

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas A. Luger-

**Untersuchungen zur biologischen Rolle
der Melanozyten in der humanen Talgdrüse**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Tolk, Kai Michael
aus Wesel
2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms – Universität Münster

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Böhm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christos C. Zouboulis, Dessau

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas A. Luger -
Referent: Prof. Dr. med. Markus Böhm
Koreferent: Prof. Dr. med. Christos C. Zouboulis, Dessau

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur biologischen Rolle
der Melanozyten in der humanen Talgdrüse

Tolk, Kai Michael

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Melanozyten in exokrinen Drüsen, u. a. auch in der humanen Talgdrüse, vorkommen. Um erste Einblicke in die mögliche Funktion dieser seboglandulären Melanozyten zu erhalten, wurde zunächst durch Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Melanozyten-Antikörper die Gegenwart von Melanozyten in der Talgdrüse der humanen Haut bestätigt. Dieses Ergebnis bildete die Grundlage für funktionelle Untersuchungen. Zunächst wurden normale humane Melanozyten und SZ95-Zellen, eine immortalisierte Talgdrüsen-Zelllinie gewonnen aus humaner Gesichtshaut, in vitro kokultiviert. Dabei bildeten die Melanozyten Dendriten, die sich an die SZ95-Zellen anlegten. Konditioniertes Melanozytenmedium hemmte die Linolensäure-induzierte Lipidsynthese und unterdrückte die Apoptose von SZ95-Zellen ausgelöst durch Serumdeprivation. Eine Koinkubation von SZ95-Zellen mit konditioniertem Melanozytenmedium und einem gegen α -Melanozyten-stimulierendes-Hormon (α -MSH) gerichteten Antikörper, konnte den antiapoptotischen Effekt des konditionierten Melanozytenmediums blockieren. Die Tatsache, dass auch α -MSH die durch Serumdeprivation induzierte Apoptose von SZ95-Sebozyten hemmte, lässt auf die Präsenz von α -MSH in konditioniertem Melanozytenmedium schließen. Diese Ergebnisse weisen auf eine erste funktionelle Rolle von Melanozyten in der humanen Talgdrüse hin. Durch Sekretion von Mediatoren wie α -MSH, könnten seboglanduläre Melanozyten die Proliferationsrate, Apoptose und Lipidsynthese regulieren und so zur Homöostase in der Talgdrüse beitragen.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2009

Meinen Eltern

Was wir wissen, ist ein Tropfen
was wir nicht wissen, ein Ozean.

(Isaac Newton)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in die Thematik	1
1.2 Struktur und Funktion der humanen Epidermis.....	2
1.3 Anatomie und Funktion der humanen Talgdrüse.....	6
1.4 Vorkommen und Rolle der Melanozyten beim Menschen.....	8
1.5 Zielsetzung	13
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Zelltypen.....	13
2.1.2 Substanzen	14
2.1.3 Geräte	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen der humanen Haut	17
2.2.3 Sebozyten-Melanozyten Kokultur	18
2.2.4 Proliferationsmessung.....	18
2.2.5 Lipidfärbung	19
2.2.6 Apoptosemessung	20
2.3 Statistische Auswertung	22

3. Ergebnisse	22
3.1 In situ-Nachweis von Melanozyten in der humanen Talgdrüse	22
3.2 Zelluläre Interaktionen in der Sebozyten-Melanozyten Kokultur	25
3.3 Konditioniertes Melanozytenmedium erhöht die metabolische Aktivität von Sebozyten	26
3.4 Identifizierung von α -MSH als anti-apoptotischer Faktor in konditioniertem Melanozytenmedium	28
3.5 Konditioniertes Melanozytenmedium unterdrückt die Lipogenese von Sebozyten	29
4. Diskussion	33
4.1 Seboglanduläre Melanozyten – ein verkanntes Melanozyten-Reservoir?	33
4.2 Seboglanduläre Melanozyten – Stress-Protektoren?	38
4.3 Seboglanduläre Melanozyten – Regulatoren der Talgdrüsenfunktion? ...	40
5. Literaturverzeichnis	44
6. Verzeichnis der Abbildungen	52
7. Danksagung	53
8. Lebenslauf	54
9. Anhang	55

Verzeichnis der Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
%	Prozent
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
DHT	Dihydrotestosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzym gekoppelter Immunofestphasen-Assay (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
<i>et al.</i>	et altera
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fötale Kälberserum
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
LA	Linolensäure
MC-1R	Melanocortin-1 Rezeptor
α-MSH	α-Melanozyten-stimulierendes Hormon
min	Minute
ml	Milliliter
M	Molar
NHM	normale humane Melanozyten

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
POMC	Proopiomelanocortin
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
rpm	Umdrehung pro Minute
SCF	Stem Cell Faktor
SZ95	Sebozyten-Zelllinie
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP	<i>Tyrosinase-related protein</i>
UV	Ultraviolett
XTT	Natrium3'-[1-phenyl-aminocarbonyl-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzosulfonsäure

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Die vorliegende Arbeit untersucht die biologische Rolle von Melanozyten in der humanen Talgdrüse.

Melanozyten kommen in der humanen Haut in erster Linie in der Epidermis und im Haarfollikel vor. Hier sind sie entscheidend bei der Regulierung der Haut- und Haarfarbe beteiligt. Interessanterweise wurde vor mehr als 30 Jahren anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits über das Vorkommen von Melanozyten in der humanen Talgdrüse berichtet. (Ito *et al.*, 1976) Die genaue Rolle dieser Melanozyten ist unbekannt.

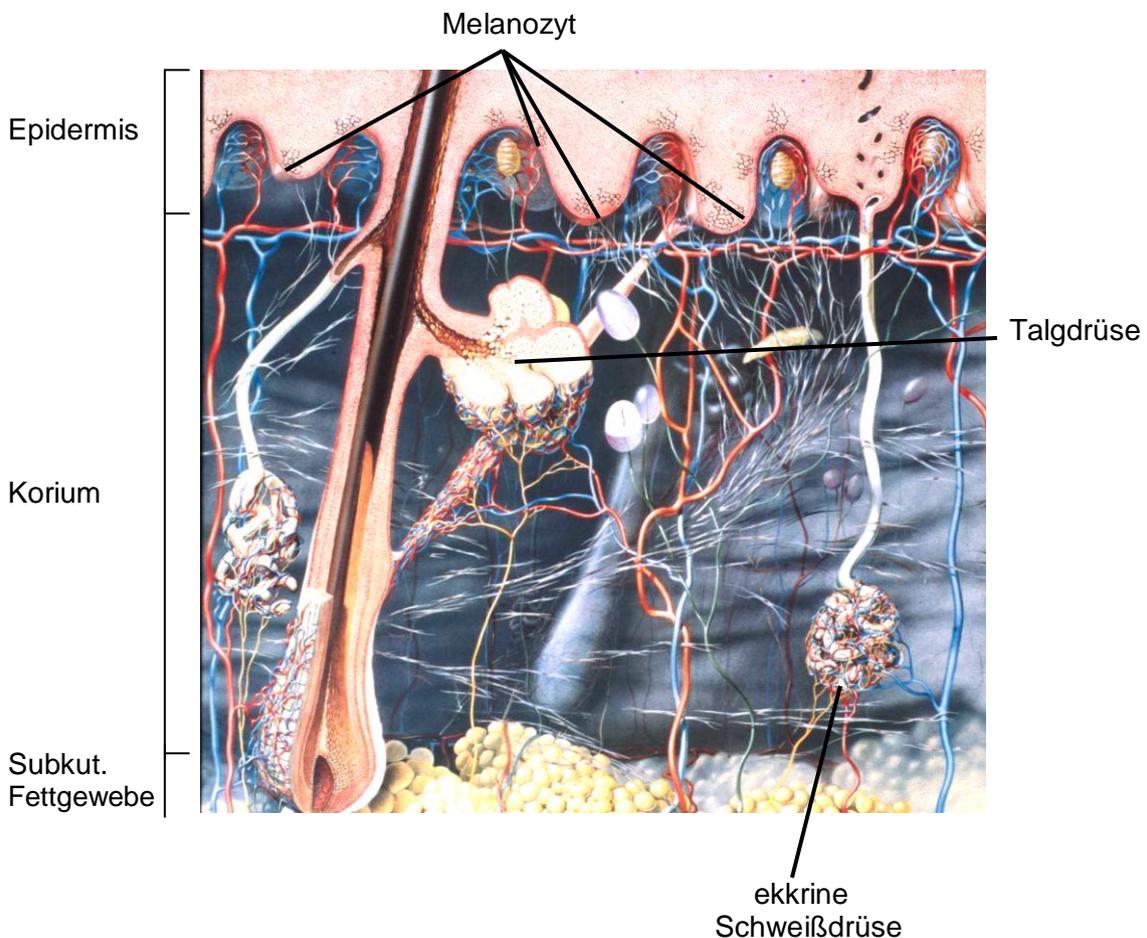
Die Tatsache, dass Melanozyten außer in der Haut noch in zahlreichen anderen Organen und Geweben wie z.B. dem Auge, Ohr und dem ZNS vorkommen und dort primär nicht der Sonnenlicht induzierten Melaninbildung dienen, lässt noch auf andere Funktionen dieser Zellen schließen.

Vor diesem Hintergrund sollen in der vorliegenden Arbeit erste funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Melanozyten in der humanen Talgdrüse dargestellt werden.

1.2 Struktur und Funktion der humanen Epidermis

Die menschliche Haut besteht aus mehreren Schichten (Abb. 1). Die oberste Schicht ist die Epidermis mit dem Stratum corneum, der so genannten Hornschicht. Darunter liegen die Dermis (Korium) und das subkutane Fettgewebe. Die Epidermis wird von der Dermis durch die dermoepidermale Junctionszone wellenförmig getrennt. Die Anteile der Epidermis, die in die Dermis ragen, werden als Reteleiste bezeichnet. Der Epidermisanteil oberhalb einer Dermispapille ist als suprapapilläre Epidermis definiert.

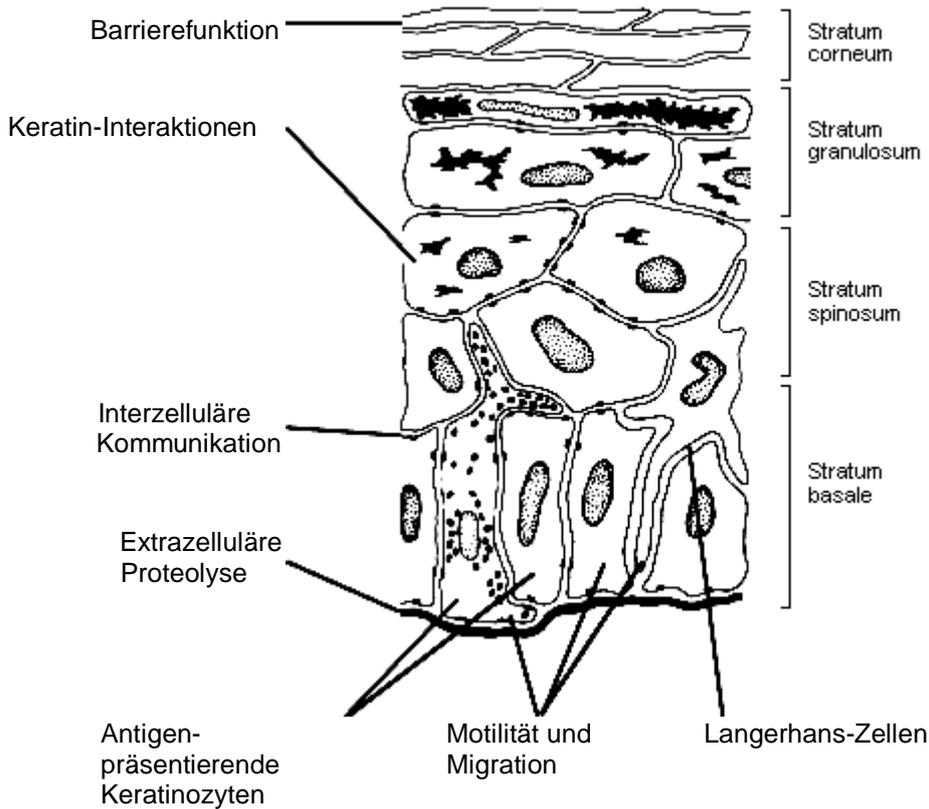
Abb. 1: Dreidimensionaler Querschnitt durch die Haut



Die Epidermis hat eine Dicke von durchschnittlich 50 - 200 μm , an der Fußsohle bis 1 mm. Bei außergewöhnlicher Beanspruchung können Schwielen entstehen, dies sind Verdickungen > 2 mm. Neben den als Keratinozyten bezeichneten Epithelzellen im engeren Sinne finden sich hier bis zu 10 % spezialisierte Zellen: Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen.

Die menschliche Haut ist ein klassisches Proliferationsgewebe, d.h. sie unterliegt ständiger Erneuerung (Abb. 2). Dabei wandern die Keratinozyten aus den unteren Zellagen in Richtung Oberfläche und schilfern nach außen ab. Zellerneuerungen finden in der Regel nur im Stratum basale statt. Von hier aus bewegen sich die Tochterzellen innerhalb von 2 Wochen aktiv unter Veränderung ihrer Struktur und Verlust ihrer Zellteilungsfähigkeit in das darüberliegende Stratum spinosum und danach ins Stratum granulosum. Für das Durchwandern der Hornschicht werden wiederum 14 Tage benötigt, so dass die gesamte „Turn-over“-Zeit etwa 28-40 Tage beträgt. Bei manchen Erkrankungen ist diese Zeit erheblich verkürzt, so z. B. bei der Psoriasis vulgaris, wo der Zeitraum sich auf etwa 8-10 Tage erstreckt (Braun-Falco *et al.*, 1996). Der Zellzyklus der Keratinozyten besteht wie der jeder Zellart aus 4 Phasen: Mitose, G₁-Phase, DNA-Synthesephase und G₂-Phase.

Abb. 2: Epidermis



Auf der dünnen zickzackartig verlaufenden Basalmembran sind die Zellen des Stratum basale über viele Hemidesmosomen verankert. Die Basalzellen haben eine kubische bis hochprismatische Form, zahlreiche fingerförmige Ausläufer und sind über Desmosomen miteinander und mit darüberliegenden Zellen verbunden. Sie haben einen länglich ovalen Zellkern und relativ wenig Zytoplasma. Die Zellen enthalten viele Ribosomen und bilden saure und basische Keratine als fibröse Proteine, die sich zu den heterodimeren Keratinfilamenten, einer Sorte von Intermediärfilamenten, zusammenlagern. Diese bündeln sich wiederum zu 7,5 nm dicken Tonofibrillen, die an den Desmosomen mit der Zellmembran verankert sind. Zwischen den Basalzellen finden sich einzeln oder in Gruppen die als Druckrezeptoren dienenden Merkel-Zellen. Außerdem sind ortsabhängig bis zu ca. 10 % der Zellen der Basalschicht nur in Spezialfärbungen erkennbare sonst helle Melanozyten.

