

**Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung  
von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin  
und Vitamin E Derivaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Kaya Lutter**

aus Haan/NRW

Düsseldorf, Mai 2009

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Stahl

Koreferent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2009

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	4
1.1 UV-Licht .....	5
1.2 Die Haut .....	5
1.3 Haut und UV-Licht.....	7
1.4 UV-Licht induzierte Hautschäden.....	11
1.4.1 Lipidoxidation .....	11
1.4.3 Proteinoxidation .....	12
1.4.3 DNA-Schäden .....	15
1.5 Schutzmechanismen der Haut .....	16
1.5.1 Prävention.....	16
1.5.2 Antioxidatives Netzwerk.....	17
1.5.3 Reparatur .....	22
1.6 Carotinoide .....	23
1.6.1 Carotinoide – Vorkommen und Funktion .....	23
1.6.2 Carotinoide im Menschen .....	24
1.6.3 DHIR .....	25
1.7 Vitamin E .....	27
1.7.1 Vitamin E – Struktur und Vorkommen .....	27
1.7.2 Synthetische Vitamin E Derivate .....	28
1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	30
2. Material .....	31
2.1 Geräte .....	31
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	32
2.3 Chemikalien .....	32
2.4 Puffer & Lösungen .....	34
2.5 Antikörper .....	36
2.6 Zellkultur.....	36
2.6.1 verwendete Medien .....	36
2.6.2 Zellen.....	36
2.7 Carotinoide und Vitamin E Derivate.....	37
2.8 Gase.....	37
2.9 Software .....	37

3. Methoden.....	38
3.1 Zellkultur.....	38
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	38
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
3.2 Inkubation der Zellen mit Substanzen.....	39
3.3 UV-Bestrahlung von Zellen.....	39
3.4 Sulforhodamin B (SRB) „assay“.....	40
3.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
3.6 Nachweis der HO-1 Expression.....	41
3.6.1 Vorbereitung der Zellen.....	41
3.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.6.3 Western Blot Analyse.....	42
3.6.4 Densitometrische Auswertung.....	43
3.7 Bildung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS).....	44
3.7.1 Mikroskopischer Nachweis von ROS mit H <sub>2</sub> DCFDA.....	44
3.7.2 Nachweis von ROS mit dem Fluoreszenzmessgerät.....	45
3.8 Zinkfreisetzung in Zellen.....	45
3.9 Auslösung von Hitzeschock bei Zellen.....	46
3.10 Nachweis von Thymindimeren mittels „Immunostaining“.....	46
3.10.1 Vorbereitung der Proben.....	47
3.10.2 Mikroskopische Auswertung.....	47
3.11 Statistik.....	48
4. Ergebnisse.....	49
4.1 Untersuchungen zur Zelltoxizität.....	49
4.1.1 Toxische Effekte von UV-Licht auf humane Hautfibroblasten.....	50
4.1.2 Zytotoxizität von DHIR und Lutein.....	55
4.1.3 Effekte von DHIR und Lutein auf die UV-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten.....	56
4.2. Effekte von DHIR und Lutein auf die Bildung von ROS in Fibroblasten.....	59
4.3 Effekte von DHIR und Lutein auf die UV-induzierte Zinkfreisetzung in Fibroblasten.....	69
4.4 Effekte von DHIR und Lutein auf die thermisch induzierte Zinkfreisetzung in Fibroblasten.....	72
4.5 Effekte von DHIR und Lutein auf die UVA-induzierte Expression von HO-1 in Fibroblasten.....	78

4.6 Effekte von DHIR und Lutein auf die Bildung von Thymindimeren nach UVB- Bestrahlung.....	80
4.7 synthetische Vitamin E Derivate.....	84
4.7.1 Zytotoxizität der Vitamin E Derivate.....	84
4.7.2 Effekte von Vitamin E Derivaten auf die UV-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten.....	87
4.8 Effekte von Vitamin E Derivaten auf die UVA-induzierte Expression von HO-1 in Fibroblasten.....	91
5. Diskussion.....	94
5.1 Zellmodell.....	94
5.2 Einfluss verwendeter UV-Dosen auf Fibroblasten.....	94
5.3 Wirkungen von Lutein und DHIR.....	95
5.3.1 DHIR-ein besonderes Carotinoid.....	95
5.3.2 Einfluss von DHIR und Lutein auf Fibroblasten.....	96
5.3.3 Einfluss von DHIR und Lutein auf Fibroblasten bei Anwesenheit von UV-Licht.....	97
5.3.4 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Bildung von ROS.....	99
5.3.5 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Freisetzung von Zink.....	100
5.3.6 Zusammenhänge.....	102
5.3.7 Einfluss von DHIR und Lutein auf die HO-1 Expression.....	102
5.3.8 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Bildung von Thymindimeren.....	103
5.4 Einfluss von Vitamin E und synthetischen Vitamin E Derivaten auf Fibroblasten.....	104
6. Zusammenfassung.....	106
6.1 Summary.....	107
7. Abkürzungsverzeichnis.....	109
8. Literaturverzeichnis.....	111
9. Danksagung.....	120
10. Eidesstattliche Erklärung.....	121

# 1. Einleitung

Die meisten auf der Erde lebenden aeroben Organismen gewinnen die zum Leben notwendige Energie direkt (Pflanzen) bzw. indirekt (z.B. Menschen) aus Sonnenlicht. Jedoch führt übermäßige Sonnenstrahlung, insbesondere Exposition gegenüber der energiereichen ultravioletten Strahlung, zu Schädigungen im Organismus. Dabei handelt es sich um direkte Schäden, bei denen UV-Strahlen unmittelbar mit biologisch relevanten Molekülen wie z.B. DNA-Basen interagieren (siehe Kapitel 1.4.3), und um indirekte Schäden, welche über sekundäre, UV-induzierte Produkte vermittelt werden (siehe Kapitel 1.4.1 und 1.4.2). Bei den sekundären Produkten handelt es sich überwiegend um reaktive Sauerstoffverbindungen, ROS genannt. Dazu zählen sowohl freie Radikale wie Superoxidradikalanionen, Peroxylradikale und Hydroxylradikale, als auch nichtradikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid.

Als photooxidativer Stress wird der biochemische Zustand bezeichnet, in dem ein Ungleichgewicht zwischen Schutzsystemen und nach UV-Bestrahlung gebildeten ROS vorliegt und in dessen Verlauf ROS diverse zelluläre Strukturen wie DNA, Proteine und Lipide oxidieren. Diese oxidativen Modifikationen biologisch relevanter Makromoleküle werden im menschlichen Organismus mit einer Reihe von verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So spielen UV-Strahlen eine entscheidende Rolle bei der Hautkrebsentstehung, dem vorzeitigen Alterungsprozess der Haut, der Veränderung des Immunsystems der Haut und bei der Pathogenese von Photodermatosen wie z.B. der polymorphen Lichtdermatose oder des Lupus erythematoses (Grether-Beck et al., 1997; Stahl & Krutmann, 2006).

Zum Schutz vor der Wirkung einer starken UV Exposition verfügen sowohl Pflanzen, als auch Menschen über diverse Schutzmechanismen (siehe Kapitel 1.5). Dabei weisen besonders sekundäre Pflanzenstoffe wie Carotinoide, Polyphenole und Vitamin E ein hohes photoprotektives Potential auf, d.h. diese Antioxidantien (siehe Kapitel 1.5.2) schützen die Pflanzen effektiv vor UV-Licht induzierten ROS.

Zahlreiche Studien belegen eine photoprotektive Wirkung der genannten sekundären Pflanzenstoffe auch im menschlichen Körper (Mathews-Roth et al., 1972; Gollnick et al., 1996; Lee et al., 2000; Stahl et al., 2000). Diese werden über Nahrungsmittel (z.B. Karotten, Tomaten, grüner Tee, Kakao oder Sonnenblumenöl) bzw. über Nahrungsergänzungsmittel dem Organismus zugeführt.

Da ein dauerhafter Schutz der menschlichen Haut durch Anwendung topischer Sonnenschutzmittel bei vielen kurzen Sonnenexpositionen kaum praktikabel ist, spielt die Prävention der in Kapitel 1.4 beschriebenen Hautschäden durch Supplementierung mit pflanzlichen Antioxidantien heutzutage ebenfalls eine Rolle.

### 1.1 UV-Licht

Die Sonne spielt für das Leben auf der Erde eine bedeutende Rolle. Permanent finden in ihrem Inneren Kernreaktionen statt, welche große Energiemengen in Form von elektromagnetischer Strahlung freisetzen. Sonnenstrahlung lässt sich in drei Wellenlängenbereiche unterteilen, wobei die energiereiche ultraviolette Strahlung nur etwa 6 % der auf der Erdoberfläche auftreffenden Gesamtstrahlung ausmacht. UV-Strahlung wird in UVA (400 – 320 nm), UVB (320 - 280 nm) und UVC –Strahlung (280 – 100 nm) eingeteilt.

Die Intensität der auf der Erdoberfläche ankommenden UV-Strahlung schwankt je nach Region und ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören Höhenlage, Bewölkung, Luftverschmutzung, Ozonschichtdicke und Bodenbeschaffenheit.

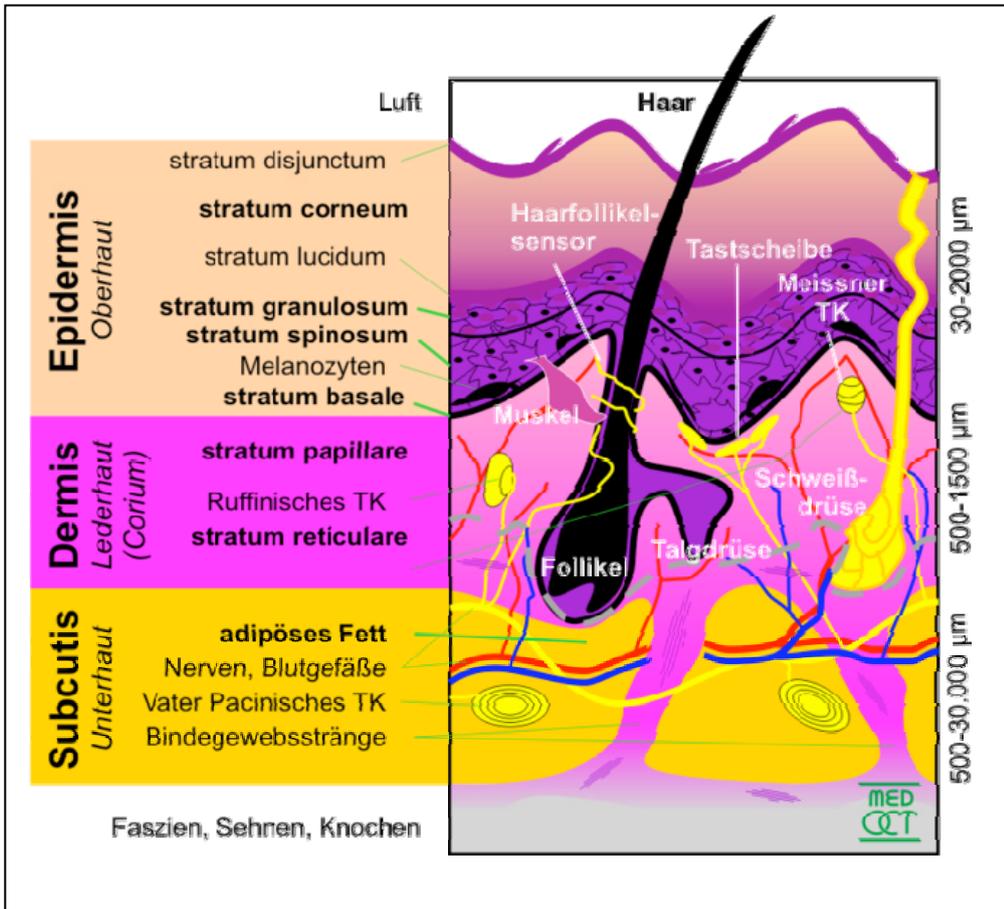
An einem wolkenlosen Sommertag in der Region des 35. nördlichen Breitengrades entspricht die UVA Dosis zur Mittagszeit binnen 70 Minuten beispielsweise 25 J/cm<sup>2</sup> (Frederick et al., 1988).

### 1.2 Die Haut

Die Haut ist neben dem Auge das einzige Organ des Menschen welches lichtexponiert ist. Dementsprechend spielt der Schutz vor photooxidativen Schäden in der Haut eine bedeutende Rolle.

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5 – 2 m<sup>2</sup> und 8 -12 % des Gesamtkörpergewichtes das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie erfüllt wichtige Funktionen. So schützt die Haut als Grenzschicht zwischen dem menschlichen Körper und der Umwelt den Organismus effektiv vor äußeren Einflüssen, wie z.B. dem Eindringen von pathogenen Organismen oder chemischen und physikalischen Reizen (Proksch et al., 2008). Des Weiteren ist sie

Stoffwechsel-, Ausscheidungs- und Tastorgan. Die Haut weist einen komplexen Aufbau auf (Abb. 1.1), der im Folgenden näher erläutert wird.



**Abb. 1.1: Aufbau der Haut**

Die menschliche Haut besteht aus 3 Hauptschichten, wobei in jeder Schicht die für sie charakteristischen Zelltypen angesiedelt sind.

Die Abgrenzung zur Umwelt bildet die Epidermis. Diese auch Oberhaut genannte Hautschicht ist als mehrschichtiges Plattenepithel, von innen nach außen bestehend aus der Basalschicht (Stratum basale), der Stachelzellschicht (Stratum spinosum), der Körnerzellschicht (Stratum granulosum), der Glanzschicht (Stratum lucidum) und der Hornschicht (Stratum corneum), aufgebaut. Die Epidermis besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Diese werden in der Basalschicht gebildet und unterliegen einem kontinuierlich von der innersten zur äußersten Epithelschicht stattfindenden Verhornungsprozess. Durch die ständige Erneuerung der oberen Schichten wird die Elastizität der Haut gewährleistet. Zusätzlich verleiht das von den Keratinozyten gebildete Keratin der Haut eine hohe Festigkeit. Des Weiteren schützt die

Hornschicht als äußerste Begrenzung der Epidermis zur Umwelt die Haut vor UV-Strahlung, indem sie Licht reflektiert bzw. streut. Weitere Zellen der Epidermis sind pigmentbildenden Melanozyten, Merkelzellen (Sinneszellen) und Langerhanszellen, welche eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr der Haut spielen.

An der Unterseite der Epidermis schließt sich die zweite Hauptschicht, die als Dermis, Lederhaut oder Corium bezeichnet wird, an. Sie besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und setzt sich aus der Papillenschicht (Stratum papillare) und der Netzschicht (Stratum reticulare) zusammen. Der Papillenschicht kommen zahlreiche Aufgaben zu. Sie ist durchzogen von Blutkapillaren, welche sowohl für die Versorgung der Epidermis und Dermis mit Nährstoffen, als auch für die Temperaturregulierung des Körpers zuständig sind. Auch die Lymphgefäße liegen im Bereich der Papillenschicht.

Die in der Dermis am häufigsten vorkommenden Zellen sind Fibroblasten. Diese synthetisieren und sezernieren kollagene Fasern, welche etwa 98 % der darunter liegenden Netzschicht ausmachen. Kollagenfasern sind Teil der extrazellulären Matrix und bewirken Festigkeit und Elastizität der Haut. Des Weiteren enthält die Dermis Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen.

Aus Hautbiopsien isolierte und kultivierte Fibroblasten haben sich bereits in der Vergangenheit als gutes Zellmodell zur Aufklärung verschiedener molekularer Reaktionsmechanismen in der Epidermis erwiesen. Da die Dermis von UVA-Strahlung komplett und von UVB-Strahlung bis in die oberen Schichten durchdrungen wird, stellen kultivierte Fibroblasten ein hilfreiches Werkzeug zur Untersuchung UV-spezifischer Wirkungen dar.

Die dritte Hauptschicht, Unterhaut oder auch Subcutis genannt, besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen. Die Anzahl der Fettzellen wird dabei in erster Linie durch die Ernährung bestimmt. Die Subcutis dient sowohl der Wärmeisolierung des Körpers, als auch als mechanische Polsterung und als Wasser- und Nährstoffspeicher.

### **1.3 Haut und UV-Licht**

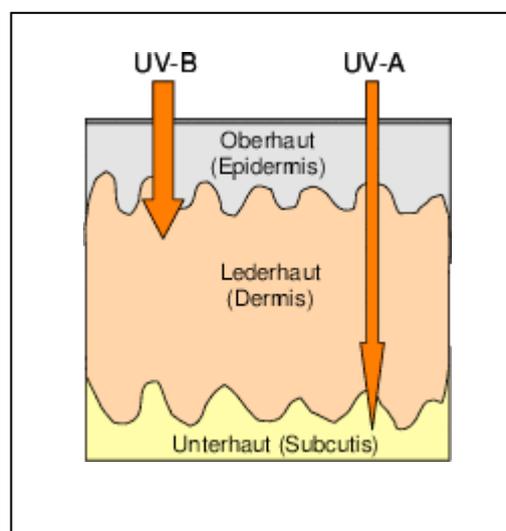
Die Haut ist das primäre Kontaktorgan des menschlichen Organismus mit UV-Strahlung. Aus diesem Grund sind besonders Modellsysteme mit kultivierten dermalen Zellen (Fibroblasten, Keratinozyten) in der Wissenschaft bei der Aufklärung UV-spezifischer Reaktionen von

Bedeutung. Eine zentrale Rolle bei der molekularen Wirkungsweise von UV-Strahlung spielt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Thiele et al., 2001).

ROS werden in freie Sauerstoffradikale wie Alkoxy-, Peroxy-, Hydroxyl- und Hydroperoxidradikale, in stabilere molekulare Oxidantien wie Hydroperoxid oder Wasserstoffperoxid und in Singulett-Sauerstoff eingeteilt. In jeder Zelle werden diese als normale Stoffwechselprodukte gebildet (Halliwell et al., 1989). Bei übermäßiger Produktion oxidieren ROS biologisch relevante Makromoleküle wie DNA, Lipide oder Proteine und führen zu zahlreichen zellulären Schäden (siehe Kapitel 1.4). Diesen können Antioxidantien wie z.B. Glutathion, Vitamin E und Carotinoide entgegen wirken (siehe Kapitel 1.5.2). Ein Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien wird allgemein als oxidativer Stress bezeichnet (Sies et al., 1991).

Im Gegensatz dazu handelt es sich um photooxidativen Stress, wenn die Störung der zellulären ROS Homöostase eine Folge von UV-Bestrahlung ist. Die Bildung von ROS in der Haut kann sowohl durch UVA-, als auch durch UVB-Strahlung induziert werden (Masini et al., 1994)

UVA und UVB-Licht haben unterschiedliche Eindringtiefen in die Haut. Die kurzwellige, energiereiche UVB-Strahlung gelangt bis in die oberen Schichten der Dermis und kann somit sowohl die Zellen der Epidermis (z.B. Keratinozyten), als auch die Zellen der Dermis (z.B. Fibroblasten) schädigen. Die energieärmere UVA-Strahlung hingegen durchdringt die Dermis vollständig und erreicht zum Teil auch subkutanes Gewebe (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Eindringtiefe von UVA- und UVB-Strahlen in die menschliche Haut



Bei der Typ I Reaktion handelt es sich um Elektronen-Transfer-Reaktionen, die nach dem in Abb. 1.3 (ganz links) dargestellten Reaktionsschema verlaufen. Dabei wird ein Elektron bzw. ein Wasserstoffatom des Reaktionspartners (RH) auf den Sensibilisator im Triplettzustand übertragen, wodurch Radikale entstehen. Reagieren diese mit molekularem Sauerstoff kommt es zur Bildung von sekundären ROS.

Handelt es sich beim Reaktionspartner um molekularen Sauerstoff, werden direkt Superoxid-Anionen gebildet.

Im Gegensatz dazu findet bei der Typ II Reaktion eine Energieübertragung vom Sensibilisator im Triplettzustand auf molekularen Sauerstoff statt (Gollnick, 1968). Dabei wird der im Grundzustand als Triplett vorliegende Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff überführt. Dieser reagiert direkt mit Makromolekülen wie DNA, Lipiden oder Proteinen (Piette, 1991; Sies und Menck, 1992; Wagener et al., 1993), oder mit weiteren sauerstoffhaltigen Molekülen was zur Bildung von sekundären ROS führt.

Zudem können UV-Strahlen auch direkt mit den im Verlauf der Oxidation von Lipiden entstandenen Lipidhydroperoxiden (LOOH) (Abb. 1.3, rechte Seite; Kap. 1.4.1) reagieren, welche in Lipidalkoxyradikale ( $LO\cdot$ ) und OH-Radikale ( $OH\cdot$ ) gespalten werden. Diese Intermediate können zu sekundären ROS weiterreagieren oder direkt biologisch relevante Makromoleküle oxidieren.

Neben der Bildung von ROS nach den in Abb. 1.3 gezeigten Reaktionsschemata kann UV Strahlung auch direkt mit der DNA reagieren. Dabei dienen die DNA-Basen als Chromophore für die spezifische Energie der UV Strahlen (siehe Kapitel 1.4.3).

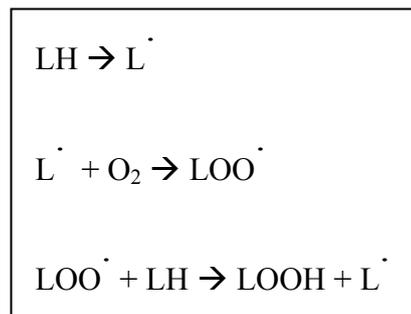
## 1.4 UV-Licht induzierte Hautschäden

Photooxidativer Stress spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Lichtschäden. Dazu gehören die Bildung von Hautkrebs, der vorzeitige Alterungsprozess der Haut, die Veränderung des Immunsystems der Haut und die Pathogenese von Photodermatosen wie z.B. der polymorphen Lichtdermatose oder des Lupus erythematoses (Grether-Beck et al., 1997; Stahl & Krutmann, 2006).

### 1.4.1 Lipidoxidation

Durch UV-Exposition kommt es unter anderem häufig zur ROS-induzierten Oxidation von ungesättigten Fettsäuren. Diese sind wichtiger Bestandteil zellulärer Membranen und die photooxidative Modifikation wird mit verschiedenen pathogenen Prozessen, wie z.B. der Entstehung von Hautschäden, in Zusammenhang gebracht.

Bei der Oxidation von Lipiden handelt es sich um eine Kettenreaktion, die nach dem in Abb. 1.4 dargestellten Schema verläuft.



**Abb. 1.4:** Lipidoxidation

Ein freies Radikal ( $\text{R}^\cdot$ ) oxidiert eine ungesättigte Fettsäure (LH), wodurch ein Lipidradikal ( $\text{L}^\cdot$ ) entsteht. An dieses lagert im darauffolgenden Schritt molekularer Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) an und bildet Lipidperoxidradikale ( $\text{LOO}^\cdot$ ). Diese sehr reaktiven Verbindungen reagieren ihrerseits

mit noch intakten Fettsäuren, wodurch unter Bildung von Lipidhydroperoxid (LOOH) nach oben genanntem Prinzip weitere Lipidperoxidradikale entstehen (Moliere et al., 1991).

Des Weiteren reagieren die Lipidhydroperoxide wie in Abb. 1.3 gezeigt unter UV-Licht zu Lipidalkoxyradikalen (LO $\cdot$ ) und OH-Radikalen (OH $\cdot$ ), welche weitere Zyklen der Lipidoxidation initiieren können.

### 1.4.3 Proteinoxidation

ROS führen u.a. zu oxidativen Modifikationen von Proteinen. Dabei handelt es sich vorwiegend um die Bildung von Protein-Protein Quervernetzungen, um Oxidation des Proteinrückgrates und um Oxidationen von Aminosäure-Seitenketten (Berlett & Stadtman, 1997). Dabei können die Seitenketten aller Aminosäuren modifiziert werden. In Tabelle 1.1 sind beispielhaft einige Aminosäuren und entsprechende Oxidationsprodukte dargestellt.

Aminosäure	Oxidationsprodukte
Cystein	Disulfidbrücken, Cysteinsäure
Methionin	Methioninsulfoxid, Methioninsulfon
Tryptophan	2-,4-,5-,6-, und 7-Hydroxytryptophan, Nitrotryptophan, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, Formylkynurenin
Phenylalanin	2,3-Dihydroxyphenylalanin, 2-,3-, und 4-Hydroxyphenylalanin
Tyrosin	Tyrosin-Tyrosin Quervernetzungen
Histidin	2-Oxohistidin, Asparaginsäure
Arginin	$\alpha$ -Aminoadipin Semialdehyd
Prolin	2-Amino-3-ketobuttersäure
Threonin	Oxalsäure

**Tab. 1.1:** Aminosäuren und Oxidationsprodukte der Seitenketten

Besonders sensitiv gegenüber ROS-induzierter Oxidation ist Cystein (Berlett & Stadtman, 1997). Auch bei geringer oxidativer Belastung kommt es zur Bildung von Disulfidbrücken (Wilcox et al., 2001). Diese Modifikation spielt häufig eine Rolle bei der Zinkfreisetzung aus Proteinkomplexen.

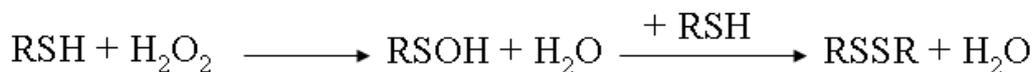
Zink ist ein essentieller Kofaktor und notwendig für die Struktur und Funktion von verschiedenen Proteinen (Kröncke, 2007). Die intrazelluläre Zinkkonzentration beträgt etwa 200  $\mu\text{M}$ . Unter physiologischen Bedingungen kommen die meisten Zinkionen in Proteinkomplexen gebunden vor, während die Konzentration von „freien Zinkionen“ im picomolaren Bereich liegt (Krezel & Maret, 2006). Etwa 10 % des humanen Proteoms besteht aus potentiell Zink-bindenden Proteinen. Dabei handelt es sich überwiegend um sogenannte Zink-Finger-Proteine, welche Zinkionen über zwei Cysteine und zwei Histidine oder über vier Cysteine binden (Andreini et al., 2006).

Bei oxidativer Belastung können die Zink-bindenden Cysteine nach folgenden Mechanismen modifiziert werden (Abb. 1.5, 1.6) (Wilcox et al., 2001).



**Abb. 1.5:** Oxidation von Cystein durch ROS

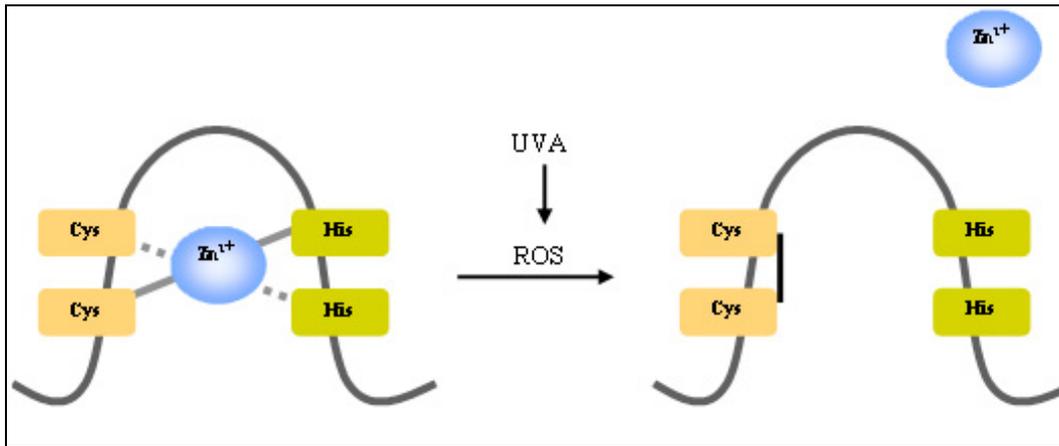
Im ersten Fall (Abb. 1.5) ergibt die „Ein-Elektronen-Oxidation“ eines Cysteins zunächst ein Thiyl-Radikal. Dieses geht eine Bindung mit einem weiteren Cystein ein. Das dabei entstehende Disulfid Radikalanion ist ein starkes Reduktionsmittel und bildet unter Abgabe eines Elektrons eine Disulfidbrücke.



**Abb. 1.6:** Oxidation von Cystein durch ROS

Der zweite Fall (Abb. 1.6) beinhaltet eine direkte Interaktion der Thiolgruppe mit einem Oxidanz., wobei es sich in diesem Beispiel um  $\text{H}_2\text{O}_2$  handelt. Die „Zwei-Elektronen-Oxidation“ führt zunächst zur Sulfensäure, welche anschließend mit einem weiteren Cystein eine Disulfidbrücke bildet.

Die Formation von Disulfidbrücken führt zur Freisetzung von Zinkionen aus entsprechenden Zink-Finger-Proteinen. Dies hat eine Störung der intrazellulären Zinkhomöostase und einen Funktionsverlust der entsprechenden Proteine zur Folge (Abb. 1.7).

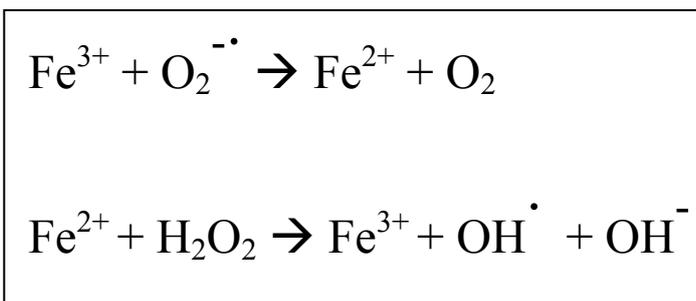


**Abb. 1.7:** Freisetzung von  $Zn^{2+}$  aus Zink-Finger-Motiven nach UV-Einwirkung

Beispielsweise besitzen viele Transkriptionsfaktoren Zink-Finger-Motive um an die DNA zu binden und dadurch die Genexpression zu regulieren. Die ständige Kontrolle der Genexpression ist notwendig für einen einwandfreien Ablauf zellulärer Prozesse. Durch eine Oxidation der Zink-bindenden Cysteine wird die tertiäre Proteinstruktur verändert, die DNA-Bindungsfähigkeit geht verloren und es kommt zu einer fehlerhaften Genexpression, welche u.a. bei der Entstehung von Krankheiten oder der Apoptose eine Rolle spielt.

Des Weiteren kann es durch Oxidation entsprechender Aminosäuren auch zur Freisetzung von Häm aus Proteinkomplexen wie Cytochromen, Peroxidasen und Katalasen kommen (Tyrrell, 2004). Häm-Strukturen sind Komplexverbindungen, welche aus einem Porphyrinsystem und einem zentralen Eisenion bestehen.

Freie Häm-Gruppen sind toxisch und wirken prooxidativ (Ryter et al., 1999; Balla et al., 2003). Auf der einen Seite ist das Porphyrinsystem (ohne Zentralatom) ein starker Photosensibilisator und ist somit in der Lage nach den in Kapitel 1.3 beschriebenen Reaktionen ROS zu generieren. Auf der anderen Seite ist das Eisenion des Häms eine wichtige Komponente der Fenton-Haber-Weiss Reaktion (Abb. 1.8).

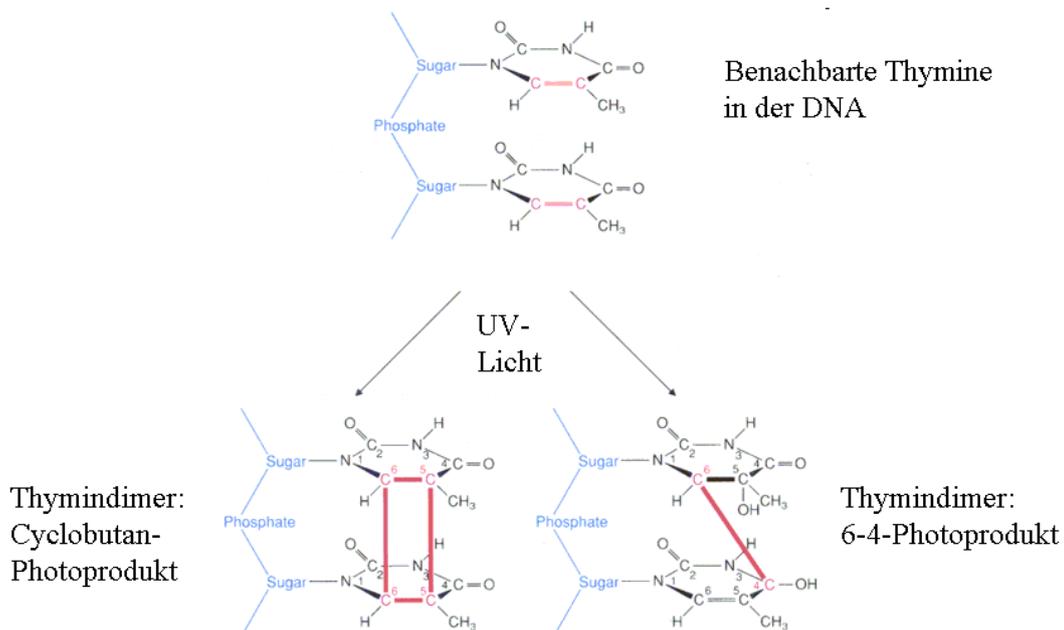


**Abb. 1.8:** Fenton-Haber-Weiss-Reaktion

### 1.4.3 DNA-Schäden

ROS, insbesondere Hydroxylradikale, reagieren mit allen Struktureinheiten der DNA, wobei sowohl Purin- und Pyrimidinbasen, als auch das Desoxyribose Rückgrat geschädigt werden können (Halliwell & Gutteridge, 1989). Die häufigste Form von ROS-induzierten DNA-Schäden nach UV-Bestrahlung ist die Bildung von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (Decreane et al., 2001).

UV Strahlen können wie in Kapitel 1.3 bereits erwähnt auch direkt mit der DNA interagieren. Dabei sind die DNA Basen endogene Chromophore. Durch die direkte Interaktion mit UVB Strahlen entstehen hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidindimere oder Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon Dimere der Basen Thymin und Cytosin (Peifer et al., 2005) (Abb. 1.9).



**Abb. 1.9:** Thymindimere nach UV-Bestrahlung

Eine fehlende und/oder mangelhafte Reparatur der DNA durch die in Kapitel 1.5.3 beschriebenen Mechanismen kann zu einem Basentausch bzw. zu einer Basendeletion innerhalb der DNA führen. Dieser Zustand wird als Mutation bezeichnet. Eine permanente Modifikation der DNA resultiert in einer Akkumulation von Mutationen, welche im

Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs und vorzeitiger Hautalterung stehen (Valko et al., 2007). Eine Akkumulation von Pyrimidindimeren wird als ein wichtiger Faktor bei der UV-induzierten Onkogenese im menschlichen Organismus gesehen (Sutherland et al., 1980; Black & Chan, 1977).

### **1.5 Schutzmechanismen der Haut**

Zum Schutz der Haut vor der Wirkung einer starken UV Exposition verfügt der menschliche Organismus über diverse Schutzmechanismen. Diese können präventiver, antioxidativer und reparativer Natur sein.

#### **1.5.1 Prävention**

Eine der wichtigsten und zugleich einfachsten Möglichkeiten des präventiven Sonnenschutzes sind Textilien. Dabei gilt, je weniger sichtbares Licht durch einen Stoff dringt, desto besser schützt er auch vor UV-Strahlen. Die Schutzwirkung ist somit abhängig von Farbe, Dicke und Art des Materials.

Sonnenschutzmittel, die topisch in Form von Cremes oder Sprays auf die Haut aufgetragen werden, stellen eine weitere Möglichkeit der UV-Protektion dar. Man unterscheidet beim Wirkprinzip zwischen physikalischem und chemischem Sonnenschutz.

