

medgen 2009 · 21:487–492  
 DOI 10.1007/s11825-009-0195-2  
 Online publiziert: 29. November 2009  
 © Springer-Verlag 2009

K.-M. Eckl<sup>1,2</sup> · H.C. Hennies<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Dermatogenetik, Cologne Center for Genomics, Universität zu Köln

<sup>2</sup> Institut für Neurophysiologie, Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität zu Köln

<sup>3</sup> Zentrum für Molekulare Medizin Köln, Universität zu Köln

# Krankheitsspezifische Hautmodelle

## In-vitro-Modelle für die Entwicklung von Therapien bei angeborenen Verhornungsstörungen am Beispiel der kongenitalen Ichthyosen

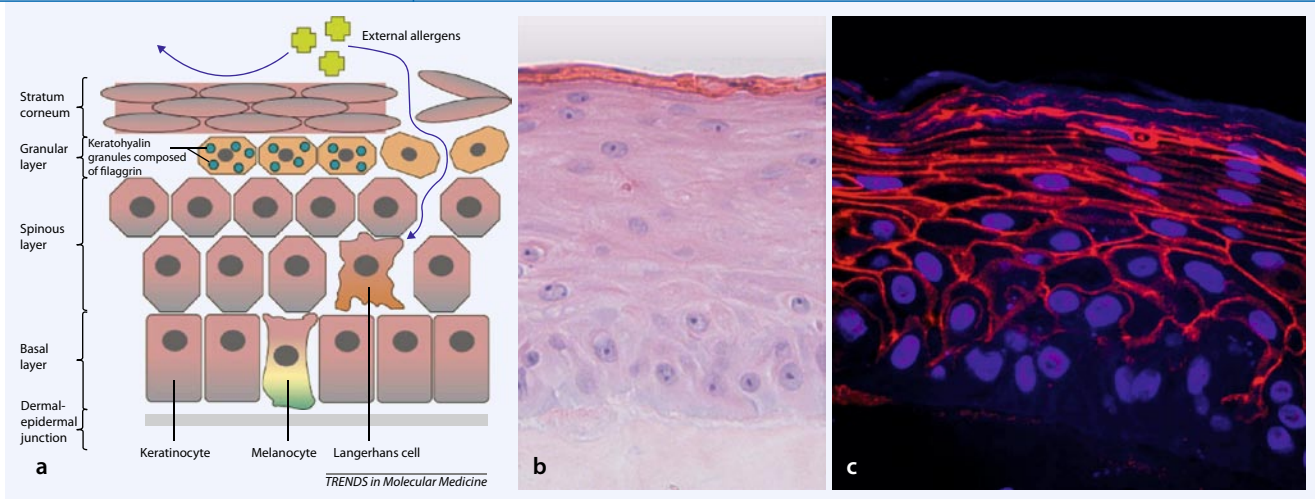
Mit dem Beschluss des europäischen Parlaments im Jahr 2003 (Richtlinie 2003/15/EG) über die Bannung von Tierversuchen bei der Entwicklung und Sicherheitsprüfung von Kosmetika, ihren Bestandteilen und Kombinationen von Bestandteilen rückte die Entwicklung von Alternativmethoden zur Untersuchung der Toxizität, Barrieregängigkeit usw. immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Heute sind eine Reihe von kommerziell erhältlichen Hautmodellen und damit validierte Versuchsabläufe als Ersatz für Tierversuche etabliert. Auf der anderen Seite werden Hautmodelle seit vielen Jahren für die Therapie von Verbrennungsoffern zur Verbesserung der Wundheilung bei großen, tiefen Wunden eingesetzt. Dreidimensionale Hautmodelle zur Analyse von Produkteigenschaften bestehen aus 2 Kompartimenten, einem Dermisäquivalent mit humanen, dermalen Fibroblasten und einer vollständig differenzierten bzw. differenzierbaren Epidermis (Keratinozyten). Auch Modelle mit Melanozyten sind erhältlich.

Seit wenigen Jahren werden zunehmend dreidimensionale Hautmodelle für zellbiologische und molekulargenetische Fragestellungen entwickelt (Abb. 1), da zweidimensionale Zellsysteme oft nicht ausreichend Auskunft über die zelluläre

Interaktion geben und Tiermodelle nur aufwändig herzustellen sind. Die Funktion der epidermalen Barriere, der Aufbau der Epidermis und die Dicke der Hornschicht sind bei Patienten mit angeborenen Verhornungsstörungen, beispielsweise kongenitalen Ichthyosen, im Vergleich zur Haut gesunder Personen deutlich verändert. Zur Entwicklung spezifischer Therapeutika für Patienten mit solchen monogenen Hautkrankheiten sind normale, kommerziell erhältliche Hautmodelle, wie die klassischen Modelle RHE und RHPE von SkinEthics (Nizza, Frankreich) bzw. solche mit zusätzlichen Melanozyten (RHPE, SkinEthics, oder Melanoderm, MatTek, Ashland, MA, USA), wenig geeignet, da bei diesen die Barrierefunktion normal und nicht reduziert ist und die Hornschicht oft kultivierungsbedingt eine deutliche Verdickung im Vergleich zur intakten Epidermis zeigt.

