunden nach UV-Bestrahlung geschädigte Zellen mit TUNEL-positivem Kern und nach 24 Stunden geschrumpfte Nuklei in apoptotischen Zellen mit einer maximalen Anzahl an TUNEL-positiven Zellen (Fischer *et al.*, 2006). Auch in menschlicher Epidermis wurde 24 Stunden nach UV-Bestrahlung ein Maximum an positiven

Zellen beobachtet, sowie eine Korrelation zwischen apoptotischen und Sonnenbrand-Zellen (Bernerd und Asselineau, 1997).

Wie in Abschnitt 5.1.3 schon erwähnt, zeigte Diclofenac behandelte Haut in meinem Experiment in der Bewertung der Epidermismorphologie die höchste Schädigung. Auch hinsichtlich der Untersuchung apoptotischer Zellen zeigt dieses Gewebe die meisten apoptotischen (TUNEL-positiven) und die wenigsten proliferativen (Ki-67-positiven) Zellen. Diclofenac zeigt eine proapoptotische Wirkung und Inhibierung der Zellproliferation in der Hautkrebstherapie (Eberle *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu fanden Çayirli *et al.*, 2013, zwar auch proapoptotische Effekte bei der Behandlung von aktinischen Keratosen, jedoch auch eine Erhöhung des Proliferationsmarkers Ki-67 nach Behandlung mit Diclofenac. Ich habe eine Abnahme der Ki-67-Immunreaktivität beobachtet. Beim Abbau von Diclofenac durch das Entgiftungssystem des Menschen entstehen reaktive Metabolite, welche sehr schädlich sein und u.a. zu mitochondrialer Toxizität, Apoptose und Schädigung von Enzymen und Proteinen führen können (Lazarska *et al.*, 2018; Sarkar *et al.*, 2017). Des Weiteren korreliert die Zytotoxizität von Diclofenac mit der Bildung von Diclofenac-Metaboliten in Leberzellen (Bort *et al.*, 1999). Auch in Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass DILI-assoziierte Gene nach Behandlung mit Diclofenac vermehrt exprimiert werden (Hirashima *et al.*, 2017). Diese Zytotoxizität von Diclofenac kann auch in meinen Experimenten zu vermehrter Apoptose und verminderter Proliferation in der Epidermis, sowie zur schlechten Morphologie beigetragen haben (**Abb. 21**). Ich konnte signifikant mehr apoptotische Zellen nach UV-Bestrahlung und Diclofenac-Behandlung in der Epidermis nachweisen.

Darüber hinaus habe ich beobachtet, dass die Anzahl an proliferativen Zellen auch durch die Behandlung mit UV-Licht tendenziell abnimmt. Auch das Experiment von Kleszczyński und Fischer, 2012, zeigte eine beginnende Abnahme Ki-67-positiver Zellen nach 24 Stunden. Lu *et al.*, 2007, detektierten erst nach 120 Stunden weniger als 1% proliferative Zellen, dafür aber mehr apoptotische Zellen in humaner Kopfhaut. Allerdings handelte es sich hierbei um unbehandelte Haut, sodass die Schädigungen allein der Kulturzeit zuzuschreiben waren. Da UV-Licht aber vor allem die DNA schädigt, u.a. durch Doppelstrangbrüche, ist es nicht verwunderlich, dass weniger proliferative als apoptotische Zellen (durch Detektion von DNA-Strangbrüchen) vorhanden sind. Zusätzlich bewirkt UVA-, UVB- und UVC-Licht eine Erhöhung des Tumorsuppressors p53 (Campbell *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1993). Dieser Transkriptionsfaktor wird durch UV-Schädigung aktiviert und führt u.a. zu einem Zellzyklusarrest für die Reparatur geschädigter DNA oder zur Apoptose der Zelle (Ho *et al.*,

2019; Latonen und Laiho, 2005; Levine, 1997). In Osteosarkoma-Zellen (Knochentumor-Zellen) wurde gezeigt, dass Ki-67 trotz Zellzyklusarrest weiter exprimiert wird (van Oijen *et al.*, 1998). Meines Wissens nach wurde dies jedoch noch nicht in der Epidermis untersucht, weshalb es fraglich ist, ob Ki-67 überhaupt exprimiert wird, wenn z.B. CPD auftreten und der Zellzyklus unterbrochen wird.

In meinem Kontrollgewebe sind mehr proliferative und nur wenige apoptotische Zellen zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass die Haut vital ist. Es wurde entdeckt, dass der Proliferationsmarker Ki-67 allein durch die Kultivierung nicht beeinflusst wird (Vostálová *et al.*, 2019). Bernerd und Asselineau, 1997, beobachteten keine TUNEL-positiven Zellen in nicht behandeltem Gewebe nach 24 Stunden. In meinem Kontrollgewebe waren bei wenigen Probanden vereinzelt TUNEL-positive Zellen sichtbar. Das könnte der Kultivierungszeit geschuldet sein, denn auch in der HE-Färbung waren im Kontrollgewebe vereinzelt apoptotische Zellen zu erkennen (**Abb. 20**). Auch Kleszczyński und Fischer, 2012, berichten von einer kulturbedingten Änderung des Gleichgewichts zwischen proliferativen und apoptotischen Zellen, allerdings erst nach 72 Stunden Inkubation.

Insgesamt kann ich mit der Ki-67 und TUNEL-Färbung meine Ergebnisse der HE-Färbung bestätigen. Durch den schädigenden Einfluss seiner Metabolite zeigt Diclofenac behandelte Epidermis morphologisch die größte Veränderung und auch die meisten apoptotischen und die wenigsten proliferativen Zellen im Vergleich zu UV-bestrahltem Gewebe (**Abb. 21**).

5.1.5 Der Apoptosemarker Caspase 3 wird vor allem unter UV-Bestrahlung in der Epidermis gespalten

Caspase 3 gehört zu einer Gruppe Cystein-Proteasen, welche für die Initiierung der Apoptose verantwortlich sind (Kumar, 1999). Die Apoptose verläuft durch zwei verschiedene Wege: Dem extrinsischen, über die Aktivierung eines Todesrezeptors in der Zellmembran, und dem intrinsischen Weg, über die Ausschüttung von Zytocrom *c* aus den Mitochondrien in das Zytosol durch z.B. DNA-Schädigung oder oxidativen Stress. Kontrolliert wird diese Form der Apoptose von den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L. Caspase 3 wird über beide Wege aktiviert (Porter und Jänicke, 1999; E. A. Slee *et al.*, 1999) und deaktiviert Strukturproteine, die für den Aufbau des Zytoplasmas und des Nukleus verantwortlich sind. Außerdem hat Caspase 3 einen proapoptotischen Effekt, indem sie Bcl-2 spaltet und somit die Freisetzung von Zytocrom *c* aus den Mitochondrien bewirkt (Jänicke *et al.*, 1998).

Ich konnte beobachten, dass Caspase 3 fast ausschließlich durch UV-Strahlung und nicht durch Diclofenac gespalten wird (**Abb. 22**). Wie schon erwähnt, stellen Sonnenbrand-Zellen eine besondere Form von apoptotischen Zellen dar, die nur durch UV-Strahlung entstehen (Daniels *et al.*, 1961; Danno und Horio, 1987; G. Murphy *et al.*, 2001). Durch direkte Einwirkung von UV-Strahlung auf die DNA entstehen DNA-Schädigungen hauptsächlich in Form von CPD (Fritsch, 2004; Miyachi *et al.*, 1983; Mouret *et al.*, 2006). Ich gehe davon aus, dass auch in meinem Experiment überwiegend CPD entstanden sind, welche zu apoptotischen Sonnenbrand-Zellen führen. Zellen, die ihre DNA nicht mehr reparieren können, gehen in die Apoptose (Danno und Horio, 1987). Brenner und Gschnait, 1979, fanden heraus, dass eine geringere DNS-Reparatur von Thymindimeren kurz nach der UV-Bestrahlung stattfindet.

Ich vermute außerdem, dass diese Form der Schädigung die Zelle in die Apoptose über die Kaskade der Caspasen führt. Diclofenac kann diese direkten Schäden nicht hervorrufen, weshalb die Diclofenac vermittelte Apoptose über einen anderen Weg verläuft. Sicherlich erfolgt nicht die Apoptose jeder UV-bestrahlten Zelle über den Weg der Caspasen. Yamaguchi *et al.*, 2006, zeigten, dass Apoptose p53-abhängig aber Caspase 3-unabhängig passieren kann. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige Rolle bezüglich UV-Licht induzierter DNA-Schädigung spielt. Er akkumuliert im Kern von UV-Licht bestrahlten Hautzellen und sorgt für den Abbau der Zelle durch Auslösen der Apoptose (Hall *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 2008, 2006). Ich gehe jedoch davon aus, dass die meisten UV-bestrahlten Zellen den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg über die Spaltung von Caspase 3 gehen. Fischer *et al.*, 2008, zeigten ebenfalls eine erhöhte Spaltung von Caspase 3 in HaCaT-Zellen nach UV-Bestrahlung. Auch in meiner Masterarbeit konnte ich einen signifikanten Anstieg von gespaltenen Caspase 3 nach UV-Bestrahlung detektieren (Stegmann, 2016, Daten nicht veröffentlicht).

Jedoch konnte ich auch einige wenige positive gespaltene Caspase 3-Zellen nach Inkubation mit Diclofenac sehen (**Abb. 22**). Die Behandlung mit Diclofenac führt auch zu einer erhöhten Todes-Ligand vermittelten Apoptose, allerdings wurde dies nur in Plattenepithelkarzinomen gezeigt. Hier wurde eine vermehrt Aktivierung der extrinsischen Apoptose über Caspase 8 und 10 und parallel dazu eine Spaltung von Caspase 3 24 Stunden nach Inkubation mit Diclofenac nachgewiesen. Der proapoptotische Effekt von Diclofenac verlief hier unabhängig von p53 (Fecker *et al.*, 2010; Rodust *et al.*, 2012). Dieselbe Arbeitsgruppe wies aber auch nach, dass die Aktivierung der Apoptose durch Diclofenac über die Caspase-Kaskade in normalen Keratinozyten weniger ausgeprägt ist und keine

zytotoxischen Effekte zu erkennen sind (Fecker *et al.*, 2007). Diese Beobachtung stimmt mit unseren Ergebnissen überein. Unter Behandlung mit Diclofenac konnte kaum eine Spaltung der Caspase 3 festgestellt werden, dafür jedoch umso mehr nach UV-Bestrahlung. Daraus schlussfolgern wir, dass eine Diclofenac-induzierte Apoptose über extrinsische oder intrinsische Wege nicht oder im geringen Maße stattfindet.

5.2 Einfluss von UV-Licht und Diclofenac auf das Entgiftungssystem der Epidermis

5.2.1 Die Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase wird durch UV-Bestrahlung herunterreguliert, die Proteinexpression jedoch erhöht

Katalase schützt die Zelle im Zusammenspiel mit SOD vor ROS und neutralisiert H_2O_2 bevor es der Zelle Schaden zufügen kann. Nicht nur bei regulären zellulären Prozessen entsteht H_2O_2 , sondern auch durch oxidativen Stress, ausgelöst z.B. von UV-Strahlung durch Generierung von ROS. Somit schützt Katalase als direktes antiapoptotisches Protein vor Apoptose und Mutagenese (Goyal und Basak, 2010; Sancho *et al.*, 2003; Sepasi Tehrani und Moosavi-Movahedi, 2018).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Genexpression von Katalase unter UV-Licht runter reguliert ist (**Abb. 23**). Auf Proteinebene wurde die Expression von Katalase durch UV-Licht jedoch erhöht (**Abb. 24**). Es ist bekannt, dass UV-Licht induzierter oxidativer Stress durch ROS oder oxidative DNA-Schäden ausgelöst wird. Hierbei spielen u.a. Superoxid-Radikale ($\cdot O_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikale ($\cdot OH$) eine wichtige Rolle. Sie richten intrazellulären Schaden an bis hin zur Apoptose (Ambach und Blumthaler, 1993; Kulms *et al.*, 2002). In humaner Vollhaut wurde von Fischer *et al.*, 2013, gezeigt, dass die Genexpression von Katalase unter UV-Bestrahlung um mehr als die Hälfte abnimmt. Ich konnte bei gleicher Strahlungsintensität eine Reduktion von etwas weniger als die Hälfte (0,4-fach) beobachten. Durch UV-Strahlung wird das Membranpotential der Mitochondrien gesenkt, was auf die Wirkung von ROS zurück zu führen ist. Es kommt zu einem Kalzium Einstrom und zur Depolarisation der Mitochondrienmembran und Freisetzung von Zytocrom *c*. Dieses setzt wiederum die intrinsische Apoptose über Caspase 3 in Gang (Fischer *et al.*, 2008). Auch Katalase kann unter besonderen Umständen indirekt als proapoptotisches Protein fungieren, indem es über die Ausschüttung von Zytocrom *c* aus den Mitochondrien Caspase 3 aktiviert (Sancho *et al.*, 2003). Die Verringerung der Katalase-Genexpression kann also von einem

irreversiblen oxidativen Schaden und/oder Apoptose der Zelle kommen (Afaq und Mukhtar, 2001). Jedoch konnten Fischer *et al.* auch in der Proteinexpression von Katalase eine deutliche Abnahme verzeichnen, genau wie Rhie *et al.*, 2001, und Sander *et al.*, 2002. Hier wurde auch der Zusammenhang von verminderter Katalase-Expression durch UV-Schädigung und erhöhter Proteinoxidation detektiert. Ich dagegen konnte eine signifikante Zunahme an Katalase detektieren.

Im Gegensatz zur UV-Bestrahlung zeigte Diclofenac keine Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression, tendenziell wurden beide erhöht. Generell wies Diclofenac aber auf beiden Ebenen keine signifikante Regulation im Vergleich zur Kontrolle auf (**Abb. 23 und 24**).

In diesem Projekt muss allerdings die interindividuelle Reaktion der Probanden berücksichtigt werden. Zwar ist auch bei zufällig ausgewählten Probanden die Intensität der Genregulation unterschiedlich bei Anwendung der selben Stressoren (Bernerd *et al.*, 2003), bei den von uns ausgewählten Probanden handelt es sich jedoch um genetisch möglichst unterschiedliche Individuen. Es ist auffällig, dass die Regulation innerhalb der einzelnen Probanden sehr unterschiedlich ist (**siehe Anhang 5 und 6**). Hier zeigen Proband 006, 051, 059, 072 und 079 eine vermehrte Immunreaktivität von Katalase in der Kontrolle. Normalerweise findet allein durch die Kultivierung keine signifikante Änderung der Katalase-Aktivität statt (Vostálová *et al.*, 2019), jedoch weist auch diese Arbeitsgruppe darauf hin, die individuelle Variabilität der Hautspender zu beachten. Auch sie sahen Unterschiede innerhalb der Spender.

Bei den Probanden 051, 072 und 079 wurde durch die Transkriptomanalyse der Firma Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im Katalase-Gen, -262 C zu T Ersatz (rs1001179), festgestellt. Es ist bekannt, dass dieser Polymorphismus zu einem höheren Katalase-Level führt (Forsberg *et al.*, 2001; Kodydková *et al.*, 2014). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die erhöhte Katalase-Reaktivität ohne Behandlung sein.

5.2.2 Der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2* wird sowohl auf Gen- als auch Proteinebene unter UV-Licht und Diclofenac hochreguliert

Nrf2 ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren zur Vermeidung von oxidativen Schäden in der Zelle durch z.B. UV-Strahlung oder Chemikalien. Er wird durch oxidative Zustände aktiviert und reguliert die Expression von wichtigen antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen, u.a. auch Phase II Enzymen (Bellezza *et al.*, 2018; Gęgotek und Skrzydlewska, 2015).

Diclofenac zeigt in diesem Experiment eine Erhöhung der Genexpression von Nrf2 (**Abb. 25**). Auch auf Proteinebene konnte eine tendenzielle Erhöhung beobachtet werden, allerdings nicht so signifikant wie auf Genebene (**Abb. 26**). Diclofenac wird über CYP3A4 zu 5-H-Diclofenac und durch CYP2C9 zu 4-OH-Diclofenac in Phase I der Entgiftung hydroxyliert. Die mRNA von CYP2C9 und CYP3A4 konnte in humaner Epidermis nachgewiesen werden (Baron *et al.*, 2008; Oesch *et al.*, 2018; Yengi *et al.*, 2003). Der weitere Abbau von Diclofenac führt u.a. zu Diclofena-acyl-Glucuroniden, welche andere Proteine transacylieren oder glykieren und zur Entstehung von anderen reaktiven und oxidativen Spezies beitragen können. Somit stellen Diclofenac-Metabolite auch eine Art von ROS dar, die oxidativen Stress auslösen. Dies würde die erhöhte Genexpression von Nrf2 erklären, da Nrf2 nämlich hauptsächlich durch oxidative Zustände aktiviert wird (Gęgotek und Skrzydlewska, 2015; Lazarska *et al.*, 2018; Tonelli *et al.*, 2018).

Nur zwei Probanden zeigten durch die Behandlung mit Diclofenac eine verminderte Genexpression von Nrf2 im Vergleich zur Kontrolle (**siehe Anhang 5**). Durch die Transkriptomanalyse der Firma Labor Dr. Heidrich & Kollegen MVZ GmbH konnte ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im CYP2C9-Gen (rs1057910) bei Proband 006 und im CYP3A4-Gen (rs2740574) bei Proband 059 festgestellt werden. Es ist bekannt, dass Polymorphismen im CYP2C9 Gen zu einer langsameren Metabolisierung von Diclofenac in der Leber führen (Crespi und Miller, 1997; Oesch *et al.*, 2018; Yamazaki *et al.*, 1998). Zur Metabolisierung in der Epidermis gibt es jedoch noch keine Studien.

Im Gegensatz zur Inkubation mit Diclofenac zeigte UV-Bestrahlung eine weniger hohe Genexpression, dafür aber eine höhere Proteinexpression von Nrf2 (**Abb. 25 und 26**). Wie schon erwähnt wirkt UV-Strahlung hauptsächlich direkt über die DNA (Murphy *et al.*, 2001; Slominski und Wortsman, 2000) und strahleninduzierte Schädigung der DNA tritt öfter auf als oxidative Schäden (Mouret *et al.*, 2006). Da Nrf2 hauptsächlich für die Vermeidung von oxidativen Schäden in der Zelle zuständig ist, ist es nicht verwunderlich, dass die Änderung der

Genexpression nicht so stark ansteigt, wie die nach Diclofenac-Inkubation. Dennoch schützt Nrf2 die Keratinozyten vor UV/ROS-induzierten Schäden (Tian *et al.*, 2011). Kokot *et al.*, 2009, sahen in Keratinozyten 2 Stunden nach Bestrahlung mit UVB-Licht einen drastischen Rückgang der Nrf2-mRNA. Nach 24 Stunden war die Menge an mRNA jedoch wieder erhöht. Ähnliche Ergebnisse erzielte diese Arbeitsgruppe auch beim Hautorgankultur-Modell. Auch ich konnte 24 Stunden nach UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Nrf2 Gen- und Proteinexpression beobachten.

Nrf2 initiiert die Transkription wichtiger antioxidativer Enzyme, wie z.B. Katalase (Gęgotek und Skrzydlewska, 2015). Dennoch sehe ich weder eine gemeinsame Gen-, noch eine gemeinsame Proteinexpression. Dies ist wahrscheinlich auch der individuellen Regulation innerhalb der Probanden geschuldet.

5.2.3 Das Hitzeschockprotein-System wird auf Genebene vor allem durch Diclofenac hochreguliert

Hitzeschockproteine sind Chaperone, welche die Faltung von Proteinen unterstützen. Bei neu synthetisierten Proteinen erfolgt zudem eine Überprüfung der Zusammensetzung und Struktur. Sind Proteine fehlerhaft, wird deren Abbau veranlasst. Hsp70 nimmt dadurch u.a. Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle. Der Zyklus von Hsp70 kann auch an andere Chaperone gekoppelt sein, z.B. Hsp90 (Mayer und Bukau, 2005).

Hsp70 und 90 werden kontinuierlich in humaner Epidermis bzw. in Keratinozyten exprimiert (Edwards *et al.*, 1991; Nordlind, 2002; Trautinger *et al.*, 1993). Auch ich konnte eine Expression von Hsp70 und 90 im Kontrollgewebe beobachten (**Abb. 28**). Es ist jedoch auffällig, dass viele Patienten schon im Kontrollgewebe eine hohe Expression von Hsp70 oder 90 zeigen (**siehe Anhang 5 und 6**). Hsp90 wird zwar kontinuierlich in Keratinozyten exprimiert, jedoch wird es auch durch Sauerstoffmangel induziert, um Wunden, in diesem Fall die Biopsieränder, zu schließen und Gewebe zu regenerieren (Jayaprakash *et al.*, 2015). Aus diesem Grund wurden die Biopsien auch nach der Entnahme für 24 Stunden ruhen gelassen, damit sie sich vom präparationsinduzierten Stress erholen können.

Matsuda *et al.*, 2010, zeigten in Mäusen, dass Hsp70 die Epidermis vor UVB-Licht induzierten Schäden durch seine antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung, sowie durch Verhinderung von DNA-Schäden, schützt. Kleszczyński *et al.*, 2015, beobachteten im humanen Hautorgankultur-Modell, dass UV-Strahlung die Gen- und Proteinexpression von Hsp70 erhöht. Auch ich konnte die Ergebnisse von Kleszczyński *et al.* bestätigen. Sowohl die

Gen- als auch Proteinexpression von Hsp70 war nach UV-Bestrahlung erhöht im Vergleich zum Kontrollgewebe. Hsp90 zeigt eine ähnliche Regulation wie Hsp70, was für ein Zusammenspiel der beiden Proteine bei UV-Bestrahlung sprechen würde (**Abb. 27 und 28**). Im Gegensatz dazu zeigten Mori *et al.*, 2008, eine Reduzierung der Hsp90-Proteinexpression nach UV-Bestrahlung.