Beim physikalischen Sonnenschutzsystem handelt es sich vorwiegend um anorganische Mikropigmente, welche in der Lage sind UV-Strahlung zu streuen, zu reflektieren und zu absorbieren. Sie wirken sowohl im UV-A als auch im UV-B Bereich und dringen nicht in die lebenden Hautschichten ein. Als chemische UV-Filter hingegen dienen Substanzen, welche teilweise in die Haut eindringen. Sie absorbieren UV-Licht und wandeln die aufgenommene Energie in Wärmestrahlung um. Um photoallergische Reaktionen zu vermeiden müssen die Sonnenschutzsubstanzen hautverträglich und vor allem photostabil sein.

Des Weiteren ist die menschliche Haut in der Lage sich in gewissem Maß selbst vor UV-Licht zu schützen. Zu den präventiven Schutzmechanismen der Haut gehören die Verdickung der Hornhaut (Lichtschwiele) und die Synthese von Melanin.

Die Verdickung der Hornhaut wird vorwiegend durch wiederholte Bestrahlung mit UVB Licht induziert. Sie ist die äußerste Begrenzung der Epidermis zur Umwelt und reflektiert bzw. streut Licht.

Eine weitere präventive Schutzreaktion der Haut ist die Synthese von Melanin. Melanozyten, die pigmentbildenden Zellen der Epidermis, werden durch UV-Licht angeregt und bilden in mehrstufigen Reaktionssequenzen aus der Aminosäure Phenylalanin den Hautfarbstoff Melanin innerhalb spezifischer Organellen, den Melanosomen. Diese werden auf die Keratinozyten übertragen, wo sich das Melanin schirmförmig über den Zellkernen lagert. Dort schützt der Hautfarbstoff indem er hauptsächlich UV-Strahlung absorbiert und freie Radikale abfängt. Des Weiteren sind Melaninpartikel in der Lage Licht zu reflektieren, zu streuen und zu brechen.

### **1.5.2 Antioxidatives Netzwerk**

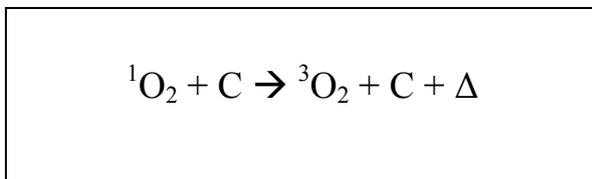
Antioxidantien sind Substanzen die in relativ niedrigen Konzentrationen die Oxidation eines Substrates (z.B. Lipide, Proteine und DNA) verhindern bzw. vermindern können (Halliwell., 1990). Zur photochemischen Oxidation verschiedener Moleküle kommt es durch nach UV-Bestrahlung gebildete ROS. Antioxidantien können ROS physikalisch oder chemisch deaktivieren.

Beim Quenchen (Löschen angeregter Zustände) handelt es sich um einen nicht-radikalischen, physikalischen Prozess. In der Natur beobachtet man physikalisches Quenchen von Singulett-Sauerstoff z.B. im Verlauf der Photosynthese. Bei der Photosynthese werden große Energiemengen von den Membranen der Chloroplasten aufgenommen. Im Regelfall wird diese Energie in photochemischen Reaktionen der Photosynthese verbraucht. Dabei übertragen die durch Licht angeregten Carotinoide die absorbierte Energie auf Chlorophyllmoleküle (Siefermann-Harms, 1987), welche die Energie ihrerseits an das Reaktionszentrum des Lichtsammelkomplexes weiterleiten. Dieses vermittelt die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie.

Bei Energieüberschuss bildet sich vermehrt angeregtes Chlorophyll, welches durch Intersystem Crossing in den Triplettzustand wechselt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die Energie vom Triplettzustand des Chlorophylls auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei wird der im Grundzustand als Triplett vorliegender Sauerstoff in

Singulett-Sauerstoff umgewandelt. In diesem angeregten Zustand weist Sauerstoff eine hohe Reaktivität auf und führt zu oxidativen Modifikationen verschiedener Zellkomponenten (z.B. DNA, Lipide und Proteine) die dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Antioxidantien wie z.B. Carotinoide sind in der Lage sowohl den Triplettzustand des Chlorophylls, als auch Singulett-Sauerstoff zu inaktivieren (Siefertmann-Harms, 1987; Frank et al., 1994). Dabei wird ein Carotinoid im Triplettzustand gebildet, welches unter Wärmeabgabe in den Grundzustand zurückfällt (Siefertmann-Harms, 1987). Das Reaktionsschema des physikalischen Quenchens ist in Abbildung 1.10 dargestellt.



**Abb. 1.10:** Physikalisches Quenchen, C = Carotinoid,  $\Delta$  = Wärme

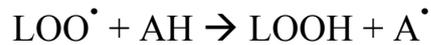
Bei der chemischen Deaktivierung von freien Sauerstoffradikalen handelt es sich um radikalische Reaktionen, die nach dem in Abb. 1.11 dargestellten Prinzip verlaufen.



**Abb. 1.11:** chemisches deaktivieren, A = Antioxidanz

Antioxidantien (Radikalfänger) entfalten ihre Schutzwirkung, indem sie als Reaktionspartner z.B. ein Elektron und ein Proton an das Radikal abgeben. Das Radikal geht somit in eine chemisch stabile Form über, während das Antioxidanz selbst zum Radikal wird. Aufgrund stabilisierender Strukturelemente (z.B. konjugierte Doppelbindungssysteme) ist dieses Radikal weniger reaktiv als das ursprüngliche Sauerstoffradikal. Im weiteren Verlauf kann das „Antioxidanz-Radikal“ z.B. zu stabilen, neutralen Molekülen abreagieren.

Antioxidantien unterbrechen nach oben genanntem Prinzip auch die Lipidperoxidation (siehe Kapitel 1.4.1). Der Kettenabbruch verläuft nach dem in Abb. 1.12 gezeigten Prinzip.



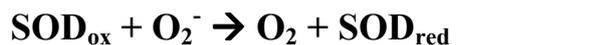
**Abb. 1.12:** Kettenabbruch der Lipidoxidation

Die antioxidativen Schutzmechanismen der Haut können direkter bzw. indirekter enzymatischer und nicht-enzymatischer Natur sein (Valko et al., 2007).

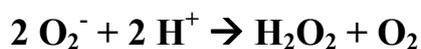
Zum direkten enzymatischen Schutz gehören Superoxid-Dismutasen (Punnonen et al., 1995), Peroxidasen und Katalasen. Superoxid-Dismutasen katalysieren die Umwandlung zweier Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid, welches von Peroxidasen bzw. Katalasen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird.

Alle genannten Enzyme besitzen ein Metallion im katalytischen Zentrum, welches in reduzierter oder oxidiert Form vorliegen kann. Durch Aufnahme bzw. Abgabe von Elektronen deaktivieren diese Enzyme ROS somit chemisch (siehe Abb.1.11). Dabei handelt es sich um Disproportionierungsreaktionen, d.h. Superoxidanionen (Superoxid-Dismutase) bzw. Wasserstoffperoxide (Peroxidase, Katalase) werden nicht nur chemisch deaktiviert sondern sind zeitgleich sowohl Reduktions-, als auch Oxidationsmittel der Enzyme.

Ein Reaktionsschema ist am Beispiel der Superoxid-Dismutase (SOD) in Abb. 1.13 dargestellt.

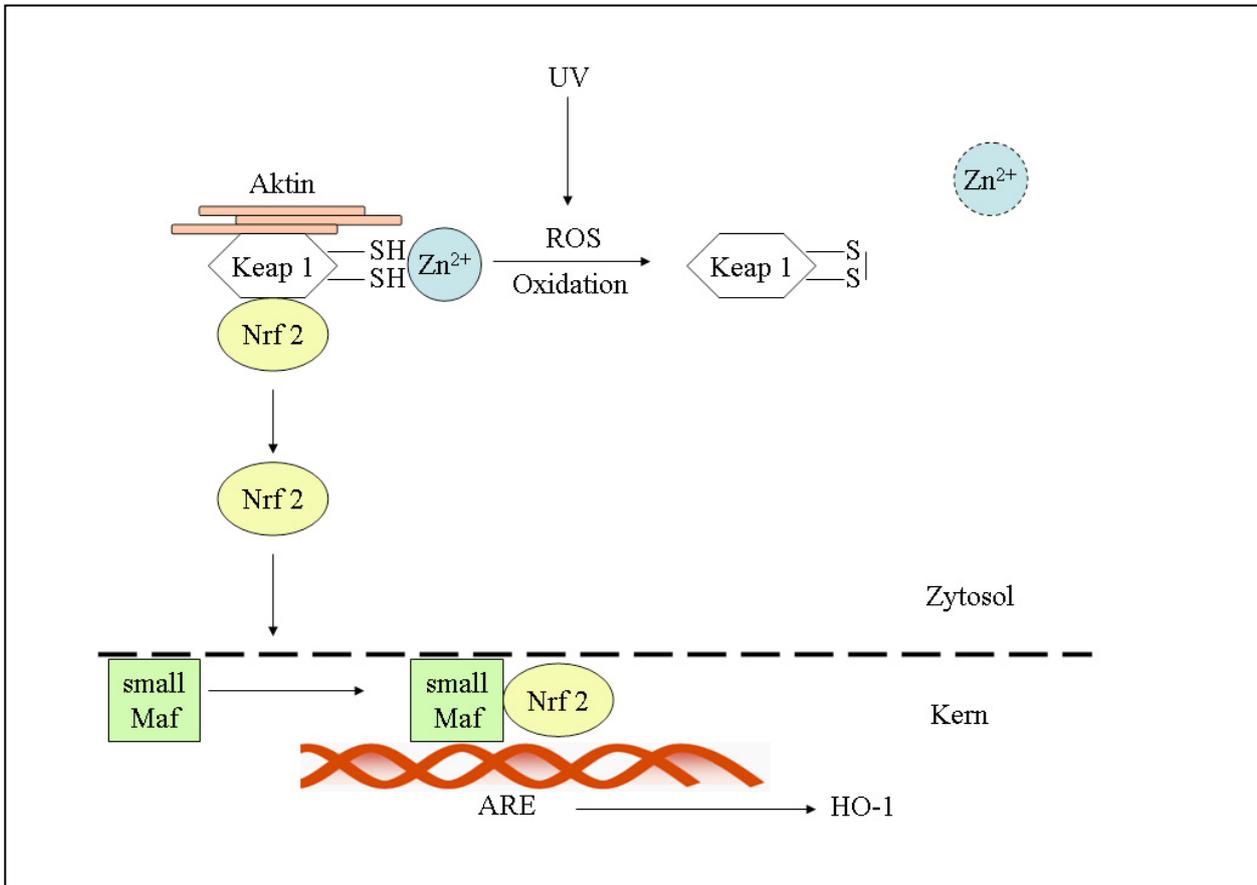


Summengleichung:



**Abb. 1.13:** Reaktionsschema der Superoxiddismutase

Zum indirekten enzymatischen Schutzsystem gehört z.B. das Enzym Hämoxigenase-1 (HO-1), welches unter Bedingungen des oxidativen Stresses verstärkt exprimiert wird (Keyse & Tyrrell, 1987) (Abb.1.14)



**Abb. 1.14:** Aktivierung der HO-1 durch ROS

Unter basalen Bedingungen wird die Nrf2-abhängige HO-1 Transkription durch einen negativen Regulator, Keap1, unterdrückt. Keap1 gehört zu den Zink-Finger-Proteinen (siehe Kapitel 1.4.2). Durch die vermehrte Bildung von ROS nach UV-Bestrahlung werden die Cysteine des Zinkfingermotivs oxidiert und es entsteht eine Disulfidbrücke. Diese Änderung der Proteinstruktur von Keap1 führt zur Freisetzung von Zink und der Dissoziation von Nrf2. Nrf2 gelangt in den Zellkern wo es small Maf bindet. Der Nrf2-small Maf Komplex aktiviert schließlich die „antioxidant responsive element“ (ARE)-abhängige HO-1 Expression (Zhang, 2006).

HO-1 ist ein Enzym, welches den Geschwindigkeits-limitierenden Schritt des Häm Abbaus katalysiert. Dabei wird Häm (Ferriprotoporphyrin IX) unter Verbrauch von NADPH und O<sub>2</sub>

# 1. Einleitung

zu Biliverdin-IX $\alpha$ , Kohlenmonoxid (CO) und Eisenionen oxidiert. Biliverdin-IX $\alpha$  wird anschließend durch das Enzym Biliverdin-Reduktase zum Gallenfarbstoff Bilirubin reduziert (Ryter und Tyrrell, 2000) (Abb. 1.15)

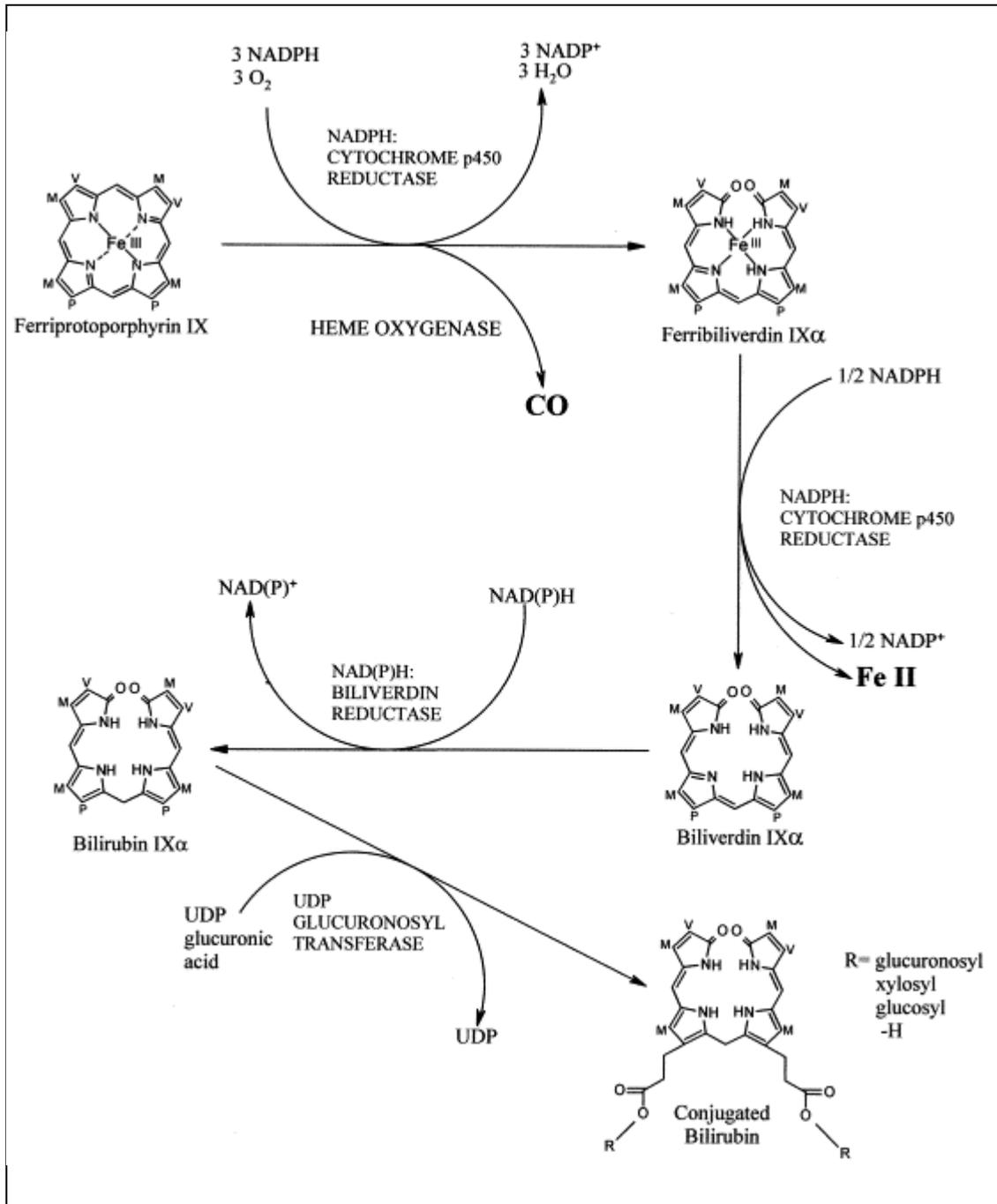


Abb. 1.15: Abbau von Häm

Das Enzym HO-1 hat somit eine duale, aber indirekte antioxidative Wirkung. Zum einen baut es freies Häm ab, welches in prooxidativen Reaktionen an der Bildung von ROS beteiligt ist (siehe Kapitel 1.4.2). Des Weiteren führt es zu Generierung der Gallenfarbstoffe Biliverdin und Bilirubin, welche antioxidative Eigenschaften besitzen (Stocker et al., 1987).

Der nicht enzymatische Schutz wird durch Antioxidantien wie Glutathion, Carotinoide, Flavonoide, Vitamin E und Vitamin C repräsentiert (Valko et al., 2007). Diese deaktivieren ROS nach in Abb. 1.10 und/oder Abb. 1.11 dargestellten Reaktionsschemata.

Da ROS im Verlauf photooxidativer Prozesse in der Haut entstehen, spielen mit der Nahrung aufgenommene Antioxidantien wie Carotinoide und Vitamin E eine wichtige Rolle beim Schutz der Haut vor oxidativen Schäden.

### 1.5.3 Reparatur

Trotz vorhandener präventiver und antioxidativer Schutzmechanismen der Haut (siehe Kapitel 1.5.1 und 1.5.2) treten bei übermäßiger UV-Exposition Schäden auf zellulärer Ebene auf. Dabei handelt es sich in erster Linie um Veränderungen von Nukleinsäuren (z.B. Thymindimere), welche mit Hilfe eines zelleigenen Reparatursystems, der Exzisionsreparatur, entfernt werden können. Im Verlauf dieser Reaktion werden schadhafte DNA-Stellen eines DNA-Stranges zunächst von spezifischen UVr (UV-repair) Proteinen erkannt (Giese, 1976). Anschließend wirken verschiedene UVr Proteine als Endonucleasen und lösen die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen. Exonucleasen schneiden die fehlerhaften Nukleotide bzw. Dimere aus dem betroffenen DNA-Strang, woraufhin die fehlenden DNA-Stücke komplementär zum noch intakten DNA-Strang von der DNA-Polymerase aufgefüllt werden. Die DNA-Ligase fügt die neu eingesetzten Nukleotide zu Polynukleotiden zusammen und schließt die Lücke. Der entsprechende Abschnitt der DNA hat somit wieder in seine ursprüngliche Basensequenz.

Durch ROS oxidierte Proteine werden u.a. durch das proteasomale System abgebaut. Ein konjugierendes Enzym katalysiert die Bildung einer Peptidbindung zwischen Ubiquitin und der NH<sub>2</sub>-Gruppe an der Seitenkette eines Lysinrestes am modifizierten Protein. Weitere Ubiquitinmoleküle lagern sich an und bilden somit eine Ubiquitinkette. Durch diese

Ubiquitinierung werden die oxidierten Proteine zum Proteasom dirigiert, welches das Zielmolekül proteolytisch spaltet (Hershko & Ciechanover, 1998).

## 1.6 Carotinoide

### 1.6.1 Carotinoide – Vorkommen und Funktion

Carotinoide sind natürliche Farbstoffe, die sowohl im Tierreich, vor allem aber im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Charakteristisch ist das C-40-Kohlenstoffgerüst, welches aus 8 Isopreneinheiten mit zahlreichen konjugierten Doppelbindungen besteht. Ausgehend vom Lycopin, einem linear vorliegendem C-40-Molekül, lassen sich durch Modifikationen, z.B. Cyclisierungen oder Einführung von Sauerstoffatomen die meisten Carotinoide ableiten (Abb 1.16) (Britton, 1995).

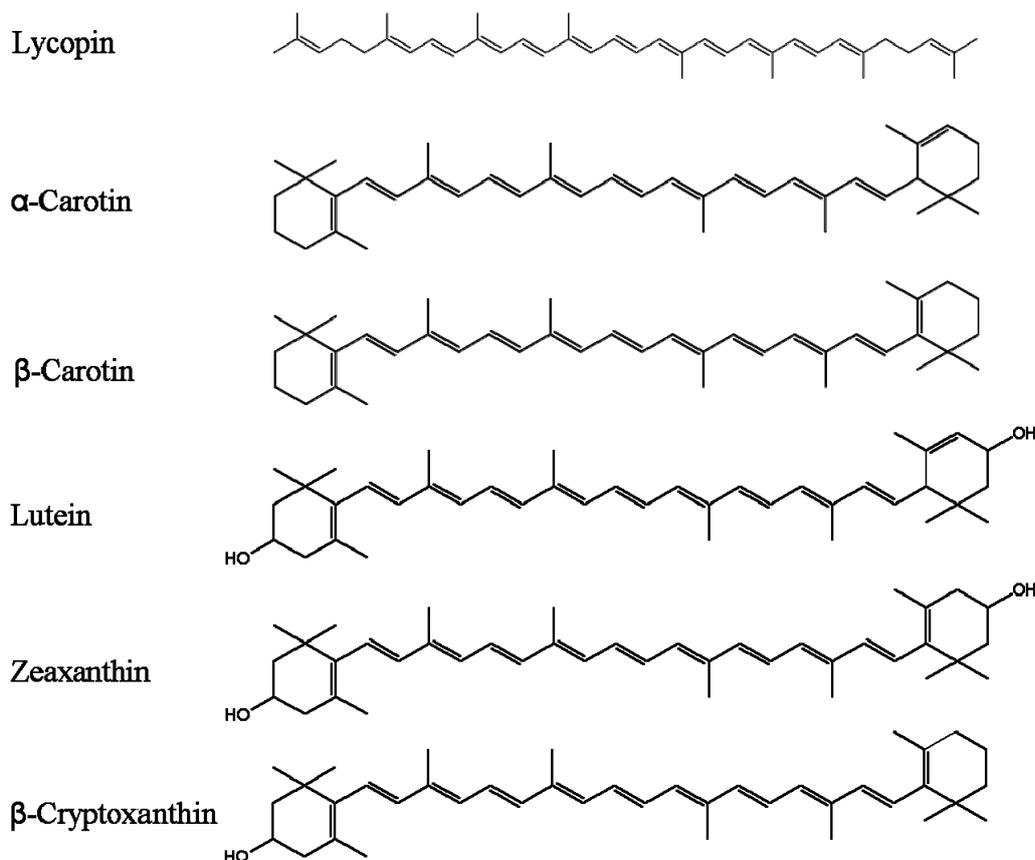


Abb. 1.16: Strukturen von Carotinoiden

Die meisten Carotinoide absorbieren Licht im Bereich von 400-500 nm, wodurch sie ihre charakteristische gelbe bis rote Farbe erhalten. So erscheinen beispielsweise Karotten aufgrund ihres hohen  $\beta$ -Carotin-Gehalts orange, Tomaten werden durch Lycopin rot gefärbt.

Bisher wurden über 700 verschiedene Carotinoide isoliert und charakterisiert. Diese Substanzklasse lässt sich in zwei Gruppen einteilen. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffverbindungen, wohingegen Xanthophylle Sauerstoffatome enthalten, die vorwiegend in Hydroxy-, Keto- und Epoxygruppen angeordnet sind.

Neben ihren antioxidativen Funktionen erfüllen Carotinoide in der Natur weitere wichtige Aufgaben. Zum einen dienen sie als Warn- bzw. Lockstoffe indem sie Früchten (Ananas, Tomate), Blüten (Rose, Mohn) und Tieren (Flamingo, Lachs) ihre Farben verleihen.

Des Weiteren spielen Carotinoide in Pflanzen neben dem Chlorophyll eine wichtige Rolle bei der Photosynthese. Sie liegen in den Membranen der Photosyntheseorganellen, den Chloroplasten, als Teil des lichtsammelnden Antennenkomplexes vor. Dort führen sie zur Erweiterung des absorbierten Lichtspektrums, indem sie aufgenommene Energie an Chlorophylle weiterleiten. Diese weisen eine Absorptionslücke im grünen Bereich auf. Somit kommt es zu einer gesteigerten Lichtausbeute, die in einer erhöhten Photosyntheseeffizienz resultiert.

### **1.6.2 Carotinoide im Menschen**

Mensch und Tiere sind nicht in der Lage Carotinoide selbst zu synthetisieren. Die im Organismus vorkommenden Carotinoide sind mit der Nahrung zugeführt worden.

Pro Kopf werden in Deutschland etwa 5,33 mg Carotinoide pro Tag aufgenommen (Pelz et al., 1998), wobei die am häufigsten in der Nahrung vorkommenden Carotinoide  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin, Lycopin, Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und  $\alpha$ -Cryptoxanthin sind (Mayne, 1995). All diese Verbindungen können auch im humanen Blutplasma nachgewiesen werden (Stahl et al., 1993)

Generell kommen Carotinoide in allen Organen des Organismus vor, wobei der Carotinidgehalt abhängig vom Gewebe stark variiert. So weisen z.B. die Leber und die Nebenniere wesentlich höhere Carotinoidspiegel als z.B. die Lunge, das Herz oder die Haut (Biesalski et al., 2002) auf. In der Haut liegen die Carotinoidkonzentrationen zwischen 0,2 –

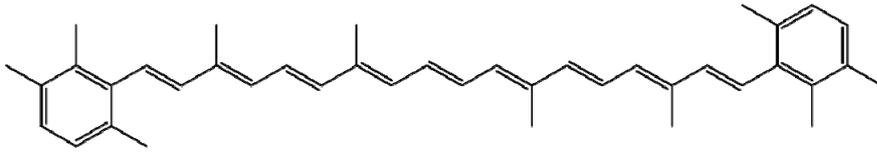
0,6 nmol/g feuchte Haut, wobei der Anteil je nach Carotinoid und Hautregion variieren kann (Peng et al., 1993; Stahl et al., 1998).

Etwa 10 % der mit der Nahrung aufgenommenen Carotinoide können zu Vitamin A (Retinol) umgewandelt werden. Vitamin A spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, dem Sehprozess und der Differenzierung und Proliferation verschiedener Zellen (Biesalski et al., 1995). Beta-Carotin besitzt die höchste Pro-Vitamin-A-Aktivität.

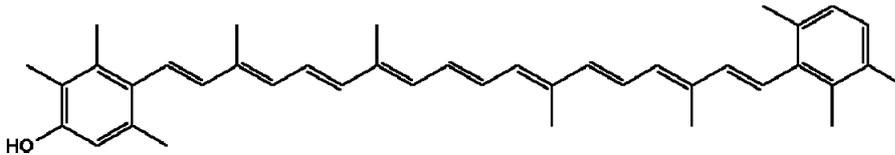
### 1.6.3 DHIR

3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR) ist ein natürlich vorkommendes phenolisches Carotinoid. Es ist wie alle Carotinoide aus einem C-40-Kohlenstoffgerüst aufgebaut. Als strukturelle Besonderheit weist es jedoch zwei phenolische Endgruppen auf. Carotinoide mit aromatischen bzw. phenolischen Endgruppen waren bis in die 50iger Jahre nicht bekannt. 1954 wurden erstmals Carotinoide mit aromatischen Endgruppen von Yamaguchi et al. beschrieben. Dabei handelte es sich um die Carotinoide Renieratin und Isorenieratin, welche aus der zerkleinerten Rohmasse des japanischen Seeschwammes *Reniera japonica* extrahiert und chromatographisch aufgetrennt wurden. Es stellte sich jedoch heraus, dass Isorenieratin nicht aus dem Schwamm selbst, sondern aus den mit dem Schwamm in Symbiose lebenden Bakterien stammte. 1969 wurden aus dem Bakterium *Streptomyces mediolani* neben Isorenieratin noch zwei weitere Carotinoide mit aromatischen Endgruppen isoliert (Arcamone et al., 1969). Es handelte sich um 3-Hydroxyisorenieratin (HIR) und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR). Diese unterscheiden sich vom Isorenieratin durch eine (HIR) bzw. zwei (DHIR) Hydroxylgruppen in para-Position zur Polyenkette (Abb. 1.17)

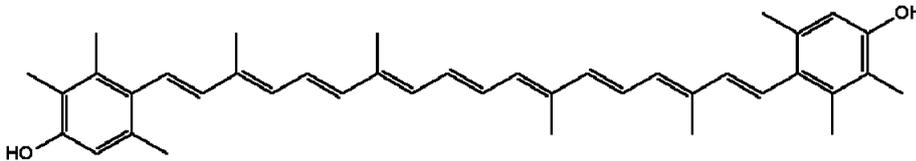
Isorenieraten



3- Hydroxyisorenieraten



3,3'-Dihydroxyisorenieraten

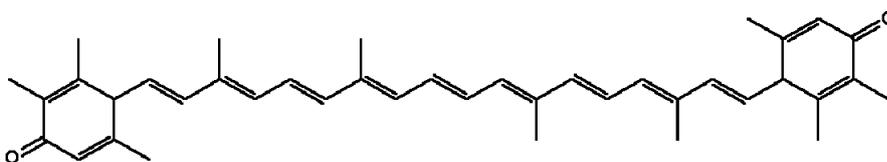


**Abb. 1.17:** Strukturen von Isorenieratin, 3-Hydroxyisorenieratin und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin

DHIR konnte ebenfalls aus *Brevibacterium linens*, welches bei der industriellen Produktion verschiedener Rotschmiere-Käsesorten wie z.B. Tilsiter, Limburger oder Romadour eingesetzt wird, isoliert werden.

Es wird davon ausgegangen, dass die jeweiligen antioxidativen Fähigkeiten eines Carotinoids von seinen funktionellen Gruppen und seinen Metaboliten abhängt. Aufgrund der Anwesenheit von polyenischen und phenolischen Strukturelementen sollte DHIR als bifunktionaler Radikalfänger wirken.

chinoide Form von 3,3'-Dihydroxyisorenieraten



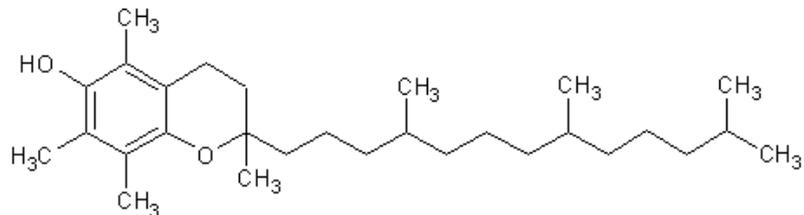
**Abb. 1.18:** Struktur von 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\Phi,\Phi$ -carotin-3,3'-dion

## 1.7 Vitamin E

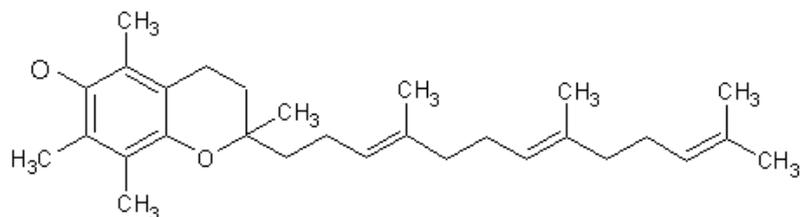
### 1.7.1 Vitamin E – Struktur und Vorkommen

Ein weiteres natürliches, sehr effektives Antioxidanz ist Vitamin E (Ingold et al., 1987). Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe fettlöslicher, strukturell sehr ähnlicher Verbindungen, welche in die zwei Untergruppen Tocopherole und Tocotrienole eingeteilt werden. Alle Vitamin E-Formen weisen eine gemeinsame Grundstruktur bestehend aus einem an Position 6 hydroxylierten Chromanring auf. Während Tocopherole eine gesättigte Seitenkette an Position 2 des Chromanringes tragen, haben Tocotrienole an gleicher Position eine dreifach ungesättigte Seitenkette (Abb. 1.19) (Schneider et al., 2005). Tocopherole und Tocotrienole liegen als  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  oder  $\delta$  Vitamine vor, die sich in der Anzahl und Position der Methylgruppen am Chromanring unterscheiden (Lodge, 2005).

$\alpha$ - Tocopherol



$\alpha$ - Tocotrienol



**Abb. 1.19:** Strukturen von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol

Vitamin E kann nur von pflanzlichen Organismen synthetisiert werden. Tiere und Menschen müssen Vitamin E mit der Nahrung aufnehmen, wobei vor allem pflanzliche Lebensmittel mit

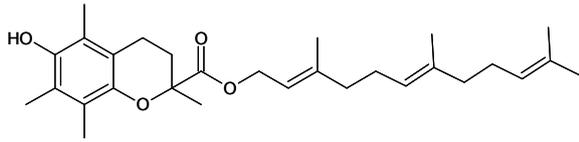
einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren hohe Gehalte an Vitamin E aufweisen. Dazu zählen z.B. pflanzliche Öle wie Weizenkeimöl, Sonnenblumenöl oder rotes Palmöl.

Als lipophile Verbindung ist  $\alpha$ -Tocopherol ein Bestandteil aller Membranen. Dort spielt es eine wichtige Rolle als Antioxidanz, indem die Verbindung Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor dem Abbau durch die Lipidoxidation schützt (Esterbauer et al., 1991). Auch im Organismus des Menschen wird Vitamin E als ein wichtiges Antioxidanz im Zusammenhang mit Kettenabbruchsreaktionen bei der Lipidoxidation gesehen (Ingold et al., 1987). In menschlichem Blut und Gewebe finden sich hauptsächlich  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol (Lindsay et al., 2000).

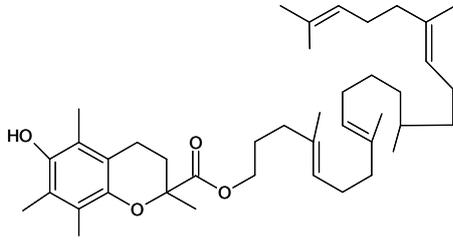
Die Eigenschaft von Vitamin E als Antioxidanz zu wirken, beruht auf der phenolischen Hydroxylgruppe. Diese gibt das Wasserstoffatom an ein Lipidperoxidradikal ab. Dabei entstehen ein stabiles Lipidmolekül und ein „Vitamin E-Radikal“. Letzteres ist relativ stabil, da das ungepaarte Elektron über die aromatische Struktur des Chromanringes delokalisiert wird.

### 1.7.2 Synthetische Vitamin E Derivate

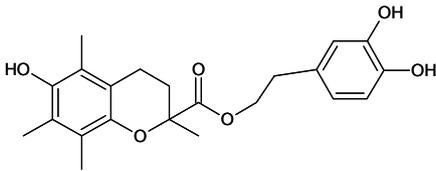
Mit dem Ziel sowohl die Aktivität, als auch die Stabilität zu verbessern wurden synthetische Vitamin E Derivate hergestellt. Dabei handelt es sich um die Substanzen FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82, welche in Abbildung 1.6 gezeigt sind.



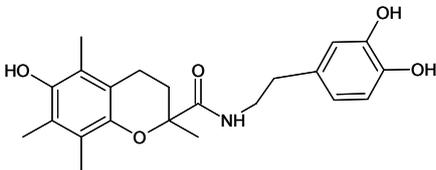
FEBL 45



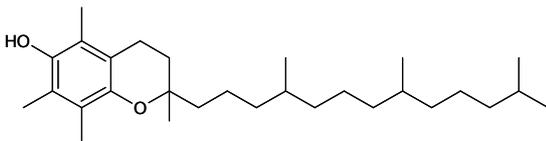
FEBL 70



FEBL 80



FEBL 82



$\alpha$ -Tocopherol

Alle vier Verbindungen unterscheiden sich von der Stammsubstanz  $\alpha$ -Tocopherol in der Struktur ihrer Seitenketten. Durch die Modifikationen der Seitenketten sollte eine größere Stabilität der Substanzen, sowie ein höheres antioxidatives Potential erzielt werden.

FEBL-45 und FEBL-70 weisen im Gegensatz zu  $\alpha$ -Tocopherol eine verlängerte, sowie ungesättigte Seitenkette auf. FEBL-80 und FEBL-82 hingegen besitzen zusätzliche funktionelle Reste in Form eines Phenolringes.

