

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Die Wirkung von Chlormadinonacetat auf humane Melanozyten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Hyun-Zu Wiedemann

aus
Miltenberg/Main

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Carola Berking

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke
Prof. Dr. Marc Heckmann
Prof. Dr. Karl-Siegfried Boos

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Orale Kontrazeption.....	8
1.2	Pigmentierung	11
1.2.1	Physiologie	11
1.2.2	Melasma.....	15
1.3	Klinische Zufallsbeobachtung bei Chlormadinonacetat	17
1.4	Fragestellung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Melanozyten	19
2.1.2	Nährmedien	20
2.1.3	Chemikalien.....	21
2.1.4	Einwegartikel und Geräte.....	21
2.1.5	Isolierung von Melanozyten aus Hautgewebe	23
2.1.6	Mediumwechsel und Splitten von Melanozyten.....	23
2.1.7	Einfrieren und Auftauen von Melanozyten.....	25
2.2	Immunhistochemie.....	25
2.2.1	Antikörper und Chemikalien	25
2.2.2	Einwegartikel und Geräte.....	26
2.2.3	Prinzip der APAAP-Methode.....	26
2.2.4	Durchführung der APAAP-Färbung.....	27
2.3	Versuchsaufbau der Zellkulturexperimente	28
2.3.1	Chemikalien.....	28
2.3.2	Einwegartikel und Geräte.....	28
2.3.3	Versuchsablauf	29
2.3.4	UV-Bestrahlung	29
2.4	Zellbiologische Assays.....	30
2.4.1	Zellvitalitätsanalyse durch Trypanblau-Färbung	30
2.4.1.1	Chemikalien.....	30
2.4.1.2	Einwegartikel und Geräte.....	30
2.4.1.3	Durchführung	31
2.4.2	Zellvitalitätsanalyse durch fluorimetrischen Assay	31
2.4.2.1	Chemikalien.....	31
2.4.2.2	Einwegartikel und Geräte.....	31

2.4.2.3	Prinzip	31
2.4.2.4	Durchführung.....	32
2.4.3	Analyse der Pigmentbildungsaktivität durch 3H-Tyrosin-Assay.....	32
2.4.3.1	Chemikalien.....	32
2.4.3.2	Einwegartikel und Geräte.....	33
2.4.3.3	Ansetzen von Lösungen	34
2.4.3.4	Prinzip	35
2.4.3.5	Durchführung.....	35
2.4.4	Analyse der Pigmentbildungsaktivität durch Messung des Melaningehalts	36
2.4.4.1	Chemikalien.....	36
2.4.4.2	Einwegartikel und Geräte.....	36
2.4.4.3	Durchführung.....	37
2.5	Statistische Auswertung.....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Trypanblau-Färbung	38
3.1.1	Bestrahlung mit UVA	38
3.1.2	Bestrahlung mit UVB	39
3.2	Proliferationsassay	40
3.2.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	40
3.2.2	Ergebnisse der Versuche.....	41
3.3	3H-Tyrosin-Assay	48
3.4	Messung des Melaningehalts.....	50
3.4.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	50
3.4.2	Ergebnisse der Versuche.....	52
4	Diskussion	53
4.1	Die Wirkung von Östrogen und Gestagenen auf Melanozyten	53
4.2	Vergleich verschiedener experimenteller Ansätze.....	55
4.2.1	Auswahl der Zellen	55
4.2.2	Bedingungen in der Zellkultur	56
4.2.3	Effekte der UV-Bestrahlung auf Melanozyten	57
4.2.4	Vorrang verschiedener Testmethoden zur Beurteilung der Proliferation und Pigmentbildungsfähigkeit.....	58
4.3	Ausblick	59
4.3.1	Cokulturen und Hautäquivalente	59
4.3.2	Effekte weiterer Gestagene	62

5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis.....	65
7	Danksagung	76
8	Lebenslauf	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Ethinylestradiol	8
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Epidermis	11
Abbildung 3: Zelluläre Kompartimente und Schritte bei der Melaninsynthese in Melanozyten	12
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Melaninsynthese.....	14
Abbildung 5: Melasma an der Stirn einer Patientin.....	16
Abbildung 6: Strukturformel von Progesteron.....	17
Abbildung 7: Strukturformel von Chlormadinonacetat	17
Abbildung 8: Dunkel pigmentiertes Zellpellet bestehend aus Melanozyten, die aus menschlicher Haut isoliert wurden, in einem Reaktionsgefäß aus transparentem Kunststoff.....	19
Abbildung 9: Humane Melanozyten in Kultur (100fache Vergrößerung).....	24
Abbildung 10: Wirkung von Östrogen auf die Proliferation humaner Melanozyten	41
Abbildung 11: Wirkung der Gestagene Progesteron und Chlormadinonacetat auf die Proliferation humaner Melanozyten	42
Abbildung 12: Wirkung von Östrogen mit und ohne UV-Bestrahlung auf die Proliferation humaner Melanozyten	43
Abbildung 13: Wirkung der Gestagene Progesteron und Chlormadinonacetat mit und ohne UV-Bestrahlung auf die Proliferation humaner Melanozyten.....	43
Abbildung 14: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen.....	45
Abbildung 15: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat	46
Abbildung 16: Einzeldarstellung von drei typischen Eichkurven bei 405 nm Wellenlänge	51
Abbildung 17: Einzeldarstellung von drei typischen Eichkurven bei 475 nm Wellenlänge	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Derzeit in Deutschland gebräuchliche orale Kontrazeptiva.....	10
Tabelle 2:	Klassifikation der Hauttypen nach Fitzpatrick anhand der Hautreaktionen auf 30-minütige Sonnenexposition	15
Tabelle 3:	Zellvitalität nach UVA-Bestrahlung	39
Tabelle 4:	Zellvitalität nach UVB-Bestrahlung	39
Tabelle 5:	Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat.....	44
Tabelle 6:	Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche, in denen Östrogen eine Proliferationssteigerung bewirkt hatte).....	46
Tabelle 7:	Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche ohne UV-Bestrahlung).....	47
Tabelle 8:	Tyrosinaseaktivität von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche, in denen Östrogen eine Steigerung der Tyrosinaseaktivität bewirkt hatte)	49
Tabelle 9:	Tyrosinaseaktivität von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche mit UVB-Bestrahlung)	49
Tabelle 10:	Einflussfaktoren auf die Pigmentierung	59
Tabelle 11:	Reaktion verschiedener Hautzellen auf UV-Bestrahlung	61

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon (<i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ASP	Agouti-Signalprotein (<i>Agouti signaling protein</i>)
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BPE	Rinderhypophysenextrakt (<i>bovine pituitary extract</i>)
BSA	Bovines Serum-Albumin (<i>albumin from bovine serum</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CHX	Cycloheximid (<i>cycloheximide</i>)
CMA	Chlormadinonacetat (<i>chlormadinone acetate</i>)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNS (<i>DNA</i>)	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
Dopa	Dihydroxyphenylalanin (<i>3,4-dihydroxy-L-phenylalanine</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ET-1/ ET-3	Endothelin-1/ Endothelin-3 (<i>endothelin-1, endothelin-3</i>)
FKS (<i>FCS</i>)	Fötales Kälber-Serum (<i>fetal calf serum</i>)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon (<i>follicle stimulating hormone</i>)
HBSS	Hanks' ausgewogene Salzlösung (<i>Hanks' balanced salt solution</i>)
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HM	Humane Melanozyten (<i>human melanocytes</i>)
IL-1	Interleukin-1 (<i>interleukin-1</i>)
KGF	Keratinozyten-Wachstumsfaktor (<i>keratinocyte growth factor</i>)
LH	Luteinisierendes Hormon (<i>luteinizing hormone</i>)
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor (<i>microphthalmia associated transcription factor</i>)
mRNS (<i>mRNA</i>)	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon (<i>melanocyte stimulating hormone</i>)
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
PAR-2	Protease-aktivierter Rezeptor 2 (<i>protease-activated receptor 2</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
POMC	Proopiomelanocortin (<i>proopiomelanocortin</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
TRP	Tyrosinase-verwandtes Protein (<i>tyrosinase related protein</i>)

1 Einleitung

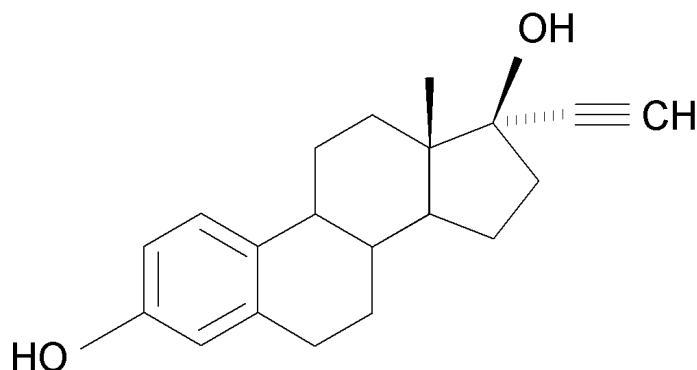
1.1 Orale Kontrazeption

Unter einer Vielzahl von verschiedenen Methoden der Kontrazeption spielt die Einnahme von Ovulationshemmern in den Industriestaaten derzeit die größte Rolle: 38,5% aller Frauen im geschlechtsreifen Alter machen in Deutschland hiervon Gebrauch, wobei es in der Altersgruppe zwischen 16 und 30 Jahren sogar über 60% sind [56].

Die in der „Pille“ enthaltenen Hormone sind synthetische Derivate der natürlichen weiblichen Geschlechtshormone, der Östrogene und der Gestagene. In der ersten Zyklushälfte bewirken die Östrogene eine Proliferation der Uterusschleimhaut. Zum Zeitpunkt des Follikelsprungs ist die Östrogenkonzentration besonders hoch, weswegen die Östrogene auch als Follikelhormone bezeichnet werden. Die Gestagene (Gelbkörper- oder Schwangerschaftshormone) werden in der zweiten Zyklushälfte nach dem Follikelsprung aus dem Corpus luteum (Gelbkörper) gebildet. Der wichtigste Vertreter ist das Progesteron, dessen Konzentration in der Schwangerschaft besonders hoch ist. Durch Progesteron wird die Uterusschleimhaut für die Aufnahme der befruchteten Eizelle vorbereitet und die Reifung weiterer Follikel verhindert. Bleibt die Befruchtung aus, sinkt der Progesteronspiegel durch das sich zurückbildende Corpus luteum. Es kommt zur Abstoßung des Endometriums und der Zyklus beginnt von vorne. Kontrazeptiva greifen direkt in diesen Zyklus ein.

Als Östrogen-Anteil in der „Pille“ wird meistens Ethinylestradiol verwendet (Abbildung 1).

Abbildung 1: Strukturformel von Ethinylestradiol



Der Ethinylestradiol-Gehalt wurde seit Einführung der oralen Kontrazeption immer weiter reduziert. Während die Dosis 1960 noch bei täglich 150 µg Ethinylestradiol lag, werden mittlerweile sogenannte „Mikropillen“ verwendet, die nur noch 20 µg Ethinylestradiol

enthalten. Als Gestagen-Anteil kommen verschiedene Abkömmlinge des 17 α -Hydroxyprogesterons und des 19-Nortestosterons zum Einsatz [49].

Die klassische Form der Pille besteht aus einem Einphasenpräparat mit gleichbleibenden Mengen Östrogen und Gestagen über den gesamten Zyklus hinweg. Später wurden Sequenz- und Stufenpräparate entwickelt, die den natürlichen Zyklus durch unterschiedliche Dosen an Östrogen und Gestagen imitieren. Darüber hinaus gibt es Gestagen-Monopräparate, die auch als „Minipillen“ bezeichnet werden. Diese bieten den Vorteil einer sehr geringen Hormonbelastung. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit in Deutschland erhältlichen Präparate.

Die kontrazeptive Sicherheit wird vor allem durch die Hemmung von Follikelreifung und Ovulation, aber auch durch eine vermehrte Viskosität des Zervixschleims, eine Proliferationshemmung des Endometriums und eine Hemmung der Tubenmotilität gewährleistet.

Durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva sind diverse Nebenwirkungen möglich. Blutungsunregelmäßigkeiten sind in den ersten Einnahmezyklen relativ häufig. Störungen des Allgemeinbefindens, wie etwa Kopfschmerzen, Gewichtszunahme, Mastodynie, Übelkeit und Magenbeschwerden kommen in ca. 10% der Fälle vor. Mitunter treten depressive Verstimmungen oder eine Verminderung der Libido auf [30]. Hyperpigmentierungen der Haut sind überwiegend bei Langzeitanwendung zu finden. Unter oraler Kontrazeption besteht außerdem ein erhöhtes Risiko sowohl für venöse als auch für arterielle thromboembolische Ereignisse [96]. Durch eine Aktivierung des Gerinnungssystems [62] können sich tiefe Beinvenenthrombosen und in der Folge Lungenembolien [34] entwickeln. Auf arterieller Seite sind Herzinfarkte und Schlaganfälle möglich [68]. Das Risiko für thromboembolische Komplikationen potenziert sich bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren, insbesondere bei Raucherinnen [29]. Gelegentlich bilden sich gutartige Lebertumoren wie die fokale noduläre Hyperplasie oder Leberzelladenome [58]. Ein Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen. Eine schwache Korrelation zwischen der Einnahme oraler Kontrazeptiva und dem Auftreten von Cervix-Karzinomen wurde gezeigt. Demgegenüber steht ein eindeutig verringertes Risiko für Endometriumkarzinome und für das Ovarial-Karzinom um mindestens 40% [54].

Einige Nebenwirkungen können relativ eindeutig auf das jeweilige synthetische Hormon zurückgeführt werden: Kopfschmerzen, Übelkeit, Ödeme, Mastodynie und umschriebene Pigmentierungsstörungen werden dem Östrogen zugeschrieben, während Müdigkeit, Depressionen und Libido-Abnahme durch den Gestagen-Anteil verursacht werden [10].

Tabelle 1: Derzeit in Deutschland gebräuchliche orale Kontrazeptiva (nach [37])

<p><i>Gestagenmonopräparate</i></p> <p>Levonorgestrel 0,03 mg (28-mini®, Microlut®)</p> <p>Desogestrel 0,075 mg (Cerazette®)</p>
<p><i>Einphasenpräparate</i></p> <p>Levonorgestrel 0,1 mg + Ethinylestradiol 20 µg (Leios®, Miranova®)</p> <p>Levonorgestrel 0,125 mg + Ethinylestradiol 30 µg (MonoStep®)</p> <p>Levonorgestrel 0,125 mg + Ethinylestradiol 50 µg (Gravistat®)</p> <p>Levonorgestrel 0,15 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Microgynon®, Femigoa®, Femranette®)</p> <p>Norethisteron 0,5 mg + Ethinylestradiol 20 µg (Eve®20)</p> <p>Norethisteron 0,5 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Conceplan®M, Nora-ratiopharm®)</p> <p>Norgestimat 0,25 mg + Ethinylestradiol 35 µg (Cilest®)</p> <p>Desogestrel 0,15 mg + Ethinylestradiol 20 µg (Lovellet®, Desmin®20, Lamuna®20)</p> <p>Desogestrel 0,15 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Marvelon®, Desmin®30, Lamuna®30)</p> <p>Gestoden 0,075 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Femovan®, Minulet®)</p> <p>Lynestrenol 0,75 mg + Ethinylestradiol 35 µg (Ovoresta®M)</p> <p>Drospirenon 3,0 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Yasmin®, Petibelle®)</p> <p>Dienogest 2,0 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Valette®)</p> <p>Chlormadinonacetat 2 mg + Ethinylestradiol 30 µg (Belara®)</p> <p>Cyproteronacetat 2 mg + Ethinylestradiol 35 µg (Diane®-35, Juliette®, Bella Hexal 35®)</p>
<p><i>Zweiphasenpräparate (Sequenzpräparate)</i></p> <p>Desogestrel 0-0,125 mg + Ethinylestradiol 50 µg (Oviol 22®)</p> <p>Lynestrenol 0-2,5 mg + Ethinylestradiol 50 µg (Ovanon®, Lyn-ratiopharm®-Sequenz)</p>
<p><i>Zweistufenpräparate</i></p> <p>Desogestrel 0,025-0,125 mg + Ethinylestradiol 40-30 µg (Biviol®)</p> <p>Chlormadinonacetat 1-2 mg + Ethinylestradiol 50 µg (Neo-Eunomin®)</p>
<p><i>Dreistufenpräparate</i></p> <p>Levonorgestrel 0,05-0,075-0,125 mg + Ethinylestradiol 30-40-30 µg (Trigoa®, Triquilar®, Triette®, Trisiston®, Novastep®)</p> <p>Norethisteron 0,5-0,75-1,0 mg + Ethinylestradiol 35 µg (TriNovum®)</p> <p>Norgestimat 0,180-0,215-0,250 mg + Ethinylestradiol 35 µg (Pramino®)</p>

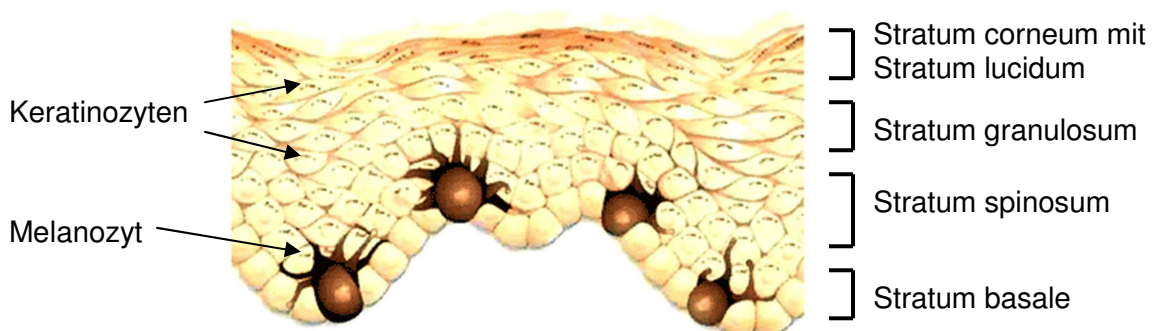
1.2 Pigmentierung

1.2.1 Physiologie

Der Melaningehalt der Haut bestimmt im Wesentlichen die natürliche Hautfarbe [6]. Entscheidend hierfür sind vor allem die Art des Melanins, die Größe der Melaningranula [98] und deren Anordnung in den Keratinozyten [61]. Eine wichtige Funktion des Melanins besteht darin, die Keratinozyten und Melanozyten in der Epidermis vor UV-Strahlung zu schützen [50]. In dunkel pigmentierter Haut sind die Zellen daher wesentlich weniger UV-induzierten DNS-Schäden ausgesetzt als in heller Haut [63].

Die Melanozyten sind dendritische Zellen, die in der Basalzellschicht der Epidermis liegen (Abbildung 2).