Auch durch Diclofenac wird die Genexpression von Hsp70 und 90 erhöht, sogar noch signifikanter als bei UV-Licht Bestrahlung. Auf Proteinebene wird Hsp70 nach Behandlung mit Diclofenac um 1% mehr exprimiert (**Abb. 27 und 28**). Durch vermehrte Expression von Hsp70 in der Magenschleimhaut wird eine Schädigung durch Diclofenac verhindert (Yanaka *et al.*, 2007). Ich denke, dass dies auch in der Epidermis geschieht. Diclofenac zeigt histologisch die meiste Schädigung und auch die meisten apoptotischen Zellen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Hsp70 zum Schutz der Zelle hochreguliert wird. Dasselbe gilt auch für die UV-Bestrahlung. Allerdings wird laut meiner quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenz Hsp90 auf Proteinebene sogar vermindert exprimiert (**Abb. 28**). Diclofenac ist ein antiinflammatorisches Medikament, welches Cyclooxygenase 1 und 2 hemmt und dadurch Prostaglandin-vermittelte Entzündungsprozesse verhindert (Chen *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007; Zacher *et al.*, 2008). Ich vermute, da keine Entzündungsprozesse entstehen, wird das antiinflammatorische Hsp90 zum Schutz der Zelle auch nicht hochreguliert. Diese Aussage steht allerdings im Kontrast zu den vorherigen beschriebenen Effekten der Gen- und Proteinexpression von Hsp70, sowie der Genexpression von Hsp90. Eine weitere Erklärung wäre, dass Hsp90 und auch Hsp70 verbraucht werden und deshalb auf Proteinebene nicht in so hohem Maße wie auf Genebene detektiert werden können. Diclofenac zeigt eine höhere Schädigung der Epidermis als UV-Licht, weshalb mehr Protein zur Schadensbehebung gebraucht und die Genexpression von Hsp70 und Hsp90 höher reguliert wird. Diese Proteine werden dann verbraucht und können auf Proteinebene nicht mehr in dem Maße wie auf Genebene detektiert werden. Unter UV-Bestrahlung werden Hsp70 und 90 nicht so stark benötigt und verbraucht wie nach Diclofenac-Behandlung. Meines Wissens nach gibt es bis jetzt noch keine Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Diclofenac auf Hsp90.

Der Grund, warum Diclofenac einen größeren Einfluss auf die Regulation der Genexpression von Hsp70, Hsp90 und auch Nrf2 hat, könnte sein, dass die Proben für 24 Stunden mit Diclofenac inkubiert wurden, der Stressor also permanent vorhanden war. Bestrahlt wurden die Proben hingegen nur einmal mit UV-Licht und wurden dann für weitere 24 Stunden im Inkubator kultiviert. Während dieser Zeit kann schon die Regeneration der Haut

eingesetzt haben. Es wurde jedoch gezeigt, dass sich das Gen- und Proteinlevel von Hsp70 nach UV-Bestrahlung innerhalb von 48 Stunden nach der Bestrahlung kaum ändert (Kleszczyński *et al.*, 2015). Ich konnte in meiner Masterarbeit zeigen, dass 48 Stunden nach UV-Bestrahlung sogar eine Erhöhung der Gen und Proteinexpression von Hsp70 stattfindet (Stegmann, 2016, Daten nicht veröffentlicht).

5.3 Fazit und Ausblick

UV-Licht und Diclofenac haben einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf das Entgiftungssystem der humanen Epidermis. Vor allem die Inkubation mit Diclofenac schädigt die Morphologie der Epidermis. Diese Stressoren erhöhen die Apoptose und unter Einfluss von UV-Licht findet eine vermehrte Spaltung des Apoptosemarkers Caspase 3 statt. Vor allem bei der Regulation des antioxidativen Proteins Katalase müssen jedoch die spenderabhängigen Reaktionen beachtet werden. Die Genexpression von Nrf2, Hsp70 und Hsp90 wird sowohl durch UV-Licht als auch Diclofenac-Inkubation erhöht, wobei Diclofenac einen deutlicheren Effekt zeigt als UV-Licht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass UV-Licht und Diclofenac sich für die Untersuchung von Detoxifizierungswegen im humanen Hautorgankultur-Modell sehr gut eignen.

Vor allem beim antioxidativen Enzym Katalase hat man die individuelle Reaktion der 21 genetisch unterschiedlichen Spender gesehen. Hier könnten in weiteren Experimenten andere antioxidative Enzyme, wie z.B. Superoxiddismutase (SOD) oder Glutathionperoxidase (GPx), untersucht werden, um die individuelle Reaktion der Spender zu bestätigen.

Im nächsten Schritt müssen außerdem die im Rahmen dieses Projektes von der Firma acCELLerate GmbH generierten Zelllinien hinsichtlich der in dieser Arbeit untersuchten Parameter getestet werden. Der Vergleich des *ex vivo* Hautmodells mit den Zelllinien dient der Aussagekraft des geplanten Toxizitäts-Assays. Je höher die Übereinstimmung, desto höher die Aussagekraft des Assays für den Menschen *in vivo*. Dieser Vergleich bietet außerdem die Möglichkeit Kompletgewebe mit Einzelzelllinien von identischen Spendern in großer Anzahl zu vergleichen und Rückschlüsse auf die Relevanz der Zelllinie oder des Hautorgankultur-Modells zu ziehen. Zuletzt werden dann bis zu fünf repräsentative Zelllinien und entsprechende Entgiftungswege ausgesucht, welche einen deutlichen Einfluss auf die spenderindividuelle Sensitivität haben. Aus diesen fünf Zelllinien wird am Ende der Toxizitäts-Assay hergestellt.

Anhang

Anhang 1: Ethikvotum vom 02.05.2017 (AZ 16-193).



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herr PD Dr. med. TW Fischer
Klinik für Dermatologie
im Hause

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Geschäftsstelle:

Frau Dr. phil. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 500 5121

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-193

Datum: 02. Mai 2017

Sitzung der Ethik-Kommission am 04. August 2016, Ihre Nachreichung vom 24. April 2017

Antragsteller: Herr PD Dr. med. TW Fischer

Titel: Etablierung und Validierung einer toxikologischen Hochdurchsatz-Technik von chemischen Substanzen an genetisch-definierten immortalisierten Keratinozyten unter Verwendung eines ex-vivo-Vollhautmodells (**KeraTox**)

Sehr geehrter Herr Fischer,

vielen Dank für die Nachreichung der überarbeiteten Unterlagen vom 24.04.2017.

Folgende Unterlagen wurden jeweils in einer Version 02 vom 20.03.2017 nachgereicht und geprüft:

- Aufklärungsbogen Patient 1x „formatted“, 1x „tracked“
- Einverständniserklärung (Version 02) 1x „tracked“

Die Kommission nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken gegen die Durchführung der Studie:

- Zu Beginn der Studieninformation und nicht erst unter Punkt f ist die Freiwilligkeit der Teilnahme anzusprechen.
- Unter Punkt h der Studieninformation wird davon gesprochen, dass eine Probandenversicherung abgeschlossen wird, im Basisformular unter 3.8 wird der Abschluss einer solchen Versicherung zugunsten der Studienteilnehmer / -teilnehmerinnen verneint. Bitte Aussage im Aufklärungsbogen korrigieren.
- Zur Steigerung der Lesbarkeit des Textes (vor allem S. 2) sind Sätze mit einer Länge über 4 Zeilen zu teilen und Schachtelsätze zu vermeiden.
- Ersetzen Sie „Einverständnis“ durch das juristisch korrekte Wort „Einwilligung“.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Anhang 2: Check-Liste zur Probandenrekrutierung und zur Überprüfung von Ein- und Ausschlusskriterien, sowie zum Erfassen von persönlichen und epidemiologischen Daten.

Familiennamen:

Vorname:

Geburtsdatum:

Alter:

Straße:

Hausnr.:

PLZ, Ort:

Festnetz-Nr.:

Mobil-Nr.:

Rauchverhalten

 Ja ≤ 5 Zigaretten pro Tag ≥ 5 Zigaretten pro Tag NeinEinnahme von
Medikamenten Ja

Welche? _____

 Nein

Gesundheitszustand

 Gesund Erkrankungen liegen vor

Welche? _____

Alkoholkonsum

 Ja ≤ 1 Bier (0,5 l) oder ≤ 1 Glas Wein (0,25 l) pro Tag ≥ 1 Bier (0,5 l) oder ≥ 1 Glas Wein (0,25 l) pro Tag Nein

Drogenkonsum

 Ja Nein

Nehmen Sie derzeit an anderen Studien teil?

 Ja Nein

Datum Aufklärungsgespräch:

Datum Blutentnahme:

Bemerkungen:

Blutentnahme/Hautentnahme durch:

 Name, Vorname

 Datum, Unterschrift

Anhang 3: Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung für Patienten zur Blut- und Hautprobenentnahme.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Lübeck Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck

→ UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

Campus Lübeck

Institut für Entzündungsmedizin
Leiter: Prof. Dr. med Diamant Thaçi

Aufklärungsbogen für den Patienten

(Version 03; 11.03.2019)

Sehr geehrte Studieninteressentin, sehr geehrter Studieninteressent,

wir möchten Sie im Folgenden über den Sinn und das wissenschaftliche Ziel der Untersuchung, zu der wir Sie um eine Blutabgabe und eine Gewebeprobe der Haut bitten, informieren. Bitte lesen Sie diese Patienteninformation sorgfältig durch. Ihr Arzt wird mit Ihnen auch direkt über die Studie sprechen. Bitte fragen Sie Ihren Arzt, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wenn Sie zusätzlich etwas wissen möchten.

1. Allgemeine Informationen:

Titel der Studie:

Etablierung und Validierung einer toxikologischen Hochdurchsatz-Technik von chemischen Substanzen an genetisch-definierten immortalisierten Keratinozyten unter Verwendung eines ex-vivo-Vollhautmodells

Akronym: KeraTox

Verantwortlicher Leiter:

Prof. Dr. med Diamant Thaçi

Leiter Institut für Entzündungsmedizin

Wenn Sie Fragen zu dieser Untersuchung haben, wenden Sie sich bitte an Ihren behandelnden Arzt oder an den wissenschaftlichen Leiter der Untersuchung:

Behandelnder Arzt: Herr Prof. Dr. med. Diamant Thaçi Studienleiter Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin Universitätsklinikum Schleswig- Holstein Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck Tel.: 0451/500-41601 Fax: 0451/500-41604	Wissenschaftlicher Leiter der Untersuchung: Herr Prof. Dr. med. Diamant Thaçi Studienleiter Exzellenzzentrum Entzündungsmedizin Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck Tel.: 0451/500-41601 Fax: 0451/500-41604
--	---

2. Informationen zur Studie

a) Zweck der Untersuchung:

Aus der Literatur und der klinischen Erfahrung ist bekannt, daß ein nicht unerheblicher Teil der Bevölkerung an Störungen des Hautaufbaus, z.B. Patienten mit trockener Haut und Barrierefunktionsstörung im Rahmen von atopischem Ekzem, leidet. Ebenso leiden große Teile der immer älter werdenden Bevölkerung an Hautalterung und Entwicklung von „weißem Hautkrebs“, der hauptsächlich durch die lebenslange kumulative Sonnen-Strahlung verursacht wird. Eine altersbedingte Abnahme der antioxidativen Schutzsysteme in der Haut und UV-induzierter oxidativer Stress, sowie Schäden der Erbsubstanz sind wesentliche Faktoren für die Entstehung des „weißen Hautkrebses“, dem Basalzell- und dem Plattenepithelkarzinom. Meidung von Sonnenstrahlung, Schutz durch Kleidung Hüte, Kopftücher, Mützen und Verwendung von Sonnenschutzcremes sind bislang die einzigen Schutz-Prinzipien zur Vermeidung von Hautkrebs. Die Untersuchung der dabei ablaufenden Vorgänge in der Haut, sowie Etablierung und Überprüfung von neuen und innovativen Schutz-Strategien stehen aber seit langem aus und sind daher von hoher Bedeutung.

Ein weiterer Aspekt von Schäden an der Haut sind die Einflüsse von berufs- oder nicht-berufsbedingten Allergien oder Irritationsekzemen an der Haut, die durch Allergene oder irritierende Substanzen hervorgerufen werden. Hier gibt es direkt und stark schädigende Substanzen (z.B. höherprozentige Säuren, Laugen) oder indirekt-chronisch und teils unterschwellig schädigende Substanzen, die erst bei Langzeitkontakt ihre schädigende Wirkung entwickeln (z.B. Seifen, Alkohole, Desinfektionsmittel, Reinigungsmittel, Lösungsmittel), sowie die große Gruppe der Substanzen, die Allergien hervorrufen (z.B. Nickel, Kobalt-III-Chlorid, Kalium-Chromat). Ebenso wie gegen UV-bedingte Schäden an der Haut gibt es auch für die Schädigung durch Allergene und irritierende Substanzen Abwehr- und Entgiftungssysteme in der Haut, die teils den Schutzsystemen der UV-Antwort ähneln, teils aber auch eigene Systeme besitzen. Die qualitative Wirksamkeit dieser Systeme kann von Mensch zu Mensch sehr verschieden sein, sodass beispielsweise zwei verschiedene Personen in einer gleichen beruflichen Tätigkeit, bei der Kontakt mit irritierenden Substanzen stattfindet, unterschiedlich starke Schutzantworten ihrer Haut aufweisen können. Dies ist vergleichbar mit der Entgiftungsfunktion der Leber, die bei unterschiedlichen Menschen ebenfalls unterschiedliche Entgiftungsfähigkeiten besitzt.

Gerade aber in der Haut sind diese Unterschiede der Entgiftungs-Kapazität bislang nicht bekannt, sodass diesbezüglich ein großer Forschungsbedarf besteht, die Entgiftungs-Systeme der Haut in der breiten Bevölkerung zu charakterisieren und dies auf genetischer und funktioneller Ebene zu untersuchen. Die Relevanz des Forschungsprojektes ist sehr hoch, da die Schäden bei schlecht entgiftenden Hautschutzsystemen für das betroffene Individuum nicht nur starke persönliche Krankheitseinschränkungen verursachen, die bis hin zum Berufswechsel oder zur Berufsunfähigkeit führen können, sondern auch volks- und gesundheitswirtschaftlich durch lange Arbeitsausfälle und medizinische Behandlung im Rahmen der berufsgenossenschaftlichen Versorgung immense Kosten verursachen, die noch über den Kosten für Hautkrebs liegen.

In dem vorliegenden Forschungsprojekt soll daher ein genetisch möglichst breit sich unterscheidendes Probandenkollektiv von 100 männlichen Individuen, die im besten Fall die genetische Vielfalt der deutschen und europäischen Bevölkerung darstellt, erfasst und genetisch auf diese Entgiftungs-Systeme der Haut untersucht werden. Um die Gene für die Entgiftungssysteme zu finden, muß eine Blutprobe entnommen und untersucht werden. Nach Bestimmung der Gene wird von einer genetisch charakterisierten repräsentativen Untergruppe von 30 der 100 Probanden anschließend eine Hautprobe gewonnen werden. An dieser Hautprobe werden im Labor für Haarbiologie, Melatonin und Photodermatologie der Experimentellen Dermatologie der Hautklinik Lübeck die Entgiftungsprozesse der Haut untersucht. Ein zweiter Teil der Hautprobe wird an die Forschungs- und Entwicklungsfirma acCELLerate geschickt, die darauf spezialisiert ist, aus Hautgewebe einzelne Zellen zu

gewinnen, die eine stabile Langlebigkeit besitzen. Ein Teil dieser Zellen wird dann wieder an das Labor für Haarbiologie, Melatonin und Photodermatologie der Experimentellen Dermatologie der Hautklinik Lübeck geschickt, um an diesen Zellen dann gleiche Untersuchungen wie an den Hautproben durchzuführen, um die Entgiftungsprozesse der Hautzellen mit denen der vollständigen Haut zu vergleichen.

Der andere Teil der Zellen wird parallel bei der Forschungs- und Entwicklungsfirma acCELLerate auf ähnliche Entgiftungsmechanismen untersucht. Die Stressantwort in den Zellen wird durch ca. 20 Referenzsubstanzen (z.B. Nickelsalze, Captafol, Methylacrylat) ausgelöst. Aus den gesamten Erkenntnissen soll ein standardisiertes und kommerziell anbietbares Zell-basiertes Toxizitäts-Testsystem entwickelt werden. Dies soll dazu dienen, anhand eines relativ einfachen Testsystems die schädigende Wirkung von Substanzen zu testen, bevor diese in Kontakt mit dem Menschen kommen.

b) Ablauf der Untersuchung und Umgang mit Blutprobe und Gewebe:

1) Blutabnahme

Nach mündlicher Aufklärung durch den Arzt/die Ärztin und ausreichender Bedenkzeit (mindestens 24 Stunden) und Ihrer anschließenden mündlichen und schriftlichen Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Untersuchung wird zunächst ein Termin für die Erhebung Ihrer persönlichen Daten und die Blutabnahme vereinbart. An persönlichen Daten erfassen wir Vor- und Familiennamen, Geburtsdatum, Adresse, Telefonnummer, Rauchverhalten (≤ 5 Zigaretten pro Tag), eine mögliche Einnahme von Medikamenten, Gesundheitszustand, Alkoholkonsum (≤ 1 Drink-Units pro Tag $= \leq 1$ Bier (0,5 l) oder ≤ 1 Glas Wein (0,25l)), sowie eventuellen Drogenkonsum. Wenn Sie alle Einschlusskriterien erfüllen, entnehmen wir nach 2-maliger Hautdesinfektion der Ellenbeuge durch Kanülenpunktion der Armvene 2 Röhrchen Blut in der Menge von ca. 7 ml. Nach der Blutabnahme wird die Punktionsstelle mit einem Pflaster abgedeckt. Damit ist der erste Teil der Untersuchung abgeschlossen.

2) Verschlüsselung der Blutproben und Bestimmung der Gene für die Entgiftungs-Systeme der Haut

Nach Entnahme Ihrer Blutprobe wird diese mit einem Nummern-Code von 001 – 100 versehen, damit Ihre Anonymität in Bezug auf die Probe bei Weitergabe an die anderen Kooperationspartner in diesem Projekt gewahrt wird. Die Zuordnung Ihrer persönlichen Daten zu den Nummern-Codierungen der Blutproben sind nur durch das ärztliche und Assistenz-Personal in der Hautklinik der Universitätsklinik Lübeck möglich. Die Blutproben werden einmal pro Woche an die Forschungs- und Entwicklungsfirma acCellerate geschickt, dort gesammelt und dann der Gen-Analyse zugeführt.

Für die Gen-Analyse werden ca. 150 – 200 Gene festgelegt, die die Stoffwechselwege, die bei der Entstehung und Abwehr schädigender Reaktionen in Hautzellen eine Rolle spielen, möglichst vollständig abdecken. Diese Gene unterscheiden sich jedoch bei verschiedenen Menschen und bedingen dadurch unterschiedliche Fähigkeiten in den Entgiftungsprozessen der Haut. Um möglichst alle Menschen in ihrer Verschiedenheit dieser Entgiftungsfähigkeiten abzubilden, werden daher von 100 analysierten Blutproben 30 ausgewählt, die sich in ihren Gen-Profilen möglichst stark unterscheiden. Die Nummern-Codes dieser 30 ausgewählten Blutproben werden dann an das Labor für Haarbiologie, Melatonin und Photodermatologie der Experimentellen Dermatologie der Hautklinik Lübeck übermittelt. Dort werden über die Codierungsliste der Blutproben die Namen der betroffenen Probanden ermittelt und diese für die Entnahme der Hautprobe kontaktiert.

3) Hautprobenentnahme

Da zwischen Blutabnahme und Zeitpunkt der Hautprobenentnahme bis zu 3 – 5 Monate liegen können, wird die spezifische Aufklärung zur operativen Entnahme der Hautprobe zu diesem

Zeitpunkt mündlich und schriftlich durch den Arzt/die Ärztin durchgeführt. Nach schriftlicher Einverständniserklärung zur Hautprobe durch Sie wird ein Termin zur Hautprobenentnahme vereinbart. Die Hautprobe wird von der Gesäßhaut (rechts oder links frei wählbar) entnommen. Am Tag der Entnahme wird die Gesäßhaut wie folgt vorbereitet: das Entnahmeareal wird 3 Mal desinfiziert. Danach erfolgt die Injektion von ca. 3 – 5 ml eines örtlichen Betäubungsmittels (Lokalanästhetikums). Dieses kann am Anfang etwas brennen. Nach etwa 5 - 10 Sekunden beginnt die Wirkung der Lokalanästhesie. Sollten Sie bereits einmal auf ein Lokalanästhetikum allergisch reagiert haben, ist die Teilnahme an der Gewebespende nicht möglich (bitte sprechen Sie dies gegenüber dem Prüfarzt rechtzeitig an). Zur Gewinnung der Probe aus der Gesäßhaut erfolgt dann mittels Skalpell die Entnahme eines kleinen Gewebestückes von ca. 1,0 x 1,5 cm Größe. Nach der Gewebeentnahme wird die Haut mit 2 bis 3 Nähten verschlossen. Dann wird die Naht mit 3 bis 4 sterilen Verbandsstreifen abgedeckt. Anschließend erfolgt ein steriler Abschlußverband mit einer Kompresse und einem selbstklebenden Verbandsflied. Eine Kontrolle der Operationswunde wird nach 14 Tagen durchgeführt und das Fadenmaterial gezogen.