## 1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit

Carotinoide und Vitamin E spielen aufgrund ihrer antioxidativen Fähigkeiten eine wichtige Rolle als Photoprotektoren der menschlichen Haut.

Im Rahmen dieser Promotion sollten die antioxidativen Eigenschaften des phenolischen Carotinoids DHIR und der 4 neu synthetisierten Vitamin E Derivate FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82 in einem Zellmodell untersucht werden. Strukturell ähnliche Kontrollsubstanzen waren Lutein und  $\alpha$ -Tocopherol. Als Zellkulturmodell diente die humane dermale Fibroblastenzelllinie CCD-1064 Sk.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

- Untersuchung der Zelltoxizität der verwendeten Substanzen vor und nach UV- Bestrahlung
- Untersuchung der UVA-induzierten ROS-Bildung in Fibroblasten nach Inkubation mit DHIR und Lutein
- Untersuchung der antioxidativen Wirkung der verwendeten Substanzen auf die UVA-induzierte Photooxidation von Proteinen anhand der Freisetzung von Zink aus Proteinkomplexen und der Expression des Enzymes HO-1
- Untersuchung der antioxidativen Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Hyperthermie-induzierte Zinkfreisetzung aus Proteinkomplexen
- Untersuchung der Wirkung von DHIR und Lutein auf die UVB-vermittelte Bildung von Thymindimeren

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Analysewaage 1246	Sartorius, Göttingen, D
Begasungsbrutschrank (Zellkultur)	Binder, Tuttlingen, D
Blotter V20-SDB	Roth, Karlsruhe, D
Camera Controller C4742	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
Digital Camera C4742	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
Elektrophoresekammer X Cell Sure Lock™	Invitrogen, Karlsruhe, D
ELISA Plate Reader, PowerWaveX	BioTek Instruments, Vermond, USA
Fluoreszenz Plate Reader, FLUOstar Optima	BMG Labtech, Offenburg, D
Heizblock	PeqLab, Erlangen, D
Lamda 10 System	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
Magnetrührer IkamagRCT	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, D
Mikroskop Axiovert 100TV	Carl Zeiss, Jena, D
Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, D
Milli-Q-Anlage	Millipore, Eschborn, D
Phasenkontrastmikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar, D
pH-Meter 537	WTW, Weilheim, D
Pipetten, 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Power Supply Consort E835	Merck, Darmstadt, D
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Kelheim, D
Sonifier (Branson 250)	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D
Sterilbank Gelaire BSB 4A	Flow Laboratories, Michigan City, USA
Trockenschrank UT	Heraeus Instruments, Düsseldorf, D
UV/Vis Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
UV-Bestrahlungsanlage BioSun®	Vilbert Lourmat, Marnè-la Vallée, F
Vortex Genie 2	Bender & Hobein Ag, Zürich, CH
Wasserbad	Klöttermann, Düsseldorf, D
Filmkassette, Hypercassette™	GE Healthcare, München, D
Attafluor cell chamber	Invitrogen, Karlsruhe, D

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Chemiluminescence BioMax Light Film	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Deckgläser Ø 25 mm (Zellkultur)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Gelkassetten 1,5 mm (Elektrophorese)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Kryotubes	Greiner, Frickenhausen, D
Küvetten, No. 67.742, 1 dm, Plastik	Sarstedt, Nümbrecht, D
Nitrocellulose-Membran Hybond <sup>TM</sup> -C Extra	GE Healthcare, München, D
Objekträger Super-Frost	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß (steril) 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß (steril) 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß (steril) 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Whatmanpaper (Blotten)	Roth, Karlsruhe, D
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen, Ø 3cm, Ø 6cm	Greiner, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrechen (steril) 15 ml	Greiner, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrechen (steril) 50 ml	Greiner, Frickenhausen, D

## 2.3 Chemikalien

2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat, 97 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Albumin (BSA) Fraktion V ≥ 98 %	Roth, Karlsruhe, D
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Fluka, Seelze, D
Chemilumineszenz-Kit SuperSignal West	Pierce, Bonn, D
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe, D
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA (Ethylendiamintetraacetat) p.a.	Merck, Darmstadt, D

## 2. Material

---

EGTA (Etylenglycoltetraacetat) p.a.	Merck, Darmstadt, D
Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, D
Essigsäure 100 5 (Eisessig) p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ethanol vergällt und absolut	Merck, Darmstadt, D
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Fixiererkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, D
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
HCl konz. und 25 % p.a.	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver, fettfrei, blotting grade	Roth, Karlsruhe, D
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O p.a.	Merck, Darmstadt, D
NaOH p.a.	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumfluorid	Fluka, Seelze, D
Natriumvanadat	Fluka, Seelze, D
Penicillin Streptomycin (100x), 200mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Poncaeu-S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Precision Plus Standard Protein Marker	Biorad, München, D
ProLong®gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 40 (37,5 : 1)	Roth, Karlsruhe, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
SDS ultra pure 99 %	Roth, Karlsruhe, D
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
TEMED (N,N,N',N'-	Serva, Heidelberg, D
Tetramethylethylendiamin)	
Tetrahydrofuran	Fluka, Seelze, D
Trichloressigsäure, reinst.	Merck, Darmstadt, D
TRIS Pufferan ≥ 99,9 % p.a.	Roth, Karlsruhe, D
Tris Pufferan® ≥ 99,9 %	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Tween20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Ziegenormalserum	Dianova, Hamburg, D
$\beta$ -Glycerolphosphat Dinatriumsalz x H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

### 2.4 Puffer & Lösungen

Anodenpuffer I	0,3 M Tris 10 % (v/v) MeOH pH = 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris 10 % (v/v) MeOH pH = 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM Glycin 10 % (v/v) MeOH pH = 9,4
TBST-Puffer 10 x	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween20 pH = 7,5
Blockierlösung (Western Blot)	5 % Milchpulver in TBST 1 x
Blockierlösung (Immunostaining)	3 % Ziegenormalserum 0,3 % Triton X-100 in PBS
Einfriermedium	20 % FCS 5 % DMSO in DMEM-Medium

## 2. Material

---

PBS	137 mM NaCl 6,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,6 mM KCl 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Lysepuffer RL (Western Blot)	20 mM Tris 139 mM NaCl 10 mM NaF 9,9 mM Na-Pyrophosphat*10 H <sub>2</sub> O 4 mM EDTA pH 8,0 4 mM EGTA pH 8,0 1,6 mM Na-Vanadat 20 mM β-Glycerolphosphat 1 % Triton X-100 pH = 7,4 je 50 ml Lysepuffer wurde eine Tablette Complete Proteaseinhibitor hinzugefügt
Blaupuffer 5x	0,25 mM Tris 10 % SDS 30 % Saccharose 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

## 2.5 Antikörper

Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D
Anti-Actin, polyclonal, rabbit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Anti-GAPDH, polyclonal, mouse	Chemicon international, Eschborn, D
Anti-HO-1, monoclonal, mouse	Biomol, Hamburg, D
Anti-Thymindimer, monoclonal, mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Goat Anti-Mouse HRP-conjugated (2. AK)	Pierce, Bonn, D
Goat Anti-Rabbit HRP-conjugated (2. AK)	Pierce, Bonn, D

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 verwendete Medien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hank's Balanced Salt Solution, HBSS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

### 2.6.2 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche in der Zellkultur mit humanen Hautfibroblasten (CCD-1064 Sk) durchgeführt. Als Grundlage für die CCD-1064 Sk Zelllinie dienten Präputiumzellen eines gesunden, eurasischen Neugeborenen. Die adherent wachsenden Zellen wurden in gefrorenem Zustand (- 80°C) von ATCC (Wesel, D) bezogen. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 5-20 eingesetzt.

---

## 2.7 Carotinoide und Vitamin E Derivate

3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR) und Lutein wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ernst (BASF, Ludwigshafen, D) zur Verfügung gestellt.

Die synthetisch hergestellten Vitamin E Derivate wurden von Herrn Prof. Manfredini, (Università di Ferrara, I) zur Verfügung gestellt.

Das  $\alpha$ -Tocopherol wurde von Henkel (Düsseldorf, D) bezogen.

## 2.8 Gase

Stickstoff, Reinheit 5,0

Linde, Höllriegelskreuth, D

CO<sub>2</sub>

Linde, Höllriegelskreuth, D

## 2.9 Software

AquaCosmos 1.2

Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D

ACD/Chem Sketch 12.0

ACD Labs, Frankfurt, D

ImageJ 1.36b

National Institutes of Health, Bethesda, USA

KC4 3.1

BioTek Instruments, Vermont, USA

## **3. Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Alle Geräte und Lösungen der Zellkultur wurden vor der Verwendung autoklaviert oder bereits steril vom Hersteller bezogen. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

#### **3.1.1 Kultivierung von Zellen**

Humane dermale Fibroblasten (CCD-1064 Sk, 2.6.2) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10% FBS sowie 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (20 mg/ml) versetzt worden war (Komplettmedium), kultiviert. Kulturflaschen und – schalen wurden in einer 37°C warmen, wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid inkubiert. Das Zellwachstum wurde täglich visuell mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes kontrolliert und das Komplettmedium wurde ein- bis zweimal in der Woche erneuert. Bei Erreichen einer 80-90 %-igen Konfluenz konnten die Zellen passagiert werden. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte das Ablösen der adherenten Zellen mit einer Trypsin-EDTA:PBS (1:1) Lösung. Nach 3-5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Komplettmedium gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem Teilungsverhältnis von 1:5 in neue Kulturflaschen überführt bzw. 1:5 bis 1:10 mit Komplettmedium verdünnt und in entsprechenden Kulturschalen ausgesät.

#### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Konservieren von Zellen erfolgte in möglichst frühen Passagen. Dazu wurde eine wie in Kapitel 3.1.1 erhaltene Zellsuspension für 10 min mit 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5-10 ml Einfriermedium (2.4) resuspendiert. Von der hergestellten Suspension wurden je 1-2 ml (ca. 1 Mio. Zellen) in ein Kryoröhrchen aliquotiert, welche bei -80°C gelagert wurden.

Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen wurden diese bei RT aufgetaut und in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 10 ml Komplettmedium überführt. Nach 20-24 h wurde das Komplettmedium erneuert und nach dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Prinzip weiter verfahren.

## 3.2 Inkubation der Zellen mit Substanzen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde die adhärenente Monolayer-Zellschicht zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h mit Komplettmedium ohne FBS-Zusatz inkubiert.

Durch Einwiegen einer entsprechenden Substanzmenge wurden 10 mM Stammlösungen der Carotinoide in THF und der Vitamin E Derivate in DMSO hergestellt. Diese wurden in FBS-freiem Medium verdünnt, so dass Inkubationslösungen mit den Konzentrationen 1,5 µM, 5 µM und 10 µM vorlagen. Die angegebenen Konzentration entsprechen der Endkonzentration der Substanz im Zellkulturmedium. Die THF-Endkonzentration lag dabei bei 0,1 %. Als Kontrolle diente eine Inkubationslösung, welche nur THF enthielt. Alle Zellen wurden mit der jeweiligen Inkubationslösung für 24 h bei 37°C inkubiert.

## 3.3 UV-Bestrahlung von Zellen

Die vorbereiteten Zellen (3.1.1 und 3.2) wurden zweimal mit PBS und einmal mit HBSS (Hanks balanced salt solution) gewaschen. Die anschließende Bestrahlung erfolgte in 1 ml HBSS pro Ø 3 cm Kulturschale bzw. 24 „well-Platte“ und 3 ml HBSS pro Ø 6 cm Kulturschale mit Hilfe der BioSun UV-Lampe (Vilber Lourmat, F). Die Bestrahlungsdosis war dabei abhängig von dem zu untersuchenden Parameter und die durchschnittliche Intensität betrug 4,6 mW/cm<sup>2</sup> bei UV-A und 1,1 mW/cm<sup>2</sup> bei UV-B.

#### **3.4 Sulforhodamin B (SRB) „assay“**

Der SRB „assay“ ist eine schnelle und effektive Methode zur Bestimmung der Zellviabilität. Der Farbstoff Sulforhodamin B bindet dabei elektrostatisch und pH-abhängig an die basischen Aminosäurereste der Proteine. Sulforhodamin B lässt sich photometrisch vermessen wobei die gemessenen Absorptionswerte linear mit der Zellzahl korrelieren.

Humane dermale Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % in 24 „well-Platten“ kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Carotinoiden und Vitamin E Derivaten (3.2) und die Bestrahlung mit UV-A und UV-B (3.3).

Nach einer 24 stündigen Postinkubation mit FBS-freiem Komplettmedium wurden die Zellen mit je 1 ml kalter, 10 %-iger Trichloressigsäure (w/v) für 1 h bei 4°C fixiert. Folgend wurden die Zellen mehrfach mit Reinstwasser gewaschen und bei RT getrocknet. Die trockenen, fixierten Zellen wurden für 10 min bei RT mit einer 0,4 %-igen SRB-Lösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend mittels 1 %-iger Essigsäure (v/v) entfernt und die Zellen wurden bei RT getrocknet. Durch Zugabe von je 130 µl 10 mM Tris-Lösung wurde der SRB-Farbstoff aus den Zellen gelöst. Nach Überführung von 100 µl je Ansatz in eine 96 „well-Platte“ erfolgte die photometrische Messung bei 492 nm im ELISA-Plattenlesegerät. Die bei 620 nm gemessenen Referenzwerte der Schwebeteilchen wurden von den bei 492 nm gemessenen Absorptionswerten abgezogen.

#### **3.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Probe erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976).

Je 6 µl mittels Ultraschall sonifizierte Probe wurden zu 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 590 nm. Die daraus resultierenden Absorptionswerte konnten mit Hilfe einer BSA-Regressionsgerade in den Proteingehalt umgerechnet werden.

## **3.6 Nachweis der HO-1 Expression**

Die Hämoxxygenase-1 (HO-1) Expression wird durch ultraviolette Strahlung induziert und gilt als Marker für oxidativen Stress.

Die gesteigerte Expression von HO-1 lässt sich mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot Analyse nachweisen.

### **3.6.1 Vorbereitung der Zellen**

Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert (3.1.1). Anschließend erfolgte die Inkubation mit den gewünschten Substanzen (3.2) und die Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UV-A (3.3). Nach einer 24 stündigen Postinkubation mit FBS-freiem Komplettmedium wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 50 µl Lysispuffer (2.4) je Ø 6 cm Kulturschale lysiert. Die Proben konnten bei – 80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet werden.

Vor der SDS-PAGE wurden die Zelllysate mittels Ultraschall sonifiziert und der Gesamtproteingehalt nach Bradford (3.5.1) bestimmt. Um die Proteine zu denaturieren wurden die Proben mit der entsprechenden Menge an 5 x Blaupuffer (2.4) versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert.

### **3.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist eine einfache und effektive Methode um Proteine voneinander zu trennen und zu identifizieren. Sie beruht auf dem Prinzip, dass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Plus-Pol wandern und dabei entsprechend ihrer Molekülgröße in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt werden. Die optimale Konzentration des Polyacrylamids hängt dabei von der erwarteten Proteingröße ab. Für den Expressionsnachweis der HO-1 wurden Gele mit 12% Polyacrylamid verwendet.

Die Gele wurden in Kunststoffgelkassetten (Invitrogen) wie folgt zusammen gegossen:

Trenngel:

- 48 % H<sub>2</sub>O reinst.
- 25 % Trispuffer (1,5 M, pH 8,8)
- 1 % SDS
- 25 % Rotiphorese Mix
- 0,1 % TEMED
- 1 % APS

Sammelgel:

- 70 % H<sub>2</sub>O reinst.
- 13 % Trispuffer (1 M, pH 6,8)
- 1 % SDS
- 14,9 % Rotiphorese Mix
- 0,1 % TEMED
- 1 % APS

Je aufgearbeiteter Probe (3.6.1) wurde 45 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Referenz dienten je 8 µl „Prestained Protein Marker“ (2.3). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25-40 mA.

#### **3.6.3 Western Blot Analyse**

Bei der Western Blot Analyse werden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Trägermembran (2.2) übertragen und anschließend mittels Antikörperreaktionen nachgewiesen.

Zunächst wurden pro Gel je 2 „Whatman-paper“ in Anode I-, Anode II- bzw. Kathode-Puffer getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Reinstwasser aktiviert und in Anode II-Puffer

gelegt (2.4). Dann wurden die Einzelbestandteile im Blotter luftblasenfrei zusammengesetzt (2 Anode I Papiere, 2 Anode II Papiere, Nitrozellulosemembran, Gel, 2 Kathode Papiere) und für 1-1,5 h eine Stromstärke von 60 mA angelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Trägermembran wurde mittels Ponceau S, welches Proteine reversibel anfärbt, kontrolliert.

Für den immunologischen Nachweis mit Hilfe von Antikörpern wurden die unspezifischen Bindestellen auf der Membran zunächst mit 5 % Milchpulver in TBST für 1 h bei RT geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (2.6) bei 4°C über Nacht. Nach dem Waschen der Nitrozellulosemembran mit PBS (4 x 5 min) wurde die Membran für 1-2 h bei RT mit dem Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper (2.6) inkubiert.

Zur Detektion der Proteine wurden je 0,5 ml Luminol- und Verstärkerlösung eines Chemilumineszenz-Kits (2.2) gemischt und für 5 min auf die Membran gebracht. Daraufhin wurde das Luminol von der Meerrettichperoxidase umgesetzt, wobei Chemilumineszenz entstand. Diese konnte durch Auflegen eines Röntgenfilms (2.2) auf die Membran in einer lichtundurchlässigen Kassette sichtbar gemacht werden. Der Film wurde in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

#### **3.6.4 Densitometrische Auswertung**

Die densitometrische Auswertung erfolgte nach Einscannen der Elektropherogramme mit der Freewaresoftware ImageJ. Mit Hilfe dieses Programmes kann die Gesamthelligkeit aller Pixel in einem definierten Bereich, z.B. einer Western Blot Bande, bestimmt werden. Die durchschnittliche Helligkeit eines Bereiches entspricht der Gesamthelligkeit dividiert durch die Anzahl der vorhandenen Pixel.

Die Bandenintensität korreliert mit der HO-1 Expression.

### **3.7 Bildung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS)**

Oxidativer Stress führt in Zellen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS können in Zellen mit Hilfe von H<sub>2</sub>DCF-DA nachgewiesen werden. Es handelt sich um einen membrangängigen Farbstoff, welcher nach Abspaltung der Acetatgruppen im Cytosol durch intrazelluläre Esterasen membranimpermeabel wird. Durch ROS wird der Farbstoff zu DCF (Dichlorofluorescein) oxidiert, welches sich mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektieren lässt.

#### **3.7.1 Mikroskopischer Nachweis von ROS mit H<sub>2</sub>DCFDA**

Fibroblasten wurden auf sterilen Glasplättchen in Ø 3 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit THF, Lutein oder DHIR (je 10 µM) inkubiert (3.2) und mit 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> UV-A bestrahlt (3.3) bzw. thermalem Stress (3.9) ausgesetzt.

Eine 1 mM H<sub>2</sub>DCF-DA Stammlösung wurde in HBSS verdünnt, so dass 1 µM Inkubationslösung vorlag. Diese wurde immer frisch hergestellt.

Im Anschluss an die Bestrahlung bzw. an den thermalen Stress wurde je 1 ml der H<sub>2</sub>DCF-DA Inkubationslösung auf die Zellen pipettiert. Nach einer 1 stündigen Inkubationszeit bei 37°C im Dunkeln wurden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Dann wurden die Glasplättchen in Attafluor Zellkammern (2.1) eingespannt und mit je 0,5 ml HBSS überschichtet um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Anschließend erfolgte die optische Analyse mit dem Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskop. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlängen 520 nm.

#### **3.7.2 Nachweis von ROS mit dem Fluoreszenzmessgerät**

Fibroblasten wurden in 24 „well-Platten“ bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit THF, Lutein oder DHIR (je 10 µM) inkubiert (3.2) und mit 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> UV-A bestrahlt (3.3) bzw. thermalem Stress (3.9) ausgesetzt.

Eine 100 mM H<sub>2</sub>DCF-DA Stammlösung in DMSO wurde in HBSS verdünnt, so dass eine 100 µM Inkubationslösung vorlag.

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde pro „well“ je 1 ml der frisch hergestellten Inkubationslösung auf die Zellen gegeben. Direkt im Anschluss wurden die Platten bei 37°C in den Fluoreszenz „plate reader“ (2.1) plaziert und die DCF-Bildung wurde 1 h lang im 5 Minutenintervall gemessen. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm und die Emissionswellenlängen 520 nm.

Bei jedem Messvorgang wurde ein Mittelwert aus 30 Messwerten pro Probe gebildet.

#### **3.8 Zinkfreisetzung in Zellen**

ROS sind in der Lage mit zahlreichen Zellkomponenten zu reagieren und sie somit zu zerstören. Dazu gehören unter anderem auch viele Zink-bindende Proteine. Zink liegt dabei in den meisten Fällen an vier Cystein- bzw. zwei Cystein- und zwei Histidinresten in einem Zinkfinger-motiv gebunden vor. Wird diese Bindung gelöst, so kommt es zu einem Anstieg von freiem Zink in den Zellen. Dieser kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin, welcher nach Bindung an Zink stark fluoresziert, analysiert werden.

Fibroblasten wurden auf sterilen Glasplättchen in Ø 3 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit THF, Lutein oder DHIR (je 10 µM) für 24 h inkubiert (3.2) und mit 5, 10 oder 20 J/cm<sup>2</sup> UV-A bestrahlt (3.3) bzw. thermalem Stress (3.9) ausgesetzt.

Direkt im Anschluß an die Bestrahlung bzw. den thermalen Stress wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und für 20 min bei 37°C im Dunkeln mit 10 µM Zinquin in DPBS inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit DPBS wurden die Glasplättchen in

Attafluor Zellkammern (2.1) fixiert und mit 0,5 ml DBPS überschichtet. Die Bildung der fluoreszierenden Zinquin-Zn<sup>2+</sup> Komplexe wurde sofort visuell mit dem Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Anregungswellenlänge lag dabei bei 485 nm und die Emissionswellenlängen bei 520 nm.

## **3.9 Auslösung von Hitzeschock bei Zellen**

Der sogenannte Hitzeschock bei Zellen tritt ein, sobald die Umgebungstemperatur einen bestimmten Wert überschreitet. Eine Folge ist die Denaturierung von zellulären Proteinen, wie z.B. Zinkfingerproteine. Um die Zinkfreisetzung bzw. die Bildung von ROS in Zellen mit Hitzeschock zu untersuchen wurden Fibroblasten auf sterilen Glasplättchen in Ø 3 cm Kulturschalen bzw. in 24 „well-plates“ bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit THF, Lutein oder DHIR (je 10 µM) für 24 h inkubiert (3.2). Der Hitzeschock wurde durch ein 30 minütige Inkubation bei 43°C ausgelöst. Anschließend wurde nach den in den Kapiteln 3.7.1, 3.7.2 oder 3.8 beschriebenen Methoden weiter verfahren.

## **3.10 Nachweis von Thymindimeren mittels „Immunostaining“**

UV-B Strahlung führt zur Bildung von DNA-Schäden. Besonders häufig treten Thymindimere auf. Es handelt sich dabei um eine kovalente Bindung zwischen zwei benachbarten Thyminbasen. Thymindimere können sowohl die Replikation stören, als auch zu Mutationen führen.

Eine Nachweismöglichkeit für Thymindimere ist das „Immunostaining“.

### 3.10.1 Vorbereitung der Proben

Fibroblasten wurden auf sterilen Glasplättchen in Ø 3 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit THF, Lutein oder DHIR (je 10 µM) inkubiert (3.2) und mit 100-300 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B bestrahlt (3.3).

Nach einer 24 stündigen Postinkubation in FBS-freiem Komplettmedium wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dann mit je 1 ml eiskaltem Methanol für 10 min bei – 20°C fixiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h mit Blockierlösung (2.4) bei RT inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Thymindimer, anti-Aktin; 2.6) bei 4°C über Nacht. Der sekundäre Antikörper (2.6) wurde nach 3 PBS-Waschschritten für 45 min bei 37°C im Dunkeln auf die Zellen gegeben. Ein letztes mehrmaliges Waschen mit PBS entfernte überschüssigen Antikörper.

### 3.10.2 Mikroskopische Auswertung

Für die floreszenzmikroskopische Auswertung wurden die Deckläser mit ProLong®Gold antifade Reagenz auf Glasobjektträger geklebt. Das Reagenz enthält neben dem Fixiermittel und einem Antibleichmittel auch den Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI) welcher an die DNA bindet und somit den Zellkern färbt. Die Proben wurden für mind. 12 h getrocknet und bei 4°C gelagert. Analysiert wurden die Proben mit dem Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskop. Die Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen waren dabei wie folgt:

<b>DAPI bzw. sek. Antikörper</b>	<b>λ<sub>Absorption</sub>nm</b>	<b>λ<sub>Emmission</sub>nm</b>
DAPI	358	461
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 488	495	519

### **3.11 Statistik**

Zur statistischen Auswertung erfolgte die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Variationskoeffizienten (Excel). Dabei wurden die Mittelwerte mit der Abkürzung MW, die Standardabweichungen mit der Abkürzung  $\pm$ SD und die Variationskoeffizienten mit der Abkürzung VK angegeben.

Die Bestimmung der Signifikanzniveaus  $p$  erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test (Excel), wobei Signifikanzniveaus von  $p \leq 0,05$  als signifikant angesehen wurden.

### 4. Ergebnisse

Carotinoide sind natürliche Farbstoffe, die sowohl im Tierreich, vor allem aber im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Auch für den humanen Organismus sind sie als Provitamin A Verbindungen und Antioxidantien von Bedeutung. Der menschliche Körper ist nicht in der Lage Carotinoide selbst zu synthetisieren, sie können aber über die Nahrung (z.B. Möhren, Tomaten, Paprika, Lachs) oder gegebenenfalls über Nahrungsergänzungsmittel, welche Carotinoide enthalten, zugeführt werden.

Zu den bekanntesten Carotinoiden, wie z.B.  $\beta$ -Carotin, existieren bereits diverse Studien (Mathews-Roth et al., 1972; Gollnick et al., 1996; Lee et al., 2000; Stahl et al., 2000), welche ihre Aktivität als Antioxidantien und Photoprotektoren auch in der menschlichen Haut belegen. Über die photoprotektiven Eigenschaften der meisten anderen Carotinoide ist jedoch nur wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das natürlich vorkommende Carotinoid DHIR, welches eine außergewöhnliche chemische Struktur aufweist (Kapitel 1.6.3 der Einleitung) auf seine Lichtschutzwirkung und antioxidativen Eigenschaften in einem Zellkulturmodell untersucht. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um humane Hautfibroblasten. Als strukturähnliche Vergleichssubstanz diente Lutein (Kapitel 1.6.1 der Einleitung).

#### 4.1 Untersuchungen zur Zelltoxizität

Eine Grundvoraussetzung für erfolgreiche in-vitro Studien zur Charakterisierung der photoprotektiven Eigenschaften von Carotinoiden ist, dass die entsprechenden Carotinoide sowohl bei alleiniger Anwendung auf Zellen, als auch in Kombination mit UV-Bestrahlung keine oder nur geringe toxischen Effekte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle aufweisen. Mit Hilfe des SRB „assays“ (3.4) wurden die verwendeten Substanzen auf toxische Effekte untersucht. Dabei korrelierte die Toxizität der Substanzen mit der Viabilität der Zellen.

### 4.1.1 Toxische Effekte von UV-Licht auf humane Hautfibroblasten

Nach UV-Bestrahlung weisen Fibroblasten eine verminderte Viabilität auf. Der toxische Effekt ist dabei abhängig von der Bestrahlungsdosis. Für den SRB-Versuch (3.4) wurden die Zellen mit 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA sowie mit 0,1 und 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt (3.3). Unbestrahlte Zellen dienten als Referenz. Jeder SRB-Versuch wurde dreimal (Versuchsreihe 1 – 3) mit je vier Ansätzen pro Bestrahlungsdosis durchgeführt. Dabei wurde die Absorption des Farbstoffes Sulforhodamin B, welcher an die basischen Aminosäuren von Proteinen bindet, photometrisch bei 492 nm gemessen. Abnehmende Absorptionswerte waren ein Indikator für Zelltoxizität.

In Tabelle 4.1 sind die im Verlauf der Versuche mit dem Photometer gemessenen Absorptionswerte aller drei Versuchsreihen dargestellt. Aus den 4 Absorptionswerten pro Bestrahlungsdosis wurden für jede Versuchsreihe die Mittelwerte und deren Standardabweichungen (hellgrau unterlegt) ermittelt. Zur Umrechnung der Mittelwerte in Prozent wurde die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle 100 % gesetzt. Die Prozentangaben aller drei Versuchsreihen sind mit einem mittleren Grauton unterlegt. In dunkelgrau dargestellt sind die jeweiligen Variationskoeffizienten (VK). Der Variationskoeffizient ist definiert als die relative Standardabweichung und wird in % angegeben. Dabei gilt, je kleiner der Prozentwert, desto geringer ist die Streuung der Daten.

Innerhalb einer Versuchsreihe liegen die Absorptionswerte einer Bestrahlungsdosis relativ nahe beieinander. Dies ist auch aus den jeweiligen geringen Standardabweichungen bzw. den „intra-assay“-Variationskoeffizienten ersichtlich (Tab.4.1).

Ein Vergleich der Versuchsreihen untereinander zeigt jedoch, dass die jeweiligen Mittelwerte auch bei gleicher Bestrahlungsdosis stark variieren. So ist in Tabelle 4.2, in welcher alle Mittelwerte zur besseren Übersicht zusammengefasst wurden, deutlich zu erkennen, dass die entsprechenden „inter-assay“-Variationskoeffizienten (in dunkelgrau unterlegt) erheblich höher sind als die Tab. 4.1 berechneten „intra-assay“-Variationskoeffizienten. Beispielsweise liegen die Werte der „intra-assay“-Variationskoeffizienten bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm<sup>2</sup> UVA in den Versuchsreihen 1, 2 und 3 (Tab. 4.1) bei 1, 4 und 7. Im Gegensatz dazu steigt der Wert des ermittelten „inter-assay“-Variationskoeffizienten nach der Zusammenfassung der Mittelwerte aller drei Versuchsreihen bei einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm<sup>2</sup> UVA auf 21 (Tab.4.2).

Trotz der beträchtlichen Abweichungen der Mittelwerte stimmen die relativen Verhältnisse zur entsprechenden unbestrahlten Kontrolle in allen Versuchsreihen überein. In Tab. 4.3 sind die Prozentangaben zusammengefasst und die zugehörigen „inter-assay“-Variationskoeffizienten ermittelt worden. Nach einer Bestrahlung mit  $5 \text{ J/cm}^2$  UVA liegt der „inter-assay“-Variationskoeffizient bei 2. Dieser Wert entspricht in etwa den Werten, welche bei der gleichen Bestrahlungsdosis für die einzelnen Versuchsreihen (1-3) berechnet wurde.

Große Schwankungen bei den Absorptionswerten unabhängiger Versuchsreihen sind bei Versuchen mit lebenden Zellen durchaus üblich. Jede Versuchsreihe wurde unter den gleichen versuchsspezifischen Bedingungen, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, durchgeführt. Da die Zellen auch während eines Versuches weiter wachsen bzw. absterben, kommt es zu den in der Zellkultur üblichen Schwankungen der Gesamtzellzahl. Diese wirken sich nur auf die Absolutwerte, jedoch nicht auf die relativen Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen bzw. eines Versuches aus.

## 4. Ergebnisse

		unbestrahlt (- UVA)	J/cm <sup>2</sup> UV-A			J/cm <sup>2</sup> UV-B	
			5	10	20	0,1	0,3
Versuchsreihe 1	Absorptionswerte	0,345	0,361	0,337	0,261	0,272	0,214
		0,386	0,367	0,353	0,267	0,313	0,267
		0,395	0,355	0,346	0,215	0,320	0,199
		0,369	0,361	0,349	0,271	0,297	0,243
	MW	0,374 ± 0,02	0,349 ± 0,00	0,346 ± 0,01	0,254 ± 0,03	0,301 ± 0,02	0,231 ± 0,03
%	100	98	94	69	81	62	
	VK (%)	6	1	2	10	7	13
Versuchsreihe 2	Absorptionswerte	0,256	0,277	0,272	0,199	0,263	0,208
		0,275	0,291	0,230	0,184	0,241	0,236
		0,338	0,287	0,231	0,191	0,284	0,187
		0,312	0,267	0,270	0,217	0,286	0,210
	MW	0,295 ± 0,04	0,281 ± 0,01	0,251 ± 0,02	0,198 ± 0,01	0,269 ± 0,02	0,210 ± 0,02
%	100	94	84	66	90	70	
	VK (%)	12	4	9	7	8	10
Versuchsreihe 3	Absorptionswerte	0,483	0,398	0,411	0,312	0,427	0,347
		0,421	0,462	0,384	0,313	0,375	0,334
		0,488	0,446	0,394	0,341	0,304	0,348
		0,392	0,410	0,393	0,282	0,373	0,326
	MW	0,446 ± 0,05	0,429 ± 0,03	0,396 ± 0,01	0,312 ± 0,02	0,370 ± 0,05	0,339 ± 0,01
%	100	96	89	70	83	76	
	VK (%)	11	7	3	8	14	3

**Tab. 4.1: Zelltoxizität (humane Fibroblasten) unter UV-Bestrahlung;** angegeben sind die mit dem Photometer gemessenen Absorptionswerte; MW = Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

#### 4. Ergebnisse

	ohne UV	J/cm <sup>2</sup> UV-A			J/cm <sup>2</sup> UV-B	
		5	10	20	0,1	0,3
Versuchsreihe 1 (MW)	0,374	0,349	0,346	0,254	0,301	0,231
Versuchsreihe 2 (MW)	0,295	0,281	0,251	0,198	0,269	0,210
Versuchsreihe 3 (MW)	0,446	0,429	0,396	0,312	0,370	0,339
MW	0,372 ± 0,08	0,357 ± 0,07	0,331 ± 0,07	0,254 ± 0,06	0,313 ± 0,05	0,260 ± 0,07
VK	20	21	22	22	17	27

**Tab. 4.2: Zelltoxizität (humane Fibroblasten) unter UV-Bestrahlung;** Zusammenfassung der Mittelwerte aus den Versuchsreihen 1-3; MW = Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

	ohne UV	J/cm <sup>2</sup> UV-A			J/cm <sup>2</sup> UV-B	
		5	10	20	0,1	0,3
Versuchsreihe 1 (%)	100	98	94	69	81	62
Versuchsreihe 2 (%)	100	94	84	66	90	70
Versuchsreihe 3 (%)	100	96	89	70	83	76
MW	100 ± 0	96 ± 2	89 ± 5	68 ± 2	85 ± 4	69 ± 7
VK	0	2	6	3	5	10

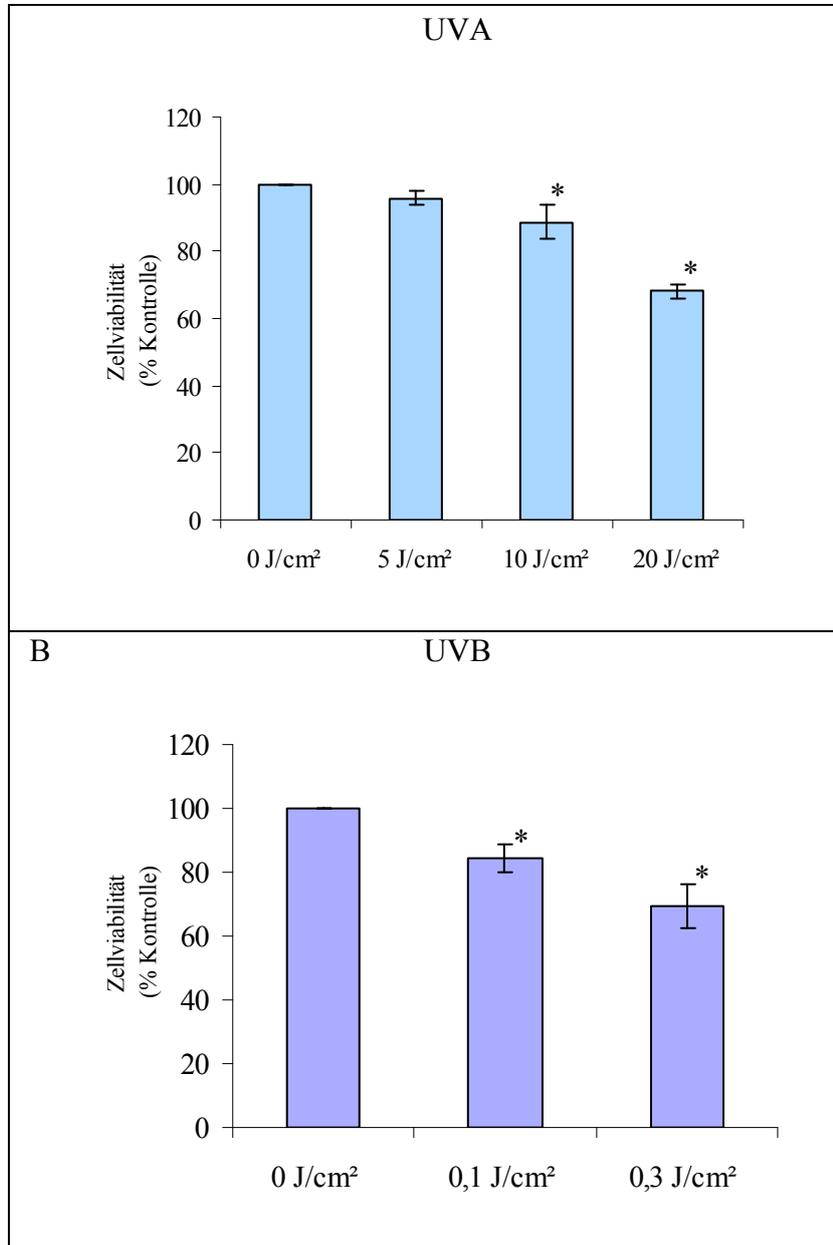
**Tab. 4.3: Zelltoxizität (humane Fibroblasten) unter UV-Bestrahlung;** Zusammenfassung der Prozentwerte aus den Versuchsreihen 1-3; MW = Mittelwert; VK = Variationskoeffizient

Für die zusammenfassende Darstellung aller drei Versuchsreihen in einem Diagramm wurden die Prozentangaben verwendet (Abb. 4.1). Die jeweilige Kontrolle wurde dabei 100 % gesetzt und alle weiteren Ergebnisse wurden darauf bezogen.