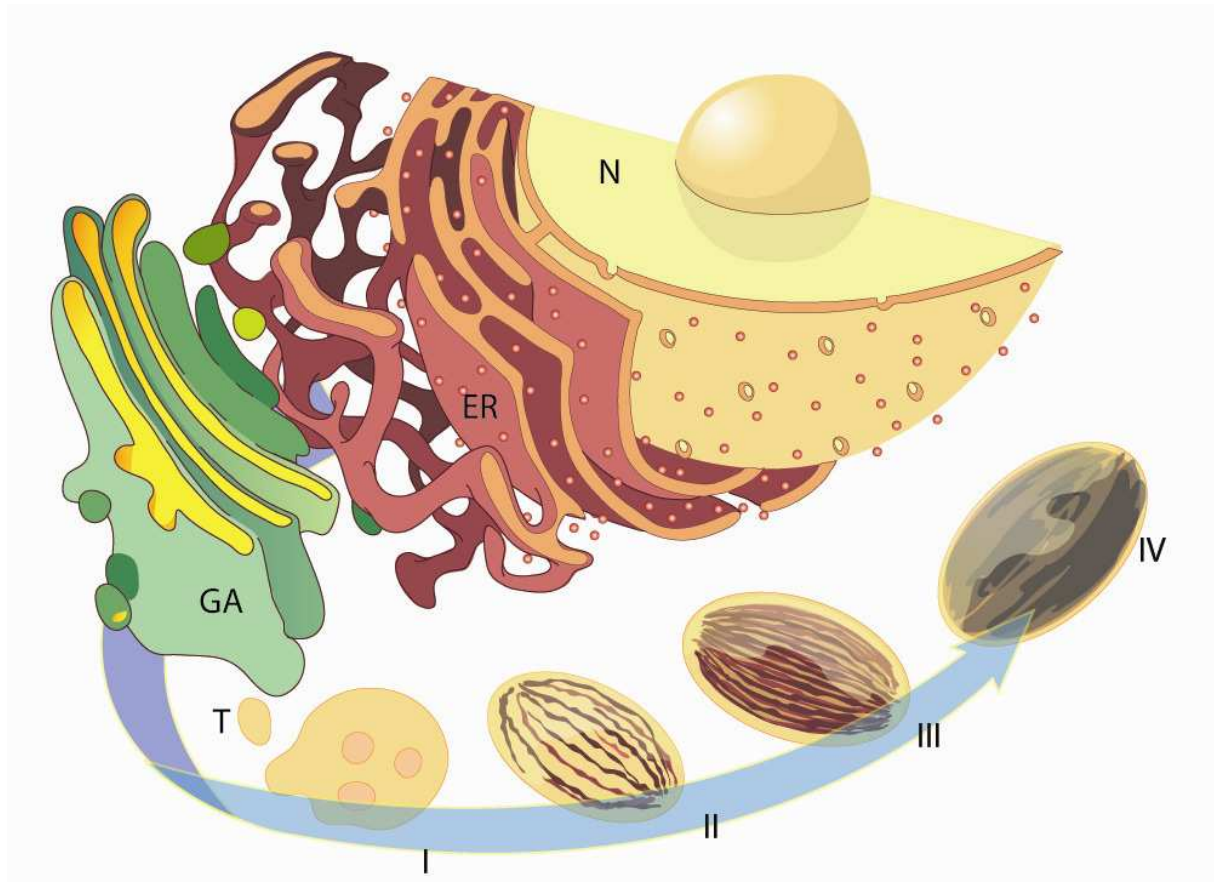
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Epidermis (nach [107])



Im Stratum basale (Basalzellschicht) befinden sich die Melanozyten und kubisch geformte Keratinozyten. In der darüberliegenden Zellschicht, dem Stratum spinosum (Stachelzellschicht), sind die Keratinozyten größer und untereinander durch Desmosomen verbunden. Im Stratum granulosum (Körnerzellschicht) enthalten die Keratinozyten Keratohyalin granula und sind abgeflacht. In der obersten Zellschicht, dem Stratum corneum (Hornschicht), befinden sich ausschließlich kernlose Zellen. In der untersten Zellschicht, dem Stratum lucidum (Glanzschicht), erscheinen die Zellen optisch dichter.

Die Melaninbildung erfolgt in speziellen Organellen, den Melanosomen. Diese durchlaufen verschiedene Reifestadien (Abbildung 3): Die primären Melanosomen erscheinen elektronenmikroskopisch betrachtet optisch leer. Sie enthalten das Schlüsselenzym der Pigmentbildung, die Tyrosinase. Aus ihnen entstehen die sekundären Melanosomen (Prämelanosomen), spezialisierte Lysosomen mit längs ausgerichteten Filamenten. In den tertiären Melanosomen wird Melanin synthetisiert und an die Filamente angelagert. Das reife (quartäre) Melanosom ist mit Melanin angefüllt. Die Filamente sind elektronenmikroskopisch nicht mehr erkennbar und auch keine Tyrosinaseaktivität mehr nachweisbar (nach [13]).

Abbildung 3: Zelluläre Kompartimente und Schritte bei der Melaninsynthese in Melanozyten (nach [13] und [78])



Die Tyrosinase wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und gelangt über den Golgi-Apparat zum primären Melanosom. Dieses entwickelt sich zum sekundären, tertiären und schließlich zum quartären Melanosom.

N: Nucleus

ER: Endoplasmatisches Reticulum

GA: Golgi-Apparat

T: Tyrosinase

I: Primäres Melanosom mit intraluminalen Vesikeln

II: Sekundäres Melanosom (Prämelanosom) mit Filamenten

III: Tertiäres Melanosom mit Filamenten, an die Melanin angelagert ist

IV: Quartäres (reifes) Melanosom, angefüllt mit Melanin

Während die Anzahl der Melanozyten von der Hautfarbe unabhängig und somit bei allen Menschen gleich ist [95], ist die Tyrosinaseaktivität bei dunkelhäutigen Menschen höher [46] und die Melanosomen sind größer [98]. Die Phäomelanosomen, die rote und gelbe Pigmente bilden, sind klein (0,7 μm) und kugelförmig, während die Eumelanosomen, die braunes oder schwarzes Pigment produzieren, ellipsoid geformt sind und bis zu 0,9 μm messen [91]. Außerdem unterscheidet sich die Anordnung der Melanosomen in den Keratinozyten: Bei hellhäutigen Menschen liegen die Melanosomen in kleinen Gruppen und sind von einer Membran umgeben, während die Melanosomen bei dunkelhäutigen Menschen einzeln verstreut vorliegen [61].

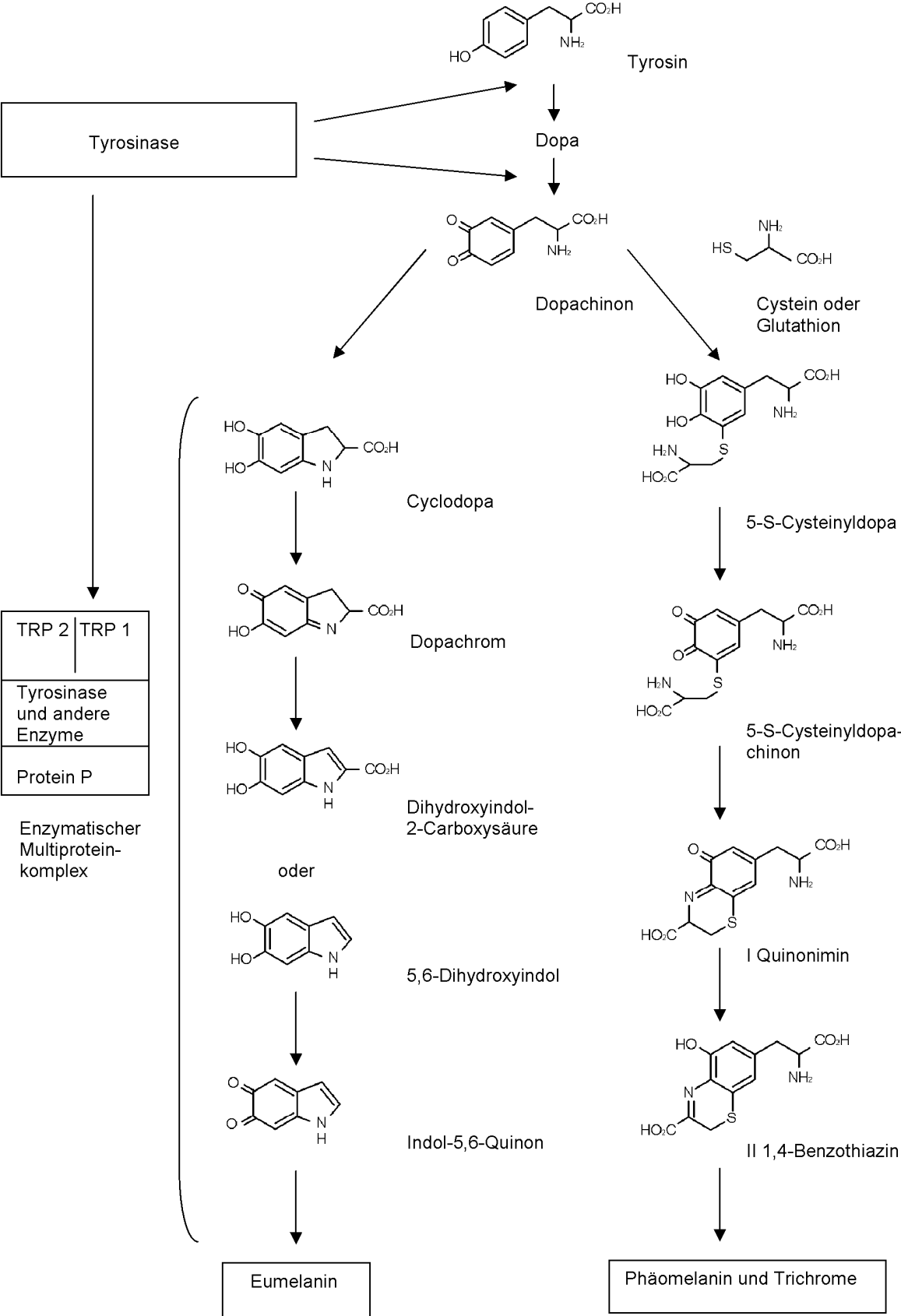
Über die Dendriten der Melanozyten wird das Melanin an die umgebenden Keratinozyten abgegeben, wobei ein Melanozyt etwa 36 Keratinozyten versorgt. Diese Zellen werden zusammen als epidermale Melanineinheit bezeichnet [88]. Keratinozyten regulieren Proliferation und Migration der Melanozyten über Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine [38].

Melanozyten kommen außerhalb der Haut auch an Schleimhäuten [12], Leptomeningen, Innenohr und Retina [101] vor. Alle Melanozyten des menschlichen Körpers können Melanin produzieren, jedoch sind nur die Melanozyten der Haut in der Lage, das Melanin an umliegende Zellen weiterzugeben. Mittlerweile wurden bereits über 130 Gene identifiziert, die für die Entwicklung und Funktion von Melanozyten verantwortlich sind [33].

Die Aminosäure Tyrosin ist das Ausgangssubstrat für die Melaninsynthese (Abbildung 4). Im ersten Schritt wird Tyrosin durch das Enzym Tyrosinase in den Melanosomen über Dihydroxyphenylalanin (Dopa) zu Dopachinon oxidiert. Nach der Bildung von Dopachinon gibt es zwei verschiedene Stoffwechselwege: In einem Fall entsteht durch Ringschluss Cyclodopa, das über Zwischenstufen zu Eumelanin polymerisiert wird und eine braune bis schwarze Farbe aufweist. Diese Schritte werden durch einen Multiproteinkomplex, bestehend aus Tyrosinase, den Tyrosinase-verwandten Proteinen 1 und 2 (TRP-1, TRP-2) und Protein P, katalysiert. Eine andere Möglichkeit ist die Verbindung von Dopachinon mit Cystein oder Glutathion. Hierbei entstehen über Zwischenstufen Phäomelanine (rote und gelbe Pigmente) und schwefelhaltige, intensiv rotfarbige Pigmente, sogenannte Trichrome (nach [18]). In der Haut sind alle Melanine enthalten, wobei das Eumelanin stets der Hauptbestandteil ist [45].

Da die Tyrosinase als Schlüsselenzym der Pigmentierung gilt, wurde in einigen Studien untersucht, wie die Aktivität dieses Enzyms reguliert wird. J. M. Naeyaert et. al. [65] postulierten, dass die Regulation der Tyrosinaseaktivität nicht über die Genexpression erfolgen kann, da der Pigmentgehalt von humanen Melanozyten nicht mit dem Gehalt an Boten-Ribonukleinsäure (messengerRNS, kurz mRNS) der Tyrosinase korrelierte. Stattdessen scheinen die Tyrosinaseaktivität und somit der Pigmentgehalt posttranslational reguliert zu werden, wie K. Iozumi et al. [44] zeigten.

Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Melaninsynthese (nach [51] und [52])



Nach Sonnenbestrahlung der Haut kommt es zu einer Vermehrung des Melanins. Dies liegt zum einen an der Sofortpigmentierung, die unmittelbar mit der Bestrahlung der Haut durch langwelliges Ultraviolettlicht (UVA, 300 – 450 nm, maximal wirksame Wellenlängen bei 340 nm) einsetzt: Melaninvorstufen werden in reifes Melanin umgewandelt und die Melanosomen in die Dendriten der Melanozyten transportiert. Die Melanosomen werden an die Keratinozyten abgegeben und dort in die Peripherie der Zellen verlagert [53]. Die Sofortpigmentierung hält nur wenige Tage an [84].

Die Spätpigmentierung dagegen entsteht hauptsächlich durch kurzwelliges Ultraviolettlicht (UVB, 250 – 400 nm, stärkste Pigmentierungskapazität bei 297 nm) und beruht auf einer Steigerung der Synthese von Tyrosinase, einer Zunahme der Melanozytenzahl und des Melanins [32, 69] sowie dem vermehrten Transfer von Melanosomen in Keratinozyten [86, 106]. Der Effekt der Spätpigmentierung ist nach spätestens 48 Stunden zu sehen. Zusätzlich nimmt die Dichte der Melanozyten in chronisch sonnenexponierter Haut zu, da die Zellteilung der Melanozyten durch UV-Bestrahlung stimuliert wird – dies gilt interessanterweise auch für nicht sonnenexponierte Hautareale [93]. Es gibt jedoch große Unterschiede bezüglich der Fähigkeit zur Pigmentierung unter Lichteinfluss [95]. Nach Fitzpatrick werden sechs Hauttypen unterschieden, wobei I ein sehr heller „keltischer“ und VI ein sehr dunkler „afrikanischer“ Hauttyp ist (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifikation der Hauttypen nach Fitzpatrick anhand der Hautreaktionen auf 30-minütige Sonnenexposition [18]

<i>Typ</i>	<i>Hautrötung</i>	<i>Bräunung</i>	<i>Haut</i>	<i>Typ</i>
I	immer	nie	Sommersprossen	„keltisch“
II	immer	gelegentlich	hellhäutig	„germanisch“
III	selten	immer	mittelstark pigmentiert	„mitteleuropäisch“
IV	sehr selten	immer	dunkelhäutig	„mediterran“
V	nie	-	braun	„indisch“
VI	nie	-	schwarz	„afrikanisch“

1.2.2 Melasma

Melasma, synonym auch Chloasma genannt, ist eine Hyperpigmentierung der Haut und meist symmetrisch an Stirn, Schläfen und Wangen ausgeprägt (Abbildung 5). Die bräunlichen, scharf und zum Teil unregelmäßig begrenzten Flecken können zu größeren Arealen konfluieren und verstärken sich bei Sonnenexposition.

Das Chloasma gravidarum ist eine physiologische Veränderung in der Schwangerschaft, tritt häufig zusammen mit einer Hyperpigmentierung der Linea alba, der Mamillenhöfe und des Genitalbereichs auf und bildet sich meist spontan zurück [103]. Bleibt es über längere Zeit bestehen, spricht man von einem Chloasma gravidarum perstans. Das Chloasma hormonale tritt bei 10 - 20% der Frauen auf, die Kontrazeptiva einnehmen.

Die Hauptfaktoren für die Entwicklung dieser umschriebenen, subjektiv störenden Hyperpigmentierung sind Östrogen, Lichtexposition und genetische Disposition. Als hormonelle Auslöser kommen Schwangerschaft, Einnahme von oralen Kontrazeptiva oder Ovarialtumoren in Frage [35]. Histologische Kennzeichen sind eine epidermale Hyperpigmentierung, ein Anstieg von Enzymen der Melanogenese sowie eine erhöhte Melanozytenzahl [48, 104].

Die therapeutischen Möglichkeiten begrenzen sich auf die Meidung der ursächlichen Faktoren und die Verwendung eines Sonnenschutzmittels mit hohem Lichtschutzfaktor auch im UVA-Bereich [71] sowie kosmetische Abdeckung. Es kann versucht werden, die Haut an den betreffenden Stellen durch eine Behandlung mit Hydrochinon, Tretinoin oder Azelainsäure zu bleichen [36] – am erfolgversprechendsten scheint derzeit die Dreifachkombination von Hydrochinon, Tretinoin und Hydrokortison zu sein [82, 102].

Abbildung 5: Melasma an der Stirn einer Patientin (Quelle: Fotoabteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München)



1.3 Klinische Zufallsbeobachtung bei Chlormadinonacetat

Bei der retrospektiven Auswertung einer 2-Jahres-Zulassungsstudie des Kontrazeptivums Belara® (Grünenthal GmbH) wurde eine überraschende Beobachtung gemacht: Vor Studienbeginn wurden 29 Patientinnen mit abnormaler Pigmentierung beziehungsweise Pigmentveränderungen der Haut registriert, die unter vorheriger Einnahme eines anderen Kontrazeptivums entstanden waren. Unter Einnahme von Belara® wurde eine abnormale Pigmentierung nur noch bei drei von diesen 29 Patientinnen beobachtet, so dass es in 90% der Fälle offensichtlich zu einem Rückgang der Pigmentveränderungen kam (Dr. G. Schramm, Grünenthal GmbH, persönliche Mitteilung).

Belara® ist ein Kombinationspräparat aus 30 µg Ethinylestradiol und 2 mg Chlormadinonacetat. Chlormadinonacetat ist ein Derivat von Progesteron und unterscheidet sich von diesem durch die Substitution von Chlor an C6 sowie einer Acetatgruppe an C17 (Abbildungen 6 und 7). Belara® ist ein Einphasenpräparat und wird 21 Tage lang in gleicher Dosis eingenommen gefolgt von 7 Tagen Einnahmepause.

Abbildung 6: Strukturformel von Progesteron

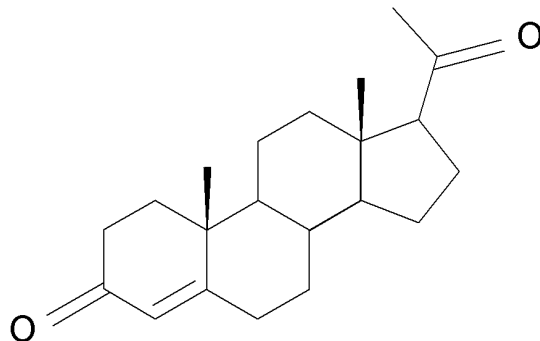
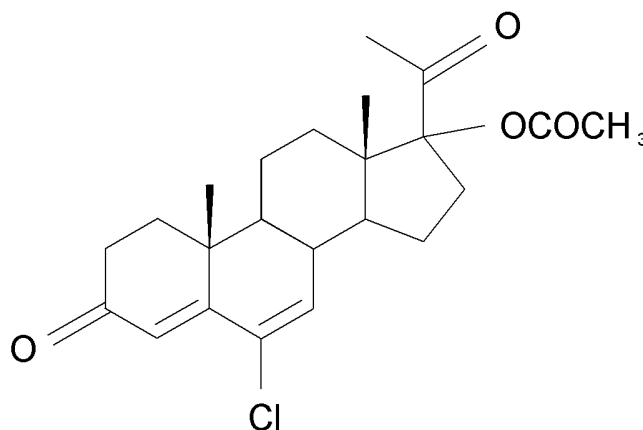


Abbildung 7: Strukturformel von Chlormadinonacetat



1.4 Fragestellung der Arbeit

Das Melasma ist eine häufige unerwünschte Nebenwirkung bei Anwenderinnen von oralen Kontrazeptiva. Bei einer retrospektiven Auswertung der Zulassungsstudie eines Kombinationspräparats aus Ethinylestradiol und Chlormadinonacetat (Belara®) fiel ein drastischer Rückgang zuvor bestehender Pigmentveränderungen auf. Da andere orale Kontrazeptiva ebenfalls Ethinylestradiol, jedoch unterschiedliche Gestagenderivate enthalten, liegt die Vermutung nahe, dass Chlormadinonacetat die Pigmentbildung in der Haut hemmt beziehungsweise die pigmentfördernde Wirkung der Östrogene aufhebt. Es wäre möglich, dass diese Hemmung direkt gegen die pigmentbildenden Zellen der Haut, die Melanozyten, gerichtet ist.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Chlormadinonacetat in Anwesenheit von Östrogenen die Proliferation und Pigmentbildung von Melanozyten im Vergleich zu Progesteron hemmt, was den Rückgang der Pigmentveränderungen erklären könnte.

2 Material und Methoden

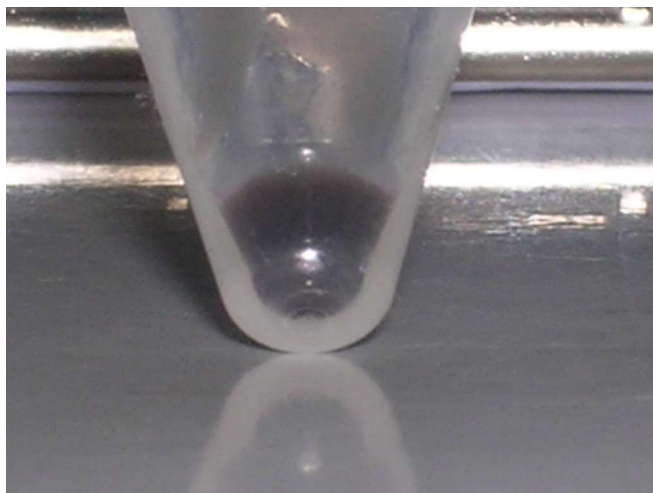
Für die in der Dissertation beschriebenen Untersuchungen wurden die nachfolgend aufgeführten Materialien und Vorgehensweisen angewendet, gegliedert nach den jeweiligen Methoden.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Melanozyten

Es wurden Melanozyten aus menschlicher Haut isoliert, die postoperativ im Rahmen von routinemäßig durchgeführten Zirkumzisionen bei sonst gesunden Kindern gewonnen worden war. Die in Kultur gezüchteten humanen Melanozyten wurden mit HM und fortlaufender Nummer bezeichnet. Außerdem wurde die pigmentierte Melanozytenlinie MNTa6 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Ralf Wienecke, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München) in den Versuchen eingesetzt. Für die Experimente wurden ausschließlich dunkel pigmentierte Melanozyten verwendet, die anhand des äußeren Aspektes der Hautprobe sowie der Farbe des Zellpellets (Abbildung 8) ausgewählt wurden.