Das entfernte Gewebe wird anschließend im Labor für Haarbiologie, Melatonin, Photodermatologie der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck weiterverarbeitet. Ein Teil wird unter experimentellen Laborbedingungen kultiviert und dann weiter untersucht. Hierzu wird das Gewebe nach der operativen Entfernung in spezielle Nährmedien transferiert. Der andere Teil wird an den Kooperationspartner acCELLerate geschickt, der aus der Haut eine Einzelzellkultur herstellen wird.

c) Auftraggeber und/oder Geldgeber:

Diese Studie wird durch Mittel eines ZIM-Kooperationsprojektes (Förderprogramm des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie) finanziert.

d) Risiken der Untersuchung:

1) Blutabnahme

Die Risiken der Blutabnahme im Rahmen des vorliegenden Projektes entsprechen den allgemeinen Risiken einer Routine-Blutentnahme wie Sie auch z.B. bei Ihrem Hausarzt erfolgt. Die Punktion der Vene kann einen kurzen Schmerz verursachen, der bei guter Durchführung minimal ist. Durch die 3-malige Desinfektion vor der Punktion wird ein mögliches Infektionsrisiko minimiert. Nach der Blutentnahme erfolgt eine Kompression der Punktionsstelle. In seltenen Fällen kann es dennoch zur Blutergussbildung kommen. Andere Risiken wie eine Entzündung der Vene sind bei kurzer Punktion äußerst selten.

2) Hautprobenentnahme

Die Risiken der Entnahme der Hautprobe werden von Ihrem betreuenden Arzt vor Ihrer Einverständniserklärung ausführlich mit Ihnen besprochen. Im Folgenden beschreiben wir Ihnen schriftlich, welche Risiken bestehen:

Die Gewebegewinnung erfolgt auf freiwilliger Basis speziell für den Forschungszweck im Rahmen des geplanten Projektes. Die Entnahme der Hautprobe erfolgt am Gesäß in Form einer spindelförmigen Biopsie, weil das Gewebe des Gesäßes üblicherweise am geringsten schädigenden Umwelteinflüssen wie UV-Licht, chronisch-repetitiven Reizungen, Seifen oder Alkoholen ausgesetzt ist. Im Gegensatz dazu sind z.B. die Hände oder das Gesicht am häufigsten diesen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Die Gesäßhaut ist darüberhinaus gut für eine Entnahme geeignet, weil dort ausreichend Unterhautfettgewebe und wenig Muskelspannung vorhanden ist, um eine spannungsfreie Hautnaht zu setzen. Prinzipiell besteht bei jeder Hautprobe das Risiko einer sich aufdehnenden Naht oder einer vergrößerten Narbe. Durch die Entnahme aus

der Gesäßhaut ist jedoch das Komplikationsrisiko einer sich aufdehnenden Naht oder einer vergrößerten Narbenbildung auf das Bestmögliche reduziert. Ein dritter Aspekt ist, daß eine Narbe in der Gesäßregion üblicherweise eine geringe Belastung darstellt, da diese Narbe in der Regel kosmetisch nicht unangenehm auffällt, da sie für gewöhnlich mindestens durch eine Sport- oder Badehose bedeckt ist.

Als allgemeine Risiken des relativ kleinen Eingriffes seien folgende Punkte erwähnt: In seltenen Fällen kann es zu einer allergischen Reaktion auf das Lokalanästhetikum kommen. Sollte bereits eine solche Lokalanästhetika-Unverträglichkeit bestehen, ist die Teilnahme an der Gewebespende nicht möglich. Durch den Schnitt in die Haut ist prinzipiell der Eintritt von Bakterien möglich, die eine Wundinfektion verursachen können. Dieses Risiko wird durch die sterile Arbeitstechnik und Desinfektion des Operationsareals weitestgehend ausgeschlossen. Nach der Operation kann die Wunde nachbluten. Dieses Risiko wird durch eine gut sitzende Naht und die Anwendung von Verbandsstreifen und eines Kompressionsverbandes minimiert. Als Folge der Operation wird sich im Bereich der Operationsnaht später eine Narbe bilden. Diese ist jedoch wie oben erwähnt in der Regel relativ unauffällig. Schließlich können bei dem Operationsschnitt auch kleine Hautnerven verletzt werden, wodurch sich in diesen Arealen eine geringfügige Empfindungsstörung entwickeln kann. Dies wäre beispielsweise an der Fingerkuppe (Tastsinn) eher problematisch, nicht jedoch im Gesäßbereich. Das Gesamtrisiko ist bei einer sorgfältigen Durchführung der Operation sehr gering, da es sich bei der Entnahme der Hautprobe um einen operativen Standardeingriff, der routiniert und ohne technisches Risiko durchgeführt werden kann, handelt. Andererseits ist die Gewebeprobe an sich relativ klein, so daß das Einzelrisiko einer Wundinfektion, Nachblutung oder Nervenstörung ebenfalls als sehr gering einzustufen ist.

Es entstehen keine außerordentlichen Risiken im Zusammenhang mit der Verwendung Ihres Gewebes für Forschungszwecke.

e) Nutzen für den Patienten

Für Sie ergibt sich durch die Teilnahme an der Studie kein unmittelbarer Nutzen. Da die Studie, für welche Sie Ihr Gewebe zur Verfügung stellen, der Erforschung der Regelmechanismen zum Schutz der Haut unter Sonnenlichteinstrahlung und oxidativem Stress dient, tragen Sie zur Aufklärung der Natur von Hautschädigung bei und haben möglicherweise mittelfristig durch die Erkenntnisse der Untersuchung auch einen persönlichen Nutzen, wenn Sie zu Hautproblemen neigen oder in einer beruflichen Tätigkeit sind, bei der Sie mit potentiell hautschädigenden Substanzen/Chemikalien Kontakt haben.

f) Freiwilligkeit der Teilnahme:

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig.

g) Rücktritt:

Sie können jederzeit die Zustimmung zur Blut- oder Gewebeentnahme auch ohne Angabe von Gründen bis zum Beginn der Blutentnahme oder Operation zurückziehen. Eine Ablehnung hat keinen Einfluß auf die Qualität der medizinischen Versorgung.

Das Einverständnis zur Verwendung Ihres Blutes oder Gewebes zu Forschungszwecken können Sie jederzeit zurückziehen, auch nach der Entnahme des Blutes oder des Hautgewebes. Es entstehen Ihnen dadurch keine Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrer/Ihrem behandelnden Ärztin bzw. Arzt.

Nach Beendigung Ihrer Teilnahme werden keine weiteren Daten von Ihnen erhoben. Ihre bisherigen Daten werden unwiderruflich anonymisiert., d.h. Sie können nicht mehr anhand der Daten identifiziert werden.

h) Hinweis auf Abschluss (oder Nichtabschluss) einer Patienten/Probandenversicherung:

Eine Probandenversicherung speziell für diese Studie wird nicht abgeschlossen.

3. Datenschutzrechtliche Informationen

a) Verantwortlicher der Datenverarbeitung

Für die Datenverarbeitung verantwortlich ist der Studienleiter / Untersucher

b) Zweck der Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgt zum Zweck des oben genannten Forschungsvorhabens.

c) Art der erhobenen Daten

Es werden Daten wie Geburtsdatum, Geschlecht und Entnahmeort des Gewebes erhoben.

d) Datenverarbeitung

Ihre Daten werden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, elektronisch gespeichert und ausgewertet.

e) Einhaltung der Datenschutzbestimmungen

Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes werden eingehalten.

f) Zugangsberechtigte zu den personenbezogenen Daten

Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Die Daten sind vor fremden Zugriff geschützt.
(Wenn Daten an Dritte außerhalb der Studie weitergegeben werden, muss dieser Personenkreis benannt werden.)

g) Zeitpunkt der Löschung/Vernichtung/Anonymisierung der Daten

Die personenbezogenen Daten werden nach Erreichen des Studienziels/am Ende des Forschungsvorhabens, spätestens jedoch nach 10 Jahren anonymisiert, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Archivierungspflichten vorsehen. Unabhängig davon haben Sie ein persönliches Recht auf Löschung der Studiendaten und Vernichtung des Materials.

4. Biomaterialien/genetische Daten

Verwendete Materialien:

- Blutprobe
- Hautgewebe von der Gesäßhaut

5. Entschädigung

Nachdem eine Blutprobe von Ihnen abgenommen wurde, erhalten Sie eine Aufwandsentschädigung von 20.- €.

Nachdem eine Gewebeprobe aus Ihrer Gesäßhaut gewonnen wurde, erhalten Sie eine Aufwandsentschädigung von 30.- € pro Biopsie und 30.- € Reisekostenentschädigung (gesamt 150.-€).

Wenn Sie die oben genannten Einzelheiten zu der Untersuchung verstanden haben und sich weiterhin zur Teilnahme bereiterklären, lesen und unterschreiben Sie bitte die beigefügte Einverständniserklärung.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Lübeck Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck

→ UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein**Campus Lübeck****Institut für Entzündungsmedizin**
Direktor: Prof. Dr. med. D. Thaçi

Einverständniserklärung

(Version 02; 29.3.2017)

Titel der Studie:

Etablierung und Validierung einer toxikologischen Hochdurchsatz-Technik von chemischen Substanzen an genetisch-definierten immortalisierten Keratinozyten unter Verwendung eines ex-vivo-Vollhautmodells

Akronym: KeraTox

Ich wurde von Herrn/Frau über die Zielsetzung der Studie aufgeklärt. Das im Rahmen der Studie nach meinem Einverständnis entnommene Blut und Gewebe wird anschließend für weitere Untersuchungen im Institut für Entzündungsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck verwendet. Die Untersuchungen dienen der Erforschung der Schädigung der Haut durch UV-Licht und oxidativem Stress. Dazu wird die Haut in verschiedene Stücke eingeteilt, welche dann in verschiedenen Untersuchungsbedingungen im Labor kultiviert werden. Ein anderer Teil des von Ihnen entnommenen Hautstückes wird an den Projektpartner acCELLerate in Hamburg geschickt. Aus diesem Teil werden Einzelzellen zur Herstellung einer Zellkultur gewonnen, die eine stabile Langlebigkeit besitzt, um einerseits in weiteren Experimenten auf gleicher funktioneller Ebene die Entgiftungs-Prozesse der Zellen zu untersuchen und andererseits die Zellkulturen für ein kommerziell anbietbares Zell-basiertes Toxizitäts-Testsystem zu entwickeln.

Mir entstehen keine Belastungen, Risiken oder Gefahren, wenn ich mich einverstanden erkläre, daß das entnommene Gewebe für weiterführende Untersuchungen verwendet wird.

Ich hatte Gelegenheit, alle mich interessierenden Fragen zu stellen.

Ich bin darüber aufgeklärt, daß ich meine Zustimmung zur Blut- und/oder Gewebeentnahme jederzeit auch ohne Angabe von Gründen bis zum Beginn der Blutabnahme bzw. Operation zurückziehen kann. Eine Ablehnung hat keinen Einfluß auf die Qualität meiner weiteren medizinischen Versorgung.

Das Einverständnis zur Verwendung meines Blutes oder Gewebes zu Forschungszwecken kann ich jederzeit zurückziehen, auch nach der Entnahme des Blutes oder des Hautgewebes. Es entstehen mir dadurch keine Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder mein Verhältnis zu meiner/meinem behandelnden Ärztin bzw. Arzt.

Die mich betreffenden Daten, die im Zusammenhang mit der Studie erhoben werden, unterliegen dem Datenschutz und werden nicht an Dritte weitergegeben.

Ich stimme der Teilnahme an dieser Untersuchung zu.

Name des Studienteilnehmers in Druckschrift

Unterschrift des Studienteilnehmers

Datum

Unterschrift des Arztes

Datum

Anhang 4: Ergebnisse der mRNA Isolation.

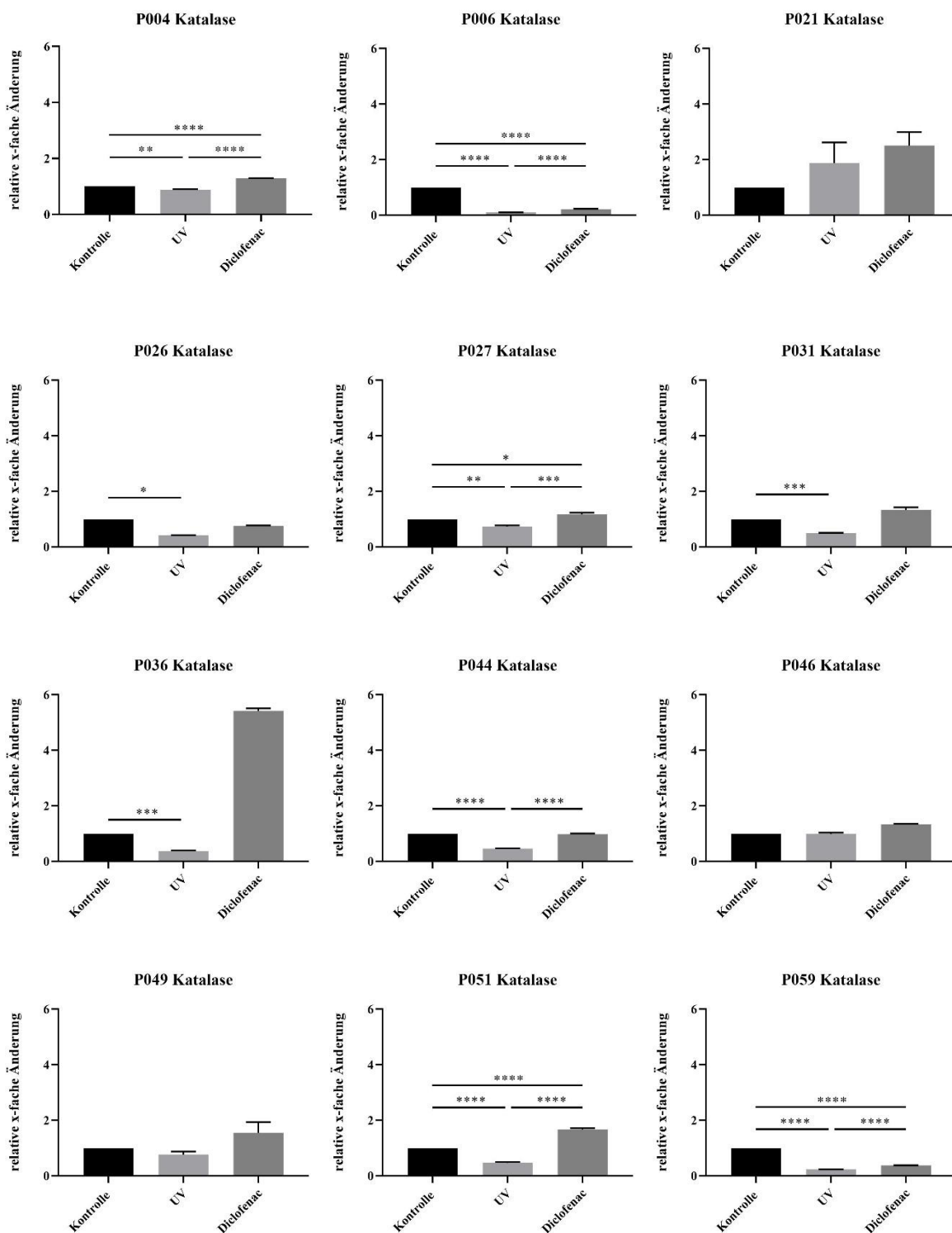
Patientenprobe	Konzentration mRNA ng/μL	260/280
P004 Kontrolle	23,8	2,09
P004 UV	31,6	2,10
P004 Diclofenac	37,5	1,86
P006 Kontrolle	15,0	2,10
P006 UV	56,8	2,11
P006 Diclofenac	77,3	2,11
P021 Kontrolle	93,6	2,07
P021 UV	82,6	2,12
P021 Diclofenac	83,7	2,07
P026 Kontrolle	26,3	2,12
P026 UV	70,3	2,10
P026 Diclofenac	44,0	2,11
P027 Kontrolle	14,2	2,00
P027 UV	90,4	2,05
P027 Diclofenac	86,7	2,06
P031 Kontrolle	65,9	2,07
P031 UV	40,5	2,09
P031 Diclofenac	7,4	1,92
P036 Kontrolle	44,8	2,08
P036 UV	57,4	2,14
P036 Diclofenac	7,2	1,73
P044 Kontrolle	40,8	2,16
P044 UV	59,0	2,09

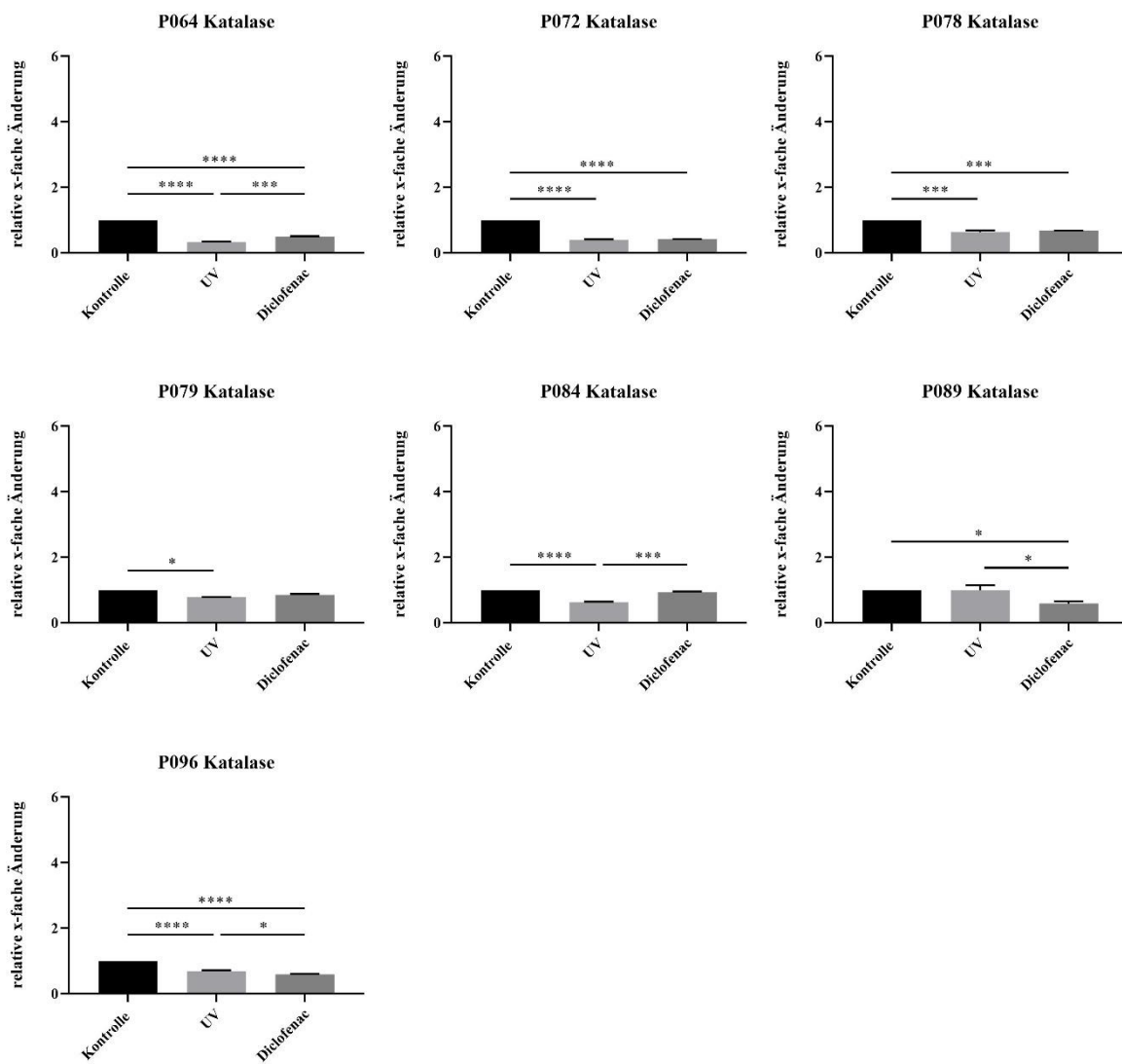
P044 Diclofenac	35,6	2,16
P046 Kontrolle	67,8	2,06
P046 UV	61,8	2,11
P046 Diclofenac	27,3	2,13
P049 Kontrolle	40,2	2,06
P049 UV	67,7	2,07
P049 Diclofenac	73,2	2,01
P051 Kontrolle	56,8	1,99
P051 UV	82,4	2,00
P051 Diclofenac	116,8	2,08
P059 Kontrolle	24,6	1,97
P059 UV	62,4	2,08
P059 Diclofenac	61,0	2,04
P064 Kontrolle	101,5	2,10
P064 UV	125,1	2,10
P064 Diclofenac	106,9	2,09
P072 Kontrolle	31,3	2,11
P072 UV	105,3	1,87
P072 Diclofenac	97,3	2,08
P078 Kontrolle	63,6	2,12
P078 UV	93,5	2,06
P078 Diclofenac	120,8	2,09
P079 Kontrolle	64,4	1,98
P079 UV	94,3	2,10
P079 Diclofenac	83,6	2,12

P084 Kontrolle	98,6	2,11
P084 UV	35,6	2,12
P084 Diclofenac	65,8	2,07
P089 Kontrolle	20,9	2,21
P089 UV	62,2	2,16
P089 Diclofenac	67,3	2,13
P096 Kontrolle	42,5	2,10
P096 UV	47,5	2,09
P096 Diclofenac	101,9	2,09

