

Untersuchungen zur photoprotektiven
Wirkung von Carotinoiden in
Modellsystemen und dermalen
Fibroblasten

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Tanja Wagener

aus Mülheim an der Ruhr, NRW

Düsseldorf 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. R. Weinkauff

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2009

meinen Eltern

Im Rahmen dieser Dissertation entstandene Veröffentlichungen:

Peterson, L. A.; Wagener, T.; Sies, H.; Stahl, W. (2007): Decomposition of S-nitrosocysteine via S- to N-transnitrosation. *Chem. Res. Toxicol.*, **20** (5), S. 721–723.

Martin, H.-D.; Kock, S.; Scherrers, R.; Lutter, K.; Wagener, T.; Hundsdörfer, C. et al. (2009): 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48** (2), S. 400–403.

Lutter, K.; Spirt, S. de; Kock, S.; Kröncke, K. D.; Martin, H. D.; Wagener, T.; Stahl, W. (2009): 3,3'-Dihydroxyisorenieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts. *Mol. Nutr. Food Res.*, **9**, in print.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Haut und UV-Strahlung	2
1.2	Schädigung durch UV-Strahlung	3
1.2.1	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	4
1.2.2	Singulett-Sauerstoff	5
1.2.3	Hyperoxid-Anion	7
1.2.4	Wasserstoffperoxid	9
1.2.5	Hydroxyl-Radikale	9
1.3	Schädigung von Lipiden	10
1.4	Schädigung von Proteinen	14
1.5	Freisetzung der Matrixmetalloprotease-1 durch UV-Licht.....	16
1.6	Schutzmechanismen des menschlichen Organismus gegen ROS.....	17
1.7	Carotinoide	18
1.7.1	Lutein.....	20
1.7.2	Isorenieratin und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin	21
1.8	Carotinoide in Membranen und Liposomen.....	23
1.9	Carotinoide als Antioxidantien	25
1.10	S-Nitrosothiole	29
2	Ziel der Arbeit	31
3	Chemikalien, Materialien und Geräte	32
3.1	Humane dermale Fibroblasten	36
3.2	Die Bestrahlungseinheit BioSun	36
4	Methoden	37
4.1	Herstellung der Liposomen.....	37
4.1.1	Bestrahlung der Liposomen.....	38
4.2	Analyse von MDA als Indikator für die Lipidperoxidation.....	38

4.3	Stabilität von Carotinoiden in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit UV-Licht	39
4.4	Isolation von humanen dermalen Fibroblasten aus Biopsien.....	40
4.5	Kultivieren der Fibroblasten	40
4.6	Inkubation und Bestrahlung der Fibroblasten	41
4.7	Stabilität von Carotinoiden in Fibroblasten unter Bestrahlung mit UV-Licht.....	41
4.8	Bestimmung der Zellviabilität mittels SRB Assay.....	43
4.9	Proteinbestimmung nach Lowry.....	44
4.10	Bestimmung der MMP-1 Konzentration mittels ELISA.....	44
4.11	Indirekte Messungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	45
4.11.1	Nachweis von ROS mittels Fluoreszenzphotometer.....	46
4.11.2	Nachweis der ROS-Bildung mittels Fluoreszenzmikroskop	46
4.12	Freisetzung von komplexierten Metallionen aus einem Modellpeptid	47
4.12.1	Aufnahme der Absorptionsspektren des Peptid-Metall-Komplex..	48
4.13	Elektronenmikroskopische Untersuchungen an dermalen Fibroblasten	49
4.14	Synthese von S-Nitrosocystein.....	50
4.14.1	Charakterisierung der Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein.....	50
4.15	Statistik	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Absorptionsspektren der untersuchten Carotinoide	53
5.2	HPLC-Chromatogramme der untersuchten Carotinoide	55
5.3	Wirkung von UV-Licht auf die Stabilität der Carotinoide	57
5.4	Wirkung von Carotinoiden auf die Bildung von MDA in Liposomen	59
5.5	Wirkung von UV-Strahlung auf die Freisetzung von komplexierten Metallionen in Zellkultur.....	71
5.6	Wirkung von UVA-Strahlung auf die Zinkfreisetzung in dermalen Fibroblasten	72

5.7	Freisetzung von komplexierten Metallionen aus modellartigen Peptid-Metall-Komplexen	75
5.8	Morphologie von humanen dermalen Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung	79
5.9	Aufnahme der Carotinoide in humane dermale Fibroblasten	81
5.10	Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von DHIR in humane dermale Fibroblasten	83
5.11	Abnahme der Carotinoide in humanen dermalen Fibroblasten unter UV-Bestrahlung	87
5.12	Zytotoxizität der untersuchten Carotinoide	94
5.13	Effekte von Carotinoiden auf die UV-induzierte ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten.....	99
5.14	Effekte von Carotinoiden auf die UV-induzierte MDA-Bildung in dermalen Fibroblasten.....	104
5.15	Effekte von Carotinoiden auf die Bildung von Matrix Metalloproteinase-1 nach UVB-Bestrahlung.....	110
5.16	Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein	116
5.17	Wirkung von UV-Strahlung auf die Zersetzung von S-Nitrosocystein	118
6	Diskussion	123
6.1	Stabilität der Carotinoide	123
6.2	Zytotoxizität der Carotinoide	124
6.3	Aufnahme der Carotinoide in dermale Fibroblasten	126
6.4	Lipidperoxidation in Liposomen und dermalen Fibroblasten.....	128
6.5	ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten	131
6.6	Wirkung von UV-Strahlung auf die Freisetzung von komplexierten Metall-Ionen in dermalen Fibroblasten und aus Peptiden	132
6.7	Wirkung von Carotinoiden auf MMP-1	134
6.8	Stabilität von S-Nitrosocystein unter UV-Bestrahlung.....	135

7	Zusammenfassung.....	137
8	Summary	139
9	Literaturverzeichnis.....	141
10	Abkürzungsverzeichnis	155
11	Anhang	159
12	Danksagung	161
13	Eidesstattliche Erklärung.....	162

1 Einleitung

Licht – notwendig für das Leben auf der Erde, gleichzeitig aber auch eine der gegenwärtigen und zukünftigen Gefahren für Mensch und Natur. Durch Umwelteinflüsse ändert sich die chemische Zusammensetzung der Erdatmosphäre. Die Folge ist eine Erhöhung des Anteils der für Organismen schädlichen ultravioletten (UV) Strahlung aus dem Sonnenlicht, das auf die Erdoberfläche gelangt. UV-Strahlung liegt im Wellenlängenbereich von 400-100 nm und wird in weitere Teilbereiche, die UVA- (400-315 nm), die UVB- (315-280 nm) und die UVC-Strahlung (280-100 nm) unterteilt. Die sehr energiereiche UVC-Strahlung wird in der Erdatmosphäre durch den dort vorhandenen Sauerstoff (O_2) unter Bildung von zwei Sauerstoffradikalen ($2 O\cdot$) absorbiert, so dass keine UVC-Strahlung an die Erdoberfläche gelangt. Die entstandenen Sauerstoffradikale können wiederum mit einem Sauerstoffmolekül zu Ozon (O_3) reagieren. Durch das Ozon in der Erdatmosphäre, der Ozonschicht, wird der größte Teil der UVB-Strahlung absorbiert. Kommt es durch verschiedene chemisch oder natürlich bedingte Veränderungen der Ozonschicht zum sogenannten Ozonloch, kann wesentlich mehr UVB-Strahlung auf die Erdoberfläche gelangen. Die UVA-Strahlung wird nur zu einem geringen Teil von der Erdatmosphäre absorbiert. An einem wolkenlosen Sommertag zur Mittagszeit in der Region des 35. nördlichen Breitengrades trifft eine UVA-Dosis von $25 J/cm^2$ innerhalb von 70 min auf die Erdoberfläche (Frederick & Lubin, 1988).

Die Haut und die Augen des Menschen sind dem Sonnenlicht und damit der UVA- und UVB-Strahlung direkt ausgesetzt. Dabei stellt die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers eine besonders große Angriffsfläche für Licht dar und muss besonders gegen übermäßige Lichteinwirkung geschützt werden. Dies kann entweder exogen oder endogen erfolgen. Zum exogenen Schutz werden z. B. absorbierende Sonnencreme oder Kleidung eingesetzt. Darüber hinaus ist die Haut, in der Lage sich selbst in einem gewissen Maße vor UV-Strahlung zu schützen. Dazu gehören die Verdickung der Hornhaut (Lichtschwiele) und die Synthese von Melanin, welches eine Bräunung der Haut

hervorrufft. Melanin absorbiert Licht im UV-Bereich und kann somit vor UV-Strahlung schützen.

Zum endogenen Schutz der Haut tragen antioxidativ wirksame Vitamine, z. B. Vitamin C, Vitamin E sowie sekundäre Pflanzenstoffe Carotinoide (β -Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein usw.), Flavonoide und Anthocyane bei. Aufgenommen werden diese antioxidativ wirksamen Substanzen hauptsächlich mit der Nahrung. Lutein ist z. B. in einer Menge von 15-40 mg/100 g in Grünkohl und β -Carotin mit 8-11 mg/100 g in Karotten zu finden (Augustin et al., 2004). Wie schon in vielen Studien gezeigt, wird durch Carotinoide wie β -Carotin oder einer Mischung verschiedener Carotinoide ein endogener Schutz der Haut erreicht (Stahl & Krutmann, 2006, Köpcke & Krutmann, 2008, Heinrich et al., 2003). Dabei ist allerdings zu beachten, dass dieser endogene Schutz viel geringer ausfällt als z. B. bei einer Sonnencreme. Durch eine regelmäßige Aufnahme von Carotinoiden wird ein Lichtschutzfaktor (LSF) von ca. 2-3 erreicht. Dieser eher geringe LSF trägt allerdings zum permanenten Schutz der Haut vor schädlicher Lichteinstrahlung bei (Sies & Stahl 2004).

1.1 Haut und UV-Strahlung

UV-Strahlung kann abhängig von ihrer Energie verschiedene Schäden in der Haut hervorrufen. Dabei muss berücksichtigt werden, wie tief welcher Anteil der UV-Strahlung in die einzelnen Schichten der menschlichen Haut eindringen kann. Die Haut ist aus drei Schichten aufgebaut (Abb. 1.1). Die oberste Hautschicht, die Epidermis (Oberhaut), besteht zum größten Teil aus einem Zelltyp, den Keratinozyten. In der darunter liegende Dermis (Lederhaut) befinden sich feine Blutgefäße, die die Epidermis mit Nährstoffen versorgen. Sie besteht hauptsächlich aus Bindegewebsfasern. Der in der Dermis am häufigsten vertretene Zelltyp sind die Fibroblasten. Daher ist dieser Zelltyp für UV-Experimente als Modellsystem geeignet. Die unterste Hautschicht, die Subcutis (Unterhaut), besteht hauptsächlich aus subcutanem Fett und bildet die Unterlage für die darüber liegenden Hautschichten. Die Subcutis enthält größere Blutgefäße und Nerven.

Kurzwellige, energiereiche UVB-Strahlung gelangt bis in die oberen Schichten der Dermis und kann somit die Zellen der Epidermis, die Keratinozyten und Melanozyten, und zum anderen die Fibroblasten und Endothelzellen der Dermis schädigen. Die energieärmere UVA-Strahlung erreicht auch tiefer liegendes dermales und zum Teil subkutanes Gewebe.

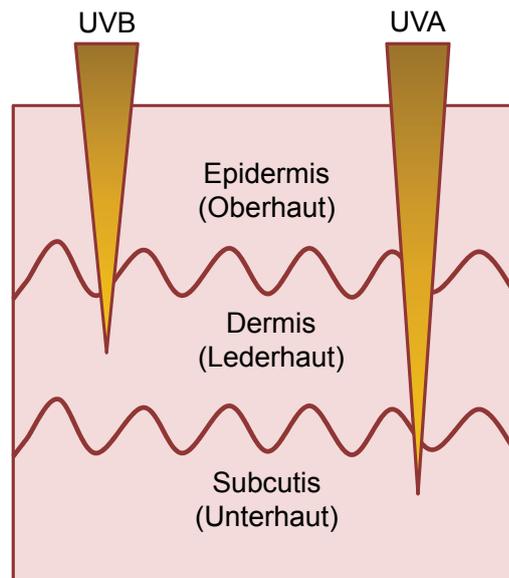


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der menschlichen Haut und die Eindringtiefen der UVB- und UVA-Strahlung

1.2 Schädigung durch UV-Strahlung

Die durch UV-Licht hervorgerufen Schäden in einem Organismus sind vielfältig. Ein sichtbarer Schaden ist z. B. die vorzeitige Hautalterung. Diese wird unter anderem durch die UV-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactiv oxygen species) hervorgerufen (vgl. 1.2.1). ROS-abhängig wird die Expression von Matrixmetalloproteasen induziert, die Bindegewebskollagen abbauen, was zur Faltenbildung führt. Des Weiteren kann insbesondere UVB-Strahlung direkt mit den Basen der DNA interagieren. Es bilden sich unter anderem Pyrimidin-Cyklobutan-Dimere. Diese Dimeren-Bildung kann zu Mutationen in der DNA und letztlich auch zu Hautkrebs führen (Mnich et al., 2009).

1.2.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Oxidativer Stress bezeichnet eine Störung der Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien, die zu Veränderungen im Redoxsignalweg und zu Schäden an Molekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen führt (Sies & Jones, 2007). Oxidantien, die oxidativen Stress hervorrufen, sind üblicherweise reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. Hyperoxid, Hydroxyl-Radikale, Hydroperoxid-Radikale, Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und Ozon. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kann verschiedene Ursachen haben. Die häufigsten Quellen von ROS sind die Zellatmung (Halliwell 1989, Cadenas & Sies 1998), die Einwirkung von Umweltgiften wie z. B. Ozon, sowie die UV-Einwirkung auf einen Organismus (Zastrow et al., 2009). Ist die Zunahme von ROS lichtinduziert, spricht man von photoinduziertem bzw. photooxidativem Stress.

ROS sind Sauerstoff tragende Moleküle, die in radikaler, angeregter oder nicht-radikalischer Form vorliegen können (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Übersicht über reaktive Sauerstoffverbindungen

Formel	Halbwertszeit $T_{1/2}$ [s]	Bezeichnung	Anmerkung
1O_2	$1 \times 10^{-6}{}^b$	Singulett-Sauerstoff	im angeregten Zustand
$RO\cdot$	$1 \times 10^{-6}{}^b$	Alkoxy-Radikal	
$ROO\cdot$	$7{}^b$	Peroxy-Radikal	
$O_2\cdot^-$	$1 \times 10^{-6}{}^b$	Hyperoxid-Anion	freie Radikale
$HO\cdot$	$1 \times 10^{-9}{}^a$	Hydroxyl-Radikal	
$HOO\cdot$	-	Hydroperoxid-Radikal	
$ROOH$	stabil	Hydroperoxid	nicht-radikalische Moleküle im Grundzustand
O_3	stabil	Ozon	
H_2O_2	stabil	Wasserstoffperoxid	

^a (Pator et al., 2000), ^b (Pryor, 1986)

1.2.2 Singulett-Sauerstoff

Sauerstoff ist essentiell für aerobe Organismen und nimmt eine Sonderstellung unter den chemischen Elementen ein. Er liegt im Gegensatz zu allen anderen Elementen als Sauerstoffmolekül im Grundzustand als Biradikal, also mit zwei ungepaarten Elektronen mit parallelem Spin, vor. Dieser Zustand wird als Triplett-Zustand bezeichnet. Dadurch ist nach den Gesetzen der theoretischen Chemie eine chemische Reaktion mit Molekülen oder Atomen, die sich im diamagnetischen Grundzustand befinden (Singulett-Zustand), nicht möglich. Diese Tatsache macht molekularen Sauerstoff relativ inert. Die Reaktivität des Sauerstoffs steigt allerdings deutlich an, sobald er in den angeregten Singulett-Zustand $^1\Sigma_g$ oder $^1\Delta_g$ übergeht. Der Singulett-Zustand höherer Energie $^1\Sigma_g$ ist sehr kurzlebig und geht schnell in den langlebigeren Singulett-Zustand $^1\Delta_g$ über (Abb. 1.2). Dieser angeregte Zustand ist biologisch von Bedeutung; denn Sauerstoff ist dann in der Lage, mit DNA, Proteinen und Lipiden zu reagieren und diese dadurch zu schädigen (Piette 1991, Sies & Menck 1993, Hawkins 2009, Wagner et al. 1993).

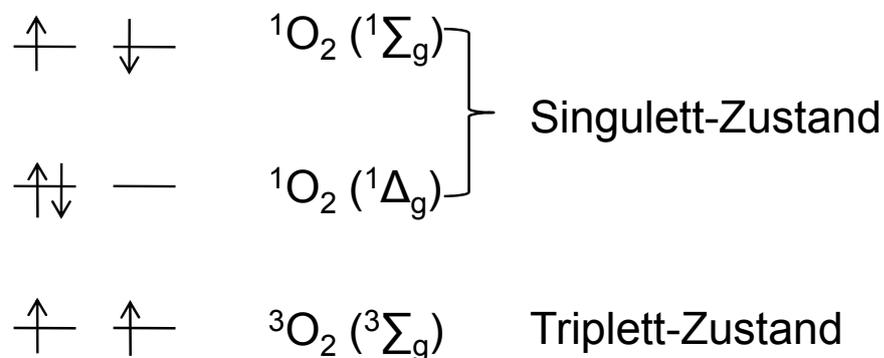


Abb. 1.2: Besetzung des HOMO von Sauerstoff im Singulett- und Triplett-Zustand

Im Körper wird Singulett-Sauerstoff hauptsächlich über zwei Wege erzeugt. Zum einen kann er photochemisch in lichtexponierten Geweben gebildet werden (Abb. 1.3). Dabei wird ein Sensibilisator im Grundzustand (1S_0) durch Absorption von Licht entsprechender Wellenlänge in den angeregten Zustand (1S_n) überführt. Dieser angeregte Zustand ist kurzlebig und kann durch Interkombinationsvorgänge (intersystem crossing) in den langlebigen Triplett-

Zustand übergehen (3S_n). Als intersystem crossing (ISC) bezeichnet man den strahlungslosen Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen, bei dem es zur Spin-Umkehr kommt. Der Sensibilisator im Triplett-Zustand kann nun seine Energie auf ein Sauerstoffmolekül übertragen und fällt selbst in den Grundzustand zurück. Der Sauerstoff hingegen befindet sich anschließend im angeregten Singulett-Zustand und kann direkt mit verschiedenen Makromolekülen im Organismus reagieren oder in Folgereaktionen weitere ROS bilden. Die Reaktion der Energieübertragung von einem Sensibilisator auf Sauerstoff gehört zu den Typ-II-Reaktionen. Die Typ-I-Reaktionen beschreiben einen Elektronentransfer und werden im Kapitel 1.2.3 erläutert. Sensibilisatoren mit biologischer Bedeutung sind z. B. Porphyrine, Flavine und Chinone (Briviba et al., 1997).

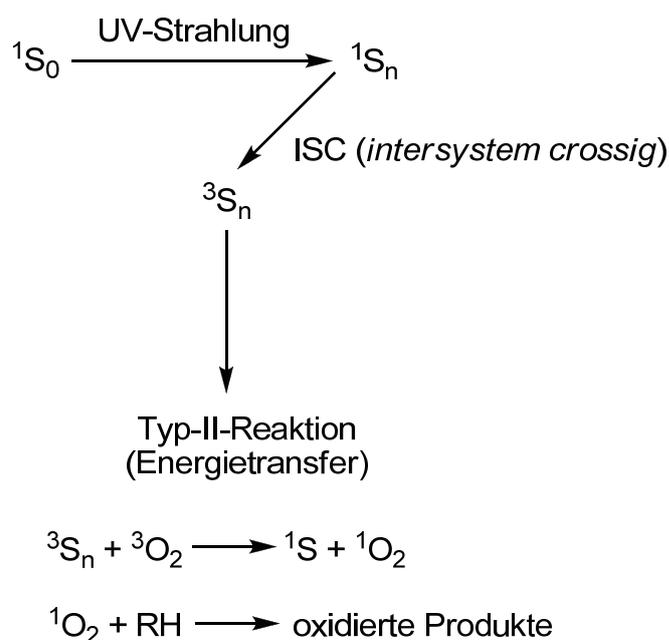


Abb. 1.3: Photoinduzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Energieübertragung; 1S_0 Sensibilisator im Grundzustand, 1S_n Sensibilisator im angeregten Zustand, 3S_n Sensibilisator im Triplett-Zustand

Auf nicht photochemischem Weg (Abb. 1.4) werden bei der Reduktion von Sauerstoff durch die NADPH-Oxidase Hydroperoxid-Anionen erzeugt (1), welche wiederum katalysiert durch die Superoxid-Dismutase (SOD) mit zwei Protonen (H^+) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff reagieren (2). Wasserstoffperoxid ist

ein Substrat der Myelo-Peroxidase (MPO), welche bei der Zersetzung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Anwesenheit von Chlorid-Ionen (Cl^-) Hypochlorid-Anionen bildet (3). Reagieren diese wiederum mit Wasserstoffperoxid, kann es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff kommen (4).

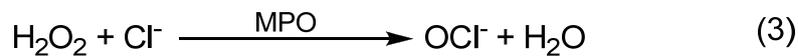


Abb. 1.4: Chemisch induzierte Bildung von Singulett-Sauerstoff *in vivo*, SOD Superoxid-Dismutase, MPO Myeloperoxidase

1.2.3 Hyperoxid-Anion

Das Hyperoxid-Anion, früher auch als Superoxid-Anion bezeichnet, entsteht wie schon in Abb. 1.4 in Gleichung (1) gezeigt, durch die Umsetzung von Sauerstoff mittels NADPH-Oxidase oder Xanthin-Oxidase. Die hauptsächliche Quelle für Hyperoxid-Anionen unter physiologischen Bedingungen ist aber die Atmungskette in den Mitochondrien (Cadenas & Sies, 1998). Beim Prozess der oxidativen Phosphorylierung reagiert in einer Vier-Elektronen-Reduktion Sauerstoff zu Wasser. In einer Nebenreaktion der Elektronentransportkette (Komplex I und III) wird molekularer Sauerstoff in einer Ein-Elektronen-Übertragung durch sogenannte „leak“-Elektronen reduziert (Abb. 1.5). Die so entstandenen Hyperoxid-Anionen werden in das umgebende Medium freigesetzt. Es wird geschätzt, dass 2-4% des Sauerstoffs in der Atmungskette nur unvollständig reduziert werden.

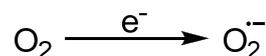


Abb. 1.5: Bildung von Hyperoxid-Anionen durch eine Ein-Elektronen-Übertragung

Dabei handelt es sich um „primäre“ ROS-Bildung. Das Hydroperoxid-Anion ist in der Lage, in weiteren Folgereaktionen sogenannte „sekundäre“ ROS zu erzeugen.

Hydroperoxid-Anionen können auch durch Photoanregung eines Sensibilisators gebildet werden. Dabei wird ein Sensibilisator im Grundzustand (1S_0) durch Absorption von Licht entsprechender Wellenlänge in den angeregten Zustand (1S_n) überführt. Dieser angeregte Zustand ist sehr kurzlebig und geht durch intersystem crossing in den langlebigen Triplett-Zustand über (3S_n). Der Sensibilisator im Triplett-Zustand kann nun mit Sauerstoff reagieren, da dieser ebenfalls im Triplett-Zustand vorliegt. Es kommt zu einer Elektronenübertragung, bei der sich ein Hydroperoxid-Anion und eine Sensibilisator-Kation bilden.

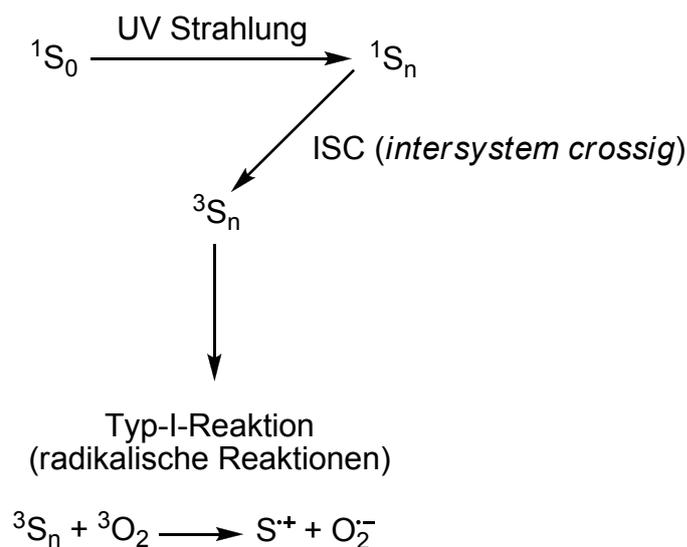


Abb. 1.6: Photoinduzierte Bildung von Hydroperoxid-Anionen durch Elektronenübertragung; 1S_0 Sensibilisator im Grundzustand, 1S_n Sensibilisator im angeregten Zustand, 3S_n Sensibilisator im Triplett-Zustand

Die Hydroperoxid-Anionen sind wegen der negativen Ladung nicht in der Lage, die Mitochondrienmembran zu durchdringen, und verbleiben in diesem Zellkompartiment (Muller et al., 2004). Im Körper abgebaut werden die Hydroperoxid-Anionen mittels der Superoxid-Dismutase (SOD), wobei Wasserstoffperoxid entsteht.

1.2.4 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid entsteht wie schon beschrieben durch Dismutation von Hydroperoxid-Anionen katalysiert von der SOD (Abb. 1.4, Gleichung 2). Abgebaut werden diese reaktiven Sauerstoffspezies durch die Enzyme Katalase oder Glutathion-Peroxidase (GPx) zu Wasser und Sauerstoff. Der Kofaktor der GPx ist das Glutathion, welches bei der Umsetzung von H_2O_2 als Elektronendonator dient und zum Disulfid oxidiert wird (GSSG). GSSG kann im Folgenden durch die Glutathion-Reduktase unter Mitwirkung von NADPH zu GSH reduziert werden.

Wasserstoffperoxid wird aber auch in einer Übergangsmetallkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion unter Beteiligung von Hydroperoxid-Anionen zu Wasser, Sauerstoff und reaktiven Hydroxyl-Radikalen umgesetzt (Liochev & Fridovich, 2002).

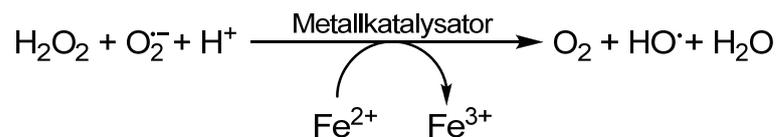


Abb. 1.7: Metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion

Wasserstoffperoxid ist relativ stabil und kann, auch innerhalb einer Zelle, längere Distanzen durch Diffusion zurücklegen. Zudem ist die Verbindung ungeladen und somit membranpermeabel (Halliwell & Gutteridge, 1984).

1.2.5 Hydroxyl-Radikale

Hydroxyl-Radikale sind mit einer Halbwertszeit *in vivo* von 1×10^{-9} s sehr reaktiv (Pator et al., 2000). Sie oxidieren daher Moleküle in unmittelbarer räumlicher Nähe. Erzeugt werden sie u. a. beim Abbau von Wasserstoffperoxid in der metallkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion (Abb. 1.7). Die Ausgangssubstanzen Hydroperoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid sind stabiler als Hydroxyl-Radikale und damit weniger reaktiv. Sie können von ihrem Entstehungsort wegdiffundieren und dann Hydroxyl-Radikal produzierende Prozesse in Gang setzen. Das für den Prozess notwendige „freie“ Eisen stammt in der Regel aus Häm oder anderen Eisenproteinen. Die dabei entstehenden

Hydroxyl-Radikale können sofort mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren (Kohen & Nyska, 2002). Hydroxyl-Radikale sind unter anderem Hauptinitiator für die Lipidperoxidation, die vor allem in Kompartimenten stattfindet, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, wie z. B. Membranen oder Lipoproteinen (Girotti, 2001).

1.3 Schädigung von Lipiden

Die Grundstruktur biologischer Membranen bilden Doppelschichten aus Lipiden wie z. B. Phosphatidylcholine (Abb. 1.8).

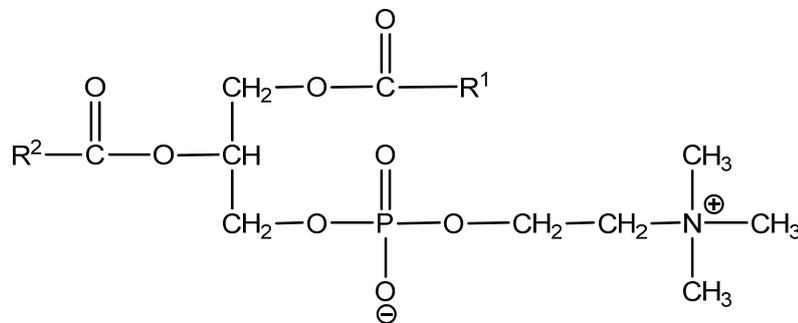


Abb. 1.8: Struktur von Phosphatidylcholin. R¹, R²: langkettige, unverzweigte aliphatische Reste mit bis zu vier Z-konfigurierten Doppelbindungen

Die langen Kohlenwasserstoffketten bilden dabei den hydrophoben Kern der Membran und die polaren Endgruppen die äußere hydrophile Oberfläche (Abb. 1.9). Zahlreiche Studien zur Struktur von Membranen und ihrer Wechselwirkung mit anderen Substanzen werden nicht an natürlichen Membranen durchgeführt, sondern in Modellsystemen wie Liposomen. Liposomen sind Vesikel, die wie biologische Membranen aus Lipiddoppelschichten aufgebaut sind und sich spontan aus gesättigten oder ungesättigten Phospholipiden in wässrigen Systemen bilden (Abb. 1.10).

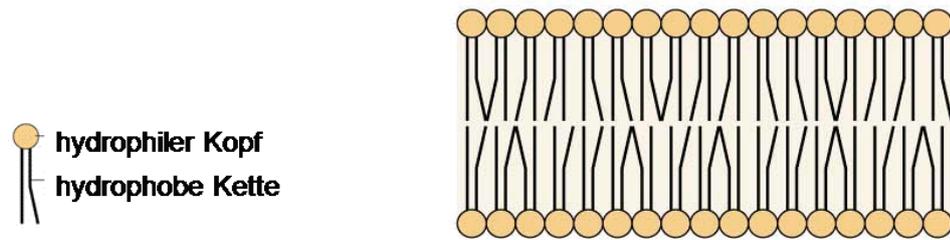


Abb. 1.9: Aufbau eines Lipids (links) und schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht (rechts)

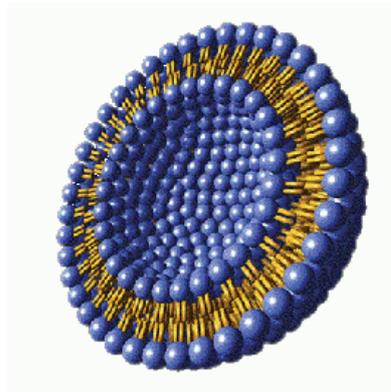


Abb. 1.10: Querschnitt durch ein Liposom. Der hydrophile Kopf ist in blau und die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten in gelb dargestellt

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren können leicht oxidiert werden. Infolge von Autoxidation sind in Liposomen immer Lipidhydroperoxide vorhanden. Sie bilden sich über den in Abb. 1.11 dargestellten Reaktionsweg. Initiiert wird die Bildung von Hydroperoxiden durch die Abstraktion eines doppelt allylisch-ständigen Wasserstoffatoms. Das entstandene Lipid-Radikal reagiert mit Sauerstoff zu einem Lipidperoxid-Radikal, welches wiederum von einem weiteren Lipid, unter Bildung eines Lipidhydroperoxids, ein Wasserstoffatom abstrahieren kann.

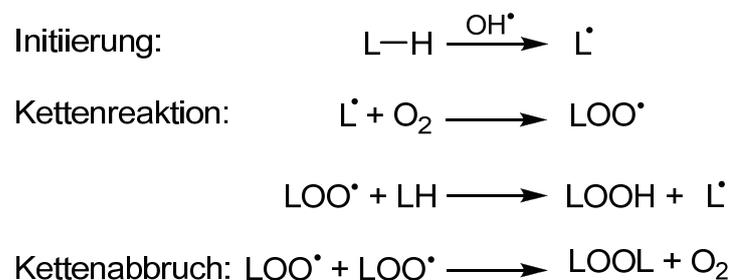


Abb. 1.11: Autoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Lipidperoxidation)

Diese Kettenreaktion wird durch die Kombination zweier Lipidperoxid-Radikale oder Radikalfänger unterbrochen (Fygle & Melo, 1995; Ogura & Sugiyama, 1993). Lipidhydroperoxide können aufgrund der relativ schwachen Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung (42-44 J/mol) durch die katalytische Wirkung von Übergangsmetallen oder durch UV-Licht gespalten werden (Schieberle et al., 1985). Dabei bilden sich sehr reaktive ROS wie Alkoxy- und Hydroxyl-Radikale.

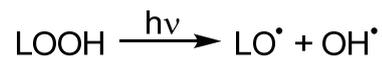


Abb. 1.12: Photolyse von Hydroperoxiden

Diese ROS können durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms einer Methylengruppe eines Lipids weitere Lipidperoxidationen initiieren (Abb. 1.13). Das entstandene Fettsäure-Radikal bildet durch Umlagerung ein stabileres konjugiertes Dien und kann in Anwesenheit von Sauerstoff zum Lipidperoxid-Radikal weiterreagieren. Durch Umlagerung kommt es zur Bildung eines zyklischen Lipidperoxid-Radikals und im weiteren Verlauf zur Bildung eines bityklischen Endoperoxides, aus dem Malondialdehyd (MDA) freigesetzt wird. MDA ist somit eine Markersubstanz für die Lipidperoxidation. MDA kann mit Hilfe von Thiobarbitursäure zu einem photometrisch detektierbaren Farbkomplex derivatisiert werden. Ein weiterer Nachweis für die oxidativen Schäden an Membranlipiden ist die Messung von konjugierten Dienen (Recknagel & Glende, 1984).

Wie in Abb. 1.13 in den Gleichungen (1) und (2) gezeigt, sind Lipidperoxid-Radikale in der Lage, ein Wasserstoffatom eines weiteren benachbarten ungesättigten Lipids zu abstrahieren, welches wiederum mit Sauerstoff zu einem Lipidperoxid-Radikal reagieren kann. Eine solche Kettenreaktion kann nach einmaliger Initiierung alle ungesättigten Lipide in einer Membran oxidieren (Kohen & Nyska, 2002). Ein Abbruch der Kettenreaktion kann durch radikal-abfangende Antioxidantien oder durch die Kombination zweier Radikalen erfolgen.

Folge dieser Lipidperoxidation in biologischen Membranen mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren ist die Zerstörung der Membran und damit der Verlust der Membranfunktion, Änderung der Membranfluidität, Modifizierung von Membranproteinen, Perforation der Zellmembran und im Extremfall Lyse der Zelle (Girotti, 2001).

1.4 Schädigung von Proteinen

Die Seitenketten aller Aminosäuren in Peptiden und Proteinen können durch ROS oxidiert werden. Besonders sensitiv gegenüber ROS sind Cystein und Methionin (Stadtman, 2004). Eine Zusammenfassung der am häufigsten von Oxidation betroffenen Aminosäuren und der entsprechenden Oxidationsprodukte ist in Tabelle 1.2 gezeigt.

Tabelle 1.2: Aminosäuren und ihre Oxidationsprodukte (Berlett & Stadtman, 1997)

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

ROS werden auch im Zusammenhang mit der Freisetzung von Zink aus Proteinen diskutiert (Jakob et al., 2000, Baldwin & Benz, 2002). Zink spielt als Kofaktor zahlreicher Proteine wie z. B. Transkriptionsfaktoren eine essentielle Rolle (Kröncke, 2007). Zink(II) ist zumeist durch zwei Cystein- und zwei Histidinreste komplexiert. Entsprechende Bereiche der Proteine bilden durch den Einbau des Zink(II) eine schleifenförmige Struktur. Diese Struktur wird als

Zinkfinger oder auch Zinkfinger-Motiv bezeichnet und kann spezifisch mit der DNA oder auch RNA interagieren. Kommt es zur Oxidation von Thiolgruppen in Cysteinen, kann Zink(II) nicht mehr komplexiert werden und wird freigesetzt. Dadurch ändert sich die Tertiärstruktur, und die Funktion des Transkriptionsfaktors bzw. des betreffenden Proteins geht verloren. Die Oxidation von Thiolgruppen kann durch eine Ein- oder Zwei-Elektronen-Oxidation zur Bildung eines intermolekularen Disulfids führen. Bei der Ein-Elektronen-Oxidation (Abb. 1.14) wird von der Thiolgruppe (RSH), z. B. eines Cysteins, unter Bildung eines Radikals ($\text{RS}\cdot$) ein Proton abstrahiert. Das entstandene Radikal kann mit einer weiteren Thiolgruppe unter Bildung eines Disulfid-Anions (RSSR^-) reagieren. Das Disulfid-Anion ist ein starkes Reduktionsmittel und reagiert unter Abgabe eines Elektrons zum Disulfid (RSSR).

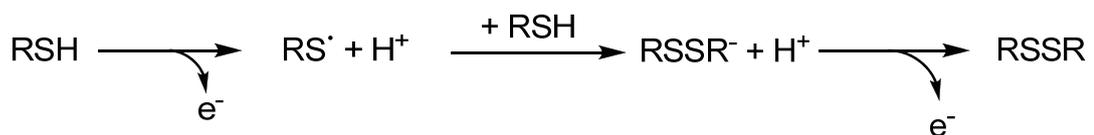


Abb. 1.14: Ein-Elektronen-Oxidation von Cystein unter Bildung eines Disulfids

Bei der Zwei-Elektronen-Oxidation (Abb. 1.15) reagiert die Thiolgruppe (RSH) z. B. mit Wasserstoffperoxid. Es kommt zur Bildung von Sulfensäure (RSOH), welche wiederum durch einen nucleophilen Angriff einer Thiolgruppe eines weiteren Cysteins unter der Bildung eines Disulfids reagiert.

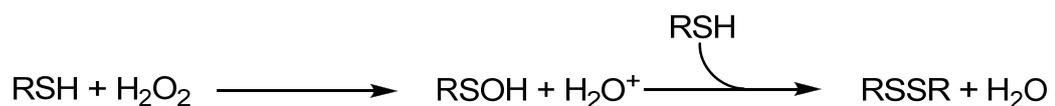


Abb. 1.15: Zwei-Elektronen-Oxidation von Cystein unter Bildung eines Disulfids

Liegen die miteinander reagierenden Cysteine im gleichen Protein vor, so bilden sich intramolekulare Disulfidbrücken. Im vorliegenden Fall kommt es zur o. g. Freisetzung von Zink(II) (Abb. 1.16).

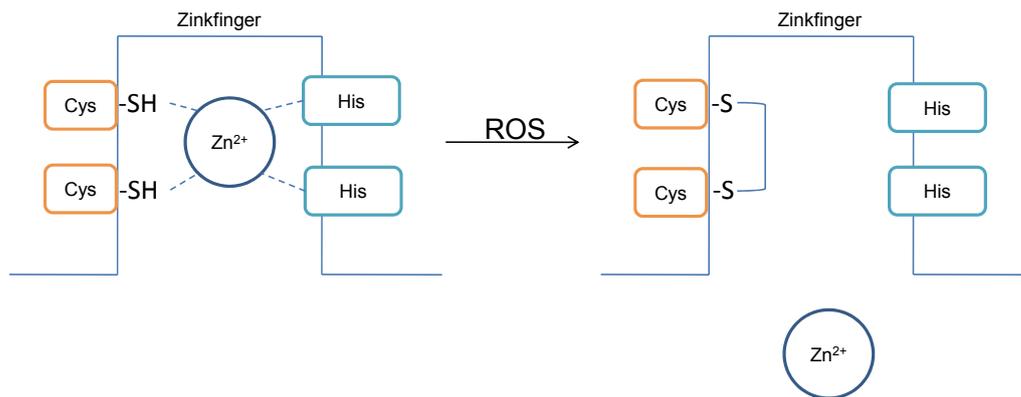


Abb. 1.16: Freisetzung von Zn^{2+} aus einer Zinkfingerstruktur durch Bildung einer Disulfidbrücke

Durch die Bildung von Disulfidbrücken in dem Zinkfinger-Motiv eines Transkriptionsfaktors kommt es zum Verlust der Tertiärstruktur, wodurch die Interaktion mit der DNA oder RNA nicht mehr stattfinden kann.