Sowohl nach UVA (Abb. 4.1 A), als auch nach UVB (Abb. 4.1 B) Bestrahlung lässt sich mit steigender Bestrahlungsdosis eine verringerte Zellviabilität feststellen. So liegt die Zellviabilität nach einer Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA bei ca. 90 % und nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> bei etwa 68 % (Abb. 4.1 A). Die Abnahme der Viabilität ist bei den Dosen von 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle statistisch signifikant (Abb. 4.1 A, \*p ≤ 0,05). Auch im Fall von 0,1 und 0,3 J/cm<sup>2</sup> UVB ist die Verringerung der Zellviabilität statistisch signifikant (Abb. 4.1 B, \*p ≤ 0,05) im Vergleich zur

## 4. Ergebnisse

nicht bestrahlten Kontrolle. So sinkt die Überlebensrate der Zellen nach einer Bestrahlung mit  $0,1 \text{ J/cm}^2$  auf ca. 85 % und nach einer Bestrahlung mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  auf 70 %.



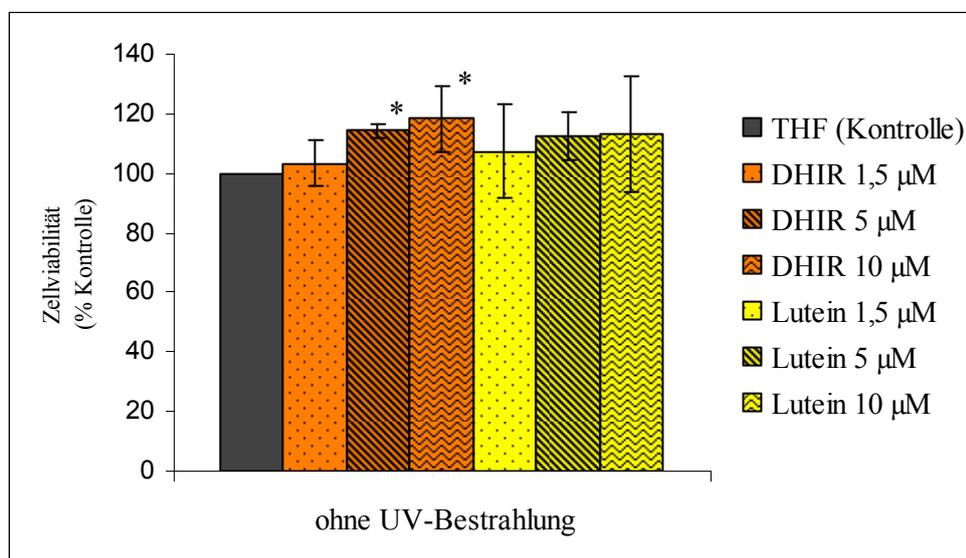
**Abb. 4.1: Zelltoxizität (humane Fibroblasten) unter UV-Bestrahlung;  $p^* \leq 0,05$**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle weiteren Versuche zur Toxizität, soweit nicht anders erwähnt, nach oben genanntem Prinzip durchgeführt und ausgewertet.

### 4.1.2 Zytotoxizität von DHIR und Lutein

Um eine mögliche toxische Wirkung von DHIR und Lutein auf humane Fibroblasten zu untersuchen wurden die Zellen mit beiden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen für einen Zeitraum von 24 h inkubiert (3.2). Anschließend wurde die Zellviabilität mit Hilfe des SRB Assays (3.4) untersucht. Insgesamt wurde der Versuch dreimal unter unabhängigen Bedingungen wiederholt.

Wie in Abb. 4.2 dargestellt war keine der beiden Substanzen (DHIR - orange, Lutein - gelb dargestellt) in den Konzentrationen 1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  toxisch. Bei Konzentrationen von 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  DHIR wurde eine leichte, aber statistisch signifikant erhöhte Zellzahl gemessen. Sie stieg diese nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  DHIR um etwa 15 % im Verhältnis zur Lösemittel-Kontrolle. Nach einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR konnte eine Steigerung von durchschnittlich 20 % gemessen werden. Dies lässt vermuten, dass DHIR in diesen Konzentrationen eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum hat.



**Abb. 4.2: Zellviabilität (humane Fibroblasten) nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von DHIR und Lutein; Kontrolle = THF;  $p^* \leq 0,05$**

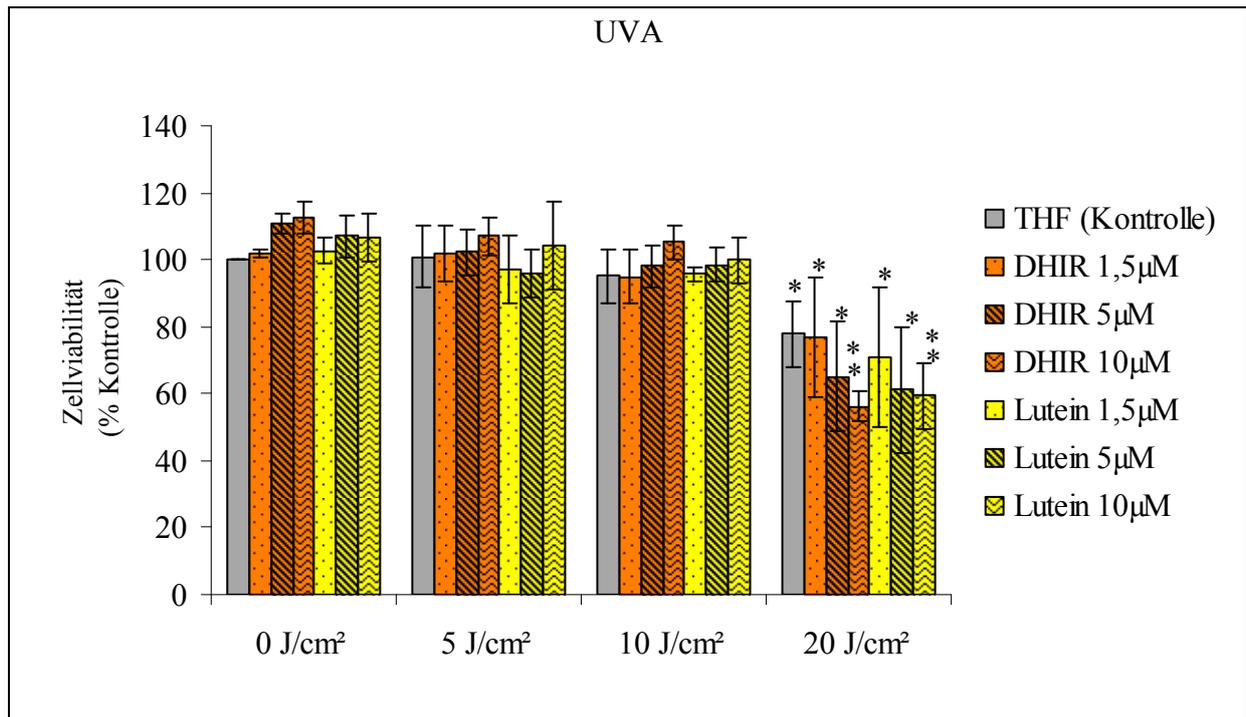
### **4.1.3 Effekte von DHIR und Lutein auf die UV-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten**

Da in weiteren in-vitro Untersuchungen die photoprotektiven Eigenschaften von DHIR und Lutein untersucht werden sollten, wurde die Zellviabilität humaner Hautfibroblasten, welche mit Carotinoiden inkubiert worden waren, ebenfalls unter Einwirkung von UV-Licht analysiert. Die Fibroblasten wurden wie in den Kapiteln 3.2 und 3.3 beschrieben mit DHIR und Lutein inkubiert und anschließend mit UV-Licht in unterschiedlichen Dosen bestrahlt. 24 h nach Bestrahlung erfolgte die Untersuchung der Zellviabilität mit Hilfe des SRB Assays (3.4).

In Abbildung 4.3 ist die Zellviabilität der mit Carotinoiden inkubierten Zellen nach UVA Bestrahlung dargestellt. Alle Werte beziehen sich auf die nicht bestrahlte Lösemittel-Kontrolle (100 %). Als Bestrahlungsdosen wurden 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA eingesetzt. Wie bereits in Abb. 4.1 an unbehandelten Fibroblasten gezeigt, ist auch bei den mit Carotinoiden inkubierten Zellen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA im Vergleich zur nicht bestrahlten Lösemittel-Kontrolle zu verzeichnen. So sinkt die Viabilität der Fibroblasten in allen Ansätzen um mindestens 20 %.

Um jedoch eine Aussage über die Toxizität von DHIR bzw. Lutein in Kombination mit UV-Licht zu machen, ist ein Vergleich mit der Lösemittelkontrolle der gleichen Bestrahlungsdosis notwendig. Da die Viabilität der Zellen nach UV-Bestrahlung generell abnimmt (Kapitel 4.1.1), ist eine Substanz nur dann als toxisch zu bezeichnen, wenn zusätzlich zur UV-bedingten Verringerung noch eine weitere, signifikante Abnahme der Zellviabilität bei Anwesenheit der Substanz zu verzeichnen ist. Unter diesem Aspekt war DHIR bei keiner der verwendeten Konzentrationen (1,5 µM, 5 µM und 10 µM) nach einer Bestrahlung der Zellen mit 5 J/cm<sup>2</sup> bzw. 10 J/cm<sup>2</sup> UVA toxisch. Lutein war ebenfalls bei keiner der verwendeten Konzentrationen nach einer Bestrahlung mit 5 J/cm<sup>2</sup> bzw. 10 J/cm<sup>2</sup> UVA toxisch. Auch nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA zeigten DHIR und Lutein in den Konzentrationen 1,5 µM und 5 µM keine toxischen Effekte auf die Zellen. Im Gegensatz dazu ließ sich bei Fibroblasten, welche mit 10 µM DHIR oder Lutein versetzt worden waren, nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA eine verringerte Zellviabilität im Vergleich zur THF-Kontrolle feststellen. Mit einer Senkung von etwa 20-25 % im Verhältnis zur Lösemittel-Kontrolle war diese Abnahme für beide Substanzen signifikant (\*\*).

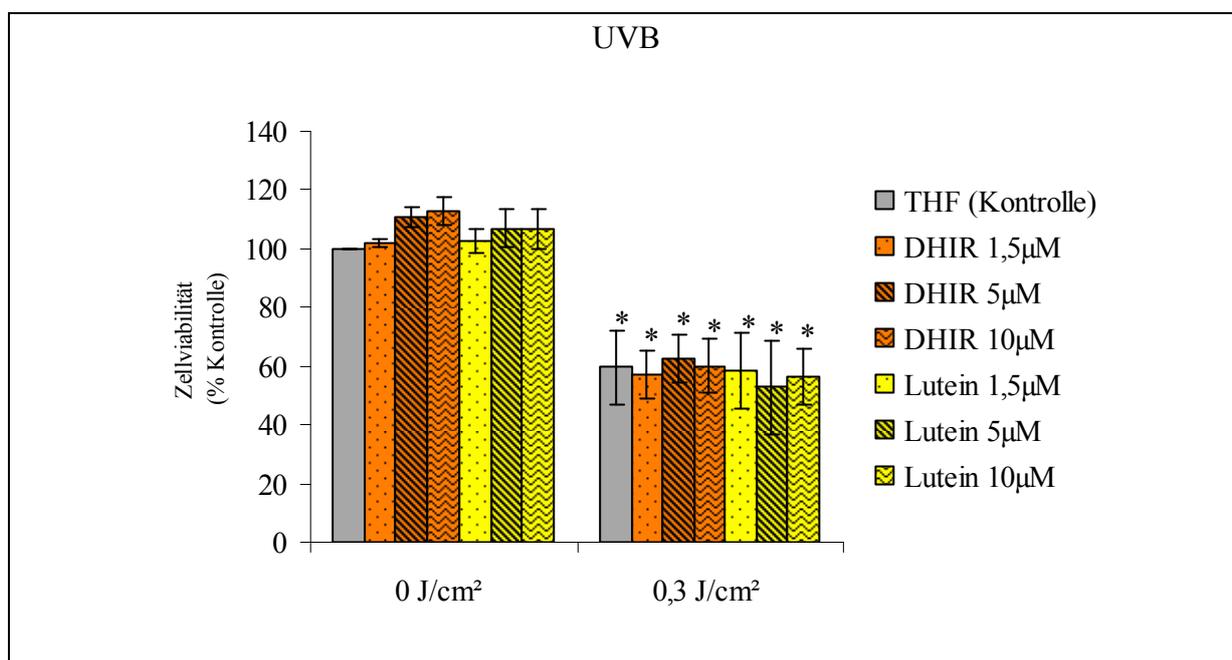
## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.3: Zellviabilität (humane Fibroblasten) nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von DHIR und Lutein in Kombination mit unterschiedlichen UVA-Dosen; Referenz: unbestrahlte Lösemittelkontrolle, THF = 100 % ;  $p^* \leq 0,05$**

## 4. Ergebnisse

Nach Bestrahlung der mit unterschiedlichen Konzentrationen von Carotinoiden inkubierten Zellen mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB erwies sich, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, dass keine Konzentration von DHIR oder Lutein toxisch im Vergleich zur ebenfalls mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB bestrahlten THF-Kontrolle war. Im Verhältnis zur nicht bestrahlten THF-Kontrolle zeigten jedoch alle Ansätze eine signifikant verringerte Viabilität. So sank die Zellviabilität in allen Ansätzen um etwa 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Dies stimmt mit den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Daten zur Viabilität von Fibroblasten unter UVB-Bestrahlung überein.



**Abb. 4.4: Zellviabilität (humane Fibroblasten) nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von DHIR und Lutein nach Bestrahlung mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB; Referenz: unbestrahlte Lösemittelkontrolle, THF = 100 % ;  $p^* \leq 0,05$**

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zur Zelltoxizität von DHIR und Lutein nach UVA- und UVB-Bestrahlung ergab sich folgende Schlussfolgerung. DHIR und Lutein zeigten in den Konzentrationen  $1,5 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  keine toxische Wirkung auf humane Hautfibroblasten. Auch in Kombination mit  $5$  und  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA sowie mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB waren diese Konzentrationen von DHIR und Lutein nicht toxisch für die Zellen. Nach Bestrahlung mit  $20 \text{ J/cm}^2$  UVA konnte in den Konzentrationen  $1,5 \mu\text{M}$  und  $5 \mu\text{M}$  ebenfalls keine toxische Wirkung nachgewiesen werden. Lediglich bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  in Kombination mit  $20 \text{ J/cm}^2$  UVA waren beide Substanzen über den UV-Effekt hinaus toxisch.

DHIR und Lutein waren somit unter den gewählten Bedingungen für weitere in vitro Experimente zur Charakterisierung ihrer biologischen Eigenschaften im vorliegenden Zellkulturmodell geeignet.

### **4.2. Effekte von DHIR und Lutein auf die Bildung von ROS in Fibroblasten**

UV-Bestrahlung führt in Zellen zum Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Aufgrund ihrer hohen chemischen Reaktivität verursachen diese reaktiven Intermediate Schäden ( Kapitel 1.4) an biologisch relevanten Makromolekülen wie DNA, Lipiden oder Proteinen. Dies wird u.a. mit der Entstehung von dermalen Erkrankungen (z.B. Hautkrebs) oder dem Prozess der frühzeitigen Hautalterung in Zusammenhang gebracht.

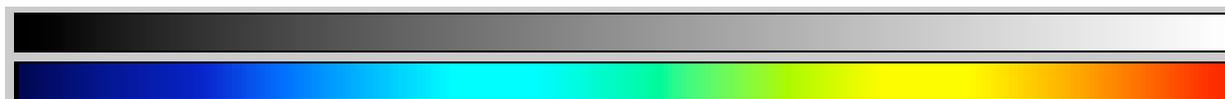
Carotinoide sind effektive Antioxidantien. Sie sind in der Lage UV-induzierte ROS abzufangen (Kapitel 1.6) und die Zellen somit vor oxidativen Schäden zu schützen. Aufgrund der besonderen chemischen Struktur von DHIR (Kapitel 1.6.3) lag die Vermutung nahe, dass DHIR im Vergleich zu anderen Carotinoiden (z.B. dem Vergleichscarotinoide Lutein) bessere antioxidative Eigenschaften hat.

Diese Annahme konnte durch ROS-Messungen in DHIR- bzw. Lutein- inkubierten Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes H<sub>2</sub>DCF-DA gestützt werden. Bei H<sub>2</sub>DCF-DA handelt es sich um einen zellpermeablen Farbstoff, welcher per se nicht fluoresziert. Gelangt er in Zellen wird im Cytosol die Acetatgruppe durch intrazelluläre Esterasen abgespalten. Das entstandene Dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF) wird durch ROS zum Fluorochrom Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert, welches grün fluoresziert. Dabei korreliert die Fluoreszenz von DCF mit der Menge an gebildetem ROS.

Die Generation von DCF (ROS-Bildung) in Zellen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes bildlich dargestellt (3.7.1). Bei der Inkubation der Fibroblasten wurde eine Konzentration von je 10 µM pro Substanz eingesetzt (3.2). Mit THF inkubierte Zellen dienten als Referenz. Die Bestrahlungsdosen betragen 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA (3.3).

Die Untersuchung der ROS-Bildung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde 1 Stunde nach H<sub>2</sub>DCF-DA Zugabe durchgeführt (3.7.1). Es wurden pro Bestrahlungsdosis und Substanz je vier Bilder aufgenommen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte im „schwarz-weiss“

Modus. Dabei entsprach der größte Helligkeitswert der stärksten Fluoreszenz. Die Darstellung der Bilder erfolgte in Fehlfarbandarstellung, wobei der geringsten Helligkeit und somit auch der geringsten Fluoreszenz die Farbe dunkelblau und der höchsten Helligkeit bzw. Fluoreszenz die Farbe rot zugeordnet wurde. Die komplette Farbskala ist in Abb. 4.5 gezeigt.



geringe Fluoreszenz

= wenig ROS-Bildung

starke Fluoreszenz

= hohe ROS-Bildung

**Abb. 4.5.:** Farbskala für die Darstellung von Fluoreszenzbildern, schwarz-weiß und Fehlfarben

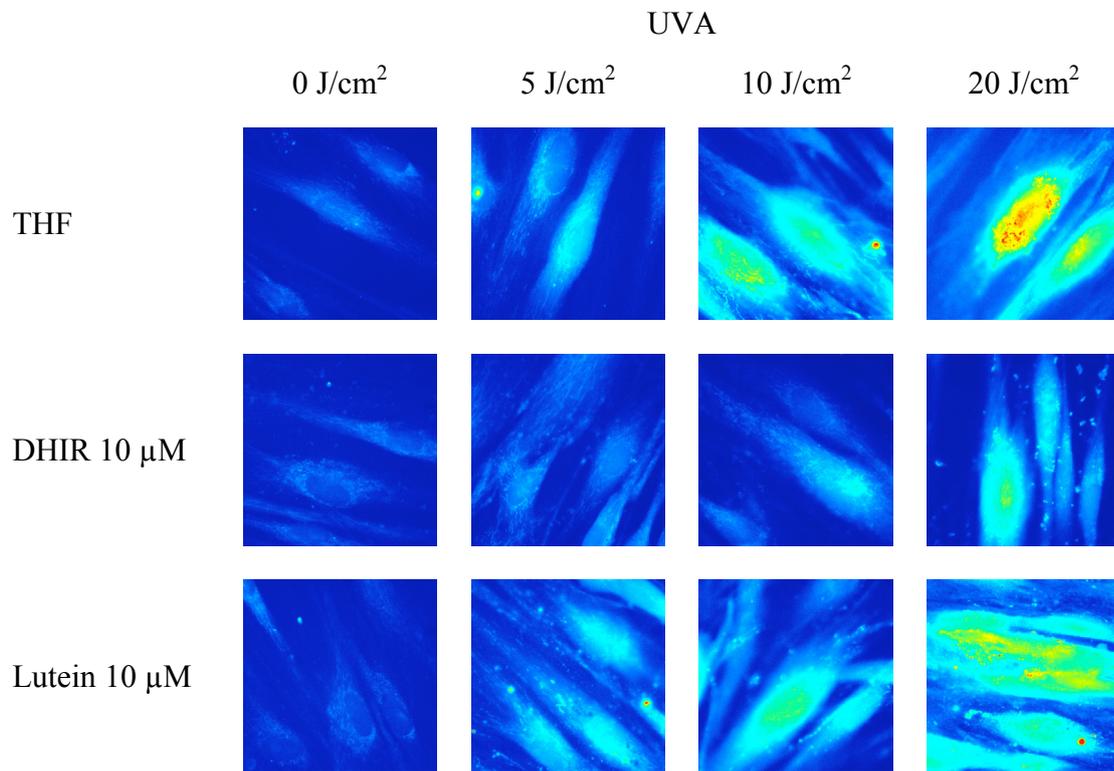
In Abb. 4.6 sind ausgewählte Bilder der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Diese sind von links nach rechts den ansteigenden Bestrahlungsdosen und von oben nach unten der Lösemittel-Kontrolle, DHIR und Lutein zugeordnet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der ROS-Anstieg mit der Bestrahlungsdosis korreliert. So ist ohne UV-Bestrahlung die vorherrschende Farbe des Fluoreszenzbildes der Lösemittelkontrolle (obere Reihe, ganz links) dunkelblau, was einer niedrigen ROS-Konzentration entspricht. Zellulären Strukturen sind nur schwer zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA (obere Reihe, ganz rechts) eine starke Fluoreszenz erkennbar (helltürkise bis gelb-rote Färbung), wobei sich die einzelnen Zellen deutlich vom dunkelblauen Hintergrund hervorheben. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die ROS-Bildung intrazellulär hauptsächlich im Zellkern und um den Zellkern herum lokalisiert ist.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen, welche mit Lutein inkubiert wurden (untere Reihe, Abb. 4.6) unterscheiden sich kaum von der Kontrolle. Somit zeigte Lutein keinen photoprotektiven Effekt gegen UV-induzierte ROS-Bildung. Im Gegensatz dazu weisen die mit DHIR versetzten Fibroblasten bei 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA eine signifikant geringere Fluoreszenz auf. So zeigen die Fluoreszenzbilder der mit DHIR inkubierten Zellen nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA zwar eindeutig vom Hintergrund abgrenzbare zelluläre Strukturen, diese haben jedoch nur eine helltürkise

## 4. Ergebnisse

Färbung. Diese Fluoreszenz entspricht in etwa der Fluoreszenz der mit THF inkubierten Kontrollzellen nach einer Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA. Somit weist DHIR einen protektiven Effekt gegen die UV-induzierte Bildung von ROS auf.

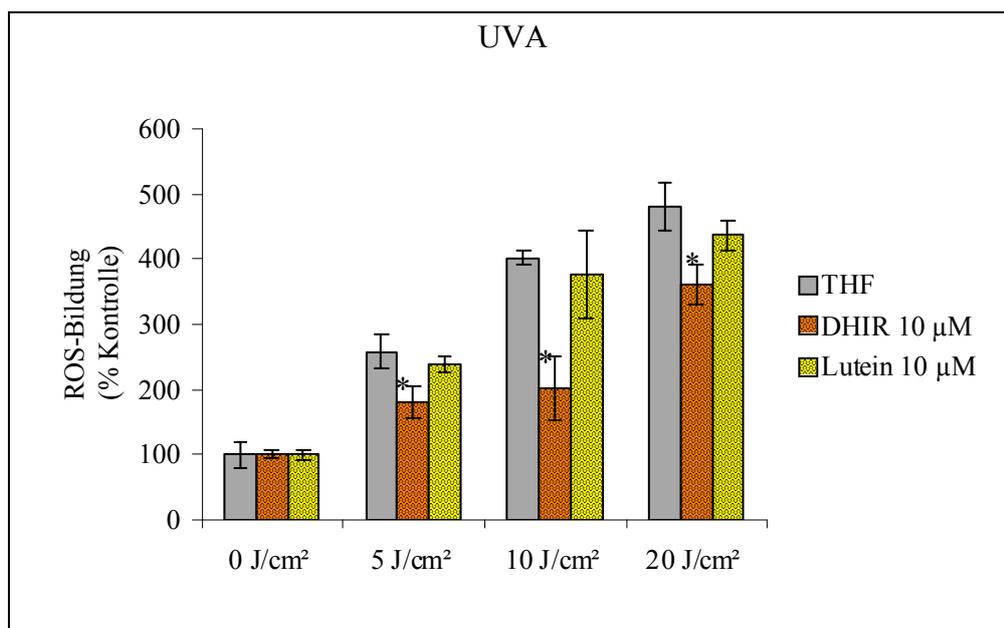


**Abb. 4.6: ROS-Bildung in Fibroblasten nach UVA Bestrahlung in Zellen inkubiert mit DHIR oder Lutein;** Mikroskop: Axiovert 100TV, 63er Objektiv, Belichtung: 778 ms., Verstärkung: 200, Offset: 0

Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Computerprogramm ImageJ. Mit Hilfe dieses Programmes kann die Gesamthelligkeit aller Pixel in einem definierten Bereich, z.B. einer abgebildeten Zelle oder eines Hintergrundabschnittes, bestimmt werden. Die durchschnittliche Helligkeit eines Bereiches entspricht der Gesamthelligkeit dividiert durch die Anzahl der vorhandenen Pixel. Mit dieser Methode wurden je Bestrahlungsdosis und Substanz neun Zellen bzw. neun dazugehörige Hintergrundabschnitte ausgewertet, wobei die daraus resultierenden Daten anschließend zu Mittelwerten zusammengefasst wurden. Der jeweilige Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz wurde von dem entsprechenden Mittelwert der Zellfluoreszenz abgezogen. Zum besseren Vergleich der Wirkung von DHIR und Lutein wurden die so berechneten Werte in Prozent umgerechnet, wobei die unbestrahlten Ansätze ( $0 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA}$ ) einer Substanz als Bezugspunkt dienten und auf 100 % gesetzt wurden.

Die Ergebnisse dieser semiquantitativen Auswertung sind in Abb. 4.7 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den mit THF inkubierten Fibroblasten (grau) die Bildung von ROS mit der zunehmenden Bestrahlungsdosis korreliert. So steigt der Wert für die ROS-Bildung nach einer Bestrahlung von  $20 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA}$  um das 5 fache im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Ein vergleichbarer Effekt kann bei den mit Lutein inkubierten Hautzellen (gelb) festgestellt werden. Lutein wirkt somit nicht photoprotektiv. Im Gegensatz dazu wirkt DHIR (orange) protektiv gegen UV-induzierte ROS-Bildung. Bei allen drei Bestrahlungsdosen ist die ROS-Bildung in DHIR-inkubierten Zellen statistisch signifikant geringer als die ROS-Bildung in der Lösemittel-Kontrolle. Dieser Effekt ist bei  $10 \text{ J/cm}^2$  besonders ausgeprägt. Während sich die Bildung von ROS in Fibroblasten, welche mit DHIR inkubiert worden sind, lediglich verdoppelt, ist ROS-Bildung in der Lösemittelkontrolle nach Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA}$  bereits um das 4 fache angestiegen.

Diese Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung bestätigen den subjektiven Eindruck der in Abb. 4.6 dargestellten Fluoreszenzbilder.



**Abb. 4.7: semiquantitative Auswertung der ROS-Bildung (DCF-Fluoreszenz) nach UVA-Bestrahlung in humanen Fibroblasten inkubiert mit DHIR und Lutein;** die unbestrahlten Ansätze jeder Substanz dienen als Kontrolle; \* $p \leq 0,05$ .

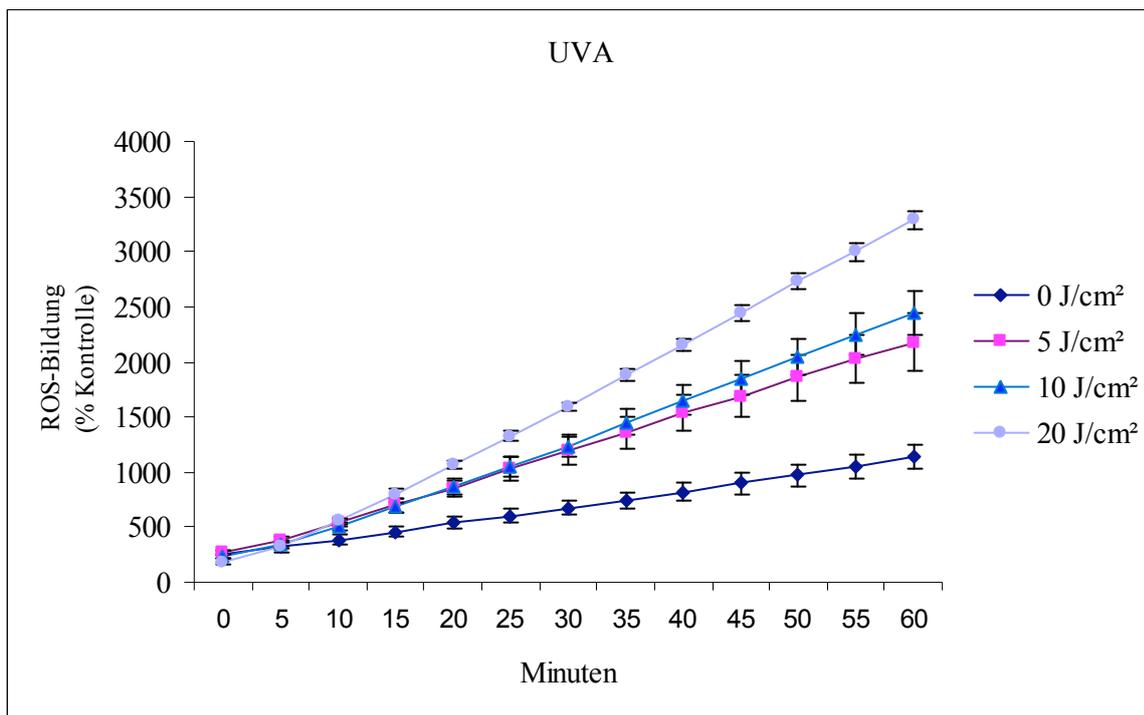
Neben der Darstellung der ROS-Bildung mittels Fluoreszenzmikroskopie und der anschließenden semiquantitativen Auswertung der Fluoreszenzbilder, erfolgte auch eine quantitative Bestimmung der ROS-Bildung mit Hilfe eines Fluoreszenz „plate readers“ (FLUOstar Optima). Die mit 10 µM DHIR bzw. Lutein inkubierten Zellen (3.2) wurden mit 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt (3.3). Direkt im Anschluß an die Bestrahlung wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>DCF-DA versetzt und die ROS-Bildung wurde eine Stunde lang im 5-Minuten-Intervall mit Hilfe des FLUOStar gemessen. In jeder Versuchsreihe wurden pro Bestrahlungsdosis und Substanz vier Ansätze vermessen, wobei die gemessenen Werte zu Mittelwerten zusammengefasst wurden. Von diesen Mittelwerten wurde jeweils die Eigenfluoreszenz der Zellen (Mittelwert) und des Farbstoffes abgezogen. Zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz wurde die Fluoreszenz von Fibroblasten ohne H<sub>2</sub>DCF-DA Zugabe bzw. nur von nur H<sub>2</sub>DCF-DA-Lösung gemessen.

Zunächst wurde nach oben genanntem Prinzip die ROS-Bildung in Fibroblasten ohne DHIR oder Lutein bei den Bestrahlungsdosen 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA über einen Zeitraum von 60 Minuten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.8 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass auch ohne UV-Bestrahlung nach 60 min ein Anstieg von ROS um das 4 fache des Ausgangswertes zu verzeichnen ist. Nach UVA-Bestrahlung nimmt

## 4. Ergebnisse

die Bildung von ROS jedoch deutlich zu, wobei die ROS-Bildung mit der zunehmenden Bestrahlungsdosis korreliert. So steigt die ROS-Bildung nach 60 min bei einer Bestrahlung von 5 J/cm<sup>2</sup> UVA um den Faktor 10, bei einer Bestrahlung von 10 J/cm<sup>2</sup> UVA um den Faktor 12 und bei einer Bestrahlung von 20 J/cm<sup>2</sup> um den Faktor 17 verglichen mit dem Ausgangswert. Die Bildung von ROS in allen Dosisbereichen von der Zeit abhängig und nimmt linear zu.