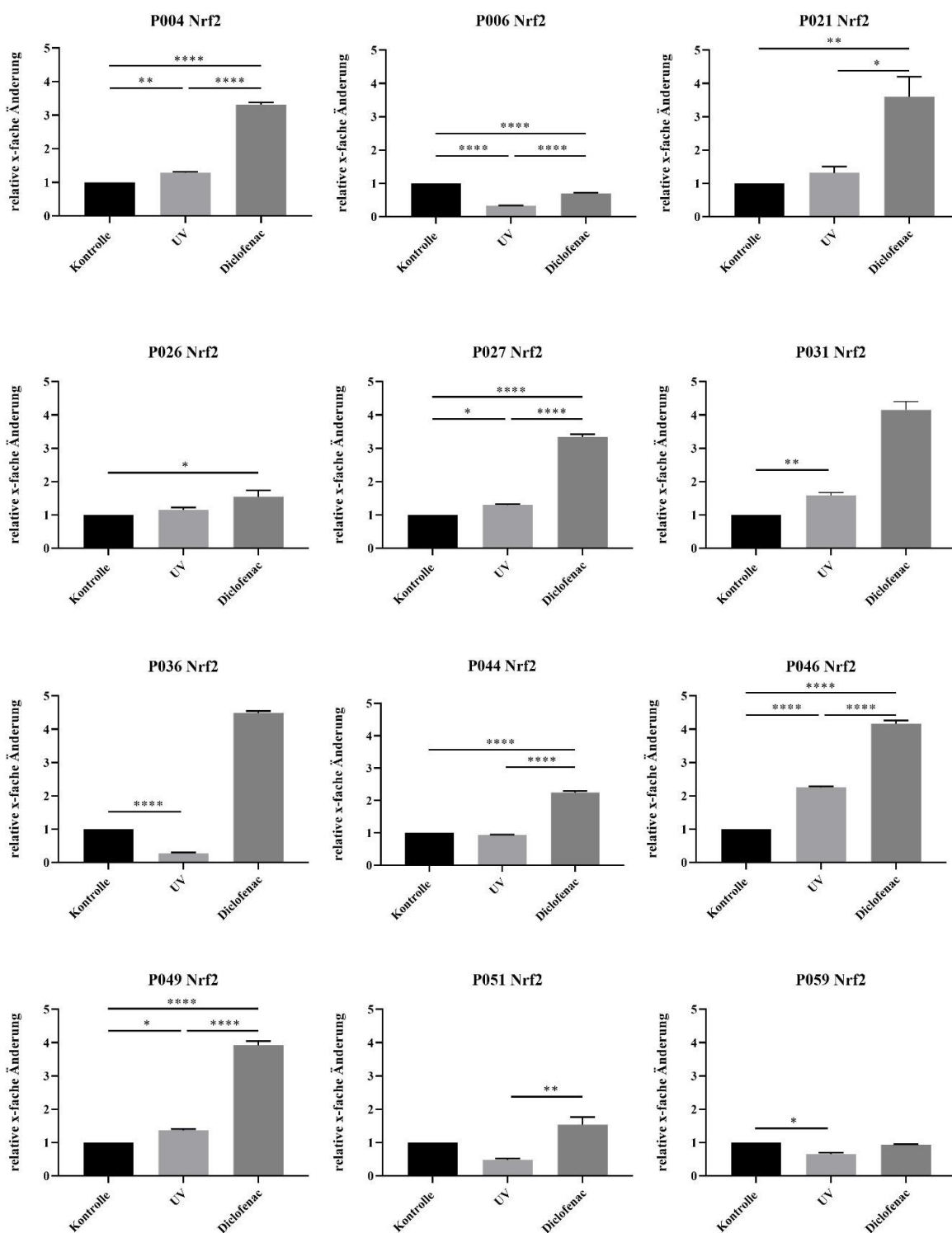
Anhang 5: Auswertung der Echtzeit-TaqMan-PCR.

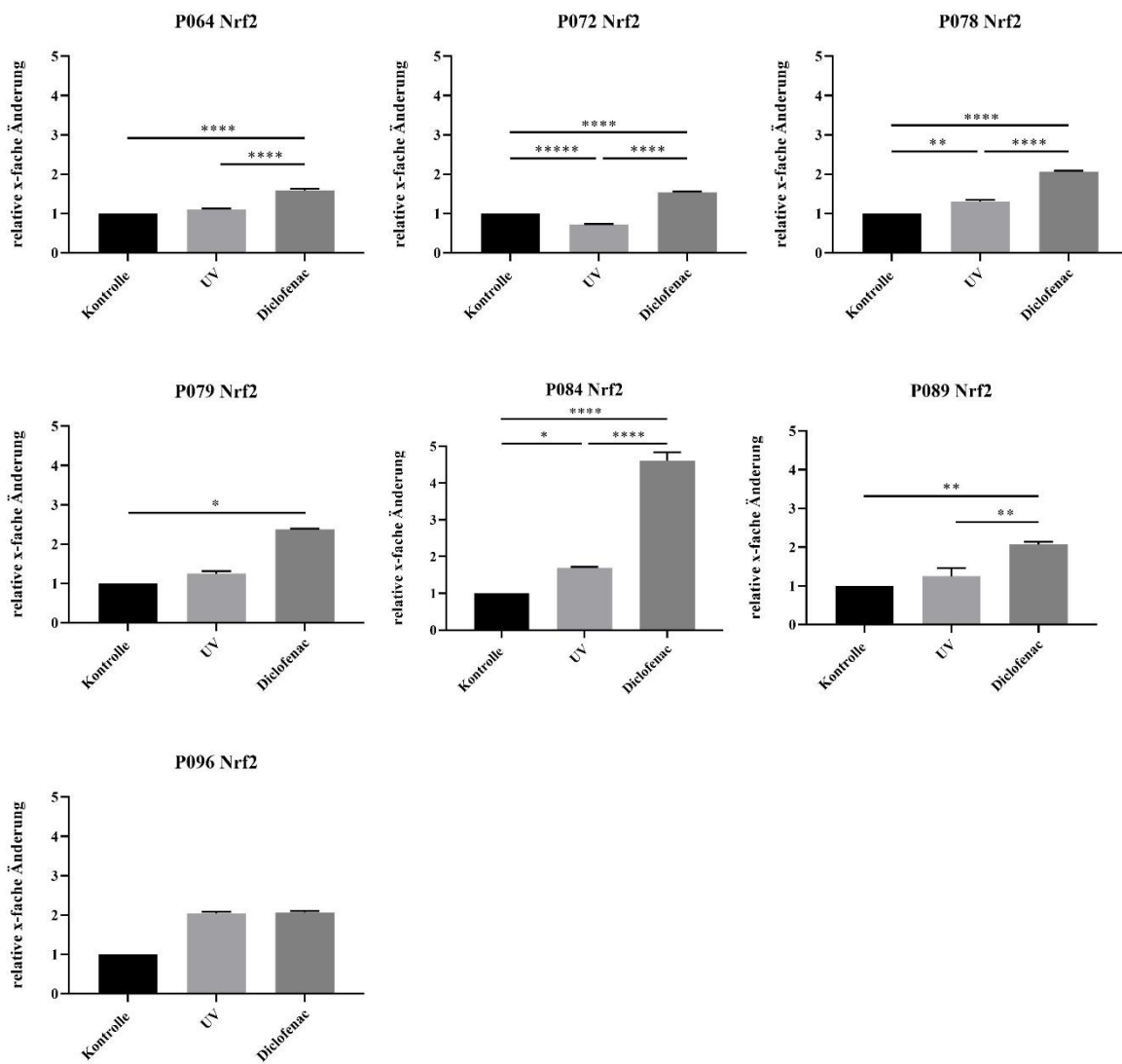
Katalase



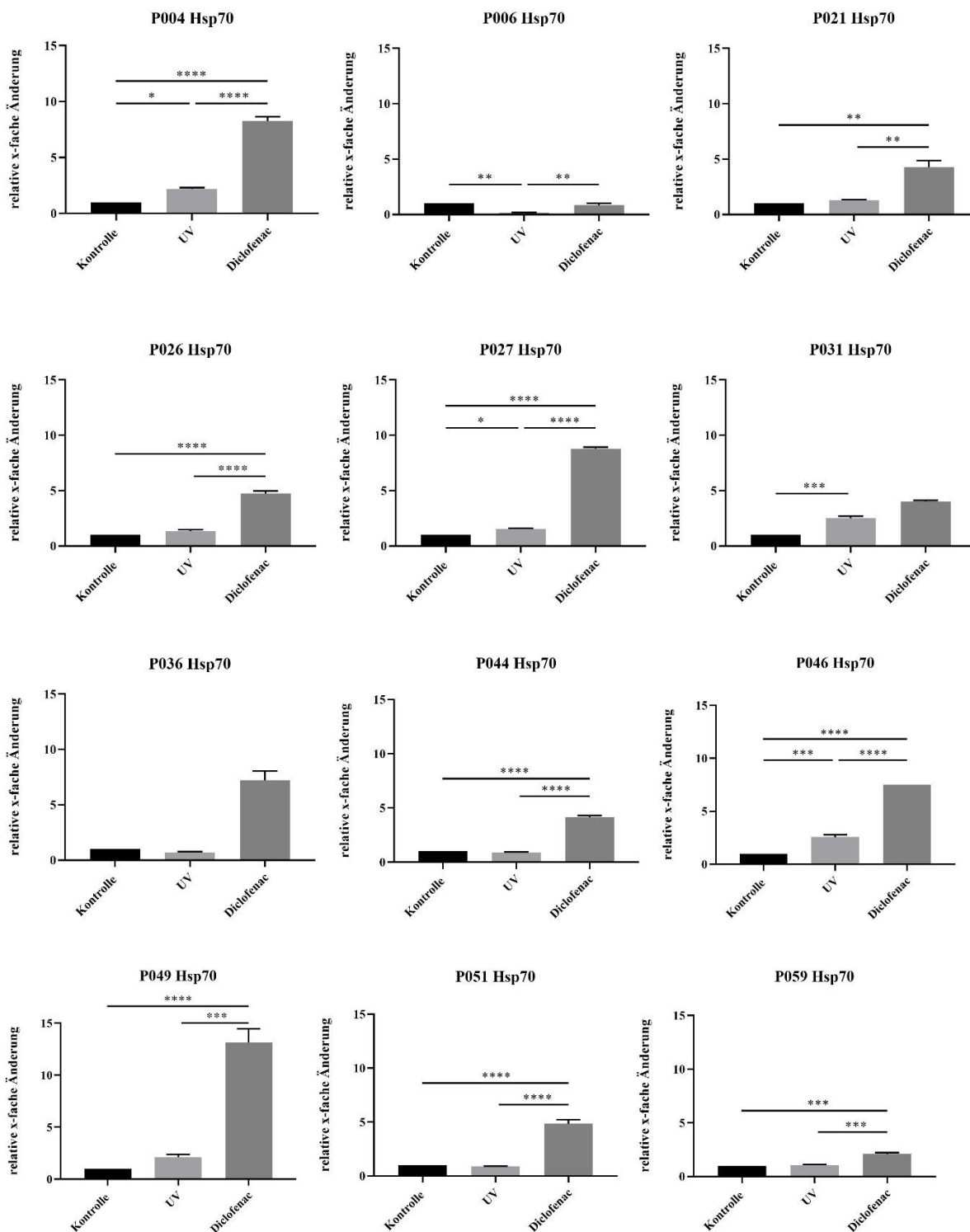


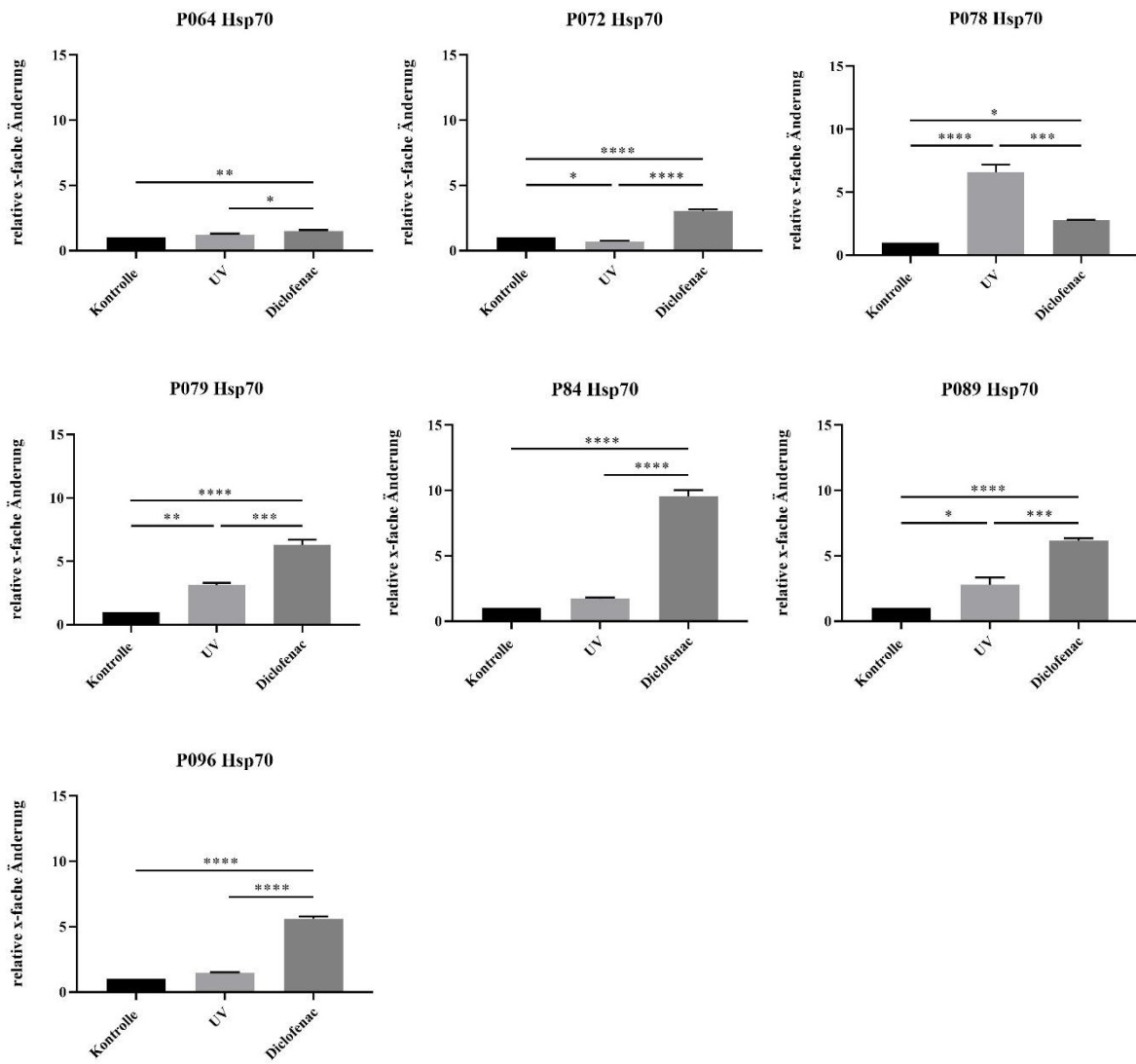
Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)



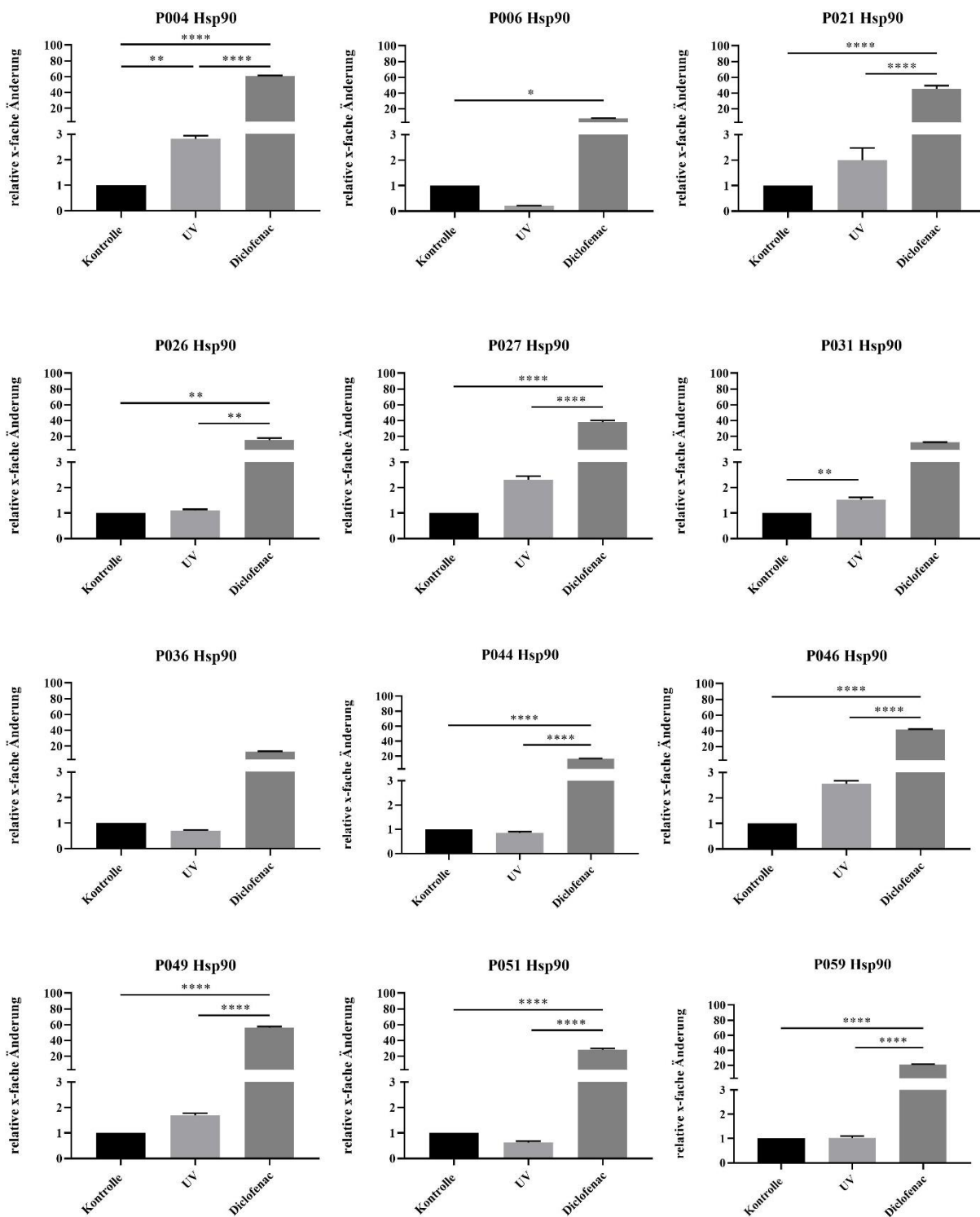


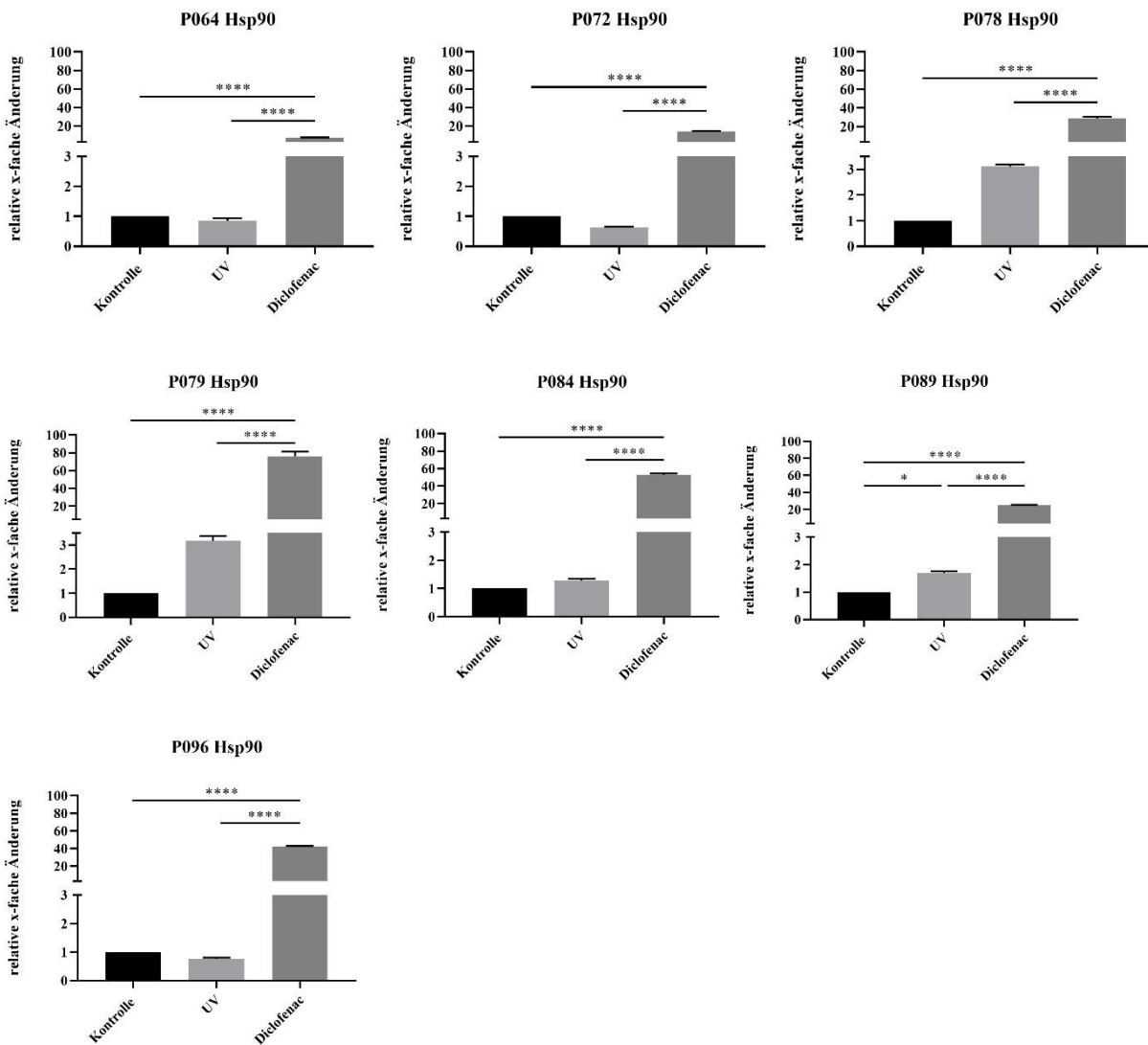
Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)