Verhornungsstörungen umfassen eine große Gruppe von Erkrankungen, die durch eine Störung der terminalen Differenzierung der Keratinozyten gekennzeichnet sind. Klinisch können sich Verhornungsstörungen durch Keratosen, Blasenbildung, Hautrötung und -trockenheit manifestieren, histologisch zeigen sich beispielsweise Hyperkeratose, Parakeratose oder epidermolytische Hyperkeratose.

Häufige, multifaktorielle Erkrankungen wie Psoriasis können typische Kennzeichen einer Verhornungsstörung zeigen. Unter den monogenen Verhornungsstörungen sind besonders die Ichthyosen zu erwähnen, die häufige Formen wie Ichthyosis vulgaris (Häufigkeit etwa 1:250) und X-chromosomal rezessive Ichthyose (Häufigkeit 1:2500) und seltene Formen wie die autosomal-rezessive kongenitale Ichthyose (ARCI, Häufigkeit 1:100.000) und die epidermolytische Ichthyose (auch bullöse ichthyosiforme Erythrodermie, Häufigkeit 1:300.000) umfassen (vgl. Oji et al. [13] in diesem Heft). Die ARCI ist klinisch, genetisch und allelisch heterogen und schließt Harlekin-Ichthyose, lamelläre Ichthyose und kongenitale ichthyosiforme Erythrodermie ein. Für ARCI wurden bis heute 6 ursächliche Gene identifiziert, wobei nur die von *TGMI* (Transglutaminase 1, Keratinozytentransglutaminase), *ALOX12B*, *ALOXE3* (epidemale Lipoxygenasen 12R-LOX bzw. eLOX-3) und *ABCA12* [ATP-Bindungskassette (ATP: Adenosintriphosphat), Subfamilie A, Mitglied 12] kodierten Proteine funktionell charakterisiert sind. Für die anderen Gene, *NIPAL4* (Ichthyin) und *CYP4F22*, ist die Bedeutung der kodierten Proteine noch nicht geklärt. Etwa 40% aller ARCI-Patienten zeigen Mutationen im Gen



**Abb. 1** ▲ Aufbau der menschlichen Epidermis und Hautäquivalente, **a** schematische Darstellung der Schichten der menschlichen Epidermis. Wichtigster Zelltyp sind die Keratinozyten, die während ihrer Wanderung vom Stratum basale (*unten*) zum Stratum granulosum differenzieren und dann ihre Zellstruktur auflösen. Eine Störung der epidermalen Barriere kann das Eindringen von schädlichen Molekülen ermöglichen und/oder zu ausgeprägtem transepidermale Wasserungsverlust führen, beispielsweise bei kongenitaler Ichthyose. (Aus: [10]), **b** Epidermisäquivalent aus normalen humanen epidermalen Keratinozyten nach 8 Tagen Kultur in der HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Das Stratum basale ist an den aufrecht stehenden Zellen zu erkennen. Im Laufe der Differenzierung werden die Zellen flacher und schließlich Bestandteil der Hornschicht. **c** Nachweis der Differenzierung durch Immunfluoreszenzfärbung. Gezeigt ist das Protein Filaggrin (*rote Markierung*). Die Synthese findet erst in differenzierten Keratinozyten statt. Die Zellkerne sind *blau* gefärbt

*TGMI*, für weitere 14% können Mutationen in einem der beiden Lipoxygenasegene nachgewiesen werden [4]. Für etwa 25% aller Patienten konnte die genetische Ursache noch nicht identifiziert werden, daher existieren sicherlich noch weitere Genorte für ARCI.

Kausale Therapien für Ichthyosen existieren bisher nicht. Symptomatische Behandlungen richten sich gegen Hauttrockenheit, Schuppenbildung, Fissuren und Erytheme und unterstützen beispielsweise die Hydratation und Keratolyse. Retinoide, die in der systemischen Therapie eingesetzt werden, unterstützen die Keratolyse und wirken abschuppend. Sie sind jedoch teratogen und können erhebliche Nebenwirkungen haben. In der Entwicklung befinden sich Therapien durch eine Blockade des Retinsäurestoffwechsels in der Haut, die diese Probleme möglicherweise reduzieren. Um ein besseres Verständnis für die Pathophysiologie von Verhornungsstörungen zu erhalten und neue, kausale Therapien zu etablieren, haben wir spezifische Hautmodelle für angeborene Verhornungsstörungen am Beispiel der kongenitalen Ichthyosen entwickelt, die nach OECD- (Organisation for Economic Co-operation and Development, [www.oecd.org](http://www.oecd.org)) und ECVAM-Richtlinien (European Centre for the Va-

lidation of Alternative Methods, [www.ecvam.jrc.ec.europa.eu](http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu)) validiert werden.