1.5 Freisetzung der Matrixmetalloprotease-1 durch UV-Licht

Photoalterung der Haut ist ein komplexer Prozess, der verschiedene Hautschichten beeinflusst. Dem dermalen Bindegewebe wird dabei eine zentrale Rolle zugewiesen. Dermale Fibroblasten regulieren durch das Expressionsmuster spezifischer Gene sowohl den Aufbau als auch den Abbau der Komponenten der extrazellulären Matrix. Von einem aufbauenden Phänotyp kann es durch die Einwirkung von UV-Strahlung zu einem degenerativen Phänotyp kommen. Dieser degenerative Phänotyp stellt eine große Menge an proteolytischen Proteinen, wie z. B. die Matrix abbauenden Matrixmetalloproteinasen (MMP), her und gibt diese in den Extrazellulärraum ab. Von dermalen Fibroblasten werden vor allem die MMPs 1, 2, 3, 13 und 14 gebildet. Die MMP-1, auch als interstitielle Kollagenase bezeichnet, gehört zu der Familie der zinkabhängigen Metalloendopeptidasen. Die MMPs werden in ihrer inaktiven Form von der Zelle in den extrazellulären Raum sezerniert. Die aktivierenden Substrate von MMP-1 sind unter anderem fibrilläre Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI (Hijova, 2005). Diese Kollagene werden von den MMP-1 zersetzt, was zu einem Abbau der Bindegewebsstruktur führt. UVA- sowie UVB-Strahlung ist in der Lage, die Expression von MMP-1 zu induzieren

(Vielhaber et al., 2006, Di Girolamo et al., 2005). Dadurch ergibt sich ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und den spezifischen Gewebeinhibitoren (TIMPs, tissue inhibitors of MMPs) zugunsten der MMPs. Es kommt also zu einem photoinduzierten Anstieg der MMP-1 Aktivität in der extrazellulären Matrix und somit zu einem vermehrten Abbau von Kollagen. Dieser Effekt, der auch als „Photoaging“ bezeichnet wird, hat als direkt sichtbaren Effekt eine vermehrte Faltenbildung der Haut zur Folge (Gilchrist & Krutmann, 2006).

Bisher ist nicht genau entschlüsselt, wie UV-Licht die vermehrte Expression in dermalen Fibroblasten verursacht. Zum Einen kann durch die UV-bedingte Regulation bestimmter UV-abhängiger Gene die MMP-1 Expression vermehrt auftreten (Brenneisen et al., 1998). Zum Anderen kommt es durch UV-Strahlung generierte ROS zur Aktivierung mitogen- und stressabhängiger Proteinkinasen und nachfolgend Transkriptionsfaktoren, die die Induktion der entsprechenden MMPs fördern (Brenneisen et al., 2002).

1.6 Schutzmechanismen des menschlichen Organismus gegen ROS

Der menschliche Organismus ist in einem gewissen Maße in der Lage, sich selbst vor übermäßiger UV-Einstrahlung und ROS zu schützen. Ein sichtbarer Schutz ist die Bräunung der Haut nach Einwirkung von Sonnenstrahlung durch die enzymatische Bildung von Melanin aus Tyrosin. Melanin absorbiert und streut Licht und kann somit vor UV-Strahlung schützen. Darüber hinaus gibt es noch verschiedene Reparatur- und antioxidative Schutzmechanismen. Die antioxidativen Schutzmechanismen können entweder enzymatischer oder nichtenzymatischer Natur sein (Valko et al., 2007).

Zu den enzymatischen Schutzmechanismen gehören z. B. die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und die Glutathion-Peroxidase (GPx). Die Superoxid-Dismutase oxidiert zwei Hydroperoxyd-Anionen unter Beteiligung von zwei Protonen zu dem weniger reaktiven Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (vgl. Abb. 1.4). Die Katalase wiederum katalysiert die Disproportionierungsreaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (Abb. 1.17).

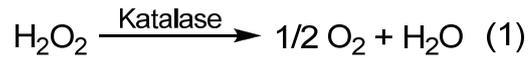


Abb. 1.17: Reaktion der Katalase

Die Glutathion-Peroxidase (GPx) katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und verhindert dadurch, wie die Katalase, die weitere Bildung von hoch reaktiven Intermediaten wie den Hydroxyl-Radikalen.

Antioxidantien, die zum nichtenzymatischen Schutz zählen, werden als Substanzen definiert, die im Vergleich zum oxidierbaren Substrat in geringen Konzentrationen vorliegen und die Oxidation des Substrates verlangsamen oder verhindern können (Halliwell & Gutteridge, 1989). Zu diesen Antioxidantien im menschlichen Organismus gehören unter anderem Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion, Flavonoide und Carotinoide.

1.7 Carotinoide

Carotinoide sind Tetraterpene, die aus acht Isopreneinheiten aufgebaut sind, also ein C_{40} Grundgerüst besitzen. Die zentrale Kette des Moleküls besitzt 9 konjugierte Kohlenstoffdoppelbindungen und trägt an den Enden zumeist Ringsubstituenten. Griechische Buchstaben bezeichnen die insgesamt sieben bekannten Endgruppen, die in Abb. 1.18 dargestellt sind.

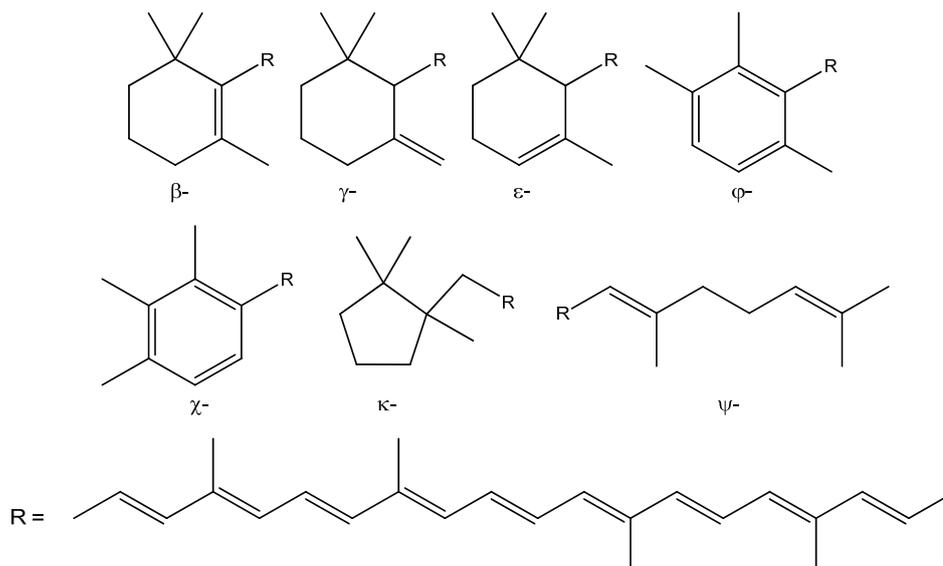


Abb. 1.18: Endruppenbezeichnung der Carotinoide und die Zentralkette R

Carotinoide werden in zwei Klassen unterteilt. Moleküle, welche ausschließlich aus Kohlenwasserstoffen bestehen, zählen zu den Carotinen. Verbindungen, die zusätzlich Sauerstoffatome in Form von z. B. Hydroxy- oder Keto-Gruppen tragen, gehören zur Gruppe der Xanthophylle. In Abb. 1.19 und Abb. 1.20 sind jeweils Beispiele für Carotinoide und Xanthophylle gezeigt.

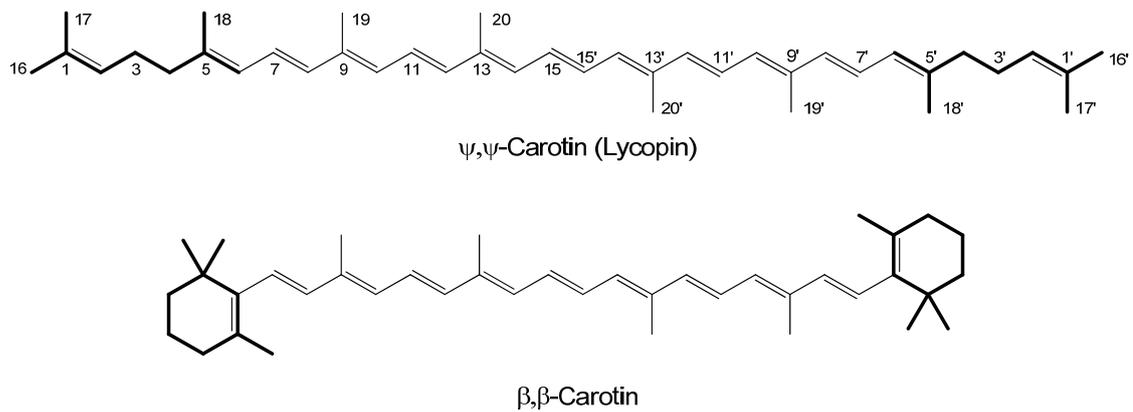


Abb. 1.19: Beispiele für Carotine

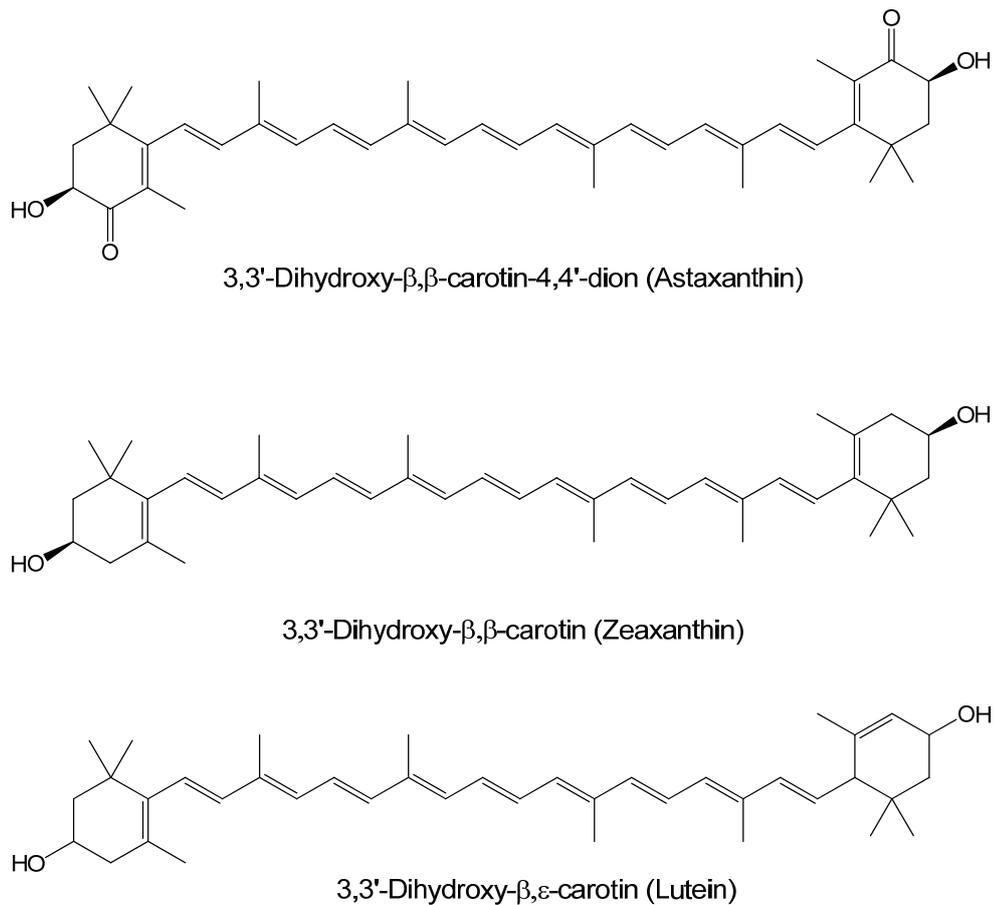


Abb. 1.20: Beispiele für Xanthophylle

Carotinoide sind lipophile Substanzen, die in Blättern, Früchten, Sprossen und Wurzeln höherer Pflanzen vorhanden sind. Weil sie langsamer abgebaut werden als das grüne Chlorophyll, bewirken sie im Herbst die gelb- bis rotbraune Farbe der Blätter (Breitmaier & Jung, 2001). Tiere und Menschen sind nicht in der Lage Carotinoide de novo zu synthetisieren und müssen diese mit der Nahrung aufnehmen. Wichtig ist insbesondere β -Carotin als Vitamin A Quelle. Ungefähr 50 bekannte Carotinoide haben eine Provitamin A-Aktivität.

Carotinoide sind in fast allen Organen des menschlichen Organismus zu finden. Allerdings hängt der Carotinoidgehalt stark von der Art des Gewebes ab. So ist der Gehalt von Carotinoiden in der Leber und in der Nebenniere höher als in der Lunge, dem Herzen oder der Haut (Biesalski et al., 2002). In der Haut liegt eine Carotinoidkonzentration von 0,2-0,6 nmol/g feuchte Haut vor. Dabei ist zu beachten, dass je nach Carotinoid und Hautregion diese Konzentration variieren kann (Peng et al. 1993; Stahl et al., 1998).

Die antioxidativen Eigenschaften von Carotinoiden sind schon lange bekannt (Krinsky, 1998) und auf die außergewöhnliche Struktur dieser Substanzen zurückzuführen. Aufgrund des Systems von konjugierten Kohlenstoffdoppelbindungen sind sie in der Lage, Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren (quenchen angeregter Zustände) und Radikale abzufangen (Harry, 1997).

1.7.1 Lutein

Das gelb-orange Lutein gehört zu der Gruppe der Xanthophylle und ist mit β -Carotin und Lycopin das am häufigsten vorkommende Carotinoid im menschlichen Blut. Es spielt zusammen mit Zeaxanthin eine wichtige Rolle im Auge. Lutein und Zeaxanthin sind die einzigen Carotinoide, die in hohen Konzentrationen in der *Macula lutea*, dem gelben Fleck (\varnothing 4-5 mm) auf der Retina des Auges, zu finden sind (Bone et al., 1988). Beiden Xanthophyllen werden hier spezifische Wirkungen zugeschrieben. Zum Einen absorbieren sie blaues Licht und fungieren somit als Blaulichtfilter, zum Anderen dienen sie als Antioxidantien. Lutein und Zeaxanthin konnten in den Photorezeptorzellen nachgewiesen werden. Hier schützen sie die an mehrfach ungesättigten

Fettsäuren reichen Membranen im Außensegment der Photorezeptorzellen vor photooxidativen Schäden (Augustin et al., 2004). Es wird vermutet, dass Lutein und Zeaxanthin beim Schutz der Retina und *Macula lutea* eine zentrale Rolle spielen. Epidemiologische Studien zeigen, dass eine erhöhte Aufnahme von Lutein und Zeaxanthin mit der Nahrung das Risiko herabsetzt an der altersbedingten Makuladegeneration zu erkranken (Stahl, 2005).

Darüber hinaus haben verschiedene Studien gezeigt, dass Xanthophylle wie das Lutein das Risiko, an Arteriosklerose (Mares-Perlman et al., 2002) und verschiedenen Krebsarten (Lee et al., 2009; Cho et al., 2009) zu erkranken, herabsetzen.

Eine weitere wichtige Aufgabe des Luteins ist die Funktion als Blaulichtfilter und Antioxidans in Pflanzen. Es hat ein Absorptionsmaximum im blauen Bereich des sichtbaren Lichtes bei 445 nm und kann somit durch Absorption die Pflanzen vor der energiereichen Strahlung schützen (Alves-Rodrigues & Shao, 2004).

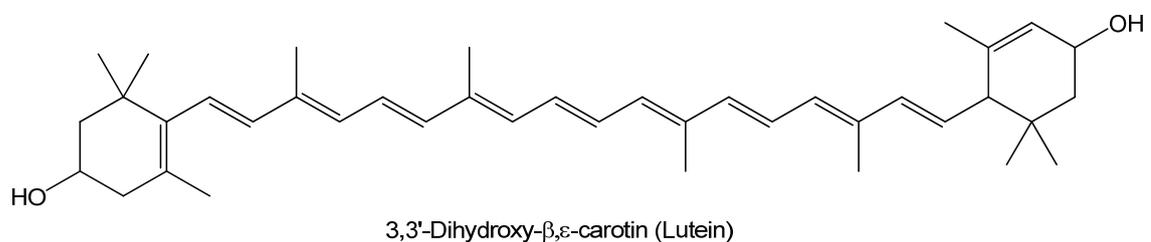


Abb. 1.21: Lutein

1.7.2 Isorenieratin und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin

Isorenieratin (Abb. 1.22) ist ein aromatisches Carotinoid, das zum ersten Mal 1957 von Yamagushi und Tsumaki aus einem orangefarbenen Meeresschwamm isoliert wurde (Yamaguchi, 1957). Allerdings stellte sich kurze Zeit später heraus, dass das Isorenieratin (IR) nicht direkt aus dem Meeresschwamm stammt, sondern aus einem mit ihm in Symbiose lebenden phototrophen Bakterium (Nybraaten & Liaaen-Jensen, 1974).

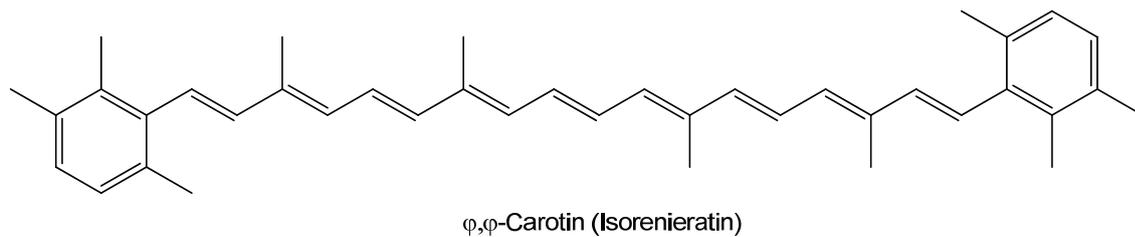


Abb. 1.22: Isorenieratin (IR)

1969 fand Arcamone et al. in dem Bakterium *Streptomyces mediolani* neben dem bereits bekannten Isorenieratin zwei phenolische Carotinoide (Arcamone et al., 1969). Diese hatten im Gegensatz zum Isorenieratin ein bzw. zwei Hydroxylgruppen in para-Position zur Polyenkette. Es handelte sich um die Verbindungen 3-Hydroxyisorenieratin (Abb. 1.23) und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (Abb. 1.24).

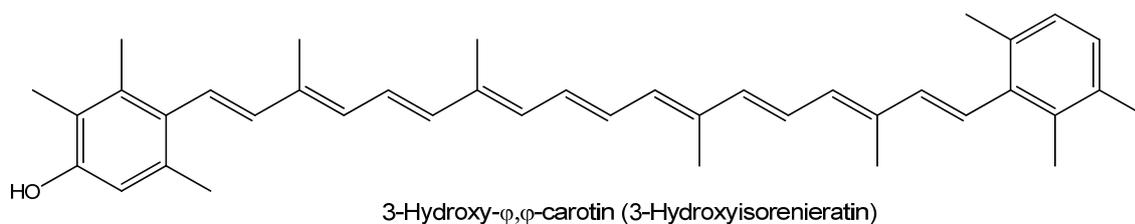


Abb. 1.23: 3-Hydroxyisorenieratin

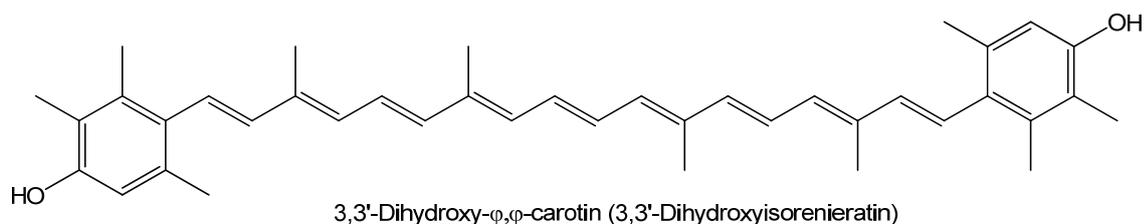


Abb. 1.24: 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR)

In weiteren Untersuchungen an den aromatischen Carotinoiden entdeckten Nybraaten et al., dass sich an der Luft die Farbe des rot-gelben Diphenols 3,3'-Dihydroxyisorenieratin nach blau ändert (Nybraaten & Liaaen-Jensen, 1974). Diese Farbreaktion ist auf die Bildung eines chinoiden Systems zurückzuführen (Abb. 1.25). Die chinoiden Endgruppen liegen in einer Ebene mit dem konjugierten Doppelbindungssystem und verursachen dadurch die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums (Marian et al., 2009).

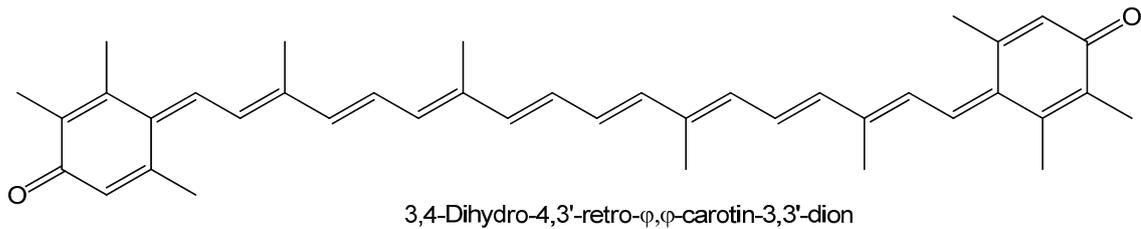


Abb. 1.25: Chinoide Form von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin

Kohl et al. beschrieben 1983 erstmalig das Vorkommen von aromatischen Carotinoiden in *Brevibacterium linens* (Kohl et al., 1983). Dies ist ein Bakterium, welches zur Produktion von Rotschmiere-Käsen verwendet wird. Das Bakterium gibt dem Käse durch die Produktion von Methanthiolen das „würzige“ Aroma. Die rote Farbe der Rinde wird durch Carotinoide hervorgerufen. Bekannte Rotschmiere-Käsesorten, zu deren Herstellung *Brevibacterium linens* eingesetzt wird, sind z. B. Tilsiter, Limburger, Romadour, Maroilles oder Münster (Guyomarch et al. 2000; Dufossé et al., 2001). Zu den drei aus dem Bakterium isolierten Carotinoiden zählen neben dem Isorenieratin (Abb. 1.22), das 3-Hydroxyisorenieratin (Abb. 1.23) und das 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (Abb. 1.24).

1.8 Carotinoide in Membranen und Liposomen

Die stabähnliche Struktur der Carotinoide, die Anwesenheit von polaren Endgruppen und die Länge des Moleküls, welche ungefähr dem Durchmesser der Lipiddoppelschicht entspricht, beeinflussen die Lokalisation und Orientierung der Carotinoide in Membranen, sowie deren Effekt auf Membraneigenschaften (Frank et al., 1999; Sujak et al., 2000; Okulski et al., 2000). Lipophile Carotinoide wie β -Carotin oder Lycopin befinden sich im inneren, hydrophoben Teil der Membran. Dabei orientieren sie sich, wie in Abb. 1.26 gezeigt, nahezu waagrecht zu den Kohlenwasserstoffketten der Lipide.

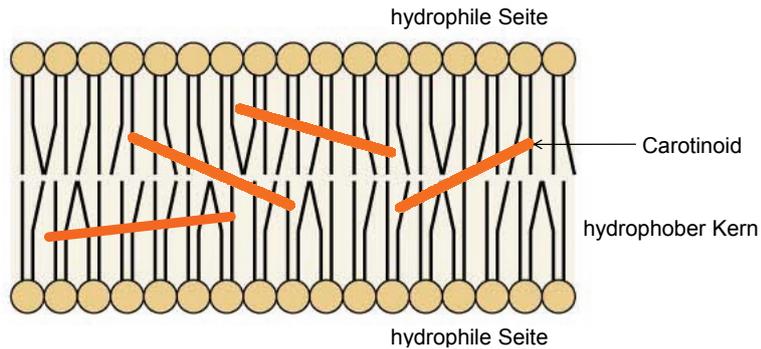


Abb. 1.26: Orientierung von unpolaren Carotinoiden in einer Lipiddoppelschicht

Carotinoide mit polaren funktionellen Gruppen wie z. B. Hydroxygruppen, lagern sich nicht in den unpolaren, hydrophoben Kern der Membran ein. Sie durchspannen die Membran, wobei sich die polaren Endgruppen des Carotinoids zu den hydrophilen Teilen der Membran orientieren und der lipophile Teil des Carotinoids den hydrophoben Kern durchspannt (Abb. 1.27). Kleine Veränderungen an der Struktur von Carotinoiden können zu signifikanten Unterschieden in der Orientierung der Carotinoide in der Membran führen. In Abb. 1.27 ist die Orientierung der Xanthophylle, Zeaxanthin und Lutein in der Membran gezeigt. Lutein unterscheidet sich von Zeaxanthin nur durch die Position einer Doppelbindung in einem der Ringe und in der Stereochemie an C-3' Position (vgl. Abb. 1.20). Dieser Unterschied führt dazu, dass Lutein die Membran nicht nur durchspannen kann, sondern auch in der Lage ist, sich horizontal an einer polaren Seite der Lipiddoppelschicht anzulagern.

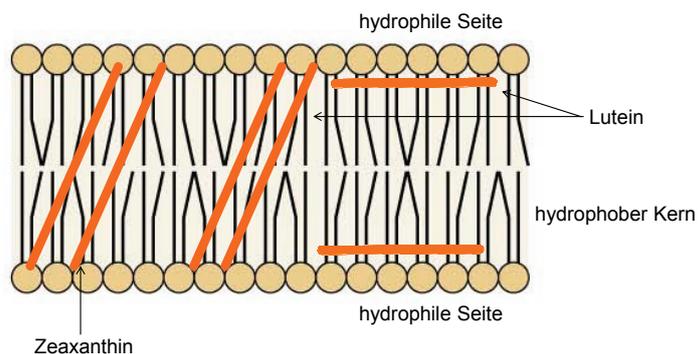


Abb. 1.27: Orientierung von Carotinoiden mit polaren Endgruppen in einer Lipiddoppelschicht am Beispiel von Zeaxanthin und Lutein

1.9 Carotinoide als Antioxidantien

Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, ist der menschliche Organismus in der Lage, sich vor übermäßiger Lichteinwirkung und ROS zu schützen. Als Antioxidantien im nichtenzymatischen Schutzsystem dienen dazu u.a. Carotinoide. Die photoprotektive Aktivität von Carotinoiden beruht auf ihrer Eigenschaft, Singulett-Sauerstoff zu deaktivieren und Radikale abzufangen. Das Deaktivieren von Singulett-Sauerstoff (Abb. 1.28) kann physikalisch durch die Übertragung der Anregungsenergie eines Singulett-Sauerstoffs ($^1\text{O}_2$) auf das Carotinoid (^1Car) erfolgen. Dadurch fällt der Singulett-Sauerstoff in den Triplett-Zustand ($^3\text{O}_2$) zurück, und das Carotinoid liegt im angeregten Triplett-Zustand vor (^3Car). Carotinoide im angeregten Zustand sind in der Lage, durch strahlungslose Relaxation die überschüssige Energie in Form von Wärme an das umgebende Medium abzugeben, und gehen so unverändert aus dieser Reaktion wieder hervor (Stahl & Sies, 2002). Carotinoide sind in der Lage, über den gleichen Mechanismus angeregte Sensibilisatoren ($^3\text{S}_n$) zu löschen, wodurch die Bildung von Singulett-Sauerstoff und weiteren ROS verhindert wird (vgl. 1.2.1).



Abb. 1.28: Physikalisches Quenchen von Singulett-Sauerstoff durch Carotinoide

Phenolische Carotinoide wie 3,3'-Dihydroxyisorenieratin können Singulett-Sauerstoff über die Bildung eines im angeregten Zustand stabilen Begegnungskomplex, einem sogenannten Exciplex, zu löschen. Dabei kommt es zu einer Ladungsverschiebung von einem elektronenreichen Phenol zum Singulett-Sauerstoff, wodurch das ISC vom Singulett- zum Triplett-Sauerstoff erleichtert wird. Diese Art der Singulett-Sauerstoff-Desaktivierung wird als Charge-Transfer-Löschung bezeichnet (Mehrdad, 2002).

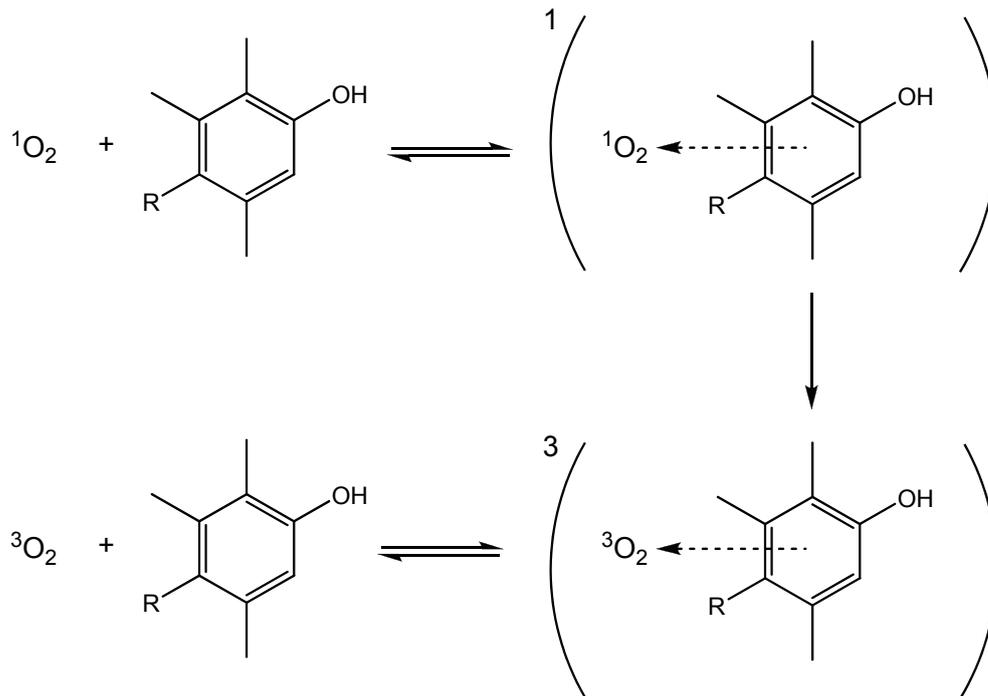


Abb. 1.29: Charge-Transfer-Löschung von Singulett-Sauerstoff durch phenolische Gruppen

Carotinoide können neben dem physikalischen Löschen auch chemisch mit ROS reagieren. Dabei erfolgt die Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff über die Bildung von Endoperoxiden in einer [2+2]- oder [2+4]-Cycloaddition (CA) (Abb. 1.30) (Li et al., 2000; Hollemann et al., 1995).

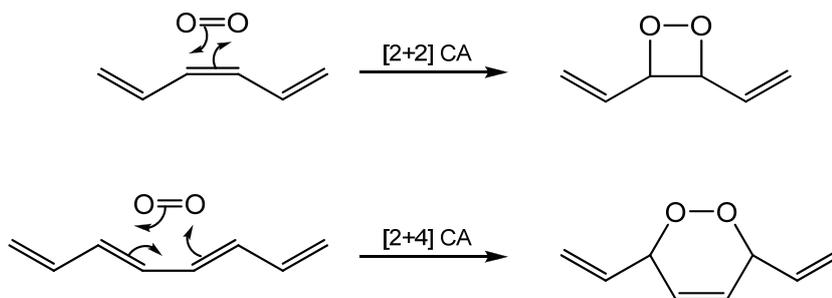


Abb. 1.30: [2+2]- und [2+4]-Cycloaddition von Singulett-Sauerstoff an das Polyensystem eines Carotinoids

Die entstandenen Endoperoxide zerfallen in weiteren Reaktionen zu oxygenierten Apocarotinoiden oder hydroxylierten Carotinoiden. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit dem

Methylgruppen tragenden Polyensystem in einer Hetero-En-Reaktion (Abb. 1.31).

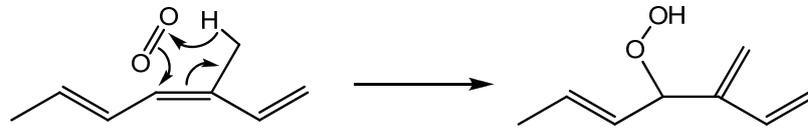


Abb. 1.31: Hetero-En-Reaktion von Singulett-Sauerstoff und einer Methylengruppe am Polyensystem

Wie in Abb. 1.32 gezeigt, werden radikalische ROS durch die Abstraktion eines Wasserstoffs (1), durch Addition des Radikals an die Polyenkette des Carotinoids (2) oder durch die Übertragung eines Elektrons desaktiviert (3).

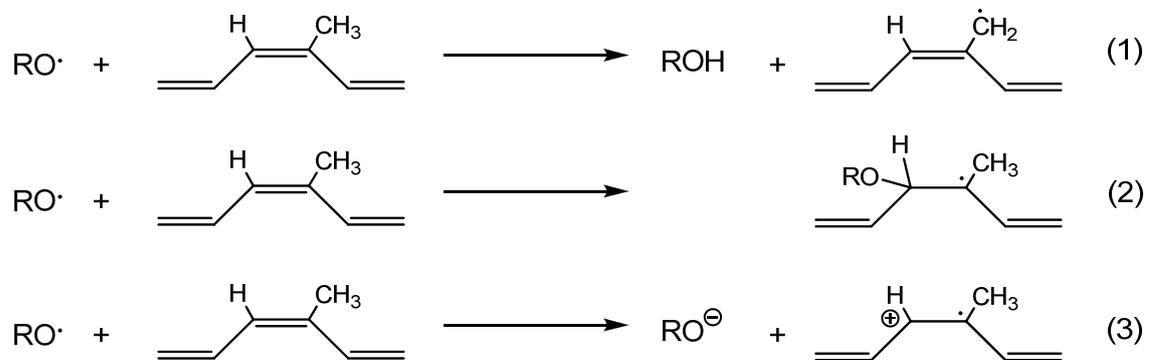


Abb. 1.32: Reaktionen von Carotinoiden mit radikalischen ROS

Die dabei entstehenden Carotinoidradikale sind mesomeriestabilisiert (Britton et al., 2008).

Eine Besonderheit des DHIR ist die Bildung eines chionoiden Systems nach einer zwei-Elektronen-Oxidation (Abb. 1.33). Ermöglicht wird dies durch die zwei phenolischen Endgruppen des Moleküls. Nach der Abstraktion eines phenolischen Wasserstoffatoms wird das zweite Wasserstoffatom unter Bildung eines Chinons abgespalten (z. B. durch ein Peroxid-Radikal).

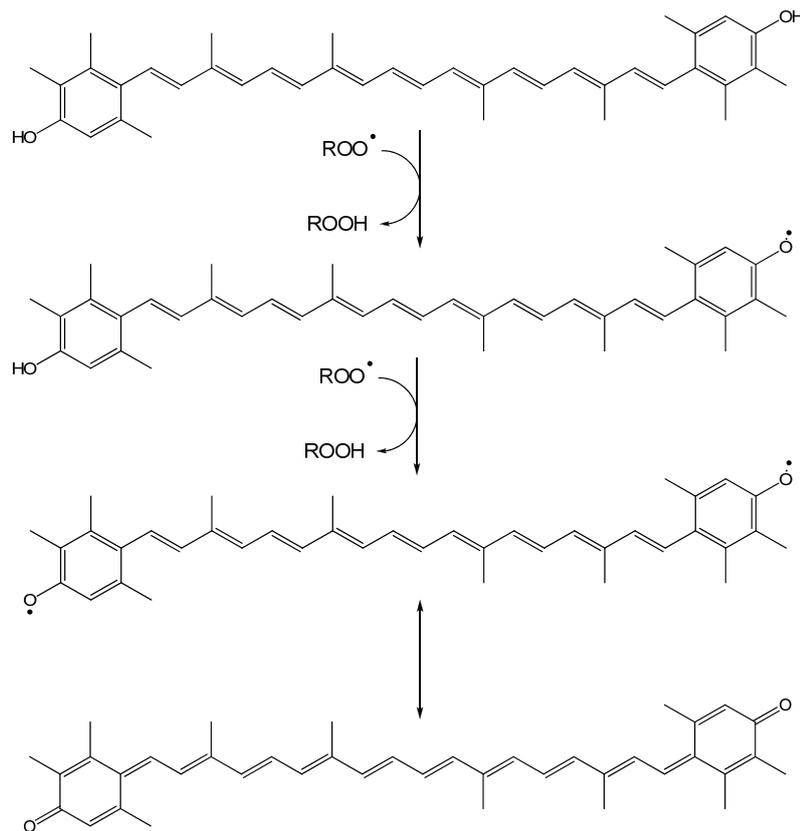


Abb. 1.33: Bildung eines Chinons durch Oxidation von DHIR

Aufgrund der genannten strukturellen Merkmale sollte DHIR anderen Carotinoiden wie IR und Lutein in seinen antioxidativen Eigenschaften überlegen sein.

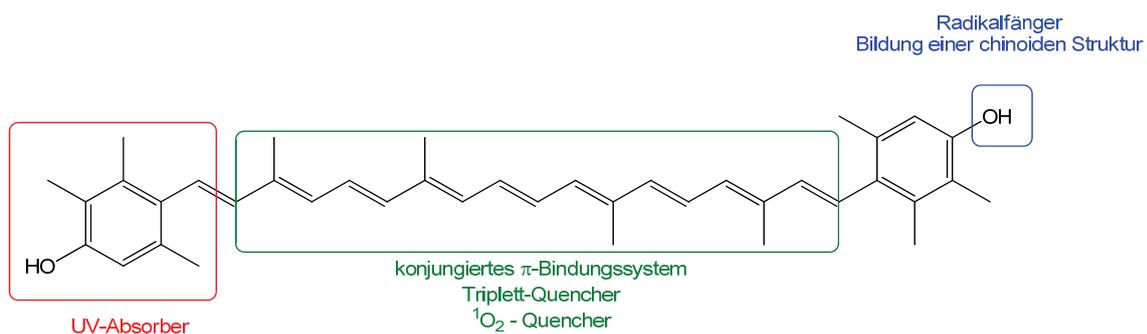


Abb. 1.34: Mögliche Schutzmechanismen aufgrund der Molekülstruktur von DHIR gegen UV-Strahlung und ROS

Mögliche Schutzmechanismen vor UV-Strahlung und ROS sind in Abb. 1.34 anhand der Struktur von DHIR dargestellt. Die aromatischen Endgruppen des DHIR absorbieren Licht im UV-Bereich zwischen 250-300 nm. Zusätzlich kann

DHIR durch die Hydroxyl-Gruppe des phenolischen Rings unter Bildung eines Chinons zwei Radikale abfangen, ohne dass das konjugierte π -Bindungssystem zerstört wird. Dadurch ist auch die chinoide Form des DHIR's in der Lage, als Singulett-Sauerstoff oder Triplett-Löscher zu agieren. IR und Lutein sind zwar ebenfalls in der Lage, durch das konjugierte Doppelbindungssystem Singulett-Sauerstoff oder Triplett- Zustände zu löschen, werden aber durch die Reaktion mit Radikalen desaktiviert. Beide Carotinoide weisen im Vergleich mit DHIR nur eine sehr geringe Absorption im UV-Bereich auf.

1.10 S-Nitrosothiole

S-Nitrosothiole werden *in vivo* in der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Thiolgruppen gebildet. Es wurden bereits verschiedene S-Nitrosothiolverbindungen in menschlichen Blut und Geweben nachgewiesen (Hogg, 2000, Kashiba et al., 1999). Bei diesen S-Nitrosoverbindungen handelt es sich um Derivate von Thiolen, die häufig im menschlichen Organismus vorhanden sind. Dazu zählen S-Nitrosocystein, S-Nitrosoglutathion, S-Nitrosohomocystein oder S-Nitrosoalbumin. Es wird vermutet, dass S-Nitrosothiole wichtige Intermediate in Stickstoffmonoxid-Signalwegen darstellen. Die Halbwertszeit von Stickstoffmonoxid (NO) ist sehr kurz. Daher ist die Bildung von stabileren S-Nitrosothiolen als längerlebige Speicher und Transportmoleküle von Bedeutung (Miersch & Mutus, 2005). Stickstoffmonoxid dient in biologischen Systemen nicht nur als Signalmolekül, sondern auch als Antioxidans im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation (Vgl. 1.3). Durch eine Kombination von Stickstoffmonoxid mit einem Lipidperoxid-Radikal kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion (Abb. 1.35).