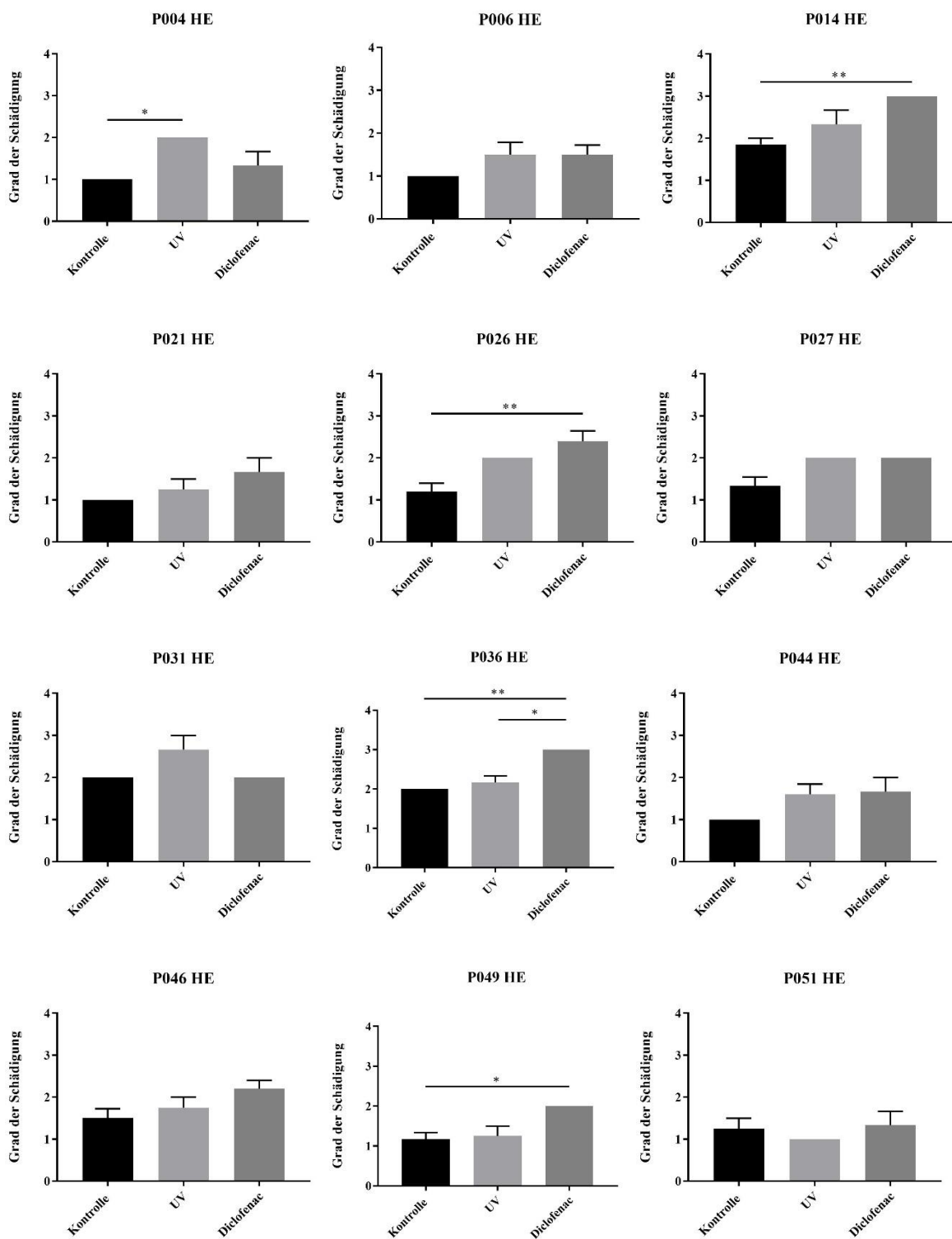
Hitzeschockprotein 90 (Hsp90)

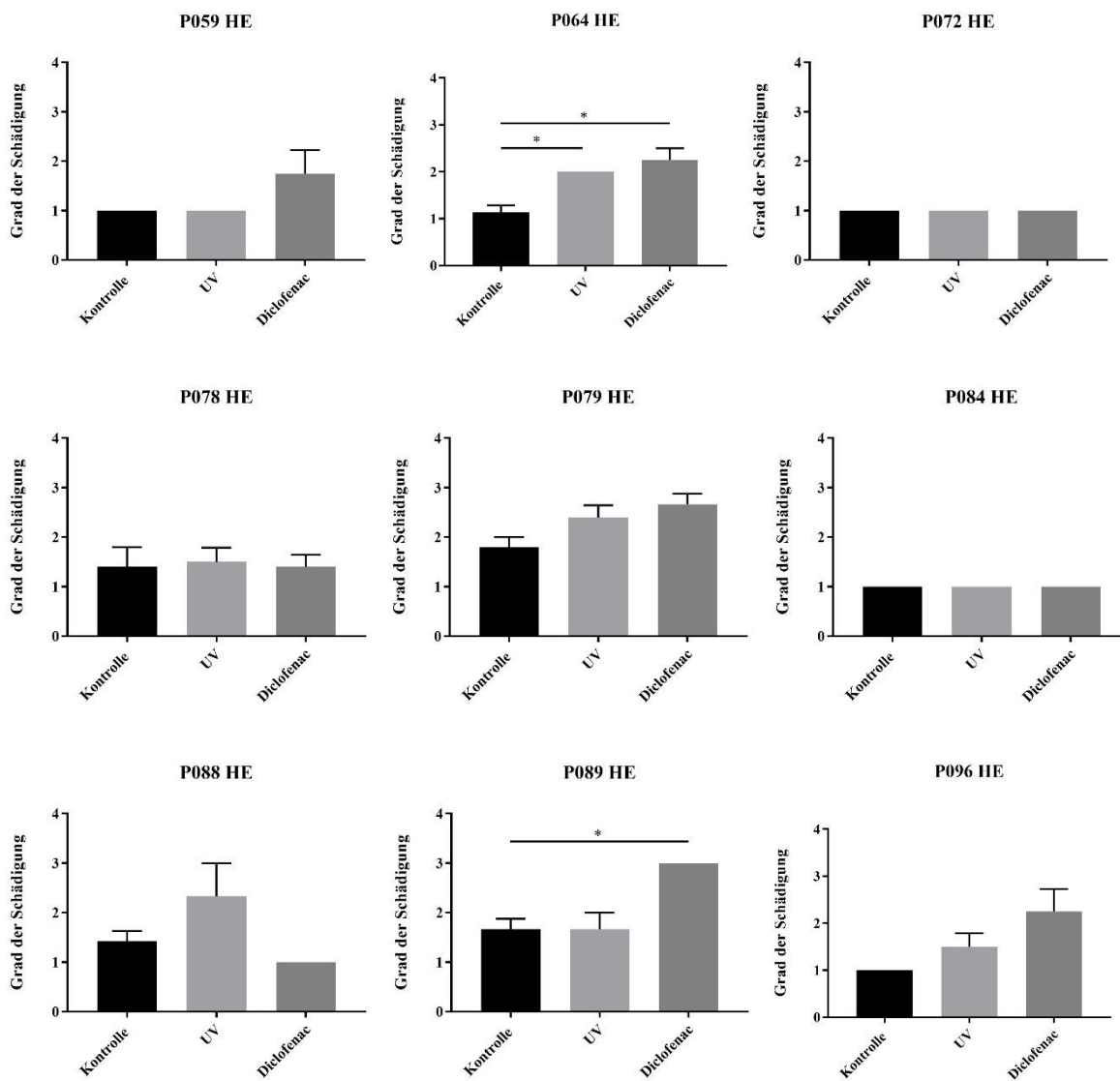




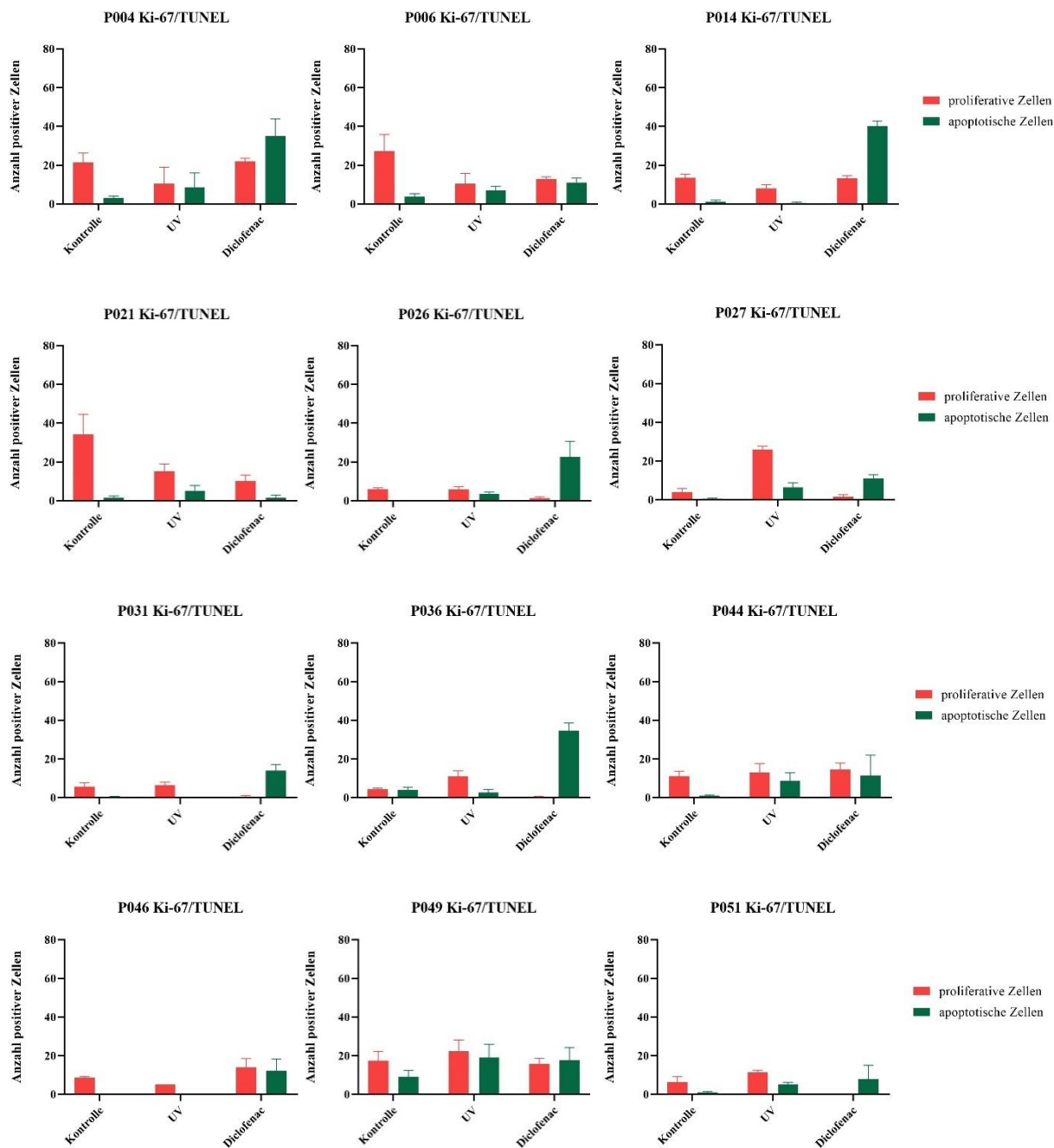
Anhang 6: Auswertung der immunhistochemischen und immunfluoreszenz Färbungen.

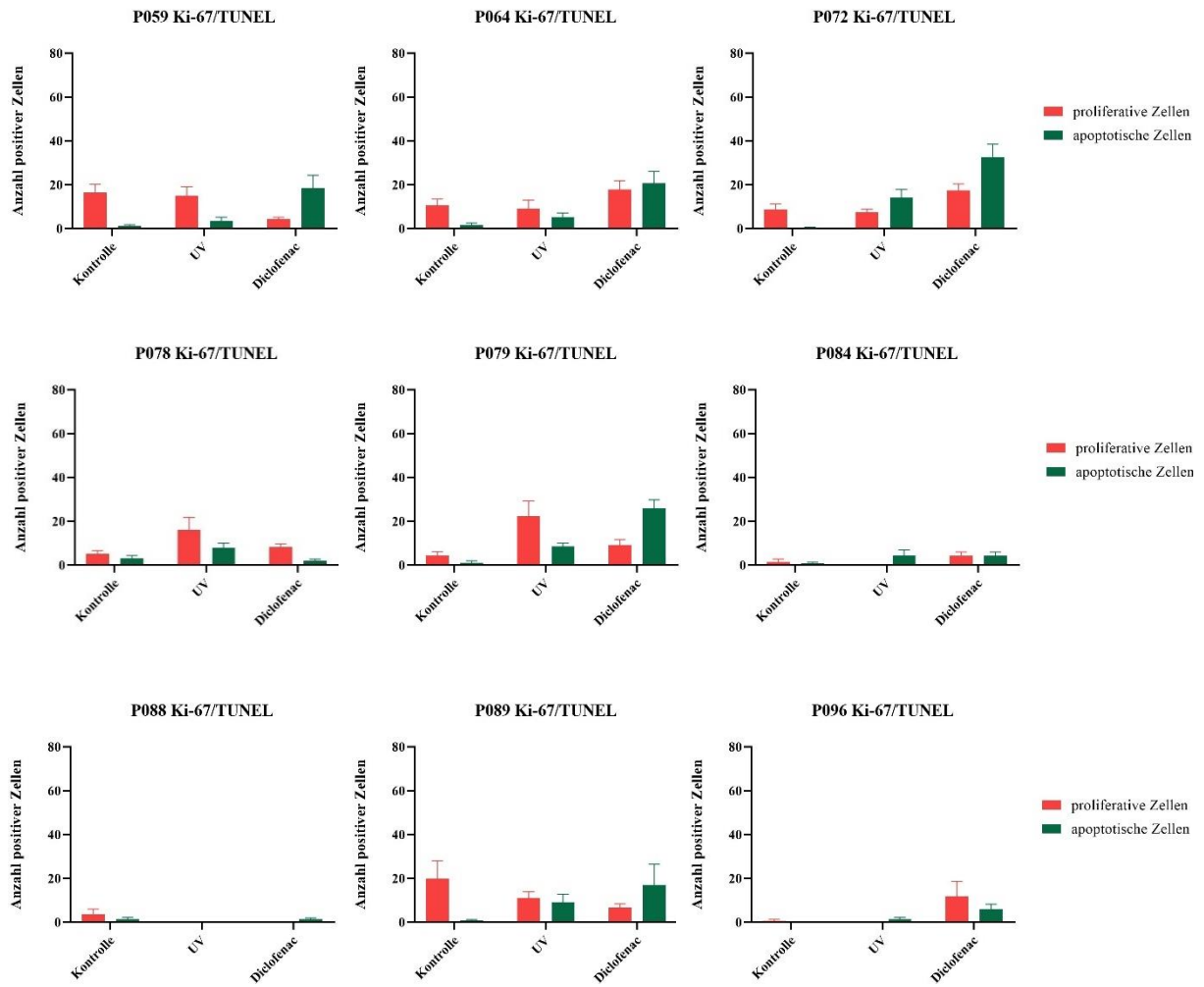
Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