### Genetik und Pathophysiologie von ARCI

Die terminale Differenzierung der Keratinozyten führt nach ihrer Wanderung vom Stratum basale zum Stratum granulosum zur Auflösung der Zellstruktur im Stratum corneum (Hornschicht), das die epidermale Barriere ausbildet (■ **Abb. 1**). Die Zellen der Hornschicht haben eine stabile, mehrschichtige Hülle („cornified cell envelope“), die aus verschiedenen Proteinen und Lipiden aufgebaut ist. Die Mechanismen der näher charakterisierten Proteine, die durch die Gene *ABCA12*, *TGMI*, *ALOX12B* und *ALOXE3* kodiert werden, sollen hier kurz dargestellt werden.

Der ABC-Transporter (ABC: „ATP-binding cassette“), der von *ABCA12* auf Chromosom 2q34 kodiert wird, spielt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von Glukosylzeramiden in verschiedene Zellkompartimente. Ein kompletter Verlust führt zu dem Phänotyp der Harlekin-Ichthyose, und nur ein partieller Ausfall kann der milder verlaufenden lamellären Ichthyose oder kongenitalen ichthyosiformen Erythrodermie zugrunde liegen. Das Gen der Transglutamina-

se 1, *TGMI*, ist beim Menschen auf Chromosom 14q11 lokalisiert. Transglutaminasen sind an der Bildung von intermolekularen Isopeptidbindungen beteiligt, der kovalenten Bindung zwischen Lysin- und Glutaminresten (■ **Abb. 2a**). Mit diesen  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin-Bindungen sind die Proteine gekoppelt, die an der Plasmamembran der terminal differenzierten Keratinozyten abgelegt werden. Transglutaminase 1 verknüpft verschiedene Bestandteile der Hülle der Hornzellen und spielt so bei ihrer Entstehung eine entscheidende Rolle. Außerdem ist das Enzym wahrscheinlich auch an der Bildung der Lipidhülle der Hornzellen beteiligt, indem es den Einbau von  $\omega$ -Hydroxy-Zeramiden durch intermolekulare Esterbindungen katalysiert.

Lipoxygenasen repräsentieren eine weit verbreitete Familie von eisenhaltigen Nicht-Häm-Dioxygenasen, welche die regio- und stereoselektive Dioxygenierung von Fettsäurederivaten mit einem oder mehreren (Z,Z)-1,4-Pentadien-Motiven katalysieren. Epidermale Lipoxygenasen, zu denen beim Menschen ausschließlich die durch die Gene *ALOX12B*, *ALOXE3* und *ALOX15B* kodierten Proteine gehören, werden nur in der Haut und in wenigen anderen epithelialen Geweben synthetisiert. Alle 3 Gene befinden sich in un-

mittelbarer Nähe zueinander auf Chromosom 17p13. Die epidermalen Lipoxygenasen 12R-LOX und eLOX-3 zeigen nicht nur in ihrer Gewebespezifität, sondern auch in ihrem katalytischen Verhalten Besonderheiten. Die 12R-LOX ist die einzige bei Säugern gefundene Lipoxygenase, welche R-Chiralität aufweist. Das Enzym eLOX-3 dagegen verfügt über keine Dioxygenaseaktivität, sondern wirkt als Hydroperoxidisomerase. Die epidermalen Lipoxygenasen 12R-LOX und eLOX-3 sind nachfolgende Enzyme in demselben Stoffwechselweg (■ **Abb. 2b**). So katalysiert 12R-LOX die Dioxygenierung von Arachidonsäure in 12R-Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eikosatetraensäure (12R-HPETE). In einem weiteren Schritt, vermittelt durch eLOX-3, wird 12R-HPETE zu einem Epoxyalkohol (8R-Hydroxy-11R,12R-Epoxyeikosatriensäure) isomerisiert, der strukturell zu den Hepoxilinen zu zählen ist. Mit einem spezifischen In-vitro-Assay konnten wir nachweisen, dass die Lipoxygenasemutationen, die bei Patienten mit ARCI gefunden wurden, zu einem Funktionsverlust des Enzyms führen [4, 5].

### Mausmodelle für ARCI

Es wurden verschiedene Mausmodelle beschrieben, mit einer Inaktivierung (Knock-out) der Gene *Tgm1*, *Alox12b* und seit kurzem auch *Abca12*. Die *Tgm1*<sup>-/-</sup>-Maus wurde 1998 von Matsuki et al. [9] vorgestellt. Sie zeigt einen für ARCI typischen epidermalen Barrieredefekt und stirbt aufgrund des transepidermalen Wasserverlusts innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Epp et al. [6] konnten beobachten, dass auch die *Alox12b*<sup>-/-</sup>-Maus den typischen Verlust der Barrierefunktion zeigt und wenige Stunden nach der Geburt an massivem transepidermalem Wasserverlust stirbt [6]. Transplantationsversuche mit Haut von neonatalen *Alox12b*<sup>-/-</sup>-Mäusen führten zum klinischen Bild der ARCI [3]. Eine *Abca12*<sup>-/-</sup>-Maus zeigte neben dem schweren Bild der Harlekin-Ichthyose auch eine Beteiligung der Lunge [18]. Trotz systemischer Retinoidgabe sterben auch diese Mäuse innerhalb weniger Stunden.