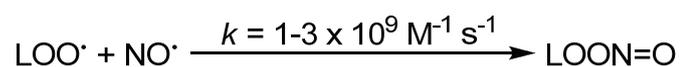


Abb. 1.35: Kettenabbruch der Lipidperoxidation durch Stickstoffmonoxid (Hummel et al., 2006)

S-Nitrosocystein (CysNO) ist ein relativ instabiles S-Nitrosothiol (Mathews & Kerr 1993). Diese Instabilität wird auf die Nähe der S-NO-Gruppe und der

Aminogruppe in dem relativ kleinen Molekül zurückgeführt (Al-Mustafa et al., 2001). Die Einwirkung von Metallen oder UV-Licht kann die Zersetzung von S-Nitrosothiolen fördern (Noble & Williams, 2000, Opländer et al., 2008). Der Zerfall von S-Nitrosocystein ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass der Zerfall von CysNO durch intra- und intermolekularen Transfer der NO-Gruppe von der Thiol- zur Amino-Gruppe unter der Bildung von N-Nitrosocystein verläuft (Abb. 1.36) (Adam et al., 2006). Aufgrund der bekannten Instabilität von primären N-Nitrosaminen kommt es zur Bildung eines Diazohydroxids, welches wiederum zu einem Diazoniumion weiterreagiert. Aus dem Diazoniumion können sich mehrere Zerfallsprodukte wie Thiiran-2-carbonsäure, 2-Hydroxy-3-mercaptopropionsäure, 3-Mercaptoacrylsäure und Acrylsäure bilden. Nachgewiesen wurde die Bildung von Thiiran-2-carbonsäure unter sauren Bedingungen; ob die Zerfallsprodukte unter physiologischen Bedingungen die Gleichen sind, ist bisher noch nicht untersucht worden.

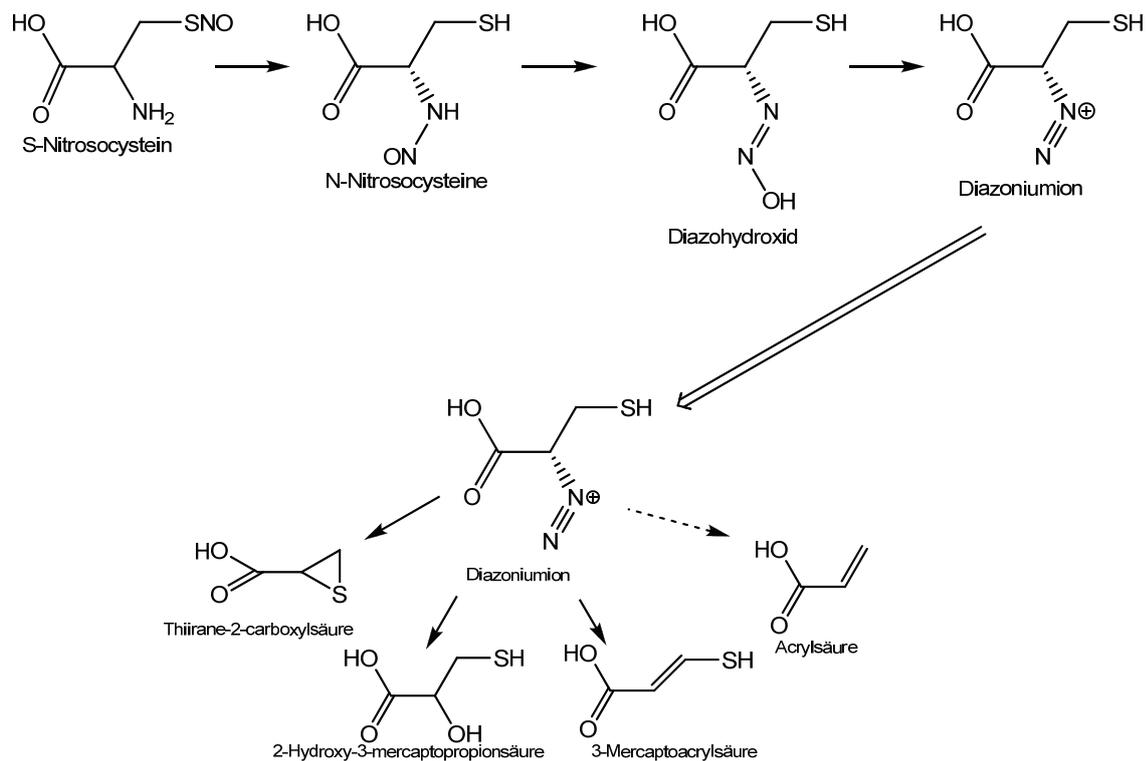


Abb. 1.36: Mögliche Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

2 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Carotinoide DHIR und IR auf ihre antioxidativen Eigenschaften in Hinblick auf photoprotektive Wirkungen in Modellsystemen und in dermalen Fibroblasten zu untersuchen. Als Vergleichssubstanz wurde das strukturähnliche Lutein verwendet.

Darum sollten in der Arbeit Untersuchungen durchgeführt werden:

- Effekte der Carotinoide auf die Lipidperoxidation im Liposomenmodell
- Wirkung der Carotinoide auf die UV-induzierte Zinkfreisetzung aus Peptidkomplexen
- Aufnahme der Carotinoide in dermale Fibroblasten
- Untersuchung der Zelltoxizität der Carotinoide vor und nach der Einwirkung von UV-Strahlung
- Effekte der Carotinoide auf die Lipidperoxidation in dermalen Fibroblasten
- Wirkung der Carotinoiden auf die UVB-induzierte MMP-1 Sekretion in dermalen Fibroblasten
- Wirkung der Carotinoide auf die ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten

Des Weiteren sollte die Zersetzung von S-Nitrosocystein unter UV-Bestrahlung untersucht werden.

3 Chemikalien, Materialien und Geräte

In den folgenden Tabellen befinden sich Angaben zu allen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräten. Alle verwendeten Löse-
mittel hatten die Reinheit p.a., wenn nicht anders angegeben.

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage TE 1246	Sartorius, Göttingen, D
Attafluor cell chamber	Invitrogen, Karlsruhe, D
Mikroskop Axiovert 100TV	Carl Zeiss, Jena, D
Extruder	Aventis, Ottawa, C
Fluoreszenz Plate Reader Fluostar Optima	BMG Labtech, Offenburg, D
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, D
ELISA Plate Reader Power Wave X	Bio-Tek Instruments, Vermont, USA
Rotationsverdampfer	Büchi, Flawil, CH
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim, D
Ultraschallbad Sonarex Super	Bandelin, Berlin, D
UV-Bestrahlungsapparatur BioSun®	Vilbert Lourmat Marnè-la-Vallée, F
UV/Vis Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Begasungsbrutschrank	Binder, Tuttlingen, 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
Sonifier (Branson 250) Heinemann	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D
Sterilbank Gelaire BSB 4A Flow Laboratories	Michigan City, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein Ag, Zürich, CH

Tabelle 3.2: Angaben zu den einzelnen Komponenten der HPLC

HPLC		
Pumpe	LaChrom L-7100	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Autosampler	Elite LaChrom L-2200	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Entgaser	L-7614	VWR, Darmstadt, D
Interface	LaChrom D-7000	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
UV-VIS Detektor	L-4250	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Dioden Array Detektor (DAD)	LaChrom L-7450	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Fluoreszenz Detektor	LaChrom L-7480	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Software	HPLC System Manager (HSM) Version 4.1	Merck-Hitachi, Darmstadt, D

Tabelle 3.3: Verwendete Materialien

Materialien	
Deckgläser Ø 25 mm (Zellkultur)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Einwegküvetten, No. 67.742, 1 dm, Plastik	Plastik Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (steril)	Pipetten Eppendorf, Hamburg, D
Küvetten 5 mm aus Quarzglas Suprasil®	Hellma, Müllheim, 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
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen, Ø 3,5 cm, Ø 6 cm	Greiner, Frickenhausen, D
MMP-1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	GE Healthcare, München, D

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Acetonitril (LiChrosolve®)	Merck, Darmstadt, D
Acrylsäure 99%, stabilisiert mit 0,02% Hydrochinonmonomethylether	Sigma, Steinheim, D
Albumin (BSA) Fraktion V ³ 98 %	Roth, Karlsruhe, D
Araldit	Fluka, Seelze, D
Bio-Rad D _C Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, D
Dichlormethan	Merck, Darmstadt, D
Dihydroxyisorenieratin	BASF, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid-d6	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
EDTA, Triplex III	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (LiChrosolve®)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol vergällt und absolut	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd (50%)	Science Services, München, D
H ₂ DCF-DA (2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat 97%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HCl 32%ig	Merck, Darmstadt, D
Isorenieratin	Bereitgestellt von Dr. S. Kock; Institut für Organische Chemie I; Universität Düsseldorf
Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe, D
L-Cystein-hydrochlorid	Sigma, Steinheim, D
L-α-Phosphatidylcholine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumsulfat	Riedel-de Haen, Seelze, D
Methanol (LiChrosolve®)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt, D
Osmiumtetroxid (4%)	Science Services, München, D
Penicillin Streptomycin (100x), 200 mmol/L	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Phospholipids B	Wako Chemicals GmbH, Neuss, D

Chemikalien	
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tetrahydrofuran	Fluka, Seelze, D
Thiobarbitursäure	Sigma, Steinheim, D
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, D
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, D
Wasser (LiChrosolve®)	Merck, Darmstadt, D
β-Apo 8'-carotenal (trans)	Fluka BioChemika, Seelze, D

Tabelle 3.5: Medien und Lösungen, die in der Zellkultur verwendet wurden

Medien / Lösungen	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phosphate-buffered Saline PBS (Natriumphosphatpuffer)	137 mmol/L NaCl 6,4 mmol/L Na ₂ HPO ₄
eigene Herstellung	2,6 mmol/L KCl 1,4 mmol/L KH ₂ PO ₄
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

1.11 Humane dermale Fibroblasten

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen von ATCC[®], USA und wurden aus der Vorhaut männlicher Neugeborener gewonnen. Die ATCC[®] Nummer lautet CRL-2076 und die Bestellnummer CCD-1064Sk. Die Zellen wurden für die Experimente in den Passagen 5-20 genutzt.

Zur Untersuchung der MMP-1 Konzentration wurden dermale Fibroblasten verwendet, die aus Biopsien aus der Vorhaut gesunder 2- bis 12-jähriger Jungen stammen. Die zur Isolation verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicher Weise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik in Grevenbroich. Für die Experimente wurden die Zellen zwischen den Passagen 2 bis 12 verwendet.

1.12 Die Bestrahlungseinheit BioSun

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Bestrahlungen wurden mit der Bestrahlungsapparatur BioSun der Firma Vilbert Lourmat durchgeführt. Mit dieser Apparatur ist es möglich, Proben mit UV-Licht im UVB-Bereich (360-280 nm) mit einem Wellenlängenmaximum bei 312 nm und im UVA-Bereich (310-400 nm) mit einem Wellenlängenmaximum von 365 nm oder einer Kombination aus beiden Wellenlängenbereichen zu bestrahlen. Die Bestrahlungsintensität liegt im UVA-Bereich bei 4,2 mW/cm² und im UVB-Bereich bei 1,22 mW/cm². Die Lampenspektren befinden sich im Anhang (vgl. 11).

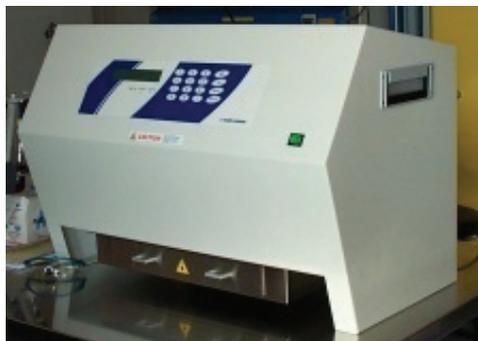


Abb. 3.1: Bestrahlungseinheit BioSun

4 Methoden

1.13 Herstellung der Liposomen

Zur Herstellung multilamellarer Liposomen wurde Phosphatidylcholin (PC) in Dichlormethan (DCM) gelöst und in einen Rundkolben gegeben. Um die Liposomen mit einer bestimmten Substanz, z.B. einem Carotinoid zu beladen, wurde eine entsprechende Menge an Substanz zu der PC / Dichlormethanlösung gegeben. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer bei einem Druck von 2 mbar entfernt, wodurch ein dünner Film aus Lipid und der zugesetzten Substanz auf der Glaswand verblieb. Durch die anschließende Zugabe von 100 mmol/L Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) und die Behandlung im Ultraschallbad (20 min) bilden sich spontan multilamellare, Liposomen in deren Membran die zugegebene Substanz eingebaut ist. Die Endkonzentration in der Liposomensuspension betrug 5 mg PC/mL Puffer.

Aus den multilamellaren Liposomen können durch Extrudieren unilamellare Liposomen gewonnen werden. Bei diesem Verfahren werden die mehrschichtigen Liposomen durch eine Polycarbonylmembran gepresst. Dieser Vorgang wird als Extrudieren bezeichnet. Die Liposomengröße ist dabei von dem Durchmesser der Poren in der Polycarbonylmembran sowie der Anzahl der Passagen abhängig.

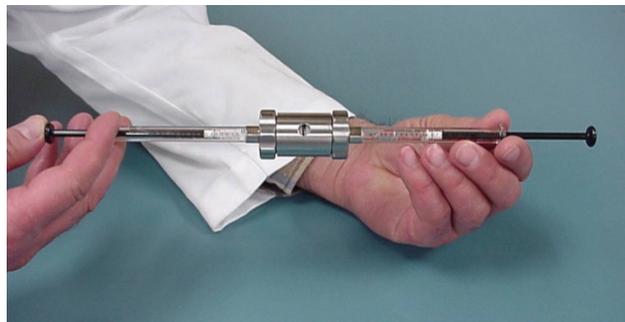


Abb. 4.1: Extruder zum herstellen von unilamellaren Liposomen

4.1.1 Bestrahlung der Liposomen

Die Liposomensuspension wurde in verschließbaren, runden Quarzglas-
küvetten mit Hilfe der BioSun mit verschiedenen Intensitäten an UV-Licht im
UVB- oder UVA-Bereich bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Proben
sofort analysiert oder, wenn das nicht möglich war, bei -80°C maximal 10 Tage
eingefroren.

1.14 Analyse von MDA als Indikator für die Lipidperoxidation

Thiobarbitursäurereaktive Substanzen (TBRS) wie Malondialdehyd (MDA)
bilden sich bei der Lipidperoxidation. Sie dienen als Indikator für die
Schädigung an z.B. Lipiden und Zellmembranen, die ungesättigten Fettsäuren
enthalten (Placer et al., 1966).

Zur Analyse von MDA in Liposomen- und Zellproben wurden diese
gegebenenfalls aufgetaut und gemischt. Anschließend wurden $50\ \mu\text{L}$ jeder
Probe in ein $1,5\ \text{mL}$ Reaktionsgefäß überführt und mit je $200\ \mu\text{L}$
Thiobarbitursäure (TBA) und $25\ \mu\text{L}$ 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT)
gemischt (siehe Tabelle 4.1). Das BHT ist ein Antioxidationsmittel, welches die
weitere Bildung von MDA während der folgenden Erhitzung und Aufarbeitung
der Proben verhindert. Die Proben wurden dann für 30 min bei 95°C erhitzt.
Dabei war die Bildung eines leicht rosa Farbstoffes zu beobachten (siehe Abb.
4.2).

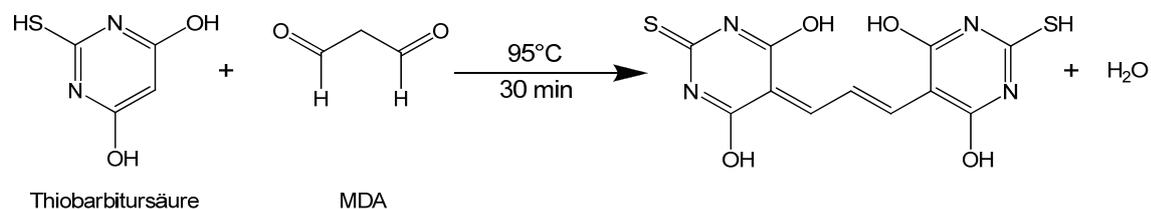


Abb. 4.2: Derivatisierungsreaktion von MDA mit Thiobarbitursäure

Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben auf Eis abgekühlt und
anschließend zentrifugiert, um restliche Bruchstücke der Liposomen abzu-
trennen. Anschließend erfolgte die Analyse per HPLC. Dazu wurden $50\ \mu\text{L}$ auf

einer LiChrosphere 100 RP 18 Säule der Firma Merck aufgetrennt und mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 513 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm detektiert. Eine Standardkurve für die MDA Bestimmung wurde mit 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) erstellt. Dazu wurde zuerst eine Lösung von TMP in 6:4 (v/v) Wasser / MeOH hergestellt und diese in unterschiedlichen Konzentrationen in reinem Wasser verdünnt.

Für die Normierung der MDA-Werte in Liposomen wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Wako (Phospholipid B) die Menge an PC bestimmt. Zur Normierung der MDA-Werte aus Zellen wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (vgl. 1.21).

Tabelle 4.1: Angaben zur Bestimmung von TBARS

Lösungen	
	0,4 % Thiobarbitursäure (TBA) in 0,2 mol/L HCL; die Lösung ist 1 Woche haltbar
	0,05 % 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT) in Ethanol
	1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMP)
HPLC	
Säule	LiChrosphere 100 RP 18; 5 µm
Laufmittel	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ Puffer; 50 mmol/L; pH 6,5; MeOH Verhältnis: 6:4 (v/v)
Fließgeschwindigkeit	1 mL/min
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge 513 nm Emissionswellenlänge 550 nm

1.15 Stabilität von Carotinoiden in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit UV-Licht

Um die Stabilität von Carotinoiden nach der Bestrahlung mit UV-Licht zu ermitteln, wurde eine kleine Menge an Lutein, IR und DHIR in THF gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungen in dem zur Analyse verwendeten Laufmittel hergestellt und die Carotinoide in runden Quarzglasküvetten mit Hilfe

der BioSun bestrahlt. Nach der Bestrahlung erfolgte sofort die Analyse mittels HPLC. Angaben zur Analyse befinden sich in Kapitel 1.19 und Tabelle 4.3. Es konnten keine Lösungen in wässrigen Systemen hergestellt werden, da Carotinoide in Wasser sehr schlecht bis unlöslich sind.

1.16 Isolation von humanen dermalen Fibroblasten aus Biopsien

Zuerst wurden die Biopsien mit kaltem Phosphate-buffered Saline (PBS) gewaschen und anschließend für 1 min in einer Lösung aus PBS mit 20 µg/mL Gentamicin gewaschen. Im nächsten Schritt wird das Fettgewebe mit einem Skalpell entfernt. Dabei darf das Gewebe nicht austrocknen. Die Biopsie wurde in möglichst kleine Stücke zerteilt und mit der Dermisseite nach unten auf einer Petrischale platziert. Nach 10 min Antrocknungszeit wurde das Gewebe mit Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), das mit 20% fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert wurde, aufgefüllt. Nach einigen Tagen im Inkubator (Temperatur: 37°C, Atmosphäre: 5% Kohlendioxid, wasserdampfgesättigt) wuchsen zuerst epitheliale Zellen aus der Biopsie. Nach einigen weiteren Tagen wuchsen darunter die Fibroblasten. Nachdem die Fibroblasten einen gewissen Konfluenzgrad erreicht hatten, wurden sie trypsinisiert und weiter kultiviert (Kap. 1.17).

1.17 Kultivieren der Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 2 mmol/L Glutamax und Penicillin / Streptomycin supplementiert war, kultiviert. Die Atmosphäre im Inkubator war bei 37°C wasserdampfgesättigt und hatte einen Anteil von 5% Kohlendioxid. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen zunächst mit Phosphate-buffered Saline (PBS) gewaschen und dann mit einer 1:1 Mischung aus Trypsin / EDTA und PBS trypsinisiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von FCS haltigem Medium gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann 1:5 in neue Kulturflaschen passagiert. Für die

einzelnen Versuche wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt und in Kulturschalen geeigneter Größe ausgesät.

1.18 Inkubation und Bestrahlung der Fibroblasten

Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen von 80-90% wurden diese mit PBS gewaschen und für 24 h mit FCS freiem Medium inkubiert. Das Fehlen der Wachstumsfaktoren im FCS freien Medium verhindert den weiteren Teilungsprozess der Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit FCS freiem Medium, welches die entsprechende Substanz in einer bestimmten Konzentration enthielt, für 24 h inkubiert. Die Konzentrationen für die Inkubation der Zellen in den verschiedenen Experimenten sind in den einzelnen Versuchsvorschriften angegeben.

Die so inkubierten Zellen wurden mit Hilfe einer UV-Lampe (BioSun) der Firma Vilbert Lourma bestrahlt (siehe 1.12). Dazu wurden die Zellen zuerst 2x mit PBS und 1x mit Hank's Buffered Saline (HBSS) gewaschen, um die nicht in die Zellmembran eingebauten Substanzen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS überschichtet und in der geöffneten Kulturschale in der Bestrahlungsapparatur mit unterschiedlichen Dosen UVA- oder UVB-Licht bestrahlt.

1.19 Stabilität von Carotinoiden in Fibroblasten unter Bestrahlung mit UV-Licht

Um die Stabilität der Carotinoide in Fibroblasten nach der Bestrahlung mit UV-Licht zu ermitteln, wurden Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen wie in Kapitel 1.18 beschrieben behandelt. Inkubiert wurden die Zellen mit DHIR, IR und Lutein. Die Bestrahlung erfolgte mit UVA mit 10, 20, 27,5 J/cm² und im Bereich von UVB mit 0,5 und 1,5 J/cm². Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen in PBS geerntet und ein Aliquot der Zellsuspension zur Proteinbestimmung mittels Lowry entnommen. Für die Analyse mittels HPLC wurden die Carotinoide aus den Zellen extrahiert. Dazu wurden 2,5 mL der Suspension

aus Zellen und PBS mit 0,5 mL Tetrathydrofuran (THF) gemischt, und es wurden 0,2 nmol β -Apo-8'-Carotenal als interner Standard zugegeben. Die anschließende Behandlung für 5 min im Ultraschallbad diente dazu, die Carotinoide aus der Zellmembran zu lösen. Durch die Zugabe von 3 mL n-Hexan kommt es zur Phasentrennung, wobei die Carotinoide durch nochmaliges Behandeln im Ultraschallbad in die obere organische Phase übergehen. Dies geschieht nahezu vollständig, wie Untersuchungen des wässrigen Rückstandes ergaben. Die organische Phase wurde dann im Stickstoffstrom getrocknet, und der verbleibende feste Rückstand in einem Gemisch aus Laufmittel und THF aufgenommen. Zur Analyse wurden 50 μ L auf die Säule gegeben.

Tabelle 4.2: Konzentrationen an Carotinoiden mit der die Fibroblasten inkubiert wurden und Bestrahlungsdosen

Carotinoid	Konzentration im Medium zu Beginn des Versuches	
DHIR	1,5 / 5 /10 μ mol/L	
IR	1,5 / 5 /10 μ mol/L	
Lutein	1,5 / 5 /10 μ mol/L	
Bestrahlung	UVA	UVB
Dosis	10 / 20 / 27,5 J/cm ²	0,5 / 1,5 J/cm ²

Tabelle 4.3: HPLC-Bedingungen zum Nachweis von DHIR, IR und Lutein

Analytik	DHIR	IR	Lutein
Säule	Supelco, Bellefonte, PA, pKb-100, 250 x 4,6 mm		
Laufmittel	(v/v/v/v)		
MeOH	52%	52%	52%
ACN	42%	42%	42%
Wasser	4%	6%	4%
2-Propanol	2%	0%	2%
Fließgeschwindigkeit	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
UV/Vis Detektor	460 nm	450 nm	444 nm

1.20 Bestimmung der Zellviabilität mittels SRB Assay

Mit Hilfe des Sulforhodamin B Assays kann die Zellviabilität und somit auch die Zytotoxizität von Substanzen, mit denen die Zellen inkubiert wurden, bestimmt werden (Skehan et al., 1990). Bei diesem Verfahren wird die negativ geladene Sulfoniumgruppe des rosa Farbstoffes Sulforhodamin B elektrostatisch an die positive Ladung der Aminosäuren zellulärer Proteine gebunden. Da die Proteinmenge mit der Zellzahl korreliert, kann somit bestimmt werden wie viele Zellen ein Experiment, z. B. die Bestrahlung mit UV-Licht, überlebt haben. Der Farbstoff Sulforhodamin B lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm vermessen.

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen wie in Kapitel 1.18 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend je nach Volumen der Kulturplatte bzw. -schale für 1 h bei 4°C mit eiskalter 10% Trichloressigsäure (TCA) überschichtet. Im Folgenden wurden die nun am Gefäßboden fixierten Zellen mit Reinstwasser gewaschen und bei RT getrocknet. Durch Zugabe von 0,4% Sulforhodamin B in 1% Essigsäure (w/v) für 10 min wurden die Zellen angefärbt und anschließend 5x mit 1% Essigsäure (v/v) gewaschen und getrocknet. Um den Farbstoff wieder zu lösen, wurde 10 mmol/L Tris Lösung zugegeben. Jeweils 100 µL wurden dann in eine „96 well“ Platte überführt und mit Hilfe eines „Plate Readers“ die Absorption bei 492 nm und 620 nm vermessen. Die Messung der Absorption bei 620 nm erfasst mögliche Schwebeteilchen in der Lösung und wurde von dem Absorptionswert bei 492 nm subtrahiert. Die ermittelte Absorption korreliert linear mit der Zellzahl.

Tabelle 4.4: Volumenangaben für den SRB-Assay

Kulturgefäß	0,4% SRB Lösung	10 mmol/L Tris Lösung
6 Well Platte	800 µL	400 µL
24 Well Platte	300 µL	130 µL

1.21 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte nach Lowry mit Hilfe eines Kits der Firma BioRad. Dazu wurden in einer Einmalküvette 20 μL des zuvor zentrifugierten Zelllysats mit 100 μL Reagenz S* und 800 μL Reagenz B für 15 min inkubiert und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm vermessen. Zu jeder Proteinbestimmung wurde eine Standardkurve mit Rinderserumerum Albumin (BSA) erstellt. Als Referenz wurde ein Reaktionsansatz mit bidestilliertem Wasser vermessen.

1.22 Bestimmung der MMP-1 Konzentration mittels ELISA

Dermalen Fibroblasten sezernieren das produzierte MMP-1 *in vivo* in die extrazelluläre Matrix. In der Zellkultur (*in vitro*) entspricht dies dem Medium, in dem die Zellen kultiviert werden. Die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium der Zellen wurde mit einem „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) der Firma GE Healthcare bestimmt. Die in diesem Experiment verwendeten humanen dermalen Fibroblasten wurden aus Biopsien wie in Kapitel 1.16 beschrieben gewonnen.

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen wie in Kapitel 1.18 beschrieben behandelt. Die Carotinoidkonzentrationen, mit der die Zellen inkubiert wurden, lagen bei 1,5, 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$ (Konzentration im Medium zu Beginn des Versuches). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5 mmol/L NAC inkubiert. Da NAC den pH Wert des Kulturmediums in den sauren Bereich verschob, wurde es mit Natronlauge wieder neutralisiert. Die Zellen wurden mit 20 mJ/cm^2 UVB bestrahlt. Nach einer 24-stündigen Postinkubation wurde das Medium abgenommen und nach der Versuchsvorschrift des ELISA die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium bestimmt. Die MMP-1 Konzentration wurde auf die Zellviabilität, welche mit der Zellzahl und der Proteinmenge korreliert, normiert (Skehan et al., 1990).

1.23 Indirekte Messungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetate (H_2DCF -DA) ist es möglich, die ROS-Bildung in Zellen zu messen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist membrangängig und wird nach Abspaltung der Acetatgruppen im Cytosol durch intrazelluläre Esterasen membranimpermeabel. Die im Cytosol gebildeten ROS oxidieren H_2DCF zu Dichlorfluorescein (DCF) (Hempel et al., 1999), welches sich mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emmisionswellenlänge von 520 nm detektieren lässt.

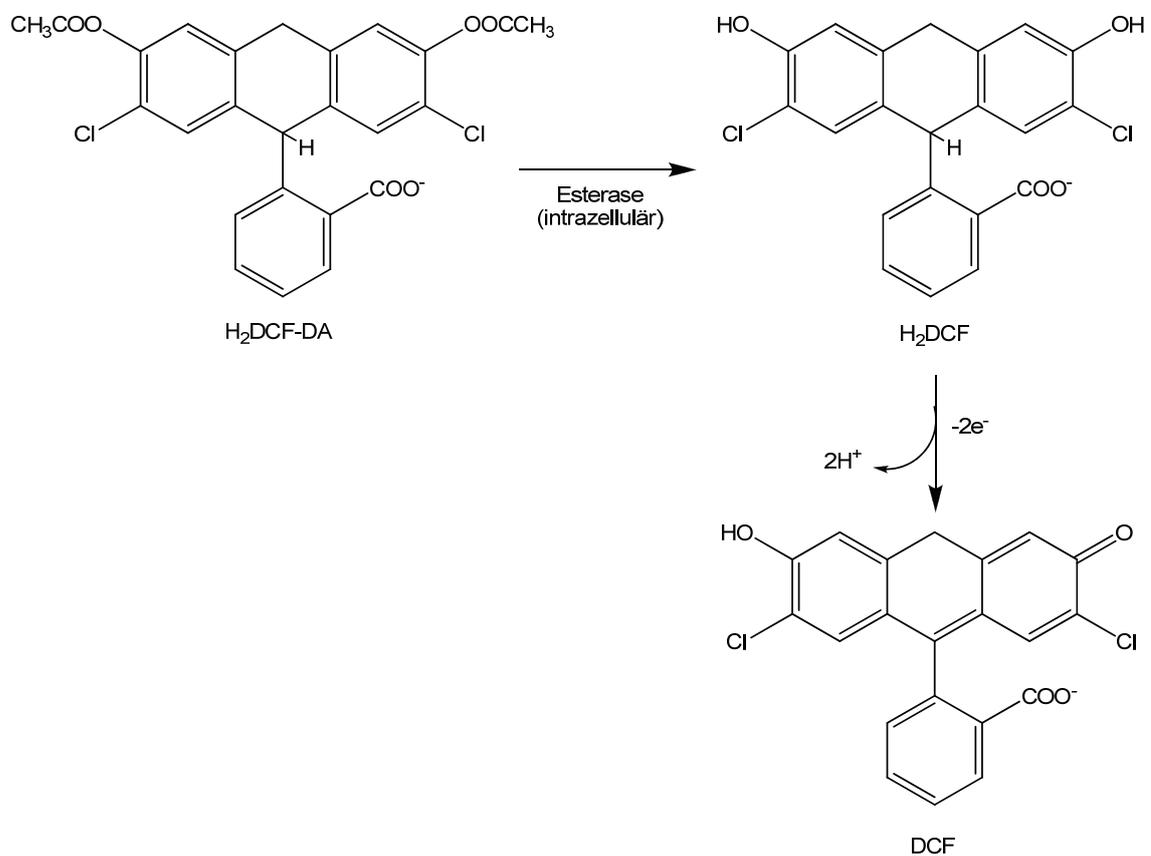


Abb. 4.3: Reaktion von H_2DCF -DA

4.1.2 Nachweis von ROS mittels Fluoreszenzphotometer

Um die Bildung von ROS in Zellen per Fluoreszenzphotometer zu untersuchen, wurden die Zellen wie in Kapitel 1.17 beschrieben kultiviert und in „24 well Platten“ ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen mit den entsprechenden Carotinoiden für 24 h inkubiert und nach mehrmaligem Waschen in 0,5 mL HBSS bestrahlt (vgl. 1.18). Es wurde eine 1 mol/L Stammlösung von H₂DCF-DA in DMSO hergestellt und diese in HBSS verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 100 nmol/L vorlag. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 0,5 mL dieser Lösung überschichtet und mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers die Bildung von DCF über einen Zeitraum von 40 min vermessen. Die Anregungswellenlänge liegt bei 485 nm und die Emissionswellenlänge liegt bei 520 nm.

Tabelle 4.5: Konzentration an Carotinoiden mit der die Fibroblasten inkubiert wurden und Bestrahlungsdosen

Carotinoid	Konzentration	Bestrahlung
Lutein	1,5 / 5 / 10 µmol/L	UVA 0, 5, 10, 20 J/cm ²
IR	1,5 / 5 / 10 µmol/L	
DHIR	1,5 / 5 / 10 µmol/L	

4.1.3 Nachweis der ROS-Bildung mittels Fluoreszenzmikroskop

Die Bildung von ROS wurde zuerst mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht. Dazu wurden die Fibroblasten in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm, welche mit runden Glasplättchen versehen waren, bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 1.18 beschrieben mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und bestrahlt (Tabelle 4.6). Es wurde eine 1 mol/L Stammlösung von H₂DCF-DA in DMSO hergestellt und diese in HBSS verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 1 µmol/L vorlag. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 1 mL dieser Lösung überschichtet und für 1 h im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und die Glasplättchen in Attafluor Zellkammern eingespannt. Damit die Zellen während der Messung nicht austrockneten, wurden sie mit HBSS überschichtet. Die Detektion des gebildeten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte mit Hilfe eines

Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskopes. Die Anregungswellenlänge liegt bei 485 nm und die Emissionswellenlänge liegt bei 520 nm.

Tabelle 4.6: Konzentration, mit der die Fibroblasten inkubiert wurden und Bestrahlungsdosen

Substanz	Konzentration	Bestrahlung
THF (Kontrolle)	0,1 %	
Lutein	10 µmol/L	UVA
IR	10 µmol/L	0, 5, 10, 20 J/cm ²
DHIR	10 µmol/L	

1.24 Freisetzung von komplexierten Metallionen aus einem Modellpeptid

In diesem Modellsystem wird die Cobalt(II)-Freisetzung aus einem synthetisch hergestellten metall-komplexierenden Peptid untersucht. Die Bindungsstellen für das Co-Ion sind zwei Cysteine und zwei Histidine. Diese sind in der nachfolgenden Aminosäuresequenz des Peptids unterstrichen.

H₂N-Arg-Pro-Phe-Met-Cys-Thr-Trp-Ser-Tyr-Cys-Gly-Lys-Arg-Phe-Thr-Arg-Ser-Asp-Glu-Leu-Gln-Arg-His-Lys-Arg-Thr-His-Thr-Gly-COOH

In Abb. 4.4 ist das Absorptionsspektrum des Peptids dargestellt. Liegt das Peptid ohne Co(II)-Ionen vor so ist in einem Wellenlängenbereich von 550-700 nm keine Absorption zu beobachten. Wird eine Lösung von Co(II) zugesetzt so wird das Ion von dem Zinkfinger komplexiert und es ist eine Absorption im Bereich von 550-700 nm zu beobachten. Das Absorptionsmaximum liegt bei 642 nm. Wird durch UV-Einwirkung das Peptid zerstört z.B. durch Oxidation der beiden Cysteine zu einer Disulfidbrücke, kann das Co(II) nicht mehr komplexiert werden. Das Co(II) wird aus dem Komplex freigesetzt und die beobachtete Absorption im Bereich zwischen 550-700 nm nimmt ab. Damit ist die Abnahme der Absorption ein Maß für die Modifikation des Peptids.

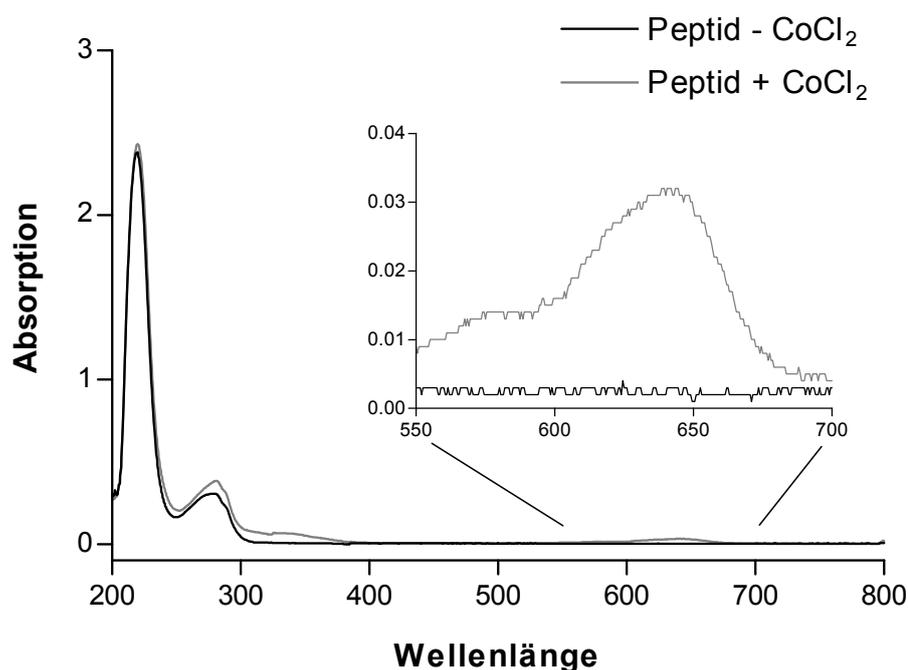


Abb. 4.4: Absorptionsspektrum des Peptids ohne Co(II) und mit Co(II) komplexiert

4.1.4 Aufnahme der Absorptionsspektren des Peptid-Metall-Komplex

Das in einem Gemisch aus 50:50 (v/v) HEPES / EtOH und NaCl gelöste Peptid wurde mit CoCl_2 vermischt (Tabelle 4.7). Dies führte zu der typischen Absorptionsbande im Bereich von 550-700 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 643 nm. Die Lösung wurde dann in verschließbaren Quarzglasküvetten mit der BioSun Bestrahlungsapparatur mit UVA- oder UVB-Licht bestrahlt und anschließend photometrisch vermessen.

Tabelle 4.7: Volumenangaben zum Reaktionsansatz

Reaktionsansatz	Volumen	Konzentration
NaCl (50 mmol/L)	90 μL	8,6 mmol/L
HEPES (5 mmol/L) / EtOH 50:50 (v/v)	360 μL	HEPES 3,3 mmol/L EtOH 33% (v)
Peptid (2 mmol/L)	24 μL	0,09 mmol/L
CoCl_2 (2,5 mmol/L)	50 μL	0,24 mmol/L
IR, DHIR (1,5 mmol/L)	1,5 μL	$4,3 \cdot 10^{-3}$ mmol/L

1.25 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an dermalen Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% in 10 cm Kulturschalen kultiviert. Anschließend erfolgte wie in Kapitel 1.18 beschrieben die Inkubation der Zellen für 24 h mit 0,1% THF als Kontrolle und 10 µmol/L DHIR. Die Zellen wurden nach der Inkubation je 2x mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die so abgelösten Zellen wurden in ein Greiner-röhrchen überführt und das Trypsin durch 2x Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellpellets 3x mit 0,1 mol/L Natriumphosphatpuffer pH 7,2 (Natriumphosphat-Puffer) gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 2,5 % Glutaraldehyd für 10 min bei RT behandelt. Nach erneutem 3x Waschen mit 0,1 mol/L Natriumphosphat-Puffer wurden die Pellets mit 2 % Osmiumtetroxid in Natriumphosphat-Puffer für 40 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellpellets 5x mit autoklaviertem kaltem Reinstwasser gewaschen und mit 2 % Uranylacetat in Wasser 30 min bei RT im Dunkeln behandelt. Nach nochmaligem Waschen (5x) mit Reinstwasser erfolgte die Dehydrierung der Zellpellets mittels einer Ethanolreihe. Dazu wurden die Pellets jeweils für 10 min bei RT mit 50%, 70%, 90%, 96% EtOH inkubiert und anschließend jeweils 2x mit 100% EtOH absolut (getrocknet über Molekularsieb) und 2x mit 100% Aceton (getrocknet über Molekularsieb) behandelt. Dann erfolgte eine 24 h Inkubation bei 4°C mit einem 1:1 Gemisch aus Aceton : Araldit. Anschließend wurde das Aceton verdampft und das Pellet in frisches Araldit überführt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 h wurde das Pellet in eine Einbettungsform überführt, in der das Araldit innerhalb von 24-48 h auspolymerisierte. Von den erhaltenen Probenblöcken wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von ca. 50 Å angefertigt und diese mit dem Elektronenmikroskop EM 109 der Firma Zeiss untersucht.