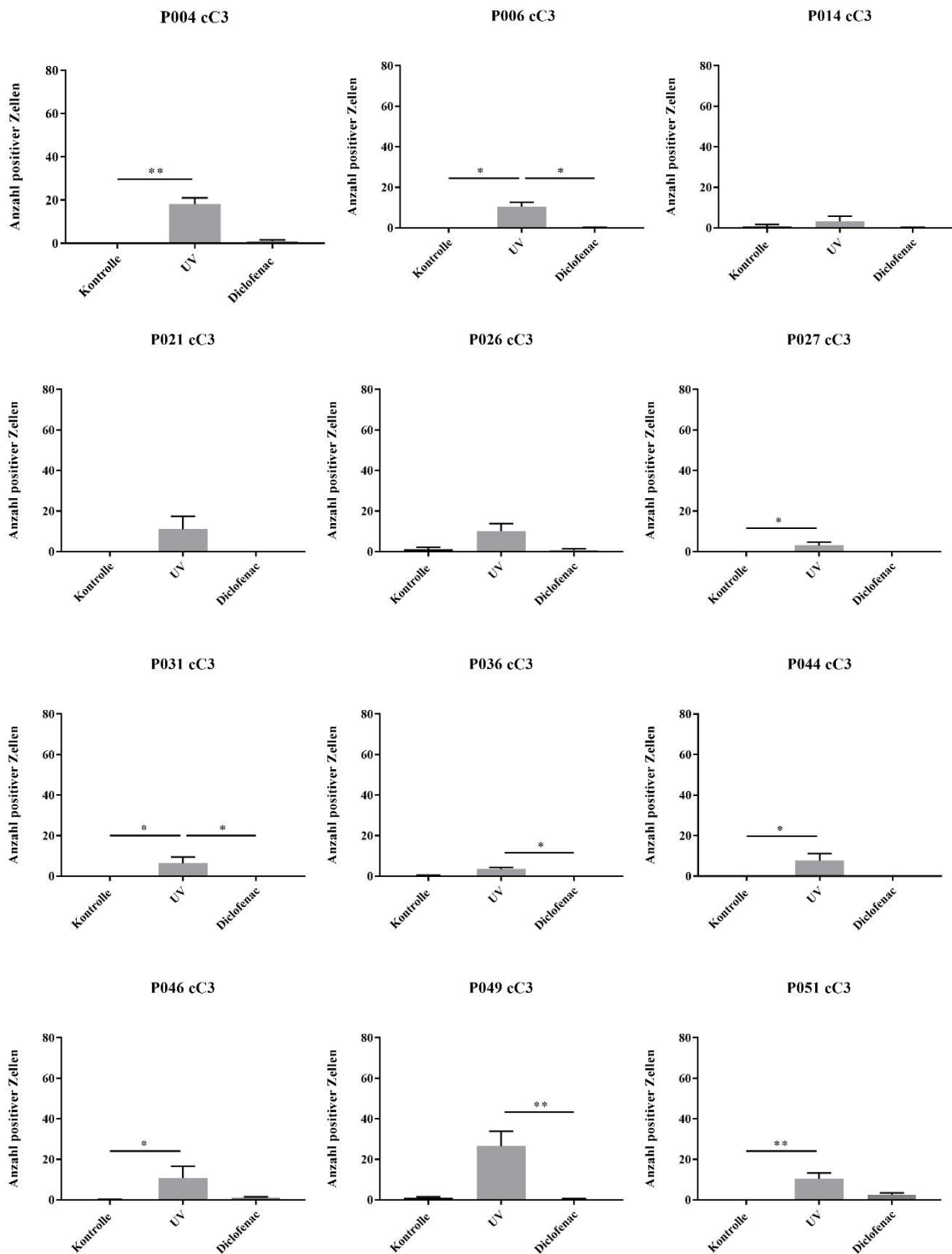


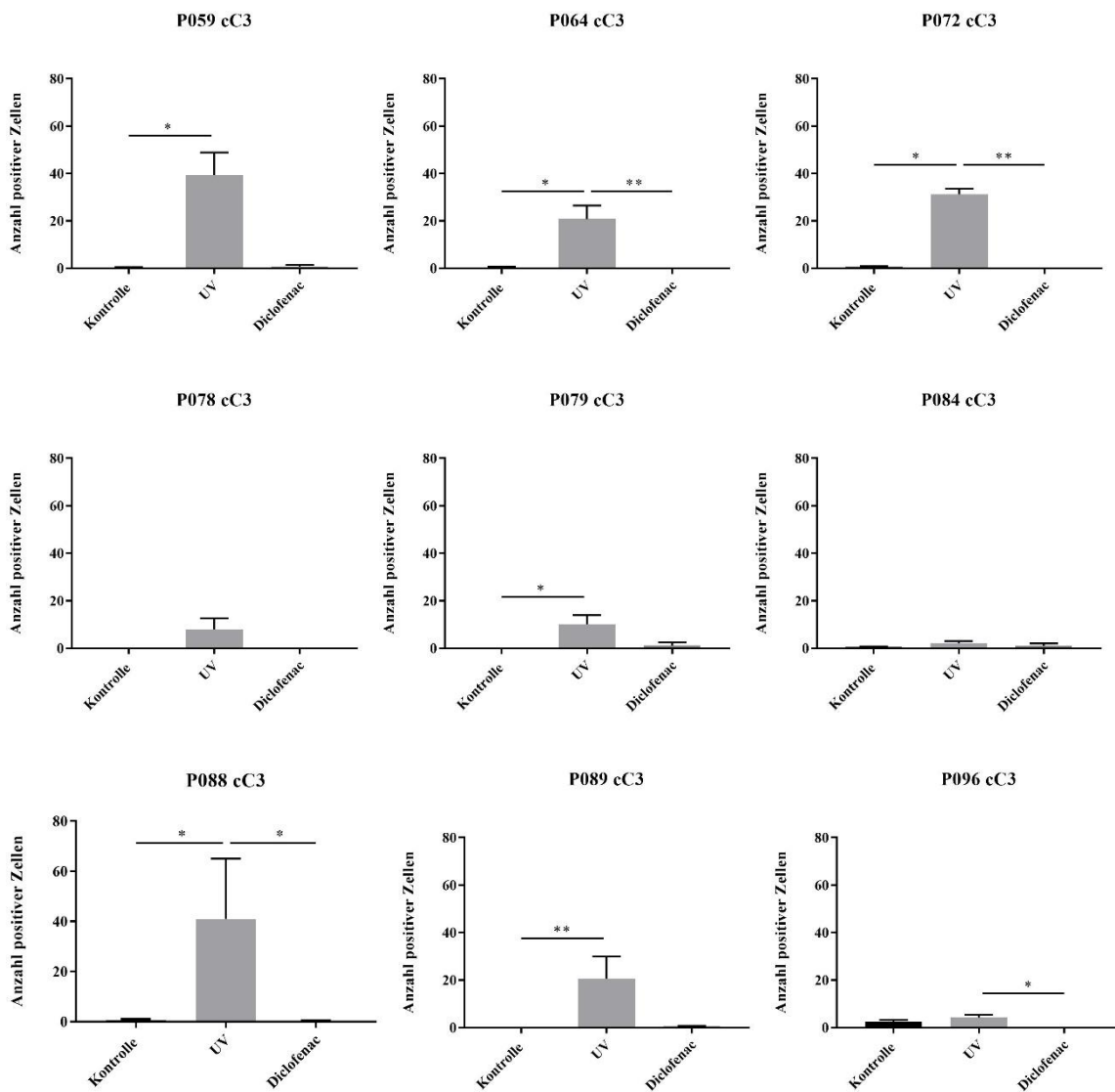


Ki-67/TUNEL Färbung

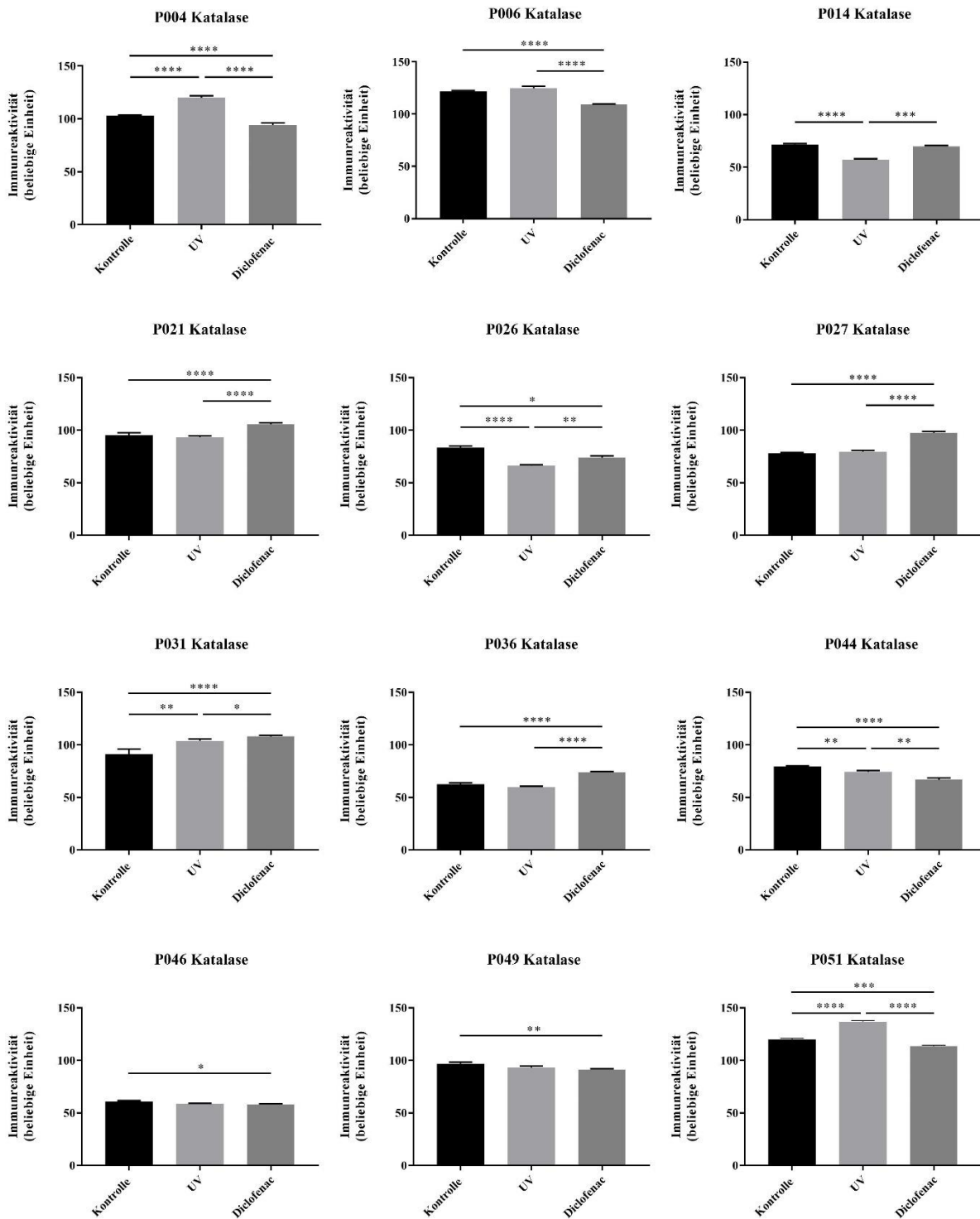


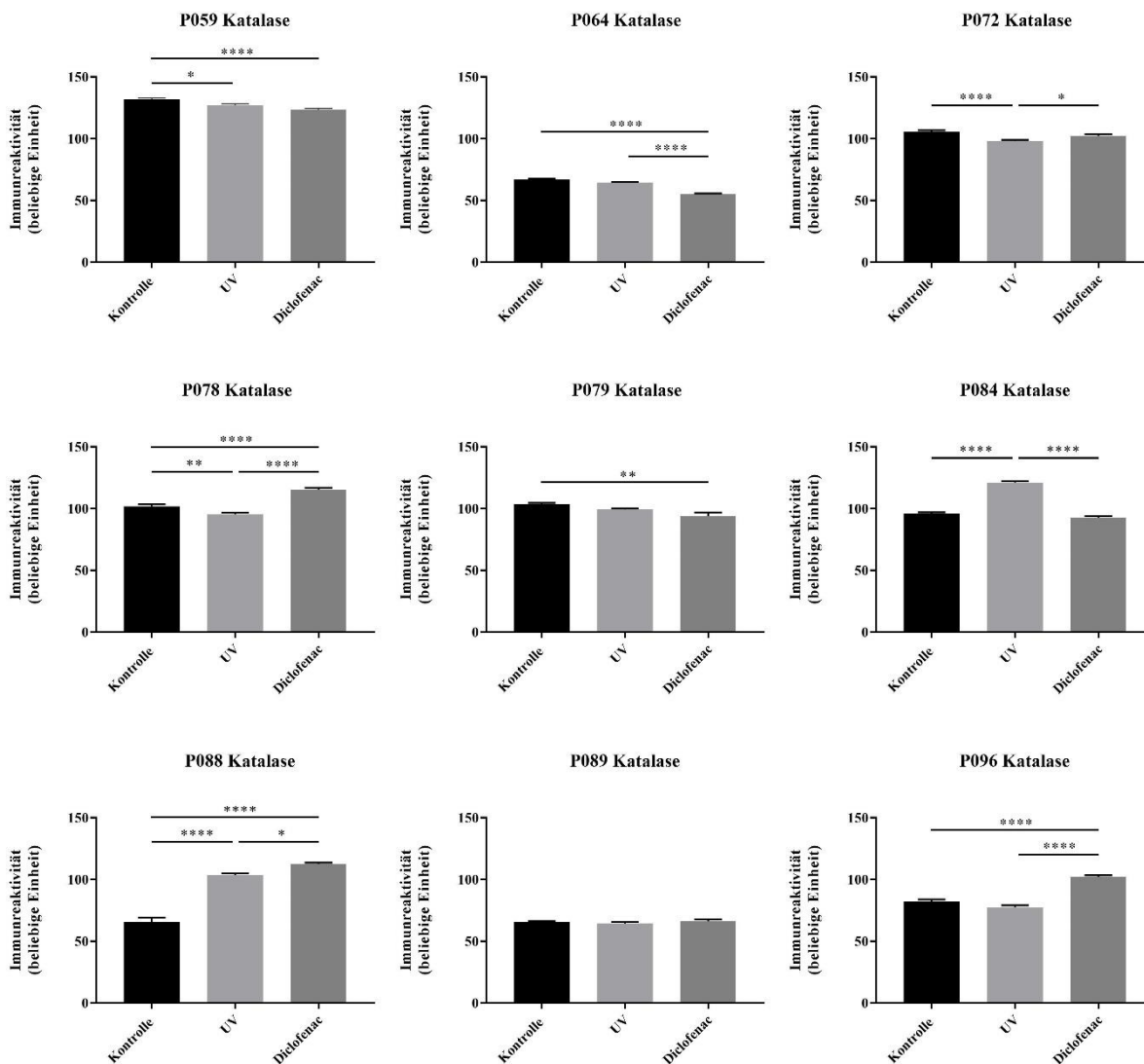


Gesplattene (*cleaved*) Caspase 3 (cC3) Färbung

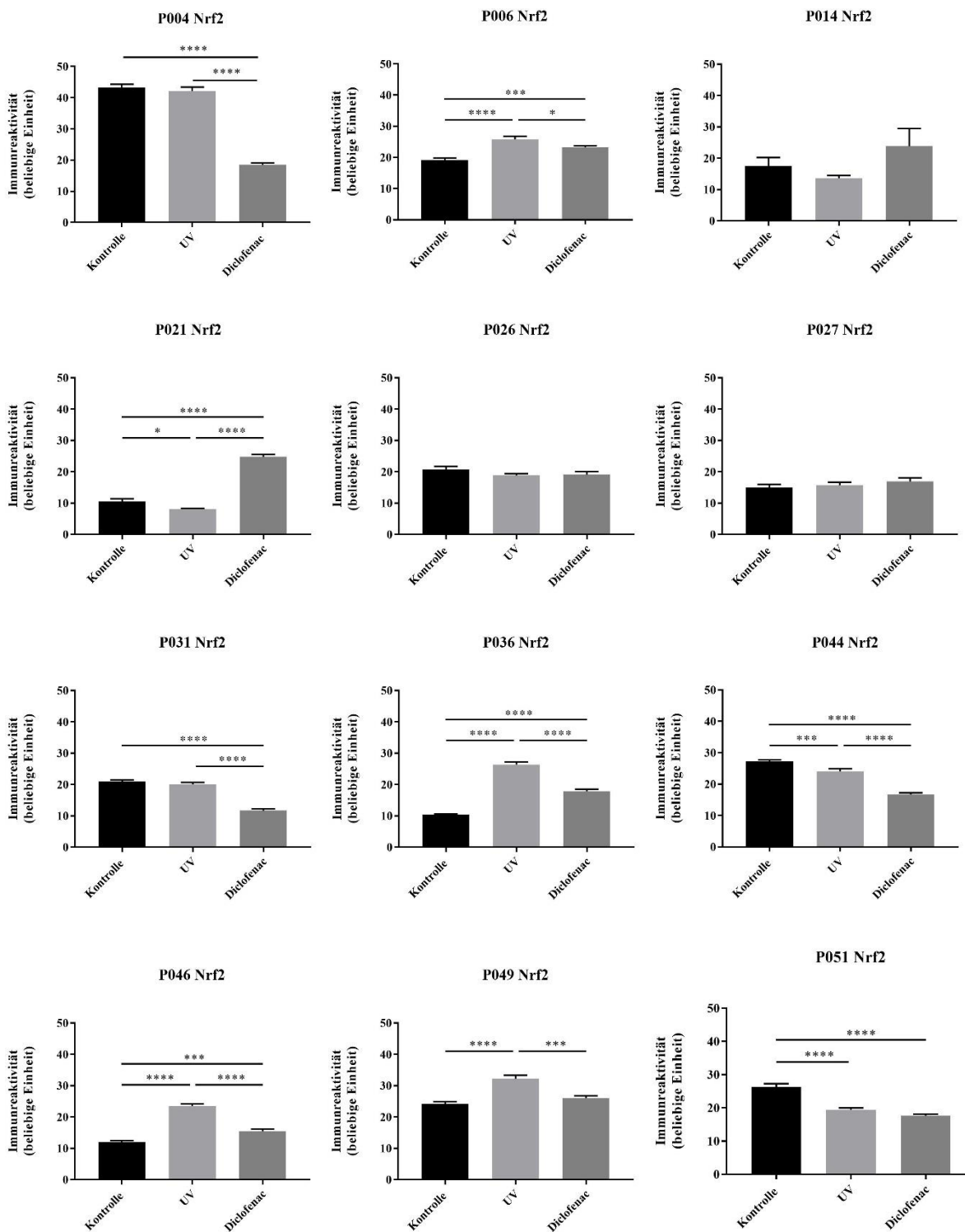


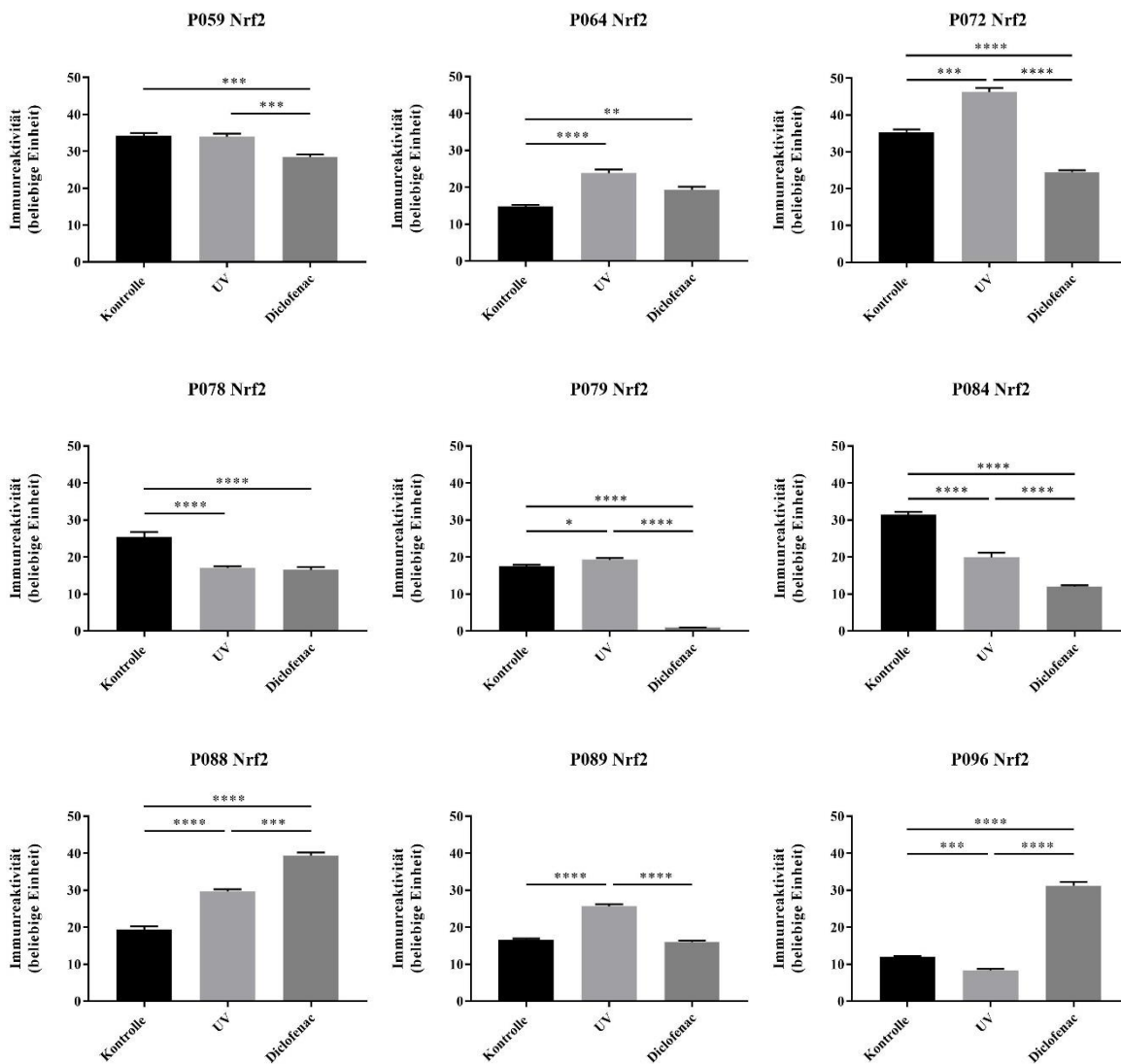
Katalase Färbung



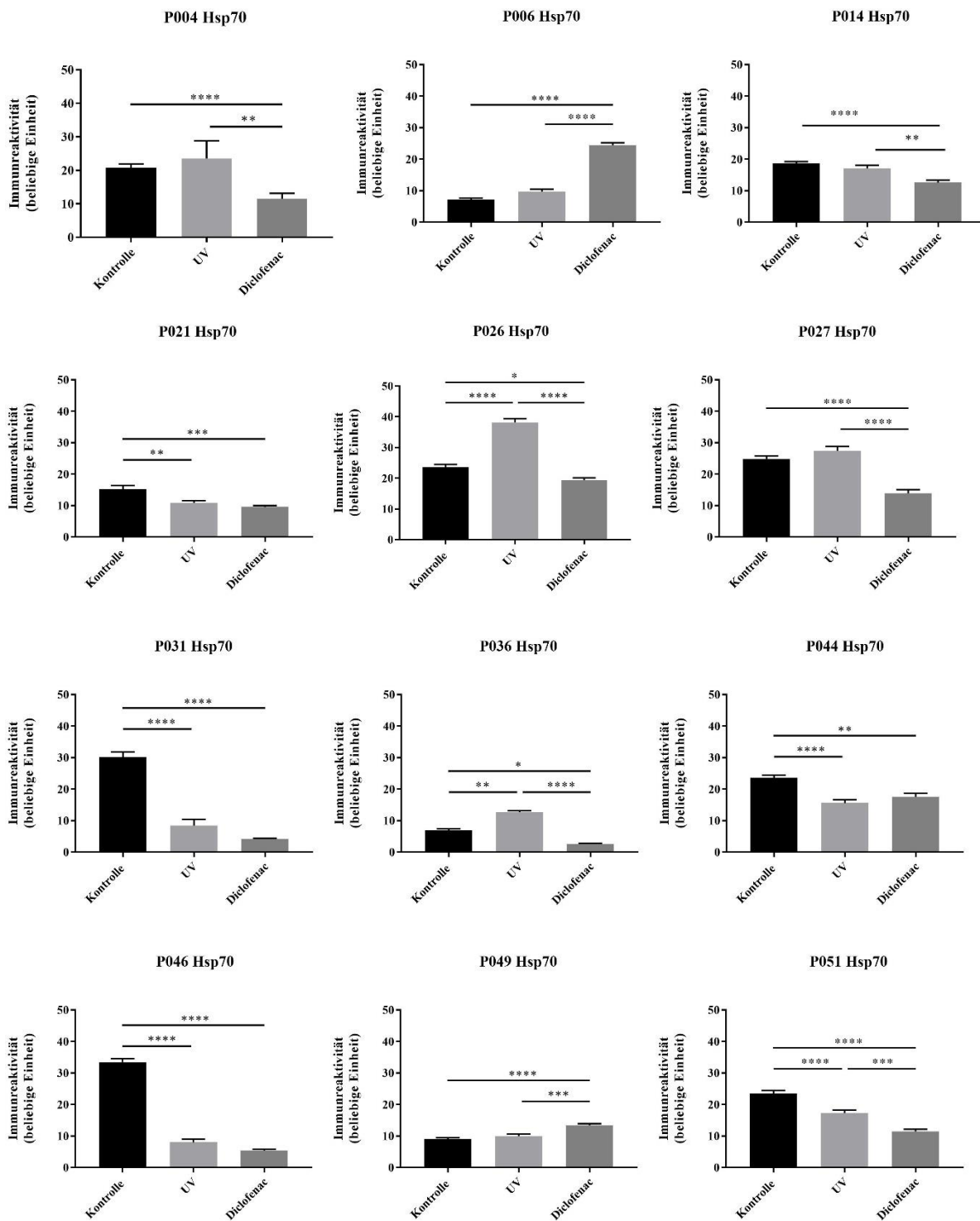


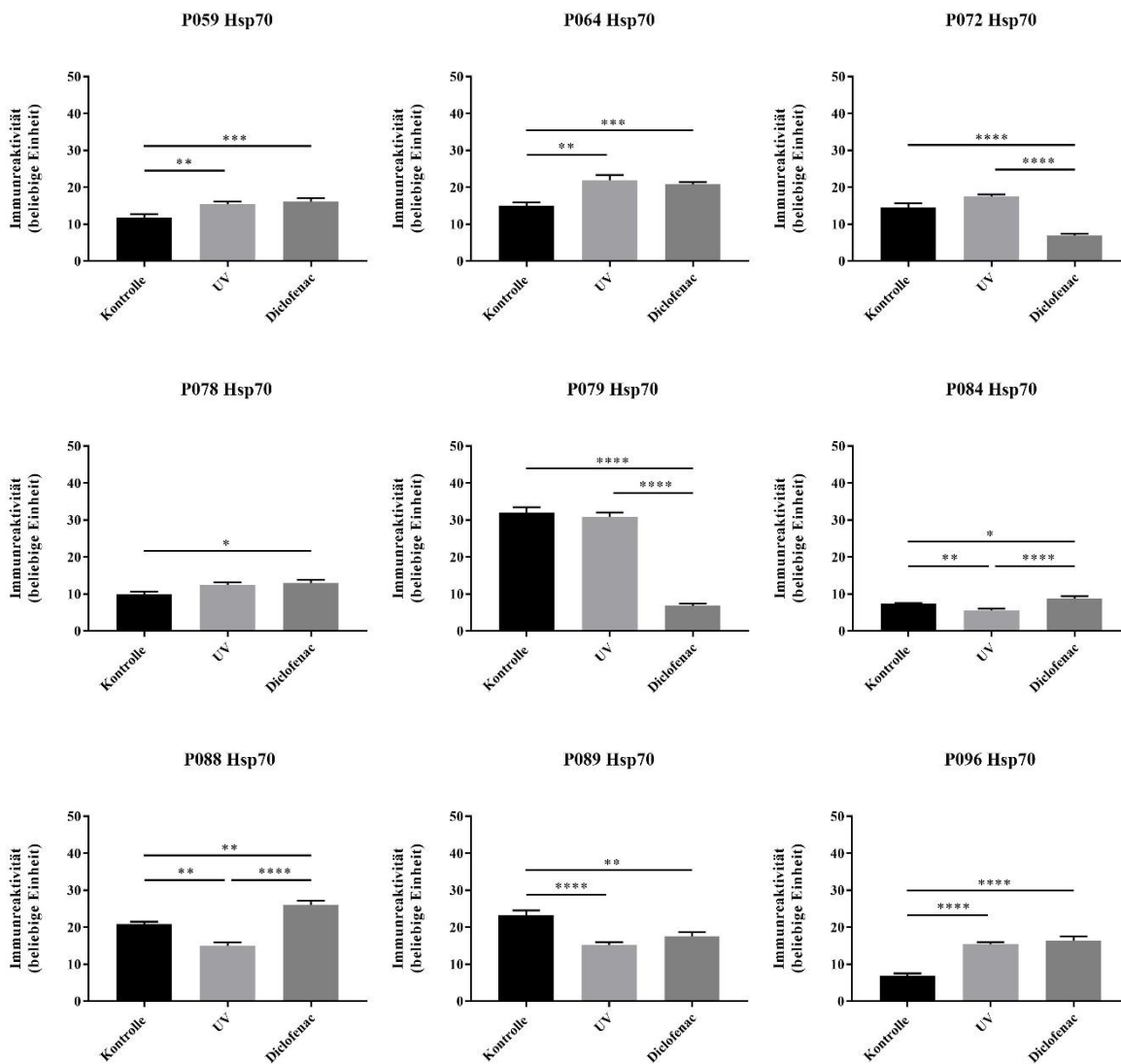
Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) Färbung



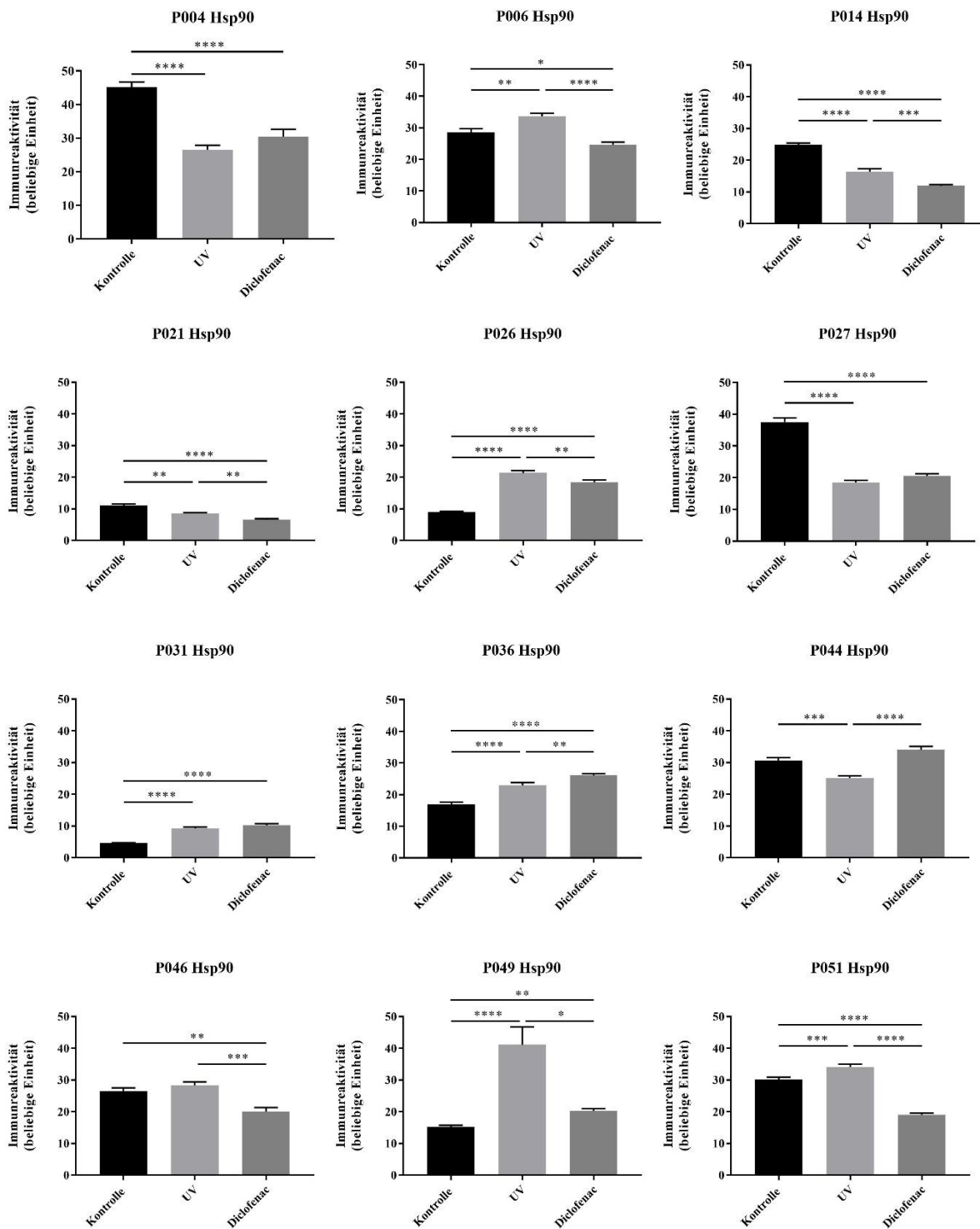


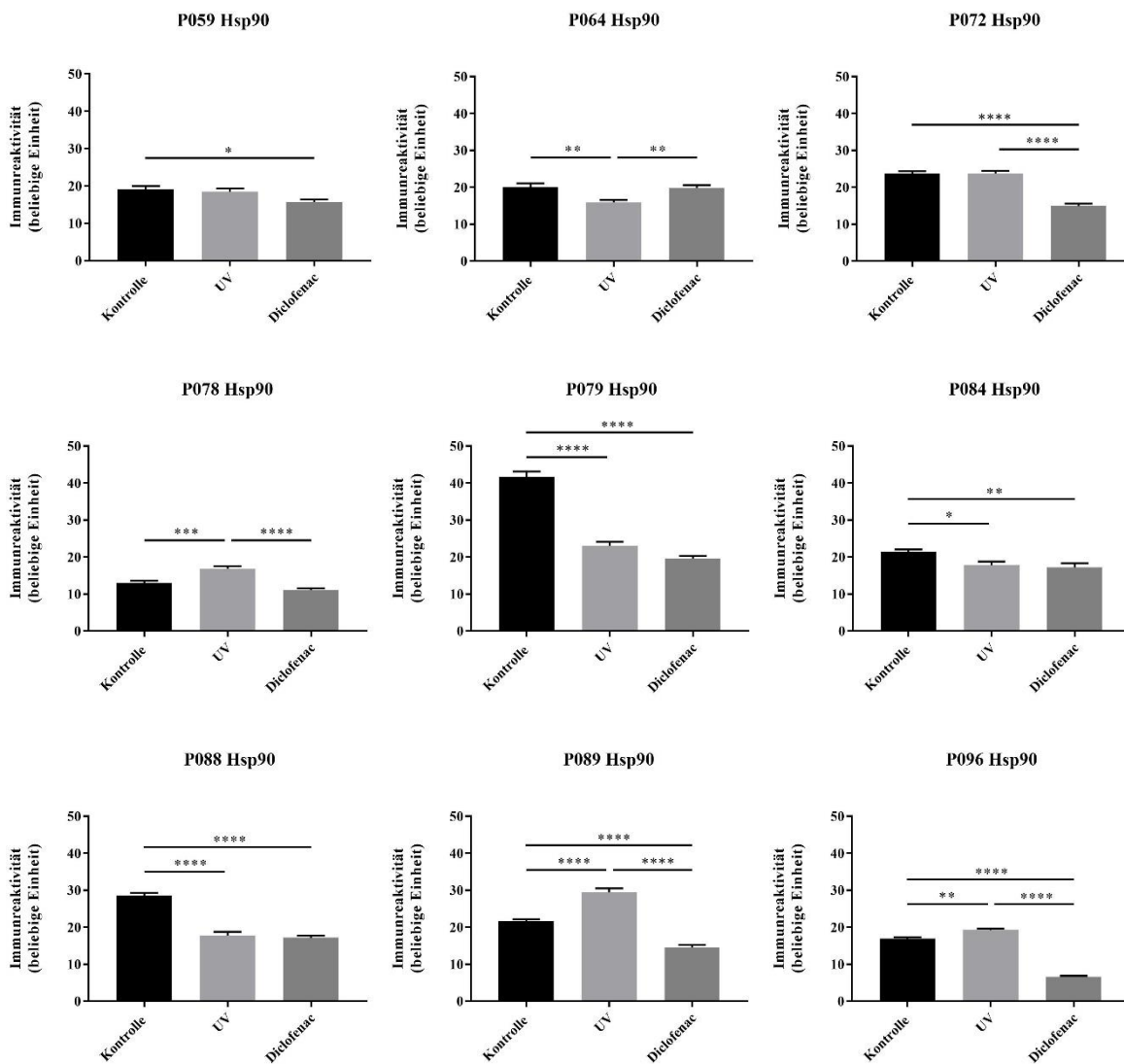
Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) Färbung





Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) Färbung





Literaturverzeichnis

- Afaq, F., Mukhtar, H., 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J. Photochem. Photobiol. B* 63, 61–69.
- Ambach, W., Blumthaler, M., 1993. Biological effectiveness of solar UV radiation in humans. *Experientia* 49, 747–753.
- Baron, J.M., Wiederholt, T., Heise, R., Merk, H.F., Bickers, D.R., 2008. Expression and function of cytochrome P450-dependent enzymes in human skin cells. *Curr. Med. Chem.* 15, 2258–2264.
- Bayerl, C., Taake, S., Moll, I., Jung, E.G., 1995. Characterization of sunburn cells after exposure to ultraviolet light. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 11, 149–154.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., Donato, R., 2018. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1865, 721–733.
- Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J., 2000. Photoaging of human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 16, 239–244.
- Bernerd, F., Asselineau, D., 1998. UVA exposure of human skin reconstructed *in vitro* induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ.* 5, 792–802.
- Bernerd, F., Asselineau, D., 1997. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed *in vitro*. *Dev. Biol.* 183, 123–138.
- Bernerd, F., Compan, D., Bernard, B., Leclaire, J., Medaisko, C., Mehul, B., Seité, S., Marionnet, C., Dumas, A., Verrecchia, F., Mollier, K., Lahfa, M., Mauviel, A., Dubertret, L., 2003. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 121, 1447–1458.
- Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V., 1999. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 65–72.
- Brenner, W., Gschnait, F., 1979. Decreased DNA repair activity in sunburn cells: A possible pathogenetic factor of the epidermal sunburn reaction. *Arch. Dermatol. Res.* 266, 11–16
- Campbell, C., Quinn, A.G., Angus, B., Farr, P.M., Rees, J.L., 1993. Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res.* 53, 2697–2699.
- Çayirli, M., Köse, O., Demiriz, M., 2013. Clinical, dermoscopic and immunohistochemical assessment of actinic keratoses and evaluation of the effectiveness of diclofenac therapy with immunohistochemical analysis. *Arch. Dermatol. Res.* 305, 389–395.

- Chen, H., Wu, Y., Zhang, Y., Jin, L., Luo, L., Xue, B., Lu, C., Zhang, X., Yin, Z., 2006. Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination. *FEBS Lett.* 580, 3145–3152.
- Cotsarelis, G., Cheng, S.-Z., Dong, G., Sun, T.-T., Lavker, R.M., 1989. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57, 201–209.
- Crespi, C., Miller, V., 1997. The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 7, 203–210.
- Daniels, F., Brophy, D., Lobitz, W.C., 1961. Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 37, 351–357.
- Danno, K., Horio, T., 1987. Sunburn cell: Factors involved in its formation. *Photochem. Photobiol.* 45, 683–690.
- Eberle, J., Fecker, L.F., Forschner, T., Ulrich, C., Röwert-Huber, J., Stockfleth, E., 2007. Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *Br. J. Dermatol.* 156, 18–24.
- Edwards, M., Marks, R., Dykes, P., Merrett, V., Morgan, H., O'Donovan, M., 1991. Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96, 392-396.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Fecker, L.F., Stockfleth, E., Braun, F.K., Rodust, P.M., Schwarz, C., Köhler, A., Leverkus, M., Eberle, J., 2010. Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2098–2109.
- Fecker, L.F., Stockfleth, E., Nindl, I., Ulrich, C., Forschner, T., Eberle, J., 2007. The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br. J. Dermatol.* 156, 25–33.
- Fischer, T.W., Kleszczyński, K., Hardkop, L.H., Kruse, N., Zillikens, D., 2013. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in *ex vivo* human skin. *J. Pineal Res.* 54, 303–312.
- Fischer, T.W., Zbytek, B., Sayre, R.M., Apostolov, E.O., Basnakian, A.G., Sweatman, T.W., Wortsman, J., Elsner, P., Slominski, A., 2006. Melatonin increases survival of HaCaT keratinocytes by suppressing UV-induced apoptosis. *J. Pineal Res.* 40, 18–26.
- Fischer, T.W., Zmijewski, M.A., Wortsman, J., Slominski, A., 2008. Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes. *J. Pineal Res.* 44, 397–407.

- Forsberg, L., Lyrenäs, L., Morgenstern, R., de Faire, U., 2001. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 500–505.
- Fredriksson, L., Wink, S., Herpers, B., Benedetti, G., Hadi, M., Bont, H. de, Groothuis, G., Luijten, M., Danen, E., Graauw, M. de, Meerman, J., de Water, B. van, 2014. Drug-induced endoplasmic reticulum and oxidative stress responses independently sensitize toward TNF α -mediated hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 140, 144–159.
- Fritsch, P.O., 2004. *Dermatologie Venerologie*, 2nd editio. ed. Springer Verlag.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28, 1317–1330.
- Gęgotek, A., Skrzydlewska, E., 2015. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 385–396.
- Goldsmith, L.A., 1991. *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. Oxford University Press, New York.
- Goyal, M.M., Basak, A., 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 1, 888–897.
- Green, H., 1980. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey Lect* 74, 101–39.
- Hall, P., McKee, P., Menage, H., Dover, R., Lane, D., 1993. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8, 203–207.
- Hirashima, R., Itoh, T., Tukey, R.H., Fujiwara, R., 2017. Prediction of drug-induced liver injury using keratinocytes: Prediction of DILI. *J. Appl. Toxicol.* 37, 863–872.
- Ho, T., Tan, B.X., Lane, D., 2019. How the other half lives: What p53 does when it is not being a transcription factor. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–19.
- Hockenbery, D., 1995. Defining apoptosis. *Am. J. Pathol.* 146, 16–19.
- Holt, M.P., Ju, C., 2006. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* 8, 48–54
- Hoter, A., El-Sabban, M., Naim, H., 2018. The HSP90 family: Structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–33.
- Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 9357–9360.
- Jayaprakash, P., Dong, H., Zou, M., Bhatia, A., O'Brien, K., Chen, M., Woodley, D.T., Li, W., 2015. Hsp90 and Hsp90 together operate a hypoxia and nutrient paucity stress-response mechanism during wound healing. *J. Cell Sci.* 128, 1475–1480.
- Johnson, J.L., 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1823, 607–613.