Es wird deutlich, dass diese Mausmodelle nicht für die Analyse neuer Thera-

medgen 2009 · 21:487–492 DOI 10.1007/s11825-009-0195-2  
© Springer-Verlag 2009

K.-M. Eckl · H.C. Hennies

### Krankheitsspezifische Hautmodelle. In-vitro-Modelle für die Entwicklung von Therapien bei angeborenen Verhornungsstörungen am Beispiel der kongenitalen Ichthyosen

#### Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden Hautmodelle besonders für die Behandlung von Verbrennungsoptern, aber auch zur molekularen und zellbiologischen Aufklärung von dermatologischen und immunologischen Erkrankungen und Untersuchung von Kosmetika und Pharmaka entwickelt. Kommerzielle Modelle, als alternative Methode für Tierversuche in der kosmetischen und chemischen Industrie entwickelt, sind vielfältig erhältlich und entsprechend den Richtlinien von OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) und ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) validiert. Hautmodelle beinhalten 2 Kompartimente, ein Dermisäquivalent, welches meist aus Typ-I-Kollagen und darin enthaltenen Fi-

broblasten besteht, und ein voll differenzierbares Epidermisäquivalent. Bis heute existieren nur wenige Hautmodelle, die spezifische monogene Hautkrankheiten simulieren oder in der Haut sichtbare Krankheitszeichen einer systemischen Autoimmunerkrankung darstellen. Wir haben kürzlich ein solches Modell für kongenitale Ichthyosen entwickelt, das hinsichtlich seiner physikalischen, physiologischen und zellbiologischen Eigenschaften validiert wird und zur Erprobung neuer Therapien geeignet ist.

#### Schlüsselwörter

Hautmodelle · Kongenitale Ichthyose · ECVAM · OECD · Nanopartikel

### Disease-specific skin models. In vitro models for the development of treatment approaches to inherited disorders of cornification as illustrated by congenital ichthyosis

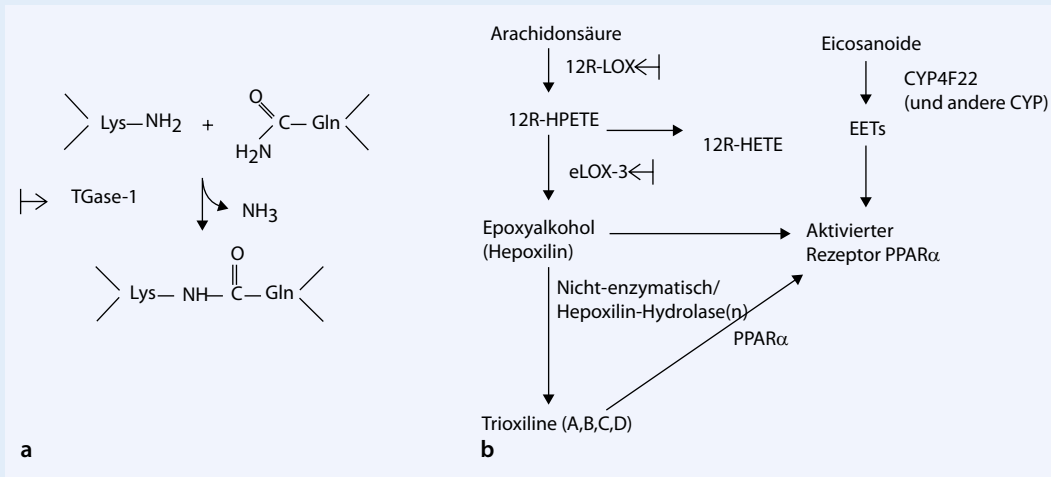
#### Abstract

A variety of skin equivalent systems have been developed recently mainly for burn therapy but also for studies of the cell and molecular biology of dermatologic and immunologic disorders and for cosmetic and pharmaceutical research. Since European regulation forbids the use of animals to prove product safety in cosmetic products, several commercially available three-dimensional skin models were developed by the cosmetic and chemical industry and validated according to OECD and ECVAM regulations. Three-dimensional skin models consist of two compartments: one serves as a dermal equivalent, usually consisting of fibroblasts in type I

collagen, onto which a terminally differentiating epidermis is placed. Up-to-date models are missing that mimic monogenic skin disorders or signs of disease in the skin caused by a systemic autoimmune disorder. We recently developed a three-dimensional skin model for congenital ichthyosis as an example for a keratinization disorder. The system is being validated and will be fundamental for studies of disturbed epidermal differentiation and pharmaceutical intervention.