Diese Pigmentzellen bilden stark verzweigte freie, d.h. desmosomenlose Dendriten bis in das darüberliegende mittlere Stratum spinosum aus. Stratum spinosum = Stratum spinocellulare = Stachelzellschicht mit rundlichen bis länglichen Zellen.

Diese haben sehr viele zackenartige Fortsätze mit unzähligen Desmosomen, wodurch die Zellen fest miteinander verbunden sind. Die Zahl der Tonofibrillen nimmt hier und in Richtung Epitheloberfläche immer mehr zu. Im oberen Stratum spinosum treten in den Zellen erste Keratinosomen = Lamellarkörperchen = Odland-Körperchen auf. Diese 80 – 130 nm großen oval lamellierten Organellen werden im Golgi-Apparat gebildet und geben bei Exozytose ihren aus Glykoproteinen, Lipiden und Enzymen bestehenden Inhalt in den Interzellularraum ab. Dort entstehen dann lamellierte, breite Schichten, die Odland-Lamellen, die zu einer zementartigen Kittsubstanz werden, welche die Zwischenzellräume komplett ausfüllt und undurchlässig macht. Zwischen den Keratinozyten liegen im Stratum spinosum die rundlicheren helleren Langerhans-Zellen, die hier etwa 4 % der Zellpopulation ausmachen. Unter dem Begriff Stratum germinativum (Regenerations-, bzw. Wachstumschicht) fasst man Stratum basale und spinosum zusammen.

Darüber liegt die Verhornungsschicht, die aus dem tiefer gelegenen Stratum granulosum und dem darüber gelegenen Stratum lucidum besteht. Die Keratinozyten des Stratum granulosum enthalten basophile Keratohyalin granula und werden deshalb auch als Granulazellen bezeichnet.

Das Stratum lucidum ist nur in dicker Epidermis gut erkennbar und zeigt im Lichtmikroskop eine starke Lichtbrechung.

Die ganz außen liegende Hornschicht = Stratum corneum besteht aus den auch als Korneozyten bezeichneten, abgestorbenen Keratinozyten, die vollständig mit sehr dicht gepackten 7-9 nm dicken Keratinfilamenten ausgefüllt sind. Sie kann je nach mechanischer Beanspruchung wenige bis mehrere hundert Zellschichten umfassen.

Die Epidermis reagiert auf traumatische, thermische, aktinische, chemische und entzündliche Reize nach einer Latenzphase innerhalb von 24 Stunden mit einer Erhöhung der Proliferation aus diesem Zellpool (G_0) mit dem Ziel, verloren

gegangenes epidermales Gewebe zu ersetzen und den Defekt bis zur Wiederherstellung des ursprünglichen Proliferationsgleichgewichtes nach Abschluss der Wundheilung zu verschließen.

Eine weitere Möglichkeit, eine hohe Proliferationsrate zu erhalten, besteht in der Verkürzung der Zellzykluszeit.

1.3 Anatomie und Funktion der humanen Talgdrüse

Die meisten Talgdrüsen finden sich in der Felderhaut des gesamten Körpers. Hier liegen sie meistens an Haarbälgen und werden dann als Haarbalg assoziierte Talgdrüsen bezeichnet. Außerdem gibt es noch freie, d.h. von Haarbälgen unabhängige Talgdrüsen. Diese finden sich im Bereich des Gehörgangs des Ohres, im äußeren Bereich der Lippe (wo diese im Gegensatz zum Lippenrot nicht mechanisch stark beansprucht wird), im Bereich der Brustwarze (Mamille), im Bereich der Eichel (Glans penis) am Penis, in der Haut der kleinen Schamlippen (Labia minora) und des Afters (Anus).

Mit Eigennamen sind noch folgende freie Talgdrüsen des Augenlids bezeichnet: Zeiss'sche Drüsen, kleine freie Talgdrüsen des Augenlids und die sehr großen, verzweigt alveolären (mit weiten, rundlichen miteinander über einen zentralen Ausführungsgang verbundenen Innenräumen) Meibom'sche Drüsen. Talgdrüsen werden von besonders differenzierten Epithelzellen gebildet. Dabei besteht das Epithel aus vielen Schichten. Außen am Rand teilen sich die der ganz unten liegenden ständig, wobei ein Teil der Tochterzellen basal verbleibt, die übrigen werden nach oben gedrückt und gelangen immer weiter in Richtung des Ausführungsgangs. Dabei werden die Zellen immer stärker von Talgansammlungen durchsetzt, es sind Fetttropfchen mit einer speziellen Lipidzusammensetzung, ihre Zellkerne und Organellen gehen allmählich zu Grunde. Deshalb werden sie nun auch als degenerierende Epithelzellen bezeichnet. Aus den Talgdrüsen werden also die degenerierten Zellen selbst als Sekret (Talg) durch den Ausführungsgang ausgeschieden. Bei den Haarbalg assoziierten

Talgdrüsen mündet dieser in den Haarschaft und der Talg gelangt dort neben dem Haar nach außen. Talgdrüsen bilden den Talg (Sebum), der Haut und Haare geschmeidig und glänzend macht, wasserabstoßend und keimwachstumshemmend wirkt. Neben verschiedenen Triglyceriden enthält Talg auch Squalen. Die Corynebakterien der physiologischen Hautflora spalten Talg zu Fettsäuren, die für das saure Milieu auf der Haut mitverantwortlich sind. Talgdrüsen sind einfache oder zusammengesetzte alveoläre (mit weiten Innenräumen ausgestattete) Drüsen mit sackartigen Endstücken. An den Haaren haben sie meist einen Durchmesser von ca. 1 mm. Mitesser entstehen, wenn sich das Sekret zu stark verdickt (durch Wasserverlust austrocknet) und dadurch seine eigene Ausscheidung behindert.

Humane Talgdrüsen wurden 1963 von Albert M. Kligman als „lebendes Fossil ohne Zukunft“ bezeichnet. Innerhalb der letzten 10 Jahre entwickelte sich allerdings ein völlig neues Verständnis gegenüber der humanen Talgdrüse aus. Im neuroendokrinen Netzwerk der Haut (Slominski und Wortsmann, 2000) hat sie einen wichtigen Anteil (Zouboulis *et al.*, 2008). Die Funktionen der Talgdrüse sind vielfältig, so dass ihr eine Schlüsselrolle in wichtigen Regulations- und hormonellen Kommunikationsprozessen zukommt. Die wichtigste Rolle der humanen Talgdrüse als Organ ist die bereits beschriebene Erhaltung der individuell spezifischen Hautflora über die Zusammensetzung des Sebums (Nikkari, 1974; Wheatley, 1956; Thody *et al.*, 1989; Zouboulis, 2003). Eine weitere Aufgabe beginnt noch während der Schwangerschaft im letzten Trimenon, wo die Talgdrüse die Vernix caseosa (Käseschmiere oder Fruchtschmiere) produziert (Zouboulis *et al.*, 2003). Diese ist nach der Geburt für die Installation der kutanen Barrierefunktion verantwortlich und hat Einfluss auf die folliculäre Differenzierung (Selleri *et al.*, 2006; Winiarska *et al.*, 2006). Über den Talg werden fettlösliche Antioxidanzien (z.B. Vitamin E) zur Hautoberfläche transportiert und haben dort photoprotektive Effekte (Thiele *et al.*, 1999) gegenüber Ultravioletter(UV)B-Strahlung. Eine weitere Schutzfunktion besteht in der Thermoregulation durch die Stimulation von Androgenen (Rhein *et al.*, 2007). Darüber hinaus wird der humanen Talgdrüse eine positiv beeinflussende Wirkung im Bezug auf die Wundheilung zugesprochen (Fimmel

et al., 2005). Neben den genannten Funktionen der embryologischen, der aktiven Synthese, der Transport- und Schutzfunktion, existieren noch zwei weitere Aufgaben der humanen Talgdrüse. Zum einen unterstützt sie unser Immunsystem und zum anderen nimmt sie eine entscheidende Rolle im Bereich bestimmter endokrinologischer Prozesse ein. Durch die Gegenwart von bestimmten meist grampositiven Bakterien wird eine durch Sebozyten vermittelte proinflammatorische Chemotaxis ausgelöst (Nagy *et al.*, 2006). Darüber hinaus wirken deren Peptide (z.B. Cathelicidin) lokal antibakteriell (Lee *et al.*, 2007). Neben dieser immunologischen Komponente nimmt die humane Talgdrüse eine Schlüsselposition im Hinblick auf die hormonell gesteuerte Hautalterung ein (Fritsch *et al.*, 2001; Mrantonaki *et al.*, 2006). Wie oben angedeutet exprimiert darüber hinaus die Talgdrüse multiple Rezeptoren für Neuropeptide, z.B. den Melanocortin-1 Rezeptor (MC-1R) und produziert diese auch selbst. Hier ist z.B. Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) zu nennen. Das detaillierte Wissen über die Funktionen der humanen Talgdrüse hat nicht nur reine akademisch-wissenschaftliche Relevanz, sondern dürfte in Zukunft auch die Therapie bestimmter Erkrankungen, vor allem die der Akne vulgaris (Zouboulis *et al.*, 2005), maßgeblich beeinflussen, z.B. durch innovative Therapie-Strategien die auf neu identifizierte Hormonrezeptoren der Talgdrüse beruhen (Böhm *et al.*, 2002).

1.4 Vorkommen und Rolle der Melanozyten beim Menschen

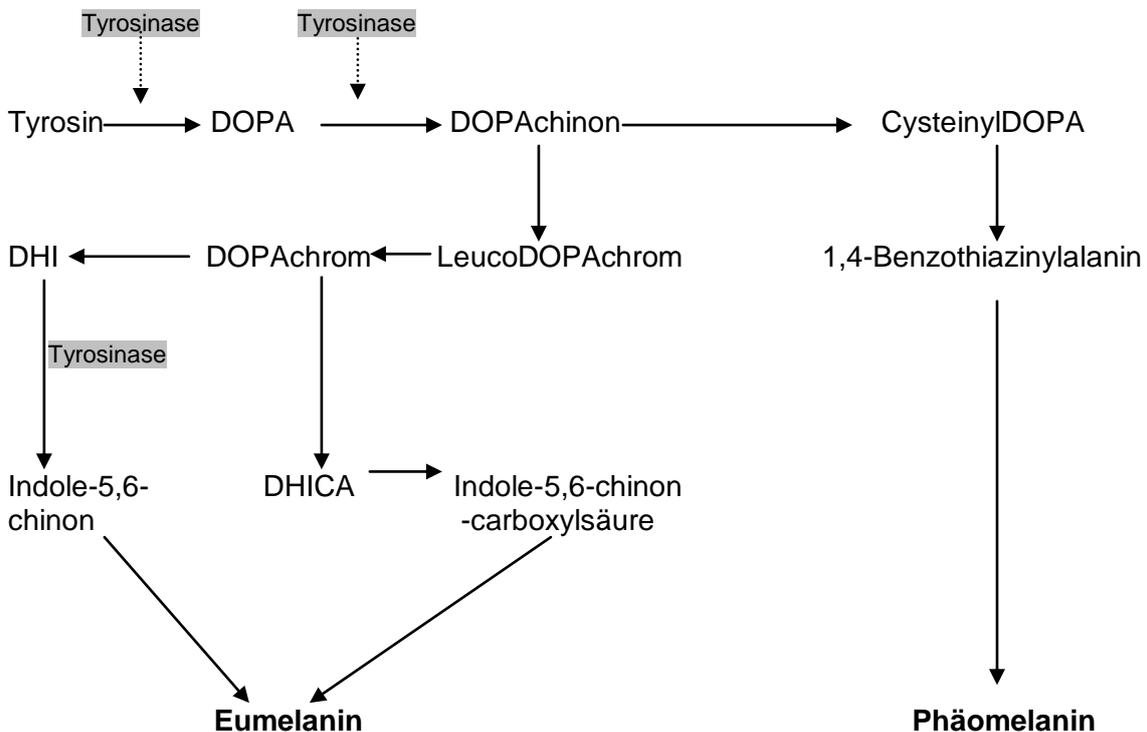
Melanozyten kommen in der Haut vor allem in der Epidermis und im Haarfollikel vor. In der Basalzellschicht (Stratum basale) liegen sie direkt der Basalmembran auf und sind mit dieser über Hemidesmosomen verbunden. Melanozyten kommen in relativ geringer Anzahl vor und sind mit ihren Zytoplasma-Verzweigungen (ca. 10-20 Dendriten) mit etwa 30 Keratinozyten locker verbunden (epidermale Melanineinheit). Diese Pigmentzellen bilden stark verzweigte freie, d.h. desmosomenlose Dendriten bis in das darüberliegende

mittlere Stratum spinosum aus. (Fitzpatrick *et al.*, 1967; Jimbow *et al.*, 1976). Sie sind metabolisch-aktiv und haben zahlreiche Mitochondrien, ein ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum (RER) und einen großen Golgi-Apparat.

Der Haarfollikel wird aus der bindegewebigen Wurzelscheide, der Haarpapille und dem Bulbus gebildet. Die Melanozyten befinden sich an der Grenze von der Haarpapille zum Bulbus. Die Haarbildung erfolgt aus epithelialen Zellen des Bulbus. Zugleich findet die Pigmentbildung im Haarbulbus durch die Melanozyten statt. Dabei bleibt ihre funktionelle Aktivität nur während der Anagenphase des Haarzyklus erhalten. Die Bildung der Melanosomen ist an einen fest strukturierten Ablauf gebunden.

Die Bildung des Melanins, die so genannte Melanogenese, ist ein komplexer biochemischer Prozess. Die Tyrosinase ist das Leitenzym der Melaninsynthese. Dieses kupferhaltige Enzym katalysiert drei Reaktionen des Raper-Mason-Schemas der Melanogenese (Abb. 3).

Abb. 3: Raper-Mason-Schema



Nachdem die Tyrosinase zunächst die Oxidation der Aminosäure L-Tyrosin über L-DOPA zu L-DOPAchinon katalysiert, entsteht anschließend in mehreren Schritten unter Beteiligung von Tyrosinase, „*Tyrosinase-related protein 1*“ (TRP-1) und „*Tyrosinase-related protein 2*“ (TRP-2) das Eumelanin, ein braunschwarzes Pigment, das zusammen mit weiteren Pigmenten Haut und Haaren die Farbe verleiht. Phäomelanin ist ein gelblich-rötliches Pigment. Das Verhältnis der beiden Melanintypen zueinander legt unsere Haut- und Haarfarbe fest. In stark pigmentierter Haut überwiegt das Eumelanin gegenüber dem Phäomelanin (Jimbrow et al., 1993).