- Kampinga, H.H., Craig, E.A., 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 579–592.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Keum, Y.-S., 2012. Regulation of Nrf2-mediated phase II detoxification and anti-oxidant genes. *Biomol. Ther.* 20, 144–151.
- Kleszczyński, K., Fischer, T.W., 2012. Development of a short-term human full-thickness skin organ culture model *in vitro* under serum-free conditions. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 579–587.
- Kleszczyński, K., Zwicker, S., Tukaj, S., Kasperkiewicz, M., Zillikens, D., Wolf, R., Fischer, T.W., 2015. Melatonin compensates silencing of heat shock protein 70 and suppresses ultraviolet radiation-induced inflammation in human skin *ex vivo* and cultured keratinocytes. *J. Pineal Res.* 58, 117–126.
- Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., Žák, A., 2014. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol. (Praha)* 60, 153–167.
- Kokot, A., Metze, D., Mouchet, N., Galibert, M.-D., Schiller, M., Luger, T.A., Böhm, M., 2009. α -melanocyte-stimulating hormone counteracts the suppressive effect of UVB on Nrf2 and Nrf-dependent gene expression in human skin. *Endocrinology* 150, 3197–3206.
- Kulms, D., Zeise, E., Pöppelmann, B., Schwarz, T., 2002. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 21, 5844–5851.
- Kumar, S., 1999. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1060–1066.
- Latonen, L., Laiho, M., 2005. Cellular UV damage responses—Functions of tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1755, 71–89.
- Lazarska, K.E., Dekker, S.J., Vermeulen, N.P.E., Commandeur, J.N.M., 2018. Effect of UGT2B7*2 and CYP2C8*4 polymorphisms on diclofenac metabolism. *Toxicol. Lett.* 284, 70–78.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levy, G., Bomze, D., Heinz, S., Ramachandran, S.D., Noerenberg, A., Cohen, M., Shibolet, O., Sklan, E., Braspenning, J., Nahmias, Y., 2015. Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat. Biotechnol.* 33, 1264–1271.
- Lu, Z., Hasse, S., Bodo, E., Rose, C., Funk, W., Paus, R., 2007. Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Exp. Dermatol.* 16, 37–44.

- Malten, K.E., den Arend, J., 1978. Topical toxicity of various concentrations of DMSO recorded with impedance measurements and water vapour loss measurements. Recording of skin's adaptation to repeated DMSO irritation. *Contact Dermatitis* 4, 80–92.
- Manevski, N., Swart, P., Balavenkatraman, K.K., Bertschi, B., Camenisch, G., Kretz, O., Schiller, H., Walles, M., Ling, B., Wettstein, R., Schaefer, D.J., Itin, P., Ashton-Chess, J., Pognan, F., Wolf, A., Litherland, K., 2015. Phase II metabolism in human skin: Skin explants show full coverage for glucuronidation, sulfation, *N*-acetylation, catechol methylation, and glutathione conjugation. *Drug Metab. Dispos.* 43, 126–139.
- Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K.I., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y., Mizushima, T., 2010. Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848–5858.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- Miyachi, Y., Horio, T., Imamura, S., 1983. Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates. *Clin. Exp. Dermatol.* 8, 305–310.
- Mori, E., Takahashi, A., Kitagawa, K., Kakei, S., Tsujinaka, D., Unno, M., Nishikawa, S., Ohnishi, K., Hatoko, M., Murata, N., Watanabe, M., Furusawa, Y., Ohnishi, T., 2008. Time course and spacial distribution of UV effects on human skin in organ culture. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 49, 269–277.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., Douki, T., 2006. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13765–13770.
- Murphy, G., Ar, Y., Hc, W., Kulms, D., The, S.T., Wulf, H.C., Kulms, D., 2001. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp. Dermatol.* 10, 155–160.
- Nordlind, K., 2002. Expression of the heat shock proteins in heavy metal-provoked inflamed human skin. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 24, 383–394.
- Oesch, F., Fabian, E., Landsiedel, R., 2018. Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch. Toxicol.* 92, 2411–2456.
- Peters, D.C., Foster, R.H., 1999. Diclofenac/Hyaluronic acid. *Drugs Aging* 14, 313–319.
- Piao, M.S., Park, J.-J., Choi, J.-Y., Lee, D.-H., Yun, S.J., Lee, J.-B., Lee, S.-C., 2012. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. *Arch. Dermatol. Res.* 304, 387–395.
- Porter, A.G., Jänicke, R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99–104.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.-M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

- Quatresooz, P., Piérard-Franchimont, C., Paquet, P., Hubert, P., Delvenne, P., Piérard, G.E., 2008. Crossroads between actinic keratosis and squamous cell carcinoma, and novel pharmacological issues. *Eur. J. Dermatol. EJD* 18, 6–10.
- Rhie, G., Seo, J.Y., Chung, J.H., 2001. Modulation of catalase in human skin *in vivo* by acute and chronic UV radiation. *Mol. Cells* 11, 399–404.
- Rodust, P.M., Fecker, L.F., Stockfleth, E., Eberle, J., 2012. Activation of mitochondrial apoptosis pathways in cutaneous squamous cell carcinoma cells by diclofenac/hyaluronic acid is related to upregulation of Bad as well as downregulation of Mcl-1 and Bcl-w. *Exp. Dermatol.* 21, 520–525.
- Rubin, L.F., 1975. Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 243, 98–103.
- Sancho, P., Troyano, A., Fernández, C., De Blas, E., Aller, P., 2003. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol. Pharmacol.* 63, 581–589.
- Sander, C.S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C.S.L., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., Thiele, J.J., 2002. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 118, 618–625.
- Sarkar, U., Ravindra, K.C., Large, E., Young, C.L., Rivera-Burgos, D., Yu, J., Cirit, M., Hughes, D.J., Wishnok, J.S., Lauffenburger, D.A., Griffith, L.G., Tannenbaum, S.R., 2017. Integrated assessment of diclofenac biotransformation, pharmacokinetics, and omics-based toxicity in a three-dimensional human liver-immunocompetent coculture System. *Drug Metab. Dispos.* 45, 855–866.
- Schopf, F.H., Biebl, M.M., Buchner, J., 2017. The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 345–360.
- Sepasi Tehrani, H., Moosavi-Movahedi, A.A., 2018. Catalase and its mysteries. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 140, 5–12.
- Shen, Y., Liu, J., Wang, X., Cheng, X., Wang, Y., Wu, N., 1997. Essential role of the first intron in the transcription of hsp90 β gene. *FEBS Lett.* 413, 92–98.
- Singh, R., Cadeddu, R.-P., Fröbel, J., Wilk, C.M., Bruns, I., Zerbini, L.F., Prenzel, T., Hartwig, S., Brännert, D., Schroeder, T., Lehr, S., Haas, R., Czibere, A., 2011. The non-steroidal anti-inflammatory drugs Sulindac sulfide and Diclofenac induce apoptosis and differentiation in human acute myeloid leukemia cells through an AP-1 dependent pathway. *Apoptosis* 16, 889–901.
- Slee, E., Adrain, C., Martin, S., 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067–1074.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.-G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., Martin, S.J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* 144, 281–292.