1.26 Synthese von S-Nitrosocystein

Lösungen von S-Nitrosocystein wurden immer frisch aus einem Reaktionsansatz von Cystein mit einer äquimolaren Stoffmenge an Natriumnitrit in 0,1 mol/L HCl hergestellt. Nach ca. 5 min Reaktionszeit waren mehr als 90% Cystein zu S-Nitrosocystein umgesetzt. Die Lösung wurde mit 1/10 des Volumens mit einer Lösung aus 1 mol/L Kaliumphosphat (pH 7,2) und 10 mol/L EDTA neutralisiert. Die Konzentration von S-Nitrosocystein wurde photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient liegt bei einer Wellenlänge von 330 nm bei $594 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Da S-Nitrosocystein eine sehr instabile Substanz ist, war es nicht möglich, eine Aufreinigung durchzuführen. Die Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein wurden per HPLC detektiert. Dazu wurde eine Phenomenex Synergie Säule isokratisch mit 10 mmol/L Ammoniumphosphat (pH 2,7) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert.

Tabelle 4.8: HPLC Detektion der Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

HPLC Daten	
Säule	Phenomenex Synergie 4,6mmØ, 250 mm 4 µm, Torrence, CA
Laufmittel	10 mmol/L Ammoniumphosphat, pH 2,7
Fließgeschwindigkeit	1 mL/min
UV/Vis Detektor	330 nm und 210 nm

4.1.5 Charakterisierung der Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

Eine Lösung aus 20 mmol/L S-Nitrosocystein wurde für ca. 300 h in einer Lösung aus 100 mmol/L Kaliumphosphat (pH 7,2) und 1 mmol/L EDTA bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Ansäuern der Lösung wurde diese mit t-Butylmethylether extrahiert. Die präparative Aufreinigung des Extraktes erfolgte mittels einer Phenomenex Synergie Säule. Diese wurde isokratisch mit 50 mmol/L Ammoniumformiat (pH 2,8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit t-Butylmethylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Abfiltrieren des Feststoffes am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Der verbleibende Rückstand wurde in DMSO- d_6 für die NMR Analyse gelöst.

Tabelle 4.9: HPLC Daten für die präperative Aufarbeitung der Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

HPLC Daten	
Säule	Phenomenex Synergie 4,6mmØ, 250 mm 4 µm, Torrence, CA
Laufmittel	50 mmol/L Ammoniumformiat, pH 2,8
Fließgeschwindigkeit	1 mL/min
UV/Vis Detektor	330 nm und 210 nm

1.27 Statistik

Die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichung (SD) erfolgte mit Hilfe der Software Excel 2003 von Microsoft®. Die Ermittlung der Signifikanzniveaus (p) erfolgte mit dem Student t-Test, ebenfalls mit Excel. Hierbei wird von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen und ein zweiseitiger Test durchgeführt, der die Nullhypothese ablehnt, wenn $p \leq 0,05$, also das Signifikanzniveau geringer oder gleich 5% ist.

5 Ergebnisse

Im Ergebnissteil werden zuerst die Resultate aus den speziell entwickelten Modellsystemen wiedergegeben, und anschließend erfolgt die Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen in Zellkultur. Die Carotinoide Isorenieratin und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin sind mit IR bzw. DHIR abgekürzt.

1.28 Absorptionsspektren der untersuchten Carotinoide

Voraussetzung für die sensitive UV/Vis-Detektion von Carotinoiden mit dem Verfahren der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) ist die Bestimmung der Absorptionsmaxima der Substanzen in den entsprechenden HPLC-Laufmitteln. Dazu wurden die Carotinoide in THF gelöst und mit HPLC-Laufmittel (vgl. 1.15) verdünnt. Anschließend wurde im Photometer ein Spektrum im Bereich von 200-600 nm aufgenommen.

In Abb. 5.1 ist das Absorptionsspektrum von Lutein in einem Wellenlängenbereich von 200-600 nm gezeigt. Es sind drei Maxima bei jeweils 420, 444 und 472 nm zu beobachten. Für die späteren HPLC-Messungen wurde das Wellenlängenmaximum von 444 nm zur Detektion verwendet.

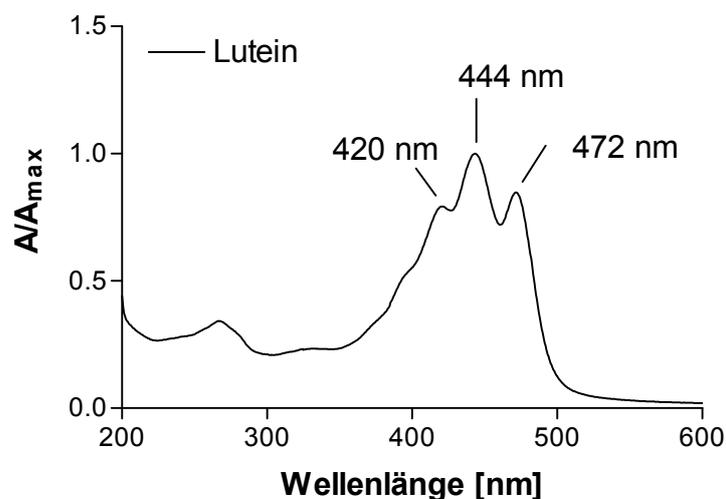


Abb. 5.1: Absorptionsspektrum von Lutein; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 4%

Wasser / 2% 2-Propanol (v/v/v)

Das Absorptionsspektrum von IR ist in Abb. 5.2 dargestellt und weist zwei Absorptionsmaxima auf. Diese liegen bei 448 und 477 nm. In den späteren HPLC-Messungen wurde das Wellenlängenmaximum von 448 nm zur Detektion verwendet.

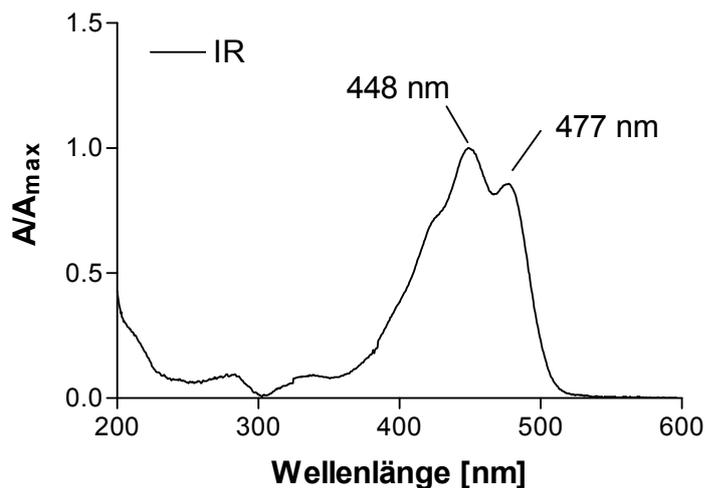


Abb. 5.2: Absorptionsspektrum von IR; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 6% Wasser (v/v/v/v)

In Abb. 5.3 ist das Absorptionsspektrum von DHIR gezeigt. Das Absorptionsspektrum weist bei 461 nm ein Maximum auf. In den späteren HPLC-Messungen wurde das Wellenlängenmaximum von 461 nm zur Detektion verwendet.

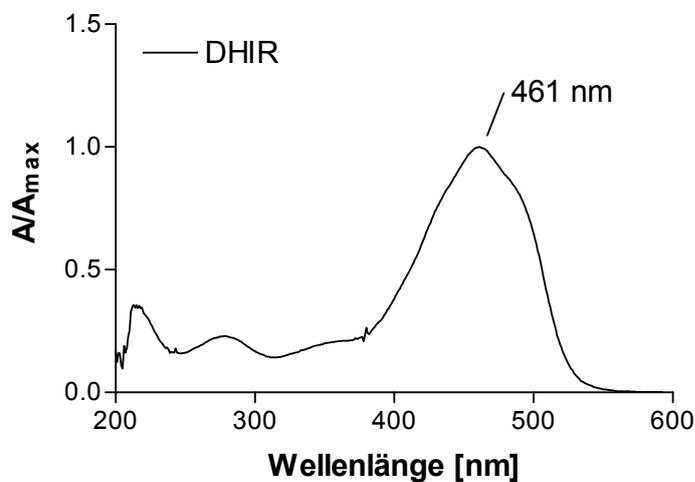


Abb. 5.3: Absorptionsspektrum von DHIR; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 4% Wasser / 2% 2-Propanol (v/v/v/v)

1.29 HPLC-Chromatogramme der untersuchten Carotinoide

Die Bestimmung der Carotinoidkonzentration in Liposomen und dermalen Fibroblasten erfolgte mittels HPLC. Dazu wurden bereits bestehende Analysemethoden für Lutein weiter optimiert und für IR und DHIR neue Methoden entwickelt. Vor der Extraktion der Carotinoide aus den Liposomen- und Zellproben wurde β -Apo-8'-carotenal als interner Standard zugesetzt. Durch Verwendung des internen Standards konnten mögliche Verluste an Carotinoid während der Aufarbeitung der Proben erkannt und korrigiert werden. In den Abb. 5.4 bis Abb. 5.6 sind die Chromatogramme der verwendeten Carotinoide gezeigt. In Abb. 5.4 ist das HPLC-Chromatogramm von Lutein zu sehen. Die Retentionszeit von Lutein liegt, unter den angegebenen HPLC Bedingungen, bei 10 min und die des internen Standards β -Apo-8'-carotenal bei 9,3 min. Die Signale sind eindeutig voneinander getrennt.

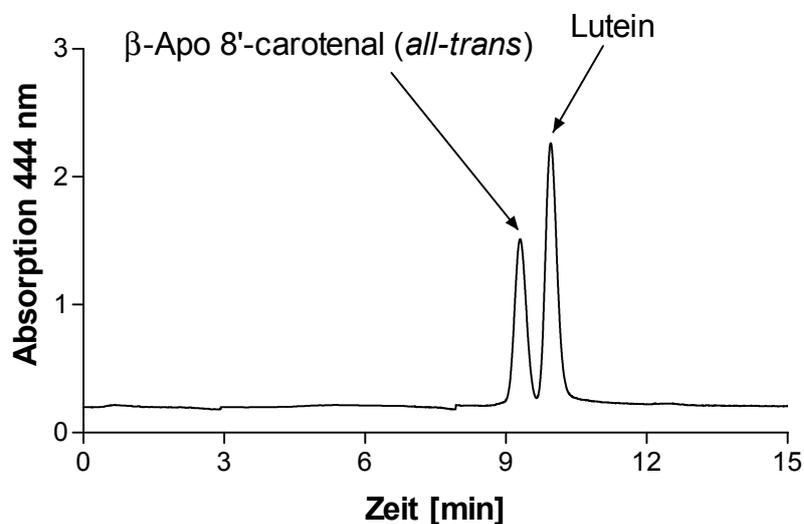


Abb. 5.4: HPLC-Chromatogramm von Lutein und dem internen Standard β -Apo-8'-carotenal; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 4% Wasser / 2% 2-Propanol (v/v/v/v)

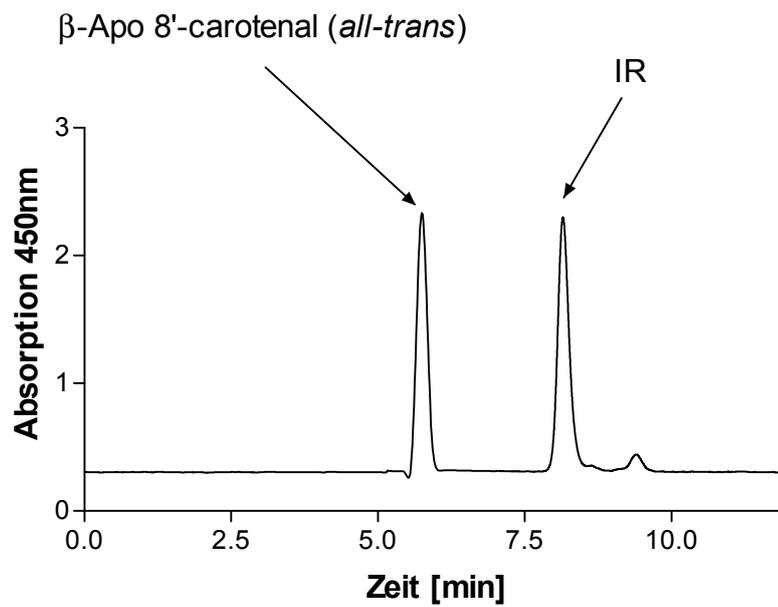


Abb. 5.5: HPLC-Chromatogramm von IR und dem internen Standard β -Apo-8'-carotenal; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 6% Wasser (v/v/v/v)

Die Abb. 5.5 zeigt das HPLC-Chromatogramm von IR. Die Retentionszeit von IR liegt unter den angegebenen Bedingungen bei 8,2 min und die des internen Standards bei 5,7 min. Die Retentionszeit für den internen Standard ist hier zu kürzeren Zeiten verschoben, da im Laufmittel der polare Anteil an 2-Propanol fehlt (vergleiche Abb. 5.4).

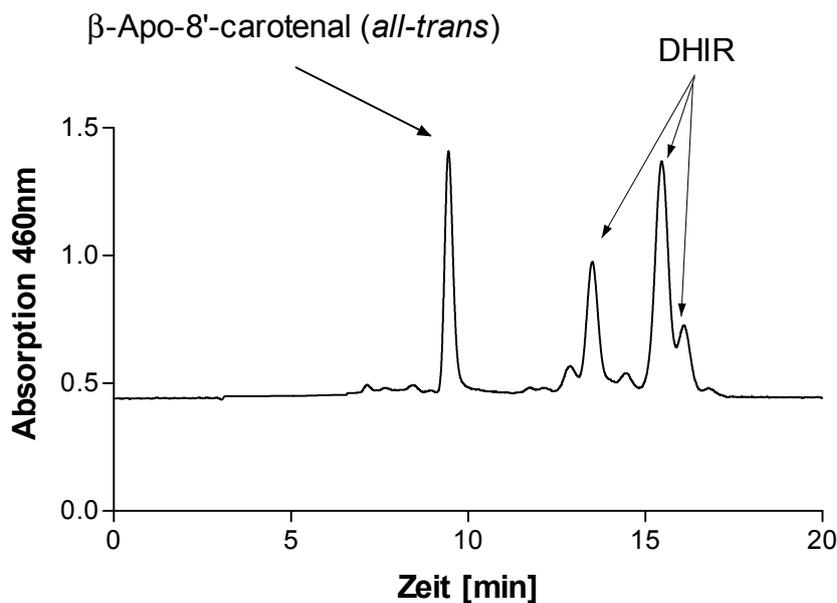


Abb. 5.6: HPLC-Chromatogramm von DHIR und dem internen Standard β -Apo-8'-carotenal; HPLC-Laufmittel: 52% MeOH / 42% ACN / 4% Wasser / 2% 2-Propanol (v/v/v/v)

Das Chromatogramm von DHIR in Abb. 5.6 weist drei Signale auf, bei denen es sich wahrscheinlich um das *all-trans* DHIR und verschiedene *cis* Isomere handelt. Diese liegen bei Retentionszeiten von 13,5 min, 15,5 min und 16,1 min und werden alle zur quantitativen Auswertung herangezogen. Der interne Standard zeigt hier ebenfalls ein Signal bei 9,4 min. Eine Zuordnung der weiteren Signale war nicht möglich, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

1.30 Wirkung von UV-Licht auf die Stabilität der Carotinoide

Carotinoide sind lichtempfindliche Substanzen. Sie werden unter anderem durch Bestrahlung mit UVA- und UVB-Licht zerstört. Da in dieser Arbeit Bestrahlungsexperimente durchgeführt wurden, war es notwendig, die Stabilität der eingesetzten Substanzen Lutein, IR und DHIR unter UV-Bestrahlung zu ermitteln. In diesem Experiment wurde die Stabilität der Carotinoide nach Bestrahlung mit 10 und 27,5 J/cm² UVA und 0,5 und 1,5 J/cm² UVB untersucht. Dazu wurden die Carotinoide zuerst in THF gelöst und anschließend im HPLC-

Laufmittel (MeOH/ACN/Wasser/2-Propanol) (vgl. 1.15) verdünnt. Die erhaltenen Carotinoidlösungen wurden in Quarzglasküvetten in der BioSun-Apparatur bestrahlt. Vor und nach der Bestrahlung der Carotinoidlösung erfolgte die Analyse mittels HPLC. Zur Auswertung wurden die Flächen unter den entsprechenden Signalen herangezogen. Die Konzentration der unbestrahlten Carotinoidlösung entspricht 100%, die Ergebnisse nach der Bestrahlung wurden auf diese Konzentration bezogen.

In Abb. 5.7 ist die Abnahme der Konzentration der Carotinoide Lutein, IR und DHIR unter Bestrahlung mit 10 und 27,5 J/cm² UVA gezeigt. Für alle drei Carotinoide ist bei einer Dosis von 10 J/cm² UVA eine Abnahme der Konzentration um 30% zu beobachten. Bei Bestrahlung mit einer Dosis von 27,5 J/cm² UVA liegt die Abnahme von Lutein und DHIR bei ca. 70%. IR ist mit einer Abnahme von 37% bei dieser Bestrahlungsdosis stabiler als die beiden anderen Carotinoide.

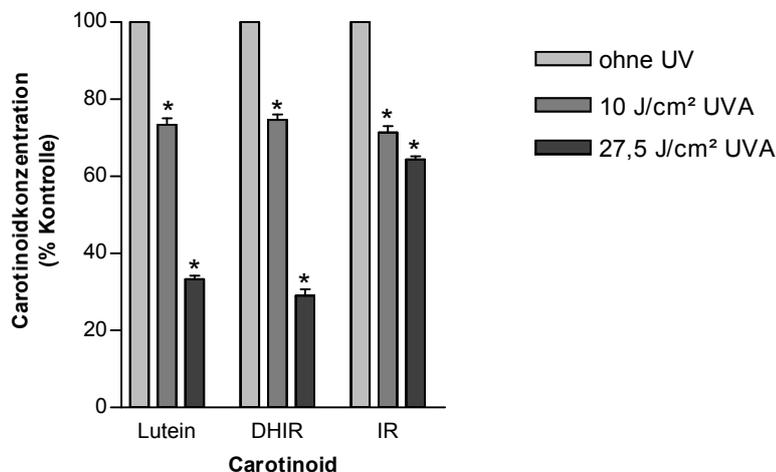


Abb. 5.7: Stabilität der Carotinoide Lutein, DHIR und IR unter Bestrahlung mit UVA-Licht, * $p \leq 0,05$

In Abb. 5.8 ist die Abnahme der Konzentration der Carotinoide Lutein, DHIR und IR unter Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB dargestellt. In diesem Diagramm ist zu sehen, dass der Substanzverlust bei einer Bestrahlungsdosis von 0,5 J/cm² UVB mit ca. 20% bei allen Carotinoiden gleich ist. Dasselbe gilt für die Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVB. Hier ist bei allen Carotinoiden eine Abnahme von ca. 35% zu beobachten.

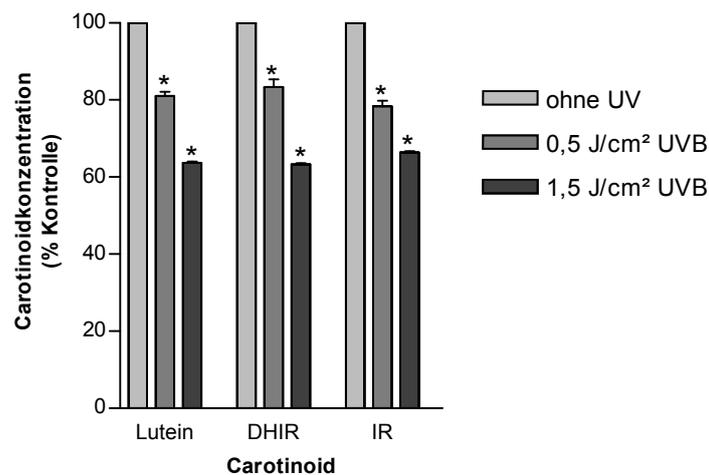


Abb. 5.8: Stabilität der Carotinoide Lutein, DHIR und IR unter Bestrahlung mit UVB, * $p \leq 0,05$

Die Stabilität der drei untersuchten Carotinoide ist unter der Bestrahlung mit geringeren Dosen UVA (10 J/cm²) und UVB (0,5 und 1,5 J/cm²) vergleichbar. IR erweist sich bei einer Bestrahlung mit 27,5 J/cm² UVA gegenüber Lutein und DHIR als stabiler.

1.31 Wirkung von Carotinoiden auf die Bildung von MDA in Liposomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Liposomenmodell entwickelt, mit dessen Hilfe pro- oder antioxidative Eigenschaften verschiedener Substanzen in lipophilen Kompartimenten, wie Lipidmembranen, untersucht werden können. Dazu wurden Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) hergestellt und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lutein, IR oder DHIR beladen. Die so präparierten Liposomen wurden mit UVA- oder UVB-Licht bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird die Lipidperoxidation induziert, und es kommt zu oxidativen Schäden an der Modellmembran (vgl. 1.3). Ein Marker für diese Schäden ist das während der Lipidperoxidation gebildete Malondialdehyd (MDA). MDA kann mit Thiobarbitursäure zu einem Farbkomplex derivatisiert werden. Der entstehende Farbstoff wird mit Hilfe der HPLC quantitativ bestimmt und ist ein Maß für die Bildung von MDA bzw. für die oxidative Schädigung der Liposomen. Die Detektion des Farbkomplexes erfolgt mittels HPLC-Fluoreszenzdetektor bei

einer Anregungswellenlänge von 513 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm. Um die MDA-Konzentration zu bestimmen, wurde zu jeder Versuchsreihe eine entsprechende Standardkurve mit 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) angefertigt. TMP setzt unter sauren Bedingungen durch zweifache Hydrolyse eine stöchiometrische Menge an MDA frei (Marnett & Tuttle, 1980). In dem Modellsystem sollte untersucht werden, ob die Beladung von Liposomen mit Lutein, IR oder DHIR die Bildung von MDA und somit die oxidative Schädigung an der Lipidmembran durch antioxidative oder prooxidative Effekte der Carotinoide verhindert oder fördert.

Zu Beginn des Experimentes wurden unbehandelte (Carotinoid-freie) Liposomen mit verschiedenen Dosen an UVA- und UVB-Licht bestrahlt. In Abb. 5.9 sind die MDA-Konzentrationen in unbehandelten Liposomen nach der Bestrahlung mit 10 und 27,5 J/cm² UVA und 0,5 und 1,5 J/cm² UVB gezeigt. Bei allen Bestrahlungsdosen (im UVA- und UVB-Bereich) wird signifikant mehr MDA gebildet als in Liposomen, die nicht bestrahlt werden. Signifikante Unterschiede zur unbestrahlten Kontrolle sind durch ein * gekennzeichnet. MDA-Werte, die mit zwei ** gekennzeichnet sind, unterscheiden sich zusätzlich signifikant von der jeweils niedrigeren Bestrahlungsdosis. Wie in Abb. 5.9 zu sehen, wird bei einer Bestrahlung der Liposomen mit 0,5 J/cm² UVB um das 1,4-fache und bei einer Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVB um das 1,9-fache mehr MDA gebildet wie in unbestrahlten Liposomen. Der MDA-Wert der Liposomen, die mit 1,5 J/cm² UVB bestrahlt wurden, ist im Vergleich zu der niedrigeren Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVA signifikant erhöht. Werden die Liposomen mit 10 J/cm² UVA und 27,5 J/cm² UVA bestrahlt, steigt die MDA-Konzentration im Vergleich zu unbestrahlten Liposomen um das 2,3- bzw. 4,5-fache an. Auch hier ist die MDA-Konzentration in den Liposomen, die mit der höheren Dosis UVA (27,5 J/cm²) bestrahlt wurden, signifikant um das 2,2-fache gegenüber der niedrigeren Dosis von 10 J/cm² UVA erhöht.

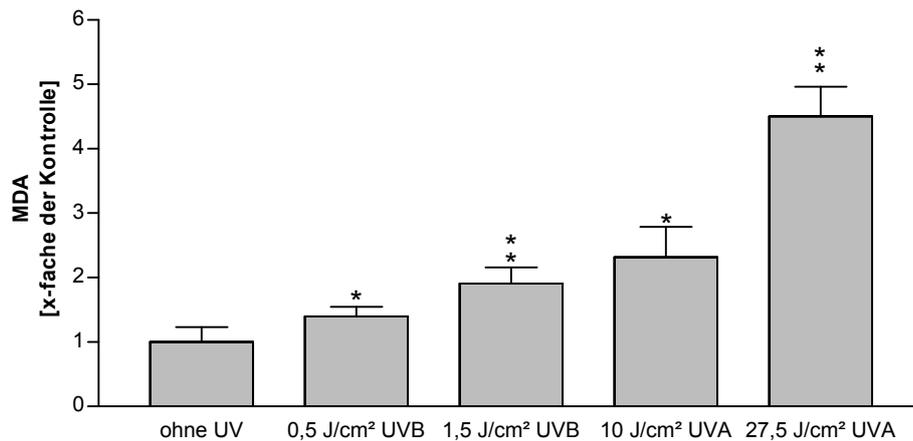


Abb. 5.9: MDA in Liposomen nach Bestrahlung mit UVB und UVA, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$

Die folgenden Diagramme in Abb. 5.10 bis Abb. 5.24 sind so dargestellt, dass auf der x-Achse die Konzentration des Carotinoids, mit der die Liposomen beladen wurden, in nmol/mg Phosphatidylcholin (PC) angegeben ist. Auf der y-Achse ist die Menge an MDA als x-faches der Kontrolle dargestellt. Die Gerade in jedem Diagramm stellt den MDA-Wert der Kontrolle dar. Dies ist der MDA-Wert von unbehandelten (Carotinoid-freien) Liposomen, die mit der entsprechenden Dosis UVB oder UVA bestrahlt wurden. Wenn der MDA-Wert der mit Carotinoid beladenen Liposomen unter dem MDA-Wert der Kontrolle liegt, wirkt das Carotinoid, mit dem die Liposomen inkubiert wurden, antioxidativ, vermindert die Bildung von MDA. Liegt der MDA-Wert, der mit Carotinoid beladenen Liposomen über dem MDA-Wert der Kontrolle, so wirkt das Carotinoid, mit dem die Liposomen inkubiert wurden, prooxidativ. Es fördert also die Bildung von MDA.

In den Diagrammen in Abb. 5.11 bis Abb. 5.14 ist die MDA-Bildung in Liposomen, welche mit verschiedenen Konzentrationen an Lutein beladen und mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB sowie mit 10 und 27,5 J/cm² UVA bestrahlt wurden, gezeigt. In Abb. 5.10 ist die MDA-Bildung in unbestrahlten Liposomen dargestellt. Bei Konzentrationen von Lutein zwischen 0,005 und 10 nmol/mg PC ist zu erkennen, dass die MDA-Bildung vermindert ist. Die MDA-Werte liegen bei einer Konzentration von 0,005 / 2 und 10 nmol/mg PC signifikant um das 0,38-, 0,52- und 0,48-fache unter dem MDA-Wert der Kontrolle. Mit

zunehmender Konzentration an Lutein nimmt der antioxidative Effekt ab. Bei einer Luteinkonzentration von 30 und 50 nmol/mg PC liegen die MDA-Werte über dem Wert der Kontrolle. Allerdings ist der Unterschied zur Kontrolle statistisch nicht signifikant.

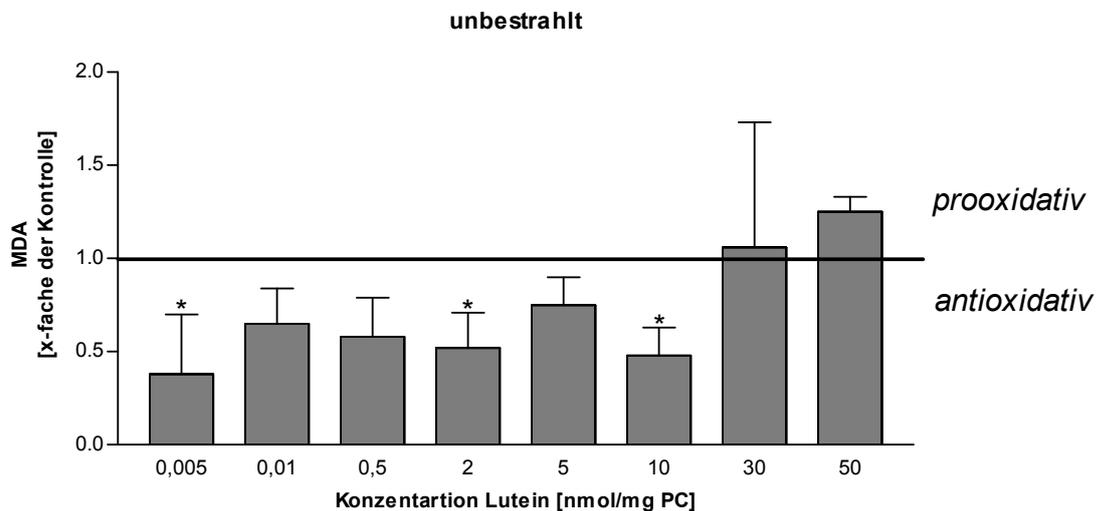


Abb. 5.10: MDA in Liposomen, beladen mit Lutein ohne Bestrahlung. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, ohne Bestrahlung (Kontrolle), * $p \leq 0,05$

In den Abb. 5.11 und Abb. 5.12 ist die MDA-Bildung in Liposomen, welche mit Lutein beladen wurden, nach der Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB dargestellt. Hier ist bei beiden Bestrahlungsdosen in einem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 10 nmol/mg PC Lutein ein antioxidativer Effekt zu erkennen. Diese antioxidative Wirkung ist bei der Bestrahlung der Liposomen mit 0,5 J/cm² UVB und einer Konzentration von Lutein mit 0,5 und 2 nmol/mg PC signifikant um das 0,57- bzw. 0,62-fache niedriger als in unbehandelten Liposomen. Werden die Liposomen mit 1,5 J/cm² UVB bestrahlt, ist bei einer Luteinkonzentration von 2 nmol/mg PC ein signifikant geringerer MDA-Wert um das 0,67-fache im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Ab einer Konzentration von 30 nmol/mg PC Lutein in den Liposomen ist eine prooxidative Tendenz des Luteins zu erkennen; die MDA-Werte liegen über dem Wert der Kontrolle.

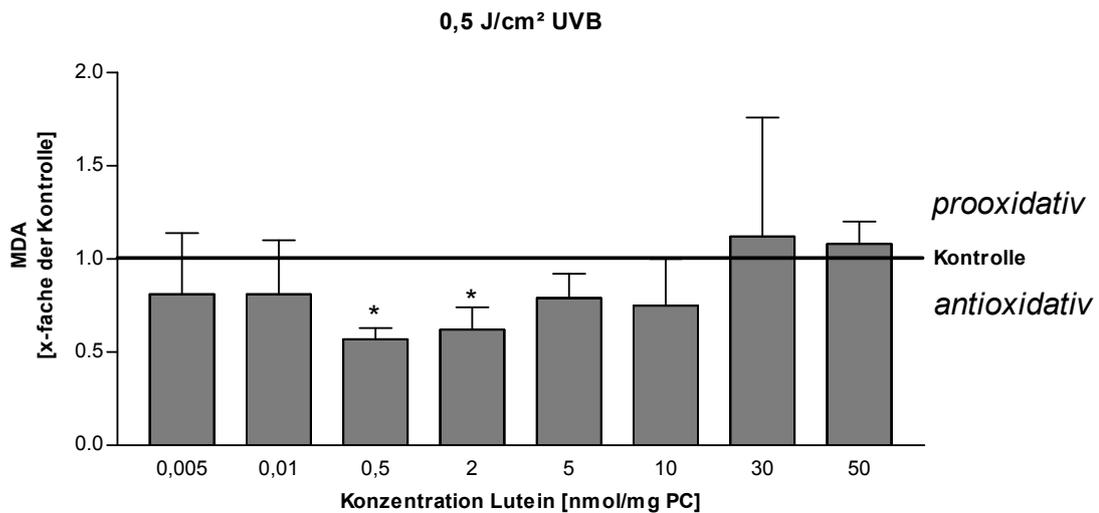


Abb. 5.11: MDA in Liposomen, beladen mit Lutein und bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

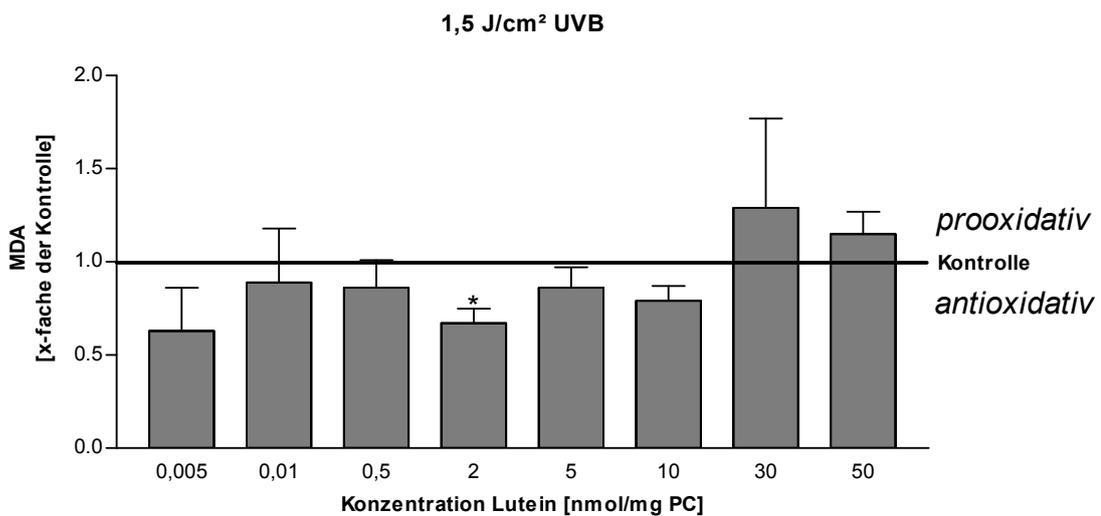


Abb. 5.12: MDA in Liposomen, beladen mit Lutein und bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

In den Abb. 5.13 und Abb. 5.14 ist die MDA-Bildung in Liposomen, beladen mit Lutein und mit 10 und 27,5 J/cm² UVA bestrahlt, dargestellt. Hier liegt bei beiden Bestrahlungsdosen nur der MDA-Wert für die Luteinkonzentration mit 2 nmol/mg PC signifikant um das 0,58- bzw. 0,76-fache unter der Kontrolle. In den Konzentrationsbereichen unter und über 2 nmol/mg PC ist kein statistisch signifikanter Effekt zu beobachten.

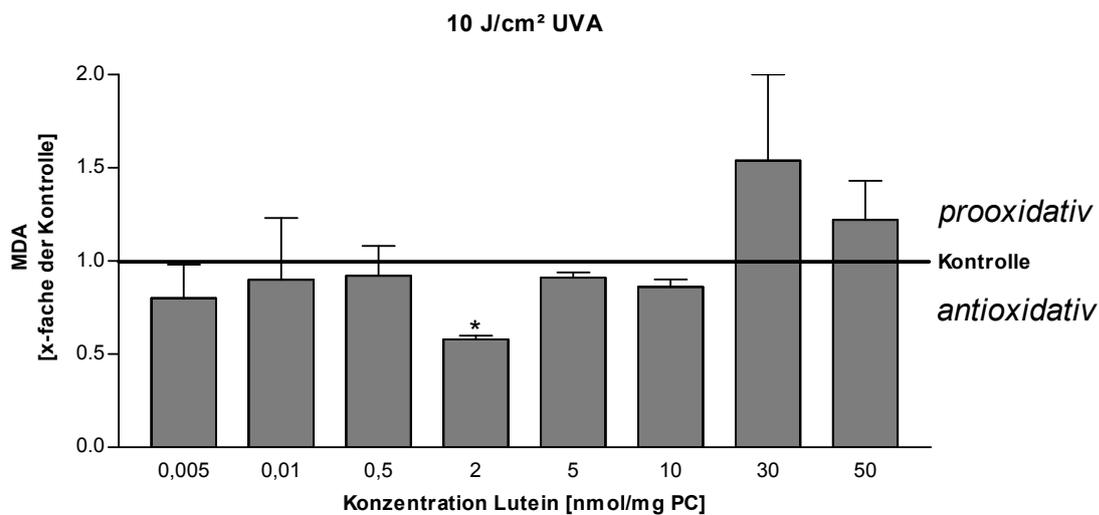


Abb. 5.13: MDA in Liposomen, beladen mit Lutein und bestrahlt mit 10 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 10 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

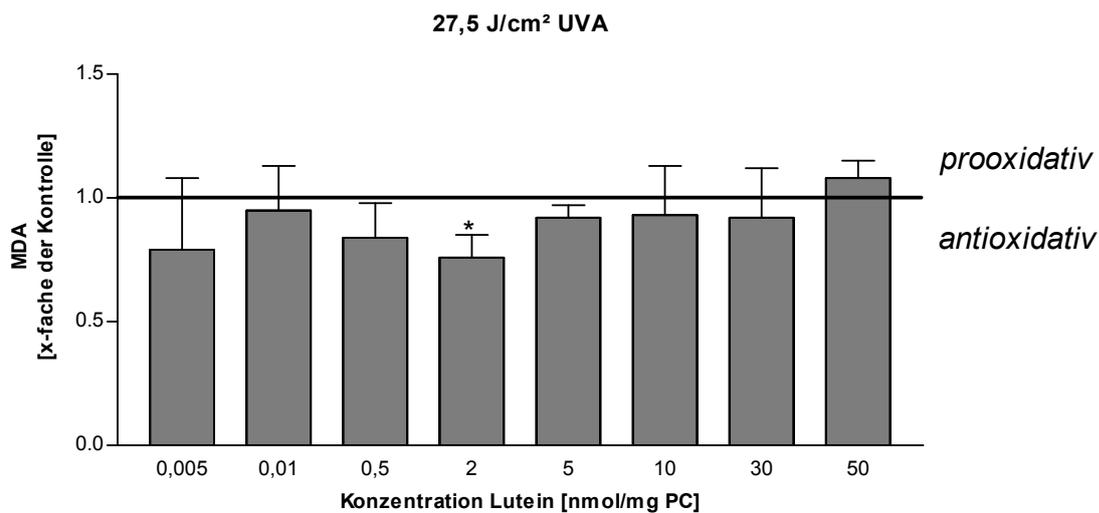


Abb. 5.14: MDA in Liposomen, beladen mit Lutein und bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

In den Diagrammen Abb. 5.15 bis Abb. 5.19 ist die MDA-Bildung in IR-beladenen Liposomen dargestellt. Werden diese, wie in Abb. 5.15 gezeigt, nicht bestrahlt, ist bei keiner IR-Konzentration ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Bei einer IR-Konzentration von 0,01 nmol/mg PC lässt

sich allerdings ein prooxidativer Effekt von IR ableiten, auch wenn dieser nicht statistisch signifikant ist.