In 4 Stadien reichert sich eine Mischung dieser Pigmente in den vom RER ausgehenden via Golgi-Apparat gebildeten, dabei immer bräunlicher werdenden Melaningranula an. Diese sind im Anschnitt ~100 x 300 nm groß, die reifen Melanosomen wandern in die Zytoplasma-Ausläufer der Melanozyten und werden an die umliegenden Zellen abgegeben. Die umliegenden Zellen nehmen die Melanosomen direkt auf und lagern diese im eigenen Zytoplasma ein. Pro Epithelzelle finden sich 16–32 Melanosomen bei Individuen der kaukasischen Rasse und 80–160 bei Angehörigen der negroiden Rasse. Die Granula absorbieren die für die Zellteilung schädlichen UV-Strahlen. Bei längerer UV Bestrahlung tritt eine vermehrte Hautbräunung auf, die auf eine Zunahme der Pigmente in den Granula zurückzuführen ist, aber auch durch eine UV-bedingte Melanozytenproliferation. Eumelanin bewirkt die stärkste Absorption von sichtbarem sowie von UV-Licht in der Haut und kann somit dem Schutz vor UV-Einflüssen dienen. Das Phäomelanin hingegen ist in der Lage, nach UV-Exposition freie Radikale freizusetzen und kann auf diese Weise sonnenbedingte Hautschäden verursachen (Tobin und Thody, 1994). Durch den MC-1R wird die Haut- und Haarpigmentierung wesentlich beeinflusst. α -MSH und das verwandte Hormon Adrenocorticotropin (ACTH) haben die höchste Affinität für den MC-1R (Gantz et al., 1993) Beide Peptidhormone entstehen aus der Vorstufe des Proopiomelanocortins (POMC) unter Einfluss von CRH im Hypophysenvorderlappen. CRH und Melanokortine wie α -MSH werden jedoch auch in der Haut exprimiert (Slominski, 2000). Bindet z.B. der Ligand α -MSH an den MC-1R, steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel und die

Melanozytenproliferation und Eumelaninbildung wird angeregt (Busca *et al.*, 2000). Die Rolle von α -MSH bei der Pigmentierung wird illustriert durch die Dyschromie bei M. Addison. Bekannt ist der Mechanismus auch bei dem seltenen (Inzidenz: 5 von 100000; überwiegend Frauen) Morbus Addison. Dabei handelt es sich um eine Nebennierenrindeninsuffizienz bei der gegen die kortisonproduzierenden Zellen Antikörper gebildet werden. Durch den abgesunkenen Cortisolspiegel im Blut wird mehr ACTH und α -MSH in der Hypophyse produziert. Durch die vermehrte α -MSH-Bildung werden die Melanozyten zur Pigmenteinlagerung angeregt, womit eine abnorme Hautbräunung auch an Hand- und Fußsohlen auftritt. Polymorphismen im MC-1R-Gen treten bei circa 80% aller Individuen mit roten Haaren, heller Haut, vielen Naevuszellnaevi oder Sommersprossen auf. Bei Menschen mit schwarzem oder braunem Haar liegt die Mutationsrate bei weniger als 20% und bei Individuen mit dunkler Hautfarbe bei deutlich weniger als 4% (Valverde *et al.*, 1995). Das bedeutet, dass die Variationen im MC-1R-Gen bei mehr als 50% der weißen Bevölkerung auftreten (Schaffer *et al.*, 2001). MC-1R steuert die Reaktion auf UV-Licht, so dass bei Menschen mit funktionell relevanten MC-1R-Polymorphismen von einem zwei bis vierfach höheren Melanomrisiko ausgegangen werden muss (Valverde *et al.*, 1996). Neben dem α -MSH-MC-1R-Ligand-Rezeptorsystem spielen bei der Melanogenese jedoch noch andere Wachstumsfaktoren eine Rolle. Zu ihnen zählen der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Endothelin-1 (ET-1) und Stem Cell Factor (SCF), auch bekannt als Mast Cell Growth Factor (MGF). Bezüglich der in vitro-Proliferation von humanen Melanozyten wirken bFGF, HGF, MGCF und ET-1 synergistisch (Böhm *et al.*, 1995).

Melanozyten befinden sich nicht nur in der humanen Epidermis und den Haarfollikeln, sondern beispielsweise auch in der Aderhaut des Auges, der Regenbogenhaut des Auges und der Mundschleimhaut (siehe Tab.1). Hierbei ist zu beachten, dass diese Melanozyten keine Melanozyteneinheiten mit den umliegenden Zellen bilden und meist auch keine Melanosomen an ihre Umgebung abgeben. Hingegen stellten Ito und Mitarbeiter 1976 eine genaue morphologische Beschreibung der Melanozyten in der humanen Talgdrüse

basierend auf der Grundlage seiner elektronenmikroskopischen Beobachtungen auf. Sie befinden sich entweder unmittelbar auf der Basalmembran oder in zweiter Reihe und kommen überwiegend in relativ geringer Anzahl und dann vor allem im Bereich der Drüsenendstücke und des Ausführungsganges vor. Diese intraglandulären bzw. intraduktalen Melanozyten erscheinen von der äußeren Form oval mit einer eher untypischen Dendrizität. Die Melaningranula werden über die Dendriten ausgeschleust und mittels Phagozytose von den Sebozyten aufgenommen. Über die exakte Rolle dieser Melanozyten ist nichts bekannt.

Tab.1: Extrakutane Melanozytenpopulation und deren Aufgabe

Vorkommen	Aufgaben
Retina und Choroidea des Auges	Koordination der Lichtempfindlichkeit und Regeneration von Rhodopsin
Stria vascularis, Cochlea und Vestibularorgan	Generierung des endocochleären Potentials sowie protektive Effekte gegen die Altersschwerhörigkeit
Medulla oblongata und Rückenmark der HWS	Funktion noch nicht erforscht
Gonaden, Lunge, Thymus, Schilddrüse, Spinalganglien, kleine Speicheldrüsen, Parotis, Rückenmark (gr. Sub.)	Funktion noch nicht erforscht

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertationsarbeit befasst sich mit der Erforschung der ungeklärten Rolle von Melanozyten in der humanen Talgdrüse. Zunächst wurde mittels spezieller Immunfärbungen die Gegenwart von Melanozyten innerhalb der Talgdrüse bestätigt. Danach wurde eine Kokultur von humanen Sebozyten der immortalisierten Sebozyten-Zell-Linie (SZ95) mit normalen humanen Melanozyten (NHM) kultiviert. Im weiteren Verlauf wurden Interaktionen zwischen Melanozyten und Sebozyten im Hinblick auf die Proliferation, der Lipidogenese und Apoptoserate erforscht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelltypen

Die humane Sebozyten-Zell-Linie SZ95

SZ95 Sebozyten wurden von Prof. Dr. Zouboulis, Klinik für Dermatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine immortalisierte Zelllinie, die aus den Talgdrüsen weiblicher Gesichtshaut gewonnen wurde. (Zouboulis *et al.*, 1999) Die SZ95 Sebozytenzelllinie weist dieselben morphologischen, phänotypischen und funktionellen Merkmale auf wie normale humane Sebozyten. Zellen wurden bei einem Konfluenzgrad von 50-70 % im Verhältnis 1:3 geteilt. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Normal humane Melanozyten (NHM)

Primäre neonatale NHM wurden von PromoCell, Heidelberg kommerziell erworben und im Verhältnis 1:3 geteilt. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3Tage.

2.1.2 Substanzen

Medien für die Zellkulturen

Die folgenden Nährmedien wurden in den Experimenten eingesetzt. Ihre Herstellung erfolgte unter aseptischen Kautelen.

SZ95 Zellen wurden kultiviert in:

Sebomed [®] basal-Medium	Biochrom, Berlin
Ergänzt mit:	
5µg/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Biochrom, Berlin
10% Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
1 mM CaCl ₂	Sigma Aldrich, Steinheim
1% Penicillin/ Streptomycin	BioWhittaker, Walkersville

NHM wurden kultiviert in:

PromoCell [®] M2-Medium	PromoCell, Heidelberg
Ergänzt mit:	
Supplement Mix	PromoCell, Heidelberg
(ohne α-MSH, ACTH und Bovinerhypophysenextrakt (BPE))	

2.1.3 Geräte

Für die Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitalkamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
Digitalkamera für Fluoreszenzmikroskopie	Leica, Wetzlar
Digitalkamera Powershot G6	Canon, Tokio
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Kryostat HM500	Microm Thermo Fisher, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer (0,0025 mm ² /0,1mm)	Zeiss, Jena
Phasenkontrast-Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Photometer Opsys MR	Thermo Labsystems, Frankfurt a.M.
Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Rüttelplatte KS 250 basic	Kika Labortechnik, Staufen
Sterilarbeitsbank Typ CA/RE4	Clean Air, Haan
Vortex-Gerät	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Hanau

Folgende Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Aceton	Sigma, Steinheim
Glasobjektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck, Tewingen
Eindeckelungsmedium VectaShield	Vector Lab., Burlingame
Fluorescein (FITC) gekoppelter anti-Maus-AK	Dako, Hamburg
Lipidfärbemittel Oil-Red O	Sigma, Steinheim

Monoklonaler Anti-Melanozyten-AK NK1/beteb	Monosan, Uden, NL
Multititerplatten	BD-Falcon, New York
Napfschalen	NalgeNunc, New York
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	BD-Falcon, New York
Phosphate-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma, Steinheim
Tesafilm	Henkel, Düsseldorf
Tris-Buffered Saline Tween (TBST)	Sigma, Steinheim
Trypanblau	Fluka, Steinheim
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Zellkulturflaschen T25-T175	BD-Falcon, New York

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung in vitro von Zellen erfordert besondere Bedingungen. Es müssen optimale Verhältnisse geschaffen werden, die denen von lebenden Organismen nahezu entsprechen. Dies ist notwendig um Zellvitalität und Zellwachstum zu garantieren. Bekannt und etabliert ist, dass Zellen im Inneren eines Brutschrankes bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius und einem atmosphärischen CO₂-Gehalt von 5% kultiviert werden können.

Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte unter dem Auflichtmikroskop in der Neubauer Zählkammer, die in 16 Quadrate unterteilt ist, wobei jedes Quadrat einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Die Zellsuspension wird mit einer 0,5% Trypanblaulösung gemischt. Die Zählkammer wird angehaucht und mit einem

Deckglas versehen. Das Erscheinen der so genannten Newtonringe zeigt, dass das Deckglas richtig aufgebracht wurde. Mit einer 20µl Pipette wird die angefärbte Suspension in die Zählkammer gefüllt. Anschließend werden die Zellen bei einer circa 40 fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt. Nach Bildung des Mittelwertes der Zellzählung aus vier Quadraten, wird der ermittelte Wert mit 10^4 und mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert. Das Ergebnis ist die Zellzahl pro µl.

Passagierung

Für die Routinekultur wurden die Zellen bis zu einer maximalen Konfluenz von 50 bis 70 % kultiviert und anschließend im Verhältnis von 1:10 geteilt, wobei jeden zweiten bis dritten Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Nach Entfernung des Nährmediums wurden die Zellen dazu einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin behandelt. Die Trypsinisierung erfolgte für 2 min im Inkubator. Das vollständige Lösen der Zellen wurde durch Klopfen der Schalen erreicht. Nach Aufnehmen der Zellen in frischem, 37 Grad Celsius warmen Zellkulturmedium wurden sie mit einer zehnpromtigen Konfluenz ausgesät oder gezählt.

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen der humanen Haut

Kryomaterial gesunder menschlicher Haut (n=3) aus der Gewebekbank der Hautklinik des UKM wurde mittels Kryostat in 5 µM-Schnitte geschnitten, luftgetrocknet und mit eiskaltem Aceton für 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden sodann für 2 Stunden mit dem monoklonalen Antikörper NK1/beteb (Monosan, Uden, Niederlande) in Form einer Dosisreihe 1:10, 1:20 und 1:30 bei Raumtemperatur inkubiert. Verdünnungen bei 1:30 ergaben die besten Ergebnisse. Nach Waschung mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem Fluorescein (FITC) gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Dako, Hamburg) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Verdünnung 1:50. Min. Die

Schnitte wurden sodann mit Eindeckelungsmedium versehen und bei -20°C gehärtet.

2.2.3 Sebozyten-Melanozyten Kokultur

Zunächst wurden 50000 SZ95 Zellen in Napfschalen mit einem Durchmesser von je 6 cm gesät. Nach 24 Stunden Inkubation in Sebomed® basal-Medium betrug die Konfluenz 50 %. Zu diesem Zeitpunkt wurde etwa 1/3 der Napfschalen mit 10000 und 2/3 der Napfschalen mit 20000 NHM in PromoCell® M2-Medium zugesetzt. Zelluläre Interaktionen in der Kokultur von SZ95 und NHM wurden lichtmikroskopisch nach insgesamt 48 und 96 Stunden beobachtet und digital dokumentiert.

2.2.4 Proliferationsmessung

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des „Cell Proliferation Assay Kit II“ von Roche Mannheim untersucht.

Dieser Proliferationstest misst die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität in tierischen und/oder menschlichen Zellen. Die Messung dieses Parameters wird für die metabolische Aktivität lebender Zellen herangezogen.

Auf einer „96-well“-Platte wurden 5000 SZ95-Sebozyten pro Napf ausgesät. 24 Stunden später wurden dann die Zellen mit serumfreiem Sebomed® basal-Medium für weitere 24 Stunden depriviert. Anschließend wurden die Testsubstanzen appliziert. Nach insgesamt 72 Stunden wurden die Zellen mit Natrium3'-[1-phenyl-aminocarbonyl-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzoesulfonsäure (XTT) behandelt und für weitere 4 Stunden inkubiert. In lebenden Zellen werden hierbei durch die aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen das Tetrazolium-Salz XTT in ein orangenes lösliches Formazan-Produkt

umgewandelt. Vollständig inhibierte intramitochondriale Dehydrogenasen können kein Formazan aus XTT bilden.

Die Formazanbildung wurde photometrisch über einen *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der Grad der Absorption korreliert mit der Zellzahl. Alle Versuchsdurchläufe wurden in Vierfachproben durchgeführt.

2.2.5 Lipidfärbung

Zum Nachweis von Lipidranula wurden Zellen mit Oil-Red O gefärbt. Bei diesem Verfahren färben sich Lipide rot.

Die Gebrauchslösung wurde wie von Humason, 1972 beschrieben hergestellt. Zunächst wurden 0,2 g Oil Red O in 57,14ml Isopropanol aufgelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde diese Lösung mit einem Filterpapier der Spezifikation 589-WH (Schleicher und Schuell) abfiltriert und mit 42,86 ml Aqua dest. aufgefüllt. Zur endgültigen Fertigstellung der Gebrauchslösung muß der Ansatz nochmals über Nacht jedoch nun bei 4 Grad Celsius stehen und anschließend noch zweimal filtriert werden. Letztendlich ist die Gebrauchslösung für 6-8 Monate bei Raumtemperatur verwendbar.