Abbildung 8: Dunkel pigmentiertes Zellpellet bestehend aus Melanozyten, die aus menschlicher Haut isoliert wurden, in einem Reaktionsgefäß aus transparentem Kunststoff



2.1.2 Nährmedien

Transportmedium für humane Melanozyten

500 ml Hanks' ausgewogene Salzlösung (HBSS; PAA, Pasching, Österreich, H15-010)

10 ml Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, P0781)

1 ml Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, A2942)

MCDB-Medium

Herstellung des MCDB 153-Grundmediums:

MCDB 153-Pulver (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, M7403) wurde in zweifach deionisiertem Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München) gelöst und 15,7 ml Natriumbicarbonat 7,5% (Gibco, Karlsruhe, 25080-060) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, C707498) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das MCDB-Grundmedium steril filtriert.

Zusammensetzung des MCDB-Nährmediums:

MCDB 153-Grundmedium

2% fötales Kälber-Serum (FKS; Biochrom, Berlin, S 0115)

10% c-FKS (FKS und Chelex 100, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, C7901)

1% L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, G7513)

1,66 µg/ml Cholera-toxin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, C8052)

2,5 ng/ml basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF; PeproTech, Hamburg, 100-18B)

264 ng/ml Endothelin-3 (ET-3; Calbiochem über Merck, Darmstadt, 05-23-3801)

10 ng/ml Stammzellfaktor (SCF; Tebu-bio, Offenbach, 016300-07-B)

Reduziertes MCDB-Medium

Zusammensetzung:

MCDB 153-Grundmedium

1% FKS

1% c-FKS

1% L-Glutamin

0,5 ng/ml bFGF

2 ng/ml SCF

Melanozyten-Wachstumsmedium (PromoCell, Heidelberg, C-24010) enthält folgende Wachstumsfaktoren:

Rinderhypophysenextrakt (BPE)	0,4%
bFGF	1 ng/ml
Insulin	5 µg/ml
Hydrocortison	0,5 µg/ml
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	10 ng/ml

Nährmedium für MNTa6

Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM; PAA, Pasching, Österreich, E15-810)
10% FKS

2.1.3 Chemikalien

- Bacillol AF (Bode Chemie, Hamburg, 973380)
- Ethanol 80% (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- HBSS (PAA, Pasching, Österreich, H15-010)
- Dispase II (Roche, Penzberg, 10 165 859 001)
- Trypsin/EDTA 0,05% (PAA, Pasching, Österreich, L11-660)
- DMEM, thermostabil, ohne L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich, E15-082)
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E5134)
- G 418 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, G8168)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D2650)
- Steriles Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Transportmedium für Melanozyten (siehe 2.1.2)
- Nährmedien (siehe 2.1.2)

2.1.4 Einwegartikel und Geräte

- Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (Cellstar über Greiner, Frickenhausen, 188271/227261)

- 10 cm TC-Petrischale (TPP über Peske, Aindling-Arnhofen, 93100)
- Zellkulturflasche 25 cm² und 75 cm² (Cellstar über Greiner, Frickenhausen, 690175/ 658175)
- Kryoröhrchen 1,8 ml (Nunc, Wiesbaden, 368632)
- Pasteurpipetten 230 mm (VWR, Darmstadt, 612-1702)
- Mikroliterpipetten 0,5-10 µl und 20-200 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettierhilfe Pipetman P 20 und P 1000 (Gilson, Bad Camberg)
- Pipettenspitzen 10 µl/ 200 µl/ 1 ml Eppendorf (Sarstedt, Nümbrecht, 70.1115/ 70.760.002/ 70.762)
- Pipetten steril 2/ 5/ 10/ 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht, 86.1252.001/ 86.1253.001/ 86.1254.001/ 86.1685.001)
- Pipetten steril 50 ml (Greiner, Frickenhausen, 768180)
- Pipettierhilfe Pipetboy acu (Tecnomara, Fernwald)
- Laborflaschen 100 und 250 ml (Duran, Schott, Wertheim/Main)
- Erlenmeyerkolben 100 ml (Duran, Schubert & Weiß, München, 9.141.154)
- 0,22 µm-Filter (Millipore über Zefa-Laborservice, München, SLGP033RS)
- Magnetrührer (Ikamag RCT, IKA, Staufen)
- pH-Meter (inoLab, Weilheim)
- Pinzette, 160 mm, gerade/spitz (Wagner & Munz, München, 9.171.115)
- Skalpell (Feather, Köln)
- Bunsenbrenner (Typ Labogaz 206, ADG Paris, Frankreich)
- Qualifreeze Kryo-Einfriergerät (Qualilab, Olivet, Frankreich, 115650)
- +4 °C Kühlschrank (AEG, Nürnberg)
- -80 °C Tiefkältelagerschrank (Hierhammer Kältetechnik, München)
- Stickstoff-Tank (Messer, Sulzbach)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- Autoklav Systec 3850 EL (Systec, Wettenberg)
- Trockenschrank (Memmert, Schwabach)
- Rotixa 50 RS (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Waage (Sartorius BP 221 S, Göttingen)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)
- Lichtmikroskop (CK2-TR, Olympus, Hamburg)
- Inverses Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 25 mit AxioCam MRc, Carl Zeiss, Oberkochen)

2.1.5 Isolierung von Melanozyten aus Hautgewebe

Die Isolierung der Melanozyten aus menschlichem Hautgewebe erfolgte jeweils über einen Zeitraum von vier Tagen.

Nach Eintreffen der im Transportmedium aufbewahrten Hautproben wurden zunächst zwei Waschschrte mit jeweils 5 ml HBSS durchgeführt. Daraufhin wurden die Hautproben in 5 ml 80% Ethanol für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Ethanols erfolgte ein weiterer Waschschrte mit 5 ml HBSS. Danach wurden in einer Petrischale mit sterilen und kurz vor Gebrauch abgeflammt Instrumenten Fett und GefäÙe entfernt und das verbliebene Gewebe in etwa 5 x 5 mm groÙe Stöcke zerteilt. Diese wurden in 5 ml Dispase II, die vorher zweimal steril filtriert worden war, gelegt und über eine Dauer von 15 bis 18 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden in einer Petrischale Epidermis und Dermis voneinander gelöst und die Dermis anschließend verworfen. Die Epidermisstücke wurden mit 2 ml 0,05% Trypsin resuspendiert und über 2 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinisierung wurde mit 4-5 ml DMEM und 10% FKS gestoppt und die Suspension anschließend mit 1.200 Umdrehungen pro Minute (350 g) über eine Dauer von 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Nährmedium in einer 25 cm²-Zellkulturflasche aufgenommen.

Am vierten Tag wurden zwei Waschschrte mit jeweils 3 ml thermostabilem DMEM durchgeführt. Danach erfolgte ein erster Mediumwechsel mit 5 ml Nährmedium. Das Medium wurde bis zu einer Oberflächenbedeckung des KulturgefäÙes durch die Zellen, im Folgenden als Konfluenz bezeichnet, von 70-80% zweimal pro Woche gewechselt. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 in 75 cm²-Zellkulturflaschen gesplittet.

2.1.6 Mediumwechsel und Splitten von Melanozyten

Vorbereitung

18,61 g EDTA wurden in 100 ml sterilem Wasser gelöst. Die 0,5 M Lösung (pH 8,0) wurde danach steril filtriert. Für 0,05% EDTA in PBS mussten 1,34 ml dieser Standardlösung mit 500 ml PBS vermischt werden. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

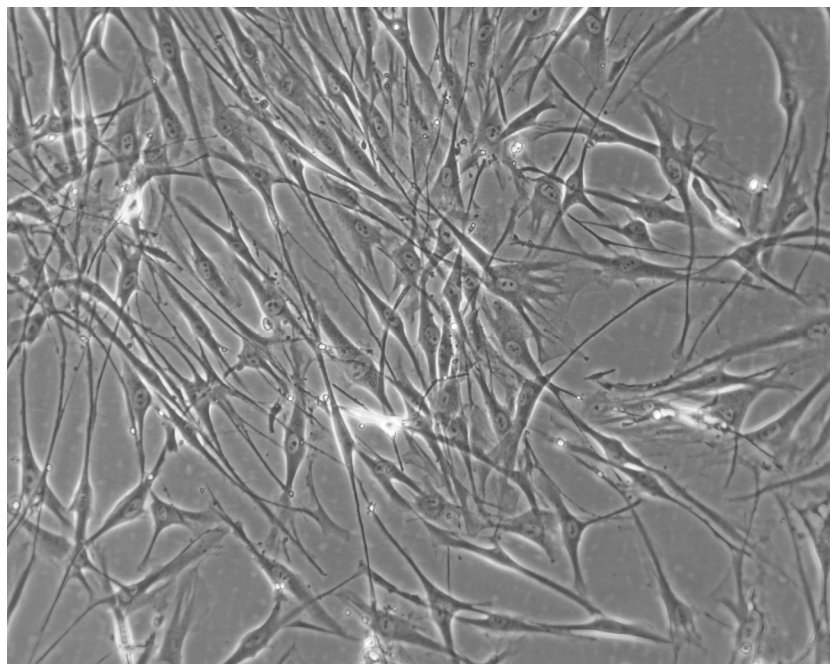
Durchführung

Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Wenn der Boden der 75 cm²-Zellkulturflasche weitgehend konfluent bewachsen war, was einer Zellzahl von etwa 3

Millionen Melanozyten entspricht, wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. Hierfür erfolgte zunächst ein Waschschriff mit 5 ml PBS-EDTA. Nach Schwenken und Absaugen des PBS-EDTA wurden 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellkulturflasche für etwa eine Minute in einen 37°C warmen Brutschrank gestellt. Sobald unter dem Lichtmikroskop erkennbar war, dass sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde der Vorgang der Trypsinisierung mit 4 ml thermostabilem DMEM und 10% FKS gestoppt. Die Suspension wurde über 5 Minuten mit 1.200 Umdrehungen pro Minute (350 g) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension des Pellets wurden die Zellen gleichmäßig auf vier 75 cm²-Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml Medium verteilt.

Für die Zelllinie MNTa6 wurde wie vorbeschrieben ein Nährmedium aus DMEM und 10% FKS verwendet. Für die selbst isolierten humanen Melanozyten wurde zunächst das MCDB-Medium verwendet. Beim ersten Mediumwechsel erfolgte eine Umsetzung auf das Melanozyten-Wachstumsmedium (Abbildung 9).

Abbildung 9: Humane Melanozyten in Kultur (100fache Vergrößerung)



Zeigten sich Anzeichen für eine Fibroblastenkontamination, wurden die Melanozyten über zwei Tage mit der Substanz G 418 (Geneticin) in einer Konzentration von 100 µg/ml versetzt. Dadurch war eine effektive Beseitigung der Fibroblasten möglich [41].

2.1.7 Einfrieren und Auftauen von Melanozyten

Zum Einfrieren wurden die Melanozyten zunächst bis zu einer Konfluenz von fast 100% kultiviert. Das weitere Vorgehen war dann zunächst analog dem Splitten: Waschschrift, Trypsinisierung, Abstoppen und Zentrifugation. Die Resuspension erfolgte mit einem Gemisch aus 95% inaktivem FKS und 5% DMSO. Danach wurden die Zellen gleichmäßig auf vier Kryoröhrchen mit je 1 ml Inhalt verteilt. Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren, wurden die Röhrchen in einer Box, die eigenständig 1°C pro Minute an Temperatur verliert, bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag konnten die Röhrchen in den Stickstoff-Tank mit einer Temperatur von -180°C überführt werden.

Zum Auftauen der kryokonservierten Melanozyten wurden die Kryoröhrchen kurzzeitig durch Schwenken in 37°C heißem Wasser erwärmt. Der Inhalt wurde zügig mit 4 ml Nährmedium vermischt, um das zytotoxisch wirkende DMSO zu verdünnen. Nachdem der gesamte Inhalt flüssig geworden war, erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1.200 Umdrehungen pro Minute (350 g). Anschließend wurden die Melanozyten in 10 ml Nährmedium aufgenommen und in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Antikörper und Chemikalien

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) pH 7,6 (Trizma® base von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, T6066)
- PBS (PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- Paraformaldehyd (Formaldehydlösung 10%, Fischar, Saarbrücken, 6415071)
- 0,5% Triton X [(100x) in PBS] (Fluka über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 93418)
- HMB45 (Enzo, Farmingdale, NY, USA, 30930), 1:4 in Tris verdünnt
- S-100 (Dako, Hamburg, Z0311), 1:1.500 in Tris verdünnt
- TRP-1 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, England, NCL-TRP-1), 1:100 in Tris verdünnt
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- Maus-anti-Kaninchen-Immunglobuline (Dako, Hamburg, M0737), 1:100 in FKS/Tris 12,5% verdünnt

- Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline (Dako, Hamburg, Z0259), 1:20 in FKS/Tris 12,5% verdünnt
- APAAP Maus (Dako, Hamburg, D0651), 1:50 in FKS/Tris 12,5% verdünnt
- Fast Red TR / Naphthol Tabletten (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, F4648)
- Destilliertes Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Hämalaunlösung (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, 109242)

2.2.2 Einwegartikel und Geräte

- Objektträger mit Zellkulturkammern (CultureSlide, 4-well, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA, 354104)
- Nitrilhandschuhe Rotiprotect® (Carl Roth, Karlsruhe, P780.1)
- Pipettierhilfe Gilson Pipetman P 200 und P 1000 (Gilson, Bad Camberg)
- Pipettenspitzen 200 µl Eppendorf/Gilson (Sarstedt, Nümbrecht, 70.760.002)
- Pipettenspitzen 1 ml Eppendorf (Sarstedt, Nümbrecht, 70.762)
- +4 °C Kühlschrank (Liebherr Comfort, Ochsenhausen)
- Vortex Genie 2 (Model G-560E, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Kunststoff 2,0 ml (Peske, Aindling-Arnhofen, 9329-901)
- Laborabzug (Prutscher, München)
- Deckgläschen 24 x 50 mm (Peske, Aindling-Arnhofen, 01-2450)
- Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen)

2.2.3 Prinzip der APAAP-Methode

Bei dieser immunhistochemischen Färbetechnik wird ein löslicher Enzym-/Anti-Enzym-Immunkomplex (**Alkalische Phosphatase** und **Anti-Alkalische-Phosphatase**) verwendet. Das Enzym wird hierfür im Überschuss zugegeben, um die Bildung von Präzipitaten zu vermeiden. Die APAAP-Methode beinhaltet 3 Inkubationsschritte: 1. Unkonjugierter Primärantikörper, 2. unkonjugierter Sekundärantikörper und 3. löslicher Enzym-Immunkomplex, gefolgt von der Farbreaktion. Der Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes müssen von derselben Spezies stammen. Der Sekundärantikörper

muss gegen Immunglobuline dieser Spezies gerichtet sein und wird im Überschuss zugegeben. Dadurch fungiert er als Verbindung zwischen Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex (nach [16]).

2.2.4 Durchführung der APAAP-Färbung

Parallel zu den Versuchsreihen wurden Zellen der gleichen Zelllinie auf Objektträgern mit Zellkulturkammern in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Kammer kultiviert. Die Immunhistochemie nach APAAP-Technik für HMB45, S-100 und TRP-1 diente der Identifizierung der Melanozyten, da diese leicht mit Fibroblasten verwechselt werden können. Die APAAP-Färbung erstreckte sich jeweils über zwei Tage.

Am ersten Tag wurde das Kulturmedium aus den Kammern abpipettiert und die Kammern anschließend abgenommen. Die Objektträger wurden 5 Minuten mit Tris/PBS gewaschen. Unter einem Abzug wurden die Objektträger etwas getrocknet und dann 150 µl Paraformaldehyd pro Kammer aufgetragen. Das Paraformaldehyd wirkte etwa 20 Minuten lang ein. Danach wurden die Objektträger zweimal für 5 Minuten mit Tris/PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen permeabilisiert, indem je 150 µl 0,5% Triton X pro Kammer aufgetragen wurde. Nach 15 Minuten Einwirkzeit in der Feuchtkammer wurden die Objektträger wiederum zweimal für 5 Minuten mit Tris/PBS gewaschen. Danach wurde mit je 150 µl 20% FKS/Tris pro Kammer über 15 Minuten in der Feuchtkammer geblockt. Anschließend konnten die Antikörper gegen HMB45, S-100 und TRP-1 aufgetragen werden und über Nacht in der Feuchtkammer einwirken.

Am nächsten Tag wurden zwei Waschschriffe für jeweils 4 Minuten in Tris-Puffer durchgeführt. Für den S-100-Antikörper war es erforderlich, 100 µl Maus-anti-Kaninchen-Immunglobuline aufzutragen und eine Stunde in der Feuchtkammer einwirken zu lassen. In dieser Zeit wurden die anderen Kammern mit 100 µl Tris-Puffer vor dem Austrocknen geschützt. Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe mit Tris-Puffer für je 4 Minuten, bevor 100 µl Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline pro Kammer aufgetragen wurden. Der Leerwert bestand aus 100 µl Tris-Puffer. Nach 30 Minuten Einwirkzeit in der Feuchtkammer folgten wiederum zwei Waschschriffe mit Tris-Puffer für jeweils 4 Minuten. Danach wurden je 100 µl APAAP pro Kammer aufgetragen, für den Leerwert wiederum 100 µl Tris-Puffer. Nach 30 Minuten in der Feuchtkammer wurden zwei Waschschriffe mit Tris/PBS durchgeführt. Anschließend wurden auf alle Kammern jeweils 100 µl Fast Red Naphthol, das kurz zuvor mit 1 ml destilliertem Wasser und Tris-Puffer angelöst worden war, aufgetragen. Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop die Anfärbung der Zellen kontrolliert. Anschließend wurde dreimal für je 4 Minuten mit Tris/PBS

gewaschen. Zuletzt wurde noch eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Diese bestand aus kurzer Spülung der Objektträger mit destilliertem Wasser, Einwirkung des Hämalaun über 2 Minuten, dreimaliger Spülung mit Leitungswasser und einmaliger Spülung mit destilliertem Wasser. Die Objektträger wurden mit 150 µl Kaisers Glyceringelatine beträufelt und anschließend mit einem Deckgläschen eingeschlossen.

2.3 Versuchsaufbau der Zellkulturexperimente

2.3.1 Chemikalien

- PBS (PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E5134)
- Trypsin/EDTA 0,05% (PAA, Pasching, Österreich, L11-660)
- DMEM, thermostabil, ohne L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich, E15-082)
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- Nährmedien (siehe 2.1.2)
- 17β-Estradiol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E2257), angelöst in Ethanol: MCDB-Grundmedium (1:50)
- Progesteron (ICN Biomedicals, Eschwege, 194570), angelöst in Medium
- Chlormadinonacetat (Grünenthal, Aachen), angelöst in Ethanol und zweifach destilliertem Wasser

2.3.2 Einwegartikel und Geräte

- Pipetten und Pipettierhilfen (s.o.)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (Cellstar über Greiner, Frickenhausen, 188271/227261)
- Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe)
- 6-Well-Platten (TPP über Peske, Aindling-Arnhofen, 92006)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- Rotixa 50 RS (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)
- Lichtmikroskop (CK2-TR, Olympus, Hamburg)

- UVA-Lampe UVASUN 5000 S (Mutzhas, München), 340-440 nm
- UVB-Lampe TL 20 W/12 (Philips, Hamburg), 280-350 nm (Peak 311 nm)
- UV-Meter Typ 585 100 (Waldmann, Villingen-Schwenningen)

2.3.3 Versuchsablauf

Die Zellen wurden zunächst wie in 2.1.6 beschrieben geerntet. Die Zellzahl wurde durch Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt: Gezählte Zellen/4 x 10.000 x Medium insgesamt [in ml] = Gesamtzahl. Danach wurden die Zellen in gleicher Dichte auf Kulturschalen mit sechs Kammern, sogenannten 6-Well-Platten, mit 1,5 ml Medium pro Well ausgesät. Am 3., 5. und 7. Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Diesem Medium wurden unterschiedliche Östrogen-/Gestagen-Kombinationen zugegeben. In jeder Versuchsreihe gab es eine unstimulierte Kontrolle, zwei Östrogen-Gruppen (0,1 nM und 1 nM), drei Progesteron-Gruppen (100 nM Progesteron, 100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen, 100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen) und drei Chlormadinonacetat-Gruppen (100 nM CMA, 100 nM CMA + 0,1 nM Östrogen, 100 nM CMA + 1 nM Östrogen).