- Slominski, A., 1998. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin. Dermatol.* 16, 503–515.
- Slominski, A., Wortsman, J., 2000. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr. Rev.* 21, 457–487.
- Stege, H., Roza, L., Vink, A.A., Grewe, M., Ruzicka, T., Grether-Beck, S., Krutmann, J., 2000. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1790–1795.
- Stegmann, M., 2016. Evaluation of the protective effect of melatonin and its metabolites (AFMK and AMK) against UVR-induced damage in *ex vivo* human full-thickness skin. Masterarbeit, Universität zu Lübeck.
- Takikawa, H., Murata, Y., Horiike, N., Fukui, H., Onji, M., 2009. Drug-induced liver injury in Japan: An analysis of 1676 cases between 1997 and 2006. *Hepatol. Res.* 39, 427–431.
- Tang, D., Kang, R., Xiao, W., Wang, H., Calderwood, S.K., Xiao, X., 2007. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *J. Immunol.* 179, 1236–1244.
- Teschke, R., 2018. Top-ranking drugs out of 3312 drug-induced liver injury cases evaluated by the Roussel Uclaf Causality Assessment Method. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 14, 1169–1187.
- Tian, F., Zhang, F., Lai, X., Wang, L., Yang, L., Wang, X., Singh, G., Zhong, J.L., 2011. Nrf2-mediated protection against UVA radiation in human skin keratinocytes. *Biosci. Trends* 5, 23–29.
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745.
- Trautinger, F., Trautinger, I., Kindas-Mügge, I., Metze, D., Luger, T.A., 1993. Human Keratinocytes *in vivo* and *in vitro* constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J. Invest. Dermatol.* 101, 334–338.
- Tsaioun, K., 2016. Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. *ALTEX* 33, 343–358.
- Usui, T., Mise, M., Hashizume, T., Yabuki, M., Komuro, S., 2009. Evaluation of the potential for drug-induced liver injury based on *in vitro* covalent binding to human liver proteins. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2383–2392.
- van Oijen, M.G.C.T., Medema, R.H., Slootweg, P.J., Rijksen, G., 1998. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 110, 24–31.
- Vostálová, J., Galandáková, A., Zálešák, B., Lichnovská, R., Čížková, K., Ulrichová, J., Rajnochová Svobodová, A., 2019. Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants: Changes in human skin explants during 1 week cultivation. *J. Appl. Toxicol.* 39, 773–782.

- Wandinger, S.K., Richter, K., Buchner, J., 2008. The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473–18477.
- Weedon, D., Searle, J., Kerr, J., 1979. Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am. J. Dermatopathol.* 1, 133–144.
- Yamaguchi, Y., Coelho, S.G., Zmudzka, B.Z., Takahashi, K., Beer, J.Z., Hearing, V.J., Miller, S.A., 2008. Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Exp. Dermatol.* 17, 916–924.
- Yamaguchi, Y., Takahashi, K., Zmudzka, B.Z., Kornhauser, A., Miller, S. a, Tadokoro, T., Berens, W., Beer, J.Z., Hearing, V.J., 2006. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1486–8.
- Yamazaki, H., Inoue, K., Chiba, K., Ozawa, N., Kawai, T., Suzuki, Y., Goldstein, J.A., Guengerich, F.P., Shimada, T., 1998. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 56, 243–251.
- Yanaka, A., Zhang, S., Sato, D., Tauchi, M., Suzuki, H., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Hyodo, I., 2007. Geranylgeranylacetone protects the human gastric mucosa from diclofenac-induced injury via induction of heat shock protein 70. *Digestion* 75, 148–155.
- Yengi, L.G., Xiang, Q., Pan, J., Scatina, J., Kao, J., Ball, S.E., Fruncillo, R., Ferron, G., Roland Wolf, C., 2003. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal. Biochem.* 316, 103–110.
- Zacher, J., Altman, R., Bellamy, N., Brühlmann, P., Da Silva, J., Huskisson, E., Taylor, R.S., 2008. Topical diclofenac and its role in pain and inflammation: an evidence-based review. *Curr. Med. Res. Opin.* 24, 925–950.
- Zhang, S., Yu, J., Cheng, X., Ding, L., Heng, F., Wu, N., Shen, Y., 1999. Regulation of human hsp90 α gene expression. *FEBS Lett.* 444, 130–135.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABC	Avidi-Biotin Komplex
ADME-Tox	Absorption/Distribution/Metabolismus/Elimination/toxisch
ADP	Adenosindiphosphat
AFMK	<i>N</i> ¹ -acetyl- <i>N</i> ² -formyl-5-methoxykynuramin
AMK	<i>N</i> ¹ -acetyl-5-methoxykynuramin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Apaf1	Apoptotische Protease aktivierender Faktor 1
APO-1	<i>Apoptosis antigen-1</i>
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2
Bcl-XL	B-Zell Lymphom <i>extra large</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	Circa
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne

CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
CTD	C-terminale Domäne
Cul3	Cullin3
CYP	CytochromP450
Cyt- <i>c</i>	Zytochrom <i>c</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid
dbSNP	<i>The Database of Short Genetic Variation</i>
DD	<i>Death Domain</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DED	<i>Death effector domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DILI	<i>Drug-induced liver injury</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Deoxyuridin-5' -Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

<i>Et. al.</i>	<i>Et alii/Et aliae</i> (und andere)
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	<i>Genomic desoxyribonucleic acid</i>
GST	Glutathion S-Transferasen
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HaCaT	<i>Human adult low calcium high temperature keratinocytes</i>
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin/Eosin
HOP	Hsp90-organisierendes Protein
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
JDP	J-Domänen-Protein
kDa	Kilodalton
Keap1	<i>Kelch-like ECH-assoziertes-Protein</i>
KS-Test	Kolmogorow-Smirnow-Test
L	Liter
m ²	Quadratmeter
Maf	<i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein</i>

MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MD	Mittlere Domäne
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min.	Minute
mJ	Millijoule
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	Nanometer
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i>
NSAID	Nichtsteroidales antiinflammatorisches Medikament

NTD	N-terminale Domäne
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Radikal
OH	Hydroxid
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PGES	Prostaglandin-Synthasen
PGH2	Prostaglandin H2
pH	<i>Potential hydrogenii</i>
PLA ₂	Phospholipase A ₂
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain-reaction</i>
s	Sekunde
S.E.M.	<i>Standard error of the mean</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOD	Superoxiddismutase
SULT	Sulfotransferasen
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale desoxyribonukleotidtransferase
TNB	Tris-NaCl-Blockierpuffer

TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TNT	Tris-NaCl-Tween 20 Puffer
TSA	<i>Tyramide signal amplification</i>
TUNEL	TdT-vermitteltes dUTP-biotin <i>nick end labeling</i>
u.a.	Unter anderem
ub	Ubiquitinierung
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen
UK	<i>United Kingdom</i>
UNG	Uracil-N-Glycosilase
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der menschlichen Haut	4
Abbildung 2: Schichten der Epidermis	5
Abbildung 3: Das elektromagnetische Spektrum	6
Abbildung 4: Wirkung von Diclofenac.....	9
Abbildung 5: Abbau von Diclofenac	10
Abbildung 6: Die Kaskade der Caspasen.....	13
Abbildung 7: Sonnenbrand-Zellen in der Epidermis	15
Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Entstehung von Sauerstoffradikalen, sowie die Neutralisation von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) durch Katalase	16
Abbildung 9: Aktivierung von <i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> (Nrf2).....	18
Abbildung 10: Der Zyklus des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70)	20
Abbildung 11: Der Hitzeschockprotein 70/90 (Hsp70/90) Zyklus.....	22
Abbildung 12: Altersverteilung der Probanden	40
Abbildung 13: Darstellung der Anzahl an rekrutierten Probanden pro Woche.....	41
Abbildung 14: Entnahme der Hautbiopsien.....	44
Abbildung 15: Zurechtschneiden der Hautbiopsien	45
Abbildung 16: Aufteilung der Hautbiopsien.....	47
Abbildung 17: Beispielbild für die immunhistochemische Färbung von Katalase	53
Abbildung 18: Beispielbild für die Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 (rot) und apoptotischen Zellen (grün; TUNEL)	54
Abbildung 19: Beispielbilder für die Immunfluoreszenzfärbung von (a) Gespaltener Caspase 3, (b) <i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> (Nrf2), (c) Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), (d) Hitzeschockprotein 90 (Hsp90).....	57
Abbildung 20: Grad der Epidermisschädigung durch die Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Behandlung mit Diclofenac	61
Abbildung 21: Förderung der Apoptose in der Epidermis durch die Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac	63
Abbildung 22: Caspase 3 wird vorwiegend unter UV-Bestrahlung gespalten	65
Abbildung 23: Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac.	67
Abbildung 24: Erhöhung der Proteinexpression des antioxidativen Enzyms Katalase in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht und Diclofenac	68
Abbildung 25: Genexpression des <i>nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> (Nrf2) in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac	69
Abbildung 26: Erhöhung der Proteinexpression des <i>nuclear factor erythroid-derived 2- like 2</i> (Nrf2) in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht und Diclofenac	71
Abbildung 27: Genexpression der Hitzeschockproteine 70 und 90 (Hsp70 und 90) in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac....	73
Abbildung 28: Erhöhung der Proteinexpression der Hitzeschockproteine 70 und 90 (Hsp 70 und 90) in der Epidermis durch ultraviolettes (UV) Licht	74
Abbildung 29: Übersicht der Gen- und Proteinexpression von Katalase, Nrf2, Hp90 und Hsp70 in der Epidermis unter Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht und Diclofenac.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	25
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien	30
Tabelle 4: Verwendete Kits	32
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen	33
Tabelle 6: Verwendete Medien	35
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper	36
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 9: Verwendete TaqMan Sonden	37
Tabelle 10: Verwendete Software	38
Tabelle 11: Programm für die TaqMan Echtzeit-PCR mit dem Fast Advanced Mastermix am StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific)	50
Tabelle 12: Score zur Bewertung der epidermalen Schädigung.	51

Danksagung

Ich danke **Prof. Dr. med. Diamant Thaçi**, dass ich diese Arbeit an seiner Klinik durchführen durfte. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit nicht beenden können.

Bedanken möchte ich mich auch beim **Team des Exzellenzzentrums für Entzündungsmedizin**, vor allem bei Dr. Kristina Neumann und Eliz Tahir, sowie Dr. Dr. Christoph Hammers für die Entnahme der Hautbiopsien.

Mein Dank gilt auch den **Kooperationspartnern** dieses Projektes, Bioglobe GmbH, acCELLerate GmbH und Fraunhofer IMB, für die großartige Zusammenarbeit und stets freundliche und lockere Atmosphäre.

Ohne die unzähligen freiwilligen **Probanden** wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen, deshalb gilt auch ihnen mein Dank.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter **Prof. Dr. med. vet. Jennifer Hundt**. Sie war für mich da, als es darauf ankam und hat mir ermöglicht, diese Arbeit zu Ende zu bringen. Sie hat mich mit all ihrer Kraft und zu jeder Zeit unterstützt. Jenny, vielen Dank, dass ich so viel von dir lernen durfte. Du bist ein großes Vorbild und ich bewundere, wie du es geschafft hast, und auch immer wieder schaffst, deine Arbeitsgruppe mit so viel Freude und Herzlichkeit zu füllen. Ich habe mich noch nie in einer Arbeitsgruppe so wohl und gut betreut gefühlt, wie in der AG Hundt. Als es mit der Fortführung meiner Doktorarbeit schwierig wurde habe ich mich oft gefragt, warum mir das alles passiert. Nun weiß ich die Antwort: Der Weg sollte zu dir führen. Es war das größte Glück für mich, dass du mir deine Unterstützung angeboten hast! Danke für die großartige Zeit mit dir und ich bin unendlich froh, dass sie weiter gehen wird und ich auch in Zukunft zum Lunch trommeln kann.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei der ganzen **AG Hundt** bedanken! Es war eine unglaubliche Zeit, die nicht nur ich, sondern auch die ungarische Austauschdotorandin Mahika (Thank you Valéria!!!) und Mareike Böhm sehr genossen haben.

Nadine, danke für deine offene Art und unzähligen Mittagessen und für all die guten Ratschläge und Tipps und all deine Unterstützung! Der Polterabend mit dir war mein Highlight,

zu mindestens das, an was ich mich noch erinnere..., oder lag mein Highlight auf der Königstraße?!

Friedi, danke für deine Herzlichkeit und die Unterstützung während unserer beider Schreibphasen! Der Joghurt nach dem Mittagessen ist nun Programm.

Caren, tausend Dank für das Korrekturlesen. Dies ist nicht die leichteste und wünschenswerteste Aufgabe, aber ich glaube niemand macht es so grandios wie du! Ich freue mich schon auf einen Cocktail mit dir!

Inka, vielen Dank, dass auch du meinen Weg begleitet hast mit vielen Umarmungen und Splitter im Po!

Birte, es war super schön und lustig mit dir, nicht nur im Labor, sondern auch bei Robert.

Team Juta: Danke **Uta**, alias keine-Partyqueen, für deine verpeilte und lustige Art und für die Freude, die du in das Labor gebracht hast (auch, wenn du dem Wendler auf Instagram folgst... aber EGAL). Danke **Julia**, dass auch du Teil meiner Zeit in der AG Hundt warst und sie mit deiner warmen und herzlichen Art bereichert hast. Und merke: Finger weg vom Kautabak!

Team Pauliana: Danke **Paul** für den ganzen Spaß und all deine Sprüche und deine Textsicherheit bei Micki Krause...von der Trinksicherheit fange ich jetzt gar nicht erst an...! Danke **Christiana**, dass du die AG Hundt mit deiner Persönlichkeit bereichert hast und für die Süßigkeiten aus Kanada.

Lisa, vielen Dank für die schöne Zeit und das gemeinsame rumschlagen mit der mRNA-Isolation!

Hanna, danke dass du mich auf meinem Weg begleitet und ihn mit vielen Mittagessen sehr angenehm gemacht hast! Wir hatten so viel Spaß im und außerhalb des Labors.

Nick, danke dass du mich nicht verpiffen hast, als ich Jennys Palme mit dem Rhabarberschnaps gegossen habe.

Valéria, thank you so much for all you gave to me. Thank you for your support, your kind and lovely personality. And thank you for speaking English („Oh, it’s emptyiiii“). It was a great time with you and I hope we will meet again some day!

Ein riesengroßes Dankeschön geht an **Nathalie Kruse**. Nathalie, ich kann nicht in Worte fassen, wie unendlich froh ich bin, dass es dich gibt! Du bist nicht nur eine Kollegin, sondern auch eine enge Freundin und Vertraute geworden. Danke für deine Unterstützung,

deine Hilfsbereitschaft und die wundervolle Zusammenarbeit. Ich hätte mir keine bessere Kollegin wünschen können! Gemeinsam haben wir viele wundervolle, aber auch sehr schwierige Momente erlebt. Ich danke dir dafür, dass du immer an mich geglaubt und mich wieder aufgebaut und neu motiviert hast, wenn mal etwas aussichtslos erschien. Ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen.

„Nein, sorg dich nicht um mich
Du weißt, ich liebe das Leben
Und weine ich manchmal noch um dich
Das geht vorüber sicherlich

Was kann mir schon geschehen?
Glaub mir, ich liebe das Leben
Das Karussell wird sich weiterdrehen
Auch wenn wir auseinandergehen

Vielleicht gefällt's mir wieder frei zu sein
Vielleicht verlieb' ich mich auf's Neu'
Man wird ja sehen (man wird ja sehen)
Die Welt ist schön (die Welt ist schön) **Achtung, Jetzt kommt meine Lieblingsstelle**
Wie's kommt ist einerlei

La la dai dai dai
Du weißt, ich liebe das Leben“

Ein besonders großer Dank geht auch an **Heike Krauth** und **Sylva Bruhns**. Heike, ich kann mich gar nicht oft genug bedanken für deine tatkräftige Unterstützung bei den Färbungen und dass du immer da warst, wenn ich Hilfe brauchte. Sylva, du hast mich eingearbeitet, als ich 2015 in der Dermatologie als studentische Hilfskraft angefangen habe. Du hast quasi den Grundstein meiner Laborausbildung gelegt und dafür bin ich dir sehr dankbar!

Danke auch an den TaqMan-Profi **Michael Könnecke**. Ohne deine Unterstützung wäre ich nicht auf diese geniale Methode gestoßen. Roter-Stempel-Daumen hoch!

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, **Susanne und Jens Stegmann**. Ohne eure Hilfe wäre ich so manches Mal verzweifelt und hätte aufgegeben. Ihr habt mir immer alles im Leben ermöglicht und mich in jeder Situation unterstützt. Dank euch bin ich zu dem Menschen geworden, der ich heute bin.

Danken möchte ich auch meinem Bruder **Lennart Stegmann** dafür, dass es dich gibt und auch du mich immer unterstützt und wir immer ein Team waren und sind.

Auch meinem Ehemann **Christian Höhn** gilt dieser besondere Dank. Danke für deine bedingungslose Unterstützung und Liebe. Du hast viele meiner Launen ertragen müssen und mir stets den Rücken freigehalten und nie an mir gezweifelt. Trotz deines manchmal fragwürdigen Musikgeschmacks bin ich dir für das Leben, welches du uns ermöglichst, unendlich dankbar.

Ein Dank geht auch an meine Schwiegereltern **Brigitte Höhn** und **Rüdiger Kilaitis**. Danke für eure Unterstützung in jeder Lebenslage und dafür, dass ihr die besten Schwiegereltern seid, die man sich wünschen kann!

Besonders danken möchte ich auch meinen besten Freundinnen **Carolin Moser** und **Sarah Scheef** für euer offenes Ohr, euren Beistand und eure positiven Worte. Ohne Freunde wäre das Leben nur halb so schön. Danke, dass es euch gibt und ihr schon so lange Teil meines Lebens seid!

Danke auch an **Sarah Negendank** und **Kerrin von Dohlen**. Es ist wundervoll Freundinnen wie euch zu haben, die für jeden Spaß zu haben sind („Das Bisschen lohnt jetzt aber auch nicht mehr...There's a Party...“), aber auch ernste und aufmunternde Worte finden.

Danke auch an **Anna Liegmann**, **Gina Lilienthal** und **Fabian „Dobi“ Stein** für die gemeinsamen Studienjahre und die vielen schönen Sachen, die wir noch gemeinsam erleben werden.

Zuletzt geht der eigentlich größte Dank an **Swantje Häger**, **Isabel Heyde**, **Eva Dietrich** und **Svenja Prüß**. Klar möchte ich euch für eure Freundschaft und auch für die schöne Zeit während des Studiums danken: Unser gemeinsamer Urlaub, die Segelwochenenden, die unzähligen Kochabende, die Partys. Aber eigentlich seid ihr der Grund, warum diese Doktorarbeit existiert. Ihr habt mich mit viel Geduld und Hilfe durch das Studium gebracht und mich immer wieder ermutigt, wenn die Lage mal wieder kritisch war (und das war sie sehr häufig...). Ohne euch wäre der Anfang schon das Ende gewesen!

Ich möchte mich auch bei allen Familienmitgliedern und Freunden bedanken, die ich hier nicht erwähnt habe. Ein Glück sind es zu viele, um sie einzeln aufzuführen, aber jeder hat seinen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.