#### Keywords

Skin models · Congenital ichthyosis · ECVAM · OECD · Nanoparticles



**Abb. 2** Funktion der Enzyme Transglutaminase 1, 12R-Lipoxygenase und epidermale Lipoxygenase 3, deren Ausfall zum Phänotyp der kongenitalen Ichthyose führt. **a** Transglutaminase 1 (TGase-1) vermittelt die Bildung intermolekularer Isopeptidbindungen zwischen Lysin- und Glutaminresten, **b** 12R-Lipoxygenase (12R-LOX) und epidermale Lipoxygenase 3 (eLOX-3) sind an demselben Stoffwechselweg der Arachidonsäure beteiligt. Die weitere Umsetzung der Trioxiline ist bisher im Detail nicht bekannt

peutika und nur eingeschränkt zum Studium der gestörten Physiologie geeignet sind, da die Tiere so früh sterben. Darüber hinaus zeigten sich insbesondere im Aufbau der Epidermis, in der Dicke der Schichten und wegen des vorhandenen Fells starke Unterschiede zwischen Mensch und Maus.

### Künstliche Hautmodelle

Dreidimensionale Hautmodelle können sich in den verwendeten Zelltypen und Komponenten deutlich unterscheiden. Einige Beispiele bestehen allein aus humanen Keratinozyten, die auf einer beschichteten Platte kultiviert werden, andere sind höchst komplex aufgebaut und umfassen mehrere verschiedene Zelltypen der Haut.

Die von uns entwickelten Modelle beruhen ebenso wie viele kommerziell erhältliche Modelle grundsätzlich auf den Beschreibungen von Stark et al. [15]. Eine Matrix aus einer Trägersubstanz (meist Typ-I-Kollagen oder Fibrin) enthält humane, primäre Fibroblasten und wird im flüssigen Zustand in spezielle Filtereinsätze gegossen (Abb. 3). Die Matrix härtet aus, anschließend werden basale, undifferenzierte Keratinozyten (human, primär) auf ihr ausgesät. Das System wird mit Medium versehen und für mindestens 24 h im Inkubator bebrütet. Danach erfolgt ein Mediumswechsel zu einem speziellen Dif-

ferenzierungsmedium, das reich an Kalzium (ungefähr 1,3 mM) ist, auch wird das Volumen des Mediums so geändert, dass sich die epidermalen Schichten an der Luft-Flüssigkeits-Grenze („air liquid interface“) befinden. Die weitere Kulturdauer beträgt 7–28 Tage (und länger). Ab dem 7. Tag können die Proben geerntet, analysiert und für pharmakologische Untersuchungen verwendet werden (Abb. 1).

Kommerziell erhältlich ist auch eine deepidermalisierte, dezellularisierte Dermis (DED), auf der Fibroblasten und Keratinozyten ausgesät werden. Dieses System wurde ebenfalls als Grundlage für dreidimensionale Hautmodelle eingesetzt [12].

### Krankheitsmodelle

Modelle für genetisch bedingte Hautkrankheiten können auf 2 Wegen erstellt werden, durch Isolation, Kultur und Einsatz von Patientenzellen oder aber durch spezifisches Ausschalten (Knock-down) von Krankheitsgenen in normalen Zellen. Das erste Krankheitshautmodell wurde 2001 bei L'Oréal für eine Form der autosomal-rezessiven Erkrankung Xeroderma pigmentosum entwickelt [2]. Es handelt sich um ein reines Forschungsmodell und ist nicht kommerziell erhältlich, zu seiner Herstellung wurden Zellen eines Patienten verwendet.

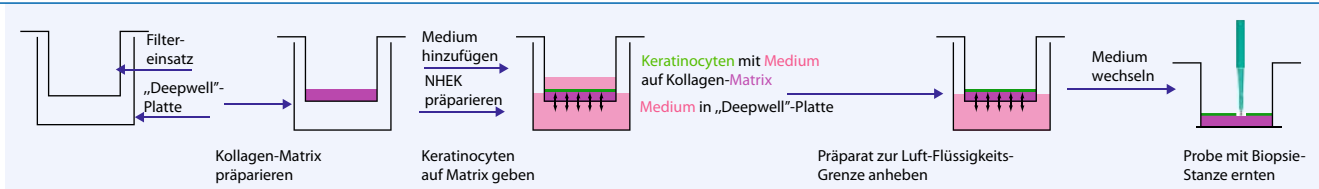
Tjabringa et al. [17] und andere Arbeitsgruppen [1] entwickelten und beschrieben künstliche Hautmodelle für Psoriasis. Sie basieren auf Fibroblasten und Keratinozyten, die aus Biopsien von Psoriasispatienten gewonnen oder durch psoriasisassoziierte Zytokine induziert wurden. In keinem der Modelle wurden Immunzellen [DC (dendritische Zelle, „dendritic cell“), LC (Langerhans-Zelle, „Langerhans cell“), Melanozyten] verwendet.