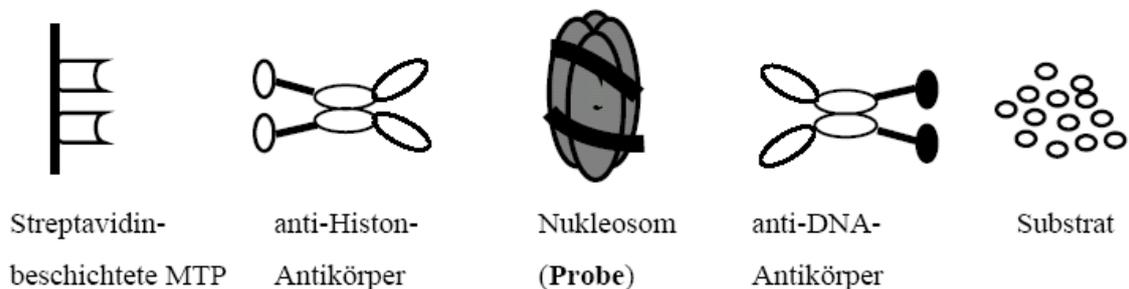
10000 SZ95 Sebozyten pro Napf wurden in einem 8-Napf-Objektträger bis zur Adhärenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit serumfreiem Sebomed[®] basal-Medium depriviert und schließlich mit verschiedenen Testsubstanzen stimuliert. In einige Objektträgerkammern wurde Linolensäure (10^{-5} M) zugefügt. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Zellen für 60 Minuten in Paraformaldehyd 10% fixiert. Danach wurden die Kulturen mit destilliertem Wasser vorsichtig einmal gespült und 120 Minuten in Oil-Red O Gebrauchslösung gefärbt. Durch einmaliges Spülen und Waschen mit bidestilliertem Wasser wurde die Färbelösung entfernt. Dabei wurde visuell

mit dem Fluoreszenzmikroskop in Dreifachproben die Zellzahl pro 100 Zellen ermittelt, die mit Lipidgranula behaftet waren.

2.2.6 Apoptosemessung

Zur genaueren Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde der kommerziell erhältliche „Cell Death Detection ELISA_{PLUS}“ von Roche, Mannheim verwendet. Dieser Sandwich-Enzym-Immunoassay detektiert mit Hilfe von Peroxidasegekoppelten murinen monoklonalen Antikörpern Histon- und DNA Komponenten von Mono- und Oligonukleosomen, die im Zuge der Apoptose gebildet werden (Abb.3). Die relative Anzahl apoptotischer Zellen korreliert mit der Menge der vorhandenen Nukleosomen, die nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates durch die Peroxidase anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes abgelesen werden kann.

Abb. 4: Reaktionsschema



Prinzip des „Cell Death Detection ElisaPlus“:

Zu der im Kit enthaltenen Mikrotiter-Platte, die mit Streptavidin beschichtet ist, wird Zellysate gegeben. Der anschließend zugegebene Anti-Histon-Biotin Antikörper bindet einerseits mittels Biotin an die Streptavidin-Beschichtung, andererseits an das Histon. Der zweite Antikörper, welcher Peroxidase-

gekoppelt ist, detektiert die um Histon gewickelte DNA, wobei die nun beidseitig durch Antikörper fixierten Nukleosomen in dem sogenannten „Sandwich-Komplex“ gehalten werden. Das zuletzt zugegebene Substrat wird durch die Antikörper- gekoppelte Peroxidase umgesetzt, was durch Farbumschlag von farblos nach grün angezeigt wird und in einem ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen werden kann.

Hierzu wurden für 24 Stunden 100000 SZ95 Sebozyten pro 3,5 cm Schale in Sebomed[®] basal-Medium ausgesät. Unmittelbar danach erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Sebomed[®] basal-Medium für weitere 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Zellstimulation sowohl mittels Sebomed[®] basal-Medium mit 10 % FCS als auch mit Sebomed[®] basal-Medium mit 1 % FCS plus α -MSH. Einen Tag später erfolgte die Apoptosemessung.

Hierzu wurden die Zellen 10 min bei 2,5 rpm inklusive aller Überstände zentrifugiert und 200 μ l des mitgelieferten Lysispuffers hinzugegeben.

Die Lyse der Zellen erfolgte in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneuter Zentrifugation wurden 20 μ l des Überstandes auf die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte übertragen und 80 μ l des Immunoreagentiums hinzu gegeben. Zusätzlich wurden eine im Test- Kit enthaltene Positivkontrolle und ein leerer Ansatz als Negativkontrolle auf derselben Platte getestet. Der Ansatz wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde jeder Napf dreimal mit 200 μ l Inkubationspuffer gewaschen und unmittelbar danach mit 100 μ l der Substratlösung suspendiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelte sich die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider, der mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 405 vermessen wurde. Alle Versuchsdurchläufe wurden mit Triplikate durchgeführt.

2.3 Statistische Auswertung

Zur Vergleichbarkeit der Daten sind statistische Evaluierungen erforderlich mit dem Ziel der Minimierung von Unberechenbarkeiten. Der Zufall wird nicht eliminiert, sondern quantifiziert (Weiß, 2005).

Zur Erstellung dieser Arbeit, der enthaltenen Abbildungen und Tabellen, wurde die Office Software mit den Programmen Word[®], Excel[®] und PowerPoint[®] (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) und den darin enthaltenen Funktionen zur Erstellung von Text, Tabellen, Abbildungen und mathematischen Berechnung verwendet. Die Messwerte erfahren hier eine statistische Analyse mit dem Ziel, charakteristische Eigenschaften zu beschreiben. Die Ergebnisse wurden der deskriptiven Statistik unterzogen. Zur statistischen Signifikanzanalyse wurde der student's t-Test mit dem Software-Programm Microsoft Origin[®] verwendet. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant angesehen. Der t-Test ist eine Entscheidungsregel auf einer mathematischen Grundlage, mit deren Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Der t-Test untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier Gruppen systematisch unterscheiden. Die inhaltliche Hypothese muss in eine statistische Hypothese umgewandelt werden.

3. Ergebnisse

3.1 In situ-Nachweis von Melanozyten in der humanen Talgdrüse

Die Präsenz von Melanozyten in der humanen Talgdrüse, wie ursprünglich von Ito *et al.* (1976) mittels Elektronenmikroskopie beschrieben, wurde als erstes immunfluoreszenzoptisch - quasi als essentielle Grundlage aller folgenden funktionellen Untersuchungen - untersucht. Als melanozytärer Marker wurde hierzu der monoklonale Antikörper anti-NKI/beteb benutzt, der gegen die

prämelanosomalen 100 + 7 KDa Glykoproteine gerichtet ist und deswegen nicht nur reife, sondern auch „inaktive“ Melanozyten erkennt. Immunfluoreszenzfärbungen von Kryomaterial gesunder humaner Haut (n=3) mit diesem Antikörper und einem anti-Maus FITC-gekoppelten Zweitantikörper zeigten erwartungsgemäß eine hochspezifische zytoplasmatische Färbung epidermaler Melanozyten (Abb.5). Diese epidermale NKI/beteb-Immunreaktivität war in regelmäßigen Abständen gemäß der 20:1-Keratinozyten-Melanozyten-Ratio in der Oberhaut verteilt.

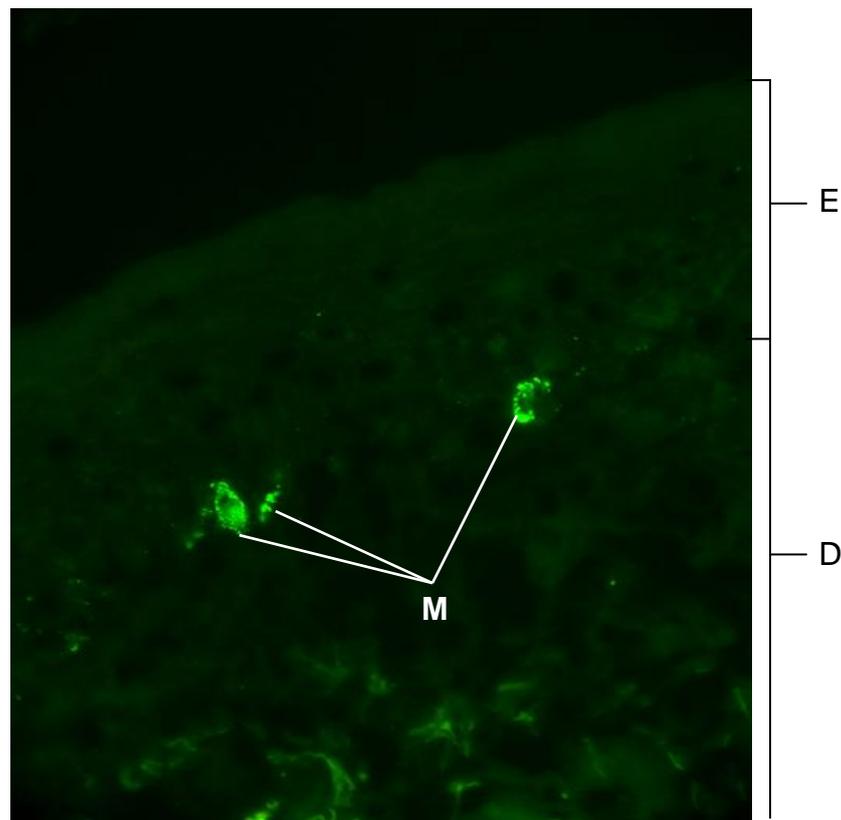


Abb. 5: Immundetektion von epidermalen Melanozyten in der Epidermis mittels NKI/beteb-Immunfluoreszenz. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3 Färbungen mit ähnlichem Ergebnis. D=Dermis; E=Epidermis; M=Melanozyten.

In Bestätigung der Daten von Ito *et al.* (1976) fanden sich in den Talgdrüsen vereinzelte NKI/beteb-positive Zellen, die in der Mehrzahl in den peripheren Anteilen der Acini, d. h. zwischen den undifferenzierten basalen Sebozyten lokalisiert waren (Abb.6).

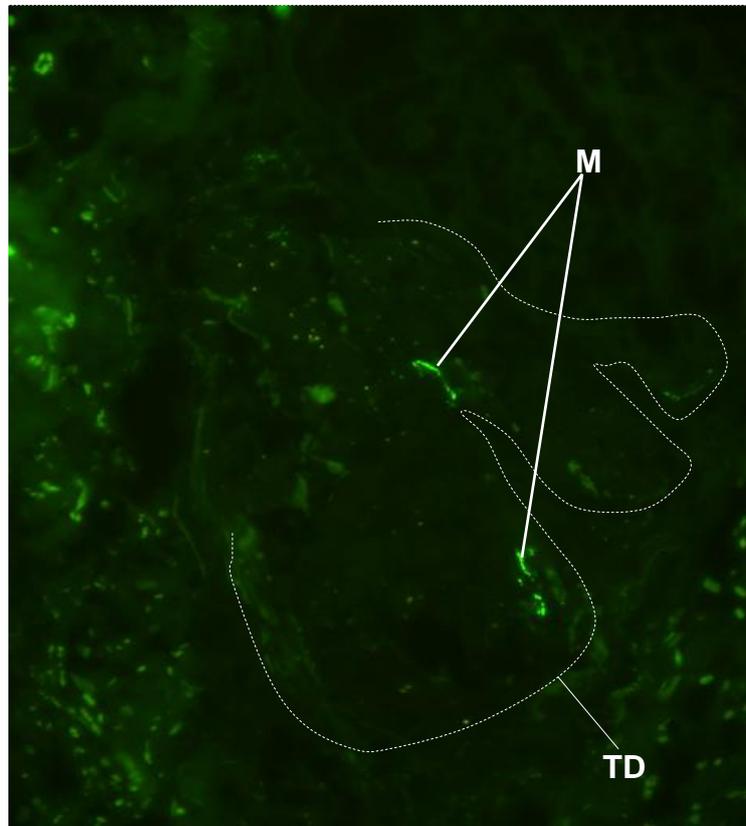


Abb. 6: Immundetektion von Melanozyten in der Talgdrüse mittels NKI/beteb-Immunfluoreszenzfärbung. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3 Färbungen mit ähnlichem Ergebnis. TD=Talgdrüse; M=Melanozyten.

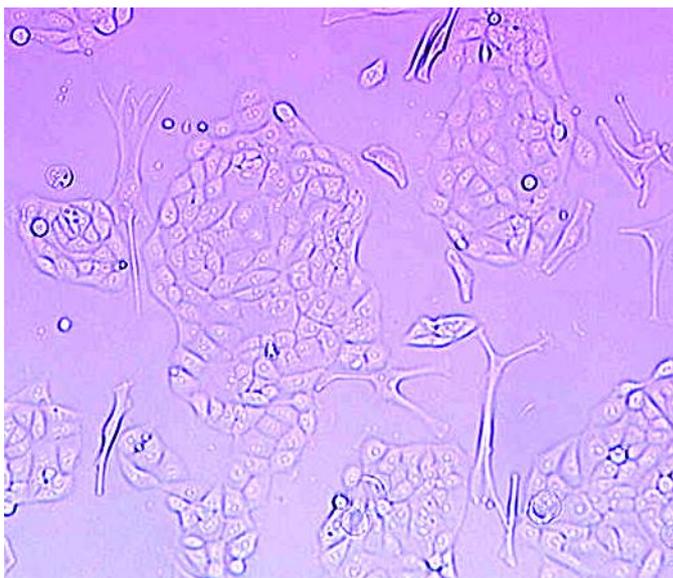
Die Negativkontrolle mit dem Zweitantikörper alleine (sog. Konjugatkontrolle) zeigte keine Immunfluoreszenz (nicht gezeigt). Zusammengefasst belegen diese Immunfärbungen die Existenz von Melanozyten in der humanen Talgdrüse des Menschen

3.2 Zelluläre Interaktionen in der Sebozyten-Melanozyten Kokultur

Um einen ersten Einblick in die mögliche Funktion von Melanozyten in der Talgdrüse zu gewinnen, wurden Kokulturen von humanen epidermalen Melanozyten und SZ95-Sebozyten angelegt.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen repräsentative Kokulturen von normalen humanen Melanozyten und SZ95-Sebozyten in PromoCell® M2- Medium. Dabei waren die SZ95-Sebozyten in ihrer typischen Azinus-Konfiguration wie schon am 1. Tag nach ihrer Aussaat erkennbar. Die Melanozyten lagerten sich in die Zwischenräume der SZ95-Sebozyten-Zell-Cluster ein. Die Dendritenbildung der Melanozyten war nach 24 Stunden noch gering und nur wenige Zellkontakte bestanden zu den SZ95-Sebozyten. Die meisten Melanozyten waren größtenteils bipolar.