In einigen Versuchsreihen wurde vor dem Mediumwechsel zusätzlich eine UV-Bestrahlung (siehe 2.3.4) durchgeführt. Am 9. Tag wurden Zellproliferation und Pigmentbildung analysiert.

2.3.4 UV-Bestrahlung

Um eine gleichmäßige Strahlenleistung zu erreichen, wurden die UV-Lampen bereits 10 Minuten vor Experimentbeginn eingeschaltet. Ein konstanter Abstand von 43 cm zwischen UVA-Lampe und Unterlage wurde zur gleichmäßigen Ausleuchtung eingehalten. Vor der UV-Exposition wurden die Zellen in den 6-Well-Platten mit je 1,5 ml PBS gewaschen, um den Indikatorfarbstoff aus dem Nährmedium möglichst vollständig zu entfernen. Die Bestrahlung erfolgte in frischem PBS (1,5 ml/ Well). Die Bestrahlungsdauer wurde nach Messung der Leistung mit dem UV-Meter folgendermaßen berechnet: $\text{Zeit} = \text{Energie} / \text{Leistung}$. Für die Bestrahlung wurde der Deckel der 6-Well-Platte abgenommen. Ursprünglich war geplant, die Zellen dreimal – vor jedem Mediumwechsel – mit 20 J/cm² (UVA) bzw. 20 mJ/cm² (UVB) zu bestrahlen. Da zu viele Zellen abstarben (siehe 3.1), wurde die Bestrahlungsdosis reduziert: Sie variierte von 10 bis 60 J/cm² für UVA und von 10 bis 40 mJ/cm² für UVB. Nach der Bestrahlung wurde das PBS wieder mit dem Nährmedium ausgetauscht.

2.4 Zellbiologische Assays

Zur Untersuchung der Proliferationsaktivität der Melanozyten wurde zum einen die absolute Zahl lebender Zellen durch Zählung unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau (siehe 2.4.1) bestimmt und mit den Kontrollzellen verglichen. Zum anderen wurde bei jeder Versuchsreihe ein fluorimetrischer Assay (siehe 2.4.2) durchgeführt, der die metabolische Aktivität der Zellen misst.

Die Pigmentbildungsaktivität der Melanozyten wurde zum einen anhand der Aktivität der Tyrosinase, des Schlüsselenzyms der Melanogenese, beurteilt (siehe 2.4.3). Zum anderen wurde die Menge an Melanin in den Melanozyten pro Versuchsansatz durch Absorptionsmessung bestimmt (siehe 2.4.4).

2.4.1 Zellvitalitätsanalyse durch Trypanblau-Färbung

2.4.1.1 Chemikalien

- PBS (PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E5134)
- Trypsin/EDTA 0,05% (PAA, Pasching, Österreich, L11-660)
- DMEM, thermostabil, ohne L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich, E15-082)
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- Trypanblau 0,4% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, T8154), 1:2 mit PBS verdünnt

2.4.1.2 Einwegartikel und Geräte

- Pipetten und Pipettierhilfen (s.o.)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Kunststoff 1,5 ml (Peske, Aindling-Arnhofen, 120-086)
- Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)
- Lichtmikroskop (CK2-TR, Olympus, Hamburg)

2.4.1.3 Durchführung

Zur Beurteilung der Vitalität der Zellen wurden 5 µl Zellsuspension - nach Ablösung vom Boden der Zellkulturflasche - mit 5 µl Trypanblau vermischt. Lebende Zellen mit intakten Membranen nehmen den Farbstoff nicht auf, während sich bereits abgestorbene Zellen blau anfärben. Die blau angefärbten Zellen wurden in der Neubauer-Kammer gezählt und daraus die Anzahl abgestorbener Zellen nach folgender Formel ermittelt: $\text{Blaue Zellen}/4 \times 10.000 \times \text{Medium insgesamt [in ml]} \times 2$. Der Faktor 2 in der Formel ergibt sich aus der 1:1-Mischung von Zellsuspension und Trypanblau. Die Zahl gesunder Zellen in Relation zu der Gesamtzellzahl stellt ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen dar.

2.4.2 Zellvitalitätsanalyse durch fluorimetrischen Assay

2.4.2.1 Chemikalien

- MCDB 153 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, M7403)
- CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, G8080)

2.4.2.2 Einwegartikel und Geräte

- Pipetten und Pipettierhilfen (s.o.)
- 6-Well-Platten (TPP über Peske, Aindling-Arnhofen, 92006)
- 96-Well-Mikrotiterplatte (TPP über Peske, Aindling-Arnhofen, 92096)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- CytoFluor™ 2350, Fluorescence Measurement System (Millipore, Schwalbach)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)

2.4.2.3 Prinzip

Der CellTiter-Blue™-Assay ist ein fluorimetrischer Test und für die Analyse der Proliferationsaktivität von Zellen in Zellkultur geeignet. Bei erhöhter Zellaktivität im

fluorimetrischen Assay im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen kann von einer erhöhten Proliferationsrate ausgegangen werden.

Bei diesem Assay wird Resazurin, ein zellgängiger blauer Redoxfarbstoff, von metabolisch aktiven Zellen zu dem pinkfarbenen, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umgesetzt. Die Menge der Umsetzung ist direkt proportional zu der Zahl lebender Zellen. Tote Zellen dagegen sind nicht in der Lage, ein fluoreszierendes Signal zu erzeugen. Das umgesetzte pinkfarbene Substrat aus dem Überstand kann über Fluoreszenzmessung mit einem Fluorimeter quantifiziert werden. Diese Methode ist sehr sensitiv, denn es werden bereits sehr wenige Zellen erfasst. Die minimal erforderliche Zellzahl beträgt 400 (nach [73]).

2.4.2.4 Durchführung

Das Nährmedium wurde aus den 6-Well-Platten abgesaugt und 750 µl MCDB-Grundmedium und 150 µl CellTiter-Blue™ zugegeben. Die Platten wurden geschwenkt, bis sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt hatte, und anschließend für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Probe für den Leerwert bestand aus 750 µl MCDB-Grundmedium und 150 µl CellTiter-Blue™. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 2 Proben mit jeweils 100 µl pro Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Im Fluorimeter wurde die Fluoreszenz des umgesetzten Substrats mit Hilfe eines integrierten automatischen Messprotokolls gemessen.

2.4.3 Analyse der Pigmentbildungsaktivität durch 3H-Tyrosin-Assay

2.4.3.1 Chemikalien

- PBS (PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E5134)
- Trypsin/EDTA 0,05% (PAA, Pasching, Österreich, L11-660)
- DMEM, thermostabil, ohne L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich, E15-082)
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- KPO₄-Puffer 1 M pH 7,2 (aus di-Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, 105104 und destilliertem Wasser, Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Penicillin G (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, P7794), angelöst in destilliertem Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)

- Bovines Serum-Albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, B4287), angelöst in destilliertem Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München): 100 mg/ml
- Cycloheximid (CHX; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, C4859) in DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D2650)
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, C7795), angelöst in Ethanol absolut (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- L-Dopa (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D9628), angelöst in 0,5 M HCl (aus HCl 25%, Merck, Darmstadt, 100.376)
- Nonidet® P40 Substitute (Fluka über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, 74385)
- Natriumdodecylsulfat (SDS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, L4509), angelöst in destilliertem Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Tris-HCl pH 7,2 (Trizma® base von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, T6066)
- Aprotinin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, A1153), angelöst in zweifach destilliertem Wasser (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, P7626), angelöst in Ethanol reinst (Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München)
- L-[3,5-3H]-Tyrosin (GE Healthcare, vormals Amersham Biosciences, München, TRK200), 1:20 verdünnt mit Lösung A
- Aktivkohle (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, C4386)
- 0,1 M HCl (aus HCl 25%, Merck, Darmstadt, 100.376)
- Szintillationsflüssigkeit: Ultima Gold™ XR (Perkin-Elmer, Überlingen, 6013119)
- Methyl-3H-Thymidin, 185 GBq/mmol (GE Healthcare, vormals Amersham Biosciences, München, TRA120), 1:30 verdünnt

2.4.3.2 Einwegartikel und Geräte

- Pipetten und Pipettierhilfen (s.o.)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Kunststoff 1,5 und 2,0 ml (Peske, Aindling-Arnhofen, 120-086 / 9329-901)
- Neubauer-Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- Eppendorf Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
- Vortex Genie 2 (Model G-560E, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- +4 °C Kühlschranks (AEG, Nürnberg)
- Lichtmikroskop (CK2-TR, Olympus, Hamburg)

- 96-Well-Mikrotiterplatte (TPP über Peske, Aindling-Arnhofen, 92097)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)

Für Arbeiten im Radioaktivlabor:

- Sterile Werkbank: Uniflow UV 1200 (UniEquip Laborgerätebau, Martinsried)
- +4 °C Kühlschrank (AEG, Nürnberg)
- Vortexer (Cenco Instrumenten B.V., Breda, Niederlande, 34524-200)
- Inkubator (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, 492.0630)
- Eppendorf Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
- Mikroliterpipetten 2-20 µl und 20-200 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen 200 µl Eppendorf/Gilson (Sarstedt, Nümbrecht, 70.760.002)
- Makropipette (Macro-Set, vormals Oxford Laboratories, USA)
- Mini Vials C (Carl Roth, Karlsruhe, 5404.1)
- Roth-Meßflaschen (Carl Roth, Karlsruhe, 0794.1)
- Szintillationszähler: 4000 Series, Liquid Scintillation Counting (vormals United Technologies Packard), seit 01/2007 Tri-Carb 2800 TR, Liquid Scintillation Analyzer (Perkin-Elmer, Überlingen)

2.4.3.3 Ansetzen von Lösungen

1. Extraktionspuffer:

98,7 ml Tris-HCl

1 ml Nonidet P40

100 µl SDS 10%

Die Proteinaseinhibitoren Aprotinin und PMSF wurden direkt vor dem Versuch in einer Konzentration von jeweils 100 µl / 10 ml zugegeben.

2. Lösung A:

0,969 ml KPO₄-Puffer 1 M

1 µl BSA

10 µl Chloramphenicol

10 µl CHX

10 µl Penicillin G

3. Lösung Z:

Identisch Lösung A mit Zusatz von 0,25 mM L-Dopa

2.4.3.4 Prinzip

Der 3H-Tyrosin-Assay basiert auf der quantitativen Messung von 3H-H₂O, das als Nebenprodukt bei der Konversion von 3H-Tyrosin zu Dopa durch das Enzym Tyrosinase gebildet wird [40]. 3H-Dopa und 3H-Tyrosin entstehen nahezu im Verhältnis 1:1 [72]. Durch den Zusatz von Aktivkohle wird das 3H-Tyrosin gebunden. Der Überstand enthält das 3H-H₂O, das im Szintillationszähler gemessen wird.

2.4.3.5 Durchführung

Zunächst wurden die Zellen wie weiter oben beschrieben geerntet, gezählt und zentrifugiert mit 5.000 Umdrehungen pro Minute (1.200 g) über 5 Minuten bei Raumtemperatur. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Extraktionspuffer resuspendiert. Um eine optimale Durchmischung zu erhalten, wurde zusätzlich gevortext. Es folgte eine Inkubation für mindestens eine Stunde im Kühlschrank. Danach wurde bei 4°C über 2 Minuten mit 12.000 Umdrehungen pro Minute (9.500 g) zentrifugiert, so dass sich die aufgebrochenen Zellhüllen am Boden der Reaktionsgefäße absetzten. Aus dem Überstand, der unter anderem die Tyrosinase enthielt, wurden je 30 µl entnommen und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde mit 10 µl Lösung Z, die den für die Tyrosinase nötigen Cofaktor L-Dopa enthielt, und 10 µl 3H-Tyrosin für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit konnte die Tyrosinase im Zelllysate aktiv werden und das 3H-Tyrosin verarbeiten. Die Probe für den Leerwert bestand aus 30 µl Extraktionspuffer, 10 µl Lösung Z und 10 µl 3H-Tyrosin. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 40 µl pro Probe in ein Reaktionsgefäß mit 0,96 ml 0,1molarer HCl-Lösung und darin gelöster aktivierter Kohle transferiert. Die Reaktionsgefäße wurden eine Stunde lang alle 10 Minuten gevortext, um ein Absinken der Kohle zu verhindern. Dann folgte eine Zentrifugation mit 6.000 Umdrehungen pro Minute (2.800 g) über 5 Minuten bei Raumtemperatur. Hierdurch setzte sich das überschüssige 3H-Tyrosin an die Kohle gebunden ab. Aus dem Überstand mit entstandenem 3H-H₂O wurden 100 µl in ein Gefäß mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Durch die Messung der Proben im Szintillationszähler konnte nach Abzug des Leerwertes mit Hilfe eines automatischen Messprotokolls der jeweilige Wert für die Aktivität der Tyrosinase ermittelt werden. Als Negativkontrolle diente ein Gefäß mit Szintillationsflüssigkeit ohne Zusätze und als Positivkontrolle Methyl-3H-Thymidin.

2.4.4 Analyse der Pigmentbildungsaktivität durch Messung des Melanin- gehalts

2.4.4.1 Chemikalien

- PBS (PAA, Pasching, Österreich, H15-001)
- EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, E5134)
- Trypsin/EDTA 0,05% (PAA, Pasching, Österreich, L11-660)
- DMEM, thermostabil, ohne L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich, E15-082)
- FKS (Biochrom, Berlin, S 0115)
- 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, C707498)
- Melanin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, M8631)

2.4.4.2 Einwegartikel und Geräte

- Pipetten und Pipettierhilfen (s.o.)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Kunststoff 2,0 ml (Peske, Aindling-Arnhofen, 9329-901)
- Inkubator Heracell® 150 (Heraeus, Hanau)
- Eppendorf Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
- Sterile Werkbank (Class II Type A/B3, Nuair™, Plymouth, England)
- Lichtmikroskop (CK2-TR, Olympus, Hamburg)
- Vortex Genie 2 (Model G-560E, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- Sonikator: U 50 control (IKA, Staufen, 2752000)
- +4 °C Kühlschrank (Liebherr Comfort, Ochsenhausen)
- Einmalküvetten Halbmikro (VWR, Darmstadt, 634-0001)
- Einmalküvetten Makro (VWR, Darmstadt, 634-0000)
- Spektralphotometer: SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad, München, 170-2501EDU)

2.4.4.3 Durchführung

Für die Bestimmung des Melaningehalts wurden die Zellen zunächst wie weiter oben beschrieben geerntet und in 2 ml-Reaktionsgefäßen bei 5.000 Umdrehungen pro Minute (1.200 g) über 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 200 µl oder 500 µl NaOH resuspendiert und die Zellmembran mit Ultraschall aufgebrochen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Um eine zuverlässige Messung zu erhalten, wurde eine Eichgerade bestimmt. Hierfür wurden 20 µl synthetisches Melanin mit 980 µl NaOH vermischt, was einem Melaningehalt von 200 µg/ml entspricht. Es wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe erstellt, so dass die Eichgerade aus folgenden Werten bestand: 0 – 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200 µg/ml. Zeigte sich eine lineare Eichgerade, konnte über die im Spektralphotometer gemessene Absorption der Proben bei 405 nm und 475 nm der Melaningehalt bestimmt werden.

2.5 Statistische Auswertung

Zunächst wurden die normierten Werte zu den Referenzwerten ohne Hormonzugabe gebildet. Zur Klärung der Frage, unter welchen Bedingungen signifikante Unterschiede zum Referenzwert bestehen, wurden Einstichproben-T-Tests durchgeführt. Die einfaktorielle Varianzanalyse kam zum Einsatz, um zu überprüfen, zwischen welchen Hormonen oder Hormonzusammensetzungen statistisch signifikante Unterschiede zu finden sind.

In allen Abbildungen sind Mittelwert + Standardfehler dargestellt. Für Testentscheidungen wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. Entsprechend signifikante Ergebnisse wurden gekennzeichnet (* für $p < 0,05$). Ergebnisse mit einem p-Wert $> 0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant bewertet.

Berechnet wurden alle Ergebnisse mit dem Statistikprogramm „SPSS® für Windows®“ Version 15.0.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Zellkulturen werden gegliedert nach der jeweiligen Methode (Trypanblau-Färbung, Proliferationsassay, ³H-Tyrosin-Assay, Messung des Melaningehalts) dargestellt. Den Versuchen gingen zur Methodvalidierung verschiedenste Vorversuche voraus, die aber nicht in der statistischen Auswertung enthalten sind.

3.1 Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung wurde zur Festlegung der Bestrahlungsdosis und eines geeigneten Bestrahlungsschemas benutzt.

Die Zellen wurden am Tag 1 in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Well ausgesät. Am Tag 3 erfolgte die erste Bestrahlung, an den Tagen 5 und 7 gegebenenfalls weitere Bestrahlungen. Am Tag 9 wurden die Zellen nach Schätzung der Konfluenz ausgezählt und mit Trypanblau gefärbt, um den Anteil toter Zellen zu bestimmen.

3.1.1 Bestrahlung mit UVA

Die Bestrahlung mit UVA lag im Wellenlängenbereich von 340 bis 440 nm, wobei die für die Pigmentierung maximal wirksame Wellenlänge 340 nm beträgt [18]. Zur Festlegung der maximal tolerablen UVA-Dosis wurden die Melanozyten ein- bis dreimal mit drei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (10, 20 und 40 J/cm²) behandelt (Tabelle 3).

Einzeldosen von 10 und 20 J/cm² wurden durch die Melanozyten gut toleriert. Da die Bestrahlung möglichst zeitnah zur Auswertung erfolgen sollte und eine dreimalige Dosis von 40 J/cm² stark toxisch auf die Melanozyten wirkte, wurden in den Versuchen keine Bestrahlungen mit 40 J/cm² durchgeführt. Aufgrund einer sehr unterschiedlichen UVA-Verträglichkeit der einzelnen Zellen (HM 77, HM 78, MNTa6) variierte die Dosis letztlich von 1 x 10 J/cm² bis 3 x 20 J/cm².

Tabelle 3: Zellvitalität nach UVA-Bestrahlung

Dosis	Konfluenz	Gesamtzellzahl	Anteil toter Zellen
1 x 10 J/cm ² 2 x 10 J/cm ² 3 x 10 J/cm ²	90 % 90 % 70 %	622.500 802.500 487.500	2,4 % 2,8 % 3,1 %
1 x 20 J/cm ² 2 x 20 J/cm ² 3 x 20 J/cm ²	90 % 80 % 60 %	915.000 727.500 375.000	2,5 % 4,1 % 4,0 %
1 x 40 J/cm ² 2 x 40 J/cm ² 3 x 40 J/cm ²	80 % 70 % 50 %	577.000 465.000 232.000	5,2 % 4,8 % 16,1 %

3.1.2 Bestrahlung mit UVB

Die Bestrahlung mit UVB lag im Wellenlängenbereich von 280 bis 350 nm mit einem Peak bei 311 nm. Die stärkste Pigmentierung wird bei 297 nm erreicht [18]. Da laborintern bereits Ergebnisse aus Vorexperimenten zur Festlegung der maximal tolerablen UVB-Dosis vorlagen, wurden weniger Bestrahlungsschemata ausgetestet als unter UVA (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zellvitalität nach UVB-Bestrahlung

Dosis	Konfluenz	Gesamtzellzahl	Anteil toter Zellen
3 x 10 mJ/cm ²	90 %	420.000	7,1 %
1 x 15 mJ/cm ² 2 x 15 mJ/cm ²	80 % 70 %	202.500 52.500	3,7 % 14,3 %
1 x 20 mJ/cm ² 2 x 20 mJ/cm ²	70 % 50 %	345.000 172.500	2,2 % 4,3 %

Nach UVB-Bestrahlung war der Anteil toter Zellen deutlich höher als nach UVA-Bestrahlung. Auch bezüglich der UVB-Verträglichkeit variierten die einzelnen Zelllinien (HM 16, HM 77, HM 78, MNTa6). Die Dosis betrug schließlich zwischen $1 \times 10 \text{ mJ/cm}^2$ bis $2 \times 20 \text{ mJ/cm}^2$.

3.2 Proliferationsassay

Mit dem Proliferationsassay wurden stimulierende und hemmende Effekte der verschiedenen Hormone auf die Lebensfähigkeit der Melanozyten beurteilt.

3.2.1 Ergebnisse der Vorversuche

Die Vorversuche hatten zum Ziel, Bedingungen festzulegen, unter denen 17β -Estradiol die Melanozytenproliferation am effektivsten stimulierte.