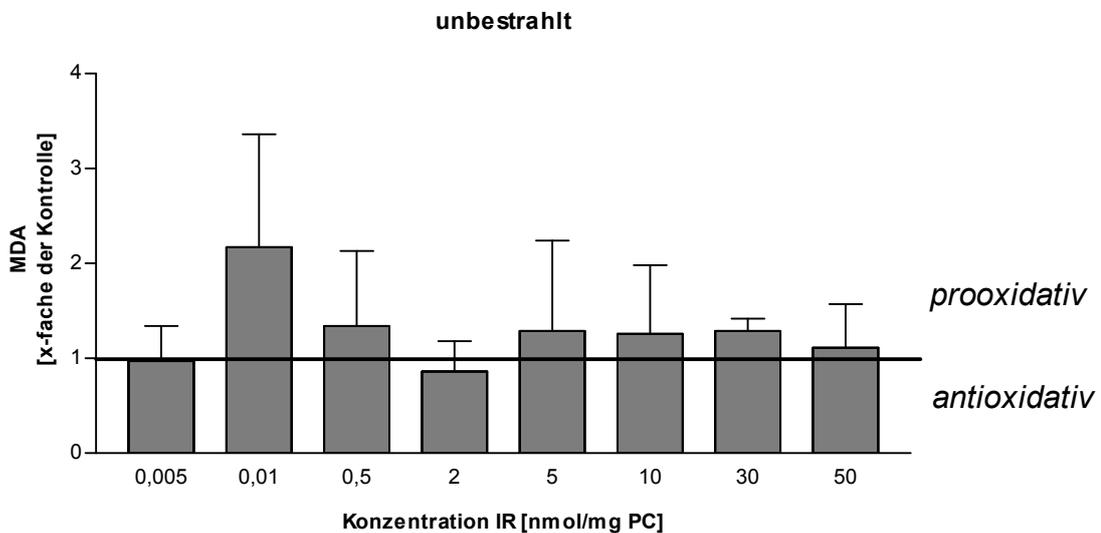


Abb. 5.15: MDA in Liposomen, beladen mit IR ohne Bestrahlung. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, ohne Bestrahlung (Kontrolle), * $p \leq 0,05$

In den Diagrammen in Abb. 5.16 und Abb. 5.17 ist die MDA-Bildung in Liposomen, welche mit IR-beladen sind, nach der Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB dargestellt. Wie in unbestrahlten Liposomen, ist hier bei keiner IR-Konzentration ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festzustellen. Auffällig ist bei beiden Bestrahlungsdosen der hohe MDA-Wert von Liposomen, die mit 0,01 nmol/mg PC IR beladen sind. Dieser MDA-Wert unterscheidet sich allerdings nicht signifikant von der Kontrolle.

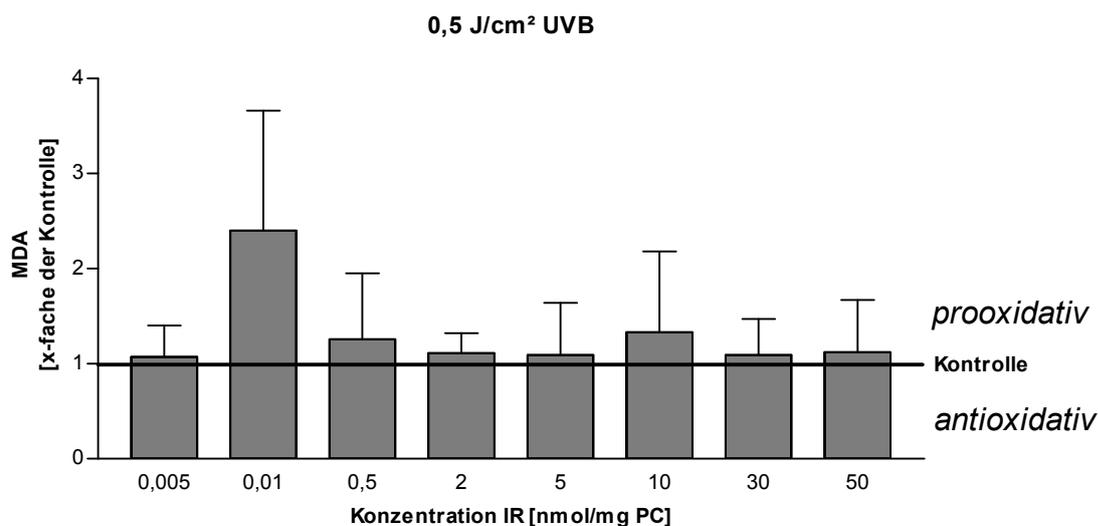


Abb. 5.16: MDA in Liposomen, beladen mit IR und bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

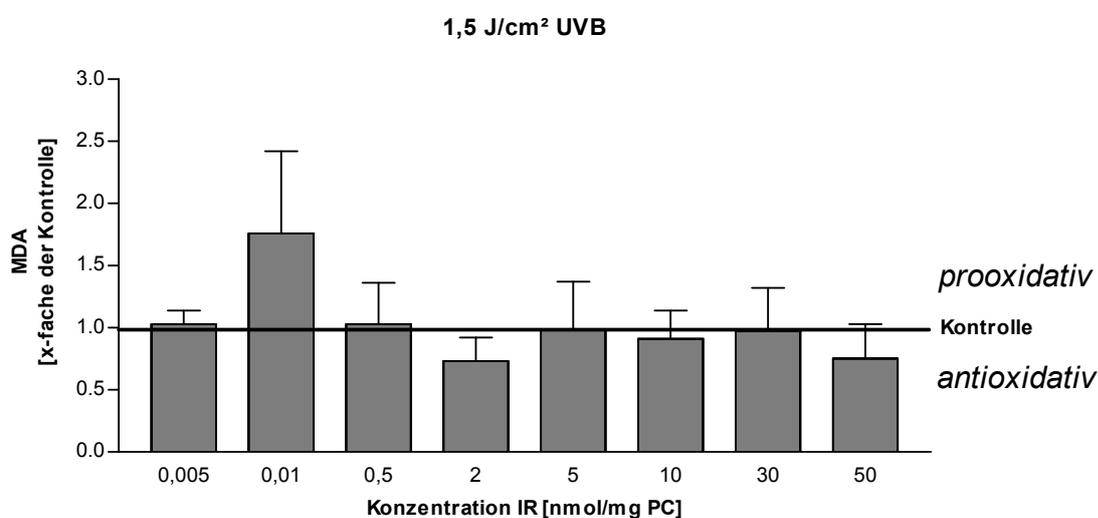


Abb. 5.17: MDA in Liposomen, beladen mit IR und bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

Die MDA-Bildung in IR-beladenen Liposomen nach Bestrahlung mit 10 und 27,5 J/cm² UVA sind in Abb. 5.18 und Abb. 5.19 gezeigt. Hier ist, wie bei der Bestrahlung der Liposomen mit UVB, kein signifikanter Unterschied der MDA-Werte im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Auch hier ist die IR-

Konzentration von 0,01 nmol/mg PC auffällig. Der MDA-Wert liegt bei beiden Bestrahlungsdosen über dem MDA-Wert der Kontrolle. Der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant; die Standardabweichung ist relativ hoch.

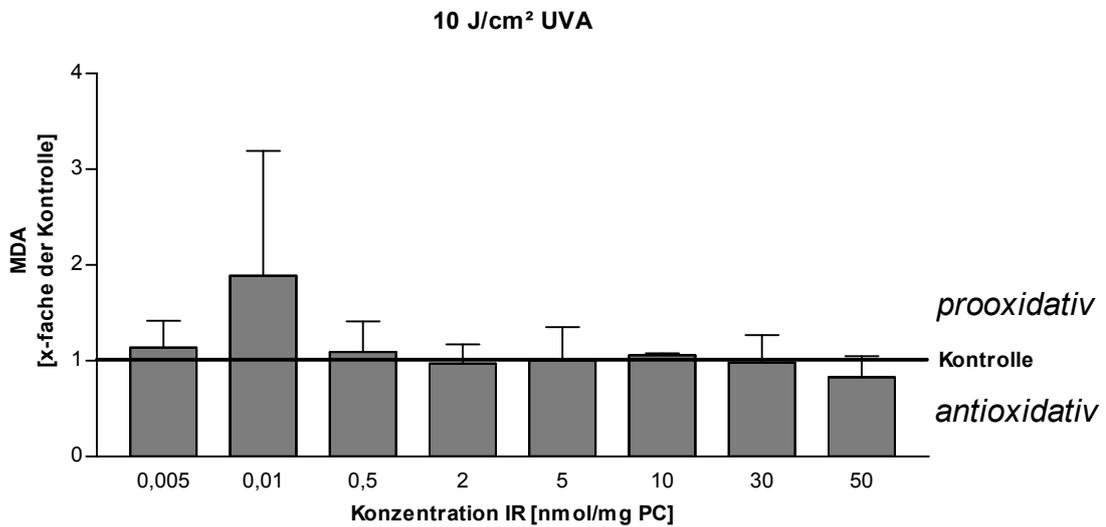


Abb. 5.18: MDA in Liposomen, beladen mit IR und bestrahlt mit 10 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 10 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

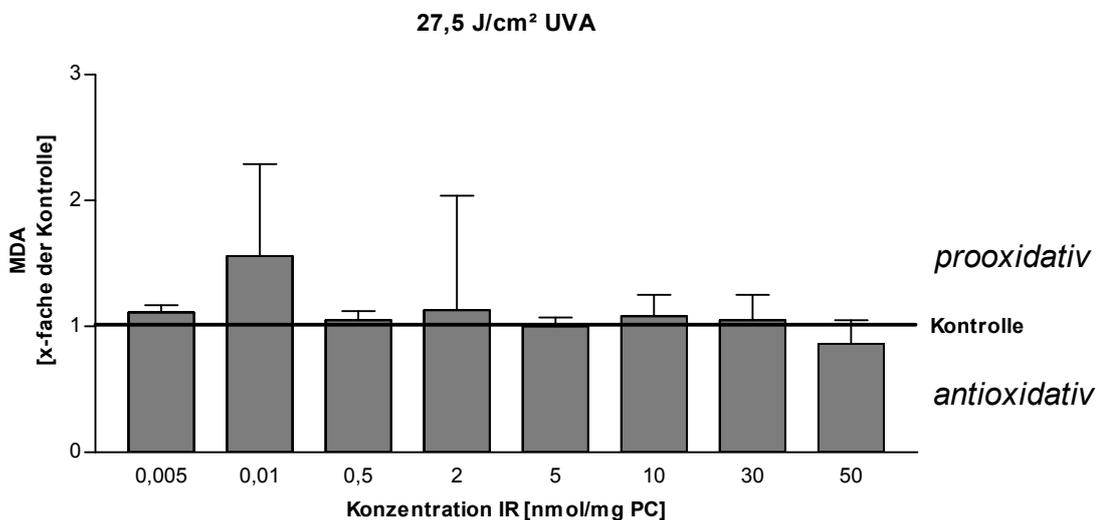


Abb. 5.19: MDA in Liposomen, beladen mit IR und bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

Die Diagramme in Abb. 5.20 bis Abb. 5.24 zeigen die MDA-Bildung in DHIR-beladenen Liposomen. Hier ist bereits bei den unbestrahlten Liposomen in Abb. 5.20 tendenziell zu erkennen, dass DHIR in höheren Konzentrationen von 10 und 30 nmol/mg PC antioxidativ wirkt, da die MDA-Werte unter dem Wert der Kontrolle liegen.

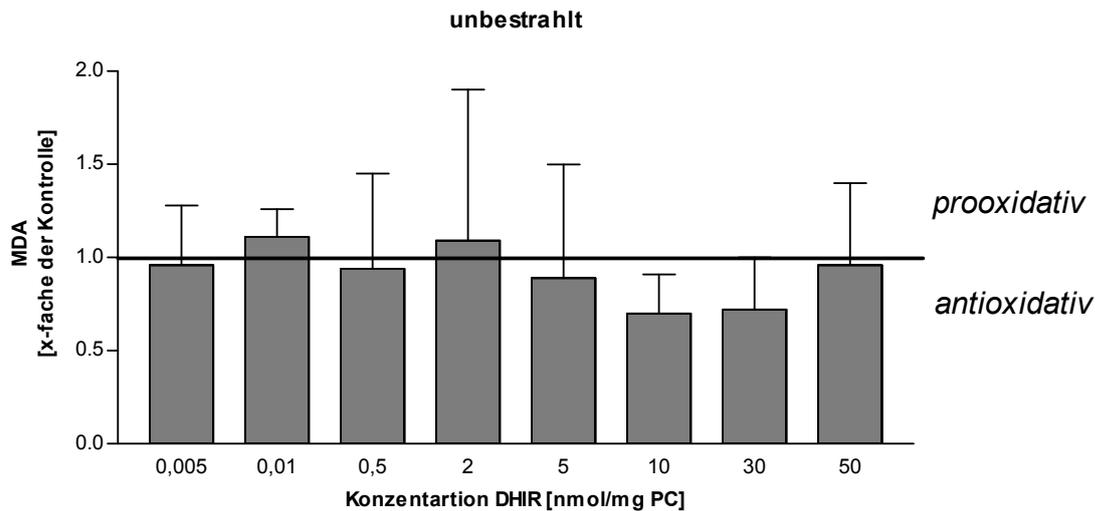


Abb. 5.20: MDA in Liposomen, beladen mit DHIR ohne Bestrahlung. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, ohne Bestrahlung (Kontrolle), * $p \leq 0,05$

Werden die mit DHIR-beladenen Liposomen mit $0,5 \text{ J/cm}^2$ UVB bestrahlt, wie in Abb. 5.21 gezeigt, liegt der MDA-Wert bei einer Konzentration von 10 und 30 nmol/mg PC um das 0,54- und 0,56-fache unter dem Wert der Kontrolle. Bei einer Konzentration von 50 nmol/mg PC DHIR geht dieser antioxidative Effekt verloren. Bei geringeren Konzentrationen unter 10 nmol/mg PC ist kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Bei einer Bestrahlung der Liposomen mit $1,5 \text{ J/cm}^2$ UVB (Abb. 5.22) ist bei einer Konzentration von 10 nmol/mg PC die MDA-Menge um das 0,56-fache und bei einer Konzentration von 30 nmol/mg PC um das 0,54-fache niedriger im Vergleich zur Kontrolle. Bei geringeren DHIR-Konzentrationen unter 10 nmol/mg PC ist kein signifikanter antioxidativer Effekt zu beobachten.

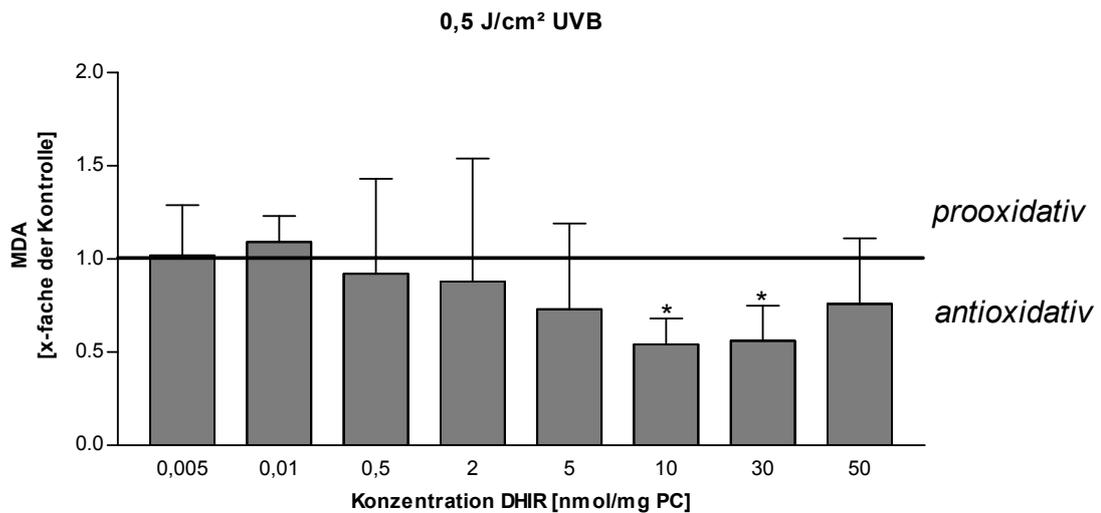


Abb. 5.21: MDA in Liposomen, beladen mit DHIR und bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 0,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

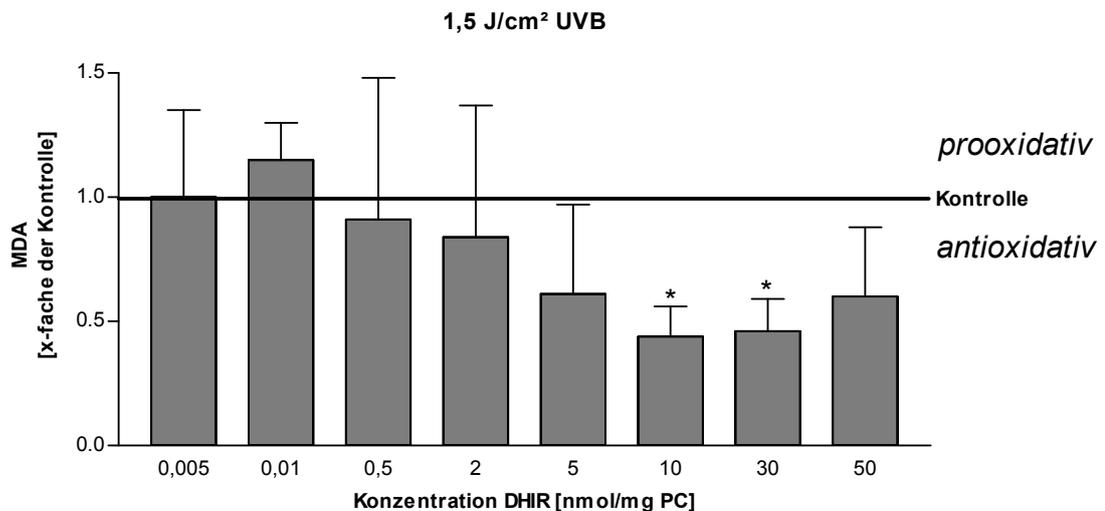


Abb. 5.22: MDA in Liposomen, beladen mit DHIR und bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 1,5 J/cm² UVB (Kontrolle), *p ≤ 0,05

In den Abb. 5.23 und Abb. 5.24 ist die MDA-Bildung in DHIR-beladenen Liposomen gezeigt, die mit 10 und 27,5 J/cm² UVA bestrahlt wurden. Bei einer Bestrahlung der Liposomen mit 10 J/cm² UVA, nimmt bei einer Konzentration von 10 sowie 30 nmol/mg PC DHIR die MDA-Menge im Vergleich zur Kontrolle um das 0,43- und 0,42-fache ab. Bei einer DHIR-Konzentration von

50 nmol/mg PC liegt der MDA-Wert ebenfalls unter der Kontrolle; der Unterschied ist aber nicht mehr statistisch signifikant. In den niedrigeren Konzentrationsbereichen von 0,005-5 nmol/mg PC ist kein statistisch signifikanter Schutzeffekt von DHIR zu beobachten.

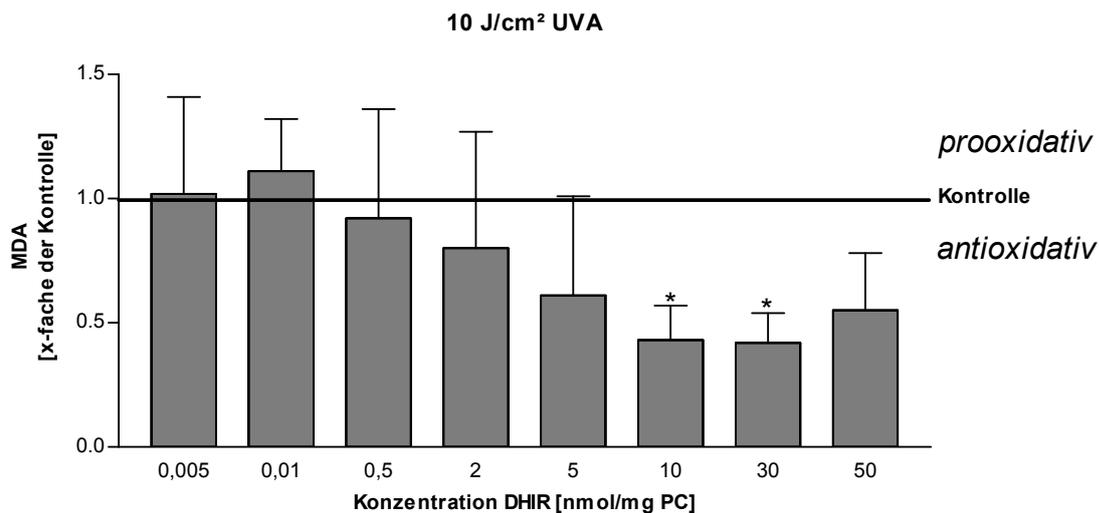


Abb. 5.23: MDA in Liposomen, beladen mit DHIR und bestrahlt mit 10 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 10 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

Werden die Liposomen, die mit DHIR beladen sind, mit 27,5 J/cm² UVA bestrahlt (Abb. 5.24), ist bereits ab einer Konzentration von 2 und 5 nmol/mg PC ein signifikanter Unterschied der MDA-Bildung, im Vergleich zur Kontrolle zu, beobachten. Die MDA-Konzentration ist um das 0,43- und 0,39-fache niedriger als bei der unbehandelten Kontrolle. Bei Konzentrationen von 10, 30 und 50 nmol/mg PC wird um das 0,28-, 0,27- und 0,31-fache weniger MDA im Vergleich zur Kontrolle gebildet. In den geringeren DHIR-Konzentrationen von 0,005-0,5 nmol/mg PC ist kein signifikanter antioxidativer Effekt zu beobachten.

Betrachtet man die Diagramme der MDA-Bildung in Liposomen, beladen mit DHIR, zeichnet sich angefangen vom niedrigen Konzentrationsbereich aus ein kurvenförmiger Verlauf der MDA-Bildung zu höheren DHIR-Konzentrationen ab. In geringen Konzentrationen ist kein Effekt zu beobachten. Dann sinken die MDA-Werte bei einer DHIR-Konzentration zwischen 10 und 30 nmol/mg PC auf

ein Minimum und steigen dann, ab einer Konzentration zwischen 30 und 50 nmol/mg PC, wieder an.

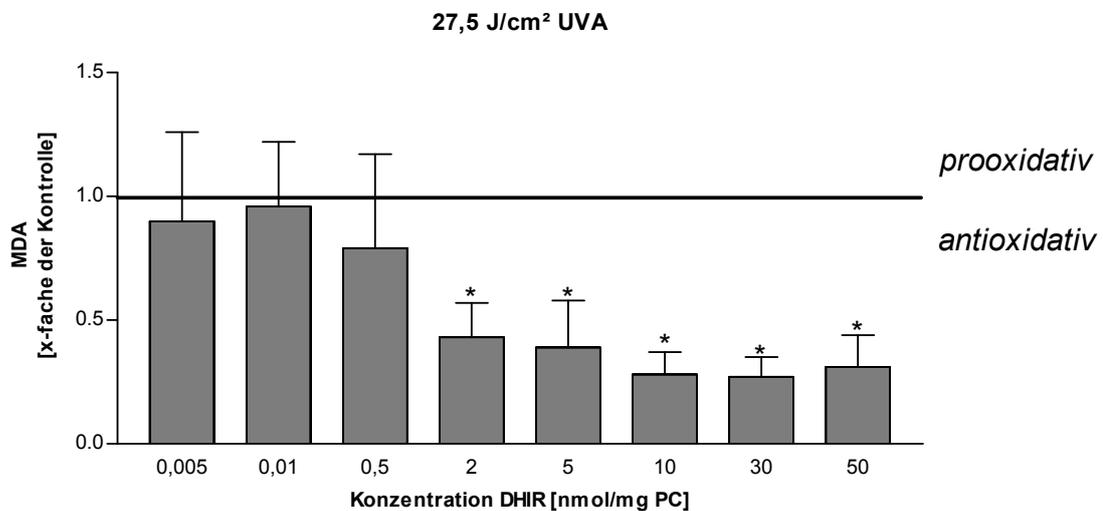


Abb. 5.24: MDA in Liposomen, beladen mit DHIR und bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA. Die Gerade entspricht dem MDA-Wert von unbehandelten Liposomen, bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA (Kontrolle), *p ≤ 0,05

Anhand dieses Modellsystems wird deutlich, dass Lutein in höheren Konzentrationen nach UVB- und UVA-Bestrahlung prooxidative Effekte in Liposomen aufweist. IR hingegen hat nach der Bestrahlung mit UVB und UVA keinen Einfluss auf die Lipidperoxidation. DHIR weist nach der Bestrahlung mit UVB und UVA in höheren Konzentrationen antioxidative Effekte in Liposomen auf.

1.32 Wirkung von UV-Strahlung auf die Freisetzung von komplexierten Metallionen in Zellkultur

Es ist bekannt, dass eine vermehrte UVA-Exposition in Fibroblasten zu einer Zinkfreisetzung aus Proteinen führt. Etwa 10 % des humanen Proteoms besteht aus potenziell Zink-bindenden Proteinen. Dabei sind die Zink(II)ionen zumeist durch zwei Cysteinreste und zwei Histidinreste oder über vier Cysteinreste komplexiert (Andreini et al., 2006). Besonders sensitiv gegenüber Oxidation von ROS ist die Aminosäure Cystein. Durch die Oxidation kommt es zur Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken und somit zu Veränderungen in der

Tertiärstruktur des Proteins. Dies führt im Falle von Zink-bindenden Proteinen zur Freisetzung von Zink(II). In vorliegenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Carotinoide Lutein, IR und DHIR vor der UV-induzierten Oxidation Zink-bindender Proteine schützen können. Dies wurde in Kooperation mit Frau Dr. Lutter in Zellkultur und anschließend photometrisch in einem Modellsystem untersucht.

1.33 Wirkung von UVA-Strahlung auf die Zinkfreisetzung in dermalen Fibroblasten

Die UV-induzierte Zink(II)-Freisetzung und eine mögliche Schutzwirkung der Carotinoide Lutein und DHIR wurde in dermalen Fibroblasten untersucht (Lutter et al., 2009). Kommt es durch UV-Einstrahlung zu Schäden an Zink(II)-komplexierenden Proteinen, steigt die Konzentration von freiem Zink(II) in dermalen Fibroblasten an. Dies kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin (2-Methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy-acetic acid), welcher nach Bindung an Zink(II) stark fluoresziert, untersucht werden. Die Affinität von Zinquin zu freiem Zink reichte jedoch nicht aus, um Zink aus Proteinen herauszulösen (Nasir et al., 1999, Snitsarev et al, 2001). Die Bildung der fluoreszierenden Zinquin-Zink(II)-Komplexe wurde an intakten Zellen mit dem Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Anregungswellenlänge lag bei 485 nm und die Emissionswellenlänge bei 520 nm.

In Abb. 5.25 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. Zellen, die mit THF behandelt und anschließend mit UVA bestrahlt wurden (erste Reihe), weisen mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz auf. Sind bei 0 J/cm² die Zellen kaum von der Umgebung zu unterscheiden, wird im weiteren Verlauf eine zunehmende Fluoreszenz deutlich. Dieser Verlauf ist auch in der zweiten Reihe zu erkennen. Hier sind Bilder von Zellen gezeigt, welche mit 10 µmol/L Lutein inkubiert wurden. Zwischen der Zink(II)-Freisetzung in der Kontrolle und den mit Lutein

inkubierten Zellen ist somit kein Unterschied zu beobachten. Werden die Zellen mit 10 $\mu\text{mol/L}$ DHIR inkubiert, ist ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Die Zellen zeigen allerdings eine signifikant niedrigere Fluoreszenz, als die entsprechende Kontrolle.

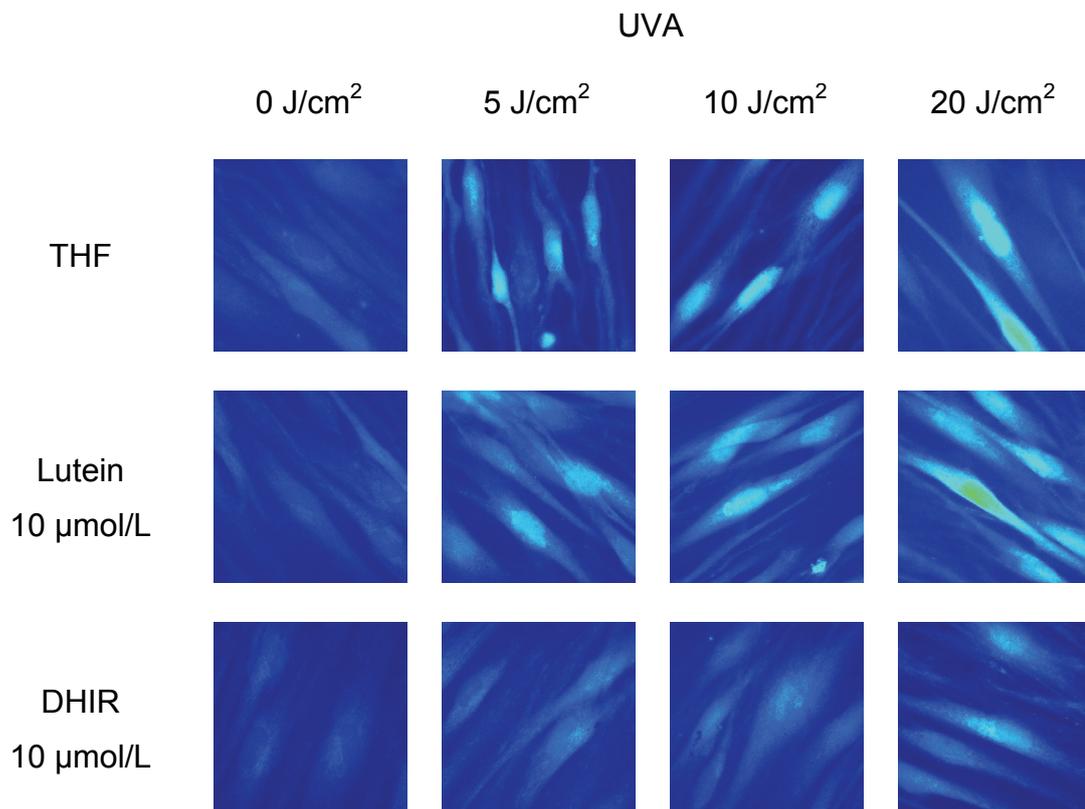


Abb. 5.25: Zunahme von freiem Zink in mit THF, DHIR und Lutein behandelten Fibroblasten nach Bestrahlung mit 0, 5, 10 & 20 J/cm² UVA.

In der Abb. 5.26 ist die semiquantitative Auswertung der Bilder gezeigt. Bei dieser Auswertungsmethode wird mit Hilfe der Computersoftware ImageJ die Gesamthelligkeit aller Pixel in einem definierten Bereich, z. B. einer abgebildeten Zelle oder eines Hintergrundabschnittes, bestimmt. 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 J/cm^2 UVA) einer Substanz als Bezugspunkt dienten und auf 100 % gesetzt wurden (Lutter, 2009).

Auf der x-Achse ist die UVA-Dosis angegeben, mit der die Zellen bestrahlt wurden. Auf der y-Achse ist die Zunahme der Fluoreszenz bzw. des intrazellulären Zink(II) als x-faches der Kontrolle wiedergegeben. Die Kontrolle entspricht dabei unbehandelten Zellen. In Abb. 5.26 ist die Zink(II)-Freisetzung in dermalen Fibroblasten unter UVA-Bestrahlung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine Bestrahlung der unbehandelten Zellen mit 5 J/cm^2 UVA zu einer Zink(II)-Freisetzung um das 2,5-fache, mit 10 J/cm^2 um das 3-fache und mit 20 J/cm^2 UVA um das 4-fache führt. Werden die Zellen mit $10 \mu\text{mol/L}$ Lutein inkubiert, ist kein signifikanter Unterschied in der Zink(II)-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Bei einer Inkubation der Zellen mit $10 \mu\text{mol/L}$ DHIR ist bereits unter der geringsten Bestrahlungsdosis von 5 J/cm^2 UVA eine signifikant geringere Zink(II)-Freisetzung um das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Dies ist auch bei höheren Bestrahlungsdosen von 10 (1,6-fache) und 20 J/cm^2 (1,8-fache) der Fall.

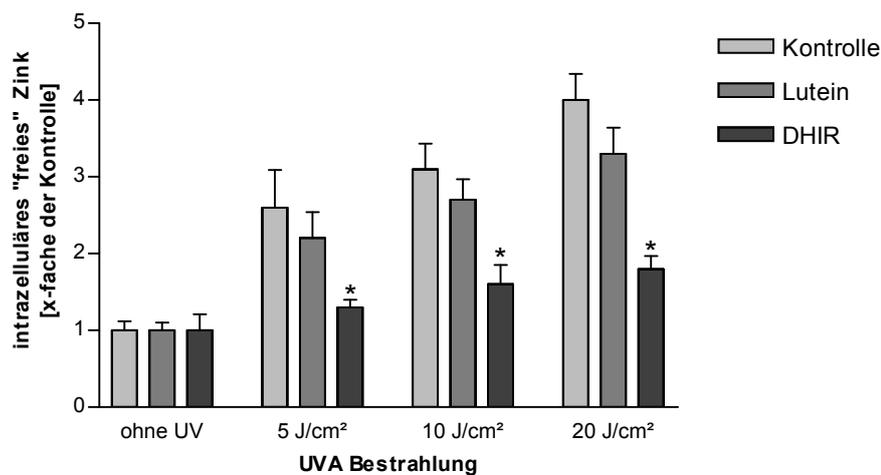


Abb. 5.26: Freisetzung von Zink(II) in dermalen Fibroblasten nach der Bestrahlung mit UVA, * $p \leq 0,05$

Aus diesem Experiment wird deutlich, dass DHIR in dermalen Fibroblasten die UVA-induzierten Zink(II)-Freisetzung, im Gegensatz zu Lutein, verhindert.

1.34 Freisetzung von komplexierten Metallionen aus modellartigen Peptid-Metall-Komplexen

Zink ist ein Übergangsmetall mit voll besetzten d-Orbitalen $[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$. Photometrisch lässt sich die Komplexbildung von Zink(II) in proteinartigen Modellpeptiden nicht beobachten, da bei voll besetzten d-Orbitalen keine d-d-Elektronenübergänge durch Absorption von Licht im UV/Vis-Bereich möglich sind. Es ist allerdings möglich, statt Zink(II) Cobalt(II) in das Peptid einzubauen. Cobalt ist ebenfalls ein Übergangsmetall, hat aber im Gegensatz zu Zink keine voll besetzten d-Orbitale $[\text{Ar}]3d^74s^2$. Aufgrund der Aufspaltung der d-Orbitale im Ligandenfeld des Peptids ist es möglich, durch Absorption von Licht im sichtbaren Bereich Elektronen in die noch nicht voll besetzten d-Orbitale höherer Energie anzuheben. Dieser Elektronenübergang ist photometrisch in einem Bereich von 550-700 nm zu beobachten. Im vorliegenden System liegt das Absorptionsmaximum bei 642 nm. Wird durch UV-Einwirkung das Peptid modifiziert, z. B. durch Oxidation der beiden Cysteine unter Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke, kann Cobalt(II) nicht mehr komplexiert werden. Das Cobalt(II) wird aus dem Peptidkomplex freigesetzt, und die beobachtete Absorption im Bereich zwischen 550-700 nm nimmt ab (vgl. 1.24). Damit ist die Abnahme der Absorption ein Maß für die Peptidmodifikation.

Im vorliegenden Modellsystem wird die Co(II)-Freisetzung aus einem synthetisch hergestellten metall-komplexierenden Peptid untersucht. Die Bindungsstellen für das Co(II)-Ion sind zwei Cysteine und zwei Histidine. Diese sind in der nachfolgenden Aminosäuresequenz des Peptids unterstrichen.

H₂N-Arg-Pro-Phe-Met-Cys-Thr-Trp-Ser-Tyr-Cys-Gly-Lys-Arg-Phe-Thr-Arg-Ser-Asp-Glu-Leu-Gln-Arg-His-Lys-Arg-Thr-His-Thr-Gly-CONH₂

Zuerst wurde untersucht, ob es bereits bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 180 min zur Freisetzung von Co(II) aus dem Peptidkomplex kommt. Die Kontrolle ist notwendig, da die Bestrahlungszeit zum Erreichen der höchsten Dosis von 40 J/cm² UVA ca. 180 min beträgt. Die Bestrahlungszeit bei der höchsten Dosis UVB mit 2,5 J/cm² dauert 35 min. In Abb. 5.27 ist die Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptid-Co(II)-Komplex bei RT in einem Zeitraum von 180 min und 45 min sowie nach der Bestrahlung mit 2,5 J/cm² (Dauer 35 min) und 40 J/cm² UVA (Dauer 180 min) dargestellt. Bei der Inkubation des Peptidkomplexes bei RT kommt es innerhalb von 45 min zu einer Cobalt(II)-Freisetzung von 22% und bei 180 min zu einer Freisetzung von 64%. Deutlich beschleunigt wird die Cobalt(II)-Freisetzung durch die Bestrahlung mit 2,5 J/cm² UVB. Hier liegt die Cobalt(II)-Freisetzung bei 68%. Eine vermehrte Cobalt(II)-Freisetzung wird ebenfalls durch die Bestrahlung mit 40 J/cm² UVA hervorgerufen. Bei einer Bestrahlungszeit von 180 min werden 94% des komplexierten Cobalt(II)-Ionen freigesetzt.

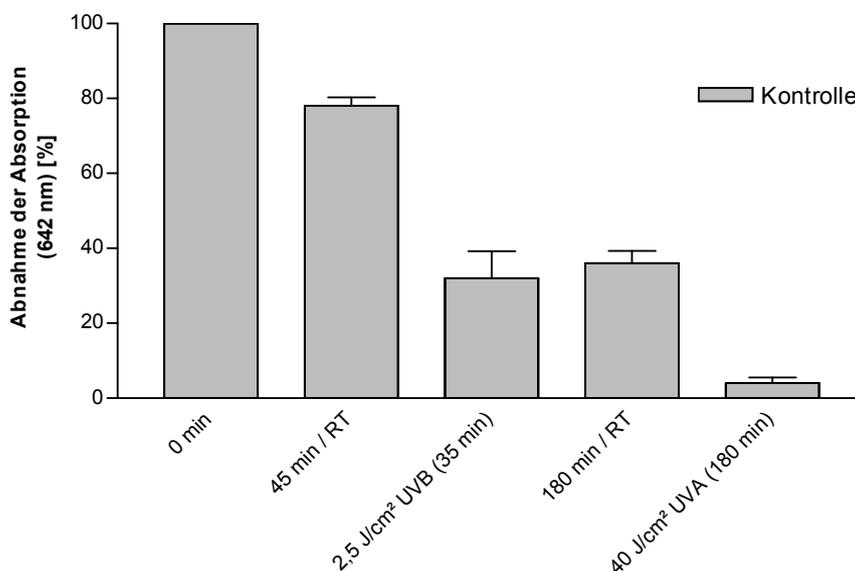


Abb. 5.27: Abnahme der Absorption (642 nm) des Protein-Co(II)-Komplexes nach 45 und 180 min bei RT, unter Bestrahlung mit 2,5 J/cm² UVB (Dauer 35 min) und 40 J/cm² UVA (Dauer 180 min)

Der nächste Schritt war zu untersuchen, ob die Zugabe von Lutein, IR oder DHIR zum Peptid einen UV-schützenden Effekt aufweist. Dazu wurden die

Peptidproben vor der Bestrahlung mit einer Konzentration von 4,3 $\mu\text{mol/L}$ Lutein, IR oder DHIR gemischt. Der Einsatz höherer Konzentrationen an Carotinoid war nicht möglich, da die Absorption der Carotinoide sonst die Absorption des Co(II)-Komplexes im Messbereich von 640 nm überlagerte.

In Abb. 5.28 ist die Abnahme der Absorption des Peptid-Co(II)-Komplexes über einen Zeitraum von 180 min bei RT im Dunkeln dargestellt. Bei der Kontrolle handelt es sich um unbehandeltes Peptid. Auf der y-Achse ist die Abnahme der Absorption bei 642 nm in Bezug auf die jeweilige Kontrolle bei 0 min angegeben. Da die Absorption mit der Freisetzung von Co(II) aus dem Peptidkomplex korreliert, wird im weiteren Verlauf nicht von der Abnahme der Absorption, sondern von der Cobalt(II)-Freisetzung gesprochen. Bei unbehandelten Peptiden (Kontrolle) beträgt die Cobalt(II)-Freisetzung über einen Zeitraum von 180 min 64%. Ein ähnlicher Verlauf ist bei Peptiden, die mit Lutein und DHIR behandelt wurden, zu beobachten. Bei Zugabe von Lutein werden 55% und bei der Zugabe von DHIR 70% Co(II) aus dem Peptidkomplex freigesetzt. Wird das Peptid mit IR vermischt, kommt es mit 79% zu einer statistisch signifikant vermehrten Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex innerhalb von 180 min.