Der Einfluss von Transglutaminaseinhibitoren auf 3D-Hautmodelle wurde durch Harrison et al. [7] beschrieben. Nach Behandlung mit Pan-Transglutaminase-Inhibitoren zeigten 3D-Hautmodelle massive Hyperkeratose und Parakeratose.

Die Ausschaltung einzelner Gene durch kurze, spezifische RNA-Moleküle (RNA-Interferenz) ermöglicht es, Zellen mit einer Defizienz für ein definiertes Protein in vitro herzustellen. Thomas et al. [16] zeigten kürzlich ein Hautmodell für die Harlekin-Ichthyose, bei dem die RNA-Interferenz durch „short-hairpin“-RNA (shRNA) realisiert wurde [16]. Dazu wurde durch lentivirale Transduktion das Gen *ABCA12* ausgeschaltet.

Die meisten Mutationen in einem der 6 bekannten Gene für ARCI sind „privat“, Hotspots sind nur regional und in *ALOXE3* beschrieben worden. Hautmodelle aus Patientenzellen, isoliert aus Stanzbi-





**Abb. 3** ▲ Schema der Herstellung von Hautäquivalenten aus Keratinozyten. Primäre Keratinozyten wachsen auf einer Kollagenmatrix, die mit Fibroblasten besiedelt ist. Details des Verfahrens werden im Text beschrieben

opsien, sind daher so unterschiedlich wie die einzelnen Patienten, zumal auch die Schwere und der Verlauf der Erkrankung von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein können (genetische, allelische und klinische Heterogenität). Aus diesem Grund haben wir uns für die Verwendung gesunder Zellen, isoliert aus der Vorhaut von Personen, die nicht älter als 10 Jahre sind, entschieden. Keratinozyten und Fibroblasten werden in Anlehnung an das Protokoll von Mitra u. Nickloff [11] isoliert und kultiviert. Zur Simulation der bei ARCI-Patienten gesehenen Mutationen verwenden wir ein Verfahren, bei dem das Ausschalten einzelner Gene durch „small-interfering“ RNA (siRNA) vermittelt wird. Dieser Knock-down erfolgt kurz vor der Etablierung der Hautmodelle in den Keratinozytenkulturen. Wir konnten eine hohe Knock-down-Effizienz von bis zu 95% erreichen, welche auch nach 10 Tagen in Kultur noch deutlich über 90% lag. Diese wurde stets mit qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) und Normalisierung gegen verschiedene Haushaltsgene nachgewiesen. Wir verwendeten siRNA gegen die Gene *TGMI*, *ALOX12B* und *ALOXE3*, da für diese die Proteine sowie ihre physiologischen und biochemischen Eigenschaften bekannt sind.

### Ansprüche an Hautmodelle

Die ECVAM (s. hierzu z. B. „performance standards for applying human skin models to in-vitro skin irritation testing“ der ECVAM; [www.ecvam.jrc.ec.europa.eu/under\\_validation\\_study\\_documents](http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu/under_validation_study_documents)) fordert Hautmodelle (oder Modelle anderer Organe), welche leicht zu generieren sind und sich durch eine hohe Uniformität der einzelnen Modelle auszeichnen (Batch-Identität). Zu diesem Zweck sollen, soweit wie möglich, stets dieselben Keratinozyten und Fibroblasten verwendet werden. Beide Zelltypen sollten von dersel-

ben Person stammen und sich in derselben Passage befinden. Zellzahlen, Medium, Verbrauchsartikel und Herstellungsverfahren müssen standardisiert werden [Etablierung von SOP (Standardarbeitsanweisung, „standard operating procedure“)].

Um Effekte des Knock-downs auf die Dicke der Hornschicht, die Zusammensetzung der Epidermis und die Differenzierung der Keratinozyten zu analysieren, sind Modelle, welche auch ohne Knock-down eine verdickte Hornschicht nach 5–7 Tagen aufweisen, für solche Studien nicht geeignet. Fast alle kommerziell erhältlichen Hautäquivalente neigen zu unspezifischer Hyperkeratose. Dieser Effekt wird durch das fehlende Abschilfern der toten Keratinozyten verstärkt. Um Modelle mit einer normalen, nicht verdickten Hornschicht zu generieren, setzten wir uns intensiv mit den für die Differenzierung notwendigen Medien auseinander. Wir konnten nachweisen, dass mit der Wahl des Differenzierungsmediums eine ungewollte Hyperkeratose vermieden werden kann. Ohne Knock-down zeigen unsere Modelle keine Hyperkeratose und eine normale Differenzierung mit allen Schichten der Epidermis (■ **Abb. 1**).