Es wurden folgende Konzentrationen von 17β -Estradiol, im Folgenden vereinfacht als Östrogen bezeichnet, ausgetestet: 0,1 nM, 1 nM, 100 nM, 1 μM und 10 μM . Die höchste Konzentration (10 μM) hatte einen toxischen Effekt auf die Zellen, so dass in den späteren Versuchsreihen nur noch die Konzentrationen 0,1 und 1 nM verwendet wurden, was auch mit Angaben in der Literatur übereinstimmte.

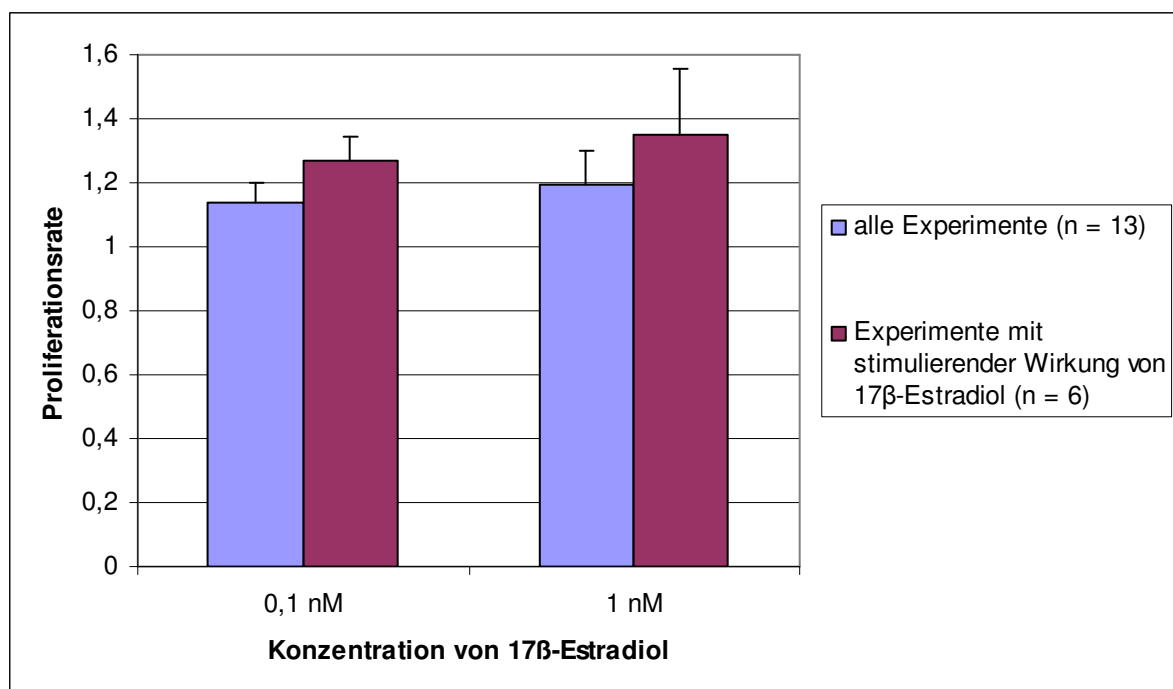
In weiteren Vorversuchen wurde überprüft, ob eine Reduktion der Wachstumsfaktoren im Nährmedium zu einer verstärkten Proliferationsförderung durch Östrogen führte. Die Hypothese war, dass das normale Nährmedium bereits Wachstumsfaktoren im Überschuss beinhaltet und daher keine zusätzliche Erhöhung der Proliferation durch Östrogen messbar sein würde. Zum Einsatz kamen hierbei für die im Labor isolierten und etablierten Melanozytenlinien das reduzierte MCDB-Medium und das Melanozyten-Wachstumsmedium mit 10% und 20% Zusätzen. Bei der Zelllinie MNTa6 wurde der FKS-Anteil im Nährmedium von 10% auf 1% reduziert oder ganz weggelassen. Es zeigte sich daraufhin ein deutlich höherer Anteil toter Zellen, jedoch keine zusätzliche Proliferationsförderung durch Östrogen, so dass in den weiteren Versuchsreihen nur Vollmedien zum Einsatz kamen.

3.2.2 Ergebnisse der Versuche

In den Versuchen wurden die Effekte von Östrogen, Gestagenen und Östrogen-Gestagen-Kombinationen auf die Melanozytenproliferation getestet und verglichen.

Östrogen wurde in Konzentrationen von 0,1 und 1 nM eingesetzt. Die Melanozytenproliferation stieg durch Zugabe von 0,1 nM Östrogen durchschnittlich um 14% und durch Zugabe von 1 nM Östrogen durchschnittlich um 19% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Ein proliferationsfördernder Effekt von Östrogen wurde in 6 von 13 Experimenten beobachtet. In diesen Versuchen wurde die Proliferation der Melanozyten durch 0,1 nM Östrogen durchschnittlich um 27%, durch 1 nM Östrogen um 35% erhöht (Abbildung 10).

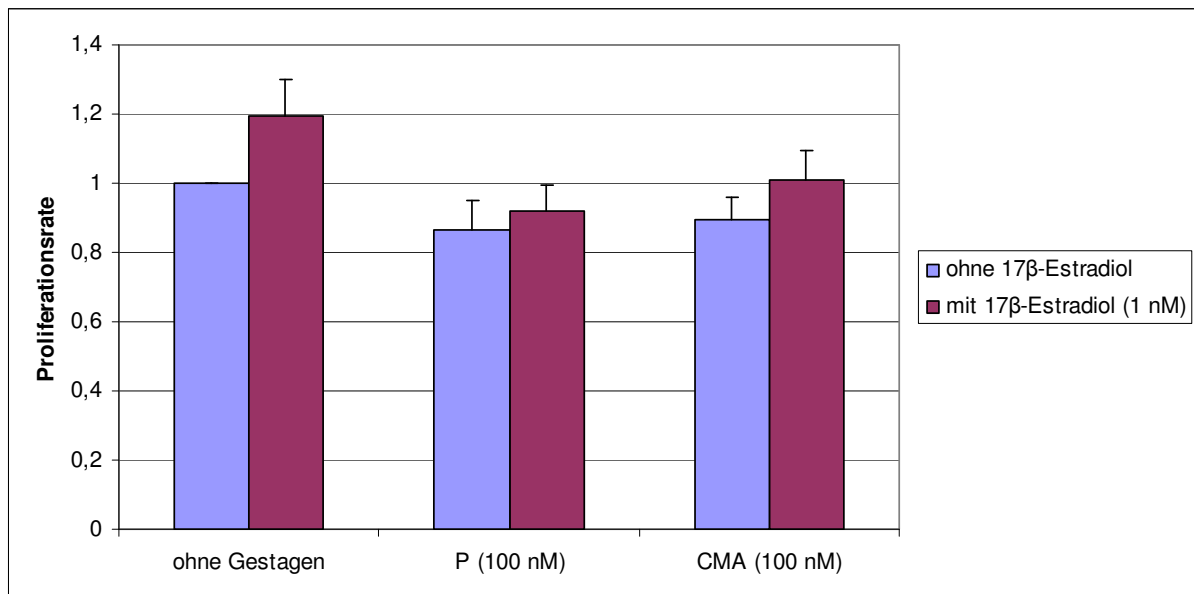
Abbildung 10: Wirkung von Östrogen auf die Proliferation humaner Melanozyten



Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler.

Um Wirkungen der Gestagene auf die Melanozyten zu evaluieren, wurden Progesteron und Chlormadinonacetat mit und ohne Zugabe von Östrogen eingesetzt. In Übereinstimmung mit der Literatur wurde eine Konzentration von 100 nM gewählt. Hierbei zeigte sich, dass Progesteron und Chlormadinonacetat jeweils einen Rückgang der Proliferation um durchschnittlich 13% beziehungsweise 11% des Kontrollwertes bewirkten. Durch Zugabe von Östrogen (0,1 nM und 1 nM) wurden die hemmenden Effekte der Gestagene teilweise kompensiert (Abbildung 11).

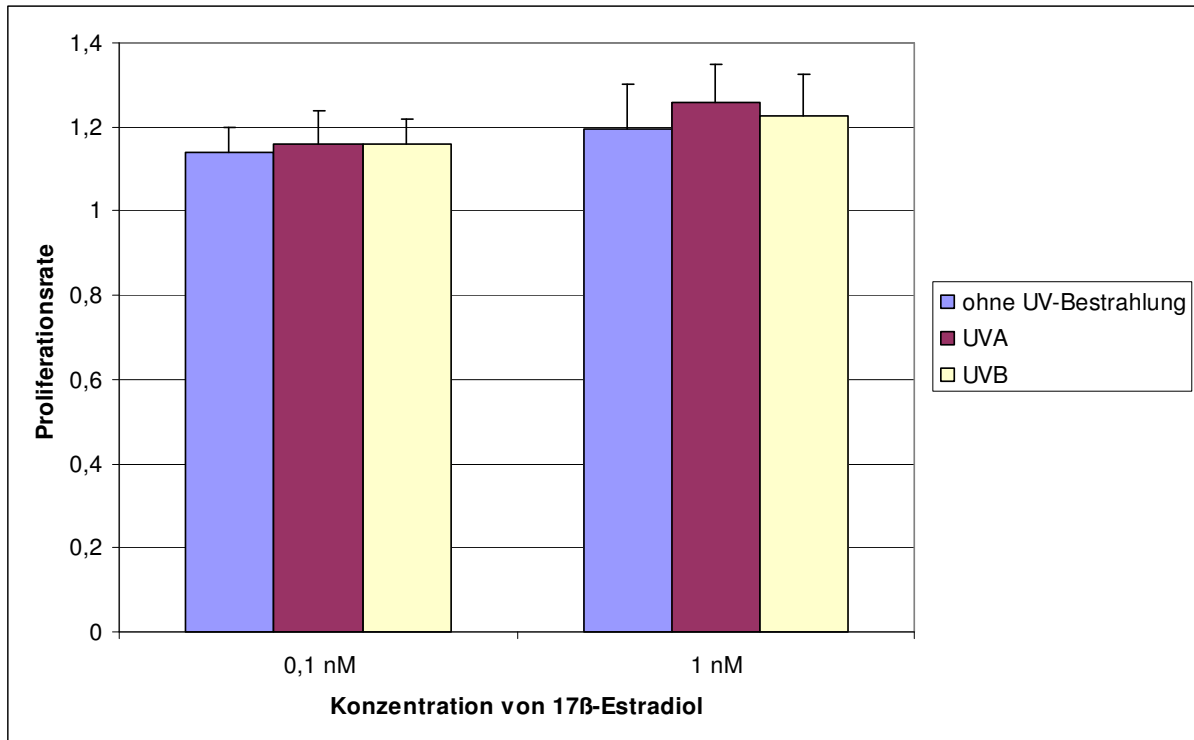
Abbildung 11: Wirkung der Gestagene Progesteron (P) und Chlormadinonacetat (CMA) auf die Proliferation humaner Melanozyten



Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler.

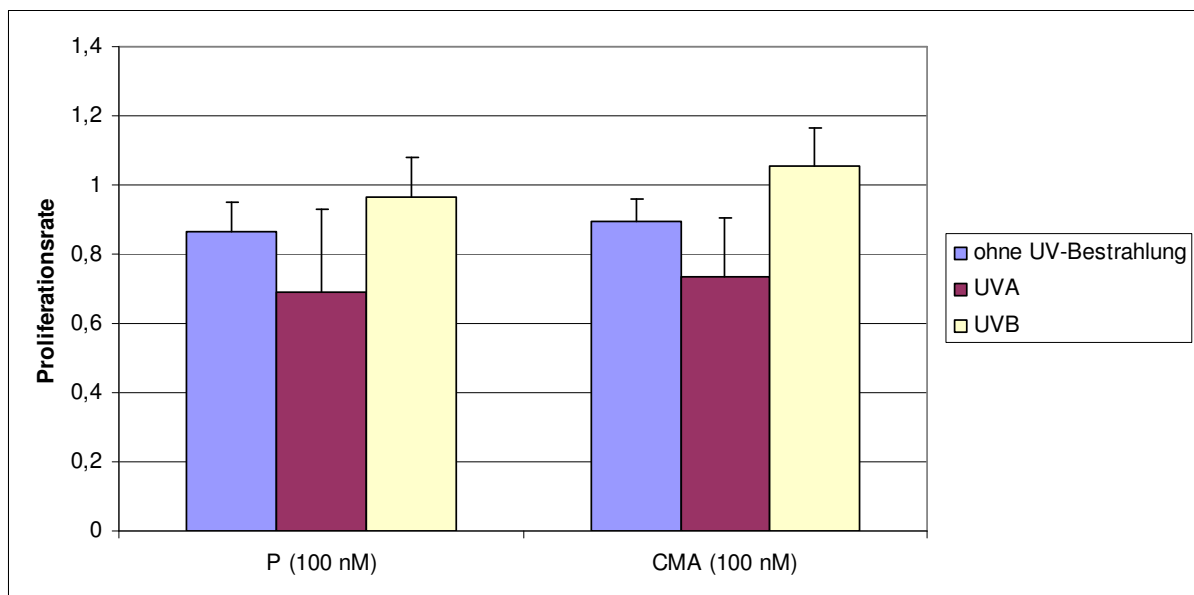
Zur Beurteilung der Rolle von ultraviolettem Licht wurden Melanozyten sowohl mit Hormonen als auch mit UVA (Gesamtdosis: 10 – 60 J/cm²) oder UVB (Gesamtdosis: 10 – 40 mJ/cm²) behandelt. Die Proliferation wurde durch Östrogen (0,1 nM und 1 nM) in unbestrahlten, UVA- und UVB-bestrahlten Melanozyten in einem ähnlichen Ausmaß gesteigert (Abbildung 12). Bei Zugabe von Progesteron (100 nM) oder Chlormadinonacetat (100 nM) dagegen gab es Unterschiede in den Proliferationsraten: Die Proliferation war am höchsten in UVB-bestrahlten Melanozyten und am niedrigsten in UVA-bestrahlten Melanozyten (Abbildung 13). Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die hemmenden Effekte der Gestagene wurden wiederum durch Zugabe von Östrogen aufgehoben.

Abbildung 12: Wirkung von Östrogen mit und ohne UV-Bestrahlung auf die Proliferation humaner Melanozyten



Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler.

Abbildung 13: Wirkung der Gestagene Progesteron (P) und Chlormadinonacetat (CMA) mit und ohne UV-Bestrahlung auf die Proliferation humaner Melanozyten



Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler.

In Varianzanalysen wurde bestätigt, dass zwischen den drei Subgruppen (keine UV-Bestrahlung, UVA und UVB) keine signifikanten Unterschiede bestanden [$F(16,14)=0,805$, sig. of $F=0,664$] und zwar für keine der experimentellen Bedingungen (univariate F-Tests, $p > 0,05$). Daher wurden die Daten aus insgesamt 25 Proliferationsassays mit 5 verschiedenen Melanozytenlinien (13 ohne UV-Bestrahlung, 4 mit UVA- und 8 mit UVB-Bestrahlung) für die weiteren statistischen Auswertungen zusammengefasst. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von Östrogen (0,1 nM und 1 nM) die Melanozytenproliferation um 15% beziehungsweise 22% steigerte. Diese Werte waren signifikant höher als der Referenzwert (Proliferation ohne Hormonzugabe). Die Behandlung mit Progesteron und Chlormadinonacetat (jeweils 100 nM) senkte die Proliferationsraten um 13% beziehungsweise 8%. Die Effekte der Gestagene waren jedoch nicht statistisch signifikant (Einstichproben-T-Test, $p > 0,05$). Einen Überblick über die normierten Proliferationswerte (Normierung über die Werte ohne Hormonzugabe) gibt Tabelle 5:

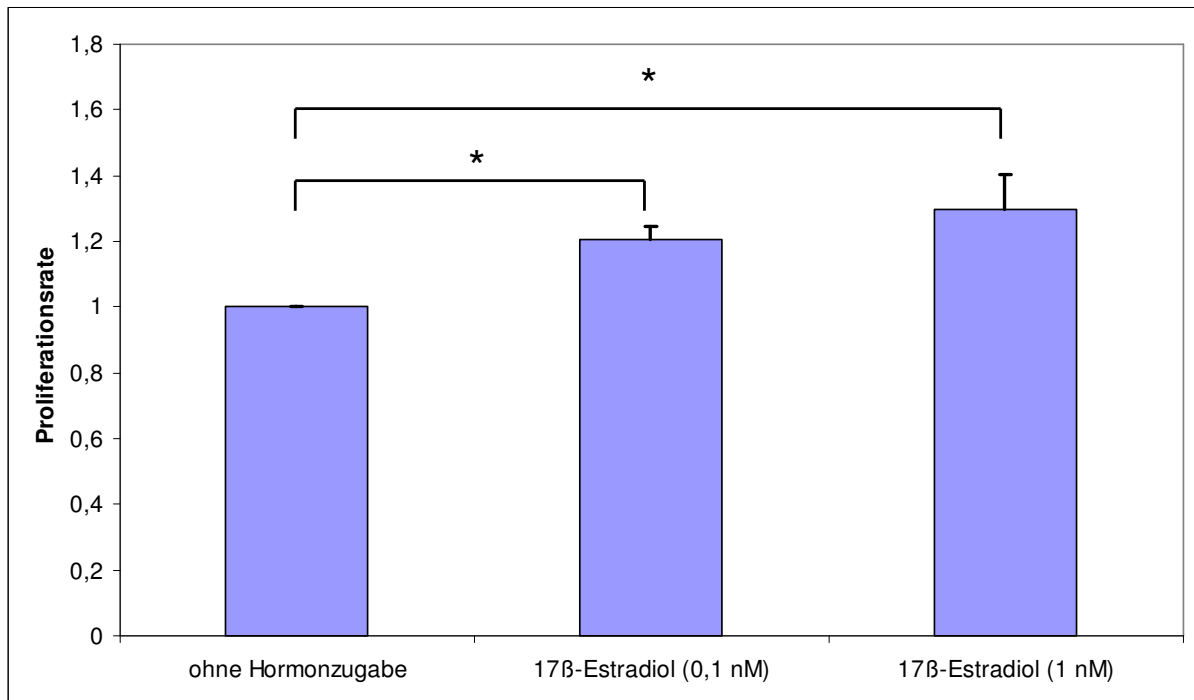
Tabelle 5: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat

	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>p</i>
Ohne Hormonzugabe	1	0	
0,1 nM Östrogen	1,15	0,038	0,001
1 nM Östrogen	1,22	0,063	0,002
100 nM Progesteron	0,87	0,067	0,063
100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen	0,88	0,087	0,192
100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen	0,95	0,080	0,546
100 nM Chlormadinonacetat	0,92	0,058	0,186
100 nM Chlormadinonacetat + 0,1 nM Östrogen	0,95	0,082	0,522
100 nM Chlormadinonacetat + 1 nM Östrogen	1,08	0,078	0,308

Auffällig war, dass Progesteron und Chlormadinonacetat in den Experimenten stärker hemmend wirkten, in denen auch die Melanozytenproliferation durch Östrogen stärker stimuliert werden konnte. Dies war in 12 (6 ohne UV-Bestrahlung, 3 mit UVA- und 3 mit UVB-Bestrahlung) von 25 Experimenten der Fall. Varianzanalysen bestätigten wiederum, dass es keine signifikanten Unterschiede in den drei Subgruppen gab [$F(16,2)=0,265$, sig. of $F=0,954$], für keine der experimentellen Bedingungen (univariate F-Tests, $p > 0,05$). Bei der Auswertung dieser 12 Versuche sind die Auswirkungen der einzelnen Hormone

ausgeprägter: Die Proliferation der Melanozyten wurde durch 0,1 nM Östrogen durchschnittlich um 20%, durch 1 nM Östrogen um 30% erhöht. Diese Werte waren wiederum signifikant höher als der Kontrollwert (Abbildung 14).