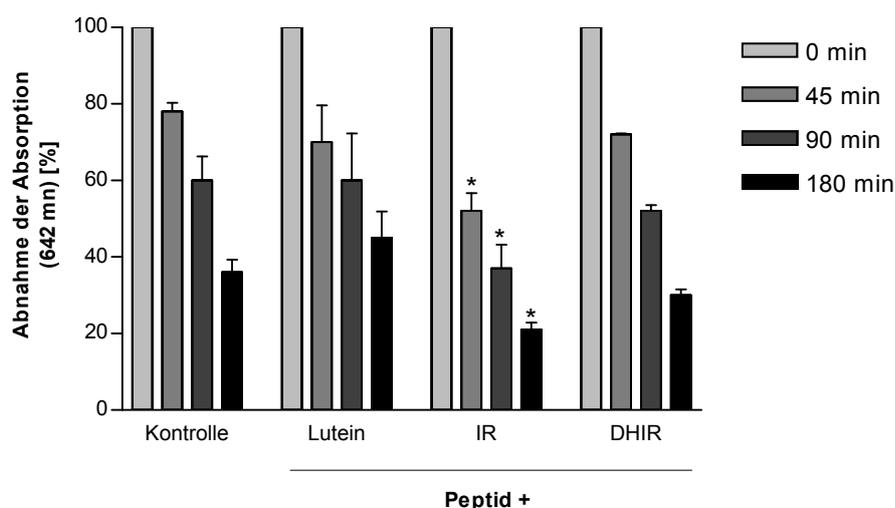


Abb. 5.28: Abnahme der Absorption (642 nm) des Peptid-Co(II)-Komplexes über eine Zeit von 180 min bei RT im Dunkeln, * $p \leq 0,05$, signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle

In Abb. 5.29 ist die Cobalt(II)-Freisetzung aus den Peptidkomplexen unter Bestrahlung mit UVB dargestellt. Die Cobalt(II)-Freisetzung in der Kontrolle (unbehandeltes Peptid) liegt bei der höchsten Bestrahlungsdosis von 2,5 J/cm² UVB bei 68%. In Anwesenheit von Lutein wurde eine Cobalt(II)-Freisetzung von 42% beobachtet, diese ist allerdings nicht statistisch signifikant. Nach Zugabe von IR zu dem Peptidkomplex ist bei keiner der Bestrahlungsdosen im UVB-Bereich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zu beobachten. Werden die Peptidkomplexe mit DHIR gemischt, ist eine signifikant geringere Cobalt(II)-Freisetzung bei einer Bestrahlung mit 1,5 und 2,5 J/cm² UVB mit nur 31% und 49% zu beobachten. DHIR kann die UVB-induzierte Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex vermindern.

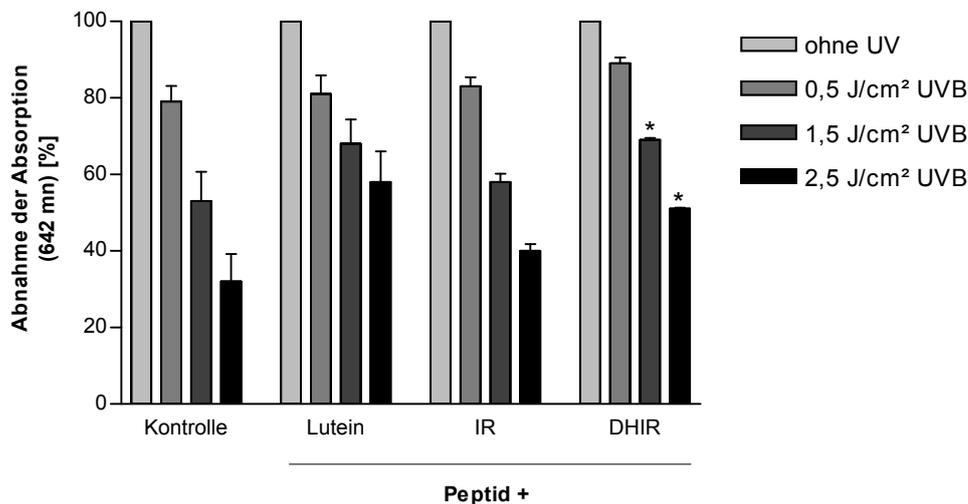


Abb. 5.29: Abnahme der Absorption (642 nm) des Peptid-Co(II)-Komplexes unter Bestrahlung mit UVB, * $p \leq 0,05$, signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle

In Abb. 5.30 wird die Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex unter der Bestrahlung mit UVA gezeigt. In der Kontrolle ist mit 94% fast eine vollständige Cobalt(II)-Freisetzung zu beobachten. Eine vergleichbare Cobalt(II)-Freisetzung ist bei einem Zusatz von Lutein (97%) und IR (94%) unter dieser Bestrahlungsdosis zu erkennen. Wird der Peptidkomplex mit DHIR gemischt, ist bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² UVA eine signifikant verminderte Cobalt(II)-Freisetzung um 18% im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

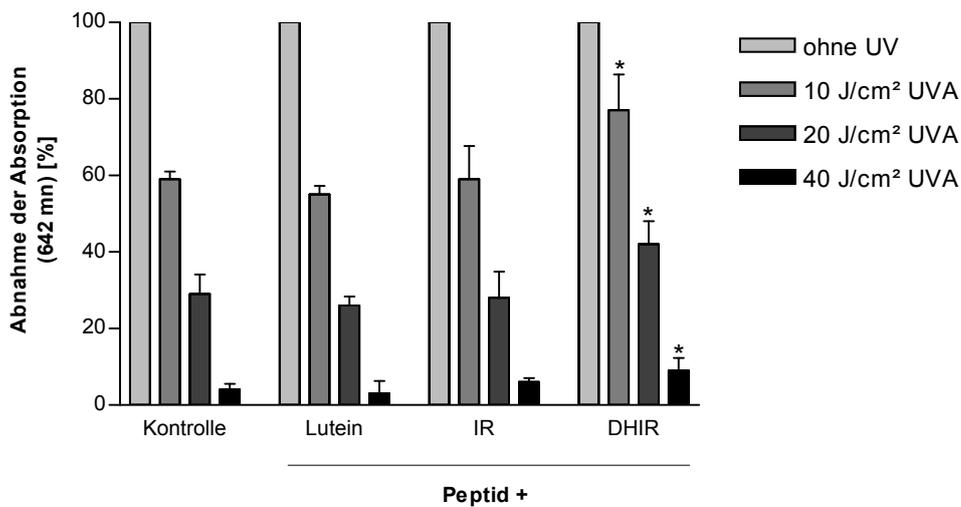


Abb. 5.30: Abnahme der Absorption (642 nm) des Peptid-Co(II)-Komplexes unter Bestrahlung mit UVA, * $p \leq 0,05$, signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle

Dieser schützende Effekt des DHIR wird auch bei Bestrahlung der Peptidkomplexe mit 20 und 40 J/cm² UVA deutlich. Hier ist die Cobalt(II)-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle um 13% und um 5% vermindert.

DHIR kann vor der UVB- sowie UVA-induzierten Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex im Vergleich zur Kontrolle schützen. Zusatz von Lutein und IR hingegen führt zu keiner Verminderung der Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex unter UV-Strahlung.

1.35 Morphologie von humanen dermalen Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Um die Wirkung von Carotinoiden auf die Zellen unter UVA-Bestrahlung zu untersuchen, wurde zunächst ein visueller Test durchgeführt. Dazu wurden dermale Fibroblasten mit dem entsprechenden Carotinoid inkubiert (vgl. 1.18) und anschließend mit unterschiedlichen Dosen an UVA-Licht bestrahlt. Die angegebenen Carotinoidkonzentrationen geben die Endkonzentration im Kulturmedium wieder. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden Aufnahmen mit einem Lichtmikroskop erstellt. Mikroskop: Axiovert 100TV, Durchlicht ohne Filter, Die Bilder sind von links nach rechts den ansteigenden Bestrahlungs-

dosen und von oben nach unten (Kontrolle) und den Substanzen, Lutein, IR und DHIR zugeordnet.

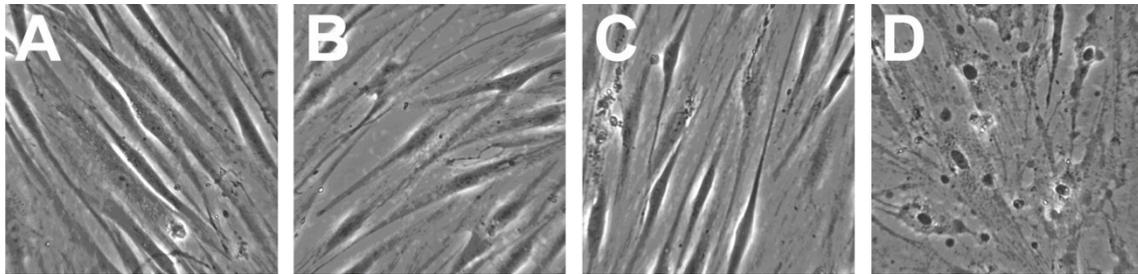


Abb. 5.31: Zellen ohne Substanz (Kontrolle) nach Bestrahlung mit (A) 0, (B) 10, (C) 20 und (D) 27,5 J/cm² UVA

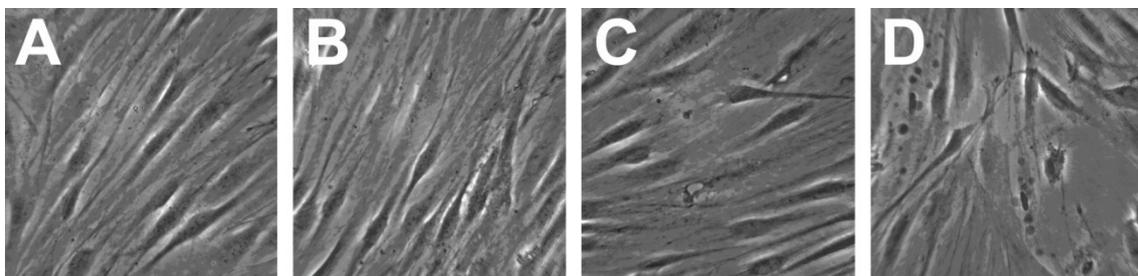


Abb. 5.32: Zellen mit 5 µmol/L Lutein inkubiert und bestrahlt mit (A) 0, (B) 10, (C) 20 und (D) 27,5 J/cm² UVA

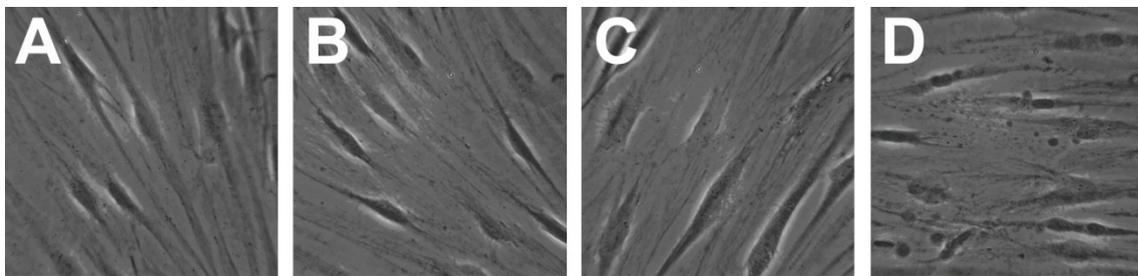


Abb. 5.33: Zellen mit 5 µmol/L IR inkubiert und bestrahlt mit (A) 0, (B) 10, (C) 20 und (D) 27,5 J/cm² UVA

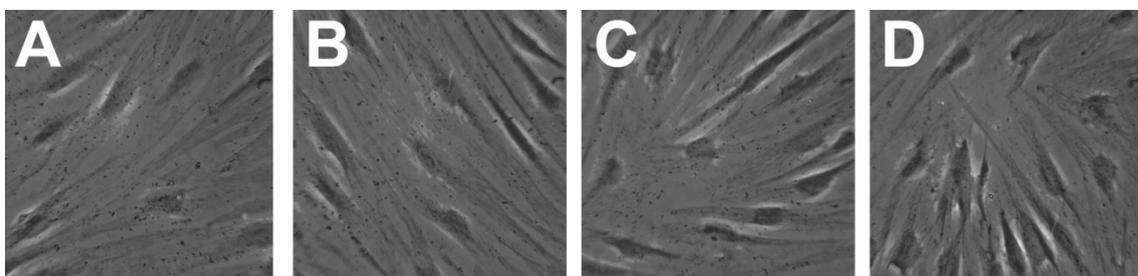


Abb. 5.34: Zellen mit 5 µmol/L DHIR inkubiert und bestrahlt mit (A) 0, (B) 10, (C) 20 und (D) 27,5 J/cm² UVA

Phasenkontrast II, 63er Objektiv, Belichtung: 2,06 ms, Verstärkung: 200, Offset: 0.

Wie in Abb. 5.31 D deutlich wird, ist eine Bestrahlungsdosis von 27,5 J/cm² UVA zytotoxisch. Die Zellmembranen weisen deutliche Schäden auf, und es sind apoptotische Körperchen zu erkennen. Die in Abb. 5.32 dargestellten Aufnahmen zeigen Zellen, die für 24 h mit Lutein inkubiert wurden. Bei allen Bestrahlungsdosen (Abb. 5.32 A, B, C, D) ist eine ähnliche Morphologie zu sehen, wie in der Kontrolle. In Abb. 5.33 wurden die Zellen vor der Bestrahlung für 24 h mit IR inkubiert. Auch hier ist bei einer Dosis von 27,5 J/cm² UVA eine Schädigung der Zellstruktur zu erkennen, diese ist jedoch weniger ausgeprägt als in den unbehandelten Zellen. Dagegen ist in Abb. 5.34 (D) zu erkennen, dass die Zellen, welche mit DHIR inkubiert wurden, deutlich weniger Schäden bei einer Bestrahlung mit 27,5 J/cm² UVA aufweisen als die Fibroblasten, die mit IR oder Lutein inkubiert wurden. Somit konnte anhand von zellmorphologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass IR und DHIR vor direkten Schäden der Zellstruktur während der Bestrahlung schützen können.

1.36 Aufnahme der Carotinoide in humane dermale Fibroblasten

Um die Schutzwirkung der verschiedenen Carotinoide in der Zelle zu beurteilen, ist es notwendig die Aufnahme der Substanzen in die Zelle zu ermitteln. Dazu wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (1,5 / 5 / 10 µmol/L) an Carotinoid für 24 h inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen geben die Endkonzentration im Medium wieder, in dem die Zellen kultiviert werden. Anschließend wurden die Carotinoide durch Extraktion aus den Zellen zurückgewonnen und die Konzentration mit Hilfe der HPLC bestimmt. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde für jedes Carotinoid eine Standardkurve angefertigt. Zur Auswertung wurden die Flächen unter den Signalen herangezogen.

In Abb. 5.35 ist die Aufnahme von Lutein in die Zellen dargestellt. In Abbildung (A) ist die Konzentration an Lutein wiedergegeben, die nach der Extraktion

gemessen wurde, normiert auf die Proteinmenge. In Abbildung (B) werden die Werte relativ zur eingesetzten Endkonzentration, mit der die Zellen inkubiert wurden, dargestellt. Hier wird deutlich, dass sich die Aufnahme von Lutein in Fibroblasten bei einer Inkubationszeit von 24 h einem Maximum annähert, da bei einer Inkubation der Zellen mit 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$ jeweils nicht mehr als 44% Lutein von der Zelle aufgenommen werden.

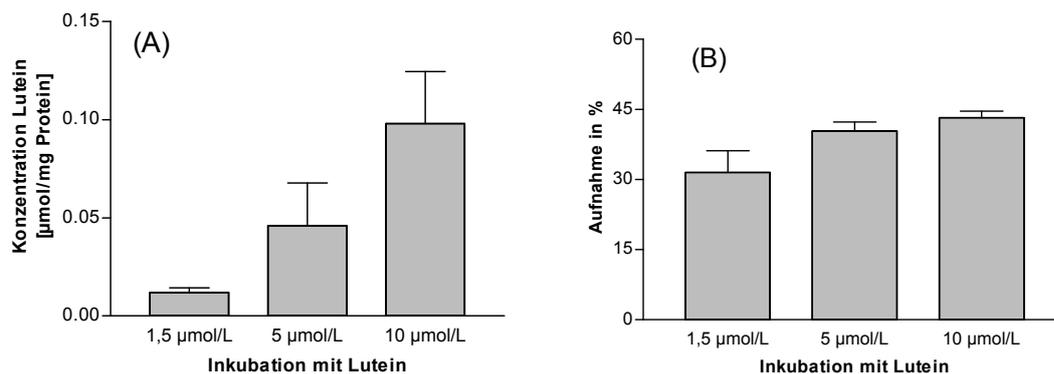


Abb. 5.35: Aufnahme von Lutein in dermale Fibroblasten in $\mu\text{mol/mg Protein}$ (A) und relative Werte in % (B)

Werden die Fibroblasten mit IR inkubiert (Abb. 5.36), ist zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ deutlich mehr IR in die Zelle aufgenommen wird als bei einer Konzentration von 1,5 und 5 $\mu\text{mol/L}$. Während bei einer Inkubation der Zellen mit 1,5 und 5 $\mu\text{mol/L}$ IR nur zwischen 13% und 15% von den Zellen aufgenommen werden, sind es bei der Inkubation der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/L}$ 45% der Ursprungsmenge.

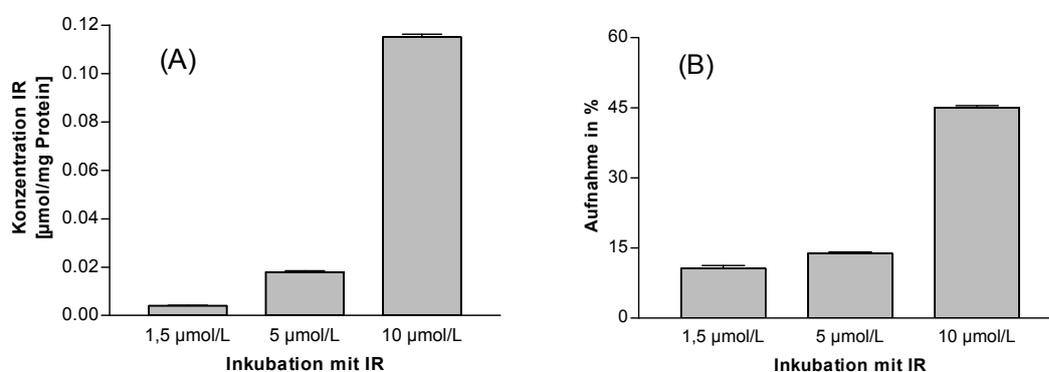


Abb. 5.36: Aufnahme von IR in dermale Fibroblasten in $\mu\text{mol/mg Protein}$ (A) und relative Werte in % (B)

Werden die Zellen mit DHIR inkubiert, ist eine dem Lutein vergleichbare Aufnahme zu beobachten. Ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ werden 50% DHIR von den Zellen aufgenommen. Diese Aufnahme liegt etwas höher als bei der Inkubation mit Lutein oder IR. Werden die Zellen mit 1,5 $\mu\text{mol/L}$ DHIR inkubiert, werden 34% des Carotinoids von den Zellen aufgenommen.

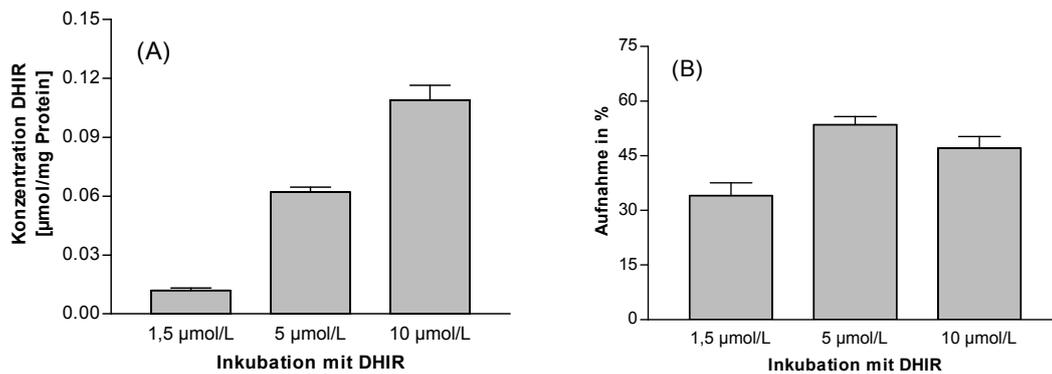


Abb. 5.37: Aufnahme von DHIR in dermale Fibroblasten in $\mu\text{mol/mg Protein}$ (A) und relative Werte in % (B)

1.37 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von DHIR in humane dermale Fibroblasten

Es gibt verschiedene Untersuchungen zu der Orientierung von Carotinoiden in Zellmembranen bzw. in Lipidmembranen (Gabrielska & Gruszecki 1996, Gruszecki & Sielewiesiuk, 1990). Bisher ist aber nur wenig bekannt, wie Carotinoide ins Zellinnere bzw. in die Zellmembran gelangen. Um dies zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf elektronenmikroskopische Aufnahmen von dermalen Fibroblasten aufgenommen. Die Zellen wurden für 24 h mit 0,1% THF (Kontrolle) oder 10 $\mu\text{mol/L}$ DHIR inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der Endkonzentration im Kulturmedium auf den Zellen. Anschließend wurden die Zellen wie in Kapitel 1.25 beschrieben aufgearbeitet und mit einem Elektronenmikroskop untersucht. Die Bilder sind mit einer 3000- (Abb. 5.38) und 12000-fachen (Abb. 5.39) Vergrößerung aufgenommen. In der Abb. 5.38 ist ein Fibroblast bei einer 3000-fachen Vergrößerung zu sehen, der mit THF (Bild A) und mit DHIR (Bild B) behandelt wurde. Es sind in den Bildern

A und B einzelne Vesikel zu erkennen sowie der Zellkern mit Nukleolus. Der Zellkern weist eine ungewöhnliche Form auf, welche vermutlich durch die Dehydrierung der Proben während der Aufarbeitung verursacht wird. Bereits bei einer 3000-fachen Vergrößerung wird beim Vergleich der Bilder A und B deutlich, dass die Zellmembran des mit DHIR inkubierten Fibroblasten dunkler gefärbt ist als die der Kontrolle. Dies scheint durch die Aufnahme des DHIR in die Zellmembran verursacht zu werden. Des Weiteren sind in dem Fibroblasten in Bild B am Rand der Zellmembran endozytotische Vesikel zu erkennen.

Werden die Fibroblasten 12000-fach vergrößert (Abb. 5.39 C und D), sind neben dem Zellkern auch Mitochondrien zu erkennen. In den Bildern C und D sind Vesikel zu sehen. Diese erscheinen in dem DHIR-inkubierten Fibroblasten (Bild D) beladen zu sein. Bei einer 12000-fachen Vergrößerung der Fibroblasten werden die Unterschiede zwischen Kontrolle (Bild C) und inkubierten Fibroblasten (Bild D) deutlich. Hier ist eine deutliche Dunkelfärbung der Zellmembran der mit Carotinoid inkubierten Zelle zu erkennen. Darüber hinaus ist in Bild D zu sehen, dass sich an der Zellmembran Abschnürungen bilden, sogenannte endozytotische Vesikel. Über solche Vesikel ist die Zelle in der Lage, Substanzen aus dem Medium ins Cytosol aufzunehmen und diese zu den verschiedenen Organellen zu transportieren.

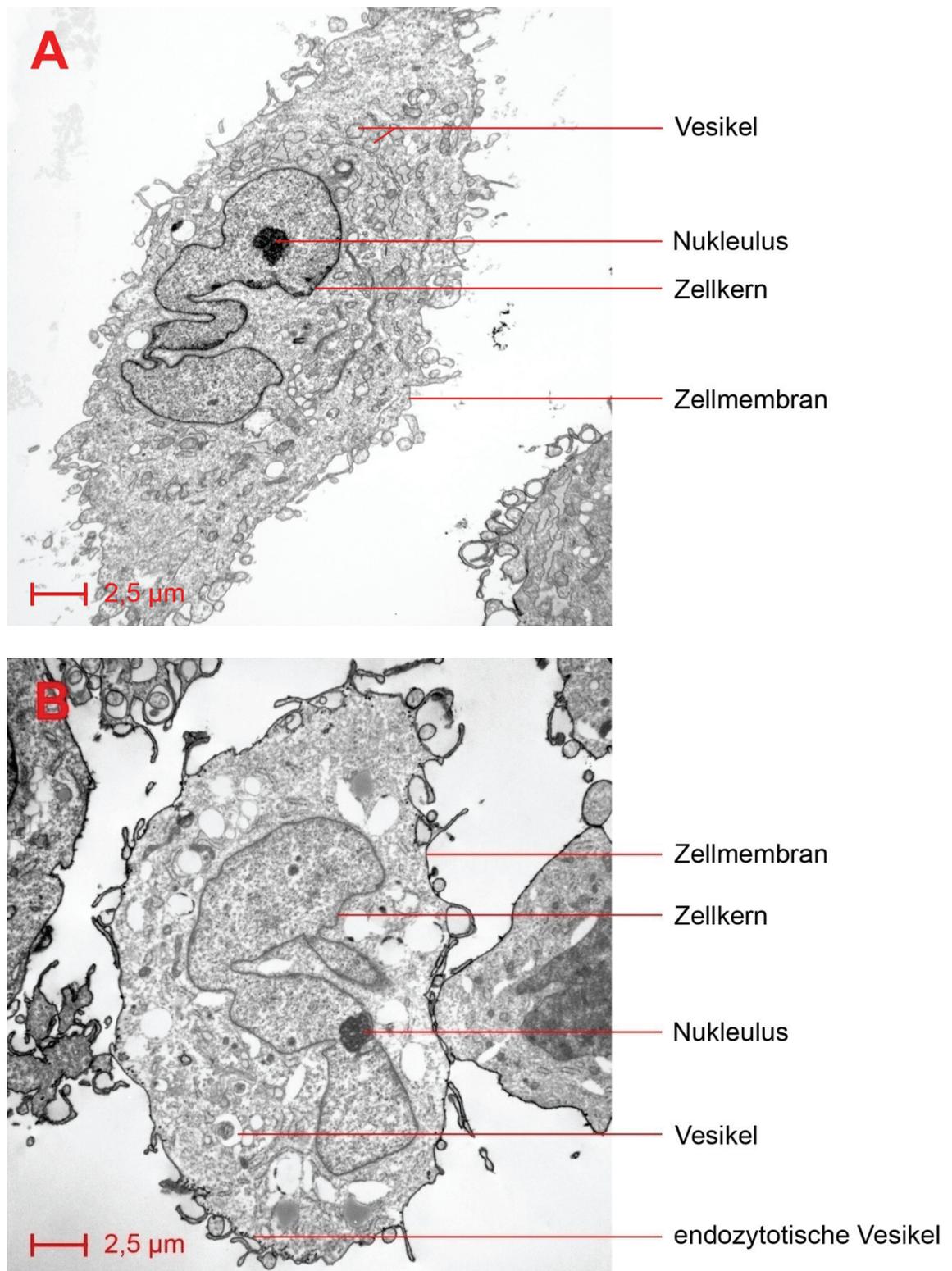


Abb. 5.38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fibroblasten mit 0,1% THF (Kontrolle) (A) und mit 10 μmol/L DHIR (B) für 24 h inkubiert; Vergrößerung: 3000-fach

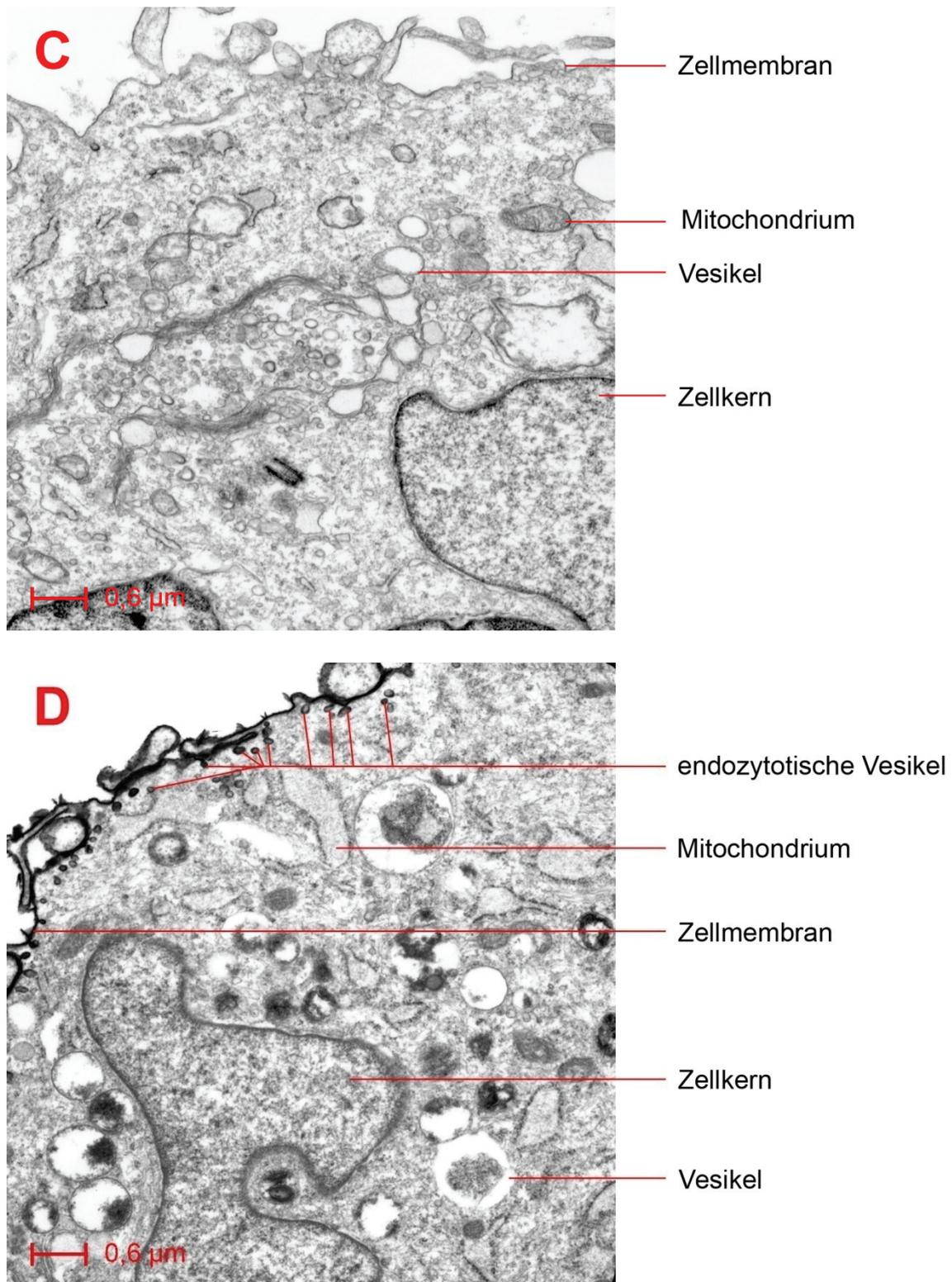


Abb. 5.39: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Fibroblasten mit 0,1% THF (Kontrolle) (C) und mit 10 μmol/L DHIR (D) für 24 h inkubiert; Vergrößerung: 12000-fach

1.38 Abnahme der Carotinoide in humanen dermalen Fibroblasten unter UV-Bestrahlung

Nachdem im Kapitel 1.30 die Zersetzung der lichtempfindlichen Carotinoide Lutein, IR und DHIR unter UV-Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB und 10 und 27,5 J/cm² UVA-Licht gezeigt wurde, wird im Folgenden die Stabilität der Carotinoide unter UV-Bestrahlung in der Zelle untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (1,5/5/10 µmol/L) an Lutein, IR und DHIR inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen der Endkonzentration im Kulturmedium auf den Zellen. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen wurden diese mit 0,5 bzw. 1,5 J/cm² UVB und 10, 20 oder 27,5 J/cm² UVA bestrahlt. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Carotinoide aus den Zellen extrahiert und per HPLC vermessen.

In den folgenden Diagrammen sind die Konzentrationen, mit denen die Zellen inkubiert wurden, auf der x-Achse angegeben. Auf der y-Achse sind die Konzentrationen an Carotinoid angegeben, die nach der Extraktion aus den Zellen mittels HPLC bestimmt wurden. Normiert wurden die Carotinoidkonzentrationen auf die Proteinmenge. Die in den Diagrammen mit * gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Die mit zwei ** gekennzeichneten Werte sind signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Werten der geringeren Bestrahlungsdosis.

In Abb. 5.40 und Abb. 5.41 ist die Abnahme von Lutein in Zellen, welche mit UVB und UVA bestrahlt wurden, gezeigt. Bei einer Inkubation der Zellen mit 1,5 µmol/L ist bei keiner Bestrahlungsdosis im UVB-Bereich eine signifikante Abnahme von Lutein zu verzeichnen. Bei einer Inkubation der Zellen mit 5 µmol/L ist ab einer Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVB eine signifikante Abnahme um 38% im Vergleich zu unbestrahlten Zellen und im Vergleich mit 0,5 J/cm² UVB bestrahlten Zellen eine Abnahme von 28% zu beobachten. Werden die Zellen mit 10 µmol/L Lutein inkubiert, ist bereits ab einer Bestrahlung mit 0,5 J/cm² eine signifikante Abnahme um 13% und bei einer Bestrahlung mit 1,5 J/cm² eine Abnahme von 30% gegenüber unbestrahlten Zellen zu verzeichnen. Zusätzlich ist die Luteinkonzentration in den mit 1,5 J/cm² UVB

bestrahlten Zellen signifikant um 17% niedriger als in Zellen, die mit 0,5 J/cm² bestrahlt wurden.

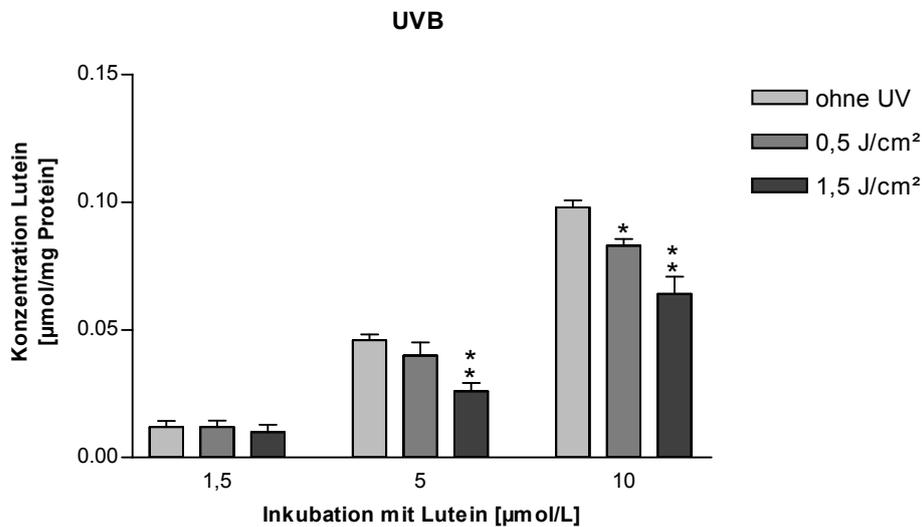


Abb. 5.40: Konzentration von Lutein in Zellen unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$

Werden die mit Lutein inkubierten Zellen mit UVA-Licht bestrahlt (Abb. 5.41), ist bei jeder Luteinkonzentration, mit der die Zellen inkubiert werden, und in allen Bestrahlungsdosen ein signifikanter Unterschied zu unbestrahlten Zellen zu erkennen.

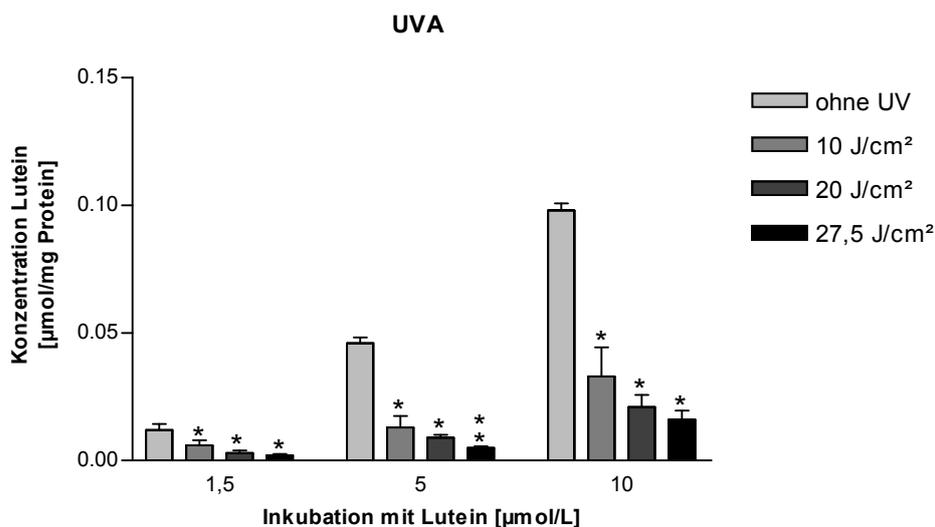


Abb. 5.41: Konzentration von Lutein in Zellen unter UVA-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$

Werden die mit 1,5 $\mu\text{mol/L}$ Lutein inkubierten Zellen mit 10, 20 oder 27,5 J/cm^2 UVA bestrahlt, kommt es zu einer signifikanten Abnahme des Luteins um 57%, 75% und 85% im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Zellen, welche mit 5 $\mu\text{mol/L}$ Lutein inkubiert werden, weisen ebenfalls eine signifikant erniedrigte Luteinkonzentration um 63%, 81% und 88% im Vergleich zu unbestrahlten Zellen auf. Werden die Zellen mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Lutein inkubiert, kommt es nach der Bestrahlung mit 10, 20 und 27,5 J/cm^2 UVA zu einer Abnahme des Luteins in den Zellen um 58%, 75% und 83% gegenüber den unbestrahlten Zellen. In Tabelle 5.1 sind alle prozentualen Werte für die Abnahme von Lutein in der Zelle nach UVB- und UVA-Bestrahlung wiedergegeben. Hier wird deutlich, dass bei der Bestrahlung mit UVA-Licht wesentlich mehr Lutein abgebaut wird als bei der Bestrahlung mit UVB-Licht. Während nach der Bestrahlung der mit Lutein inkubierten Zellen mit 1,5 J/cm^2 UVB durchschnittlich noch 69% an Lutein in der Zelle wiederzufinden sind, sind nach der Bestrahlung mit 27,5 J/cm^2 UVA-Licht nur noch durchschnittlich 15% an Lutein in der Zelle vorhanden.

Tabelle 5.1: Abnahme von Lutein in Zellen unter UVB- und UVA-Bestrahlung in Bezug auf die Kontrolle (100%)

Bestrahlung	Inkubiert mit Lutein		
	1,5 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
0 J/cm^2 (Kontrolle)	100	100	100
0,5 J/cm^2 UVB	98 \pm 0%	90 \pm 13%	87 \pm 5%
1,5 J/cm^2 UVB	77 \pm 12%	62 \pm 5%	70 \pm 10%
10 J/cm^2 UVA	43 \pm 10%	37 \pm 15%	42 \pm 15%
20 J/cm^2 UVA	25 \pm 6%	19 \pm 2%	25 \pm 6%
27,5 J/cm^2 UVA	15 \pm 2%	12 \pm 2%	17 \pm 4%

In Abb. 5.42 und Abb. 5.43 ist die Abnahme von IR in Zellen unter UV-Bestrahlung dargestellt. Werden die mit 1,5 $\mu\text{mol/L}$ inkubierten Zellen mit 0,5 oder 1,5 J/cm^2 UVB bestrahlt, kommt es zu einem signifikanten Verlust von IR in der Zelle um 34% bzw. 43%. Zellen, welche mit 5 $\mu\text{mol/L}$ IR inkubiert wurden, weisen nach einer Bestrahlung mit 0,5 J/cm^2 UVB keine signifikante Abnahme

von Lutein auf. Entsprechende Zellen, welche mit $1,5 \text{ J/cm}^2$ UVB-Licht bestrahlt wurden, haben einen um 50% niedrigeren Gehalt an IR als unbestrahlte Zellen. Zellen, welche mit $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$ IR inkubiert wurden, haben nach der Bestrahlung mit $0,5$ oder $1,5 \text{ J/cm}^2$ eine um 10% bzw. 23% niedrigere IR-Konzentration.