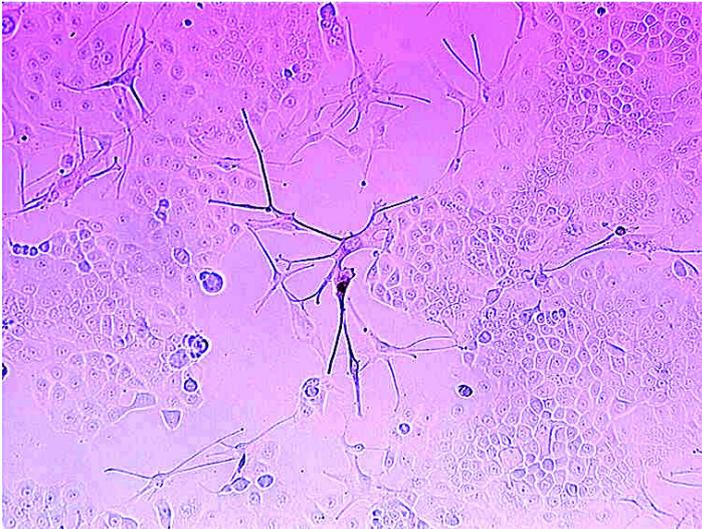
Abb. 7: SZ95-Sebozyten-Melanozyten Kokultur nach 48 Stunden



Nach weiteren 24-48 Stunden schien die Proliferation der SZ95- Sebozyten angeregt im Gegensatz zu SZ95-Reinkulturen in PromoCell® M2-Medium. Die Zellzwischenräume der Sebozyten wurden kleiner, ein höherer Konfluenzgrad

wurde schneller erreicht und Mitosefiguren waren vermehrt zu erkennen. Die Melanozyten verzweigten sich zunehmend mit Ausbildung multipolarer Zellen (Abbildung 8).

Abb. 8: SZ95-Sebozyten-Melanozyten Kokultur nach 96 Stunden



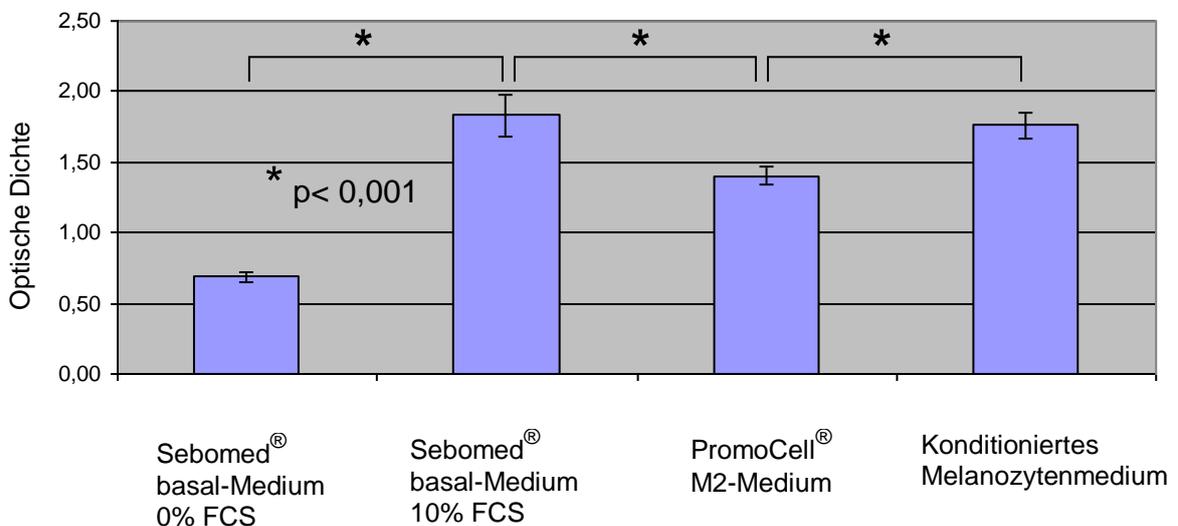
Demgegenüber zeigten Melanozyten kokultiviert mit SZ95- Sebozyten in Sebomed[®] basal-Medium bereits nach 24 Stunden ein Absterben. Eine Langzeitkokultur von Melanozyten und SZ95 Sebozyten in PromoCell[®] M2-Medium für mehr als 96 Stunden war allerdings trotz Mediumwechsel nicht möglich. Die Melanozyten kugelten sich ab und begannen sich abzulösen.

3.3 Konditioniertes Melanozytenmedium erhöht die metabolische Aktivität von Sebozyten

Als nächstes wurde untersucht, ob die verwandten Zellkulturmedien insbesondere das konditionierte Melanozytenmedium die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten anregt.

Abbildung 9 zeigt eine Analyse der Effekte mehrerer Zellkulturmedien auf die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten mittels XTT-Test. Dieser Test wird allgemein auch zur Einschätzung der Zellproliferation benutzt, misst aber streng genommen nur die metabolische Aktivität. Erwartungsgemäß war die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten in Gegenwart von 10% FCS signifikant stärker als bei Abwesenheit von FCS. Serumfreie Kulturbedingungen hatten gegenüber PromoCell® M2-Medium und konditioniertem PromoCell® M2-Melanozytenmedium die geringste metabolische Aktivität zur Folge.

Abb. 9: Effekt verschiedener Zellkulturmedien auf die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten



In Übereinstimmung mit der Kokultur von SZ95-Sebozyten und Melanozyten war die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten in konditioniertem PromoCell® M2-Melanozytenmedium signifikant höher als in PromoCell® M2-Medium. Konditioniertes PromoCell® M2-Medium war im Hinblick auf die sebozytäre-metabolische Aktivität der Sebozyten sogar äquipotent wie Routinemedium Sebomed® basal-Medium 10% FCS. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass

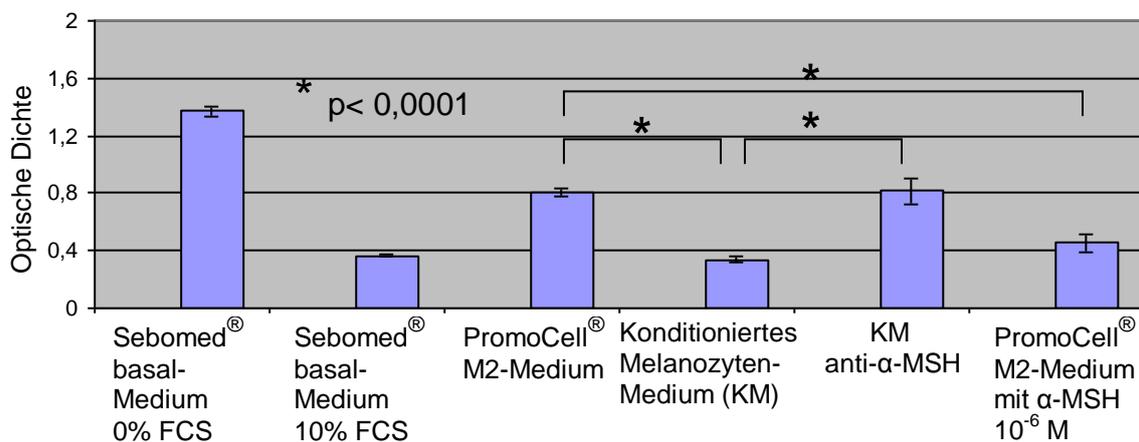
die humanen Melanozyten offenbar einen Faktor oder mehrere Faktoren sezernieren, die die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten anregen.

3.4 Identifizierung von α -MSH als anti-apoptotischer Faktor in konditioniertem Melanozytenmedium

Basierend auf den gefundenen Daten des XTT-Tests wurde als nächstes geprüft, ob konditioniertes PromoCell[®] M2-Medium in der Lage ist die Apoptose von SZ95-Sebozyten zu unterbinden. Zur Apoptosemessung wurde hierzu ein „Cell Death Detection ELISA“ (CDDE) benutzt, der die Menge an Mono- und Oligonukleosomen misst.

Erwartungsgemäß war die Rate apoptotischer SZ95-Sebozyten in Abwesenheit von FCS sehr hoch (Abb. 10).

Abb. 10: Apoptosemessung



In Gegenwart von Routinekulturmedium von SZ95-Sebozyten reduzierte sich die Menge apoptotischer Zellen deutlich. Die basale Apoptoserate in Routine-medium könnte ein Hinweis auf den holokrinen Sekretionstyp, in welchem die Sebozyten durch die eigene Lipogenese schließlich zugrunde gehen, sein. In

Analogie zu den Ergebnissen des XTT-Tests, zeigten SZ95- Sebozyten in Gegenwart von PromoCell® M2-Medium eine signifikant reduzierte Apoptose gegenüber serumfreien Kulturbedingungen. Die Apoptoserate von Sebozyten in konditioniertem PromoCell® M2-Melanozytenmedium war vergleichbar niedrig wie im Routinemedium. Eine Koinkubation von SZ95-Sebozyten mit einem polyklonalen α -MSH Antikörper neutralisierte die anti-apoptotische Wirkung von konditioniertem PromoCell® M2-Melanozytenmedium. Die Ergänzung von PromoCell® M2-Medium mit α -MSH führte zu dem gegenteiligen Effekt einer reduzierten Apoptose.

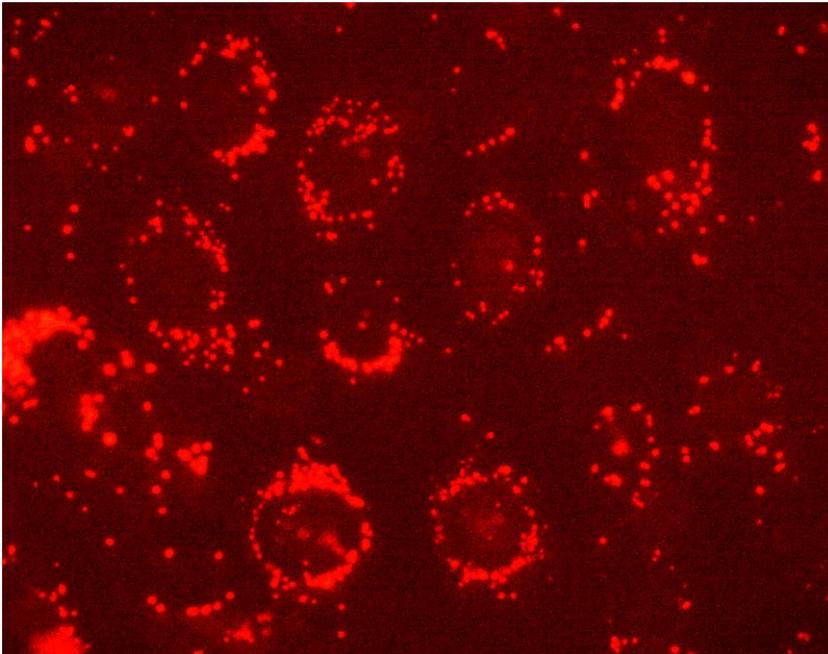
Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass α -MSH Einfluß auf die Apoptoserate nimmt und die metabolische Aktivität der SZ95-Sebozyten erhöht.

3.5 Konditioniertes Melanozytenmedium unterdrückt die Lipogenese von Sebozyten

Da zellbiologisch Proliferation und Differenzierung häufig entgegengesetzt sind (z.B. in der Epidermis, aber auch in der Talgdrüse), haben wir als nächstes den Einfluss unterschiedlicher Medien auf die Lipogenese in SZ95-Zellen untersucht.

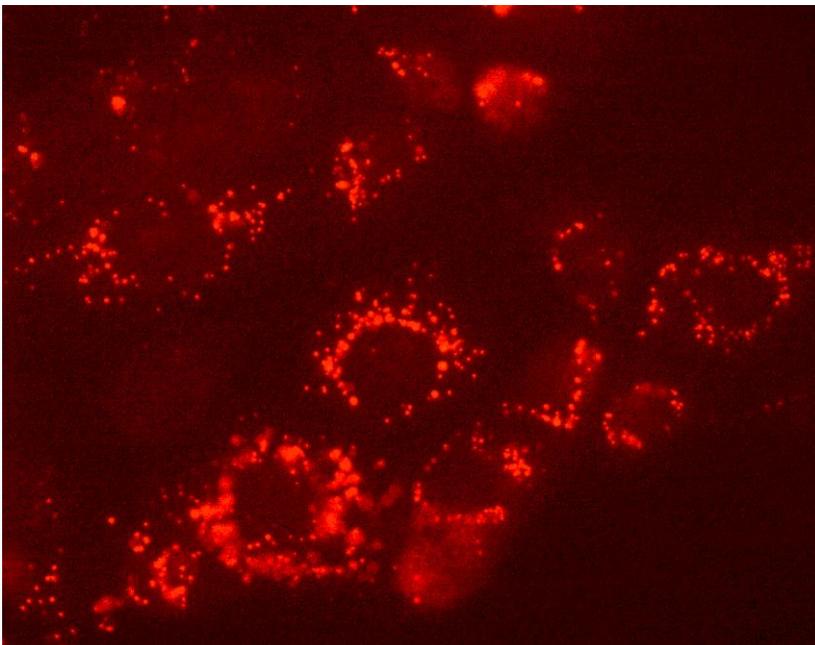
Zur semiquantitativen Lipidmessung wurde hierzu die Nilrot Färbung benutzt (Abb.14). In Gegenwart von Sebomed® basal-Medium mit 10% FCS zeigten sich multiple kleine Lipidgranula in nahezu jedem Sebozyt pro Gesichtsfeld (Abb.11).

Abb. 11: Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in Sebomed[®] basal-Medium (10% FCS)



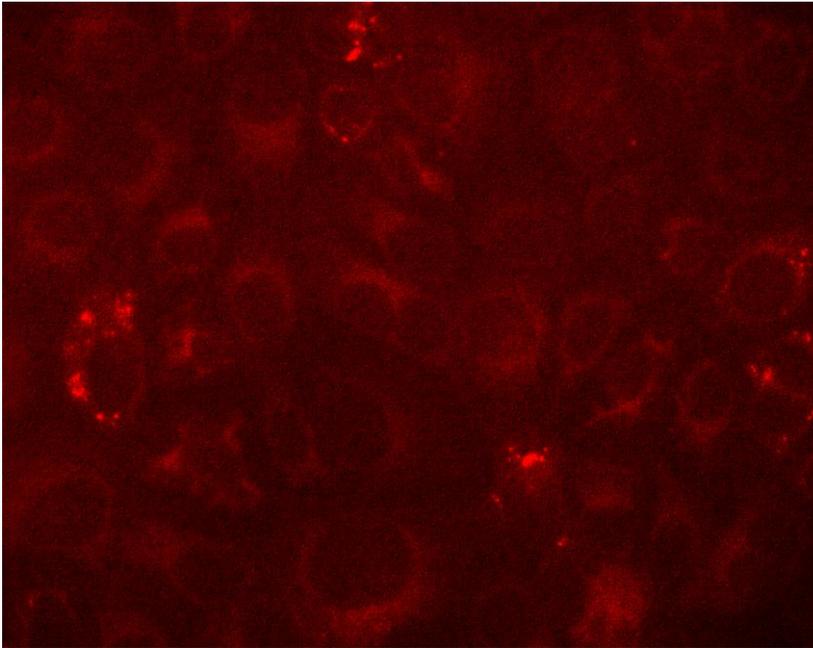
In PromoCell[®] M2-Medium kultivierte SZ95-Zellen zeigten eine etwas geringere Anzahl der Lipidgranula (Abb.12).