Abbildung 14: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen

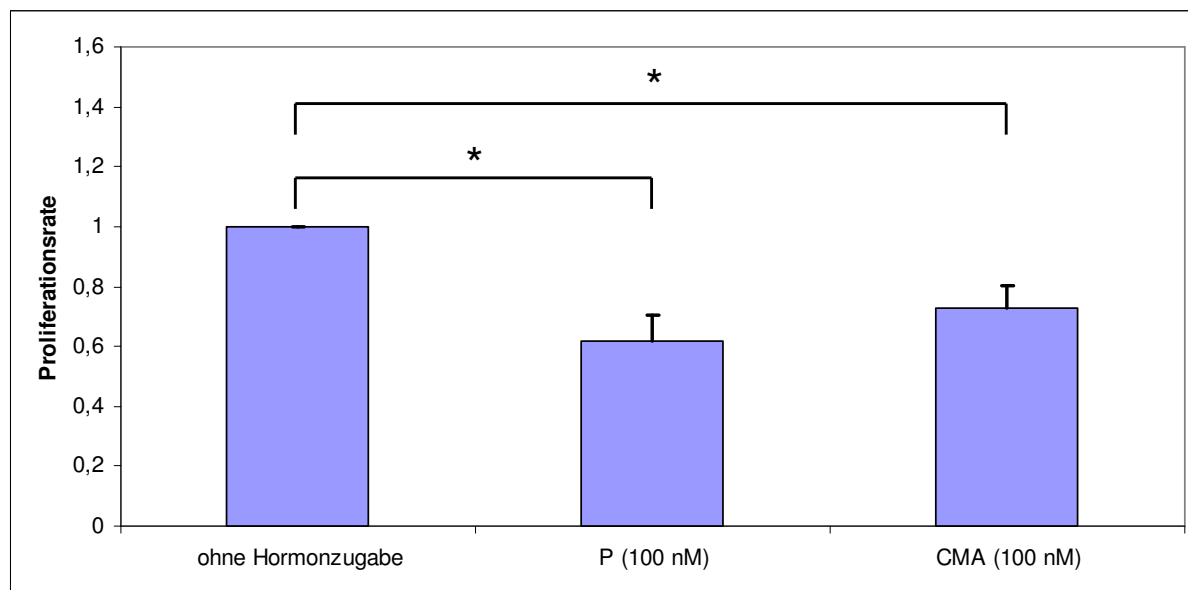


Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler. * für $p < 0,05$.

Bei Zugabe von 100 nM Progesteron sank die Proliferationsrate auf 62% des Referenzwerts, bei Zugabe von 100 nM Chlormadinonacetat auf 73% (Abbildung 15).

Diese statistisch signifikant hemmenden Effekte der Gestagene konnten durch Zugabe von Östrogen teilweise aufgehoben werden. Dennoch war die Proliferation sowohl unter Progesteron und 0,1 nM Östrogen, als auch unter Progesteron und 1 nM Östrogen immer noch signifikant niedriger als der Referenzwert. Dagegen waren die Proliferationswerte unter Chlormadinonacetat und 0,1 nM oder 1 nM Östrogen nicht mehr signifikant niedriger. Einen Überblick über die normierten Proliferationswerte (Normierung über die Werte ohne Hormonzugabe) gibt Tabelle 6.

Abbildung 15: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von den Gestagenen Progesteron (P) und Chlormadinonacetat (CMA)



Dargestellt sind Mittelwert + Standardfehler. * für $p < 0,05$.

Tabelle 6: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche, in denen Östrogen eine Proliferationssteigerung bewirkt hatte)

	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>p</i>
Ohne Hormonzugabe	1	0	
0,1 nM Östrogen	1,20	0,042	0,001
1 nM Östrogen	1,30	0,105	0,016
100 nM Progesteron	0,62	0,086	0,001
100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen	0,74	0,095	0,021
100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen	0,67	0,095	0,006
100 nM Chlormadinonacetat	0,73	0,073	0,004
100 nM Chlormadinonacetat + 0,1 nM Östrogen	0,84	0,101	0,145
100 nM Chlormadinonacetat + 1 nM Östrogen	0,89	0,094	0,256

In den experimentellen Versuchsreihen ohne UV-Bestrahlung innerhalb der getroffenen Auswahl (6 von 12 Versuchen) zeigten sich trotz vergleichbarer Proliferationswerte (Tabelle

7) nur noch signifikante Werte für 0,1 nM Östrogen und für 100 nM Progesteron, auch unter dem Zusatz von 1 nM Östrogen.

Tabelle 7: Proliferation von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche ohne UV-Bestrahlung)

	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>p</i>
Ohne Hormonzugabe	1	0	
0,1 nM Östrogen	1,27	0,075	0,023
1 nM Östrogen	1,35	0,207	0,152
100 nM Progesteron	0,65	0,119	0,033
100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen	0,75	0,135	0,139
100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen	0,71	0,068	0,008
100 nM Chlormadinonacetat	0,77	0,112	0,094
100 nM Chlormadinonacetat + 0,1 nM Östrogen	0,79	0,146	0,221
100 nM Chlormadinonacetat + 1 nM Östrogen	0,86	0,148	0,376

In Post-hoc Kontrasttests (Bonferroni-korrigiert) konnte gezeigt werden, dass sich die experimentellen Bedingungen in allen Gruppen signifikant voneinander unterschieden (alle Versuche: $F(7,169)=3,38$, sig. of $F=0,021$; Auswahl der Versuche mit Förderung durch Östrogen: $F(7,85)=7,92$, sig. of $F<0,0001$; Auswahl der Versuche mit Förderung durch Östrogen und ohne UV-Bestrahlung: $F(7,37)=3,86$, sig. of $F=0,0030$). Die Bedingungen unterschieden sich dabei am stärksten und häufigsten bei der Auswahl derjenigen Versuche, in denen Östrogen eine Förderung der Melanozytenproliferation bewirkt hatte: In diesen Fällen waren die normierten Proliferations-Mittelwerte unter Chlormadinonacetat, Progesteron und der Kombination aus Progesteron und Östrogen (0,1 und 1 nM) signifikant niedriger als unter 0,1 nM Östrogen. Im Vergleich zu 1 nM Östrogen waren sogar die Proliferations-Mittelwerte unter Chlormadinonacetat, Progesteron und allen Östrogen-Gestagen-Kombinationen signifikant niedriger.

Insgesamt wurden somit hemmende Effekte von Progesteron und Chlormadinonacetat eher in den Experimenten beobachtet, in denen die Melanozytenproliferation durch Östrogen gesteigert werden konnte.

3.3 3H-Tyrosin-Assay

Durch den 3H-Tyrosin-Assay wurden stimulierende und hemmende Effekte der verschiedenen Hormone auf die Aktivität der Tyrosinase, die das Schlüsselenzym der Pigmentbildung ist, beurteilt.

Insgesamt wurden 20 Experimente mit 4 verschiedenen Melanozytenlinien ausgewertet, die aufgrund identischer Östrogen- und Gestagenkonzentrationen im Versuchsaufbau vergleichbar waren.

Die Tyrosinaseaktivität der Melanozyten stieg unter 0,1 nM Östrogen durchschnittlich um 8% und unter 1 nM Östrogen um etwa 16% an. Diese Effekte waren statistisch jedoch nicht signifikant. Bei Zugabe von Progesteron in einer Konzentration von 100 nM oder auch Östrogen-Progesteron-Kombinationen glichen die Werte denen der Referenzsituation. Chlormadinonacetat in einer Konzentration von 100 nM wirkte fördernd auf die Tyrosinaseaktivität, allerdings ließ sich auch dieser Effekt statistisch nicht belegen.

Analog zur Auswertung der Proliferationsassays wurden auch bei den 3H-Tyrosin-Assays diejenigen 10 Versuche gesondert betrachtet, in denen Östrogen die Tyrosinaseaktivität der Melanozyten stimuliert hatte. Durch Zugabe von 0,1 nM Östrogen wurde die Tyrosinaseaktivität durchschnittlich um 16%, durch 1 nM Östrogen um 34% erhöht. Dieser Anstieg war bei 0,1 nM Östrogen statistisch signifikant, bei 1 nM Östrogen grenzwertig signifikant. Bezüglich der Wirkungen der Gestagene ergaben sich keine eindeutigen Veränderungen. Einen Überblick über die normierten Werte für die Tyrosinaseaktivität (Normierung über die Werte ohne Hormonzugabe) gibt Tabelle 8.

In den Versuchsreihen mit zusätzlicher UVB-Bestrahlung innerhalb der getroffenen Auswahl (5 von 10 Versuchen) war die Tyrosinaseaktivität unter Zugabe von 100 nM Progesteron am niedrigsten (Tabelle 9). Allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant.

Tabelle 8: Tyrosinaseaktivität von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche, in denen Östrogen eine Steigerung der Tyrosinaseaktivität bewirkt hatte)

	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>p</i>
Ohne Hormonzugabe	1	0	
0,1 nM Östrogen	1,16	0,042	0,009
1 nM Östrogen	1,34	0,153	0,054
100 nM Progesteron	0,97	0,134	0,834
100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen	1,13	0,150	0,410
100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen	0,99	0,084	0,908
100 nM Chlormadinonacetat	1,15	0,101	0,166
100 nM Chlormadinonacetat + 0,1 nM Östrogen	1,13	0,141	0,408
100 nM Chlormadinonacetat + 1 nM Östrogen	1,17	0,107	0,148

Tabelle 9: Tyrosinaseaktivität von Melanozyten in Abhängigkeit von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat (Subgruppe der Versuche mit UVB-Bestrahlung)

	<i>Mittelwert</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>p</i>
Ohne Hormonzugabe	1	0	
0,1 nM Östrogen	1,18	0,103	0,219
1 nM Östrogen	1,23	0,111	0,102
100 nM Progesteron	0,78	0,138	0,179
100 nM Progesteron + 0,1 nM Östrogen	1,03	0,283	0,927
100 nM Progesteron + 1 nM Östrogen	0,80	0,105	0,134
100 nM Chlormadinonacetat	1,06	0,177	0,749
100 nM Chlormadinonacetat + 0,1 nM Östrogen	0,93	0,316	0,854
100 nM Chlormadinonacetat + 1 nM Östrogen	1,19	0,224	0,449

Die einfaktorielle Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Insgesamt ließen sich somit weder fördernde noch hemmende Effekte von Östrogen und den Gestagenen Progesteron und Chlormadinonacetat auf die Tyrosinaseaktivität der Melanozyten belegen.

3.4 Messung des Melaningehalts

Die Messung des Melaningehalts stellt neben der Aktivität der Tyrosinase eine Möglichkeit dar, die Effekte der verschiedenen Hormone auf die Pigmentbildung zu beurteilen.

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es, eine geeignete Wellenlänge für die spektralphotometrische Bestimmung des Melaningehalts festzulegen. In der Literatur fanden sich diesbezüglich sehr unterschiedliche Angaben. Folgende Wellenlängen wurden in den Vorversuchen ausgetestet: 405 nm, 470 nm, 475 nm und 500 nm. Gut übereinstimmende Doppelwerte zeigten sich bei 405 nm sowie bei 475 nm, so dass diese Wellenlängen in den weiteren Versuchen Verwendung fanden.

Im nächsten Schritt wurde versucht, eine möglichst lineare Eichgerade zu erhalten. Hierfür wurden unterschiedliche Probengrößen (200 µl und 500 µl) jeweils bei den Wellenlängen 405 nm und 475 nm gemessen. Die Messungen mit 500 µl Probe ergaben deutlich linearer verlaufende Eichgeraden als die Messungen mit 200 µl Probe.

Die Eichgerade für 405 nm war bei geringer Melaninkonzentration günstiger, während die Eichgerade für 475 nm bei höherer Melaninkonzentration genauere Messwerte lieferte (Abbildungen 16 und 17). Daher wurden alle Messungen sowohl bei 405 nm als auch bei 475 nm durchgeführt.

Abbildung 16: Einzeldarstellung von drei typischen Eichkurven bei 405 nm Wellenlänge

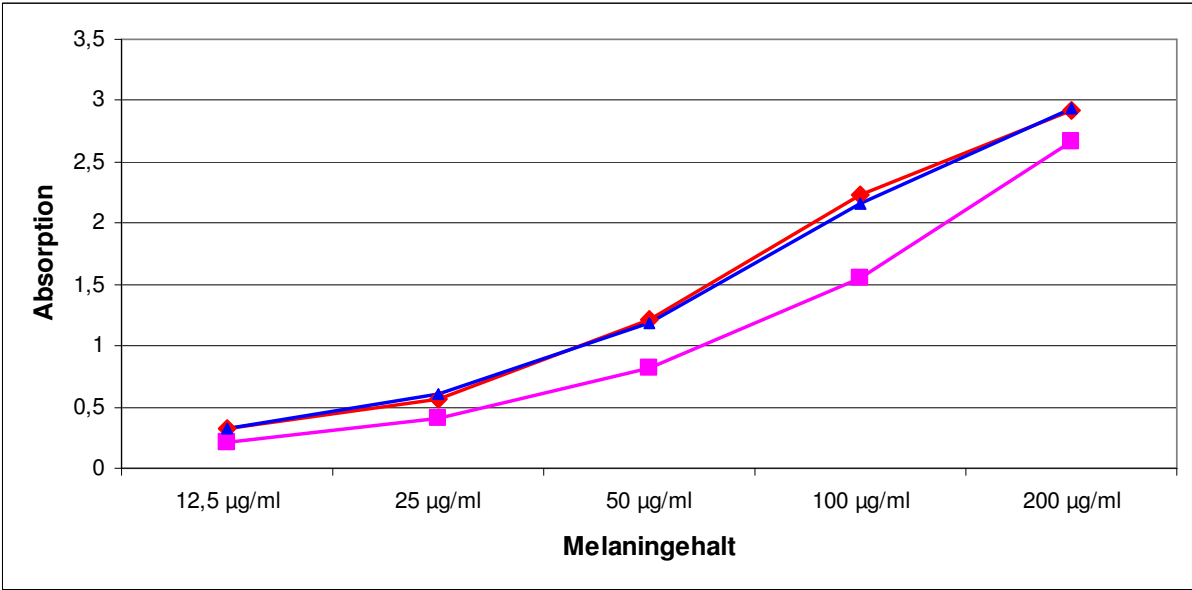
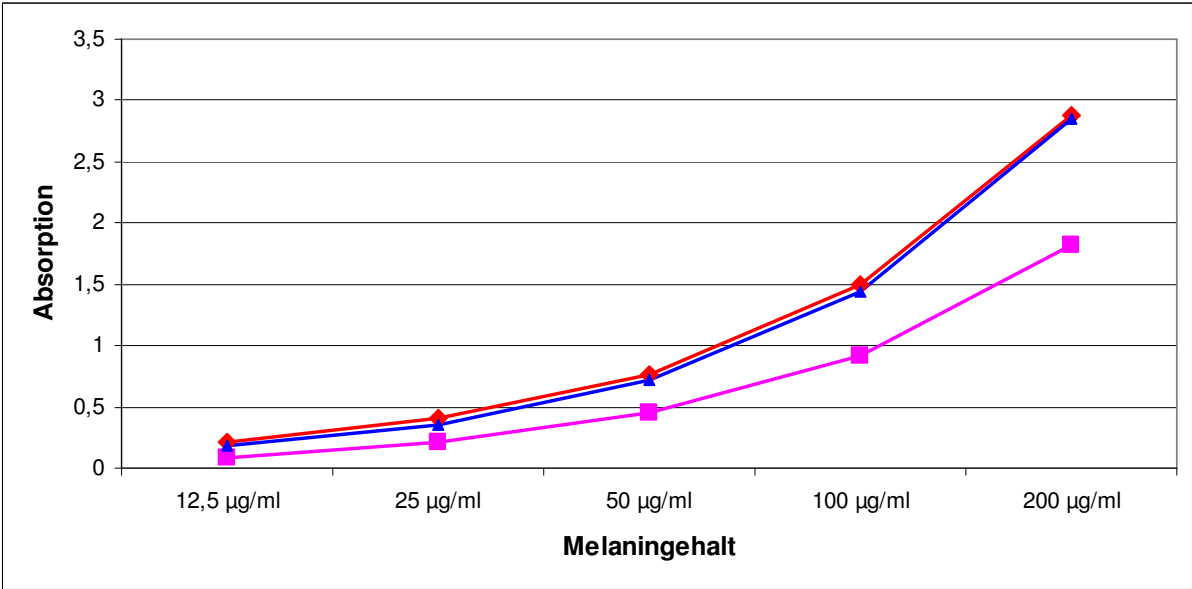


Abbildung 17: Einzeldarstellung von drei typischen Eichkurven bei 475 nm Wellenlänge



3.4.2 Ergebnisse der Versuche

Eine Erhöhung des Melaningehalts durch Östrogen ließ sich bei diesem Test nur in 9 von insgesamt 25 Versuchen beobachten. In diesen 9 Versuchen stimmten die Messungen bei 405 nm und 475 nm nur in 4 Fällen überein. Dieses Problem ergab sich auch bei der Beurteilung eines eventuellen Effektes der Gestagene. Daher wurde beschlossen, hormonelle Effekte auf die Pigmentbildung ausschließlich über die Aktivität der Tyrosinase zu beurteilen.

4 Diskussion

4.1 Die Wirkung von Östrogen und Gestagenen auf Melanozyten

In dieser Studie wurden die Effekte von Östrogen, Progesteron und Chlormadinonacetat auf die Proliferation und Pigmentbildung von humanen Melanozyten untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Östrogen führte zu einer signifikanten Förderung der Proliferation.
2. In den Versuchen, in denen Östrogen eine Förderung der Proliferation bewirkt hatte, führten sowohl Progesteron als auch Chlormadinonacetat jeweils zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation.
3. Östrogen führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Tyrosinaseaktivität.
4. Sowohl Progesteron als auch Chlormadinonacetat hatten keine signifikanten Effekte auf die Tyrosinaseaktivität.

Hieraus kann man schließen, dass das reduzierte Auftreten von Melasma möglicherweise eher durch eine Verminderung der Proliferation der Melanozyten und weniger durch eine Modulation der Tyrosinaseaktivität in den Melanozyten vermittelt wird.

Bereits früh wurde erkannt, dass humane Melanozyten auf eine Vielzahl hormoneller Reize reagieren können [77]. K. Maeda et al. [59] wiesen nach, dass eine Inkubation mit hypophysären und ovariellen Hormonen zu einer Veränderung in der Morphologie von humanen Melanozyten führte: Sie wurden größer und bildeten mehr Dendriten aus. Die Hypophysenhormone Melanozyten stimulierendes Hormon (β -MSH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) erhöhten außerdem die Aktivität von Enzymen der Melaninsynthese: Tyrosinase und TRP-1. Unter dem Einfluss der ovariellen Hormone Estradiol, Estriol und Progesteron kam es dagegen nur zu einem Anstieg von TRP-1.

Die Effekte von Östrogen auf humane Melanozyten in vitro wurden 1994 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen publiziert. Es ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse: S. H. Jee et al. [47] beobachteten, dass Östrogen in einer Konzentration von 1 pM bis 1 nM die Zellproliferation förderte, jedoch zu einer Abnahme sowohl des Melaningehaltes als auch der Tyrosinaseaktivität in Melanozyten führte. Im Gegensatz dazu wiesen S. D. McLeod et al. [60] unter ähnlichen Östrogen-Konzentrationen (10 pM – 1 nM) eine signifikante Erhöhung der Tyrosinaseaktivität und des Melaningehaltes nach. Bei Erhöhung der Tyrosinaseaktivität kam es zu einer Abnahme der Zellzahl. Später wurde von Im et al. gezeigt, dass das

Ansprechen auf Steroidhormone spenderabhängig ist [42]: Bei Melanozyten von einem Teil der Spender (drei von acht) bewirkten Östrogen und Progesteron in Konzentrationen von 1 nM und 100 nM eine Steigerung sowohl der Zellzahl als auch der Tyrosinaseaktivität, während Melanozyten anderer Spender keinerlei Veränderungen aufwiesen. Interessanterweise waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den physiologischerweise vorliegenden Konzentrationen (1 nM) und denen während einer Schwangerschaft (100 nM) nachzuweisen.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Wirkungen des Östrogens stimmen weitestgehend mit den Berichten aus der Literatur überein: Wir konnten in etwa der Hälfte der Experimente einen fördernden Einfluss von Östrogen (0,1 nM und 1 nM) auf die Proliferation oder die Tyrosinaseaktivität nachweisen. Dabei war wiederum in etwa der Hälfte dieser Experimente eine Förderung sowohl der Proliferation als auch der Tyrosinaseaktivität erkennbar, während in den restlichen Experimenten entweder die Proliferation oder die Tyrosinaseaktivität stimuliert wurde.

Überraschend und abweichend zu unseren Befunden ist, dass Progesteron in der Studie von Im et al. einen fördernden Effekt auf die Proliferation und Tyrosinaseaktivität hatte, während es in unseren Experimenten unter der gleichen Konzentration (100 nM) zu einer starken Hemmung der Proliferation kam und sich kein Effekt auf die Tyrosinaseaktivität zeigte. Über den Einfluss von Progesteron auf Melanozyten existiert insgesamt nur wenig Literatur: K. Maeda et al. [59] zeigten, dass Progesteron zu einem Anstieg von TRP-1 führt, jedoch nicht zu einer Erhöhung der Tyrosinaseaktivität. A. M. Hall et al. [39] stellten ebenfalls keine Veränderung der Tyrosinaseaktivität fest, jedoch eine deutliche Abnahme des Melaningehalts. Ferner hat Progesteron keinen Einfluss auf die Genexpression des Melanocortin-1-Rezeptors auf Melanozyten [87] – dieser gilt als einer der Schlüsselrezeptoren für die Melaninsynthese, da bei Aktivierung dieses Rezeptors, die durch α -MSH, ACTH oder auch ultraviolettes Licht erfolgt, die Melanozytenproliferation und die Eumelanogenese gesteigert wird [1].