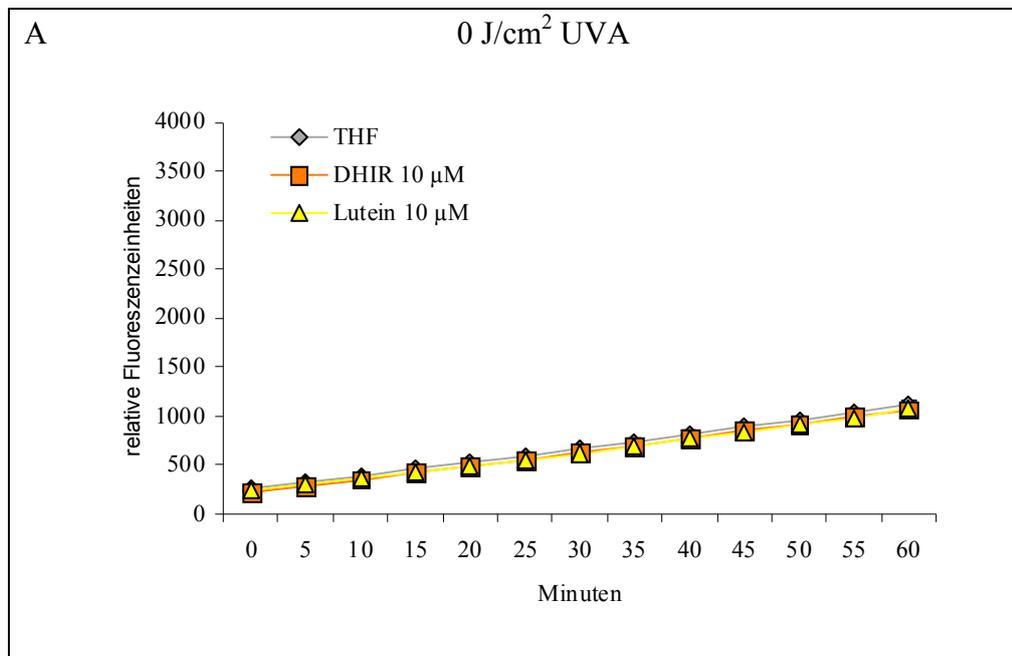
**Abb. 4.8: Zunahme von ROS in humanen dermalen Fibroblasten nach UVA Bestrahlung**

## 4. Ergebnisse

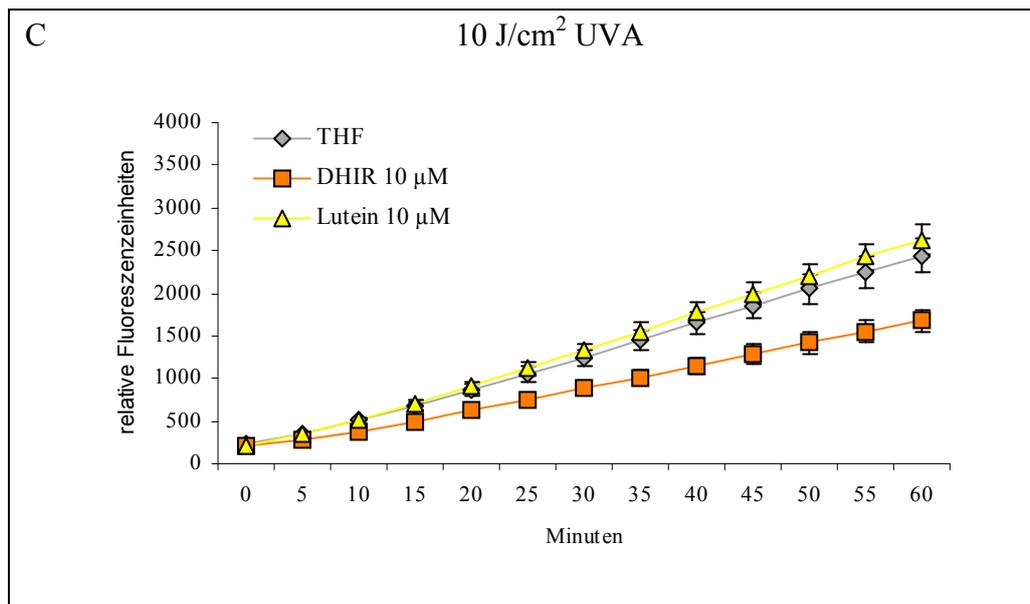
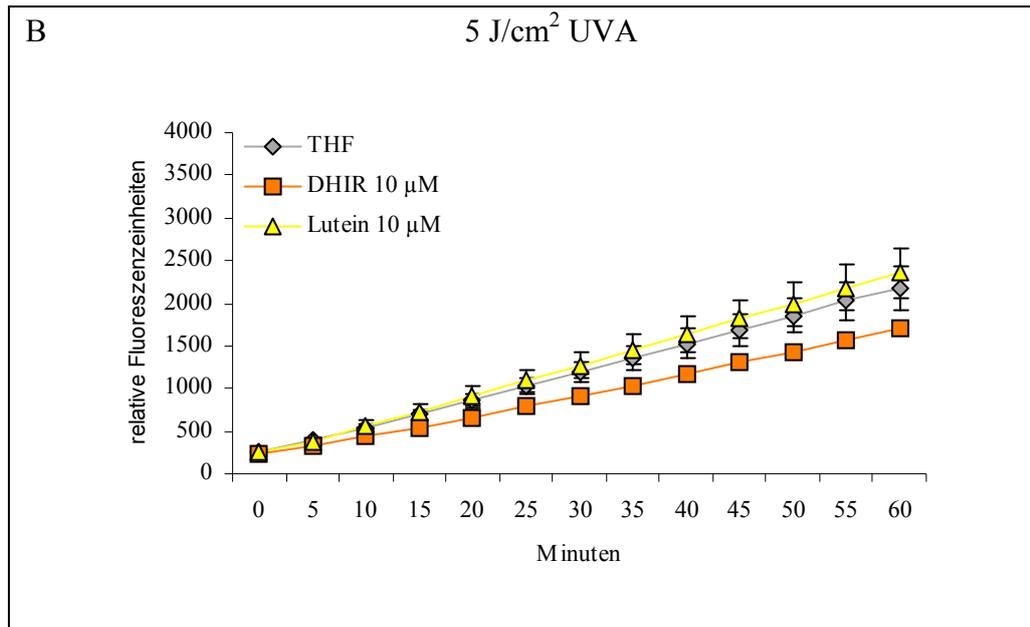
Mit Hilfe der oben genannten Methode wurde die ROS-Bildung in Fibroblasten in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein nach UV-Bestrahlung untersucht.

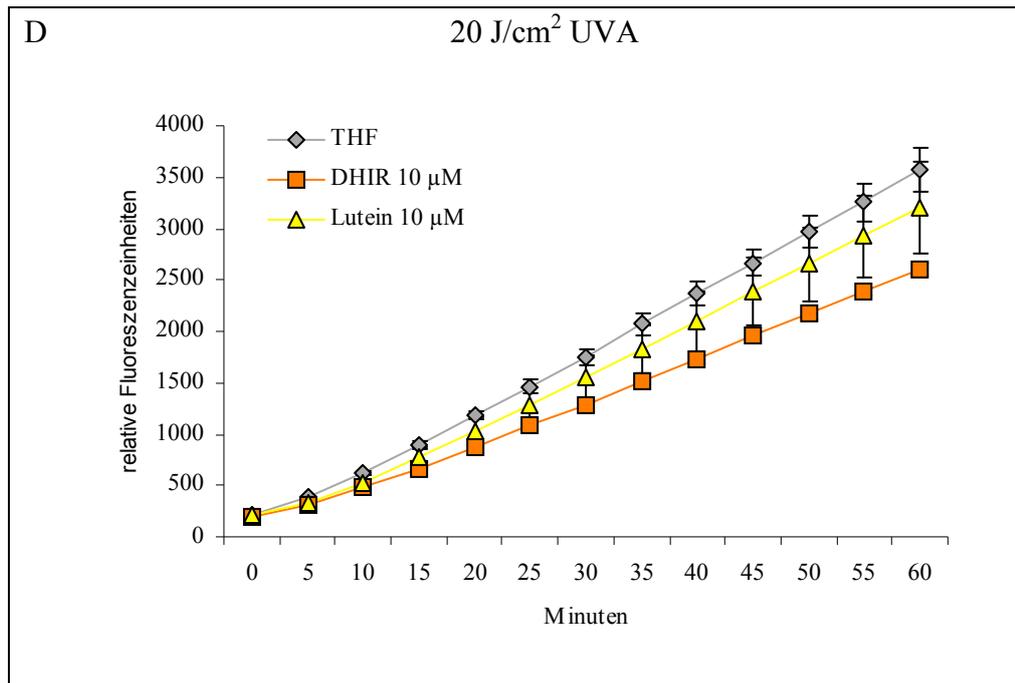
In Abb. 4.9 (A-D) sind typische Zeitverläufe der ROS-Bildung in den mit Carotinoiden inkubierten Zellen bei Bestrahlungsdosen von 0, 5, 10 und 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA dargestellt. Die Bildung von ROS wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) angegeben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den mit THF behandelten Zellen (Kontrolle) vergleichbare Ergebnisse wie bei den in Abb. 4.8 gezeigten unbehandelten Fibroblasten erzielt werden. So ist ohne UV-Bestrahlung nach 60 min ein Anstieg von ROS um das 5 fache des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 zu verzeichnen. Nach einer Bestrahlung mit 5 bzw. 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  steigt die ROS-Bildung um den Faktor 9-11 und nach einer Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  um den Faktor 18. Auch mit Lutein werden analoge Effekte gemessen. Im Vergleich dazu zeigen die mit DHIR behandelten Zellen bei Bestrahlung mit 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  (4.8 B), 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  (4.8 C) und 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  (4.8 D) UVA eine signifikant verminderte Bildung von ROS. Während ohne UV-Bestrahlung kein Unterschied zwischen den mit DHIR inkubierten Zellen und der Lösemittel-Kontrolle zu sehen ist, steigt die ROS-Bildung nach einer Bestrahlung mit 5, 10 bzw. 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA lediglich um den Faktor 7, 8 bzw. 13. Bei einer Bestrahlungsdosis von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA entspricht dieser Anstieg nur etwa 72 % des Anstieges von ROS in der Kontrolle.



## 4. Ergebnisse





**Abb. 4.9: ROS-Bildung nach UVA-Bestrahlung in mit THF, DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten.**

## 4. Ergebnisse

---

Zur besseren Vergleichbarkeit der Wirkung von DHIR und Lutein wurden die Werte der drei spektrometrischen Analysen zum Zeitpunkt 60 min zusammengefasst (Tab. 4.4.)

Die ROS-Bildung wurde in jeder Versuchsreihe eine Stunde lang im 5-Minuten-Intervall mit Hilfe des Spektralphotometers gemessen. Es gab pro Bestrahlungsdosis und Substanz vier Ansätze, wobei die gemessenen Werte der verschiedenen Zeitpunkte zu entsprechenden Mittelwerten zusammengefasst wurden. Von diesen Mittelwerten wurde jeweils die durchschnittliche Eigenfluoreszenz der Zellen und des Farbstoffes abgezogen. Diese wurde ermittelt, indem die Fluoreszenz von Fibroblasten ohne H<sub>2</sub>DCF-DA Zugabe bzw. nur von H<sub>2</sub>DCF-DA gemessen wurde.

Bei der Zusammenfassung der drei Versuchsreihen wurden alle Mittelwerte zunächst auf den Mittelwert des Zeitpunktes 0 der entsprechenden Substanz und Bestrahlungsdosis normiert und in Prozent umgerechnet. Dabei wurden die Mittelwerte zum Zeitpunkt 0 auf 100 % gesetzt. Um anschließend das Verhältnis der ROS-Bildung nach 60 min in den mit verschiedenen Carotinoiden inkubierten Zellen darzustellen wurden die für den Zeitpunkt 60 min nach oben beschriebenen Prinzip ermittelten Prozentangaben der THF-Kontrolle jeder Bestrahlungsdosis 100 % gesetzt und die Werte der DHIR und Lutein inkubierten Zellen darauf bezogen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ROS-Bildung in Fibroblasten, die mit Lutein inkubiert wurden, bei allen Bestrahlungsdosen der ROS-Bildung der Lösemittel-Kontrolle entspricht. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von ROS in DHIR inkubierten Zellen bei allen Bestrahlungsdosen geringer als die ROS-Bildung der Lösemittel-Kontrolle.

	60 Minuten		
	THF	DHIR 10 µM	Lutein 10 µM
<b>0 J /cm<sup>2</sup> UVA</b>	100 %	100 % ± 9	99 % ± 5
<b>5 J /cm<sup>2</sup> UVA</b>	100 %	91 % ± 5	105 % ± 7
<b>10 J /cm<sup>2</sup> UVA</b>	100 %	84 % ± 6	109 % ± 4
<b>20 J /cm<sup>2</sup> UVA</b>	100 %	78 % ± 5	96 % ± 8

**Tab. 4.4: Zunahme von ROS in THF, DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten zum Zeitpunkt 60 min nach UVA-Bestrahlung**

### **4.3 Effekte von DHIR und Lutein auf die UV-induzierte Zinkfreisetzung in Fibroblasten**

Zink ist ein wichtiger Kofaktor und essentiell für die Struktur und Funktion zahlreicher Proteine. Etwa 10 % des humanen Proteoms besteht aus potentiellen Zink-bindenden Proteinen. In diesem Zusammenhang sind Cys<sub>4</sub> und Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfinger häufig vorkommende Strukturen, welche Zink in einem Protein komplexometrisch binden.

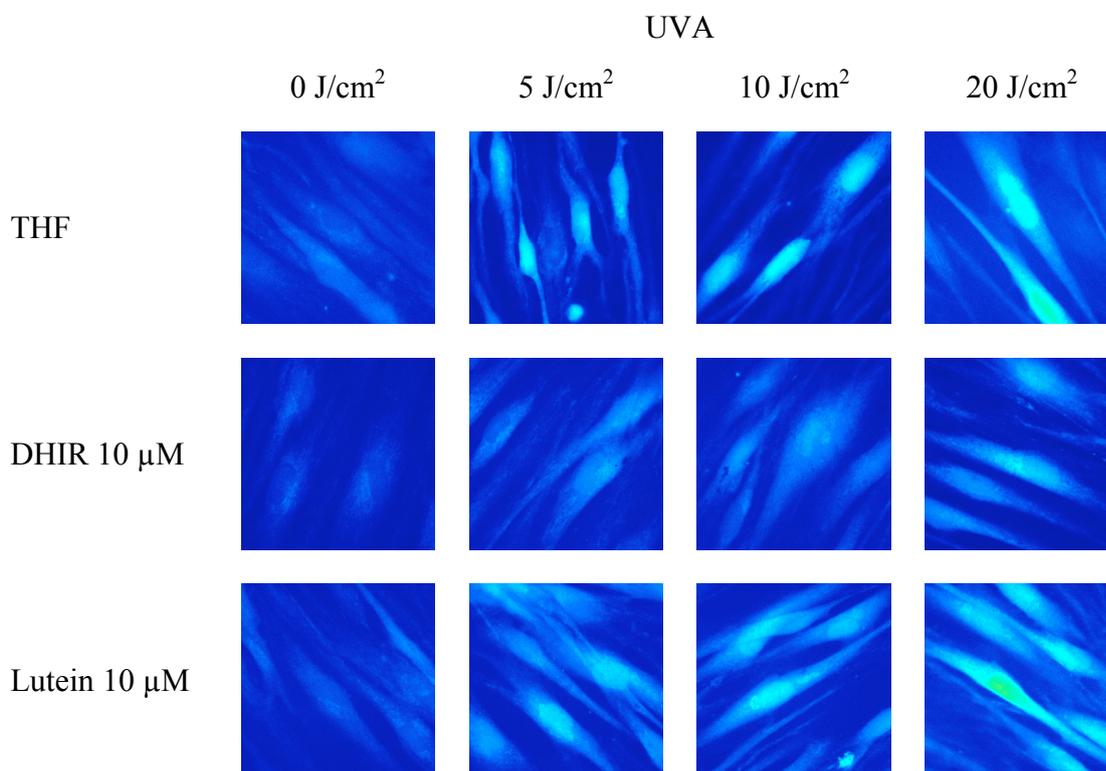
Die vermehrte UV-bedingte Bildung von ROS innerhalb von Zellen verursacht Modifikationen von Zink-bindenden Cysteinen, was zu einer Freisetzung von Zink aus Zinkfingern oder vergleichbaren Strukturen führt. Daraus resultiert ein Funktionsverlust der Proteine sowie eine Störung der intrazellulären Zinkhomöostase.

Die Zunahme von freiem Zink nach UV-Behandlung von Fibroblasten wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin fluoreszenzmikroskopisch (3.8) analysiert. Zur Untersuchung der Schutzwirkung von Carotinoiden wurden die Zellen mit je 10 µM DHIR bzw. Lutein inkubiert (3.2) und mit 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA (3.3) bestrahlt. Der Versuch wurde dreimal unabhängig wiederholt, wobei in jedem Versuch pro Bestrahlungsdosis und Substanz je vier Bilder aufgenommen wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte im „schwarz-weiss“-Modus. Dabei entsprach der höchste Helligkeitsgrad der stärksten Fluoreszenz. Für eine deutlichere Darstellung wurden die Bilder in Fehlfarbandarstellung abgebildet, wobei der geringsten Helligkeit und somit auch der geringsten Fluoreszenz die Farbe dunkelblau und der höchsten Helligkeit bzw. Fluoreszenz die Farbe rot zugeordnet wurde. Die komplette Farbskala ist in Abb. 4.5 S.60 gezeigt.

In Abb. 4.10 sind ausgewählte Fluoreszenzbilder dargestellt. Diese sind von links nach rechts den ansteigenden Bestrahlungsdosen und von oben nach unten den Substanzen THF (Lösemittel-Kontrolle), DHIR und Lutein zugeordnet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass ist in allen Fällen die Zunahme an freiem Zink mit der ansteigenden Bestrahlungsdosis korreliert. So ist ohne UV-Bestrahlung die vorherrschende Farbe des Fluoreszenzbildes der Lösemittelkontrolle (obere Reihe, ganz links) dunkelblau mit nur schwer erkennbaren zellulären Strukturen. Nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA (obere Reihe, ganz rechts) hingegen sind die einzelnen Zellen eindeutig vom Hintergrund abgrenzbar und weisen eine helltürkise Färbung auf, welche eine deutlich erhöhte Fluoreszenz anzeigt. Die mit Lutein inkubierten Zellen zeigen unter Bestrahlung einen vergleichbaren

Effekt. Im Gegensatz dazu findet man in Fibroblasten, welche mit DHIR inkubiert wurden, bei 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA eine signifikant geringere Fluoreszenz und somit eine verringerte Freisetzung von Zink im Vergleich zur entsprechenden Lösemittel-Kontrolle.



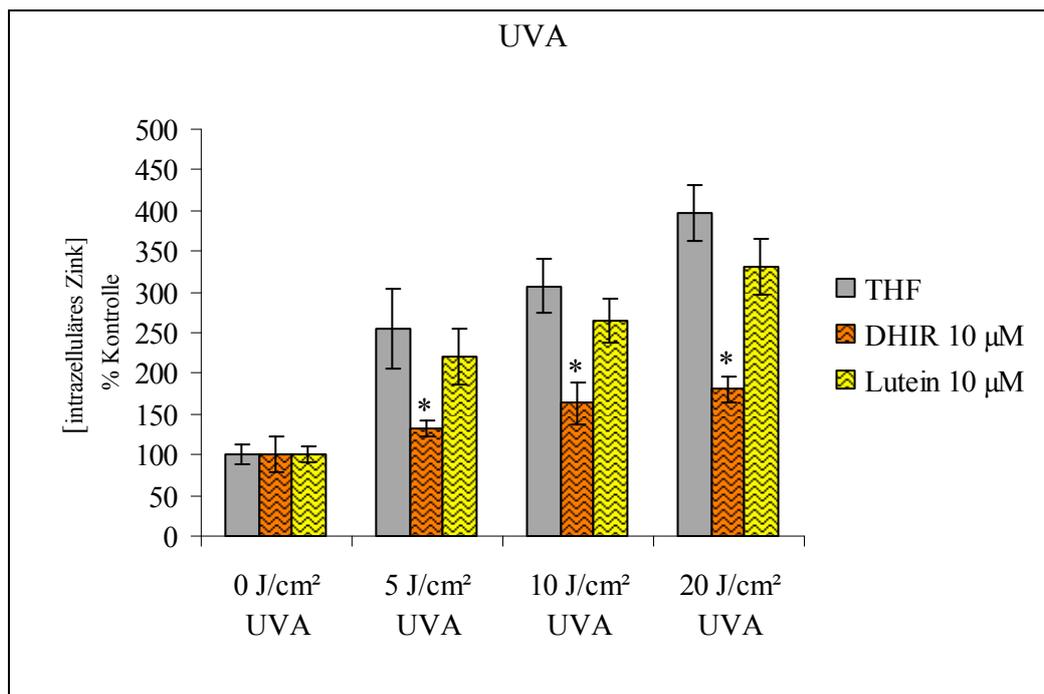
**Abb. 4.10: Zunahme von freiem Zink in mit THF, DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten nach Bestrahlung mit 0, 5, 10 & 20 J/cm<sup>2</sup> UVA.**

Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte gemäß dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Prinzip mit dem Computerprogramm ImageJ. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.11 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den mit THF (Kontrolle) inkubierten Fibroblasten die Zunahme an freiem Zink mit der ansteigenden Bestrahlungsdosis korreliert. So steigt der Wert für das intrazelluläre freie Zink nach einer Bestrahlung mit 5 J/cm<sup>2</sup> UVA um das 2,5 fache, nach Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA um das 3 fache und nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA um das 4 fache im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Ein ähnlicher Effekt kann bei den mit Lutein inkubierten Hautzellen (in gelb dargestellt) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wirkt DHIR (in orange dargestellt) protektiv gegen UVA-induzierte Zinkfreisetzung. Bei allen drei Bestrahlungsdosen ist die Fluoreszenz (intrazelluläres Zink) in DHIR-inkubierten Zellen statistisch signifikant geringer als die Fluoreszenz in der Lösemittel-

## 4. Ergebnisse

Kontrolle. So verdoppelt sich der Gehalt an freiem Zink in Fibroblasten, welche mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR inkubiert wurden, nach einer Bestrahlung von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA, während der Zink-Wert der Lösemittelkontrolle um den Faktor 4 ansteigt.

Diese Ergebnisse bestätigen den subjektiven Eindruck der in Abb. 4.5 dargestellten Fluoreszenzbilder.



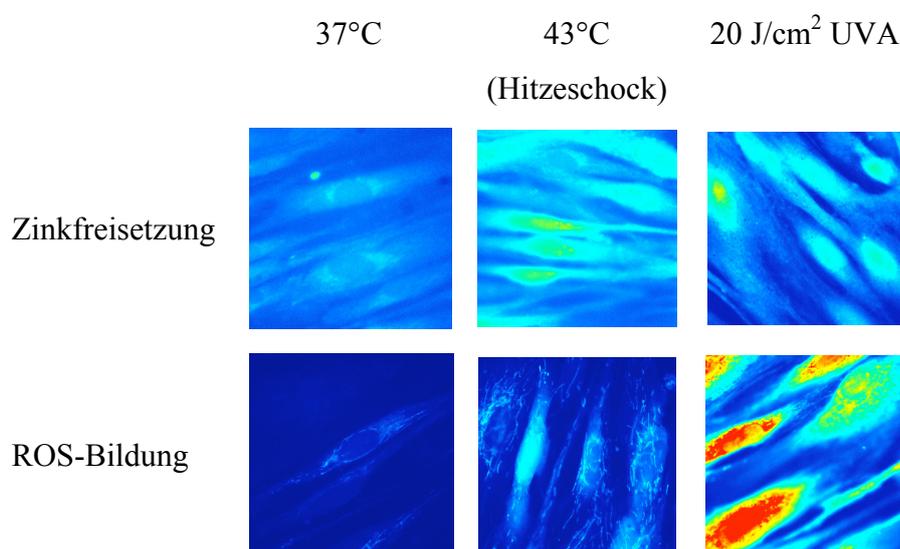
**Abb. 4.11:** semiquantitative Auswertung der Zunahme von freiem Zink in mit THF, DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung, die unbestrahlten Ansätze jeder Substanz dienen als Kontrolle, \* $p \leq 0,05$

Anhand der in Kapitel 4.2 und 4.3 erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass DHIR sowohl protektiv auf die UV-induzierte Bildung von ROS, als auch auf die durch ROS bedingte Zinkfreisetzung in Zellen wirkt. Somit lag die Vermutung nahe, dass die mit DHIR erzielten Effekte auf eine photoprotektive Wirkung zurückzuführen sind.

#### 4.4 Effekte von DHIR und Lutein auf die thermisch induzierte Zinkfreisetzung in Fibroblasten

Um den Beweis zu erbringen, dass DHIR photoprotektiv ist, also spezifisch vor UV-abhängiger Photooxidation schützt, wurde die Zinkfreisetzung (3.8) in mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR oder Lutein inkubierten Zellen (3.2) ebenfalls nach Auslösung eines Hitzeschocks (3.9) untersucht. Eine Behandlung bei 43 °C für 30 min löst in Zellen Stress aus, den sogenannten Hitzeschock. Dieser führt, ebenso wie UVA Strahlung, zur Freisetzung von Zink aus Proteinen (siehe Kapitel 4.3). Diese Wirkung beruht allerdings nicht auf einer ROS-Zunahme wie sie nach UV-Einstrahlung aufgrund photooxidativer Prozesse zu beobachten ist.

Die in Abb. 4.12 gezeigten Fluoreszenzbilder wurden wie in den Kapiteln 4.2 und 4.3 bereits beschrieben aufgenommen. Die Farbskala ist in Abb. 4.5 S.60 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Hitzeschock, als auch eine Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA zu einer deutlichen Zinkfreisetzung (Zunahme der Fluoreszenz) in Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Fibroblasten führen (obere Reihe mittleres und rechtes Bild). Im Fall der UV-Bestrahlung beruht dieser Effekt auf der Bildung von ROS (Nachweis mit dem ROS sensitiven Farbstoff  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , untere Reihe, rechtes Bild), dargestellt durch die gelb-rote Färbung. Im Gegensatz dazu ist nach Auslösung von Hitzeschock nur eine sehr geringe Zunahme von ROS zu verzeichnen (untere Reihe, mittleres Bild). Die Reaktion, welche zur Freisetzung von Zink nach Hitzeschock führt ist demnach nicht UV-abhängig.



**Abb. 4.12:**  
Zinkfreisetzung  
und ROS Bildung  
in Fibroblasten  
nach Hitzeschock  
und Bestrahlung  
mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$   
UVA

Der nur sehr geringe Anstieg von ROS nach Hitzeschockauslösung wurde durch spektrometrischen Analysen (3.7.2) bestätigt. Die mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein inkubierten Zellen (3.2) wurden für 30 min bei 42°C inkubiert, wodurch ein Hitzeschock ausgelöst wurde (3.9). Direkt im Anschluß an die thermische Behandlung wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>DCF-DA versetzt und die ROS-Bildung wurde eine Stunde lang im 5-Minuten-Intervall mit Hilfe des FluoStar gemessen. In jeder Versuchsreihe gab es pro Substanz vier Ansätze, wobei die gemessenen Werte zu Mittelwerten zusammengefasst wurden. Von diesen Mittelwerten wurde jeweils die durchschnittliche Eigenfluoreszenz der Zellen und des Farbstoffes abgezogen. Diese wurden ermittelt, indem die Fluoreszenz von Fibroblasten ohne H<sub>2</sub>DCF-DA Zugabe bzw. von nur H<sub>2</sub>DCF-DA ohne Zellen gemessen wurde.

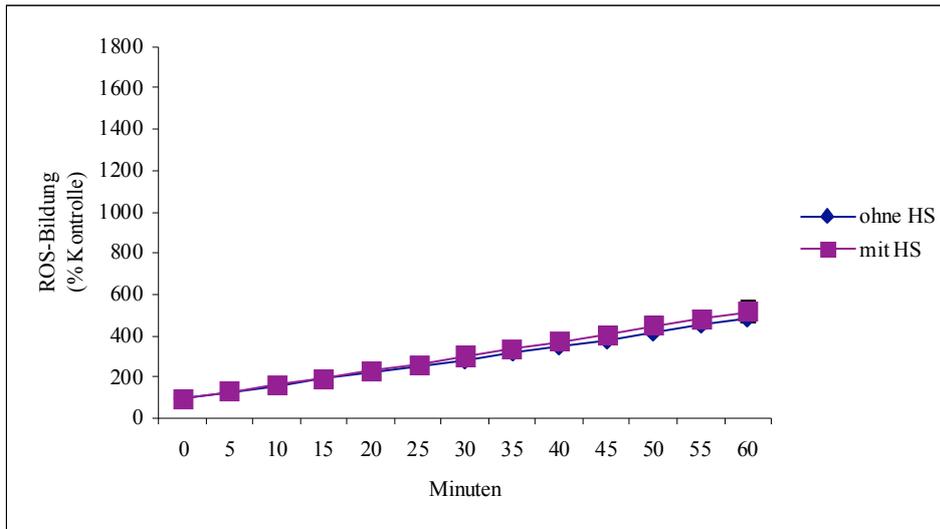
Für eine bessere Vergleichbarkeit der ROS-Bildung ohne und mit Hitzeschock wurden die Ergebnisse in Prozent umgerechnet. Dabei dienten die Mittelwerte zum Zeitpunkt 0 jeweils als Bezugspunkte und wurden 100 % gesetzt.

In Abb. 4.13 ist deutlich zu erkennen, dass sich die hohe Temperatur nicht auf die Bildung von ROS auswirkt. Sowohl ohne als auch mit Hitzeschock stieg der Gehalt an ROS nach 60 min um das 5-fache im Verhältnis zum Ausgangswert zum Zeitpunkt 0.

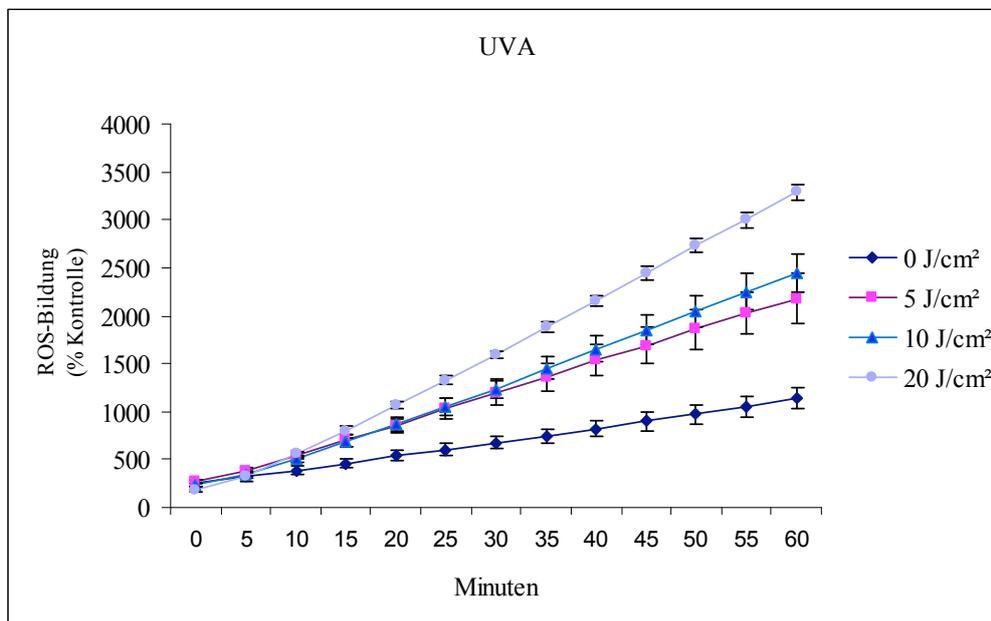
Dieses Ergebnis stimmt mit den in Abb.4.14 gezeigten Daten zur ROS-Bildung unbestrahlter Kontrollzellen überein. Auch hier wurden die Mittelwerte zum Zeitpunkt 0 auf 100 % gesetzt und alle weiteren Mittelwerte darauf bezogen.

Auch ohne UV-Bestrahlung ist nach 60 min ein Anstieg von ROS um das 4-fache des Ausgangswertes zu verzeichnen. Nach UVA-Bestrahlung, jedoch nicht nach Hitzeschock (vergleiche Abb. 4.13) nimmt die Bildung von ROS deutlich zu, wobei die ROS-Bildung mit der zunehmenden Bestrahlungsdosis korreliert. So steigt die Anzahl von ROS nach 60 min bei einer Bestrahlung von 5 J/cm<sup>2</sup> UVA um den Faktor 8, bei einer Bestrahlung von 10 J/cm<sup>2</sup> UVA um den Faktor 10 und bei einer Bestrahlung von 20 J/cm<sup>2</sup> um den Faktor 17 im Verhältnis zum Ausgangswert.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.13: Zunahme von ROS nach Hitzeschock in Fibroblasten;**  
Kontrolle = Ansätze zum Zeitpunkt 0



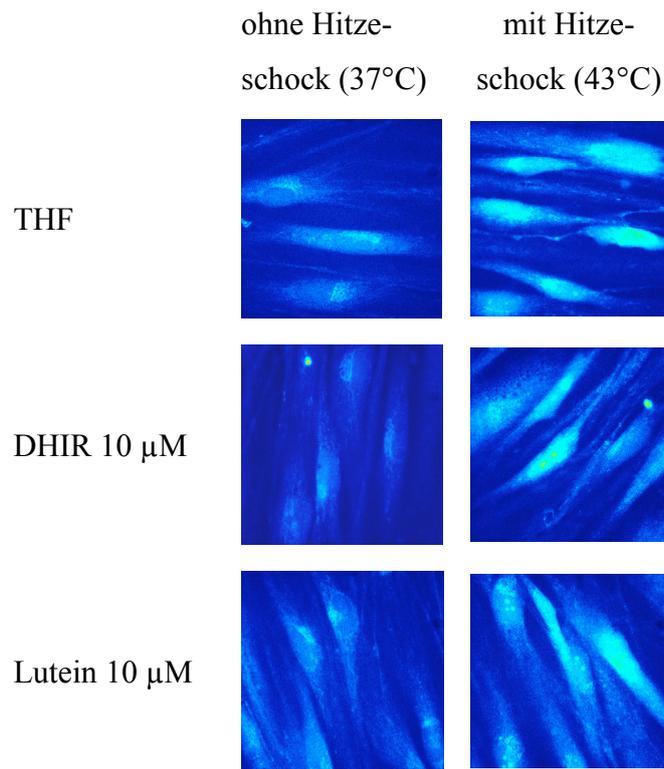
**Abb. 4.14: Zunahme von ROS nach UVA Bestrahlung in Fibroblasten;**  
Kontrolle = Ansätze zum Zeitpunkt 0

UVA-Bestrahlung führt zum Anstieg von freiem Zink in Fibroblasten. Ein vergleichbarer Effekt wurde in Zellen nach Auslösung eines Hitzeschock ermittelt. Diese Zinkfreisetzung ist jedoch nicht ROS-abhängig.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DHIR sowohl protektiv auf die UV-induzierte Bildung von ROS, als auch auf die durch ROS bedingte Zinkfreisetzung in Zellen wirkt. Somit lag die Vermutung nahe, dass DHIR photoprotektiv wirkt. Handelt es sich bei den mit DHIR erzielten Effekten um photoprotektive Effekte, so sollte die Inkubation mit DHIR keinen Einfluss auf die Zinkfreisetzung in Zellen nach Auslösung eines Hitzeschocks haben, da dieser Effekt ROS unabhängig ist.

Die Zinkfreisetzung (3.8) wurde 25 Minuten nach Auslösung eines Hitzeschocks (3.9) in Fibroblasten, welche mit 10  $\mu$ M DHIR bzw. Lutein inkubiert worden waren (3.2), analysiert. In Abbildung 4.15 sind exemplarische Fluoreszenzbilder dargestellt. Die Fluoreszenzbilder wurden wie in den Kapiteln 4.2 und 4.3 bereit beschrieben aufgenommen.

Es ist eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz (Zinkfreisetzung) nach Auslösung eines Hitzeschocks zu erkennen (rechte Reihe). So sind die einzelnen Zellen der Lösemittelkontrolle helltürkis eingefärbt und deutlich vom dunkelblauen Hintergrund abgrenzbar (rechte Reihe, oben). Im Gegensatz dazu weisen die Fibroblasten der Lösemittelkontrolle ohne Hitzeschock nur eine geringe helltürkise Färbung, vorwiegend um den Zellkern, auf (linke Reihe, oben). Sowohl in den mit DHIR, als auch in den mit mit Lutein inkubierten Zellen wurde in diesem Experiment ein vergleichbarer Effekt gemessen.