Abb. 12: Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in PromoCell[®] M2-Medium



Konditioniertes Melanozytenmedium bewirkte eine dramatische Verminderung der Zahl und Größe der Lipidgranula in den Sebozyten (Abb. 13).

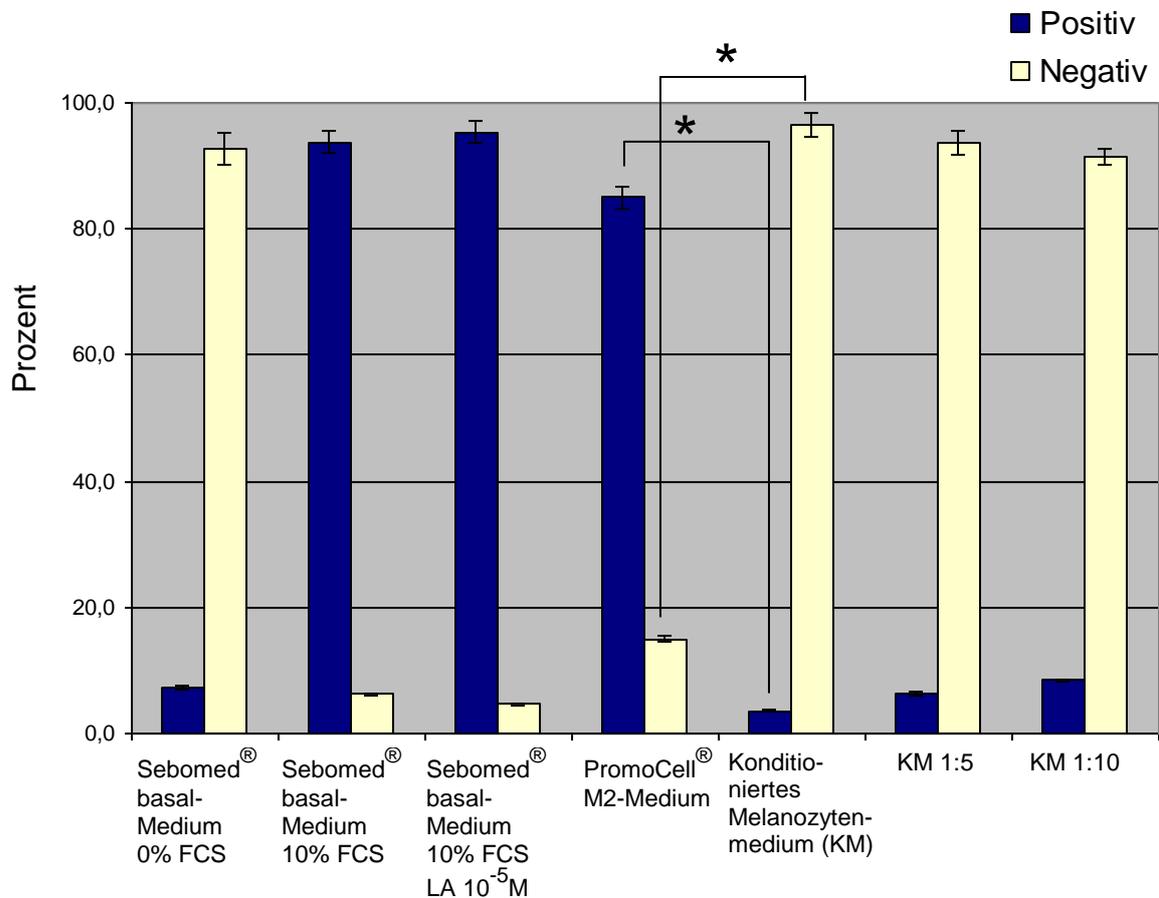
Abb. 13: Gehemmte Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in konditioniertem PromoCell® M2-Medium



Um den Effekt der unterschiedlichen Medien zu quantifizieren wurden jeweils in 10 verschiedene Gesichtsfeldern mit Lipidgranula geladene und ungeladene SZ95-Sebozyten ausgezählt und das Verhältnis prozentual ausgewertet.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der prozentualen Verteilung grafisch dargestellt. Erwartungsgemäß waren wenige Lipidgranula-positive Zellen in Abwesenheit von FCS zu erkennen, wohingegen in Sebomed® basal-Routinemedium die Dichte der Lipidgranula dramatisch (nahezu 100!) zunahm. Eine Supplementierung dieses Routinemediums mit Linolensäure (LA) bewirkte keinen Unterschied. Interessanterweise wurde durch das konditionierte Melanozytenmedium die Lipogenese fast vollständig gehemmt.

Abb. 14: Veränderung der Lipidsynthese in SZ95-Sebozyten in verschiedene Nährmedien



* $p < 0,0001$

Im Gegensatz dazu war die Lipidgranula-Dichte der Zellen in PromoCell[®] M2-Medium deutlich erhöht und ähnlich wie in Sebomed[®] basal-Medium mit 10% FCS.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass in konditioniertem Melanozytenmedium eine Substanz von den Melanozyten enthalten ist, der die Lipogenese der SZ95-Sebozyten unterdrückt.

4. Diskussion

4.1 Seboglanduläre Melanozyten – ein verkanntes Melanozyten-Reservoir?

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass Melanozyten in der Talgdrüse des menschlichen Körpers vorkommen. Unsere Daten bestätigen vormals publizierte elektronenmikroskopische Beobachtungen von Ito *et al.* (1976). Diese Autoren beobachteten, dass Melanozyten in der humanen Talgdrüse basal oder suprabasal in den Drüsenendstücken und im Ausführungsgang lokalisiert sind. Diese intraglandulären bzw. intraduktalen Melanozyten zeichneten sich im Gegensatz zu epidermalen Melanozyten durch eine geringe Dendritenzahl aus. In vereinzelt Melanozyten konnte man Melaningranula feststellen. Bis heute gibt es keine weiteren Untersuchungen über Melanozyten in der humanen Talgdrüse.

Interessanterweise berichtete Takeda (1997) auch über die Existenz von Melanozyten in der Glandula parotidea. Er fand in einem von insgesamt 400 Autopsiefällen Melanozyten im interlobulären Gangsystem dieser Drüse. Die Präsenz von Melanozyten in der Ohrspeicheldrüse scheint deswegen kein Regelfall zu sein. Die Melanozyten waren hierbei basal oder suprabasal im hyperplastischen Drüsenepithel lokalisiert. Die gleiche Arbeitsgruppe identifizierte wenige Jahre später Melanozyten auch in den kleinen Speicheldrüsen; dabei waren die HMB-45 positiven Zellen entweder in kleineren Zellgruppen oder auch einzeln unregelmäßig im periduktalen und periacinären Bindegewebe ohne direkten Kontakt zum Drüsenepithel verteilt (Takeda, 2000). Im Gegensatz zur Glandula parotidea und humanen Talgdrüse konnten jedoch weder Melanozyten noch Melaningranula im Drüsenepithel der kleinen Speicheldrüsen detektiert werden. Von einem routinemäßigen Vorkommen der Melanozyten in den kleinen Speicheldrüsen kann auch in diesem Fall nicht gesprochen werden, da die Inzidenz bei 1.8% lag. Interessanterweise kann die Existenz von Melanozyten in der Ohrspeicheldrüse Anlass für ein malignes Melanom sein. Seit 1975 wurden 25 Fälle eines

primären Melanoms der Ohrspeicheldrüse publiziert. Primärmanifestationen eines Melanoms innerhalb der Glandula parotidea sind demnach außergewöhnlich selten (Bussi *et al.*, 1999; Barbieri *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die Entstehung solcher Melanoma im Drüsengewebe selbst oder in den intraglandulären Lymphknoten beginnt (Dasgupta *et al.*, 1963; Chang *et al.*, 1982). Bemerkenswert ist, dass primäre Melanome bislang nur in der Glandula parotidea und nicht in den kleinen Speicheldrüsen, in denen üblicherweise intraglanduläre Lymphknoten nicht vorkommen, beschrieben wurden (Maier *et al.*, 2008).

Das Vorkommen der Melanozyten in der Talgdrüse lässt eine andere Funktion als die der Pigmentierung vermuten, da typischerweise diese Zellen in Routineschnitten von normaler humaner Haut keine nennenswerte Pigmentbildung aufweisen. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich zunächst zwei Fragen: 1) Wie gelangen die Melanozyten in die Talgdrüse? und 2) Welche Funktion haben diese Zellen in der Talgdrüse? Eine mögliche Erklärung auf die erste Frage gibt die Entwicklung der Haut und ihrer Anhangsgebilde. Im Laufe des dritten Fetalmonats wandern die noch inaktiven Melanozyten aus der Neuralleiste in die Epidermis ein. Dort sind sie in der Basalzellschicht lokalisiert. Einen Monat später werden sie aktiv. Das Epithel der Epidermis leitet sich demgegenüber von dem Ektoderm ab. Im 5. Schwangerschaftsmonat vollzieht sich die Entwicklung der Talgdrüsen. Es sind ausdifferenzierte ektodermale Epithelausstülpungen, die in das darunter liegende Mesoderm einspießen. Demnach werden die Melanozyten mit dem sog. Epithelgemisch in die Tiefe als Epithelknospe gezogen, aus dem sich im weiteren Verlauf der Embryogenese die Talgdrüse entwickelt (Holbrook *et al.*, 1975; Pinkus, 1910; Serri, 1963). Es ist jedoch vollkommen offen, in welchem numerischen Verhältnis die Melanozyten zu den Talgdrüsenzellen in der Talgdrüse stehen. Zukünftige Studien könnten deswegen anhand von Serienschnitten und Immunfärbungen z. B. mit anti-NKI/beteb-, anti-MART1, anti-HBM45-Antikörpern oder weiteren anti-Melanozyten-Antikörpern diese Frage angehen.

Die seboglandulären Melanozyten bilden somit ein verkanntes dermales Reservoir. Eine mögliche Funktion dieses Reservoirs könnte in der

regenerativen und primären Wundheilung liegen. Dabei liegen die Wundränder eng zusammen, es befinden sich keine Fremdkörper oder bakterielle Verunreinigungen in der Wunde. Eine vollständige Regeneration ist möglich. Maßgeblich an der vollständigen Pigmentierung der regenerierten Haut sind die Melanozyten beteiligt. Zunächst bewirken die epidermalen Melanozyten den größten Teil der Repigmentierung. In unmittelbarer räumlicher Nähe befinden sich jedoch die Talgdrüsen. Diese könnten unter Umständen aufgrund ihrer topografischen Lage in größerem Umfang auch an der Repigmentierung beteiligt sein. Eine unterstützende Funktion bei der Repigmentierung aus dem Melanozyten-Reservoir der Talgdrüse ist darüber hinaus nicht nur bei der Wundheilung, sondern auch bei der Vitiligo denkbar.

Dabei handelt es sich um eine erworbene idiopathische, hypomelanotische Hauterkrankung, die durch den Verlust oder eine weitestgehende Inaktivierung von Melanozyten in Haut und Haarbulbus charakterisiert ist. Schleimhautbefall ist ebenfalls möglich. Typische klinische Symptome sind scharf begrenzte depigmentierte Makulae unterschiedlicher Größe, Form und Ausdehnung, die an jeder Körperstelle lokalisiert sein können (Ortonne *et al.*, 1983; Westerhof *et al.*, 1997). Die weltweite Prävalenz beträgt 0,5-4%. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen. In 30-40% der Fälle findet sich eine positive Familienanamnese. Die Ätiologie ist immer noch lückenhaft. Die Melanozyten stellen zunächst die normale Melanogenese ein. Diese Phase ist möglicherweise reversibel. Danach kommt es zur weitestgehenden Zerstörung der Melanozyten. Diese Zerstörung kann auch in den adnexalen Strukturen der Haut stattfinden (Braun-Falco *et al.*, 2002). Als krankheitsauslösend werden immer wieder schwere Sonnenbrände und emotionale Stresssituationen wie Unfälle, Todesfälle in der Familie, Kriegereignisse und schwere Erkrankungen angegeben. Auch am Ort eines lokalen Traumas wurde die Vitiligo als Koebner-Phänomen beobachtet (Braun-Falco *et al.*, 1996; Westerhof *et al.*, 1997). Es gibt im Wesentlichen drei ätiopathogenetische Hypothesen, die autoimmunologische, neurogene und autoaggressiv-melanozytäre Prozesse bei der Vitiligo diskutieren. Die Autoimmunhypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass verschiedene Autoimmunerkrankungen mit der Vitiligo

assoziiert sind. Auslöser der Erkrankung könnte eine Verletzung der Melanozyten mit Freisetzung antigener Substanzen und nachfolgender Autoimmunisation sein. Im Serum von Vitiligo-Patienten können Autoantikörper gegen Melanozyten nachgewiesen werden, die positiv mit dem Ausmaß der Depigmentation korrelieren. Diese so genannten Vitiligoantikörper sind in vitro in der Lage, Pigmentzellen abzutöten. Eine weitere Hypothese geht davon aus, dass neurochemische Mediatoren vorhanden sind, die aus benachbarten Nervenendigungen freigesetzt werden und auf Pigmentzellen zytotoxisch wirken. Gestützt wird diese Hypothese zum einen durch die lokalisierte Form der Vitiligo, die nur auf ein Körpersegment beschränkt ist sowie durch das Auftreten der Vitiligo nach Perioden emotionalen Stresses und in neurologisch geschädigten Hautarealen, wie zum Beispiel bei kindlicher Virusenzephalitis, multipler Sklerose mit Horner-Syndrom und peripheren Nervenverletzungen. Ferner wird die Selbstzerstörungshypothese diskutiert, die auf dem Vorhandensein intermediär toxischer Metabolite beruht. Diese in der Melanogenese gebildeten Vorstufen wirken melanozytotoxisch. Intrazelluläre Mechanismen, die beim gesunden Patienten toxische Melaninvorstufen eliminieren, scheinen beim Vitiligo-Patienten gestört zu sein, so dass es zu einer Destruktion der Melanozyten kommt. In den letzten Jahren konnte insbesondere durch Schallreuter und Mitarbeiter demonstriert werden, dass dramatisch erhöhte Mengen an Wasserstoffperoxid, ein Molekül, das in die Familie der reaktiven Sauerstoffspezies eingruppiert wird, in läsionaler Haut von Patienten mit Vitiligo vorkommen (Schallreuter *et al.*, 1999). Aufgrund der weitestgehend unklaren Ätiologie der Vitiligo ist eine kausale Behandlung noch nicht möglich. Prinzipiell bestehen 3 Behandlungsstrategien: Die Maskierung der Leukoderme, die irreversible Depigmentierung der verbliebenen unbeeinträchtigten Epidermis oder die Repigmentierung der Leukoderme.