Über Einflüsse von Chlormadinonacetat auf Melanozyten gibt es keine Daten. Die von uns erhobenen Ergebnisse zeigen erstmals einen hemmenden Einfluss von Chlormadinonacetat auf die Proliferation von Melanozyten, jedoch keine signifikante Beeinflussung der Tyrosinaseaktivität. Diese Wirkungen gleichen denen des Progesterons, was angesichts der Tatsache, dass Chlormadinonacetat ein Derivat des Progesterons ist, auch plausibel ist. Auffallend hierbei ist jedoch, dass Chlormadinonacetat insgesamt weniger stark hemmend zu wirken scheint als Progesteron: Die Proliferation wird durch Chlormadinonacetat durchschnittlich auf etwa 73% des Referenzwertes gesenkt, durch Progesteron auf 62%.

Bezüglich der Tyrosinaseaktivität liegen die mit Progesteron behandelten Zellen knapp unterhalb von 100%, die mit Chlormadinonacetat behandelten Zellen dagegen stets über 100%. Abgesehen von einer Studie über Cyproteronacetat sind in der Literatur keinerlei Daten zu Effekten von Gestagenen auf humane Melanozyten zu finden. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass eine durch Androgene ausgelöste Stimulation der Tyrosinaseaktivität in genitalen Melanozyten durch Cyproteronacetat antagonisiert werden kann [94]. Dies bestätigt, dass bestimmte Gestagene auf die Pigmentbildung Einfluss nehmen können.

Östrogen, Progesteron und Chlormadinonacetat zählen zu den Steroidhormonen, die über Steroidrezeptoren ihre Wirkung ausüben. Die Steroidrezeptoren sind intrazelluläre Rezeptoren, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zählen. Humane Melanozyten besitzen sowohl Östrogen- als auch Progesteron-Rezeptoren [42]. Es wurden zwei verschiedene Subtypen von Östrogenrezeptoren identifiziert: ER- α und ER- β . Diese sitzen im Zytosol und wandern nach ihrer Aktivierung in den Zellkern. Hier binden sie an spezifische DNS-Sequenzen und induzieren die Transkription von DNS in mRNS. Daneben gibt es den transmembranösen G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR30, der intrazelluläre Signalkaskaden, beispielsweise über Kinasen oder Adenylatzyklen, aktiviert [112]. Dies geschieht innerhalb von Sekunden bis Minuten, während die über den genomischen Signalweg induzierten Effekte erst nach Stunden auftreten [74]. Über welchen Östrogenrezeptor-Subtyp die beschriebenen Wirkungen in den Melanozyten vermittelt werden, ist bislang nicht untersucht worden. Möglicherweise spielt auch die Verteilung der Rezeptor-Subtypen in der Haut eine Rolle. Während ER- β ubiquitär in verschiedenen Hautzellen vorkommt, wurde ER- α vor allem in Anhangsgebilden der Haut nachgewiesen [70,99].

4.2 Vergleich verschiedener experimenteller Ansätze

4.2.1 Auswahl der Zellen

Für unsere Experimente wurden dunkel pigmentierte Melanozyten verwendet. Die Auswahl erfolgte nach dem äußeren Aspekt der Hautprobe sowie der Farbe des Zellpellets. Ein Vorteil von dunklen Melanozyten ist, dass sie sich wesentlich schneller als helle Melanozyten nach UV-Bestrahlung erholen und wieder proliferativ aktiv werden [11]. Bei Bestrahlung mit UVB haben dunkle Melanozyten außerdem einen eindeutigen Überlebensvorteil, während

nach UVA-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede zwischen hellen und dunklen Melanozyten eruierbar sind [23].

In den meisten publizierten Studien wurden wie in unseren Experimenten primär gezüchtete Melanozyten eingesetzt. Ein Nachteil des Gebrauchs dieser Melanozyten ist jedoch, dass sich mit jeder Zellteilung das Proliferationsverhalten ändert: Z. A. Abdel-Malek et al. [5] stellten bei Melanozyten erwachsener Spender einen drastischen Rückgang der Proliferationsraten nach einigen Passagen fest (natürliche Seneszenz).

1999 wurde ein Protokoll namens STOPR (standardized testing of pigmentation regulators) vorgestellt, das immortalisierte Melan-A-positive Melanozyten für die Untersuchung von Effekten auf die Melanozytenproliferation und –differenzierung verwendete [105]. Laut den Autoren sind primäre Melanozyten aufgrund ihrer eingeschränkten Proliferationsfähigkeit weniger gut für In-vitro-Studien geeignet als immortalisierte Melanozyten. Allerdings ist die Immortalisierung selbst eine genetisch bedingte Veränderung, die wiederum von der Realität mehr abweicht als die natürliche Seneszenz.

4.2.2 Bedingungen in der Zellkultur

Die aus menschlichem Hautgewebe selbst isolierten Zellen wurden in unseren Experimenten beim ersten Mediumwechsel auf das Melanozyten-Wachstumsmedium umgesetzt. Dieses enthält die Substanz 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), synonym auch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), in einer Konzentration von 10 ng/ml. Dies ist die optimale TPA/PMA-Dosis zur Förderung des Melanozytenwachstums [8].

Ein Vorteil von TPA-/PMA-haltigen Nährmedien ist die nahezu komplette Inhibierung von Fibroblastenwachstum, welches bei der Kulturetablierung ein Problem darstellen kann. Für Pigmentierungsstudien nachteilig ist, dass die Substanz TPA/PMA an sich bereits einen Einfluss auf die Pigmentierung hat. In verschiedenen Studien bewirkte sie neben der Erhöhung der Melanozytenzahl [19] eine Stimulation der Tyrosinaseaktivität [3] sowie bei höheren Konzentrationen eine starke Vergrößerung der Melanozyten auf das 3-10fache der Norm mit teilweise unregelmäßiger Zellform [21]. Da jedoch in der vorgestellten Arbeit alle Zellen gleichermaßen in TPA-/PMA-haltigem Nährmedium kultiviert wurden und Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt wurden, sehen wir hierin keine Beeinflussung unserer Ergebnisse.

Einen Einfluss auf die Pigmentierung kann auch die Beschichtung der Zellkulturschale haben: M. Ranson et al. [76] kultivierten Melanozyten auf mit extrazellulärer Matrix

beschichteten Oberflächen. Diese extrazelluläre Matrix sollte die Basalmembran imitieren, an der epidermale Melanozyten physiologischerweise verankert sind. Auf diese Weise kultivierte Melanozyten entwickelten größere Zellkörper und produzierten mehr Melanin als Melanozyten, die auf unbeschichteten Oberflächen kultiviert wurden. In Anwesenheit von TPA/PMA und Cholera toxin wurde zusätzlich die Replikationsrate der Melanozyten gesteigert. In unseren Experimenten kamen jedoch nur unbeschichtete Zellkulturflaschen zum Einsatz, so dass ein Einfluss von Oberflächen-Faktoren auf die Proliferation und Tyrosinaseaktivität der Melanozyten ausgeschlossen ist.

4.2.3 Effekte der UV-Bestrahlung auf Melanozyten

Es gibt eine Vielzahl von Studien über den Einfluss von ultravioletter Strahlung. Bereits 1987 stellte man an Melanozyten nach UVB-Bestrahlung die gleichen morphologischen Veränderungen wie nach Sonnenlichtexposition fest: Die Zellen bildeten mehr Dendriten aus und die Zahl der Melanosomen sowie deren Melanisierung nahmen zu [28]. A. Ramirez-Bosca et al. [75] bemerkten eine dosisabhängige Abnahme der Zellzahl, jedoch eine Zunahme der Tyrosinaseaktivität und des Melaningehalts nach UV-Bestrahlung. N. S. Dissanayake et al. [24] wiesen diese Effekte sowohl bei kombinierter Bestrahlung mit UVA und UVB als auch bei reiner UVA-Bestrahlung nach und K. Nakazawa et al. [67] sogar bereits bei Einwirkung von Wärme (42°C). Die UVB-Bestrahlung führte außerdem zum Wachstumsstillstand und einer morphologisch sichtbaren Alterung der Melanozyten [2]. Y. Funasaka et al. [31] gelang die Identifizierung des Mechanismus, über den UVB zu einer verstärkten Pigmentierung führt: UVB bewirkt eine vermehrte Genexpression des Melanocortin-1-Rezeptors und somit eine erhöhte Bindungsaktivität des MSH-Rezeptors. In dem Großteil unserer Experimente blieben die Zellen unbestrahlt, in insgesamt vier Versuchsreihen erfolgte eine UVA- und in neun Versuchen eine UVB-Bestrahlung. In der statistischen Auswertung wurden alle Experimente zusammengefasst, da die Werte innerhalb eines Experimentes jeweils in Relation zu dem Wert ohne Hormonzugabe gesetzt wurden und durch Normierung der Einzelexperimente fördernde oder hemmende Effekte der UV-Bestrahlung als Einflussfaktor nicht mehr ins Gewicht fielen.

4.2.4 Vorrang verschiedener Testmethoden zur Beurteilung der Proliferation und Pigmentbildungsfähigkeit

In vielen der zuvor genannten Veröffentlichungen [19, 24, 42, 47, 60, 75] wurde zur Beurteilung der Melanozytenproliferation lediglich die Zellzahl bestimmt. Im Gegensatz dazu wendeten V. M. Virador et al. [105] in ihrem Protokoll STOPR den MTT-Assay an, der auch von Q. X. Xu et al. [108] sowie von L. Yang und Y. Deng [110] für ihre jeweiligen Melanozyten-Studien benutzt wurde. In diesem Assay wird das gelbe Tetrazoliumsals MTT in einen blau- bis violettfarbenen Formazanfarbstoff umgesetzt, wobei die Menge der Umsetzung mit der Zahl gesunder Zellen korreliert. Die Absorption des Formazanfarbstoffes wird durch Messung bei einer bestimmten Wellenlänge spektralphotometrisch quantifiziert [64]. Abgesehen von diesem gibt es eine Vielzahl weiterer kommerziell erhältlicher Assays zur Bestimmung der Zellzahl: Radioaktive Assays wie etwa bei K. Reid et al. [81] beschrieben werden heutzutage seltener angewendet, im Vordergrund stehen colorimetrische, fluorimetrische und luminometrische Methoden.

Für unsere Untersuchungen setzten wir den Proliferationsassay CellTiter-Blue™ ein. Dieser fluorimetrische Assay bot neben einer sehr einfachen Handhabung und ausgezeichneten Sensitivität den zusätzlichen Vorteil, dass die Zellvitalität erhalten blieb.

Die gängigsten Assays zur Bestimmung der Tyrosinaseaktivität arbeiten mit Radioaktivität. In einem 1964 von S. H. Pomerantz vorgestellten Assay wurde ³H-Tyrosin eingesetzt, um über die Bildung von ³H-markiertem Wasser, das bei dem ersten Schritt der Melanogenese (Hydroxylierung von Tyrosin zu Dopa) anfällt, die Tyrosinaseaktivität quantifizieren zu können. Die Messung von ³H-markiertem Wasser ist wesentlich einfacher als die Messung von ³H-markiertem Dopa und sehr zuverlässig, weil beide Substanzen ziemlich genau im Verhältnis 1:1 entstehen [72]. Etwa zur gleichen Zeit wurde ein weiterer radioaktiver Assay entwickelt, in dem ¹⁴C-Tyrosin eingesetzt wurde. Dieser misst die Bildung von radioaktivem Melanin und Melaninvorstufen. Beide Assays weisen Vor- und Nachteile auf [40]: Beim ³H-Tyrosin-Assay ist unter anderem eine hohe Hintergrundaktivität unvermeidbar, was insbesondere bei niedriger Tyrosinaseaktivität ein Problem ist. Vorteilhaft an diesem Assay sind jedoch seine hohe Sensitivität und die direkte Messung der Tyrosinaseaktivität. Letzteres ist beim ¹⁴C-Tyrosin-Assay nicht möglich, jedoch ist die Hintergrundaktivität viel geringer als beim ³H-Tyrosin-Assay.

Abgesehen von radioaktiven Assays nutzten andere Autoren für ihre Melanozyten-Studien auch Färbungen [111] oder spektralphotometrische Methoden [22, 43, 57, 59].

Wir entschieden uns für den 3H-Tyrosin-Assay, da dieser auch in der Mehrzahl der Veröffentlichungen, die unseren Versuchen zugrunde lagen [42, 47, 60, 77] angewendet worden war. Da wir für die Experimente möglichst dunkel pigmentierte Zellen einsetzten und ein Nährmedium verwendeten, das die Pigmentbildung förderte, war die Tyrosinaseaktivität hoch und somit auch die hohe Hintergrundaktivität des 3H-Tyrosin-Assays vertretbar.

4.3 Ausblick

4.3.1 Cokulturen und Hautäquivalente

Für Melanozyten-Monokulturen konnten wir signifikant hemmende Effekte der Gestagene bezüglich der Zellproliferation nachweisen. Eine interessante Frage wäre nun, welche Auswirkungen sich in anderen Zellkultur-Modellen wie etwa Cokulturen oder Hautäquivalenten, die dem realen Aufbau der Haut noch mehr entsprechen, zeigen.

Der Grad und die Qualität der Pigmentierung werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die aber nicht nur von den Melanozyten abhängen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Einflussfaktoren auf die Pigmentierung (nach [109])

Embryonale Entwicklung der Melanoblasten
Überleben und Differenzierung von Melanozyten
Melanozytendichte
Aufbau und Funktion der Melanosomen
Melaninsynthese: Substratverfügbarkeit, Enzymaktivität, Strukturbindungsproteine
Transport der Melanosomen in die Dendriten
Aufnahme der Melanosomen durch Keratinozyten
Verteilung von Melanin in der Haut

Über Cokultursysteme mit Melanozyten und Keratinozyten existieren zahlreiche Studien. In diesen wurde ersichtlich, dass Keratinozyten eine essenzielle Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung der Melanozyten spielen [25]. Auch kontrollieren Keratinozyten das Verhältnis von Phäomelanin zu Eumelanin – dieses verschiebt sich bei

Melanozyten-Monokulturen zuungunsten des Eumelanins, das jedoch physiologischerweise das Hauptprodukt der Melanogenese ist [27].

Bekannte Modulatoren der Melanogenese sollten daher in der Cokultur untersucht werden [79]. Das Protokoll STOPR, das eine standardisierte Untersuchung von Regulatoren der Pigmentierung ermöglichen soll, wurde unter 4.2.1 erwähnt. In der Zwischenzeit gibt es eine Erweiterung dieses Protokolls für die Cokultur von Melanozyten und Keratinozyten [55].

Bereits 1995 wurde festgestellt, dass lösliche Faktoren, die von Keratinozyten sezerniert werden, die Dendritenzahl der Melanozyten sowie die Anzahl der Zell-Zell-Kontakte zwischen diesen erhöhen [97].

M. Seiberg et al. [90] bewiesen, dass der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2) über Interaktionen zwischen Keratinozyten und Melanozyten Einfluss auf die Pigmentierung nimmt. Interessanterweise sind die Genexpression und die Aktivität von PAR-2 in dunkel pigmentierter Haut höher [9]. Für die Aktivierung oder Inhibierung dieses Rezeptors, der auf Keratinozyten exprimiert wird, sind direkte Zell-Zell-Kontakte mit Melanozyten erforderlich. Modulationen an diesem Rezeptor führen zu einer Beeinflussung des Melanosomen-Transfers in Keratinozyten [89]. Es zeigte sich, dass die Expression des Rezeptors bei UV-Bestrahlung hochreguliert wird [86] und zu einer verstärkten Aufnahme von Melanosomen in die Keratinozyten führt [17]. Eine wichtige Rolle für die Induktion des Melanosomentransfers spielt der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) [20].

Ein Schlüsselrezeptor bei der Melaninsynthese ist der transmembranöse G-Proteingekoppelte Melanocortin-1-Rezeptor an der Oberfläche von Melanozyten [85]. Bei Aktivierung dieses Rezeptors durch α -MSH und ACTH kommt es zu einer vermehrten Eumelaninsynthese. Antagonistisch an diesem Rezeptor wirkt das Agouti-Signalprotein (ASP), das zu einer gesteigerten Phäomelaninsynthese führt [109]. Die Agonisten α -MSH und ACTH entstehen aus dem Proopiomelanocortin (POMC) in Keratinozyten [83] als Reaktion auf UV-Bestrahlung [92]. Nach Bindung an den Melanocortin-1-Rezeptor kommt es zu einer Erhöhung an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch die Transkription von Genen der Pigmentierung, insbesondere des Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktors (MITF), erhöht wird [4].

Bei UV-Bestrahlung wurde deutlich, dass im Vergleich zu Melanozyten-Monokulturen in Cokulturen von Melanozyten und Keratinozyten schon bei weitaus niedrigeren UVB-Dosen eine Steigerung der Melaninsynthese erreicht wird. Im Gegensatz dazu waren bei UVA-Bestrahlung keine Unterschiede zwischen Mono- und Cokulturen erkennbar [26]. Die UV-Bestrahlung induziert durch eine Vielzahl von Faktoren, die von Melanozyten, Keratinozyten und auch Fibroblasten sezerniert werden, über teils komplexe Signalwege eine Steigerung der Melanogenese (Tabelle 11). Beispielsweise führt die Stimulation von p53 durch UV-Licht in Keratinozyten zu einer gesteigerten Expression des POMC-Gens, was eine vermehrte

Sekretion von α -MSH und somit eine Aktivierung des Melanocortin-1-Rezeptors auf Melanozyten bewirkt.

Tabelle 11: Reaktion verschiedener Hautzellen auf UV-Bestrahlung (nach [109])

Melanozyten	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor (MITF) \uparrow α -Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) \uparrow Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) \uparrow
Keratinocyten	Protease-aktivierter Rezeptor 2 (PAR-2) \uparrow α -MSH \uparrow ACTH \uparrow Endothelin-1 (ET-1) \uparrow Interleukin-1 (IL-1) \uparrow Stammzellfaktor (SCF) \uparrow Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) \uparrow p53 \uparrow
Fibroblasten	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) \uparrow Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) \uparrow SCF \uparrow

Eine Weiterentwicklung der Zellkultur stellen die sogenannten Hautäquivalente dar, die eine Vielzahl zellulärer Interaktionen ermöglichen. Erste Modelle bestanden nur aus Melanozyten und Keratinozyten, jedoch war der Aufbau der Hautäquivalente bereits ähnlich der normalen Haut [15]. Mittlerweile ist es möglich, Hautäquivalente herzustellen, die neben Melanozyten und Keratinozyten noch weitere Zellen wie Fibroblasten und Langerhanszellen enthalten [14, 66, 80].

Bei diesen Hautäquivalenten ließen sich eine verstärkte Pigmentierung, eine erhöhte Zahl an Melanozyten und mehr Dendriten als Effekte der UVB-Bestrahlung nachweisen [100]. Im Vergleich zwischen reinen Melanozytenkulturen und Hautäquivalenten hatten die Zellen in den Hautäquivalenten einen eindeutigen Überlebensvorteil und produzierten mehr Melanin nach UV-Bestrahlung [7].

4.3.2 Effekte weiterer Gestagene

Klinisch wurde bei Anwenderinnen von Kombinationsprodukten aus Ethinylestradiol und Chlormadinonacetat ein deutlicher Rückgang von zuvor bestehenden Pigmentveränderungen beobachtet. Aufgrund unserer Ergebnisse darf man annehmen, dass dies auf einer Hemmung der Melanozytenproliferation durch Chlormadinonacetat beruht.

Um dies zu verifizieren, sind jedoch vergleichende Studien mit weiteren Gestagenen, die ebenfalls in Kontrazeptiva enthalten sind, nötig. Die in Deutschland erhältlichen Kontrazeptiva können außer Chlormadinonacetat als Gestagen-Anteil Levonorgestrel, Norethisteron, Norgestimat, Desogestrel, Gestoden, Lynestrenol, Drospirenon, Dienogest oder Cyproteronacetat enthalten. Abgesehen von einer Studie zu Cyproteronacetat, die unter 4.1 erwähnt wurde, sind in der Literatur bislang keine Daten zu Effekten von Gestagenen auf humane Melanozyten zu finden.

Weiterführende Studien über die Beeinflussung der Proliferation und Tyrosinaseaktivität durch Gestagene sollten klären, ob auch andere Substanzen außer Chlormadinonacetat eine Hemmung der pigmentbildenden Melanozyten bewirken können. Dies könnte bei Frauen für die Auswahl des Kontrazeptivums zur Vermeidung kosmetisch störender Pigmentveränderungen der Haut bedeutsam sein.