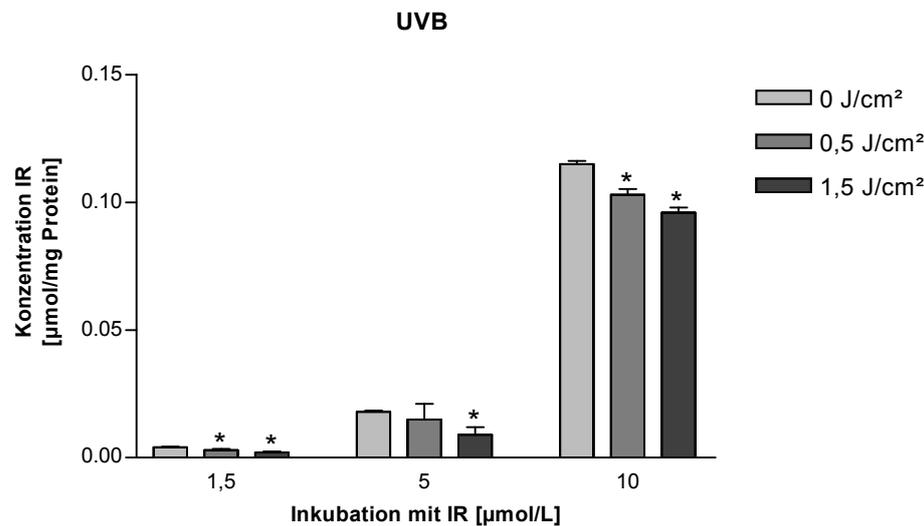


Abb. 5.42: Konzentration von IR in Zellen unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

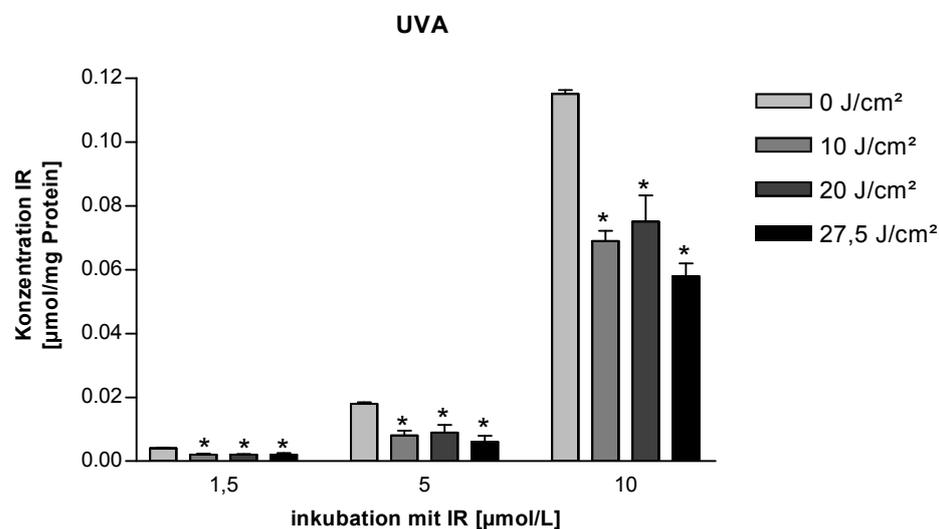


Abb. 5.43: Konzentration von IR in Zellen unter UVA-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

In Abb. 5.43 ist die Abnahme von IR in Zellen nach der Bestrahlung mit 10, 20 und $27,5 \text{ J/cm}^2$ UVA gezeigt. Die mit $1,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ IR inkubierten Zellen weisen nach der Bestrahlung mit den angegebenen Dosen UVA eine Abnahme von

60%, 47% und 68% auf. Die mit 5 $\mu\text{mol/L}$ inkubierten Zellen weisen einen um 55%, 51% und 64% niedrigeren IR-Gehalt im Gegensatz zur Kontrolle auf. Bei der höchsten Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ IR nimmt die Menge an IR in den Zellen nach Bestrahlung mit UVA um 36%, 39% und 53% ab.

Anhand des Graphen in Abb. 5.43 und der relativen Werte für die Stabilität von IR in Zellen in Tabelle 5.2 wird deutlich, dass IR unter UVA-Bestrahlung stabiler ist als Lutein. Bei einer Bestrahlung mit 27,5 J/cm^2 UVA sind in Zellen, welche mit Lutein inkubiert wurden, noch 17% der Substanz vorhanden. Nach der gleichen Bestrahlung von Zellen, welche mit IR inkubiert wurden, sind hingegen noch 47% der Substanz vorhanden. Dennoch ist auch bei der Bestrahlung mit UVA von Zellen, inkubiert mit IR, in jeder Dosis und Konzentration eine signifikante Abnahme von IR zu erkennen.

Tabelle 5.2: Abnahme von IR in Zellen unter UVB- und UVA-Bestrahlung in Bezug auf die Kontrolle

Bestrahlung	Inkubiert mit IR		
	1,5 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$
0 J/cm^2 (Kontrolle)	100	100	100
0,5 J/cm^2 UVB	66 \pm 3%	84 \pm 5%	90 \pm 1%
1,5 J/cm^2 UVB	57 \pm 3%	50 \pm 2%	77 \pm 11%
10 J/cm^2 UVA	40 \pm 12%	45 \pm 10%	64 \pm 8%
20 J/cm^2 UVA	53 \pm 10%	49 \pm 16%	61 \pm 10%
27,5 J/cm^2 UVA	32 \pm 2%	36 \pm 13%	47 \pm 7%

Werden Zellen mit DHIR inkubiert und anschließend mit UVB-Licht bestrahlt, wie in Abb. 5.44 gezeigt, ist bei einer Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm^2 UVB eine signifikante Abnahme von DHIR um 36% und 42% zu beobachten. Bei der höheren Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ ist eine signifikante Abnahme von DHIR von 16% und 50% zu verzeichnen. Werden die Zellen mit 10 $\mu\text{mol/L}$ DHIR inkubiert und mit UVB bestrahlt (0,5 und 1,5 J/cm^2), nimmt die DHIR Konzentration im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen um 12% bzw. 27% ab.

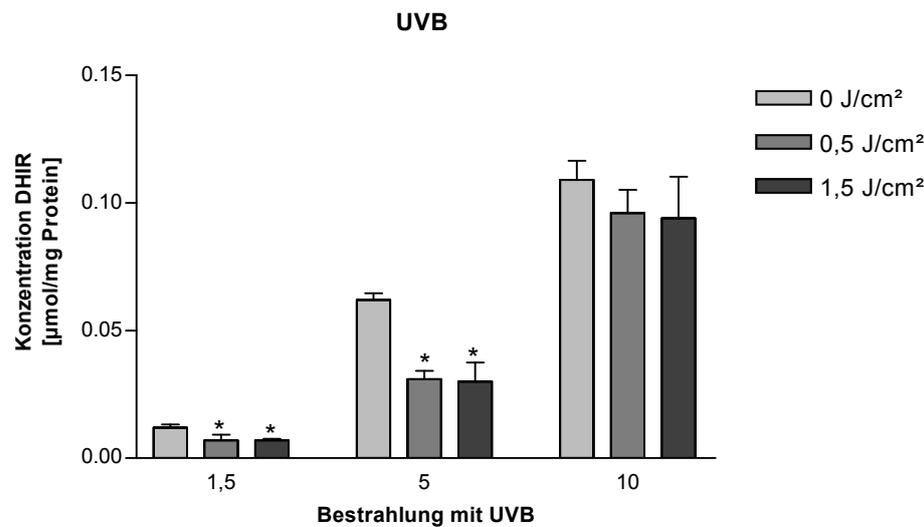


Abb. 5.44: Konzentration von DHIR in Zellen unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

Werden die mit DHIR inkubierten Zellen mit 10, 20 oder 27,5 J/cm² UVA bestrahlt, ist wie im Falle des Lutein und IR bei jeder Bestrahlungsdosis eine signifikante Abnahme an DHIR zu beobachten. Werden die Zellen mit 1,5 µmol/L DHIR inkubiert, nimmt die Konzentration in Zellen unter der Bestrahlung mit UVA (10, 20 und 27,5 J/cm²) um 74%, 81% bzw. 84% im Vergleich zu unbestrahlten Zellen ab. Bei einer Inkubation der Zellen mit 5 µmol/L DHIR liegen die DHIR-Konzentrationen nach der Bestrahlung mit UVA mit einer Abnahme von 55%, 51% und 64% noch deutlich höher. Bei der höchsten Konzentration von 10 µmol/L DHIR werden nach der UVA-Bestrahlung nur 38%, 27% bzw. 52% an DHIR zerstört.

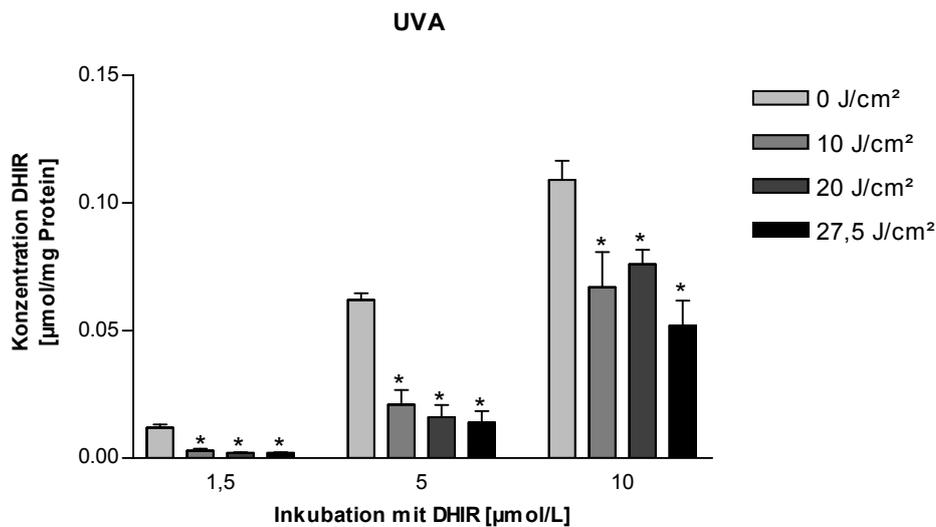


Abb. 5.45: Konzentration von DHIR in Zellen unter UVA-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

DHIR erweist sich somit im Vergleich zu Lutein in Zellen unter Bestrahlung mit UVA als stabiler. Im Vergleich zum IR ist weder nach der Bestrahlung mit UVB- noch UVA-Licht ein Unterschied zu erkennen.

Tabelle 5.3: Abnahme von DHIR in Zellen unter UVB- und UVA-Bestrahlung in Bezug auf die Kontrolle

Bestrahlung	Inkubiert mit DHIR		
	1,5 µmol/L	5 µmol/L	10 µmol/L
0 J/cm² (Kontrolle)	100	100	100
0,5 J/cm² UVB	64 ± 4%	58 ± 8%	88 ± 13%
1,5 J/cm² UVB	58 ± 1%	56 ± 9%	73 ± 10%
10 J/cm² UVA	26 ± 4%	39 ± 6%	62 ± 14%
20 J/cm² UVA	19 ± 2%	30 ± 5%	73 ± 14%
27,5 J/cm² UVA	16 ± 2%	26 ± 4%	48 ± 12%

Anhand der Ergebnisse lässt sich folgende Reihenfolge der Stabilität der Carotinoide in Zellen unter Bestrahlung mit UV ermitteln:

UVB: Lutein = IR = DHIR

UVA: Lutein < DHIR < IR

1.39 Zytotoxizität der untersuchten Carotinoide

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war es notwendig zu ermitteln, ob die untersuchten Carotinoide toxisch auf ausgewählte Zellen wirken und ob sich eine toxische Wirkung unter der Bestrahlung mit UV-Licht durch mögliche Zerfallsprodukte der Carotinoide ergibt. Mit Hilfe des Sulforhodamin B (SRB) Assays können Aussagen zur Zytotoxizität einer Substanz gemacht werden.

Dazu wurden die Zellen, wie in Kapitel 1.17 und 1.18 beschrieben, kultiviert, inkubiert und bestrahlt. Die angegebenen Carotinoidkonzentrationen entsprechen der Endkonzentration im Kulturmedium auf den Zellen. Diese betragen 1,5, 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$. Anschließend erfolgte wie in Kapitel 1.20 erläutert die Bestimmung der Zellviabilität mittels SRB Assay. Nachdem alle abgestorbenen Zellen durch mehrmaliges Waschen entfernt wurden, bindet der zugegebene Farbstoff Sulforhodamin B über ionische Wechselwirkungen an die zellulär gebundenen Proteine noch lebender Zellen. Da die Proteinmenge mit der Zellzahl korreliert, kann somit bestimmt werden, wie viele Zellen in einem Experiment, wie z. B. die Bestrahlung mit UV-Licht, überlebt haben. Der Farbstoff Sulforhodamin B lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm vermessen.

Bestrahlt wurden die Zellen im UVA-Bereich mit 5, 10, 20, 27,5 J/cm^2 und im UVB-Bereich mit 0,5 und 1,5 J/cm^2 . Die Zytotoxizität wurde drei Mal unabhängig voneinander untersucht ($n=3$). Zur Auswertung wurden die erhaltenen Messwerte jeweils auf den Wert der Lösemittelkontrolle (Zellen inkubiert mit THF) bezogen.

In den Abb. 5.46 und Abb. 5.47 ist die Zellviabilität von mit Lutein inkubierten dermalen Fibroblasten unter Bestrahlung mit UVA und UVB gezeigt. Im Bereich der UVA-Strahlung mit 5 und 10 J/cm^2 ist keine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten. Bei einer Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVA ist ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle in allen Konzentrationen (1,5 / 5 / 10 $\mu\text{mol/L}$) von Lutein zu erkennen. Die Bestrahlungsdosis von 27,5 J/cm^2 UVA ist mit

einer Abnahme der Zellviabilität um fast 50% toxisch. Bei dieser Bestrahlungsdosis ist kein signifikanter Unterschied der inkubierten Zellen gegenüber der Kontrolle zu erkennen.

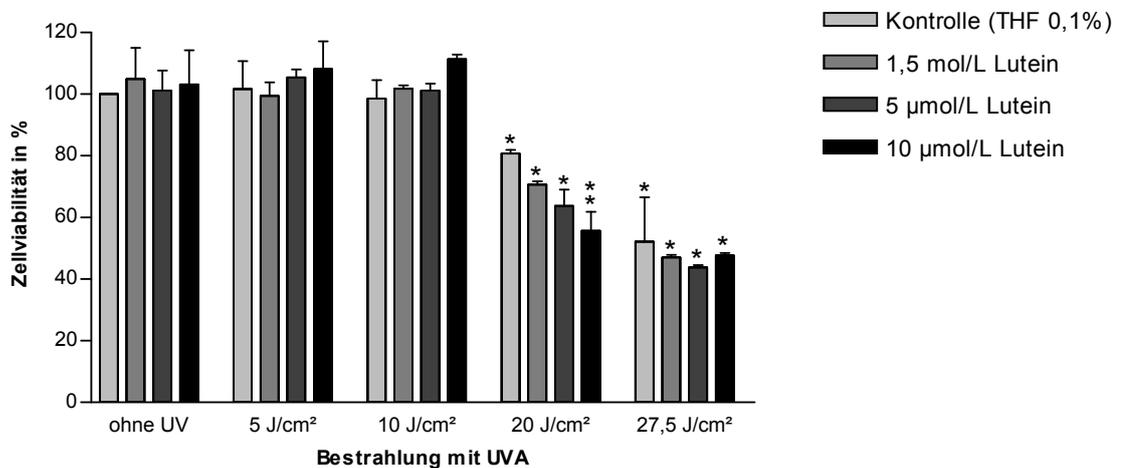


Abb. 5.46: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit Lutein unter UVA-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$

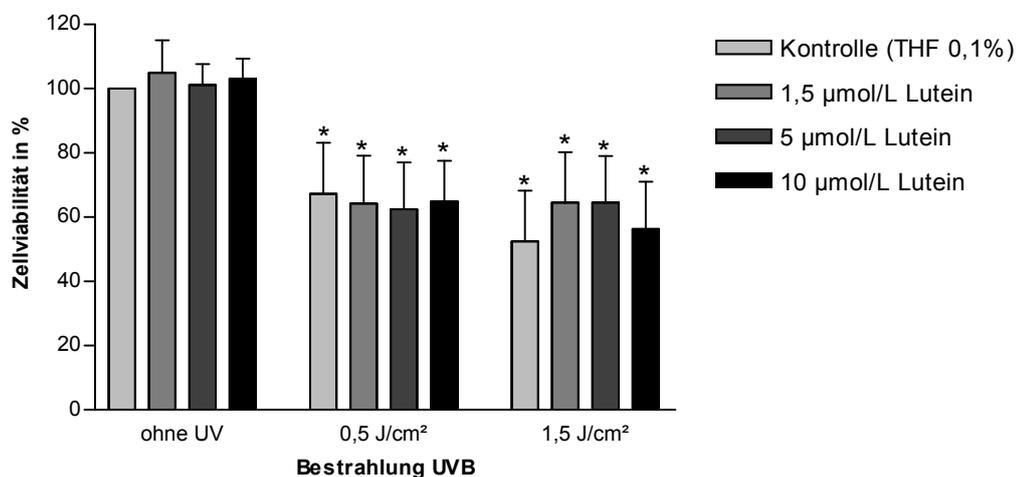


Abb. 5.47: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit Lutein unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

Eine vergleichbare Zytotoxizität ist bei der Inkubation der Zellen mit IR zu beobachten (Abb. 5.48). Die Bestrahlung im Bereich von UVA mit 5 und 10 J/cm² hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Sie liegt in diesem Bereich um

100%. Ab einer Dosis von 20 J/cm² UVA ist eine Abnahme der Zellviabilität um 20% (Kontrolle) zu beobachten. IR-inkubierte Zellen weisen allerdings keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (bestrahlt mit 20 J/cm² UVA) auf, d. h. IR ist unter diesen Bedingungen nicht toxisch für die Zellen. Ab einer Bestrahlungsdosis von 27,5 J/cm² liegt die Zellviabilität nur noch bei 50%. In diesem Bereich sind keine Unterschiede zwischen Kontrolle und IR-inkubierten Zellen mehr festzustellen.

In Abb. 5.49 ist die Zellviabilität unter Bestrahlung mit UVB-Licht gezeigt. Hier ist eine verminderte Zellviabilität (30% niedriger) bereits ab einer Dosis von 0,5 J/cm² zu beobachten. Eine Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVB führt bei keiner der untersuchten Konzentrationen zu einer weiteren signifikanten Verminderung der Zellviabilität. Das bedeutet, IR ist in keiner der verwendeten Dosen im UVB-Bereich im Vergleich zur Kontrolle toxisch.

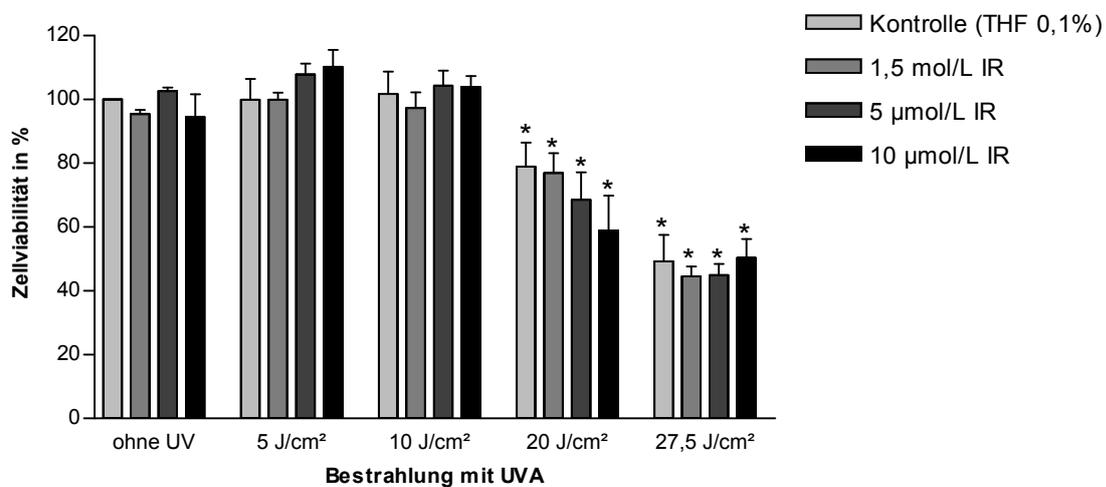


Abb. 5.48: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit IR unter UVA-Bestrahlung, *p ≤ 0,05

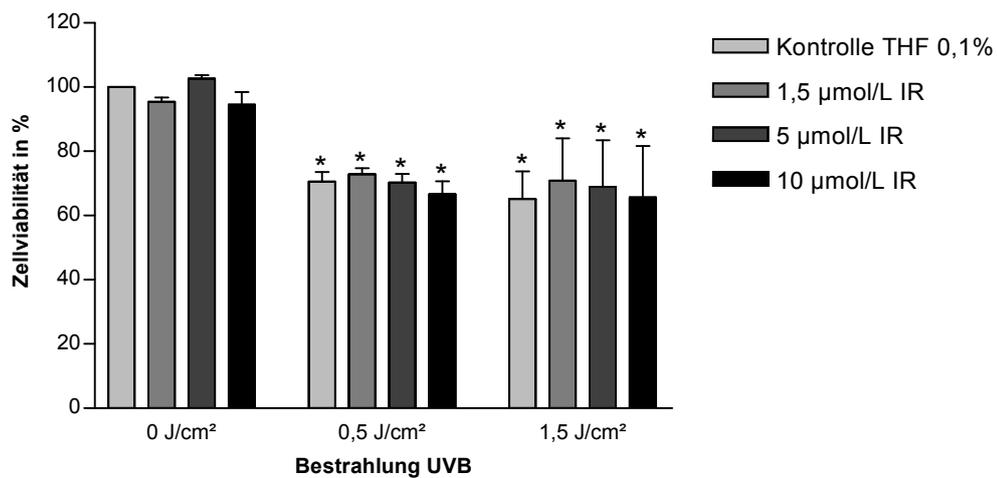


Abb. 5.49: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit IR unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

In Abb. 5.50 ist die Wirkung von DHIR unter UVA-Bestrahlung auf die Zellviabilität dargestellt. Es wird deutlich, dass bis zu einer Bestrahlungsdosis von 10 J/cm² keine toxischen Effekte von DHIR auftreten. Die Zellviabilität liegt bei 5 und 10 J/cm² UVA bei nahezu 100%. Bei einer Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA ist hingegen eine deutliche Abnahme der Zellviabilität in der Kontrolle und den mit DHIR behandelten Zellen zu erkennen. Darüber hinaus wird deutlich, dass die mit 10 µmol/L inkubierten Zellen eine um 20% niedrigere Zellviabilität aufweisen als die Kontrolle. DHIR wirkt somit bei einer Bestrahlungsdosis von 20 J/cm² UVA und einer Inkubation der Zellen mit 10 µmol/L toxisch. Bei einer Bestrahlungsdosis von 27,5 J/cm² UVA ist eine deutliche Verringerung der Zellviabilität zu erkennen. Dabei ist kein Unterschied zwischen Kontrolle und DHIR inkubierten Zellen in jeder untersuchten Konzentration zu erkennen.

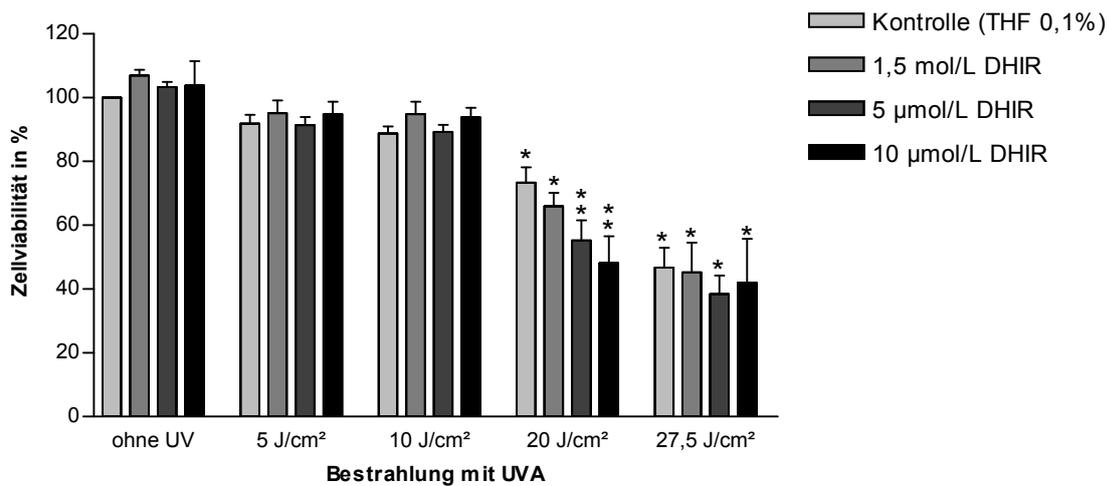


Abb. 5.50: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit DHIR unter UVA-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,05$

Werden die Zellen mit UVB-Licht bestrahlt (Abb. 5.51), ist bereits ab einer Dosis von $0,5 \text{ J/cm}^2$ eine Abnahme der Zellviabilität um 30-40% zu beobachten. Eine Abnahme um weitere 10% ist bei einer Bestrahlung von $1,5 \text{ J/cm}^2$ zu beobachten. Es ist kein signifikanter Unterschied der DHIR-inkubierten Zellen zur THF-Kontrolle zu erkennen. Somit kann eine Toxizität von DHIR in diesem Bestrahlungsbereich ausgeschlossen werden.

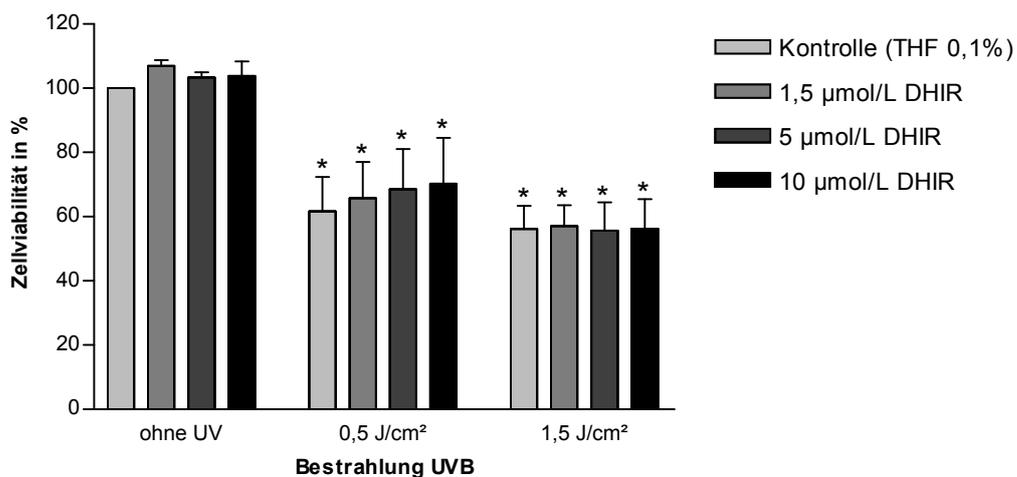


Abb. 5.51: Zellviabilität (dermale Fibroblasten) nach Inkubation mit DHIR unter UVB-Bestrahlung, * $p \leq 0,05$

1.40 Effekte von Carotinoiden auf die UV-induzierte ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten

Die UV-Bestrahlung von Zellen führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese ROS können durch Oxidationsreaktionen an Lipiden, Proteinen und der DNA die Zelle schädigen. In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Carotinoide Lutein, IR und DHIR die Bildung von ROS hemmen können.

Die ROS-Bildung in Zellen lässt sich mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA) verfolgen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist membrangängig und wird nach Abspaltung der Acetatgruppe im Cytosol durch intrazelluläre Esterasen membranimpermeabel. Die im Cytosol gebildeten ROS oxidieren H₂DCF zu DCF (Dichlorofluorescein). Dieser grün-gelblich fluoreszierende Farbstoff lässt sich mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektieren. Für die bildgebende Analyse mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden dermale Fibroblasten mit jeweils 10 µmol/L Lutein, IR und DHIR für 24 h inkubiert und anschließend mit 0, 5, 10 und 20 J/cm² UVA-Licht bestrahlt. Sofort nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit einer Lösung aus H₂DCF-DA überschichtet und für 60 min im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Bilder angefertigt. Diese sind „Schwarz-Weiß“-Bilder, die mit Hilfe des Computers in Falschfarben umgewandelt werden. Wie in Abb. 5.52 dargestellt, ist geringe Fluoreszenz im originalen Bild dunkel dargestellt, als Falschfarbe entspricht dies Blautönen. Nimmt die Fluoreszenz zu, so wird das originale Bild entsprechend heller, und die Falschfarben gehen hin zu den Farbtönen gelb bis rot.

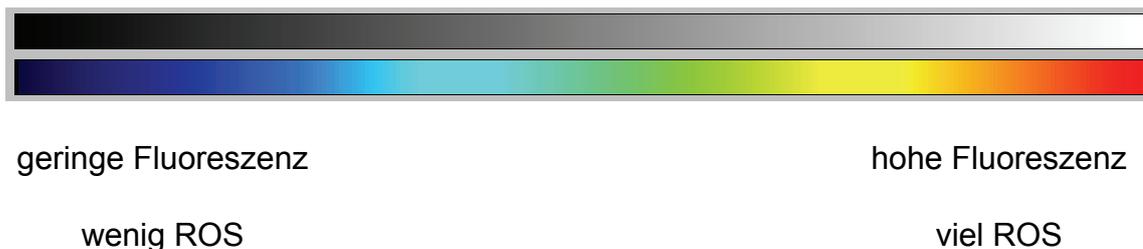


Abb. 5.52: Falschfarbenskala des Fluoreszenzmikroskopes

In der Abb. 5.53 sind ausgewählte Bilder dargestellt. Diese sind von links nach rechts den ansteigenden Bestrahlungsdosen und von oben nach unten den Substanzen THF (Lösemittel-Kontrolle), Lutein, IR und DHIR zugeordnet. In der ersten Reihe der Abb. 5.53 sind Bilder von Zellen, inkubiert mit 0,1% THF, nach der Bestrahlung mit UVA gezeigt. Diese Reihe gilt als Kontrolle. Bei unbestrahlten oder mit 5 J/cm^2 bestrahlten Zellen ist eine geringe Fluoreszenz im Cytosol zu beobachten. Bei einer Bestrahlungsdosis von 10 und 20 J/cm^2 UVA entwickelt sich die Fluoreszenz zunehmend im Kern der Zelle. In der zweiten Reihe der Abb. 5.53 sind die Bilder von Zellen, welche mit Lutein inkubiert wurden, dargestellt. Im ersten Bild sind unbestrahlte Zellen zu sehen. Hier ist wie bei der Kontrolle nur eine minimale Fluoreszenz zu beobachten. Bei höheren Bestrahlungsdosen mit 5, 10 und 20 J/cm^2 UVA nimmt die Fluoreszenz kontinuierlich zu. Dabei weist das letzte Bild bei einer Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVA eine etwas geringere Fluoreszenz auf als die Kontrolle bei gleicher Bestrahlung.

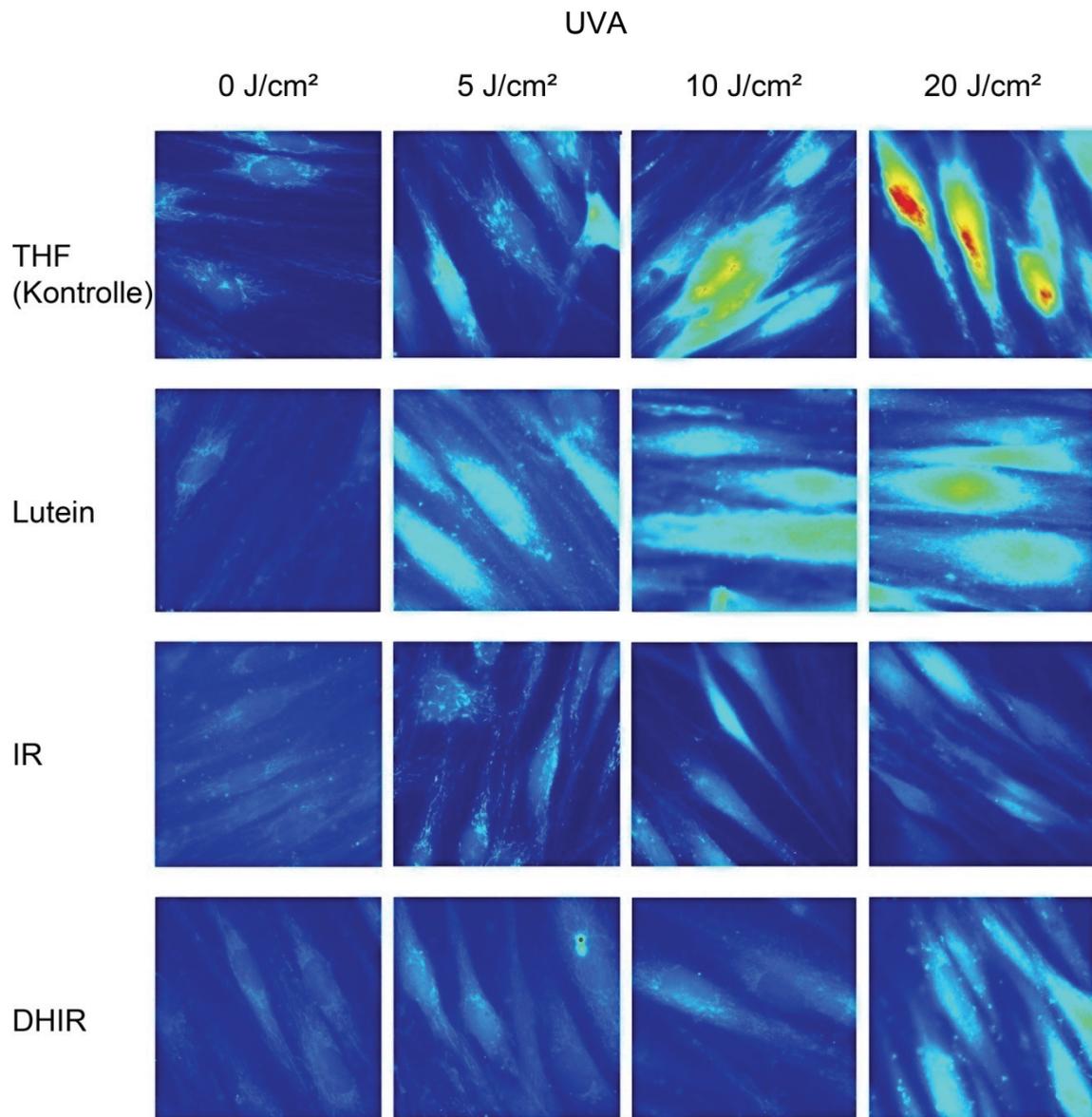


Abb. 5.53: ROS-Bildung in Zellen, inkubiert mit THF (Kontrolle), Lutein, IR und DHIR nach verschiedenen Bestrahlungsdosen UVA; Mikroskop: Axiovert 100TV, 63er Objektiv, Belichtung: 778 ms, Verstärkung: 200, Offset: 0

In der dritten Reihe der Abb. 5.53 sind Zellen, welche mit IR inkubiert wurden, gezeigt. Im ersten Bild sind die unbestrahlten Zellen zu sehen. Wie bei der Kontrolle ist auch hier nur eine geringe Fluoreszenz zu erkennen. Werden die mit IR inkubierten Zellen mit 5, 10 und 20 J/cm² UVA-Licht bestrahlt, nimmt die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger zu. In den Zellen, inkubiert mit IR, wird nach der Bestrahlung mit UVA weniger ROS gebildet bzw. abgefangen als in der Kontrolle oder mit Lutein inkubierten Zellen. In der untersten Reihe der Abb. 5.53 sind die Zellen, welche mit DHIR inkubiert

wurden, gezeigt. Auch hier sind im ersten Bild unbestrahlte Zellen zu sehen. Es ist kein Unterschied zur Kontrolle und zu den mit Lutein oder IR inkubierten Zellen zu erkennen. Werden die Zellen, welche mit DHIR inkubiert wurden, mit 5, 10 und 20 J/cm² UVA bestrahlt, ist eine geringere Fluoreszenz gegenüber den mit Lutein inkubierten Zellen und der Kontrolle zu erkennen.

Dieses qualitative Experiment zeigt, dass die ROS-Bildung nach der Bestrahlung mit UVA-Licht in Zellen, inkubiert mit IR oder DHIR, geringer ist als in Zellen, die mit THF (Kontrolle) oder Lutein inkubiert sind.

Um die qualitativen Ergebnisse, die mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erhalten wurden, zu untermauern, wurden zusätzlich quantitative Messungen durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesers. Die Zellen wurden in „24 Well Platten“ mit den entsprechenden Carotinoiden in drei verschiedenen Konzentrationen 1,5 / 5 / 10 µmol/L für 24 h inkubiert und anschließend bestrahlt. Als Kontrolle wurden, wie bei der qualitativen Bestimmung, Zellen inkubiert mit 0,1% THF herangezogen. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung mit H₂DCF-DA überschichtet und sofort vermessen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesers über eine Zeitspanne von 40 min. Die Ergebnisse wurden auf die entsprechende Kontrolle bezogen. Die Fluoreszenzwerte werden als x-fache der Fluoreszenz der Kontrolle wiedergegeben. Diese Werte sind in den folgenden Diagrammen auf der y-Achse wiedergegeben. Auf der x-Achse ist die UVA-Bestrahlungsdosis in J/cm² angegeben.

In Abb. 5.54 ist die ROS-Bildung in Zellen, welche mit 1,5 µmol/L Lutein, IR und DHIR inkubiert sind, gezeigt. In den unbestrahlten Zellen, welche mit Lutein, IR oder DHIR inkubiert wurden, ist gegenüber der THF-Kontrolle kein Unterschied im ROS-Gehalt zu beobachten.

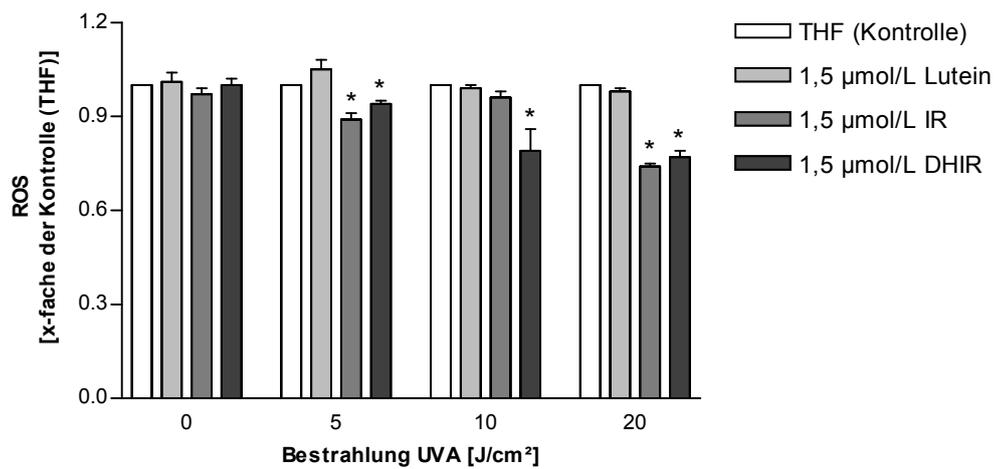


Abb. 5.54: ROS-Bildung in Zellen, inkubiert mit THF (Kontrolle), Lutein, IR, DHIR 1,5 µmol/L, nach der Bestrahlung mit UVA, * $p \leq 0,05$

Die mit Lutein behandelten Zellen weisen auch bei keiner weiteren Bestrahlungsdosis einen Unterschied zur Kontrolle auf. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus den qualitativen Experimenten (vgl. Abb. 5.53). Werden die Zellen mit 1,5 µmol/L IR oder DHIR inkubiert, ist bereits ab einer Bestrahlungsdosis von 5 J/cm² eine 0,3-fach geringere ROS-Bildung zu verzeichnen. Dies korreliert ebenfalls mit den Ergebnissen aus den qualitativen Untersuchungen.