Die heutigen Behandlungsmöglichkeiten zielen vor allem auf eine Repigmentierung der betroffenen Hautareale ab. Auch hierbei gibt es breit gefächerte Möglichkeiten zu denen vor allem konservative Verfahren gehören. Hier werden systemisch verabreichtes 8-oder 5-Methoxypsoralen plus UVA (PUVA), Phenylalanin und UVA (PAUVA), Khellin und UVA (KUVA), topische

Glukokortikoide und Calcineurininhibitoren, UVB-Schmalband (311nm) mit und ohne Pseudokatalase, Balneo-PUVA und die Kombination von UVA/UVB-Bestrahlung mit Solebädern eingesetzt. Die Wirkmechanismen der Repigmentierung der Phototherapien vs. der konservativen topischen immunmodulierenden/-suppressiven Verfahren (Kortikosteroide, topische Calcineurininhibitoren) sind im einzelnen verschieden, allen gemeinsam ist jedoch eine Aktivierung noch vorhandener epidermaler Melanozyten und/oder die Rekrutierung von Pigmentzellen aus noch vorhandenen dermalen Melanozyten-Reservoirs (Nishimura *et al.*, 2002). Hier wurde bislang dem Haarfollikel die größte Aufmerksamkeit geschenkt. Durch den Melanosomenmarker NKI/beteb konnten Narisawa *et al.* (1997) dendritische, melaninproduzierende Melanozyten in der Wulstregion des Haarfollikels nachweisen. Die gängige These ist, dass bei der Repigmentierung der Vitiligo die noch inaktiven Melanozyten entlang der äußeren Wurzelscheide in Richtung Epidermis wandern. Immunhistologische Studien könnten in Zukunft erste Informationen über das Vorhandensein von Melanozyten in der Talgdrüse von läsionaler Haut bei Vitiligo-Patienten liefern. Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Talgdrüsendichte in den unterschiedlichen Körperregionen im Bezug auf die Repigmentierung der Leukoderme bei Vitiligo. Bekannt ist, dass die Verteilung der Talgdrüsen in den einzelnen Körpersegmenten sehr variabel ist. Die Zahl der Talgdrüsen schwankt wegen ihrer Bindung an den Haarfollikel regional, ebenso ihre Größe. Eine besonders hohe Talgdrüsendichte findet sich typischerweise in der Haut an der Stirn, Kopfhaut, an den Wangenpartien, im Gesicht sowie an der hinteren und vorderen Schweißrinne des Thorax. Viele Studien belegen in der Tat, dass sich vor allem in den oben erwähnten Arealen (Gesicht, Hals, proximaler Oberkörper) die beste therapeutische Repigmentierung bei der Vitiligo erzielen lässt (Whitton *et al.*, 2008), welches möglicherweise als ein Hinweis für das verkannte Melanozyten-Reservoir in der Talgdrüse verstanden werden könnte.

4.2 Seboglanduläre Melanozyten – Stress-Protectoren?

Im Jahre 1929 prägte Cannon eine bereits 1863 von Bernard beschriebene Vorstellung eines Fließgleichgewichtes innerhalb eines Organismus (Cannon, 1929). Sämtliche biologischen Prozesse eines Individuums laufen im Rahmen eines homöostatischen Gleichgewichtes ab und sollte es durch innere oder äußere Faktoren zu einer Störung dieses Gleichgewichtes kommen reagiert der Körper mit einer Alarmreaktion. Cannon bezeichnet dies als Notfallreaktion, welche als physiologische Grundlage die Aktivierung des adrenomedullären Systems („Sympathikus“) zur Folge hat und zum Angriff oder zur Flucht (fight or flight) befähigen soll (Panconesi & Hautmann, 1996). Im Tierexperiment bestätigte 1936 Selye dieses Konzept und verwendete erstmals den Begriff Stress.

Die Haut ist als Grenzorgan genau wie z.B. der Darm multiplen exogenen Stressoren ausgesetzt. Sie ist eines unserer Sinnesorgane und sie stellt ein wichtiges Kommunikationsorgan mit der Umwelt dar. Die Haut spielt eine entscheidende Rolle für die Selbstwahrnehmung und das Selbstbewusstsein des Individuums. Zwischen der Haut und dem zentralen Nervensystem besteht schon entwicklungsgeschichtlich eine enge Verbindung. So entstehen Epidermis und Neuralplatte beide aus dem Ektoderm und verfügen über viele Hormone, Neurotransmitter und Rezeptoren gemeinsam. Einige Neuropeptide wirken als Neurotransmitter in der Haut. Sensible Nerven haben nicht nur eine afferente Funktion, sie sind durch die Sekretion von Neuropeptiden auch efferent tätig und können somit ihrerseits eine Vasodilatation und Schwellungen auslösen (Panconesi & Hautmann, 1996). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Haut bemerkenswerterweise über ein funktionell analoges neuroendokrines Netzwerk verfügt wie die klassische Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse (Slominski *et al.*, 2000; Böhm *et al.*, 2006). Dabei verfügt speziell die Talgdrüse über eine ganze Reihe von Neuromediatoren und entsprechende Rezeptoren, wie z. B. CRH, CRH-R1, CRH-R2, POMC, ACTH, α -MSH, MC-1R, MC-5R oder Opioidrezeptoren (Böhm & Luger 2008). Im Bezug auf die Opioidrezeptoren, die die Wirkung des POMC-

Peptids β -Endorphin (β -ED) vermitteln, konnte gezeigt werden, dass SZ95-Sebozyten den μ -Opioid-Rezeptor (MOR) exprimieren (Böhm *et al.*, 2004). Neuere Untersuchungen belegen, dass MOR sowohl *in vitro* als auch *in situ* in humanen Talgdrüsenzellen vorkommen. β -ED modulierte dabei die Zellproliferation, Lipogenese und könnte möglicherweise auch bei der Immun- und Entzündungsantwort der Talgdrüse eine Rolle spielen (Böhm *et al.*, 2004). α -MSH ist in diesem Zusammenhang ein pleiotroper Faktor und hat potente Effekte auf das Immunsystem. Es hat modulierende Wirkung auf Entzündungsreaktionen, in dem es diese unterdrückt. Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften besitzt α -MSH anti-apoptische und zytoprotektive Fähigkeiten (Brzoska *et al.*, 2008). Mehrere Studien konnten sowohl den MC-1R als auch den MC-5R innerhalb der Talgdrüse nachweisen (Böhm *et al.*, 2002; Hatta *et al.*, 2001; Thiboutot *et al.*, 2000). Die MC-1R-Expression wurde hierbei v. a. in undifferenzierte Sebozyten detektiert. Der MC-5R war besonders in den terminal differenzierten Zellen lokalisiert (Zhang *et al.*, 2003, 2006). Die Tatsache, dass Melanozyten in der Talgdrüse vorkommen, deutet daraufhin, dass ein Teil der zuvor beschriebenen MC-1R-Immunreaktivität der Talgdrüse (Böhm *et al.*, 2002) auch durch seboglanduläre MC-1R-exprimierte Melanozyten zustande kommen könnte. Die in der Talgdrüse *in situ* detektierte MC-1R-Immunreaktivität in basalen Sebozyten war jedoch wesentlich prominenter als man dies bei einzelnen intraglandulären Melanozyten erwarten würde.

Bzgl. der Expressions- und Sekretionsfähigkeit von Neuropeptiden durch Melanozyten erhebt sich deswegen die Frage, ob Melanozyten in der humanen Talgdrüse nicht Botenstoffe an undifferenzierte Sebozyten abgeben und dadurch deren Funktion und Aktivität modulieren. Wie in der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet werden konnte, sezernieren Melanozyten *in vitro* lösliche Substanzen, die die Apoptose von SZ95-Sebozyten nach Serumdeprivation unterdrücken. Als mutmaßlicher Faktor wurde hier α -MSH in konditioniertem PromoCell[®] M2-Medium identifiziert, da die Supplementierung von PromoCell[®] M2-Medium mit α -MSH ähnlich wie konditioniertes PromoCell[®] M2-Medium antiapoptotisch wirkte. Es wäre deshalb hochinteressant zu

untersuchen, ob konditioniertes PromoCell® M2-Medium bzw. α -MSH *in vitro* den Effekt noch anderer mehr physiologischer Apoptose-Induktoren attenuieren kann. In Frage kommen hier proinflammatorische Zytokine und Faktoren wie z.B. IL-1, *Propionibacterium acnes*, TNF- α oder bestimmte ungesättigte Fettsäuren. Ob seboglanduläre Melanozyten via sezerniertes α -MSH immunmodulierende oder zytoprotektive Effekte *in vivo* haben, bleibt abzuwarten. Tatsächlich konnte zumindest die Expression von POMC-RNA in der Talgdrüse gezeigt werden (Kono *et al.*, 2001).

4.3 Seboglanduläre Melanozyten – Regulatoren der Talgdrüsenfunktion?

In dieser Arbeit konnte als Grundlage aller funktionellen Untersuchungen gezeigt werden, dass Melanozyten in der Talgdrüse immunfluoreszenzoptisch nachweisbar sind. Als weiteres Ergebnis konnten wir zeigen, dass konditioniertes Melanozytenmedium nicht nur die Apoptose von SZ95-Sebozyten durch Serumdeprivation, sondern auch die Lipidsynthese dieser Zellen unterdrückt.

Bekanntermaßen ist eine gesteigerte Lipidsynthese (Seborrhoe) ein Kardinalmerkmal der Akne vulgaris. Die Akne vulgaris ist vor allem im adoleszenten Alter mit einer Inzidenz von 40-50 % weit verbreitet. Der Altersgipfel liegt um das 14. Lebensjahr (Breckwoldt; 1994). Ausgangspunkt der Akne vulgaris ist der Talgdrüsenfollikel. Durch eine verstärkte Aktivität der Sebumproduktion der Talgdrüsen und durch eine Hyperkeratose des Infrainfundibulums werden ein Talgrückstau und damit die Komedonenbildung hervorgerufen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ansiedlung von *P. acnes* in den tieferen Abschnitten und von *Staphylococcus aureus* in den höheren Abschnitten der Komedonen. Insbesondere das Zytokin Interleukin 1 α (IL-1 α) scheint eine entscheidende Rolle in den entzündlichen Prozessen der Akne zu spielen (Boehm *et al.*, 1995). Interessanterweise enthalten Komedone keine

oder nur sehr wenige Bakterien, aber dafür einen hohen Spiegel an IL-1 α (Ingham *et al.*, 1992; Eady *et al.*, 1993).

Die von den Bakterien freigesetzten Esterasen induzieren einen enzymatischen Abbau der Talgmassen mit Abspaltung von freien Fettsäuren, die als Mediatoren konsekutiv einen Inflammationsprozess mit Förderung der Hyperkeratose herbeiführen. Durch diesen Inflammationsprozess wird der teils schmerzhaft gerötete Fokus sichtbar, der je nach Ausmaß der bakteriellen Infektion mit eitrigen Absonderungen belegt ist.

Androgene spielen in der Pathogenese der Akne eine wichtige Rolle. Eine erhöhte 5 α -Reduktase Typ I-Aktivität bedingt eine erhöhte Konversion von Testosteron in das wirksamere Dihydrotestosteron (DHT) in den Talgdrüsenfollikeln. Testosteron bzw. DHT stimulieren die Proliferation der Sebozyten und steigern somit konsekutiv die Talgdrüsensekretion (Chen *et al.*, 1996). Die Prävalenz einer Hyperandrogenämie bei Aknepatientinnen beträgt einer Studie von Slayden *et al.* (2001) zufolge 63 %. Dabei waren insbesondere freies Testosteron und DHEAS erhöht.

Neuere Untersuchungen betonen darüber hinaus eine Störung des empfindlichen Gleichgewichts von entzündungshemmenden und entzündungsfördernden Einflüssen aus dem neuroendokrinen System (Zouboulis, 2006). Es besteht eine wechselseitige Beziehung zwischen peripherem Nervensystem und der Haut. Sie verfügt über das vollständige Repertoire an Botenstoffen und Signalkaskaden um beispielsweise Entzündungen entstehen zu lassen oder auch zu hemmen.

In welchem Zusammenhang könnten die seboglandulären Melanozyten mit der Talgdrüsenfunktion und besonders mit der Lipidsynthese stehen? Wie oben beschrieben ist die Talgdrüse eine Androgen-abhängige Struktur. Die Umwandlung von Testosteron in das aktivere DHT geschieht in der Talgdrüse. Die Folge ist eine Aktivierung der Talgdrüse, wobei die Mitoserate und Talgproduktion (Lipidsynthese) erhöht wird. Könnten die von uns nachgewiesenen Melanozyten in der Talgdrüse also die hormonell-vermittelte Differenzierung (Lipidsynthese und Apoptose) modulieren? Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kommt als ein von Melanozyten sezernierter Faktor hier

α -MSH in Frage, da dieses Peptid eine anti-apoptotische Wirkung besitzt. Interessanterweise blockiert konditioniertes Melanozytenmedium die Linolensäure-induzierte Lipidsynthese. Die Identität dieses Faktors ist noch unklar. Das von Melanozyten sezernierte α -MSH scheint hier wenig wahrscheinlich, da bekannt ist, dass α -MSH die Lipogenese von primären Sebozyten fördert (Zhang *et al.*, 2003).

Für zukünftige Untersuchungen wäre es deswegen in diesem Zusammenhang interessant zu erforschen, in welcher Dichte und in welchem Funktionszustand die Melanozyten in der Talgdrüse bei der Akne vorkommen. Das Vorkommen von Melanozyten in der Talgdrüse und ihre wie in der vorliegenden Dissertation beschriebene anti-apoptotische bzw. Lipidsynthese-hemmende Aktivität *in vitro*, könnte auf eine modulierende Funktion auch *in vivo* hindeuten (Abb.15). Hängt vielleicht die Bildung der schwarzen Komedonen („black leads“) von dem Zustand der Melanozyten in der Talgdrüse ab oder sind die seboglandulären Melanozyten bei Akne in ihrer lipidhemmenden Funktion alteriert?