Für eine normale, vollständige Differenzierung der Epidermis ist die dermalepidermale Junctionszone (DEJ) essenziell. Diese kann sich nur ausbilden, wenn die künstliche Dermismatrix genügend, aber nicht zu viele Fibroblasten enthält und die undifferenzierten, basalen Keratinozyten in nicht zu geringer Menge auf diese aufgebracht werden. Die DEJ kann durch spezifische Marker, etwa gegen Kollagen IV und Integrin  $\beta 1$ , nachgewiesen werden. In vivo zeigen die basalen Keratinozyten eine aufrechte Orientierung, bevor sie im Verlauf der Differenzierung abflachen und sich später in ihrer Zellstruktur auflösen (■ **Abb. 1**). Auch in unserem Modell zeigt sich die basale Keratinozytenschicht aufrecht.

### Validierung von Hautmodellen

Mit den Richtlinien von OECD und ECVAM entwickelte die Europäische Union internationale anerkannte Regeln für das Vergleichen und Prüfen von Hautmodellen. Tierexperimente sollen mit der alternativen Verwendung von In-vitro-Modellen bei der Prüfung und Zulassung von chemischen und kosmetischen Produkten minimiert und vermieden werden. Alle künstlichen Hautmodelle sollen eine DEJ, eine Basalschicht, alle Schichten der Differenzierung und eine nicht zu stark ausgeprägte Hornschicht aufweisen. Wichtiges Kriterium für die Austestung neuer Kosmetika oder Pharmazetika sind die Uniformen und mit der menschlichen Haut vergleichbaren Barriereigenschaften. Diese werden mit Permeabilitätsassays, analog Technical Guidance 428 (TG428) und Guidance Document 28 (GD28) der OECD durchgeführt. Auch wurden in den letzten Jahren Testvorgaben für durch Chemikalien verursachte Hautreizungen („skin irritation test“), Phototoxizität, Korrosivität, Kanzerogenität und Mutagenität etabliert und veröffentlicht.

Hautmodelle für die Erprobung neuer Therapeutika bei schweren, angeborenen Verhornungsstörungen sind insbesondere auf ihre veränderte Permeabilität zu untersuchen. Hierzu werden normale humane Haut, porcine Haut sowie kommerzielle Hautmodelle mit den Testmodellen auf die Permeabilität von zuvor validierten Stoffen untersucht, beispielsweise Koffein und Testosteron [14]. Die Testsubstanzen wurden entsprechend ihrer Molekülgröße, Ladung und Polarität ausgewählt und entsprechend den veröffentlichten SOP appliziert.

### Vehikel für Therapien durch und an der Haut

Die Therapie einer Hautkrankheit kann systemisch erfolgen oder topisch mit Cre-

mes und Lotionen, die auf die Haut aufgetragen werden. Wird ein Therapeutikum appliziert, muss es die (dicke) Hornschicht überwinden, um in die stoffwechselaktiven Bereiche der Epidermis vorzudringen. Meist ist es allerdings unerwünscht, wenn Therapeutika tiefer in die Haut eindringen (Dermis, Hypodermis, Blutbahn), da dies zu Nebeneffekten führen kann, aber auch eine höhere Dosierung erforderlich macht. Um die meist großen, hydrophilen Genprodukte (Proteine, Enzyme) oder Metaboliten durch die Hornschicht in die proliferierenden Schichten der Epidermis, nicht aber in die Dermis oder Hypodermis zu transportieren, stehen verschiedene spezifische Transportsysteme (Carrier) zur Auswahl. Da Hautlipide eine entscheidende Rolle in der Barrierefunktion der Epidermis spielen, sind lipidhaltige Transporter die erste Wahl, wie etwa Liposomen, SLN („solid lipid nanoparticles“), NLC („nanostructured lipid carriers“), „lipid microspheres“, Mikroemulsionen, hexagonale Phasennanodispersionen und CMS („dendritic core-multishell“).

Nanopartikel sind definitionsgemäß Partikel mit einer maximalen Größe von 100 nm, sie zeichnen sich durch eine große (funktionale) Oberfläche im Verhältnis zur Gesamtgröße aus und können aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Ihre Beladung mit aktiven kosmetischen (wie etwa Koenzym Q<sub>10</sub>) oder pharmazeutischen (Retinol) Substanzen schützt sie vor chemischer Degradation und stabilisiert somit auch das Endprodukt. Die Zytotoxizität der nackten und beladenen Nanopartikel ist bis heute nicht eindeutig geklärt und nur im spezifischen Einzelfall zu analysieren. Auch große, geladene Stoffe, wie Proteine oder stark saure hydrophile Arachidonsäurederivate, lassen sich in Nanopartikel verpacken. Kürzlich konnten Kuchler et al. [8] zeigen, dass die Nanopartikel CMS (20–30 nm) und SLN (150–170 nm) gegenüber Öl-in-Wasser-Formulierungen (Deutscher Arzneimittelcodex 2004) eine 13-fache bzw. 6,3-fache Akkumulation einer Testsubstanz (hier Nilrot) in der Epidermis erbringen. Die zum Vergleich verwendete Öl-in-Wasser-Formulierung dringt nur leicht in die obersten Schichten des Stratum corneum ein. Nilrot ist ein lipophiler Fluor-

reszenzfarbstoff, der intrazelluläre Lipide färbt und sehr gut in organischen Lösungsmitteln löslich ist und sich daher als Modellschubstanz für zu verpackende Chemikalien und Stoffe eignet.