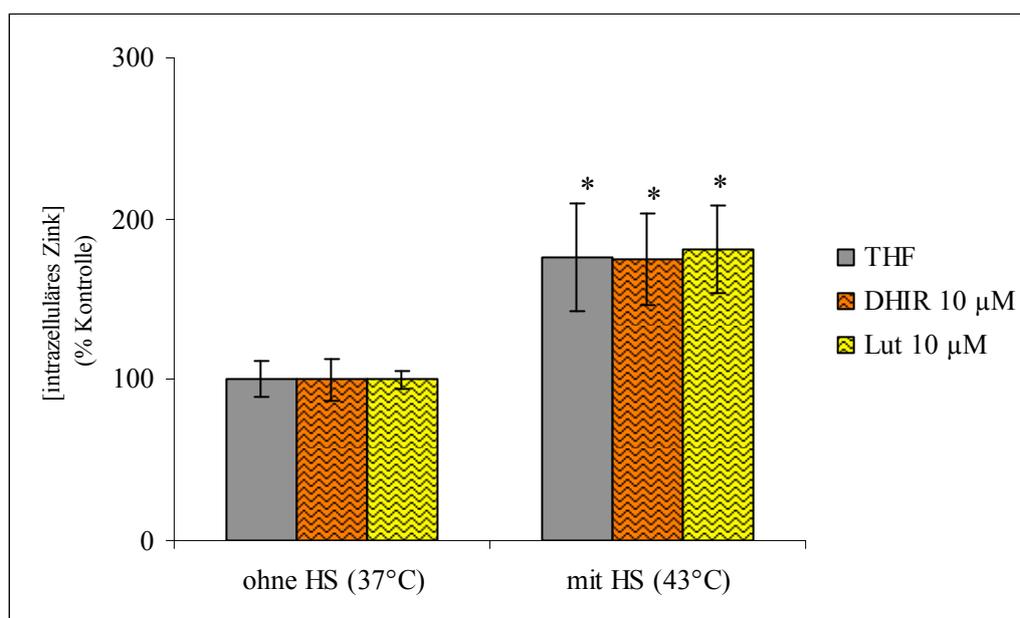


**Abb. 4.15: Zinkfreisetzung nach Auslösung eines Hitzeschocks in mit DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten.**

## 4. Ergebnisse

Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte gemäß dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Prinzip mit dem Computerprogram ImageJ. Die Inkubationsansätze bei 37°C dienten dabei als Kontrolle und wurden für jede Substanz 100 % gesetzt.

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung sind in Abb. 4.16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die thermische Behandlung bei den mit THF inkubierten Fibroblasten (in grau dargestellt) eine Zinkfreisetzung auslöst. So steigt der Wert für die Zinkfreisetzung nach der thermalen Behandlung um das 2 fache im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Ein vergleichbarer Effekt kann bei den mit Lutein inkubierten Hautzellen (in gelb dargestellt) und bei den mit DHIR inkubierten Fibroblasten (in orange dargestellt) festgestellt werden. Der Anstieg des freien Zinks nach Hitzeschock ist in allen Zellen statistisch signifikant.



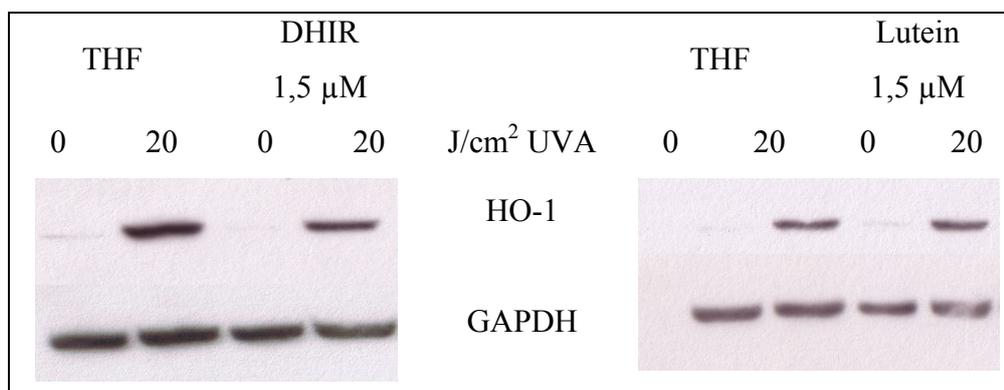
**Abb. 4.16: semiquantitative Auswertung der Zinkfreisetzung nach Auslösung eines Hitzeschocks in Fibroblasten**

## 4.5 Effekte von DHIR und Lutein auf die UVA-induzierte Expression von HO-1 in Fibroblasten

UV-bedingte ROS-Bildung führt unter anderem zur Freisetzung von Häm aus zellulären Strukturen. Da freies Häm toxisch und prooxidativ auf Zellen wirkt, ist ein schneller Abbau der Substanz notwendig. Dies geschieht durch das Protein Hämoxygenase-1 (HO-1), dessen Expression u.a. auch durch UVA bzw. freies Häm induziert wird. Eine zusätzliche Wirkung der HO-1 ist, dass im Verlauf des Hämabbaus die Reaktionsprodukten Biliverdin und Bilirubin entstehen, welche selbst antioxidative Eigenschaften aufweisen.

Die HO-1 Expression nach Bestrahlung von Hautfibroblasten wurde mit Hilfe von SDS-PAGE (3.6.2) und Western Blot Analyse (3.6.3) untersucht. Jeder Versuch wurde dreimal unabhängig wiederholt, wobei mit THF inkubierte Zellen als Referenz dienten. Referenzzellen und die mit 1,5  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein inkubierten Fibroblasten (3.2) wurden mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA bestrahlt (3.3). 24 h nach der Bestrahlung wurde die HO-1 Expression analysiert. In Abbildung 4.17 ist ein typischer HO-1 Western Blot gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Expression der HO-1 nach einer Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA in den mit THF bzw. Carotinoiden inkubierten Fibroblasten im Verhältnis zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle deutlich ansteigt. Bei einem Vergleich der HO-1 Expression in Zellen die mit Lutein und THF inkubiert waren (rechte Seite) lässt sich kein Unterschied feststellen. Im Gegensatz dazu weisen mit DHIR inkubierte Zellen (linke Seite) eine wesentlich schwächere HO-1 Bande als die entsprechende Lösemittel-Kontrolle auf.

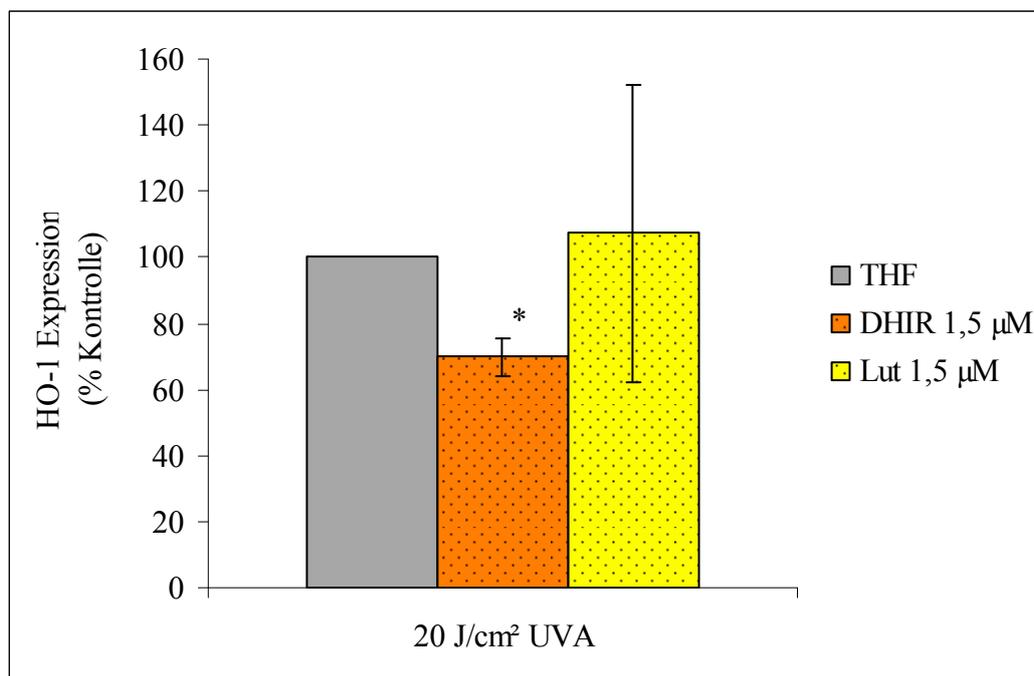
Die GAPDH-Banden unten im Bild dienen als Ladekontrolle. GAPDH ist ein ubiquitäres Protein, welches als „housekeeping“ Gen exprimiert wird und dessen Expression nicht durch UV-Bestrahlung verändert wird.



**Abb. 4.17: HO-1 Expression nach Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA in mit DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten**

Die semiquantitative Auswertung der HO-1 Expression nach UVA-Bestrahlung in den mit Carotinoiden inkubierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ. Dabei wurden nur die Banden der mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten Ansätze, sowie die zugehörigen GAPDH-Banden berücksichtigt. Die entsprechenden Banden von drei unabhängig voneinander durchgeführten Western Blots wurden eingescannt. Anschließend wurde die Gesamthelligkeit aller Pixel in einem definierten Bereich (einer Western Blot Bande) bestimmt. Die Bandenintensität korrelierte mit der HO-1 Expression. Die Werte der mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten, mit THF inkubierten Fibroblasten dienten als Referenz und wurden auf 100 % gesetzt.

In Abbildung 4.18 ist deutlich zu erkennen, dass durch Inkubation mit 1,5 µM DHIR eine statistisch signifikante Senkung der HO-1 Expression im Vergleich zur THF-Kontrolle nach UVA Bestrahlung erreicht wurde. Die entsprechenden Werte der mit Lutein inkubierten Zellen waren großen Schwankungen unterworfen. Der Unterschied war im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant.



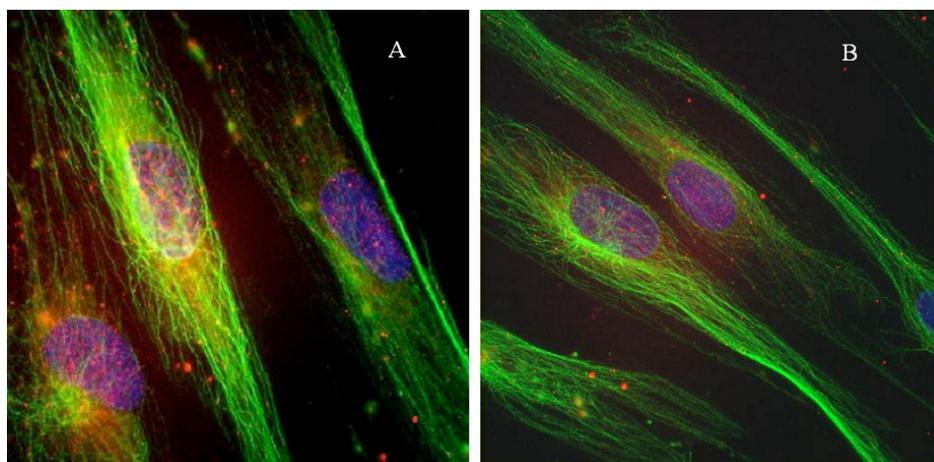
**Abb. 4.18: semiquantitative Auswertung der HO-1 Banden aus drei unabhängigen Western Blots;** Kontrolle = mit THF behandelte Zellen; \*p ≤ 0,05.

## 4.6 Effekte von DHIR und Lutein auf die Bildung von Thymindimeren nach UVB-Bestrahlung

UV-Strahlung kann auch Ursache von Schäden auf DNA-Ebene sein. Wie bereits in Kapitel 1.4.3 beschrieben, führt UVB Strahlung zu DNA-Schäden, wobei besonders häufig Thymindimere und andere Photoprodukte auftreten. Werden diese DNA-Schäden nicht durch körpereigene Reparatursysteme behoben, können sie zu Mutationen führen, welche eine Ursache für die Entstehung von Hautkrebs sind.

Die Bildung von Thymindimeren konnte mittels spezifischer Antikörper im Verlauf von „Immunostaining“-Versuchen (3.10) am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Fibroblasten wurden mit je 10  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein inkubiert (3.2). Die Bestrahlungsdosen betragen 0, 0,1 und 0,3  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVB (3.3). Die Fluoreszenzbilder wurden 24 h nach der Bestrahlung aufgenommen, wobei pro Substanz und Bestrahlungsdosis je vier Bilder aufgenommen wurden.

Abbildung 4.19 zeigt ausgewählte Fluoreszenzbilder, welche 24 h nach Bestrahlung mit 0,3  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVB aufgenommen wurden. Die DNA in den Zellkernen ist auf den Bildern jeweils blau (Dapi-Färbung), die Thymindimere (Antikörper-Färbung) rot und das Aktinzytoskelett (Antikörper-Färbung) grün dargestellt. Bei einem Vergleich von Bild A, auf dem mit THF inkubierte Zellen gezeigt sind, und Bild B, welches mit DHIR inkubierte Fibroblasten zeigt, ist ein deutlicher Unterschied in der Bildung der Thymindimere zu erkennen. So sind in den THF Kontrollzellen wesentlich mehr Thymindimere (rote Punkte) entstanden, als in DHIR behandelten Zellen.



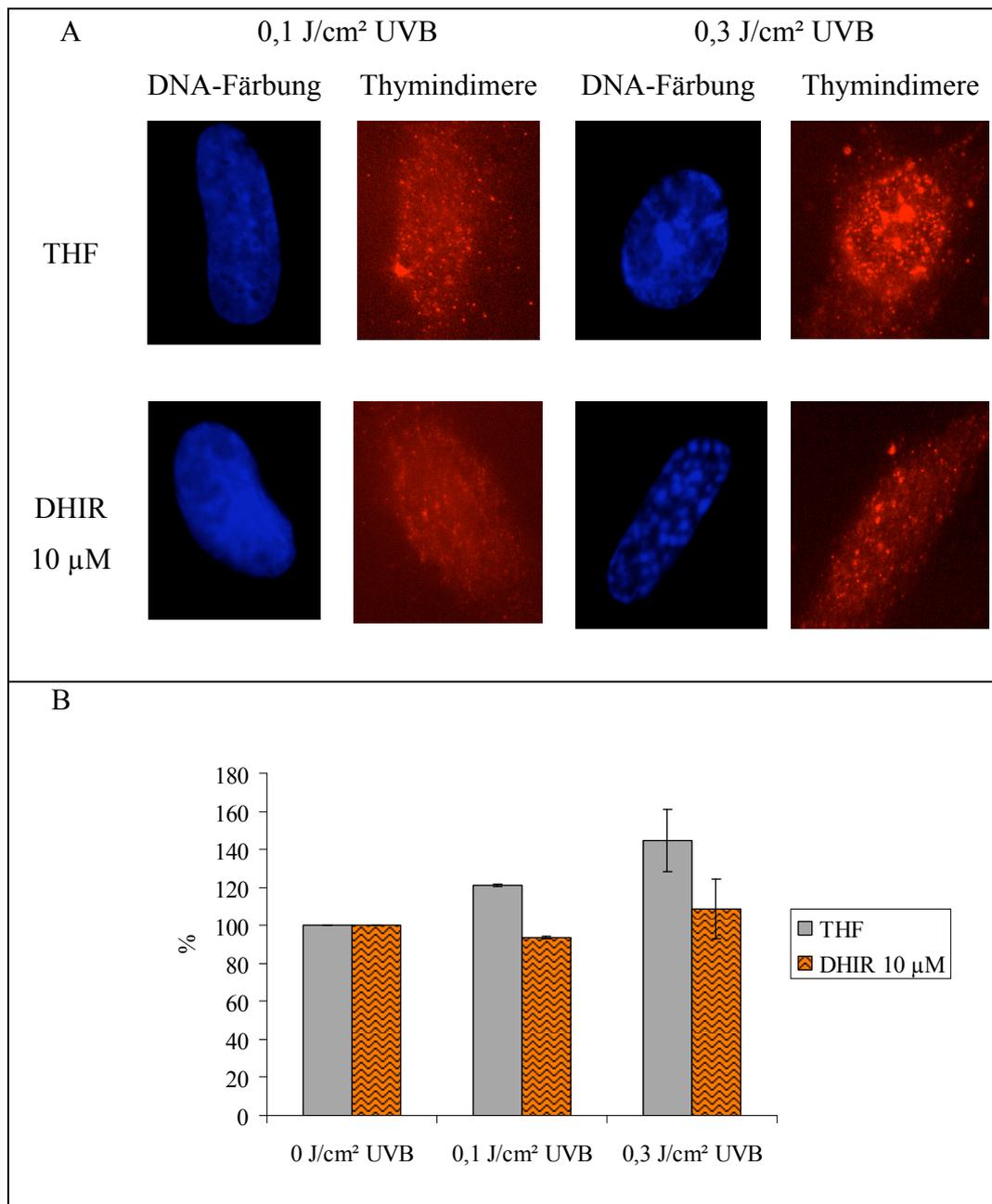
**Abb. 4.19: Bildung von Thymindimeren nach Bestrahlung mit 0,3  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVB in mit THF und DHIR behandelten Fibroblasten; die DNA ist blau (Dapi-Färbung), das Aktinzytoskelett grün und die Thymindimere rot eingefärbt (Antikörper-Färbung).**

In Abbildung 4.20 und 4.21 ist die Bildung von Thymindimeren nach UVB-Bestrahlung mit  $0,1 \text{ J/cm}^2$  und  $0,3 \text{ J/cm}^2$  in Zellen, welche mit THF und DHIR bzw. mit THF und Lutein inkubiert wurden, dargestellt. Dabei zeigen Abb. 4.20 und 4.21 A ausgewählte Fluoreszenzbilder. Die DNA ist jeweils in blau dargestellt und die entsprechenden Thymindimere in rot. DNA bzw. Kerne und Thymindimere wurden zur besseren Darstellung nicht übereinander gelegt. Auf eine Aktinfärbung wurde verzichtet.

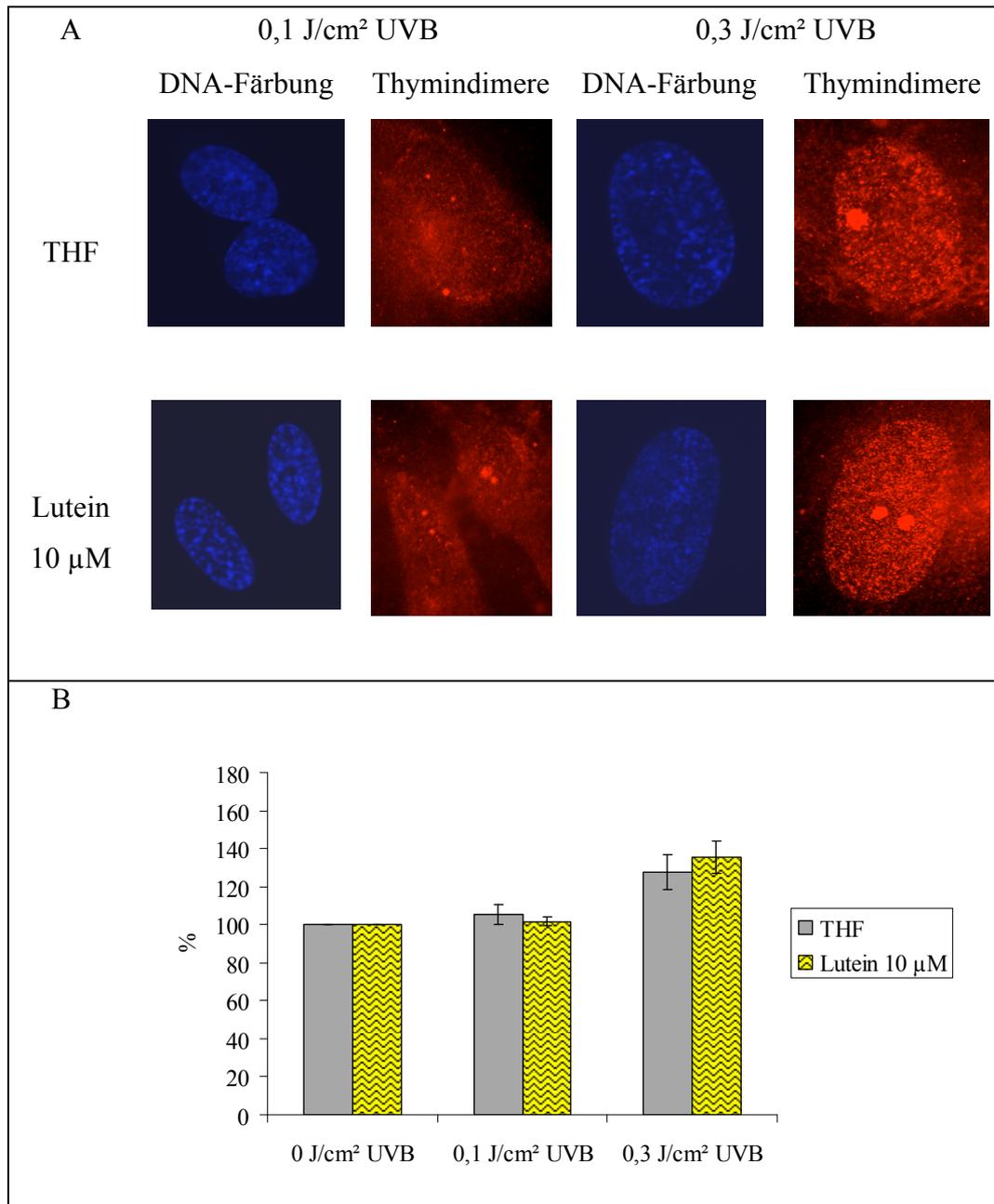
In Abb. 4.20 und 4.21 B ist die jeweilige semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzbilder dargestellt. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm ImageJ nach der in Kapitel 4.2 beschriebenen Methode. Pro Bestrahlungsdosis und Substanz wurden je neun Zellen ausgewertet. Die nicht bestrahlten Zellen dienten als Referenz und wurden auf 100 % gesetzt. Alle weiteren Werte wurden darauf bezogen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bildung von Thymindimeren in Zellen der Lösemittelkontrolle mit zunehmender Bestrahlungsdosis ansteigt (Abb. 4.20 und Abb. 4.21). So steigt der Wert für die Thymindimere nach einer Bestrahlung von  $0,1 \text{ J/cm}^2$  UVB um 10-20 % und nach einer Bestrahlung von  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB um 40 % im Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigen Fibroblasten, welche mit DHIR behandelt wurden (Abb. 4.20 B), nach beiden Bestrahlungsdosen eine signifikant geringere Bildung von Thymindimeren. So kann nach einer Bestrahlung mit  $0,1 \text{ J/cm}^2$  UVB keine zusätzliche Bildung von Thymindimeren im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle gemessen werden. Im Fall von  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB steigt der Wert für die Thymindimere nur um 10 %. Dies entspricht einer um 30 % gesenkten Bildung von DNA-Schäden im Vergleich zur Lösemittel-Kontrolle bei gleicher Bestrahlungsdosis.

Lutein zeigte weder nach einer Bestrahlung von  $0,1 \text{ J/cm}^2$  UVB noch nach einer Bestrahlung mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB einen Effekt auf die Bildung von Thymindimeren (Abb. 4.21 B)



**Abb. 4.20: Bildung von Thymindimeren nach UVB in mit THF und DHIR behandelten Zellen; A=Fluoreszenzbilder, B=semiquantitative Auswertung.**



**Abb. 4.21: Bildung von Thymindimeren nach UVB in mit THF und Lutein behandelten Zellen; A=Fluoreszenzbilder, B=semiquantitative Auswertung.**

### **4.7 synthetische Vitamin E Derivate**

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe natürlicher, fettlöslicher und strukturell sehr ähnlicher Verbindungen, welche u.a. als sehr effektive Antioxidantien wirken. Im humanen Organismus wird Vitamin E als wichtiges Antioxidanz zur Kettenabbruchsreaktion bei der Lipidoxidation gesehen (siehe Kap. 1.7.1).

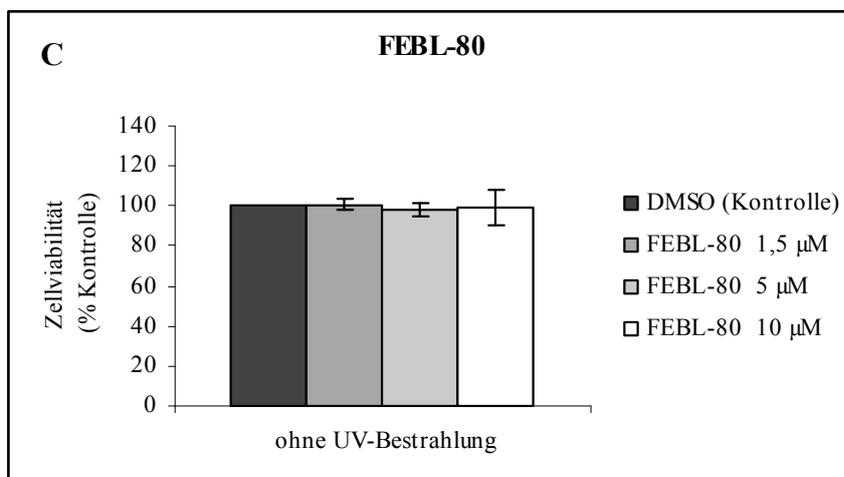
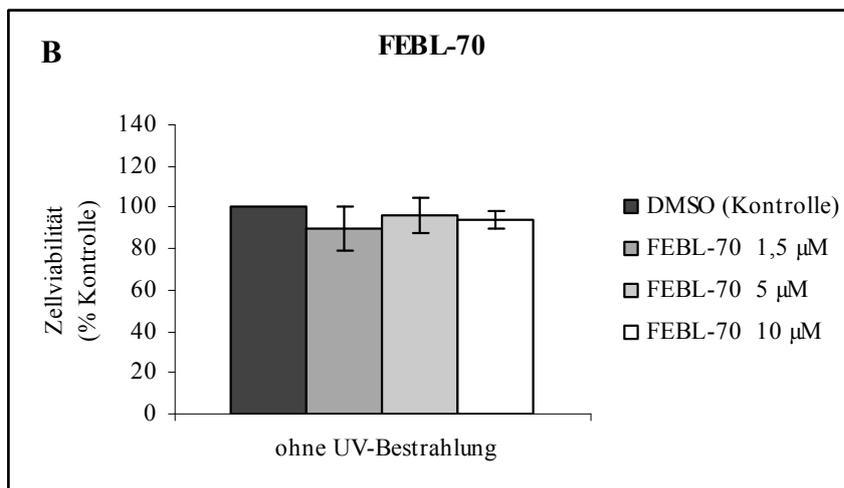
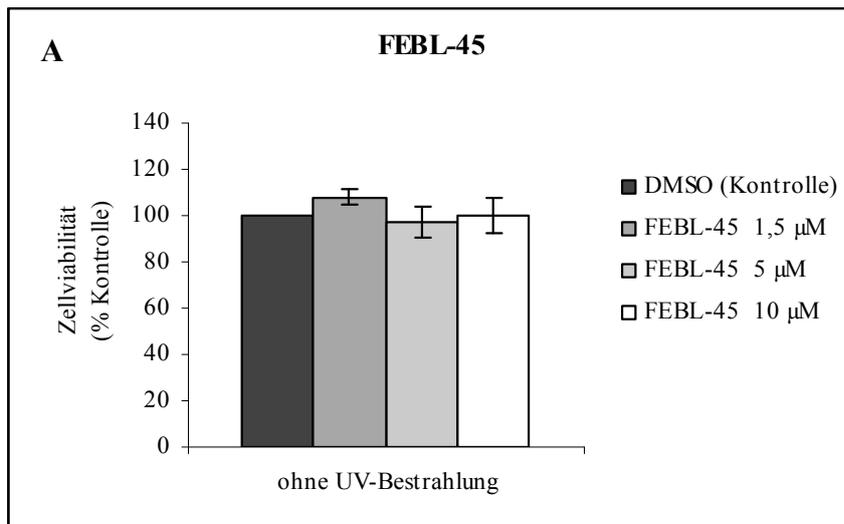
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die synthetisch hergestellten Vitamin E Derivate FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82 (1.7.2) auf ihre Lichtschutzwirkung und antioxidativen Eigenschaften untersucht. Als strukturähnliche Kontrollsubstanz diente  $\alpha$ -Tocopherol.

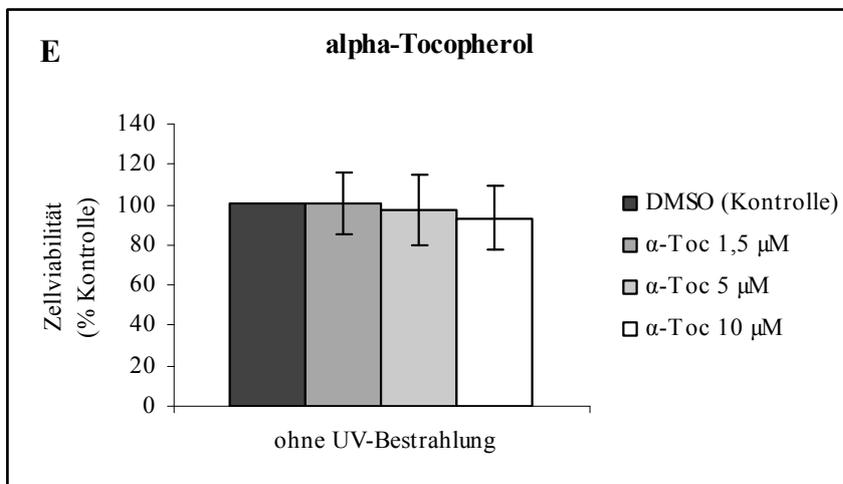
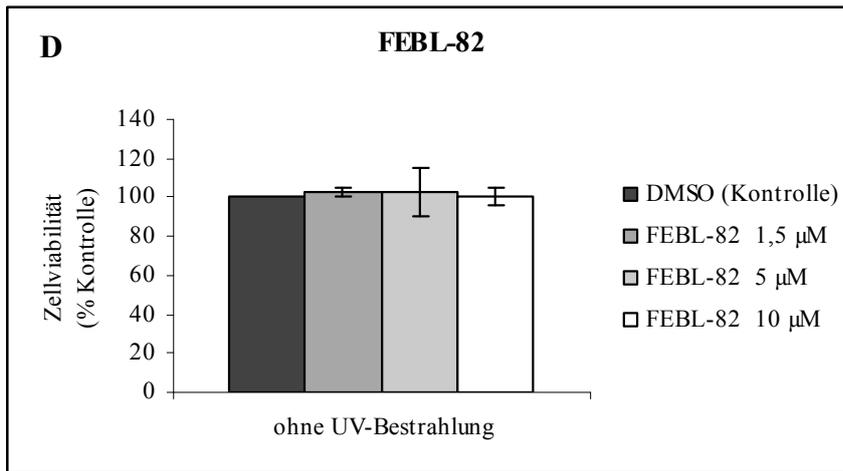
#### **4.7.1 Zytotoxizität der Vitamin E Derivate**

Zunächst wurde eine mögliche toxische Wirkung der Substanzen auf humane Hautfibroblasten untersucht. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen für einen Zeitraum von 24 h inkubiert (3.2). Anschließend wurde die Zellviabilität mit Hilfe des SRB Assays (3.4) untersucht. Insgesamt wurde der SRB Assay dreimal unter unabhängigen Bedingungen wiederholt.

Wie in Abb. 4.22 A-E war keine der fünf Substanzen in den Konzentrationen 1,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M toxisch.

## 4. Ergebnisse





**Abb. 4.22 A-E: Zellviabilität von Fibroblasten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Vitamin E Derivaten und  $\alpha$ -Tocopherol**

### **4.7.2 Effekte von Vitamin E Derivaten auf die UV-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten**

Da die photoprotektiven Eigenschaften von FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82 in weiteren in-vitro Untersuchungen analysiert werden sollten, wurde die Zellviabilität von humanen Hautfibroblasten, welche mit den Vitamin E Derivaten inkubiert worden waren, ebenfalls unter Einwirkung von UV-Licht untersucht. Die Zellen wurden wie in den Kapiteln 3.2 und 3.3 beschrieben mit den Vitamin E Derivaten inkubiert (1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) und anschließend mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung erfolgte die Untersuchung der Zellviabilität mit Hilfe des SRB Assays (3.4).

In Abb. 4.23 A-E ist die Zellviabilität der mit den unterschiedlichen Vitamin E Derivaten und  $\alpha$ -Tocopherol inkubierten Zellen ohne UV-Bestrahlung und nach Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA dargestellt. Alle Werte beziehen sich jeweils auf die entsprechende nicht bestrahlte Lösemittel-Kontrolle (DMSO, 100 %).

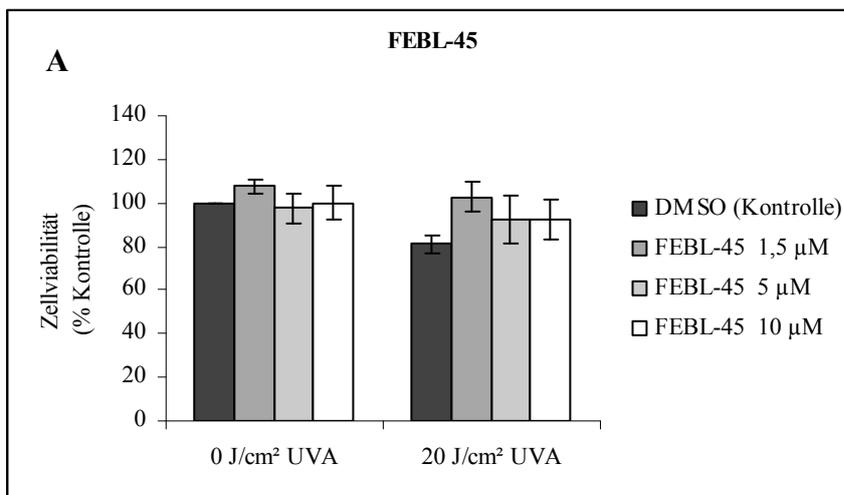
Wie bereits in Abb. 4.1 an unbehandelten Fibroblasten gezeigt, ist auch bei den mit DMSO (Lösemittel-Kontrolle; Abb. 4.23 A-E, dunkelgrau unterlegt) und den mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $\alpha$ -Tocopherol (Abb. 4.23 E) inkubierten Zellen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität um ca. 20 % nach einer Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA im Vergleich zur nicht bestrahlten Lösemittel-Kontrolle zu erkennen. Eine signifikante Abnahme um 40 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle liegt bei Fibroblasten, welche mit 10  $\mu\text{M}$  FEBL-80 bzw. FEBL-82 inkubiert worden waren, vor.

Um eine Aussage über die Toxizität bzw. die Photoprotektivität der synthetischen Vitamin E Derivate im Zusammenhang mit UVA-Licht zu machen, ist ein Vergleich mit der entsprechenden Lösemittel-Kontrolle gleicher Bestrahlungsdosis von Bedeutung. Zellen welche mit 1,5  $\mu\text{M}$  FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 oder FEBL-82 inkubiert wurden, weisen eine signifikant erhöhte Zellviabilität auf. So ist die Zellviabilität der mit 1,5  $\mu\text{M}$  FEBL-45 inkubierten Fibroblasten nach einer Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  um 20 % höher als die Zellviabilität der entsprechenden Lösemittel-Kontrolle (Abb. 4.23 A). Die Viabilität der Zellen, welche mit jeweils 1,5  $\mu\text{M}$  FEBL-70, FEBL-80 oder FEBL-82 inkubiert wurden, ist um 10 %, 20 % und 15 % signifikant erhöht im Vergleich zur entsprechenden Lösemittel-Kontrolle (Abb. 4.23 B,C,D). Das bedeutet, dass alle Vitamin E Derivate in der Konzentration 1,5  $\mu\text{M}$  bei einer Bestrahlung von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA photoprotektiv wirken.