5 Zusammenfassung

Bei der retrospektiven Auswertung einer Zulassungsstudie für ein orales Kontrazeptivum mit den Inhaltsstoffen Ethinylestradiol (30 µg) und Chlormadinonacetat (2 mg) fiel auf, dass bei 90% der Anwenderinnen, die unter vorheriger Einnahme eines anderen Kontrazeptivums Pigmentstörungen entwickelt hatten, diese verschwanden. Da sich orale Kontrazeptiva in ihrem Gestagen-Anteil voneinander unterscheiden, wird der beobachtete Effekt dem Chlormadinonacetat zugeschrieben. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Chlormadinonacetat einen Einfluss auf die Proliferation und Pigmentbildung von Melanozyten hat.

Für diesen Zweck wurden humane Melanozyten in vitro den Hormonen Östrogen, Progesteron und Chlormadinonacetat ausgesetzt. In einigen Experimenten wurden die Zellen zusätzlich mit UVA oder UVB bestrahlt. Die Auswertung erfolgte mittels zellbiologischer Assays zur Analyse der Zellvitalität und Pigmentbildungsaktivität.

Eine signifikante Erhöhung der Melanozytenproliferation nach Stimulation mit Östrogen konnte in etwa der Hälfte der Versuchsreihen nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen hemmten die Gestagene das Melanozytenwachstum signifikant, wobei Progesteron stärker wirksam war als Chlormadinonacetat.

Die Tyrosinaseaktivität wurde geringfügig durch Östrogen wiederum in etwa der Hälfte der Versuchsreihen aktiviert. Gestagene hatten keinen Einfluss auf die Tyrosinaseaktivität.

Die beobachtete Steigerung der Proliferation und der Tyrosinaseaktivität durch Östrogen war voneinander unabhängig. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten aus der Literatur auch darin überein, dass das Ansprechen auf Östrogen Spender-abhängig ist.

Über die Wirkungen von Progesteron auf humane Melanozyten gibt es nur wenige Studien, die sich zudem ausschließlich mit der Tyrosinaseaktivität befassen: In einer Arbeit stimulierte Progesteron diese, in zwei weiteren hatte es keinerlei Einfluss. Unsere Versuche ergaben eine hemmende Wirkung sowohl von Progesteron als auch von Chlormadinonacetat auf die Proliferation von humanen Melanozyten.

In unserer Studie konnte erstmals eine Hemmung der Melanozytenproliferation durch die Gestagene Progesteron und Chlormadinonacetat gezeigt werden. Dies könnte ein erster experimenteller Hinweis darauf sein, dass Chlormadinonacetat möglicherweise im Gegensatz zu anderen Gestagenkomponenten, die in handelsüblichen Kontrazeptiva zu finden sind, der Melasma-Bildung vorbeugt. Um dies zu verifizieren, sind weiterführende

Untersuchungen notwendig. Zum einen sollten vergleichende Untersuchungen mit anderen Gestagenen erfolgen. Zum anderen wären Versuche in weiter entwickelten Zellkultur-Modellen wie Cokultur-Systemen aus epidermalen Zellen oder Hautäquivalenten interessant. Diese Ergebnisse könnten für Frauen bei der Auswahl des Kontrazeptivums zur Vermeidung kosmetisch störender Pigmentveränderungen der Haut bedeutsam sein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000; 13 Suppl 8: 156-62.
- [2] Abdel-Malek Z, Swope V, Smalara D, Babcock G, Dawes S, Nordlund J. Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res* 1994; 7(5): 326-32.
- [3] Abdel-Malek Z, Swope VB, Pallas J, Krug K, Nordlund JJ. Mitogenic, melanogenic, and cAMP responses of cultured neonatal human melanocytes to commonly used mitogens. *J Cell Physiol* 1992; 150(2): 416-25.
- [4] Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadekaro AL, Swope VB, Starner R. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes--a shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 2008; 84(2): 501-8.
- [5] Abdel-Malek ZA, Swope VB, Nordlund JJ, Medrano EE. Proliferation and propagation of human melanocytes in vitro are affected by donor age and anatomical site. *Pigment Cell Res* 1994; 7(2): 116-22.
- [6] Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Blount M, Carter N, Heath A. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed and photoprotected human skin. *Pigment Cell Res* 2002; 15(2): 112-8.
- [7] Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 1995; 104(5): 859-67.
- [8] Arita Y, O'Driscoll KR, Weinstein IB. Growth of human melanocyte cultures supported by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate is mediated through protein kinase C activation. *Cancer Res* 1992; 52(16): 4514-21.
- [9] Babiarez-Magee L, Chen N, Seiberg M, Lin CB. The expression and activation of protease-activated receptor-2 correlate with skin color. *Pigment Cell Res* 2004; 17(3): 241-51.

- [10] Bagshaw S. The combined oral contraceptive. Risks and adverse effects in perspective. *Drug Saf* 1995; 12(2): 91-6.
- [11] Barker D, Dixon K, Medrano EE et al. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. *Cancer Res* 1995; 55(18): 4041-6.
- [12] Barrett AW, Scully C. Human oral mucosal melanocytes: a review. *J Oral Pathol Med* 1994; 23(3): 97-103.
- [13] Benninghoff A. *Anatomie 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 17. Auflage 2008.
- [14] Berking C, Herlyn M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol Histopathol* 2001; 16(2): 669-74.
- [15] Bertaux B, Morliere P, Moreno G, Courtalon A, Masse JM, Dubertret L. Growth of melanocytes in a skin equivalent model in vitro. *Br J Dermatol* 1988; 119(4): 503-12.
- [16] Boenisch T. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. Dako, 3. Auflage 2006.
- [17] Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp Dermatol* 2003; 12 Suppl 2: 5-12.
- [18] Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. *Dermatologie und Venerologie*. Springer, Heidelberg, 5. Auflage 2005.
- [19] Brooks G, Birch M, Hart IR. Effects of biologically active tumour-promoting and non-promoting phorbol esters on in vitro growth of melanocytic cells. *Pigment Cell Res* 1990; 3(2): 98-100.
- [20] Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D et al. Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2005; 125(6): 1190-9.
- [21] Chao-Hsing KA, Hsin-Su YU. A study of the effects of phorbol 12-myristate-13-acetate on cell differentiation of pure human melanocytes in vitro. *Arch Dermatol Res* 1991; 283(2): 119-24.

- [22] Cheng KT, Hsu FL, Chen SH et al. New constituent from *Podocarpus macrophyllus* var. *macrophyllus* shows anti-tyrosinase effect and regulates tyrosinase-related proteins and mRNA in human epidermal melanocytes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007; 55(5): 757-61.
- [23] De Leeuw SM, Smit NP, Van Veldhoven M et al. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol B* 2001; 61(3): 106-13.
- [24] Dissanayake NS, Greenoak GE, Mason RS. Effects of ultraviolet irradiation on human skin-derived epidermal cells in vitro. *J Cell Physiol* 1993; 157(1): 119-27.
- [25] Donatien P, Surleve-Bazeille JE, Thody AJ, Taieb A. Growth and differentiation of normal human melanocytes in a TPA-free, cholera toxin-free, low-serum medium and influence of keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1993; 285(7): 385-92.
- [26] Duval C, Regnier M, Schmidt R. Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure. *Pigment Cell Res* 2001; 14(5): 348-55.
- [27] Duval C, Smit NP, Kolb AM, Regnier M, Pavel S, Schmidt R. Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. *Pigment Cell Res* 2002; 15(6): 440-6.
- [28] Friedmann PS, Gilchrest BA. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J Cell Physiol* 1987; 133(1): 88-94.
- [29] Fruzzetti F. Hemostatic effects of smoking and oral contraceptive use. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(6 Pt 2): S369-74.
- [30] Frye CA. An overview of oral contraceptives: mechanism of action and clinical use. *Neurology* 2006; 66(6 Suppl 3): S29-36.
- [31] Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y et al. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol* 1998; 139(2): 216-24.

- [32] Gilchrest BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 1996; 63(1): 1-10.
- [33] Goding CR. Melanocytes: the new Black. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(2): 275-9.
- [34] Gomes MP, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* 2004; 164(18): 1965-76.
- [35] Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. *Arch Dermatol* 1995; 131(12): 1453-7.
- [36] Gupta AK, Gover MD, Nouri K, Taylor S. The treatment of melasma: a review of clinical trials. *J Am Acad Dermatol* 2006; 55(6): 1048-65.
- [37] Haag P, Hanhart N, Müller M. Gynäkologie und Urologie. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2. Auflage 2005.
- [38] Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18(3): 150-9.
- [39] Hall AM, Krishnamoorthy L, Orlow SJ. Accumulation of tyrosinase in the endolysosomal compartment is induced by U18666A. *Pigment Cell Res* 2003; 16(2): 149-58.
- [40] Hearing VJ, Ekel TM. Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem J* 1976; 157(3): 549-57.
- [41] Horikawa T, Norris DA, Zekman T, Morelli JG. Effective elimination of fibroblasts in cultures of melanocytes by lowering calcium concentration in TPA depleted medium following geneticin treatment. *Pigment Cell Res* 1996; 9(2): 58-62.
- [42] Im S, Lee ES, Kim W et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes. *J Korean Med Sci* 2002; 17(1): 58-64.
- [43] Inoue K, Hosoi J, Ideta R, Ohta N, Ifuku O, Tsuchiya T. Stress augmented ultraviolet-irradiation-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 2003; 121(1): 165-71.

- [44] Iozumi K, Hoganson GE, Pennella R, Everett MA, Fuller BB. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 1993; 100(6): 806-11.
- [45] Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 2003; 16(5): 523-31.
- [46] Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J Invest Dermatol* 1990; 95(1): 9-15.
- [47] Jee SH, Lee SY, Chiu HC, Chang CC, Chen TJ. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199(3): 1407-12.
- [48] Kang WH, Yoon KH, Lee ES et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol* 2002; 146(2): 228-37.
- [49] Kiechle M. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Elsevier, München, 1. Auflage 2007.
- [50] Kollias N, Sayre RM, Zeise L, Chedekel MR. Photoprotection by melanin. *J Photochem Photobiol B* 1991; 9(2): 135-60.
- [51] Land EJ, Ramsden CA, Riley PA. Pulse radiolysis studies of ortho-quinone chemistry relevant to melanogenesis. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64(2-3): 123-35.
- [52] Land EJ, Ramsden CA, Riley PA. Quinone chemistry and melanogenesis. *Methods Enzymol* 2004; 378: 88-109.
- [53] Lavker RM, Kaidbey KH. Redistribution of melanosomal complexes within keratinocytes following UV-A irradiation: a possible mechanism for cutaneous darkening in man. *Arch Dermatol Res* 1982; 272(3-4): 215-28.
- [54] Lech MM, Ostrowska L. Risk of cancer development in relation to oral contraception. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2006; 11(3): 162-8.

- [55] Lei TC, Virador VM, Vieira WD, Hearing VJ. A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro. *Anal Biochem* 2002; 305(2): 260-8.
- [56] Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. 2006: www.dgkg.de.
- [57] Liu SH, Pan IH, Chu IM. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(6): 1135-9.
- [58] Lizardi-Cervera J, Cuellar-Gamboa L, Motola-Kuba D. Focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma: a review. *Ann Hepatol* 2006; 5(3): 206-11.
- [59] Maeda K, Naganuma M, Fukuda M, Matsunaga J, Tomita Y. Effect of pituitary and ovarian hormones on human melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res* 1996; 9(4): 204-12.
- [60] McLeod SD, Ranson M, Mason RS. Effects of estrogens on human melanocytes in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 49(1): 9-14.
- [61] Minwalla L, Zhao Y, Le Poole IC, Wickett RR, Boissy RE. Keratinocytes play a role in regulating distribution patterns of recipient melanosomes in vitro. *J Invest Dermatol* 2001; 117(2): 341-7.
- [62] Misz M, Beck P. Action of hormonal contraceptives on the coagulation system and some of its inhibitors. *Acta Med Hung* 1986; 43(3): 301-10.
- [63] Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2007; 20(1): 2-13.
- [64] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- [65] Naeyaert JM, Eller M, Gordon PR, Park HY, Gilchrist BA. Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br J Dermatol* 1991; 125(4): 297-303.

- [66] Nakazawa K, Kalassy M, Sahuc F, Collombel C, Damour O. Pigmented human skin equivalent--as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36(6): 813-20.
- [67] Nakazawa K, Sahuc F, Damour O, Collombel C, Nakazawa H. Regulatory effects of heat on normal human melanocyte growth and melanogenesis: comparative study with UVB. *J Invest Dermatol* 1998; 110(6): 972-7.
- [68] Nessa A, Latif SA, Siddiqui NI. Risk of cardiovascular diseases with oral contraceptives. *Mymensingh Med J* 2006; 15(2): 220-4.
- [69] Nishioka E, Funasaka Y, Kondoh H, Chakraborty AK, Mishima Y, Ichihashi M. Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis. *Melanoma Res* 1999; 9(5): 433-43.
- [70] Ohata C, Tadokoro T, Itami S. Expression of estrogen receptor beta in normal skin, melanocytic nevi and malignant melanomas. *J Dermatol* 2008; 35(4): 215-21.
- [71] Perez-Bernal A, Munoz-Perez MA, Camacho F. Management of facial hyperpigmentation. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1(5): 261-8.
- [72] Pomerantz SH. The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J Biol Chem* 1966; 241(1): 161-8.
- [73] Promega. Technical Bulletin No. 317. Madison, WI, USA.
- [74] Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138-42.
- [75] Ramirez-Bosca A, Bernd A, Werner R, Dold K, Holzmann H. Effect of the dose of ultraviolet radiation on the pigment formation by human melanocytes in vitro. *Arch Dermatol Res* 1992; 284(6): 358-62.
- [76] Ranson M, Posen S, Mason RS. Extracellular matrix modulates the function of human melanocytes but not melanoma cells. *J Cell Physiol* 1988; 136(2): 281-8.

- [77] Ranson M, Posen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones: in vitro studies with 1 alpha-25, dihydroxyvitamin D3, alpha-melanocyte stimulating hormone, and beta-estradiol. *J Invest Dermatol* 1988; 91(6): 593-8.
- [78] Raposo G, Marks MS. Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 786-97.
- [79] Regnier M, Duval C, Galey JB et al. Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45(7): 969-80.
- [80] Regnier M, Patwardhan A, Scheynius A, Schmidt R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36(6): 821-4.
- [81] Reid K, Turnley AM, Maxwell GD et al. Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* 1996; 122(12): 3911-9.
- [82] Rendon MI. Utilizing combination therapy to optimize melasma outcomes. *J Drugs Dermatol* 2004; 3(5 Suppl): S27-34.
- [83] Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE et al. Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *Faseb J* 2007; 21(8): 1844-56.
- [84] Routaboul C, Denis A, Vinche A. Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol* 1999; 9(2): 95-9.
- [85] Rouzaud F, Annereau JP, Valencia JC, Costin GE, Hearing VJ. Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. *Faseb J* 2003; 17(14): 2154-6.
- [86] Scott G, Deng A, Rodriguez-Burford C et al. Protease-activated receptor 2, a receptor involved in melanosome transfer, is upregulated in human skin by ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 2001; 117(6): 1412-20.

- [87] Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2002; 15(6): 433-9.
- [88] Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res* 2001; 14(4): 236-42.
- [89] Seiberg M, Paine C, Sharlow E et al. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J Invest Dermatol* 2000; 115(2): 162-7.
- [90] Seiberg M, Paine C, Sharlow E et al. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 2000; 254(1): 25-32.
- [91] Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 2004; 84(4): 1155-228.
- [92] Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev* 2000; 21(5): 457-87.
- [93] Stierner U, Rosdahl I, Augustsson A, Kagedal B. UVB irradiation induces melanocyte increase in both exposed and shielded human skin. *J Invest Dermatol* 1989; 92(4): 561-4.
- [94] Tadokoro T, Itami S, Hosokawa K, Terashi H, Takayasu S. Human genital melanocytes as androgen target cells. *J Invest Dermatol* 1997; 109(4): 513-7.
- [95] Tadokoro T, Yamaguchi Y, Batzer J et al. Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 2005; 124(6): 1326-32.
- [96] Tanis BC, Rosendaal FR. Venous and arterial thrombosis during oral contraceptive use: risks and risk factors. *Semin Vasc Med* 2003; 3(1): 69-84.
- [97] Tenchini ML, Morra F, Soranzo C, Malcovati M. Effects of keratinocyte-secreted soluble factors on spreading, number of dendrites and cell-cell contacts of human

- epidermal melanocytes and dermal fibroblasts: a quantitative analysis. *Epithelial Cell Biol* 1995; 4(4): 143-55.
- [98] Thong HY, Jee SH, Sun CC, Boissy RE. The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *Br J Dermatol* 2003; 149(3): 498-505.
- [99] Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K et al. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol* 2003; 12(2): 181-90.
- [100] Todd C, Hewitt SD, Kempenaar J, Noz K, Thody AJ, Ponc M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch Dermatol Res* 1993; 285(8): 455-9.
- [101] Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2005; 23(2): 105-61.
- [102] Torok HM. A comprehensive review of the long-term and short-term treatment of melasma with a triple combination cream. *Am J Clin Dermatol* 2006; 7(4): 223-30.
- [103] Tunzi M, Gray GR. Common skin conditions during pregnancy. *Am Fam Physician* 2007; 75(2): 211-8.
- [104] Victor FC, Gelber J, Rao B. Melasma: a review. *J Cutan Med Surg* 2004; 8(2): 97-102.
- [105] Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal Biochem* 1999; 270(2): 207-19.
- [106] Virador VM, Muller J, Wu X et al. Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes. *Faseb J* 2002; 16(1): 105-7.
- [107] [www. alterspigmentierung.de/images/Epidermis.gif](http://www.alterspigmentierung.de/images/Epidermis.gif).
- [108] Xu QX, Du J, He PY, Zhang JZ, Zhu TJ. [Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and UVB on cell proliferation and melanin synthesis of cultured human melanocyte.]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2004; 36(5): 483-6.

- [109] Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 27557-61.
- [110] Yang L, Deng Y. [Hominis placenta promotes melanocyte proliferation melanin synthesis and tyrosinase activity in vitro]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2004; 24(9): 1040-1, 4.
- [111] Zhong S, Wu Y, Soo-Mi A et al. Depigmentation of melanocytes by the treatment of extracts from traditional Chinese herbs: a cell culture assay. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(9): 1947-51.
- [112] Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res* 2007; 39(2): 85-95.

7 Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Carola Berking danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Betreuung und die stets konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie zu erstellen.

Weiterhin geht mein Dank an Frau Ursula Nägele, dir mir stets kompetent und hilfsbereit bei allen praktischen Angelegenheiten zur Seite gestanden hat.

Herrn Dr. Georg Schramm von der Firma Grünenthal danke ich für die Unterstützung des Projekts.

Mein herzlicher Dank gilt zudem Herrn Dr. Alexander Yassouridis für seine engagierte Hilfe bei der statistischen Datenauswertung.

Mariana Ruiz Villarreal und Frédéric Singer danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen meinen Freundinnen und Freunden, die mich stets motiviert haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die vielen Korrekturlesungen, die wertvollen Anregungen und insbesondere ihre ständige Unterstützung während des gesamten Studiums und darüber hinaus.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christine Hyun-Zu Wiedemann
Geburtsdatum/-ort: 18.09.1981 in Miltenberg/Main
Eltern: Yeun-Hwan Wiedemann, geb. Kim
Prof. Dr. Klaus Wiedemann
Geschwister: Johannes Wiedemann

Schulbildung

1988-1990 Weiherhof-Grundschule Freiburg
1990-1992 Gerhardinger Grundschule Pfaffenhofen
1992-2001 Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen
06/2001 Abitur

Studium

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2003 Ärztliche Vorprüfung
03/2004 Famulatur in der Anästhesiologie und Intensivmedizin
am Klinikum Lippe-Lemgo
09/2004 Famulatur in der Kinder- und Jugendmedizin
an der Klinik St. Elisabeth in Neuburg/Donau
03/2005 Famulatur am Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2005 Famulatur in der orthopädischen Gemeinschaftspraxis
Dr. E. Braun und Dr. M. Brusdeilins in Pfaffenhofen
09/2006 bis 11/2006 PJ-Tertial Neurologie am Inselspital der Universität Bern
12/2006 bis 03/2007 PJ-Tertial Chirurgie am Städtischen Klinikum München-
Neuperlach
04/2007 bis 07/2007 PJ-Tertial Innere Medizin an der Ilmtalklinik Pfaffenhofen
06/2008 Ärztliche Prüfung und Approbation

Berufliche Tätigkeit

Seit 07/2008 Assistenzärztin in der Inneren Medizin
an der Ilmtalklinik Pfaffenhofen