## Fazit und Ausblick

**Das Fehlen geeigneter Testsysteme stellt große Hindernisse bei der Entwicklung spezifischer Therapien für genetisch bedingter Hauterkrankungen dar. Mit modernen Zellkulturtechniken und molekularbiologischen Methoden, besonders der RNA-Interferenz, können seit kurzem In-vitro-Testsysteme entwickelt werden, die sich flexibel gestalten lassen, entscheidende Eigenschaften der menschlichen Epidermis zeigen und Funktionsstörungen bei Verhornungsstörungen nachstellen. Diese Verfahren können Tiermodelle bei der Entwicklung von Pharmaka nicht komplett ersetzen, aber ihren Einsatz deutlich reduzieren. Sie erlauben es auch, innovative Methoden umfassend zu testen und etablieren. In Verbindung mit aktuellen, nanopartikelbasierten Möglichkeiten eines definierten Transfers von Zielsubstanzen in die Haut entstanden vollkommen neue Möglichkeiten, Differenzierungsstörungen der Haut zu erforschen und Wege der Therapie zu entwickeln. Unser Hautmodell für kongenitale Verhornungsstörungen wurde kürzlich zum Europäischen Patent angemeldet und wird zurzeit abschließend nach den hier beschriebenen Richtlinien charakterisiert. Wir und andere arbeiten an der weiteren Entwicklung komplexer Hautmodelle, die nicht nur Keratinozyten und Fibroblasten, sondern auch Zellen des Immunsystems und Melanozyten enthalten, um die Physiologie der Haut, Krankheitseffekte und neue Medikamente möglichst wirklichkeitsnah analysieren zu können.**

## Korrespondenzadresse

**Dr. H.C. Hennies**

Abteilung Dermatogenetik, Cologne Center for Genomics, Universität zu Köln  
Zülpicher Straße 47, 50674 Köln  
h.hennies@uni-koeln.de

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

1. Barker CL, McHale MT, Gillies AK et al (2004) The development and characterization of an in vitro model of psoriasis. *J Invest Dermatol* 123:892–901
2. Berner F, Asselineau D, Vioux C et al (2001) Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7817–7822
3. De Juanes S, Epp N, Latzko S et al (2009) Development of an ichthyosiform phenotype in Alox12b-deficient mouse skin transplants. *J Invest Dermatol* 129:1429–1436
4. Eckl KM, De Juanes S, Kurtenbach J et al (2009) Molecular analysis of 250 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis: evidence for mutation hotspots in ALOXE3 and allelic heterogeneity in ALOX12B. *J Invest Dermatol* 129:1421–1428
5. Eckl KM, Krieg P, Küster W et al (2005) Mutation spectrum and functional analysis of epidermis-type lipoxygenases in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum Mutat* 26:351–361
6. Epp N, Fürstenberger G, Müller K et al (2007) 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol* 177:173–182
7. Harrison CA, Layton CM, Hau Z et al (2007) Transglutaminase inhibitors induce hyperproliferation and parakeratosis in tissue-engineered skin. *Br J Dermatol* 156:247–257
8. Kuchler S, Radowski MR, Blaschke T et al (2009) Nanoparticles for skin penetration enhancement – a comparison of a dendritic core-multishell nanoparticle and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 71:243–250
9. Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A et al (1998) Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1044–1049
10. McGrath JA, Uitto J (2008) The flaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med* 14:20–27
11. Mitra R, Nikoloff B (1994) Cultivation of human epidermal keratinocytes in serum-free growth medium. In: Leigh IM, Watt F (Hrsg) *Keratinocyte methods*. Cambridge University Press, Cambridge, S 17–20
12. Ojeh NO, Frame JD, Navsaria HA (2001) In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. *Tissue Eng* 7:457–472
13. Oji V, Traupe H, Hennies HC (2009) Molekulare Charakterisierung der Ichthyosen. *Med Genet*
14. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W et al (2008) The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the validation study. *Altern Lab Anim* 36:161–187
15. Stark HJ, Baur M, Breiterkreutz D et al (1999) Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 112:681–691
16. Thomas AC, Tattersall D, Norgett EE et al (2009) Premature terminal differentiation and a reduction in specific proteases associated with loss of ABCA12 in Harlequin ichthyosis. *Am J Pathol* 174:970–978
17. Tjabringa G, Bergers M, van Rens D et al (2008) Development and validation of human psoriatic skin equivalents. *Am J Pathol* 173:815–823
18. Yanagi T, Akiyama M, Nishihara H et al (2008) Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum Mol Genet* 17:3075–3083