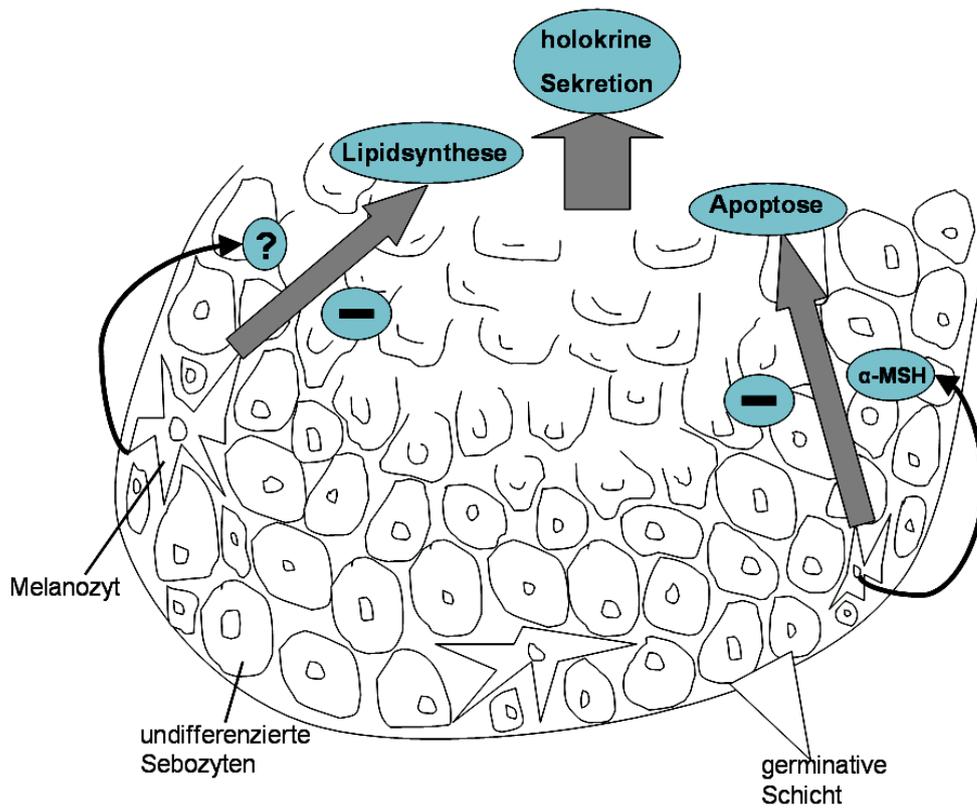


Abb. 15: Mögliches Schema der Interaktion von Melanozyten und Sebozyten in der humanen Talgdrüse

5. Literaturverzeichnis

Barbieri M, Gentile R, Cordone MP, Mora R, Mora F. Primitive malignant melanoma of the parotid gland. *ORL J Otorhinolaryngol Relat* 2002; 64: 297-9.

Boehm KD, Yun JK, Strohl KP, Elmets CA. Messenger RNAs for the multifunctional cytokines interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are present in adnexal tissues and in dermis of normal human skin. *Exp Dermatol* 1995; 4: 335-41.

Böhm M, Moellmann G, Cheng E, Alvarez-Franco M, Wagner S, Sassone-Corsi P, Halaban R. Identification of p90^{RSK} as the Probable CREB-Ser¹³³ Kinase in Human Melanocytes. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 291-302.

Böhm M, Schiller M, Ständer S, Seltsmann H, Li Z, Brzoska T, Metze D, Schiöth HB, Skottner A, Seiffert K, Zouboulis ChC, Luger TA. Evidence for expression of melanocortin-1 receptor in human sebocytes in vitro and in situ. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 533-9.

Böhm M, Li Z, Ottaviani M, Picardo M, Zouboulis ChC, Ständer S, Luger TA, Beta-endorphin modulates lipogenesis in human sebocytes. *J Invest Dermatol* 2004; 123: A10.

Böhm M, Luger TA, Tobin DJ, García-Borrón JC. Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1966-75.

Böhm M, Luger TA. Neurobiology of sebaceous glands. In: Granstein RD, Luger TA, eds. *Neuroimmunology of the Skin*. Berlin, Springer 2008: 159-66.

Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH. *Dermatologie und Venerologie*. Berlin, Springer 1996: 3-40.

Breckwoldt M, Beier M, Neumann F, Bräuer H. *Exempla endocrinologica. Bildatlas zu Aspekten der Pathophysiologie des endokrinen Systems.* Berlin, Schering AG 1994: 70-9.

Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Abels C, Böhm M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev* 2008; 29: 581-602.

Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaud C, Eychene A, Ortonne JP, Ballotti R. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J* 2000; 19: 2900-10.

Bussi M, Cardarelli L, Riontino E, Valente G. Primary malignant melanoma arising in the parotid gland: case report and literature review. *Tumori* 1999; 85: 523-5.

Cannon WB. Organization of physiological homeostasis. *Physiol Rev* 1929; 9: 399-402.

Chang P, Knapper WH. Metastatic melanoma of unknown primary. *Cancer* 1982; 49: 1106-11.

Chen W, Zouboulis ChC, Orfanos CE. The 5 alpha-reductase system and its inhibitors. Recent development and its perspective in treating androgen-dependent skin disorders. *Dermatology* 1996; 193: 177-84.

Dasgupta T, Bowden L, Berg JW. Malignant Melanoma of unknown primary origin. *Surg Gynecol Obstet* 1963; 117: 341-5.

Eady EA, Ingham E, Walters CE, Cove JH, Cunliffe WJ. Modulation of comedonal levels of interleukin-1 in acne patients treated with tetracyclines. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 86-91.

Fimmel S, Zouboulis ChC. Influence of physiological androgen levels on wound healing and immune status in men. *Aging Male* 2005; 8: 166-74.

Fitzpatrick TB, Miyamoto M, Ishikawa K. The evolution of concepts of melanin biology. *Arch Dermatol* 1967; 96: 305-23.

Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis ChC. Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 793-800.

Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson S J, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning of a novel Melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 8246-50.

Gantz I, Miwa H, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 15174-79.

Hatta N, Dixon C, Ray AJ, Phillips SR, Cunliffe WJ, Dale M, Todd C, Meggit S, Birch-Machin MA, Rees JL. Expression, candidate gene, and population studies of the melanocortin 5 receptor. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 564-70.

Holbrook KA, Odland GF. The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm. *J Invest Dermatol* 1975; 65: 16-38.

Ingham E, Eady EA, Goodwin CE, Cove JH, Cunliffe WJ. Pro-inflammatory levels of interleukin-1 alpha-like bioactivity are present in the majority of open comedones in acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 895-901.

Ito K, Sato S, Nishijima A, Hiraga K, Hidano A, Kukita A. Melanogenetic Melanocytes in Human Sebaceous Glands. *Experientia* 1976; 32: 511-2.

Jimbow K, Lee SK, King MG, Hara H, Chen H, Dakour J, Marusyk H. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 259-68.

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

Kligman AM. The uses of sebum? In: Montagna W, Ellis RA, Silver AF, eds. *Advances in Biology Skin Vol IV. The Sebaceous Glands*. Pergamon Press, Oxford 1963: 110-2.

Kono M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY. In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin (POMC) genes in human skin. *FASEB J* 2001; 15: 2297-9.

Lee DY, Yamasaki K, Zouboulis ChC, Park GT, Yang JM, Gallo RL. Sebocytes express functional cathelicidin antimicrobial peptides and can act to kill *Propionibacterium acnes*. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1863-6.

Maier H, Mühlmeier G, Kraft K, Blumstein NM, Tisch M. Primary malignant melanoma of the parotid gland: a case report and review of the literature. *HNO* 2008; 56: 627-32.

Makrantonaki E, Adjaye J, Herwig R, Brink TC, Groth D, Hultschig C, Lehrach H, Zouboulis ChC. Age-specific hormonal decline is accompanied by transcriptional changes in human sebocytes in vitro. *Aging Cell* 2006; 5: 331-44.

Narisawa Y, Kohda H, Tanaka T. Three-dimensional demonstration of melanocyte distribution of human hair follicles: special reference to the bulge area. *Acta Derm Venereol* 1997; 77: 97-101.

Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, Mc Dowell A, Seltmann H, Patrick S, Zouboulis ChC, Kemény L. Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antibacterial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* 2006; 8: 2195-205.

Nikkari T. Comparative chemistry of sebum. *J Invest Dermatol* 1974; 62: 257-67.

Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002; 416: 854-60.

Ortonne JP, Mosher DB, Fitzpatrick TB. Vitiligo and other hypomelanoses of hair and skin. Plenum, New York, 1983.

Panconesi E, Hautmann G. Psychophysiology of stress in dermatology. The psychobiologic pattern of psychosomatics. *Dermatol Clin* 1996; 14: 399-421.

Pinkus F. In: Keibel F, Mali FP, eds. *Manual of Human Embryology*. Philadelphia, Lippincott 1910: 243.

Rhein LD, Zatz JL, Motwani MR. Sebum: Physical-chemical properties, macromolecular structure, and effects of ingredients. In: Webster GF, Rawlings AV, eds. *Acne and its therapy*. New York, Informa Healthcare 2007: 203-22.

Schaffer JV, Bolognia JL. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1477-85.

Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, Marshall HS, Panske A, Panzig E, Hibberts NA. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 91-6.

Selleri S, Seltmann H, Gariboldi S, Shirai YF, Balsari A, Zouboulis ChC, Rumio C. Doxorubicin-induced alopecia is associated with sebaceous gland differentiation. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 711-20.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936; 138: 32.

Serri F, Huber WM. The development of sebaceous glands in man. In: Montagna W, Ellis RA, Silver AF eds. *Advances in Biology of Skin Vol IV. The Sebaceous Glands*. Oxford, Pergamon Press 1963: 1-18.

Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinologie of the Skin. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 457-87.

Slayden SM, Moran C, Sams WM, Boots LR, Azziz R. Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril* 2001; 75: 889-92.

Takeda Y. Melanocytes in the human parotid gland. *Pathol Int* 1997; 47: 581-3.

Takeda Y. Existence and distribution of melanocytes and HMB-45-positive cells in the human minor salivary glands. *Pathol Int* 2000; 50: 15-9.

Thiboutot D, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 614-9.

Thiele JJ, Weber SU, Packer L. Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1006-10.

Thody AJ, Shuster S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* 1989; 69: 383-416.

Tobin D, Thody AJ. The superoxide anion may mediate short- but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp Dermatol* 1994; 3: 99-105.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; 11: 328-30.

Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, Jackson IJ, Rees JL. The Asp84Glu variant of the melanocortin-1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1663-66.

Wheatly VR. Sebum: its chemistry and biochemistry. *Am Perfumer* 1956; 68: 37-47.

Wei Ch. *Basiswissen Medizinische Statistik*. Berlin, Springer 2005.

Westerhof W, Njoo MD, Schallreuter KU. Vitiligo. *Hautarzt* 1997; 48: 677-93.

Westerhof W, Nieuweboer-Krobotova L. Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1525-8.

Whitton ME, Ashcroft DM, González U. Therapeutic interventions for vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59: 713-7.

Winiarska A, Mandt N, Kamp H, Hossini A, Seltmann H, Zouboulis ChC, Blume-Peytavi U. Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 311-21.

Zhang L, Anthonavage M, Huang Q, Li WH, Eisinger M. Proopiomelanocortin peptides and sebogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 994: 154-61.

Zhang L, Li WH, Anthonavage M, Eisinger M. Melanocortin-5 receptor: a marker of human sebocyte differentiation. *Peptides* 2006; 27: 413-20.

Zouboulis ChC, Seltmann H et al. Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1011-20.

Zouboulis ChC, Fimmel S, Ortmann J, Turnball JR, Boschnakow A. Sebaceous glands. In: Hoath SB, Maibach HI, eds. *Neonatal skin structure and function*. New York, Marcel Dekker 2003: 59-88.

Zouboulis ChC, Eady A, Philpott M, Goldsmith LA, Orfanos C, Cunliffe WJ, Rosenfield R. What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* 2005; 14: 143-52.

Zouboulis ChC, *Moderne Aspekte der Akne-Pathogenese. Aktuelle Dermatologie* 2006; 32: 296-302.

Zouboulis ChC, Baron JM, Böhm M, Kippenberger St, Kurzen H, Reichrath J, Thielitz A. *Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. Exp Dermatol* 2008; 17: 542-51.

6. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Dreidimensionaler Querschnitt durch die Haut	2
Abb. 2: Epidermis.....	4
Abb. 3: Raper-Mason-Schema	9
Abb. 4: Reaktionsschema.....	20
Abb. 5: Immundetektion von epidermalen Melanozyten in der Epidermis mittels NKI/beteb-Immunfluoreszenz.	23
Abb. 6: Immundetektion von Melanozyten in der Talgdrüse mittels NKI/beteb- Immunfluoreszenzfärbung.....	24
Abb. 7: SZ95-Sebozyten-Melanozyten Kokultur nach 48 Stunden	25
Abb. 8: SZ95-Sebozyten-Melanozyten Kokultur nach 96 Stunden	26
Abb. 9: Effekt verschiedener Zellkulturmedien auf die metabolische Aktivität von SZ95-Sebozyten	27
Abb. 10: Apoptosemessung.....	28
Abb. 11: Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in Sebomed [®] basal-Medium (10% FCS)	30
Abb. 12: Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in PromoCell [®] M2-Medium	30
Abb. 13: Gehemmte Lipidsynthese von SZ95-Sebozyten in konditioniertem PromoCell [®] M2-Medium	31
Abb. 14: Veränderung der Lipidsynthese in SZ95-Sebozyten in verschiedenen Nährmedien	32
Abb. 15: Mögliches Schema der Interaktion von Melanozyten und Sebozyten in der humanen Talgdrüse.....	43

7. Danksagung

Zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit haben viele Personen großen Anteil geleistet.

Mein erster Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm für die Überlassung des Themas, für die wertvollen inhaltlichen Anregungen und Hinweise, die schnelle Durchsicht der Manuskripte sowie seine ausgesprochen freundliche Unterstützung und unendliche Geduld beim Verfassen dieser Arbeit. Seine vielfältigen Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Th. A. Luger für die Möglichkeit, in seinem Institut die Doktorarbeit anzufertigen,

Mein Dank gilt auch den Medizinisch-technischen Assistentinnen aus den Laboratorien der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten, Klinikum der Universität Münster für die freundliche Unterstützung und ein gutes Arbeitsklima.

Das größte und herzlichste Dankeschön gilt jedoch meinen lieben Eltern, die mich während meines gesamten Studiums uneingeschränkt und liebevoll in jeder Hinsicht unterstützt haben und denen deshalb diese Arbeit gewidmet ist. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine beiden Brüder Sven und Lars, die mir nicht nur während meines Studiums beigestanden haben.

Mein letzter Dank gilt meinen Großeltern, die ihre Aufgabe als Oma und Opa nicht hätten besser erfüllen können. Leider war es meinem Opa verwehrt sowohl Studienabschluss als auch die Fertigstellung dieser Arbeit zu erleben.

8. Lebenslauf

9. Anhang

Publikation

Tolk K, Luger Th, Zouboulis ChC, Böhm M. Elucidation of the enigmatic role of melanocytes within the sebaceous gland: PP099. Pigment Cell Research 2006; 19: 548.