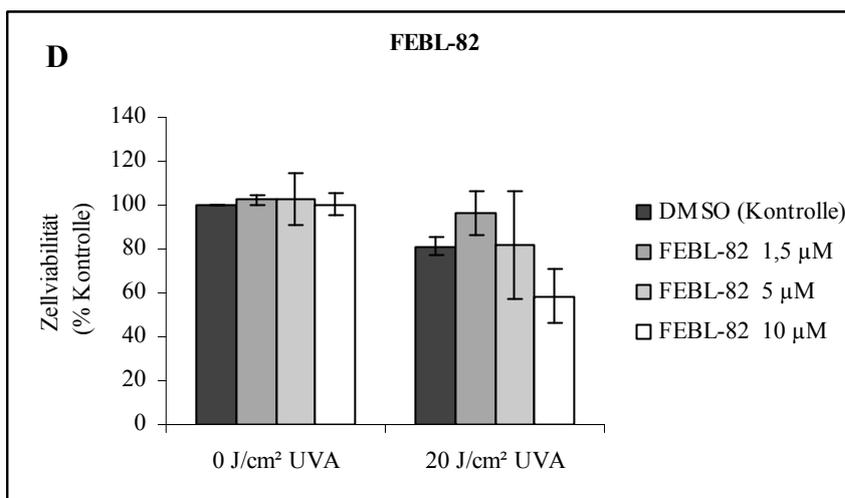
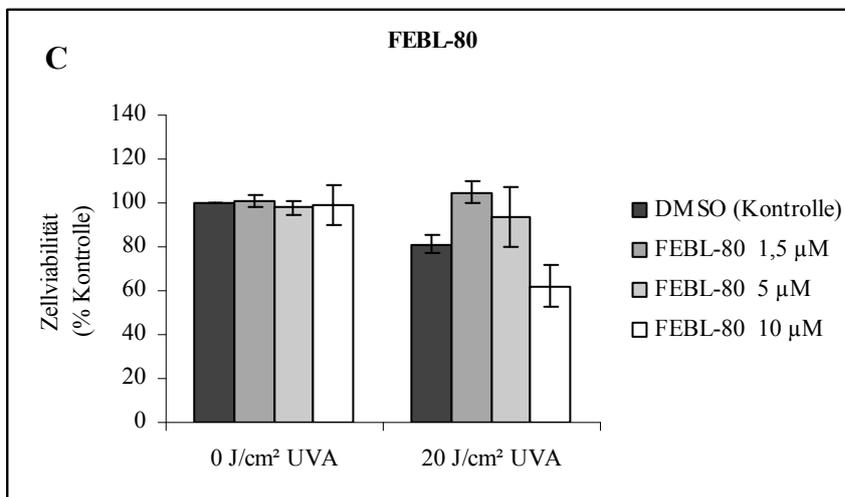
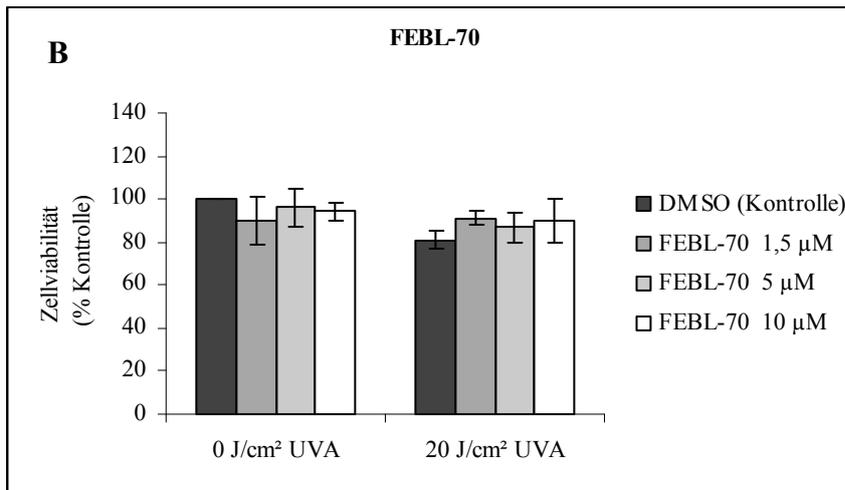
## 4. Ergebnisse

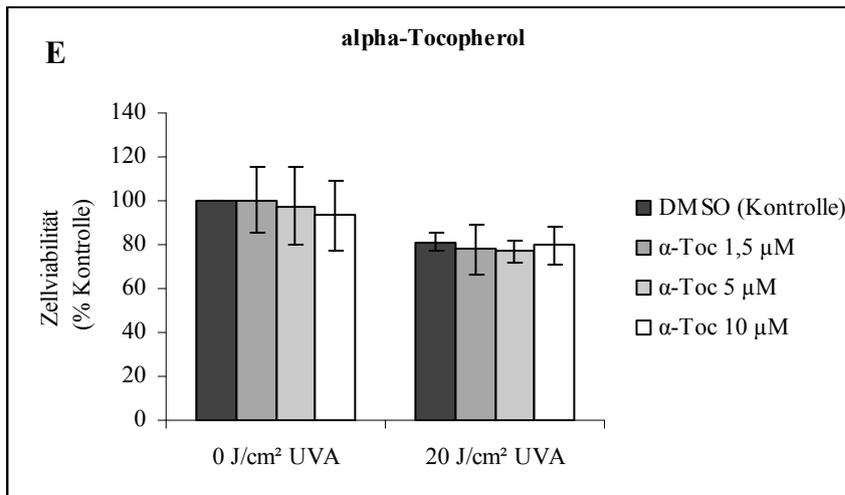
Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  findet man für FEBL-45, FEBL-70 und FEBL-80 (Abb. 4.23 A,B,C,) eine Erhöhung der Zellviabilität von 5-10 % im Vergleich zur ebenfalls mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA bestrahlten Lösemittelkontrolle. Diese Erhöhung ist jedoch in allen drei genannten Fällen statistisch nicht signifikant. Eine Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  FEBL-82 führt hingegen zu keiner Erhöhung der Zellviabilität nach UVA-Bestrahlung (Abb.4.23 D)

Werden die Vitamin E Derivate mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt, so weisen nur die Zellen, welche mit FEBL-45 oder FEBL-70 inkubiert wurden, eine um etwa 10 % erhöhte Zellviabilität auf, welche jedoch nicht signifikant ist (Abb. 4.23 A,B). Im Gegensatz dazu ist bei Fibroblasten, welche mit 10  $\mu\text{M}$  FEBL-80 bzw. FEBL-82 inkubiert worden eine um 20 % verringerte Zellviabilität im Vergleich zur ebenfalls bestrahlten Lösemittel-Kontrolle zu erkennen. Diese Abnahme der Zellviabilität ist signifikant. Die Vitamin E Derivate FEBL-80 und FEBL-82 sind somit bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Kombination mit einer Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA toxisch für humane Hautfibroblasten.



## 4. Ergebnisse





**Abb. 4.23 A-E: Zellviabilität von Fibroblasten nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Vitamin E Derivaten und  $\alpha$ -Tocopherol nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA**

## **4.8 Effekte von Vitamin E Derivaten auf die UVA-induzierte Expression von HO-1 in Fibroblasten**

Wie bereits in den Kapiteln 1.5.2 und 4.5 beschrieben führen UV-induzierte ROS zum Anstieg von freiem Häm in Zellen. Dieses wirkt toxisch und prooxidativ auf Zellen. Daher ist ein schneller Abbau durch das Enzym Hämoxigenase (HO-1) notwendig.

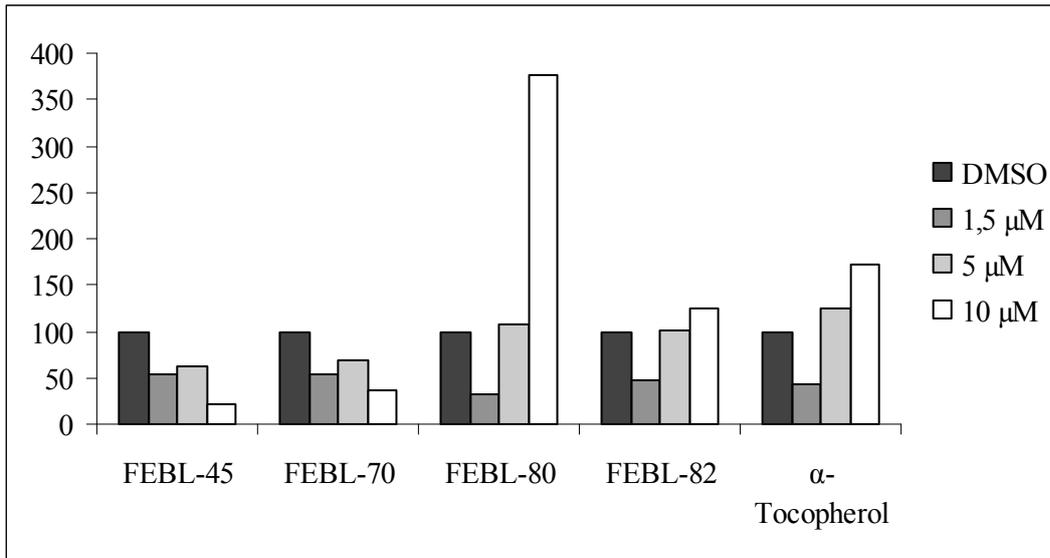
Humane dermale Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80, FEBL-82 und  $\alpha$ -Tocopherol (1,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) inkubiert (3.2) und anschließend mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt (3.3). 24 h nach der Bestrahlung wurde die Expression von HO-1 mit Hilfe der SDS-PAGE (3.2.6) und Western Blot Analyse (3.6.3) untersucht. Jeder Versuch wurde dreimal unabhängig wiederholt. Zellen, welche mit DMSO inkubiert wurden, dienten als Referenz.

In der Abbildung 4.24 sind die semiquantitativen Auswertungen der HO-1 Western Blots dargestellt. Die semiquantitative Auswertung der HO-1 Expression nach UVA-Bestrahlung in den mit Vitamin E bzw.  $\alpha$ -Tocopherol inkubierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes ImageJ. Dabei wurden nur die Banden der mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten Ansätze, sowie die zugehörigen GAPDH-Banden berücksichtigt. Die entsprechenden Banden wurden eingescannt. Anschließend wurde die Gesamthelligkeit aller Pixel in einem definierten Bereich (einer Western Blot Bande) bestimmt. Die Bandenintensität korrelierte mit der HO-1 Expression. Die Werte der mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten, mit THF inkubierten Fibroblasten dienten als Referenz und wurden auf 100 % gesetzt.

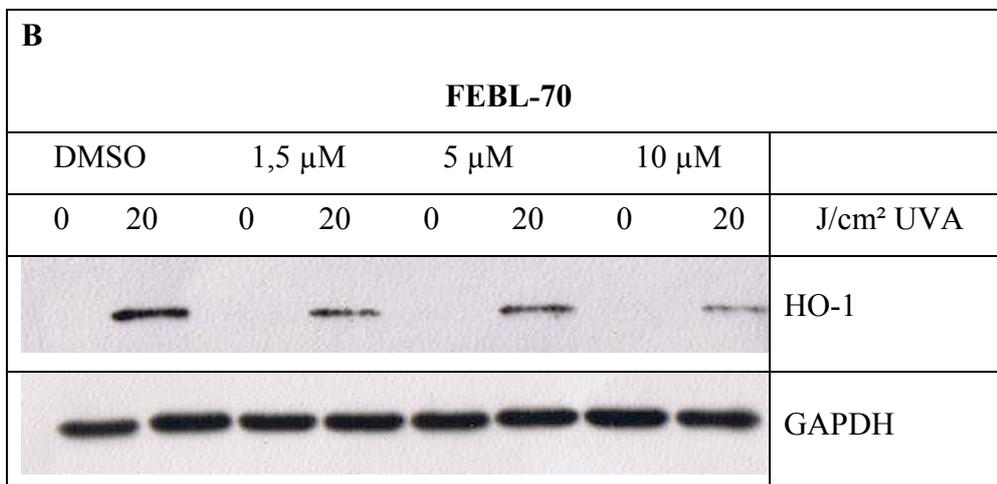
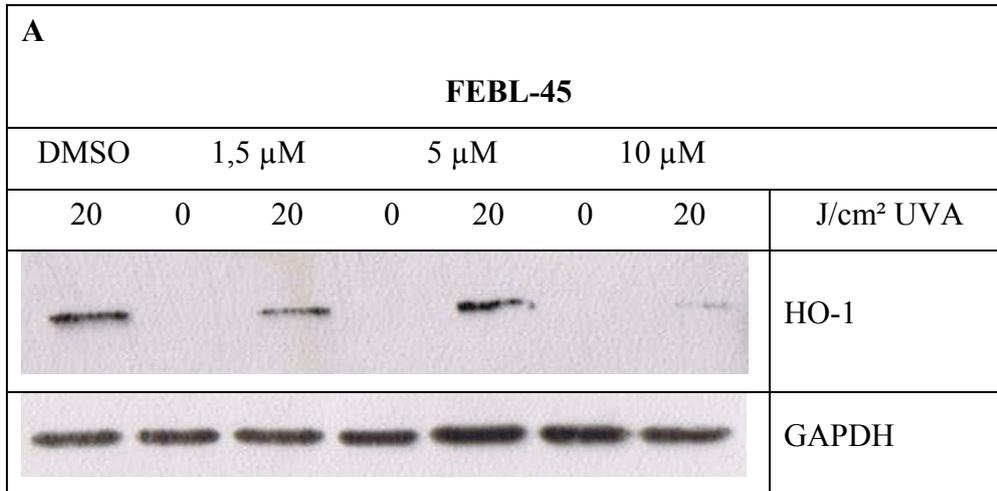
Die entsprechenden Western Blot sind in Abbildung 4.25 A-E gezeigt.

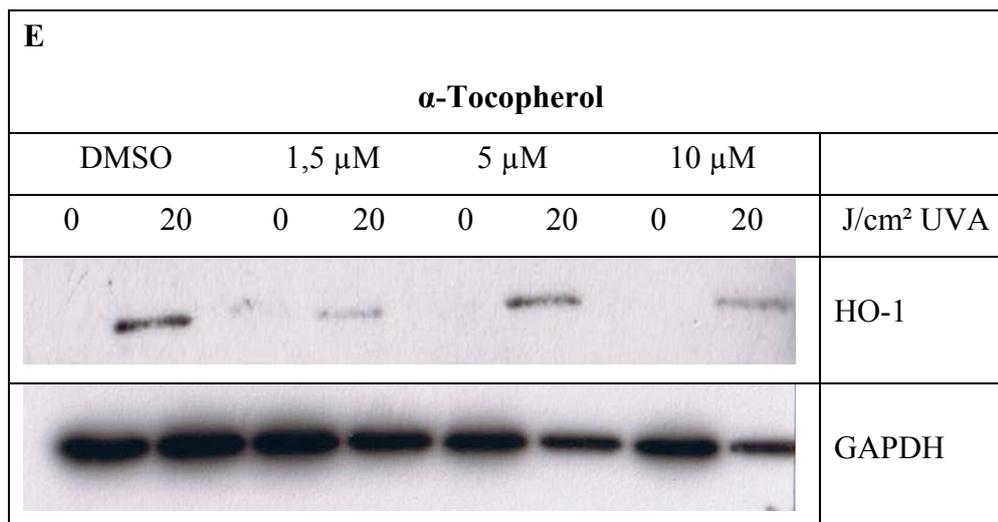
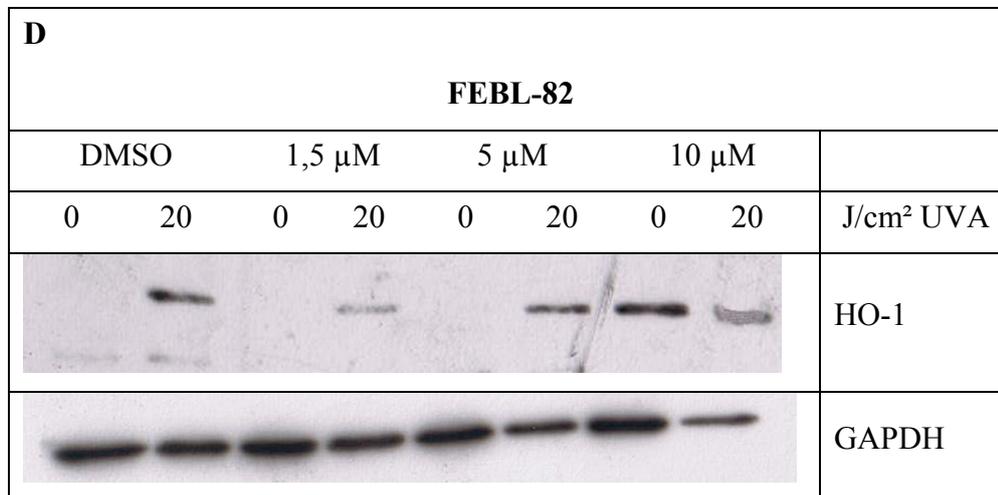
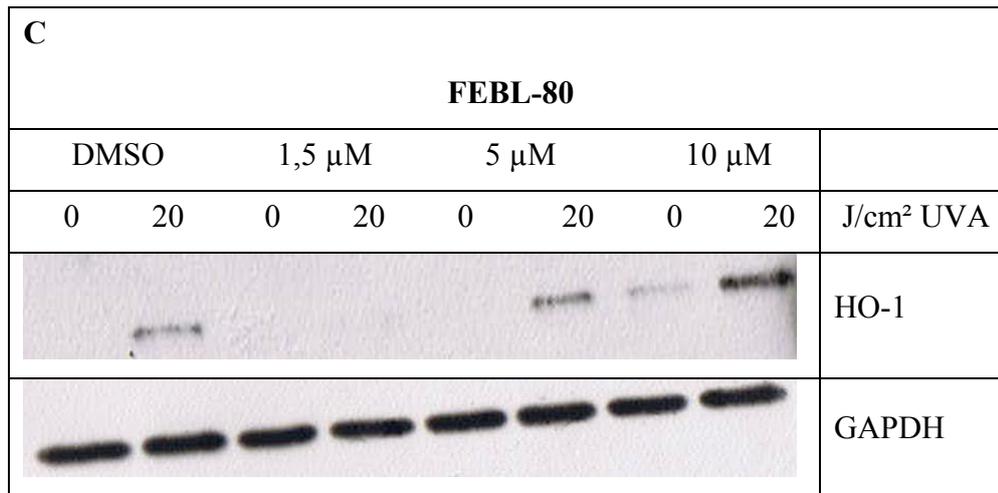
Es ist deutlich zu erkennen, dass durch Inkubation mit 1,5  $\mu$ M FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80, FEBL-82 und  $\alpha$ -Tocopherol eine signifikante Senkung der HO-1 Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach UVA-Bestrahlung erreicht wurde. So sinkt der Wert für die HO-1 Expression in allen Fällen um mindestens 50 %. Eine Inkubation mit FEBL-45 und FEBL-70 in den Konzentrationen 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M hatte ebenfalls eine stark verringerte HO-1 Expression zur Folge. Im Gegensatz dazu hatte eine Inkubation mit 5  $\mu$ M FEBL-80, FEBL-82 und  $\alpha$ -Tocopherol keinen Effekt. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M der Verbindungen FEBL-80 und FEBL-82 sowie  $\alpha$ -Tocopherol wurde eine erhöhte HO-1 Expression gemessen.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 4.24: semiquantitative Auswertung der HO-1 Expression;** Kontrolle = mit DMSO inkubierte Zellen





**Abb. 4.25 A-E: HO-1 Expression nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA in Fibroblasten welche mit Vitamin E Derivaten bzw  $\alpha$ -Tocopherol behandelt wurden; Kontrolle = mit DMSO inkubierte Zellen**

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die antioxidativen und photoprotektiven Wirkungen des natürlich vorkommenden, phenolischen Carotinoids 3,3'-Dihydroxyisorenieratin und der vier synthetisch hergestellten Vitamin E Derivate FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82 in Zellen untersucht. Als strukturähnliche Vergleichssubstanzen dienten Lutein und  $\alpha$ -Tocopherol.

### 5.1 Zellmodell

Die Haut ist das primäre Kontaktorgan des menschlichen Organismus mit UV-Strahlung. Daher eignen sich besonders dermale Zellen als Zellmodell für die Untersuchung photoprotektiver Eigenschaften von oben genannten Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Fibroblastenzelllinie CCD-1064 Sk der Firma ATCC verwendet. Fibroblasten sind der Hauptzelltyp der Dermis, welche von der kurzwelligeren, energiereichen UVB-Strahlung bis in die oberen Schichten und von der energieärmeren UVA-Strahlung vollständig durchdrungen wird. Dies ist ein wichtiger Faktor, da die vorliegenden Untersuchungen mit sowohl UVB, als auch UVA-Strahlen durchgeführt wurden.

Bei den Fibroblasten der Zelllinie CCD-1064 Sk handelt es sich um Präputiumszellen eines gesunden, eurasischen Neugeborenen. Man kann also davon ausgehen, dass sämtliche gemessene Effekte Substanz-spezifisch sind und nicht auf krankhaften Veränderungen des Zellstoffwechsels bzw. der Zellstrukturen beruhen.

### 5.2 Einfluss verwendeter UV-Dosen auf Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurden UVA Dosen von 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Dabei handelt es sich um physiologisch relevante Strahlungsdosen. An einem wolkenlosen Sommertag in der Region des 35. nördlichen Breitengrades (z.B. Gibraltar, Los Angeles)

entspricht die UVA Dosis zur Mittagszeit binnen 70 Minuten beispielsweise  $25 \text{ J/cm}^2$  (Frederick & Lubin, 1988).

Der Einfluss der UVA-Bestrahlung auf die Zellviabilität von dermalen Fibroblasten wurde mit Hilfe des SRB-„assays“ untersucht. Dabei wurde nur die Anzahl der noch lebenden Zellen ermittelt, da in einem unmittelbar an die Bestrahlung anschließenden Waschschrift abgestorbene und somit nicht mehr adherent vorliegende Fibroblasten entfernt wurden.

Wie in Kapitel 4.1.1 gezeigt sinkt die Zellviabilität der Fibroblasten mit zunehmender UVA-Bestrahlung. Die Abnahme der Viabilität ist im Fall einer Bestrahlung mit  $10$  und  $20 \text{ J/cm}^2$  UVA im Vergleich zur unbehandelten (unbestrahlten) Kontrolle statistisch signifikant. Folglich liegt die zytotoxische UVA Dosis für die verwendete Zelllinie bei  $10 \text{ J/cm}^2$ .

Die verwendeten UVB Dosen waren  $0,1 \text{ J/cm}^2$  und  $0,3 \text{ J/cm}^2$ , wobei immer mit einer Intensität von  $0,00167 \text{ J/cm}^2 \text{ sec}$  bestrahlt wurde und sich somit nur die Bestrahlungsdauer änderte. Die Intensität der UVB-Strahlung zur Mittagszeit am Äquator liegt hingegen bei  $0,00025 \text{ J/cm}^2 \text{ sec}$  (Ball, 1995). Die genutzten UVB Dosen waren somit unphysiologisch hoch. In der vorliegenden Arbeit sollten jedoch die photoprotektiven Effekte von Carotinoiden auf die Bildung von Thymindimeren nach UVB-Bestrahlung untersucht werden. Ein Vorversuch bei dem Fibroblasten ohne vorherige Inkubation mit Carotinoiden mit  $0,05 \text{ J/cm}^2$ ,  $0,1 \text{ J/cm}^2$  und  $0,3 \text{ J/cm}^2$  UVB bestrahlt wurden, zeigte, dass sich eine deutliche Akkumulation von Thymindimeren mittels Immunostaining erst bei UVB Dosen von  $0,1 \text{ J/cm}^2$  bzw.  $0,3 \text{ J/cm}^2$  nachweisen ließ. Um die Effekte von DHIR und Lutein auf die Thymindimer-Bildung eindeutig nachweisen zu können, wurden daher oben genannte UVB Dosen verwendet.

### **5.3 Wirkungen von Lutein und DHIR**

#### **5.3.1 DHIR-ein besonderes Carotinoid**

Carotinoide sind u.a natürliche Antioxidanzien. Zahlreiche Studien belegen jedoch auch eine photoprotektive Wirkung verschiedener Carotinoide im menschlichen Körper. So wurde die photoprotektive Wirkung von  $\beta$ -Carotin bereits 1972 nachgewiesen (Mathews-Roth et al., 1972). Dieses Ergebnis konnte seitdem in weiteren Studien gefestigt werden (Heinrich et al., 2003b, Stahl et al., 2003).

Auch für Lycopin wurde eine photoprotektive Wirkung festgestellt. So konnte beispielsweise nach einer 10 wöchigen Gabe von 16 mg Lycopin/ Tag eine verringerte Erythembildung gemessen werden (Stahl et al., 2002).

Des Weiteren weisen auch Lutein und Zeaxanthin, die beiden Hauptpigmente der Macula lutea des menschlichen Auges, photoprotektive Effekte auf. Je höher der Gehalt an Lutein und Zeaxanthin in der Macula, desto geringer ist das Risiko an einer altersbedingten Makuladegeneration zu erkranken (Landrum et al., 2004)

3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR) ist ein natürliches Carotinoid mit einer besonderen Struktur. Neben der klassischen polyenischen Struktur der Carotinoide besitzt es ebenfalls phenolische Strukturelemente. Da auch Polyphenole photoprotektive Effekte aufweisen, sollte DHIR aufgrund der Anwesenheit von polyenischen und phenolischen Strukturelementen als multifunktionelles Antioxidanz mit hohem photoprotektiven Potential wirken.

DHIR wurde zunächst in verschiedenen chemischen Systemen, wie z.B. dem „Cumene Hydroperoxid Inhibitions Assay“ auf seine antioxidativen Eigenschaften untersucht. In allen Systemen erwies sich DHIR als überschnittliches Antioxidanz im Vergleich zu anderen Carotinoiden wie z.B. Lutein oder Astaxanthin (Martin et al., 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse war es von Interesse die Wirkung von DHIR auch in komplexeren Systemen wie einem Zellkulturmodell aus humanen Hautfibroblasten zu untersuchen.

### **5.3.2 Einfluss von DHIR und Lutein auf Fibroblasten**

Eine wichtige Rolle spielte zunächst die Wirkung von DHIR und Lutein auf humane Fibroblasten in Abwesenheit von UV-Licht (Eigentoxizität). Mit Hilfe des SRB-„assays“ wurde untersucht, welchen Einfluss die beiden Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellviabilität haben. Da sämtlichen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen eine Inkubation mit den entsprechenden Substanzen von 24 h vorausging, wurden mögliche toxische Effekte von DHIR und Lutein auf die Zellen ebenfalls nach 24 h untersucht.

Wie in Kapitel 4.1.2 gezeigt, hat die Inkubation mit Lutein in den Konzentrationen 1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Lutein wirkt also weder toxisch noch proliferationsstimulierend auf die Zellen. Auch nach einer Inkubation mit 1,5  $\mu\text{M}$  DHIR konnten weder toxische noch proliferierende

Effekte gemessen werden. Bei den Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DHIR wurde jedoch eine Steigerung der Viabilität von 15 bzw. 20 % gemessen. Dies lässt vermuten, dass DHIR in diesen Konzentrationen eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum hat.

Da die Effekte von DHIR auf Fibroblasten bzw. in einem Zellkulturmodell in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht wurden, sind bisher keine weiteren Daten zu einer proliferierenden Wirkung der Verbindung bekannt. Es existieren jedoch Studien, welche eine gesteigerte Lymphozytenproliferation nach Inkubation mit verschiedenen Carotinoiden bzw. mit Polyphenolen aufzeigen. So zeigten Studien an Lymphozyten von verschiedenen Tieren wie z.B. Hunden (Kim et al., 2000), Mäusen (Chew et al., 1996) oder Ratten (Bendich & Shapiro, 1986), dass Carotinoide wie Astaxanthin,  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin die Rate der Proliferation erhöhen können. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Polyphenole einen biphasischen Effekt auf die Lymphozytenproliferation haben – sie hemmen das Zellwachstum bei hohen Konzentration (256  $\mu\text{g/ml}$ ) und stimulieren es z.T. bei niedrigen Konzentrationen (16  $\mu\text{g/ml}$ ) (Formica & Regelson, 1995) (die DHIR-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  entspricht einem Wert von 5,6  $\mu\text{g/ml}$ ).

Da es sich bei DHIR um ein Carotinoid mit phenolischen Endgruppen handelt, ist es möglich, dass es ebenso wie oben genannte Carotinoide bzw. wie Polyphenole auf die Zellproliferation wirkt. Der Wirkungsmechanismus ist bislang jedoch nicht geklärt.

### **5.3.3 Einfluss von DHIR und Lutein auf Fibroblasten bei Anwesenheit von UV-Licht**

Da in der vorliegenden Arbeit die photoprotektiven Eigenschaften von DHIR und Lutein untersucht werden sollten, wurde die Zellviabilität humaner Hautfibroblasten, welche mit Carotinoiden inkubiert worden waren, ebenfalls unter Einwirkung von UV-Licht analysiert. Da die Viabilität der Zellen nach UV-Bestrahlung generell abnimmt, ist eine Substanz nur dann als toxisch zu bezeichnen, wenn zusätzlich zur UV-bedingten Verringerung der Viabilität noch eine weitere, signifikante Abnahme der Zellviabilität bei Anwesenheit der Substanz zu verzeichnen ist.

Nach dieser Definition waren DHIR und Lutein in keiner Konzentration (1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) unter Einwirkung von 5  $\text{J/cm}^2$  bzw. 10  $\text{J/cm}^2$  UVA toxisch. Es wurde auch keine erhöhte Zellviabilität gemessen. Bei der höheren Dosis von 20  $\text{J/cm}^2$  UVA ließ sich bei Fibroblasten,

welche mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein inkubiert worden waren, jedoch eine statistisch signifikant verringerte Zellviabilität feststellen. Eine mögliche Ursache können prooxidative Effekte der eingesetzten Substanzen sein. Prooxidative Eigenschaften von Carotinoiden sind bereits beschrieben (Mayne et al., 1996; Wang & Russell, 1999). Dabei sind die anti- oder prooxidativen Wirkungen abhängig von der Konzentration und der chemischen Struktur der Carotinoide sowie vom Sauerstoffpartialdruck, dem Redoxstatus der Zelle und möglichen Interaktionen mit anderen redoxreaktiven Verbindungen (Palozza et al., 2004). So reagieren Carotinoide u.a. mit Lipidperoxyradikalen, welche im Verlauf der Lipidoxidation gebildet werden (Kapitel 1.4.1). Neben der in Kapitel 1.5.2 dargestellten Kettenabbruchsreaktion (antioxidativ), entstehen bei hohen Konzentrationen von Lipidperoxyradikalen alternativ auch Intermediate von denen prooxidative Reaktionswege ausgehen (Burton & Ingold, 1984). Diese sind in Abb. 5.1 dargestellt.

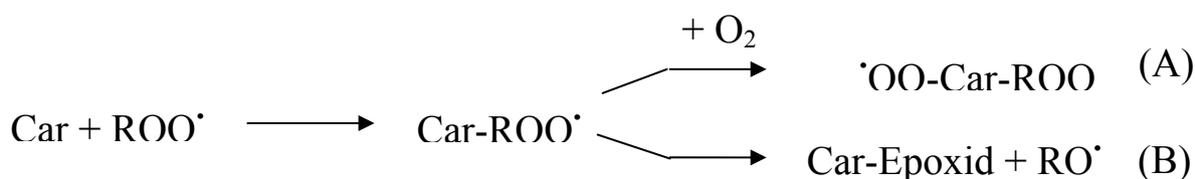


Abb. 5.1: prooxidative Reaktionswege von Carotinoiden

Zunächst entsteht nach Anlagerung des Peroxylradikals ein resonanzstabilisiertes Carotinoid-Peroxy-Addukt. Lagert sich Sauerstoff an das radikalische Addukt an, so wird ein neues Radikal gebildet (prooxidativ) (Abb 5.1 A). Alternativ ist auch eine Spaltung der Peroxygruppe des Addukts möglich, welche ein reaktives Alkoxyradikal entstehen lässt (Abb. 5.1 B). Da Alkoxyradikale reaktiver als Peroxyradikale sind, ist dieser Reaktionsweg ebenfalls als prooxidativ zu sehen (Kennedy & Liebler, 1992).

Des Weiteren könnten bei starker UV-Bestrahlung auch oxidative Spaltprodukte von DHIR und Lutein entstehen. Oxidative Spaltprodukte von Carotinoiden werden u.a. auch für prooxidative Effekte verantwortlich gemacht (Yeh & Hu, 2001).

Bei Bestrahlung mit UVB-Licht von 0,1  $\text{J}/\text{cm}^2$  bzw. 0,3  $\text{J}/\text{cm}^2$  zeigten weder DHIR noch Lutein in den verwendeten Konzentrationen einen toxischen oder proliferationsstimulierenden Effekt auf die Zellen im Vergleich zur Lösemittel-Kontrolle.

### 5.3.4 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Bildung von ROS

Die Messung von gebildeten ROS nach UVA-Bestrahlung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes H<sub>2</sub>DCF-DA. Dabei handelt es sich um einen membrangängigen Farbstoff, welcher nach Abspaltung der Acetatgruppen im Cytosol durch intrazelluläre Esterasen membranimpermeabel wird. Durch ROS wird der Farbstoff zu DCF oxidiert, welches sich bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektieren lässt. Diese Methode ist ein in der Literatur häufig beschriebenes System zur Messung von ROS in lebenden Zellen. Es können jedoch nur stabile ROS, wie z.B. Peroxide, gemessen werden, da der Farbstoff photoinstabil ist (Keller et al., 2004) und erst nach der Bestrahlung zugesetzt werden kann. Eine direkte Erfassung von ROS während der Bestrahlung ist somit nicht möglich.

Humane Fibroblasten wurden mit 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt. Die Untersuchung der ROS-Bildung erfolgte unmittelbar nach der Bestrahlung.

In Kapitel 4.2 konnte gezeigt werden, dass die Bildung von ROS in humanen Fibroblasten mit der ansteigenden Bestrahlungsdosis korreliert. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bei der ROS Bildung in Zellen, die mit THF und Lutein inkubiert worden waren, festgestellt werden. Lutein wirkte somit nicht protektiv. Im Gegensatz dazu war die ROS-Bildung bei allen drei Bestrahlungsdosen in DHIR-inkubierten Zellen statistisch signifikant geringer als die ROS-Bildung in der Lösemittel-Kontrolle (THF-inkubierte Zellen). DHIR wirkte also protektiv gegen UV-induzierte ROS-Bildung. Aufgrund seiner polyenischen und phenolischen Strukturelemente kann DHIR als multifunktionelles Antioxidanz fungieren (Martin et al., 2009). Ebenso wie das strukturell ähnliche Vergleichscarotinoid Lutein (nur die polyenische Struktur) deaktiviert DHIR freie Sauerstoffradikale aufgrund seiner Polyenkette. Dies führt im Fall von Lutein zum Verlust des konjugierten Doppelbindungssystemes und zur anschließenden Spaltung des Carotinoids. Lutein ist somit nicht mehr in der Lage weitere Sauerstoffradikale abzufangen. Im Gegensatz dazu kann DHIR zusätzliche Sauerstoffradikale aufgrund seiner phenolischen Strukturelemente deaktivieren. DHIR geht dabei in die stabile chinoide Form über.

### 5.3.5 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Freisetzung von Zink

ROS führen u.a. zu oxidativen Modifikationen von Aminosäure-Seitenketten der zellulären Proteine (Berlett & Stadtman, 1997). Besonders sensitiv gegenüber ROS-induzierter Oxidation sind die SH-Gruppen von Cystein. Schon bei geringer oxidativer Belastung kommt es zur Bildung von Disulfidbrücken (Wilcox et al., 2001).

Zink, ein essentieller Kofaktor und notwendig für die Struktur und Funktion verschiedener Proteine (Kröncke, 2007), wird häufig über so genannte Zinkfinger-Motive in Proteinen komplexiert. Zinkfinger-Proteine binden Zinkionen in der Regel über zwei Cysteine und zwei Histidine bzw. über vier Cysteine (Andreini et al., 2006). Die Modifikation der Zink-bindenden Cysteine bei oxidativer Belastung führt zur Freisetzung von Zinkionen aus entsprechenden Zinkfinger-Proteinen. Dies resultiert in einer Störung der intrazellulären Zinkhomöostase und einem Funktionsverlust der relevanten Proteine.

Der Gehalt an freiem Zink in Fibroblasten vor und nach Bestrahlung mit verschiedenen UVA Dosen konnte mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy-acetic acid (Zinquin) detektiert werden.

Zinquin ist ein membranpermeables Fluorophor, welches spezifisch freie Zinkionen bindet (Zalewski et al., 1993). Nach der Bindung von  $Zn^{2+}$  wird Zinquin zum Fluorophor und kann somit genutzt werden um eine Änderung der freien intrazellulären Zink-Konzentration festzustellen. Die Affinität von Zinquin zu freiem Zink reichte jedoch nicht aus, um Zink aus Zinkfingerstrukturen herauszulösen (Fahrni et al., 1999, Snitsarev et al., 2001). Dieses System ist eine in der Literatur bereits beschriebene Methode (Zalewski et al. 1992, Pirev et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden humane dermale Fibroblasten zunächst mit 0, 5, 10 und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt. Die Zinkfreisetzung wurde unmittelbar nach der Bestrahlung untersucht. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich bereits bei der niedrigsten UVA Dosis von 5 J/cm<sup>2</sup> eine signifikante Zinkfreisetzung messen (Kapitel 4.3). Des Weiteren wurde in Kapitel 4.3 gezeigt, dass die Zunahme an freiem Zink mit der ansteigenden Bestrahlungsdosis und somit auch mit der zunehmenden ROS-Bildung in den Fibroblasten korreliert.

In Zellen, welche mit THF (Lösemittel-Kontrolle) inkubiert worden waren, stieg der Gehalt an freiem Zink nach einer Bestrahlung mit 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> UVA um die Faktoren 2,5, 3 und 4. Bei den mit Lutein inkubierten Fibroblasten stiegen die Zinkwerte um

die Faktoren 2,2 , 2,6 und 3,5. Obwohl der Anstieg von freiem Zink in den mit Lutein inkubierten Zellen langsamer verlief als der Anstieg in den mit THF inkubierten Zellen, waren die Unterschiede zu keiner Bestrahlungsdosis statistisch signifikant. Lutein wirkte somit nicht protektiv gegen die ROS-induzierte Zinkfreisetzung. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache gestützt, dass Lutein ebenfalls kein protektiven Effekt auf die UV-induzierte ROS-Bildung hatte (Kap. 4.2). Im Gegensatz dazu zeigten die mit DHIR inkubierten Fibroblasten bei allen Bestrahlungsdosen eine statistisch signifikant geringere Zinkfreisetzung als bei der Lösemittel-Kontrolle (THF-inkubierte Zellen). Somit lag die Vermutung nahe, dass die mit DHIR erzielten Effekte auf eine photoprotektive Wirkung zurückzuführen sind, die vor photooxidativen Veränderungen an Cysteinresten in Zinkfinger-Proteinen schützt.

Um den Beweis zu erbringen, dass DHIR photoprotektiv ist, also spezifisch vor UV-abhängiger Photooxidation schützt, wurde die Zinkfreisetzung in DHIR und Lutein inkubierten Fibroblasten ebenfalls unter thermalem Stress untersucht. Dieser führt, ebenso wie UVA-Strahlung, zur Freisetzung von Zink aus Proteinen. Die Wirkung beruht allerdings nicht auf einer ROS-Zunahme (Oxidation) wie sie nach UV-Einstrahlung aufgrund photooxidativer Prozesse zu beobachten ist (Kapitel 4.4). Die Ursache für die Zinkfreisetzung in thermisch gestressten Zellen ist noch nicht geklärt. Unter den Bedingungen der Hyperthermie, auch Hitzeschock genannt, kommt es jedoch zu einer Akkumulation von denaturierten Proteinen (Hightower, 1991). Durch den Verlust der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Proteine kommt es unter Umständen auch zur Auflösung der koordinativen Bindungen, über welche Cysteine Zink komplexieren, was zu einer Zinkfreisetzung aus entsprechenden Proteinen führt.

Thermaler Stress wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine 30 minütige Inkubation bei 43°C ausgelöst. Unter natürlichen Bedingungen kommt der sogenannte Hitzeschock im menschlichen Körper im Fall von Fieber vor (Hasday & Singh, 2000). In der Situation zellulären Stresses werden sogenannte Hitzeschockproteine vermehrt exprimiert, welche weitere Proteine stabilisieren und diese vor Denaturierung schützen (Javid, 2007). Bei einer akuten Fieberreaktion steigt die Temperatur des menschlichen Körpers bis zu 41°C, jedoch fast nie auf Werte die darüber hinaus gehen (Precht et al., 1955). Dennoch wird thermischer Stress zu Versuchszwecken häufig bei 43°C ausgelöst.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von freiem zellulärem Zink direkt im Anschluss an den Hitzeschock gemessen. Thermische Belastung führte in den mit THF-inkubierten Zellen (Lösemittel-Kontrolle) zu einem Anstieg von freiem Zink um den Faktor 2 im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle (Kapitel 4.4). Ein vergleichbarer Effekt wurde

sowohl in den mit Lutein, als auch in den mit DHIR-inkubierten Fibroblasten gemessen. Weder Lutein noch DHIR wirkten also protektiv gegen die Hitzeschock-induzierte Zinkfreisetzung. Dieses Ergebnis festigt die Annahme, dass DHIR photoprotektiv wirkt, d.h. Folgereaktionen wie eine Zinkfreisetzung aus Zinkfinger-Proteinen durch UV-induzierte ROS werden durch die antioxidativen Eigenschaften von DHIR unterbunden. DHIR hat jedoch keinen Einfluss auf ROS-unabhängige Reaktionen innerhalb von Zellen.

### **5.3.6 Zusammenhänge**

DHIR wirkte in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  bei allen verwendeten Bestrahlungsdosen protektiv gegen UV-induzierte ROS und gegen ROS-induzierte Zinkfreisetzung (siehe Kap 5.3.4 und 5.3.5). Dennoch zeigen Fibroblasten, welche mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR inkubiert wurden, bei einer Bestrahlungsdosis von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA eine signifikant verringerte Zellviabilität. Dieses Ergebnis lässt sich durch die unterschiedlichen Versuchszeitpunkte begründen. Sowohl die Messung der stabilen reaktiven Sauerstoffspezies mit  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , als auch die Untersuchung der Zinkfreisetzung mit Zinquin wurde unmittelbar nach der Bestrahlung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wirkte DHIR antioxidativ. Im Gegensatz dazu wurde die Zellviabilität 24 h nach der Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA gemessen. Im Verlauf der 24 h veränderte sich der Redoxstatus der Zellen stetig. So entstanden vermutlich beim Prozess der Lipidoxidation Lipidperoxyradikale, welche in sehr hohen Konzentrationen nicht mehr von DHIR deaktiviert werden, sondern mit dem Carotinoid nach dem in Abb. 5.1 dargestellten Reaktionschema zu prooxidativen Intermediaten reagieren. Auf diese Weise nimmt die oxidative Belastung der Fibroblasten zu, dass es zur Verringerung der Zellviabilität kommt.

### **5.3.7 Einfluss von DHIR und Lutein auf die HO-1 Expression**

Das Enzym HO-1, welches zum indirekten enzymatischen Schutzsystem des Menschen gehört (Kap. 1.5.2), wird unter Bedingungen des oxidativen Stresses hochreguliert (Tyrell & Reeve, 2006). Die Messung einer erhöhten HO-1 Expression nach UVA-Bestrahlung mittels Western Blot Analyse gilt als allgemein akzeptierter Marker für oxidative Belastung (Trekli et al., 2003). Eine Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA induzierte eine deutlich erhöhte HO-1

Expression in der verwendeten Zelllinie. 24 h nach der Bestrahlung war die höchste Proteinmenge feststellbar. Dies weist darauf hin, dass die Expression des Proteins zeitversetzt zur Bestrahlung eintritt (Trekli et al., 2003).

Eine Inkubation mit DHIR (1,5  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer statistisch signifikanten Senkung der HO-1 Expression im Vergleich zur bestrahlten THF-Kontrolle. Eine Inkubation mit Lutein (1,5  $\mu\text{M}$ ) hatte keinen Effekt auf HO-1 Expression. DHIR wirkte somit protektiv gegen den UV-induzierten Anstieg der HO-1 Expression. Ursachen der photoprotektiven Wirkung von DHIR sind in Kapitel 5.3.3 beschrieben.

Der Einfluss einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR bzw. Lutein auf die Expression von HO-1 konnte nicht untersucht werden. Aufgrund der verringerten Zellviabilität von Fibroblasten nach entsprechender Inkubation und Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA (siehe Kapitel 5.3.3) wurde keine ausreichende Proteinmenge für eine Western Blot Analyse erhalten.

### **5.3.8 Einfluss von DHIR und Lutein auf die Bildung von Thymindimeren**

UVB Strahlen können direkt mit der DNA interagieren. Dabei entstehen hauptsächlich Thymindimere (Pfeifer et al., 2005). Die Bildung von Thymindimeren in humanen Fibroblasten nach UVB-Bestrahlung wurde mittels spezifischer Antikörper im Verlauf von „Immunostaining“-Versuchen am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Bildung von Thymindimeren korreliert mit der Bestrahlungsdosis, wobei erst bei UVB Dosen von 0,1  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 0,3  $\text{J}/\text{cm}^2$  ein deutlicher Anstieg der Thymindimer-Bildung sichtbar wurde (siehe Kapitel 5.2). Eine Inkubation mit Lutein hatte keinen Einfluss auf die Bildung von Thymindimeren im Vergleich zur Lösemittel-Kontrolle. Lutein wirkte somit nicht protektiv. Im Gegensatz dazu zeigten die mit DHIR inkubierten Fibroblasten eine statistisch signifikante Verringerung der Thymindimer-Bildung. DHIR wirkte somit protektiv gegen die UVB-induzierte Bildung von Thymindimeren. Diesem Effekt können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Da die Bildung von Thymindimeren eine photochemische Reaktion von DNA Basen mit UVB Licht ist und diese Reaktion nicht einer Photooxidation durch ROS zugeordnet werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass UVB-absorbierende Eigenschaften von DHIR verantwortlich für den oben genannten Effekt sind (Martin et al., 2009).

Des Weiteren können durch UVB-Strahlung auch ROS generiert werden (DiDomenico et al., 2009). Diese können wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben Proteine oxidieren, u.a. auch die

Proteine welche an der Excisionsreparatur von Thymindimeren beteiligt sind (Kapitel 1.5.3). Werden diese Proteine oxidativ modifiziert kommt es zu einem Funktionsverlust der entsprechenden Proteine und die Excisionsreparatur der DNA ist nicht mehr gewährleistet. Es kommt zu einer Akkumulation von Thymindimeren nach UVB Bestrahlung.

Die Untersuchung der Thymindimer-Bildung wurde 24 h nach UVB-Bestrahlung durchgeführt. DHIR wirkte photoprotektiv gegen UV-induzierte ROS (Kapitel 5.3.3) und war somit in der Lage auch Proteine der Excisionsreparatur vor Photooxidation zu schützen. Innerhalb der 24 h Postinkubation nach UVB-Bestrahlung war es also möglich, dass die Thymindimere in DHIR-inkubierten Fibroblasten in wesentlich größerem Maße entfernt wurden, als die Thymindimere in den mit THF bzw. Lutein inkubierten Zellen.

Es besteht also die Möglichkeit, dass durch UVB-absorbierende Eigenschaften von DHIR weniger Thymindimere in einer Photoreaktion entstehen und dass DHIR das zelluläre Reparatursystem vor Photooxidation schützt und somit zu einer effizienten Reparatur der DNA-Schäden beiträgt.

### **5.4 Einfluss von Vitamin E und synthetischen Vitamin E Derivaten auf Fibroblasten**

Die Zellviabilität humaner Hautfibroblasten nach Inkubation mit den 4 synthetisch hergestellten Vitamin E Derivaten und  $\alpha$ -Tocopherol wurde mit dem SRB-„assay“ untersucht. Keine Konzentration der verwendeten Substanzen hatte bei Abwesenheit von UV-Licht nach 24 h einen toxischen oder proliferierenden Effekt auf die Zellen. FEBL-45, FEBL-70, FEBL-80 und FEBL-82 waren somit für in vitro Experimente zur Charakterisierung ihrer antioxidativen Eigenschaften im verwendeten Zellkulturmodell geeignet.

Nach Bestrahlung mit 20 J/cm<sup>2</sup> UVA zeigten alle Substanzen in der Konzentration 1,5  $\mu$ M eine erhöhte Zellviabilität im Vergleich zur THF-Kontrolle. Dies deutet auf eine photoprotektive Wirkung der Verbindungen in der entsprechenden Konzentration hin. Dieser Effekt wurde auch durch die Ergebnisse der HO-1 Western Blot Analyse gestützt. So zeigten Fibroblasten, welche mit 1,5  $\mu$ M eines synthetischen Vitamin E Derivates oder  $\alpha$ -Tocopherol inkubiert worden waren, eine verringerte Expression der HO-1. Im Gegensatz dazu zeigten FEBL-80, FEBL-82 und  $\alpha$ -Tocopherol in der Konzentration 5  $\mu$ M keine Effekte auf die

Zellviabilität bzw. die Expression der HO-1. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  waren FEBL-80 und FEBL-82 in Kombination mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA toxisch für die Zellen. Es konnte ebenfalls unter Einfluss der beiden Verbindungen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine gesteigerte HO-1 Expression nach Bestrahlung mit 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA gemessen werden. Diese Ergebnisse können durch evtl. prooxidative Effekte der entsprechenden Derivate erklärt werden.

Wie bereits in Kapitel 5.3.1 beschrieben ist auch die Konzentration eines Antioxidanz ausschlaggebend für anti- oder prooxidative Folgereaktionen. So wirkt beispielsweise  $\beta$ -Carotin in hohen Dosen prooxidativ (Wang & Russell, 1999). Auch  $\alpha$ -Tocopherol wirkt in hohen Dosen prooxidativ (Ohm et al., 2005). Es ist somit möglich, dass alle verwendeten Verbindungen bei einer niedrigen Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  antioxidativ wirken. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  liegen bei allen Verbindungen anti- und prooxidativen Eigenschaften vor, ebenso wie bei FEBL-45, FEBL-70 und  $\alpha$ -Tocopherol bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu wirken FEBL-80 und FEBL-82 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  überwiegend prooxidativ. Diese Verbindungen weisen eine verkürzte Seitenkette auf. 2007 zeigte G.V. Petrova in ihrer Veröffentlichung, dass  $\alpha$ -Tocopherol mit einer stark verkürzten Seitenkette verstärkt prooxidativ wirkt. Dies könnte auch auf die Vitamin E Derivate FEBL-80 und FEBL-82 zutreffen.

### 6. Zusammenfassung

Die menschliche Haut ist neben dem Auge das einzige lichtexponierte Organ. Ohne ausreichenden Schutz, u.a. durch körpereigene Substanzen oder durch die topische Anwendung von Sonnenschutzmitteln, führt übermäßige Sonnenstrahlung, insbesondere Exposition gegenüber energiereicher UV-Strahlung, zu Schädigungen der Haut. Dabei handelt es sich um direkte entstehende Schäden, bei denen UV-Strahlen unmittelbar mit biologisch relevanten Molekülen interagieren (z.B. der DNA), oder um indirekte Schäden, welche über sekundäre, UV-induzierte Reaktionsprodukte vermittelt werden (z.B. Photooxidation). Zu den sekundären Intermediaten zählen die reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), sowohl freie Radikale wie Superoxidradikalanionen, Peroxylradikale und Hydroxylradikale, als auch nichtradikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid. Als photooxidativer Stress wird ein Ungleichgewicht bezeichnet bei dem lichtinduzierte oxidative Schäden nicht vollständig von den Schutzsystemen verhindert werden und in dessen Verlauf ROS zelluläre Strukturen wie DNA, Proteine und Lipide oxidieren. Photooxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Hautkreberkrankungen, bei vorzeitiger Hautalterung, Veränderung des cutanen Immunsystems und bei der Entwicklung von Photodermatosen. Antioxidative Mikronährstoffe wie die Vitamine E und C sowie die Substanzgruppe der Carotinoide werden zur endogenen Photoprotektion beim Menschen eingesetzt. Als orale Sonnenschutzmittel tragen sie zur antioxidativen Verteidigung bei.

DHIR ist ein phenolisches Carotinoid und kommt u.a. im *Brevibacterium linens* vor, welches in der Nahrungsmittelindustrie Verwendung findet. In der vorliegenden Arbeit wurden die UV-protaktiven Eigenschaften von DHIR in Zellkulturexperimenten an humanen Hautfibroblasten im Vergleich zu Lutein untersucht. Keine der Verbindungen war mit oder ohne UV-Bestrahlung zelltoxisch (Sulforhodamin B Test). Als zelluläre Antwort auf UV-Bestrahlung wurde die Expression des Enzyms Hämooxygenase 1 (HO-1) anhand der Proteinmenge mittels Western Blot untersucht. Nach UV-A induzierter Photooxidation ist die Expression der HO-1 erhöht. Im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle (20 J/cm<sup>2</sup>) war die Expression von HO-1 um 30 % geringer, wenn die Zellen über 24 h vor Bestrahlung mit 1,5 µM DHIR behandelt wurden. Bei gleicher Vorbehandlung mit Lutein wurden keine Effekte beobachtet. DHIR verhindert die Freisetzung von Zn-Ionen aus Proteinkomplexen, was auf einen Schutz der Thiolliganden vor Oxidation zurückgeführt wird. Die Bildung von

Cyclobutanpyrimidindimeren ist eine Hauptschädigung der DNA nach UV-B Exposition. In den Fibroblasten konnten nach Bestrahlung mit UV-B (300 mJ/cm<sup>2</sup>) Thymidindimere mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Waren die Zellen 24 h mit DHIR vorbehandelt bilden sich weniger Thymidindimere. Lutein hatte keinen Effekt. Da die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren eine photochemische Reaktion der DNA Basen ist und nicht mit photooxidativen Prozessen zusammenhängt sind hier wahrscheinlich UV-B absorbierende Eigenschaften für den Schutzeffekt verantwortlich.

Das natürliche Carotinoid DHIR verfügt über außergewöhnliche antioxidative und photoprotektive Eigenschaften. Ursache dafür ist die besondere Struktur des Carotinoids, welches aufgrund polyenischer und phenolischer Strukturelemente als bifunktionaler Radikalfänger wirken kann und gleichzeitig UV-Licht absorbiert.

In der Arbeit untersuchte synthetische Vitamin E Derivate erwiesen sich ebenfalls als photoprotektiv, was mit einer Verringerung der HO-1 Expression nach UVA-Bestrahlung belegt wurde. Keine der Substanzen war aber dem natürliche Vitamer in der Wirkung überlegen.

### 6.1 Summary

Beside of the eye, skin is the only light-exposed tissue of the human organism. Without an adequate defence, for example by substances produced naturally in the body or topical application of sunscreens, excessive light exposure, especially exposition to high-energy UV-light, leads to skin damage. This includes direct damage, where UV-radiation interacts directly with biologically relevant molecules (e.g. DNA), and indirect damage, mediated by secondary, UV-induced reaction products (photooxidation). Secondary intermediates include reactive oxygen species (ROS) such as peroxy radicals and hydroxyl radicals as well as non-radical compounds like singlet oxygen and hydrogen peroxide. Photooxidative stress is characterized by an imbalanced redox state where light-induced oxidative damage is insufficiently counteracted by antioxidant defence systems and ROS oxidize cellular structures such as DNA, lipids or proteins. Such damaging reactions are involved in the pathobiochemistry of erythema formation, premature aging of the skin, development of photodermatoses and skin cancer. Dietary antioxidants like vitamins E and C as well as

carotenoids protect against UV-mediated skin damage. Human studies provide evidence that they are conducive as “oral sunscreens” to the antioxidative defence. DHIR is a phenolic carotenoid present in *Brevibacterium linens*, which is used in dairy industry. In the present work the UV-protective effects of DHIR were investigated in human fibroblasts in comparison to the structurally related lutein. None of the compounds was cell toxic with and without UV-irradiation (sulforhodamine B assay). As a cellular response to UV-radiation the expression of the enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) was investigated by Western blot analysis on the basis of the protein amount. In comparison to the irradiated control (20 J/cm<sup>2</sup>), cells treated with 1,5 µM DHIR for 24 h had a 30 % lowered expression of HO-1. Expression of the enzyme was not affected in cells treated with lutein. DHIR also impeded the release of Zinc-ions from protein complexes, an effect which has been ascribed to a protection of thiol ligands against oxidation. The formation of cyclobutane pyrimidine dimers is a major mechanism of DNA damage in tissues exposed to UVB light. When human dermal fibroblasts were exposed to UVB light (0,1 J/cm<sup>2</sup> and 0,3 J/cm<sup>2</sup>) thymidine dimers were formed and were visualized with specific antibodies. Upon preincubation of cells for 24 h with DHIR less dimer formation was observed than in the solvent control. However, lutein was not effective. Since the generation of cyclobutane pyrimidine dimers is a photochemical reaction of DNA bases and not related to photooxidation it is likely that UVB absorbing properties of DHIR are responsible for the effect.

In the present work synthetic vitamin E derivatives were also investigated for photoprotection determined by changes in HO-1 expression after UVA-irradiation. All compounds included in the study were active but none of them was superior to the natural vitamin E.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volume / volume (Volumenprozent)
(w/v)	Weight / volume (Gewichtsprozent)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Antioxidant response element
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid
DCF	Dichlorofluorescein
DCF-DA	Dichlorofluorescein-diacetat
DHIR	Dihydroxyisorenieratin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HO	Hämoxigenase
HRP	Horseradish-Peroxidase
KEAP	Kelch-like Elch associated protein
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Maf	Small musculoaponeurotic fibrosarcoma
mM	mMol/L
MW	Mittelwert
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Nrf-2	NF-E2-related factor

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

PBS	Phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
rfu	Relative fluorescence units
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin B
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS buffered saline (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS + Tween 20
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Trihydroxymethylammoniummethan
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient

## 8. Literaturverzeichnis

**Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. (2006).** Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* **5**, 196-201

**Arcamone, F., Camerino, B., Cotta, E., Francesc, G., Grein, A., Penco, S. & Spalla, C. (1969).** New carotenoids drom *Streptomyces mediolani* n. sp. *Experientia* **25**, 241-244

**Ball, J. (1995).** A comparison of the UV-B irradiance of low-intensity, full spectrum lamps with natural sunlight. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society* **30**, 69-71

**Balla, J., Vercellotti, G.M., Nath, K., Yachie, A., Nagy, E., Eaton, J.W. & Balla G. (2003).** Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant.* **18**, 8-12

**Bendich, A. & Shapiro, S.S. (1986).** Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. *J. Nutr.* **116**, 2254-2262

**Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. (1997).** Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316

**Biesalski, H.K., Fürst, P., Kluthe, H.K.R., Pölerl, W., Puchstein, C. & Stähelin, H.B. (1995).** Ernährungsmedizin. *Georg Thieme Verlag; Stuttgart*

**Biesalski, H.K., Köhrle, J. & Schürmann, K. (2002).** Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. *Georg Thieme Verlag; Stuttgart/New York*, 41-49

**Black, H.S. & Chan, J.T. (1977).** Experimental ultraviolet light carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* **26**, 183-189

**Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

- Britton, G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 1551-1558
- Burton, G.W. & Ingold, K.U. (1984).**  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569-573
- Chew, B.P., Wong, M.W. & Wong, T.S. (1996).** Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res.* 16, 3689-3694
- Dalle-Carbonare, M. & Panthak, M.A. (1992).** Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J. Photochem. Photobiol.* 14, 105-124
- Decraene, D., Agostimis, P. Pupe, A., de Haes, P., Garmyn, M. & Giacomoni, P.U. (2001).** Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *J.Photochem. Photobiol.* 63, 78-83
- DiDomenico, F., Perluigi, M., Foppoli, C., Blarzino, C., Coccia, R., DeMarco, F., Butterfield, D.A. & Cini, C. (2009).** Protective effect of ferulic acid ethyl ester against oxidative stress mediated by UVB irradiation in human epidermal melanocytes. *Free Radic. Res.* 43, 365-375
- Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G. & Rabl, H. (1991).** Effect of antioxidants on oxidative modifications of LDL. *Ann. Med.* 23, 573-581
- Fitzpatrick, T.B., Johnson, R.A., Wolff, K., Polano, M.K. & Suurmond, D. (1997).** Color atlas and synopsis of clinical dermatology, common and serious diseases. Mc Graw-Hill, USA 1997, third edition
- Foote, C.S. (1991).** Definition of Type I and II photosensitized oxidation. *J. Photochem. Photobiol.* 54, 659
- Formica, J.V. & Regelson, W. (1995).** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *FD. Chem. Toxic.* 33, 1061-1080

**Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gostola, D. & Wasielewski, M.R. (1994).** Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res* **41**, 389-395

**Frederick, J.E. & Lubin, D. (1988).** Possible long-term changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the ground. *Photobiol* **47**, 571-578

**Giese, A.C. (1976).** Living with our sun's ultraviolet rays. *Plenum press, New York*

**Gollnick, K. (1968).** Type II photooxidation reactions in solution. *Adv. Photochem.* **6**, 1-122

**Gollnick, P.M., Hopfenmüller, W., Hemmes, C., Chun, S.C., Sundermeier, K. & Biesalski, H.K. (1996).** Systemic  $\beta$ -carotene plus topical sunscreen are an optimal protection against harmful effects of natural UV-sunlight: results of the Berlin-Eilath study. *Eur. J. Dermatol.* **6**, 200-205

**Grether-Beck, S., Buettner, R. & Krutmann, J. (1997).** Ultraviolet A radiation-induced expression of human gene: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.* **378**, 1231-1236

**Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1989).** Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford University Press, New York*, 2<sup>nd</sup> edition

**Halliwell, B. (1990).** How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **9**, 1-32

**Hasday, J. D. & Singh, I. S. (2000).** Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes *Cell Stress Chaperones* **5**, 471-480

**Heinrich, U., Gärtner, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H. & Stahl, W. (2003).** Supplementation with  $\beta$ -carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects human skin from UV-induced erythema. *J Nutr.* **133**, 98-101

**Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998).** The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479

**Hightower, L.E. (1991).** Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* **66**, 191-197

**Ingold, K.U., Webb, A.C., Witter, D., Burton, G.W., Metcalfe, T.A. & Muller, D.P. (1987).** Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 224-225

**Keller, A., Mohamed, A., Dröse, S., Brandt, U., Fleming, I. & Brandes, R.P. (2004).** Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* **38**, 1257-1267

**Kennedy, T.A. & Liebler, D.C. (1992).** Peroxyl radical scavenging by  $\beta$ -carotene in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **267**, 4658-4663

**Keyse, S.M. & Tyrell, R.M. (1987).** Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* **262 (30)**, 14821-14825

**Kim, H.W., Chew, B.P., Wong, T.S., Park, J.S., Weng, B.B.C., Byrne, K.M., Hayek, M.G. & Reinhart, G.A. (2000).** Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**, 315-327

**Kretzel, A. & Maret, W. (2006).** Zinc-buffering capacity of an eukaryotic cell at physiological pZN. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 1049-1062

**Kröncke, K-D. (2007).** Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch Biochem Biophys.* **463 (2)**, 183-187

**Landrum, J.T. & Bone, R.A., (2004).** Mechanistic evidence for eye diseases and carotenoids. In carotenoids in health and disease, Marcel Dekker Verlag New York, Basel, S. 445-472

**Lee, J., Jiang, S., Levine, N. & Watson, R.R. (2000).** Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after stimulated radiation exposure. *Proc. Soc. Exp. Med.* **223**, 170-174

**Lindsay, D.G. & Astley, S.B. (2000).** European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol. Asp. Med.* **23**, 1-38

**Lodge, J.K. (2005).** Vitamin E bioavailability in humans. *J. Plant. Physiol.* **162**, 790-796

**Martin, H.D., Kock, S., Scherrers, R., Lutter, K., Wagener, T., Hundsdörfer, C., Frixel, S., Schaper, K., Ernst, H., Schrader, W., Görner, H. & Stahl, W. (2009).** 3,3'-Dihydroxyisorenieratine, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 400-403

**Masini, V., Noel-Hudson, M.S. & Wepierre, J. (1994).** Free radical damage by UV or hypoxanthine-xanthine oxidase in cultured human skin fibroblasts: protective effect of two human plasma fractions. *Toxicol. In vitro* **8**, 235

**Mathews-Roth, M.M., Panthak, M.A., Parrish, J., Fitzpatrick, T.B., Kass E.H., Toda, K. & Clemens, W.A. (1972).** Clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J. Invest. Dermatol.* **59**, 349-353

**Mayne, S.T. (1995).** Beta-carotene; carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J* 690-701

**Morliere, P., Moysan, A., Santus, R., Hüppe, G., Maziere, J-C. & Duberter, L. (1991).** UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* **1084**, 261-268

**Ohm, V.A., Stöckmann, H. & Schwarz, K. (2005).** The more- the better? Estimating the inhibitory activity of alpha-tocopherol towards lipid oxidation. *J. Plant Physiol.* **162**, 785-789

**Palozza, P., Krinsky, N. (Hrsg), Mayne, S. (Hrsg) & Sies, H. (Hrsg) (2004).** Carotenoids in health and disease. Carotenoid antioxidant activity in carotenoids in health and disease. Marcel Dekker Verlag, New York, S. 127 ff.

**Pelz, R., Schmidt-Faber, B. & Heseke, H. (1998).** *Zeitschr. Ernährungswissenschaften* **37**, 319-326

**Peng, Y.M., Peng, Y.S. & Lin, Y. (1993).** A nonsaponification method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in solid human tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2**, 139-144

**Petrova, G.V. (2007).** Membranotopic and pro-oxidative effects of alpha-tocopherol short-chain derivatives. *Ukr Biokhim Zh.* **79**, 39-45

**Pfeifer, G.P., You, Y.H. & Besaratina A. (2005).** Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* **571 (1-2)**, 19-31

**Piette, J. (1991).** Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol.* **11**, 241-260

**Pirev, E., Calles, C., Schroeder, P, Sies, H. & Kröncke, K.D. (2008).** Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 86-91

**Precht, H., Christophersen, J. & Hensel, H. (1955).** Temperatur und Leben. Springer Verlag 1955

**Proksch, E., Brandner, J.M. & Jensen, J.M. (2008).** The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**, 1063-1072

**Punnonen, K., Lehtola, K., Autio, P., Kiistala, U. & Ahotupa, M. (1995).** Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B* **30**, 43-48

**Rosenstein, B.S., Ducore, J.M. & Cummings, S.W. (1983).** The mechanism of bilirubin photosensitized DNA strand breakage in human cells exposed to phototherapy light. *Mutat. Res.* **112**, 397-406

**Ryter, S., Kvam, E. & Tyrell, R.M. (1999).** Heme oxygenase activity determination by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* **300**, 322-336

**Ryter, S.W. & Tyrell, R.M. (2000).** The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidative properties. **28**, 289-309

**Schneider, C. (2005).** Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 7-30

**Siefermann-Harms, D. (1987).** The light harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol Plant* **69**, 561-568

**Sies, H. & Menck, C.F.M. (1992).** Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Res.* **275**, 367-375

**Sies, H. (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91** (3C), 31-38

**Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M.R. (1990).** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112

**Stahl, W. & Krutmann, J. (2006).** Systemic photoprotection through carotenoids. *Hautarzt* **57**, 281-285.

**Stahl, W. & Sies, H. (2002).** Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.* **15**, 291-296

**Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H. & Tronnier, H. (2000).** Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J. Clin. Nutr.* **71**, 795-798

**Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., von Laar, J., Schietzel, M., Sies, H. & Tronnier, H. (1998).** Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectroscopy correlate with serum levels in women ingesting Betatene. *J. Nutr.* **128 (5)**, 903-907

**Stahl, W., Sundquist, A.R., Hanusch, M., Schwarz, W. & Sies, H. (1993).** Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. *Clin. Chem.* **39 (5)**, 810-814

**Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. & Ames, B.N. (1987).** Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **27**, 1043-1046

**Sutherland, B.M., Harber, L.C. & Kochevar, I.E. (1980).** Pyrimidine dimer formation and repair in human skin. *Cancer Research* **40**, 3181-3185

**Thiele, J.J., Schroeter, C., Hsieh, S.N., Podda, M. & Packer, L. (2001).** The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr. Probl. Dermatol.* **29**, 26-42

**Trekli, M.C., Riss, G., Goralczyk, R. & Tyrell, R.M. (2003).** Beta-carotene suppresses UVA-induced HO-1 Gene Expression in cultured FEK4. *Free Radic. Med.* **34**, 456-464

**Tyrell, R.M. (2004).** Solar ultraviolet A radiation. An oxidizing skin carcinogen that activates heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* **6 (5)**, 835-840

**Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44-84

**Vam, E. & Tyrell, R.M. (1997).** Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* **18**, 2379-2384

**Wagener, J.R., Motchnik, P.A., Stocker, R., Sies, H. & Ames, B.N. (1993).** The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **268**, 18502-18506

**Wang, X.D. & Russell, R.M. (1999).** Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr. Rev.* **57**, 263-272

**Wilcox, D.E., Schenk, A.D., Feldmann, B.M. & Xu, Y. (2001).** Oxidation of zinc-binding cysteine residues in transcription factor preteins. *Antioxid. Redox Signal.* **3**, 549-564

**Yamaguchi M. (1957).** On Carotenoids of a Sponge „*Reniera japonica*“ . *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **30**, 111-114

**Zalewski, P.D., Forbes, I.J. & Betts, W.H. (1993).** Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using Zinquin (2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy acetic acid) a new specific fluorescent probe for ZN(II). *J. Biochem.* **296**, 403-408

**Zhang, D.D. (2006).** Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway 1. *Drug. Metab. Rev.***38**, 769-789

## 9. Danksagung

Eine Promotionsarbeit benötigt, damit sie gelingen kann,

- Ein niveauvolles und gutes Arbeitsklima
- Einen fördernden und fordernden Professor
- Unterstützende und verständnisvolle Kollegen und Mitstreiter

Da dies nicht selbstverständlich ist, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Stahl für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, welches mich herausgefordert hat, seine ständige Bereitschaft zum Dialog und die Stärkung meiner Motivation, bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Für ihre Geduld meine Fragen zu beantworten, praktische Tipps zu geben, Mut zu machen und die Ergebnisse meiner Forschung zu reflektieren, sowie für die zahlreichen interessanten und lustigen Aktivitäten und Gespräche, welche nicht immer nur naturwissenschaftliche Inhalte hatten, bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere bei Tatjana Brossette, Silke DeSpirt, Peter Graf, Claas Hundsdörfer, Heide Krahl und Tanja Wagener.

Ich hatte eine tolle Zeit mit Euch allen und habe mich sehr wohl gefühlt.

Ein liebevoller Dank gilt meinen Mann Sven, der mich immer unterstützt hat und der immer für mich da ist.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mein Leben lang immer für mich da waren und durch deren Unterstützung und Liebe es mir möglich wurde, heute meine Promotionsarbeit fertig zu stellen.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht (Veröffentlichungen nach §4 (3) der Promotionsordnung bleiben hiervon ausgenommen).

Düsseldorf, den .....

.....

Kaya Lutter