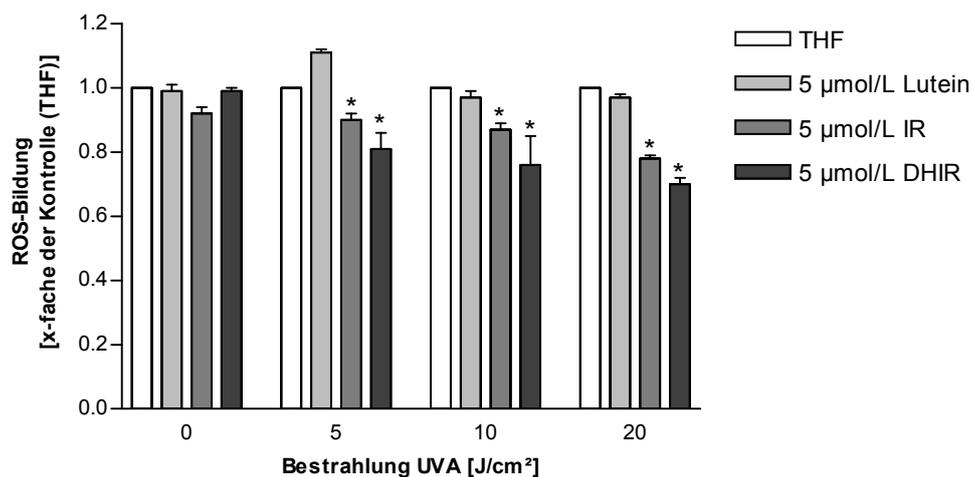


Abb. 5.55: ROS-Bildung in Zellen, inkubiert mit THF (Kontrolle), Lutein, IR, DHIR 5 µmol/L, nach der Bestrahlung mit UVA, * $p \leq 0,05$

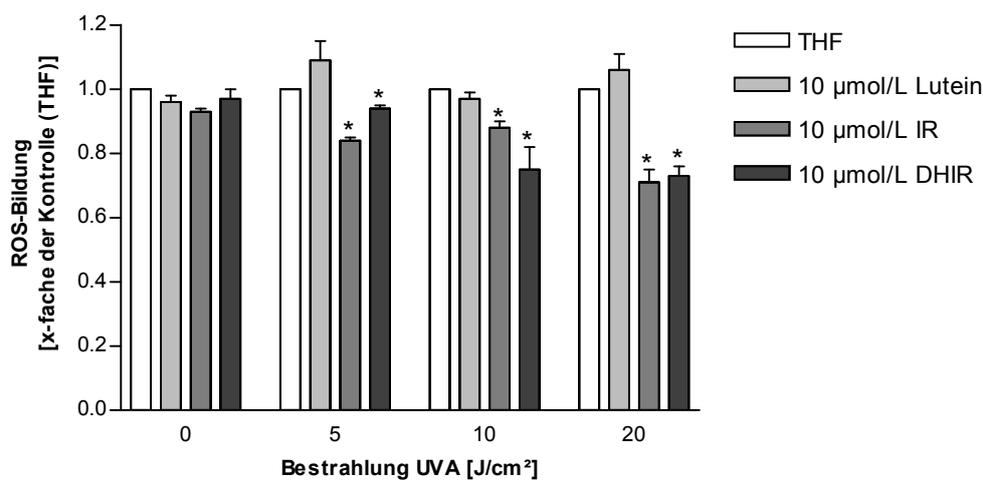


Abb. 5.56: ROS-Bildung in Zellen, inkubiert mit THF (Kontrolle), Lutein, IR, DHIR 10 µmol/L, nach der Bestrahlung mit UVA, *p ≤ 0,05

In den Diagrammen in Abb. 5.55 und Abb. 5.56 ist die ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten inkubiert mit 5 und 10 µmol/L Carotinoid, dargestellt. Die bereits beschriebenen Beobachtungen bestätigen sich hier erneut. Lutein hat keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von ROS in Zellen. Die Carotinoide IR und DHIR konnten in diesem Experiment signifikant vor der UVA-induzierten ROS-Bildung schützen.

1.41 Effekte von Carotinoiden auf die UV-induzierte MDA-Bildung in dermalen Fibroblasten

In Kapitel 1.31 wird die UV-abhängige Bildung von Malondialdehyd (MDA) in Liposomen beschrieben. In diesem Teil der Arbeit wird die Bildung von MDA in dermalen Fibroblasten unter den gleichen Bedingungen untersucht. Malondialdehyd ist ein Abbauprodukt, das bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Lipiden der Zellmembran, z. B. mit reaktiven Sauerstoffspezies, entsteht. MDA kann mit Thiobarbitursäure zu einem Farbkomplex derivatisiert werden. Dieser Farbstoff wird mit Hilfe der HPLC quantitativ bestimmt und ist ein Maß für die Schädigung an den Zellmembranen. Je mehr MDA sich bildet, desto größer ist der Schaden an der Zellmembran. Um den Einfluss der drei Carotinoide auf die MDA-Bildung in Zellen unter Bestrahlung mit UV-Licht zu untersuchen, wurden dermale Fibroblasten mit Lutein, IR und DHIR in

verschiedenen Konzentrationen inkubiert und mit UVB- und UVA-Licht bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen wie in Kapitel 1.14 beschrieben aufgearbeitet und das gebildete MDA mit Thiobarbitursäure derivatisiert. Die Detektion des Farbkomplexes erfolgte mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 513 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

In den Diagrammen (Abb. 5.57 und Abb. 5.58) ist auf der x-Achse die Bestrahlungsdosis im UVB- bzw. UVA-Bereich und auf der y-Achse die MDA-Konzentration als x-faches der unbehandelten Zellen ohne UV-Bestrahlung angegeben. In Abb. 5.57 ist die Bildung von MDA in Zellen unter Bestrahlung mit UVB gezeigt. Bei keiner der beiden Bestrahlungsdosen von 0,5 und 1,5 J/cm² UVB wird signifikant mehr MDA gebildet als in der Kontrolle ohne UV-Bestrahlung. Die MDA-Werte für unbehandelte Zellen und mit THF inkubierte Zellen weisen dabei keinen signifikanten Unterschied auf. Werden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen UVA-Licht bestrahlt (Abb. 5.58), ist bereits ab einer Dosis von 10 J/cm² UVA ein signifikanter Anstieg an MDA um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle bzw. zur MDA-Konzentration in unbehandelten Zellen zu beobachten. Bei einer Bestrahlung mit 20 und 27,5 J/cm² UVA ist ein signifikanter Anstieg der MDA-Bildung um das 2,5- und 3-fache zu beobachten. Im Weiteren werden die ermittelten MDA-Werte auf die MDA-Werte der Kontrolle (0,1% THF) bezogen, da die Kontrollwerte mit den Werten aus unbehandelten Zellen korrelieren. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse für die Bestrahlung mit UVA dargestellt, da bei der Bestrahlung mit UVB kein signifikanter Anstieg von MDA, weder in der Kontrolle noch in den unbehandelten Zellen, zu erkennen war.

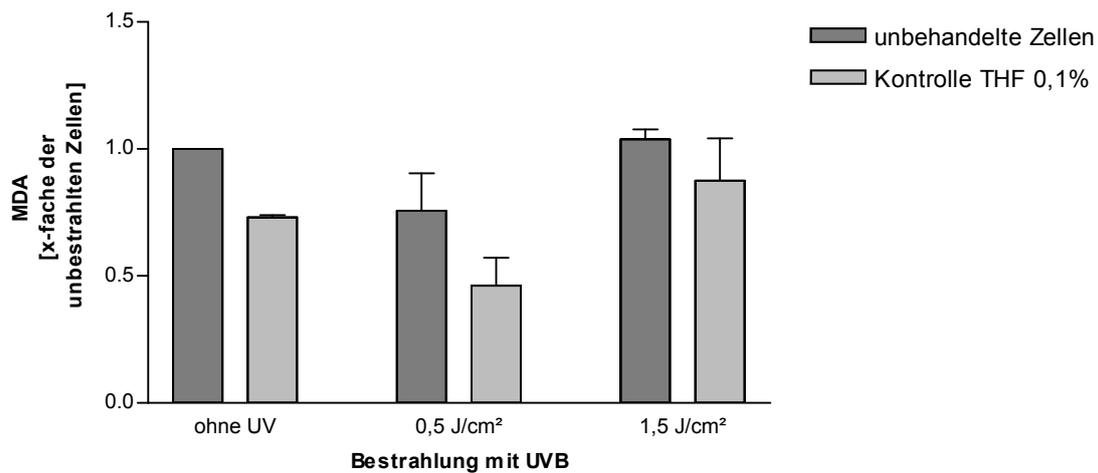


Abb. 5.57: MDA-Bildung in unbehandelten Zellen und mit 0,1% THF (Kontrolle) inkubierten Zellen, bestrahlt mit UVB; angegeben ist das x-fache der unbehandelten, unbestrahlten Zellen

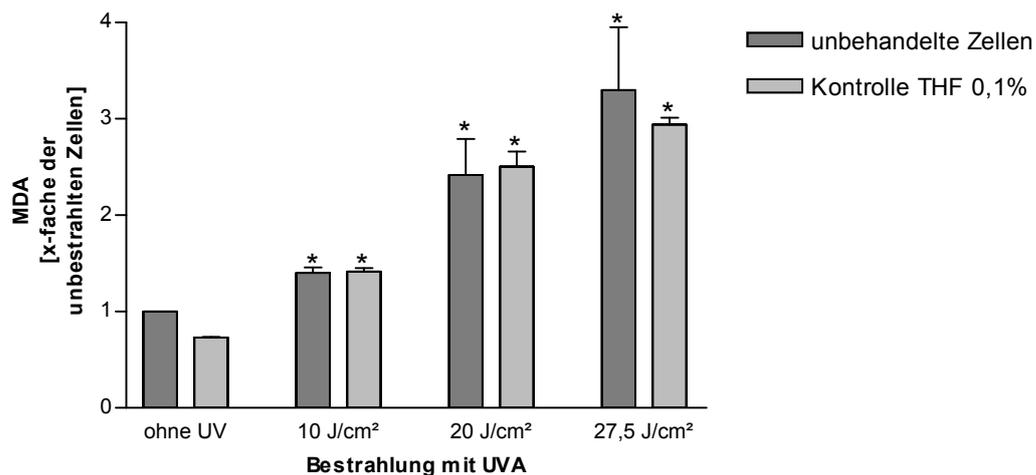


Abb. 5.58: MDA-Bildung in unbehandelten Zellen und mit 0,1% THF (Kontrolle) inkubierten Zellen, bestrahlt mit UVA; angegeben ist das x-fache der unbehandelten, unbestrahlten Zellen,* $p \leq 0,05$

In den Diagrammen in Abb. 5.60 bis Abb. 5.62 ist die MDA-Bildung in Zellen, inkubiert mit Lutein, IR und DHIR, dargestellt. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen angegeben, mit denen die Zellen inkubiert wurden. Diese Konzentration entspricht der Endkonzentration an Carotinoid im Kulturmedium. Auf der y-Achse ist die MDA-Konzentration als x-faches der Kontrolle wiedergegeben. Die Gerade in den dargestellten Diagrammen entspricht dem MDA-Wert von Zellen, welche mit 0,1% THF (Kontrolle) inkubiert wurden.

MDA-Werte von behandelten Zellen, die über dieser Geraden liegen, weisen auf eine erhöhte Lipidperoxidation hin. Die Bedingungen können als prooxidativ bezeichnet werden. MDA-Werte, die unter dieser Geraden liegen, weisen auf antioxidative Bedingungen hin.

In Abb. 5.59 ist die Bildung von MDA in unbestrahlten Zellen, inkubiert mit Lutein, IR und DHIR gezeigt. Lutein und DHIR haben unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die MDA-Bildung. IR hingegen wirkt stark prooxidativ. Die MDA-Bildung ist bereits ab einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{mol/L}$ statistisch signifikant erhöht und steigt bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ IR um das 4-fache an.

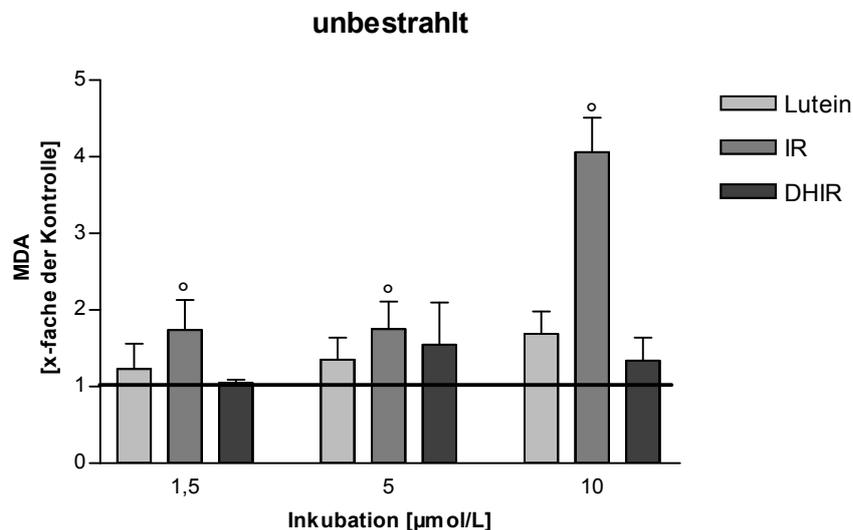


Abb. 5.59: MDA- Bildung in unbestrahlten Zellen inkubiert mit Lutein, IR und DHIR, Die Gerade im Diagramm entspricht dem MDA-Wert in unbestrahlten Zellen behandelt mit 0,1%; * $p \leq 0,05$: MDA-Werte liegen signifikant unter der Kontrolle; $^{\circ}p \leq 0,05$: MDA-Werte liegen signifikant über der Kontrolle

In Abb. 5.60 ist die MDA-Bildung in Zellen unter Bestrahlung mit 10 J/cm^2 UVA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Lutein in allen Konzentrationen bei einer Bestrahlung mit 10 J/cm^2 die Lipidperoxidation signifikant vermindern kann. Dabei nimmt die Bildung von MDA mit steigender Luteinkonzentration (1,5/ 5/10 $\mu\text{mol/L}$) um das 0,87-, 0,69- und 0,55-fache ab. Die MDA-Bildung in Zellen, welche mit IR inkubierten sind, ist in allen Konzentrationen (1,5/5/10 $\mu\text{mol/L}$) um das 2,39-, 2,48- bzw. 2,85-fache im Bezug zur Kontrolle deutlich erhöht. Durch IR wird eine Lipidperoxidation induziert. Werden die Zellen mit DHIR inkubiert,

zeigt die geringste Konzentration (1,5 $\mu\text{mol/L}$) keinen Einfluss auf die MDA-Bildung. Bei einer Konzentration von 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$ DHIR ist eine Abnahme der MDA-Bildung um das 0,79- und 0,62-fache zu beobachten. DHIR wirkt in diesen Konzentrationen antioxidativ.

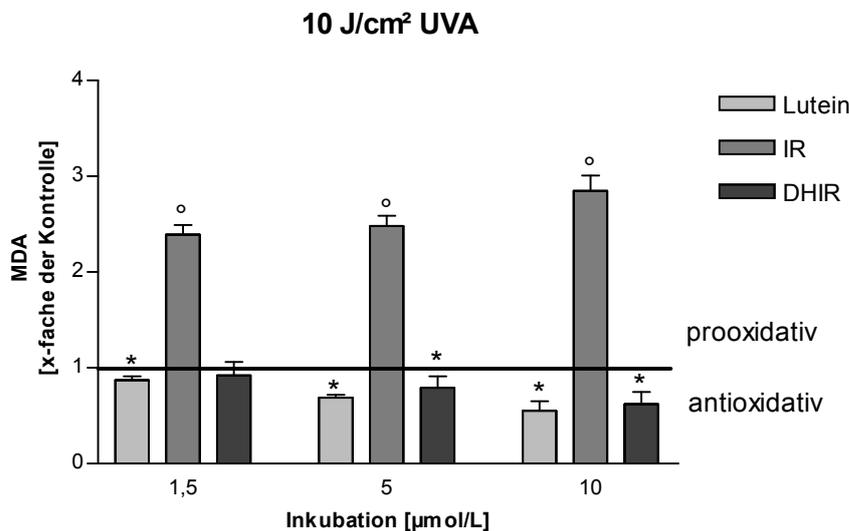


Abb. 5.60: MDA-Bildung in Zellen, inkubiert mit Lutein, IR und DHIR, bestrahlt mit 10 J/cm² UVA; Die Gerade im Diagramm entspricht dem MDA-Wert in Zellen behandelt mit 0,1% THF unter Bestrahlung mit 10 J/cm²* $p \leq 0,05$: MDA-Werte liegen signifikant unter der Kontrolle; ^o $p \leq 0,05$: MDA-Werte liegen signifikant über der Kontrolle

Werden die mit Carotinoid behandelten Zellen mit 20 J/cm² UVA bestrahlt (Abb. 5.61), weist Lutein in keiner der drei Konzentrationen eine antioxidative Wirkung auf. Die MDA-Bildung in Zellen, welche mit IR inkubiert sind, steigt ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ um das 1,9-fache und bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ IR um das 4-fache an. IR wirkt in diesen Konzentrationsbereichen stark prooxidativ. DHIR zeigt in den Konzentrationen 1,5 (0,83-fache) und 5 $\mu\text{mol/L}$ (0,87-fache) einen signifikant schützenden Effekt.

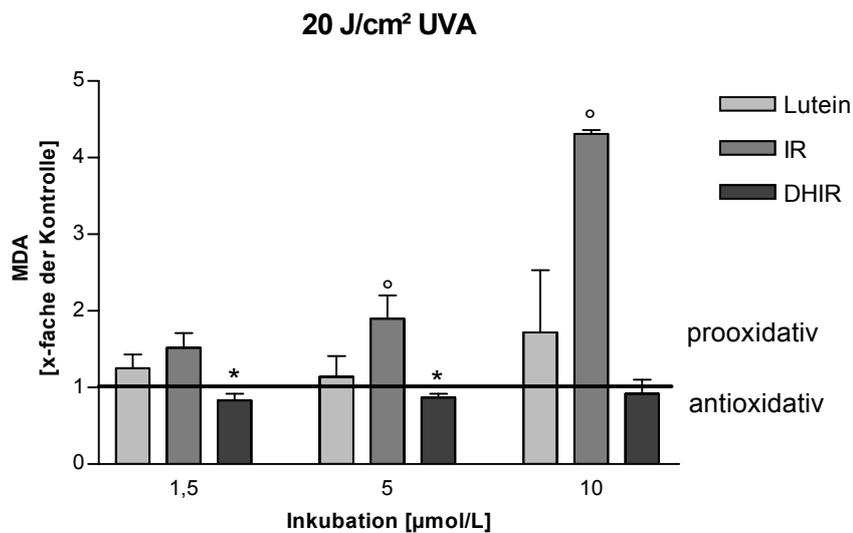


Abb. 5.61: MDA-Bildung in Zellen, inkubiert mit Lutein, IR und DHIR, bestrahlt mit 20 J/cm² UVA; Die Gerade im Diagramm entspricht dem MDA-Wert in Zellen behandelt mit 0,1% THF unter Bestrahlung mit 20 J/cm²; *p ≤ 0,05: MDA-Werte liegen signifikant unter der Kontrolle; °p ≤ 0,05: MDA-Werte liegen signifikant über der Kontrolle

Werden die mit Carotinoid behandelten Zellen mit 27,5 J/cm² UVA bestrahlt, sind die bereits beschriebenen antioxidativen bzw. prooxidativen Effekte der Carotinoide ebenfalls zu beobachten (Abb. 5.62). Lutein wirkt in den Konzentrationen 1,5 (0,56-fache) und 5 µmol/L (0,55-fache) antioxidativ. Werden die Zellen mit 1,5 und 5 µmol/L DHIR inkubiert, liegt die MDA-Menge bei dem 0,71- bzw. 0,73-fachen des MDA-Wertes der bestrahlten, unbehandelten Zellen. IR hingegen wirkt schon ab einer Konzentration von 1,5 µmol/L stark prooxidativ. Hier steigt die MDA-Konzentration gegenüber der Kontrolle mit steigender IR-Konzentration (1,5/5/10 µmol/L) um das 1,4-, 2,0- bzw. 2,8-fache an.

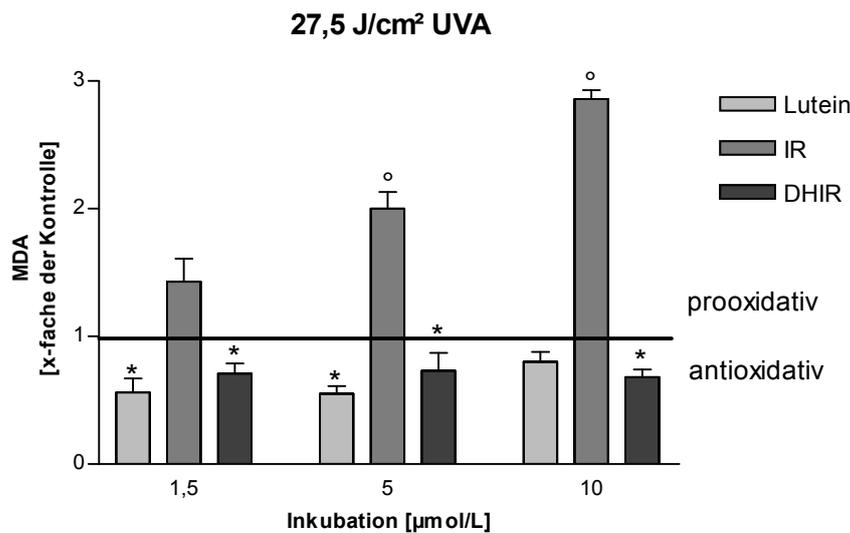


Abb. 5.62: MDA-Bildung in Zellen, inkubiert mit Lutein, IR und DHIR bestrahlt mit 27,5 J/cm² UVA; Die Gerade im Diagramm entspricht dem MDA-Wert in Zellen behandelt mit 0,1% THF unter Bestrahlung mit 27,5 J/cm²; *p ≤ 0,05: MDA-Werte liegen signifikant unter der Kontrolle; ^op ≤ 0,05: MDA-Werte liegen signifikant über der Kontrolle

Durch die Untersuchung der MDA-Bildung in Zellen wird deutlich, dass IR sich hier prooxidativ verhält. Lutein und DHIR hingegen haben in fast allen Konzentrationen eine schützende, also antioxidative Wirkung in Bezug auf die Bildung von MDA in Zellen nach der Bestrahlung mit UVA-Licht.

1.42 Effekte von Carotinoiden auf die Bildung von Matrix Metalloproteinase-1 nach UVB-Bestrahlung

Nachdem die Effekte der Carotinoide Lutein, IR und DHIR auf die ROS-Bildung getestet wurden, war es von Interesse, in komplexeren Systemen eine schützende Wirkung der Substanzen in Bezug auf die Bestrahlung mit UV-Licht zu untersuchen. Dazu wurde die UVB-induzierte Bildung von Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) untersucht. Die MMP-1 gehört zu der Familie der zinkabhängigen Metalloendopeptidasen. Von dermalen Fibroblasten werden vor allem die MMPs 1, 2, 3, 13 und 14 gebildet. Die MMPs werden in ihrer inaktiven Form von der Zelle in den extrazellulären Raum sezerniert. Die aktivierenden Substrate von MMP-1 sind unter anderem fibrilläre Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI (Hijova, 2005). Diese Kollagene werden von den MMP-1 lysiert und führen damit zu einem Abbau des Bindegewebes. Die Expression von MMP-1

kann durch UVA- sowie UVB-Strahlung induziert werden (Vielhaber et al., 2006, Di Girolamo & Coroneo, 2005, Brenneisen et al., 2002). Es kommt also zu einem photoinduzierten Anstieg der MMP-1 Konzentration in der extrazellulären Matrix und somit zu einem vermehrten Abbau von Kollagen. Dieser Effekt, der auch als „Photoaging“ bezeichnet wird, hat eine vorzeitige Hautalterung zur Folge (Gilchrest & Krutmann, 2006).

Die dermalen Fibroblasten sezernieren das produzierte MMP-1 *in vivo* in die extrazelluläre Matrix. In der Zellkultur (*in vitro*) entspricht dies dem Medium, in dem die Zellen kultiviert werden. Die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium der Zellen wurde mit einem „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) der Firma GE Healthcare bestimmt. Die in diesem Experiment verwendeten humanen dermalen Fibroblasten wurden aus Biopsien, wie in Kapitel 1.16 beschrieben, gewonnen. Die Hautfibroblasten des Donors reagierten nur mit einer sehr geringen MMP-1 Sekretion auf die Bestrahlung mit UVA-Licht. Es war keine bzw. nur eine geringe Erhöhung der MMP-1 Konzentration im Kulturmedium zu beobachten. Daher wurden die Experimente mit UVB-Licht durchgeführt. Um eine optimale Bestrahlungsdosis zu ermitteln, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen an UVB-Licht im Bereich von 0-200 mJ/cm² bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.63 dargestellt. Die für die Untersuchung optimale Bestrahlungsdosis liegt bei 20 mJ/cm² UVB, da bei höheren Dosen an UVB-Licht die hier eingesetzten Zellen abstarben. Die Postinkubationszeit wurde aufgrund früherer Experimente auf 24 h festgelegt. Die Werte wurden aufgrund des großen Probenumsatzes nicht auf die Proteinmenge, sondern auf die Zellviabilität, ermittelt mit Hilfe des SRB Assays, normiert.

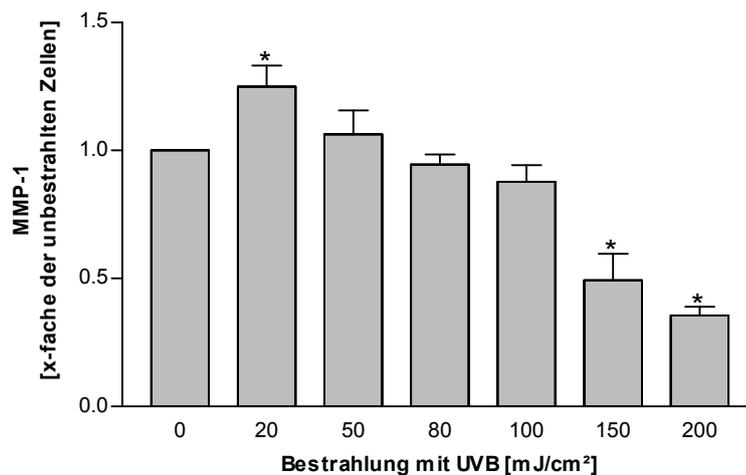


Abb. 5.63: Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium nach der Bestrahlung mit UVB. Die Werte sind auf die Zellviabilität normiert, * $p \leq 0,05$

In den folgenden Diagrammen in Abb. 5.64 bis Abb. 5.66 ist die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium von Zellen ohne Bestrahlung und nach der Bestrahlung mit 20 mJ/cm² UVB dargestellt. Auf der x-Achse ist die Carotinoidkonzentration angegeben, mit der die Zellen inkubiert wurden. Auf der y-Achse ist das x-fache des MMP-1 Wertes in Bezug auf die Kontrolle (unbestrahlte Zellen) angegeben.

Abb. 5.64 zeigt die MMP-1 Konzentration von unbestrahlten und mit 20 mJ/cm² UVB bestrahlten Zellen, welche mit Lutein inkubiert wurden, nach 24-stündiger Postinkubation im Kulturmedium. Bei unbehandelten Zellen ist die MMP-1 Sekretion nach der Bestrahlung der Zellen mit 20 mJ/cm² UVB im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle signifikant um das 1,3-fache erhöht. Werden die Zellen mit 1,5 und 5 µmol/L Lutein inkubiert, weisen sie ohne die Einwirkung von UVB-Licht eine signifikant vermehrte Sekretion um das 1,4- bzw. 1,2-fache in das Kulturmedium auf. Bei einer Konzentration von 10 µmol/L ist bei den unbestrahlten Zellen sowie bei den bestrahlten Zellen eine Veränderung in der Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium zu beobachten.

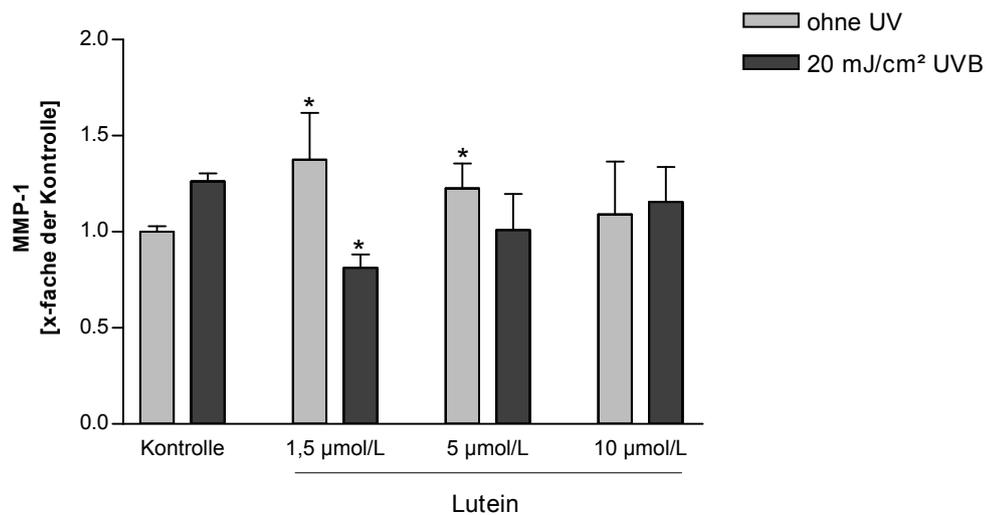


Abb. 5.64: Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium von Zellen, inkubiert mit Lutein, * $p \leq 0,05$

Das Diagramm in Abb. 5.65 zeigt die Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium von Zellen, die mit 1,5 / 5 und 10 µmol/L IR inkubiert wurden. Die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium von unbestrahlten Zellen ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant um das 1,45 (1,5 µmol/L IR), 1,55 (5 µmol/L IR) bzw. 1,57-fache (10 µmol/L IR) erhöht. Dabei scheint die IR-konzentration, mit der die Zellen inkubiert wurden, keinen Einfluss auf die MMP-1 Sekretion zu haben. Die MMP-1 Sekretion von bestrahlten Zellen hingegen weist keinen Unterschied zur Kontrolle auf.

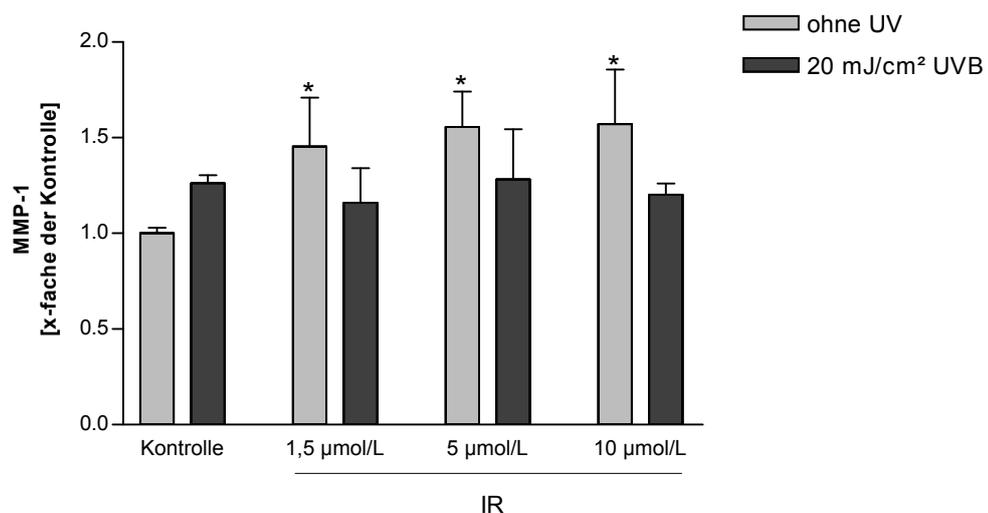


Abb. 5.65: Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium von Zellen, inkubiert mit IR, * $p \leq 0,05$

Werden die Zellen mit DHIR inkubiert, (Abb. 5.66) ist bei den unbestrahlten Zellen in den höheren Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$ ein signifikanter Anstieg der MMP-1 Konzentration im Kulturmedium um das 1,5- bzw. 1,7-fache zu verzeichnen. Werden die mit DHIR inkubierten Zellen mit 20 mJ/cm^2 UVB bestrahlt, ist der Effekt der erhöhten Sekretion von MMP-1 aus Zellen in das umgebende Medium nicht mehr zu beobachten.

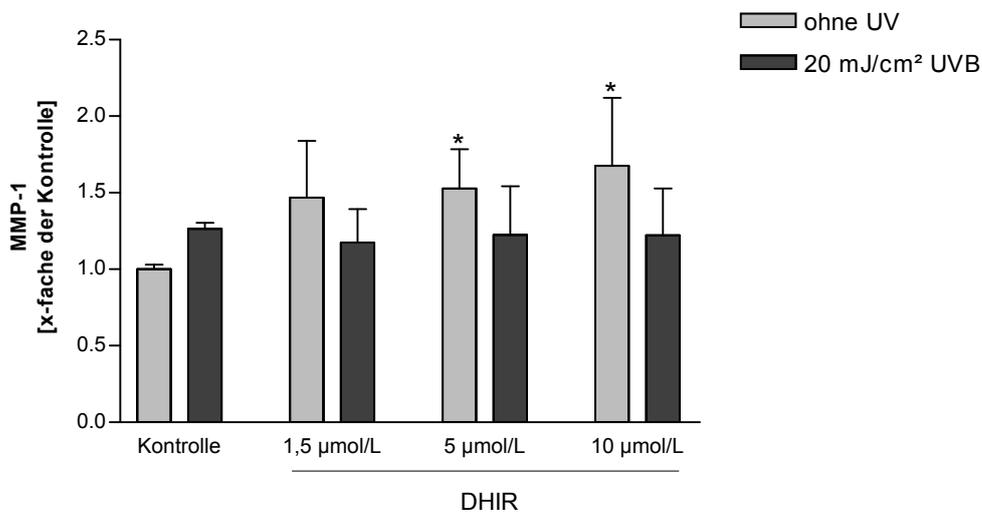


Abb. 5.66: Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium von Zellen, inkubiert mit DHIR, * $p \leq 0,05$

Als Positivkontrolle zu diesem Experiment wurden die Zellen mit N-Acetylcystein (NAC) inkubiert. Es ist bereits in vorhergegangenen Experimenten gezeigt worden, dass NAC die Sekretion von MMP-1 nach der Bestrahlung mit UVB vermindern kann. In Abb. 5.67 ist die MMP-1 Sekretion von Zellen, inkubiert mit NAC, gezeigt. Es ist zu erkennen, dass nach der Bestrahlung mit 20 mJ/cm^2 UVB eine signifikante Verminderung der MMP-1 Konzentration im Medium um das 0,7-fache durch die Zugabe von NAC erreicht werden kann.

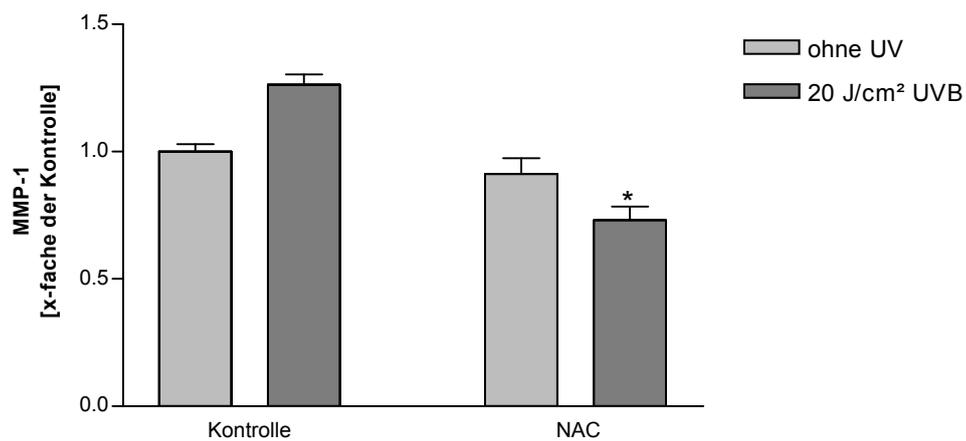


Abb. 5.67: Sekretion von MMP-1 in das Kulturmedium von Zellen inkubiert mit NAC, * $p \leq 0,05$

Die Ergebnisse aus diesem Experiment zeigen, dass die Carotinoide Lutein, IR und DHIR unabhängig von der Konzentration, mit der die Zellen inkubiert wurden, die Sekretion von MMP-1 fördern. Werden die mit Carotinoiden inkubierten Zellen mit 20 J/cm^2 UVB-Licht bestrahlt, wird dieser MMP-1 fördernde Effekt unterdrückt.

1.43 Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

S-Nitrosocystein ist ein instabiles Molekül, das intermediär aktiv sein kann und als NO-Speicher dient. Die Aufklärung des Zersetzungsweges dieser Substanz kann Erkenntnisse über die Funktion im menschlichen Organismus bringen. In Abb. 5.72 sind mögliche Zerfallswege mit den entsprechenden Reaktionsprodukten abgebildet.

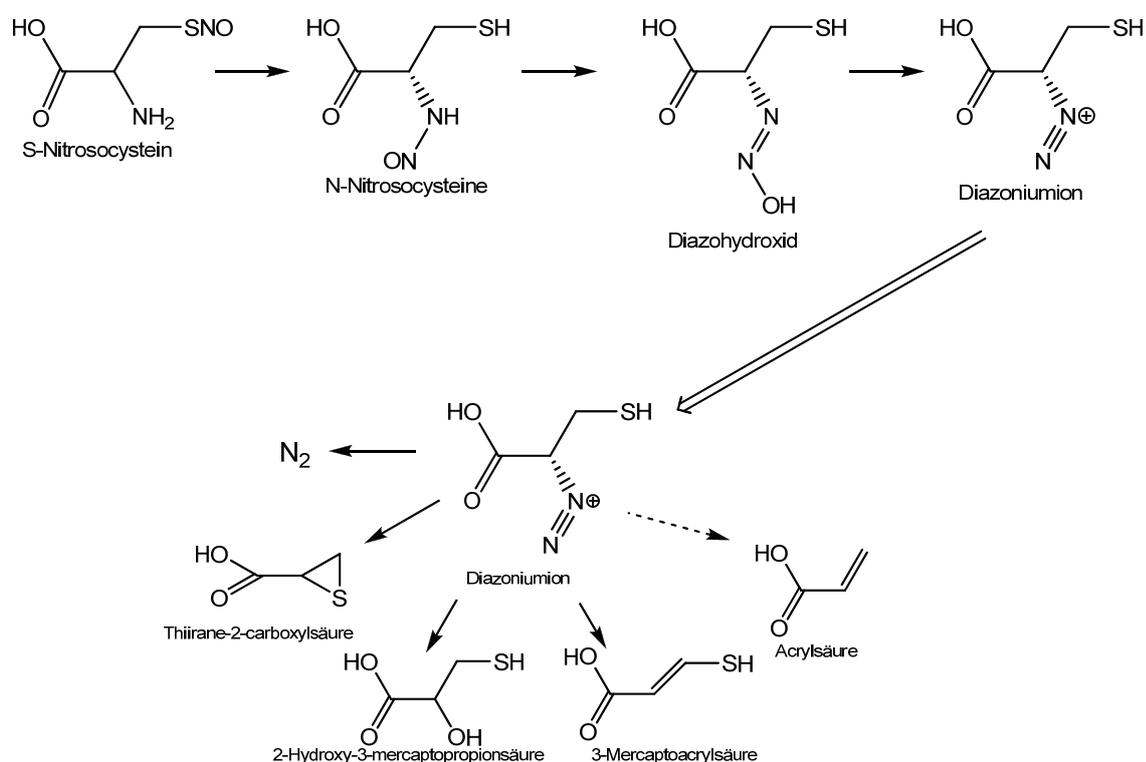


Abb. 5.68: Mögliche Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein

Die S-Nitrosocysteinlösung wurde über eine präperative HPLC-Säule aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen gesammelt. Nach der Aufkonzentration der einzelnen Fraktionen wurden ein ¹H- und ¹³C-NMR Spektrum aufgenommen. In Abb. 5.69 ist das ¹H-NMR-Spektrum der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Zerfallsprodukte Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure in DMSO-d₆ zu sehen.

Acrylsäure in DMSO-d₆ ¹H-NMR: δ=6.2 (dd, 1H, C3-H), 6.1 (dd, 2H, C2-H), 5.9 (dd, 1H, C3-H) ppm, ¹³C-NMR in DMSO-d₆ δ: C1, 171; C3, 131; C2, 129 ppm

Thiiran-2-carbonsäure in DMSO-d₆ ¹H-NMR: δ=3.38 (dd, 1H, C2-H), 2.67 (dd, 2H, C3-H₂) ppm; ¹³C-NMR in DMSO-d₆ δ=C1, 171; C2, 29; C3, 24 ppm

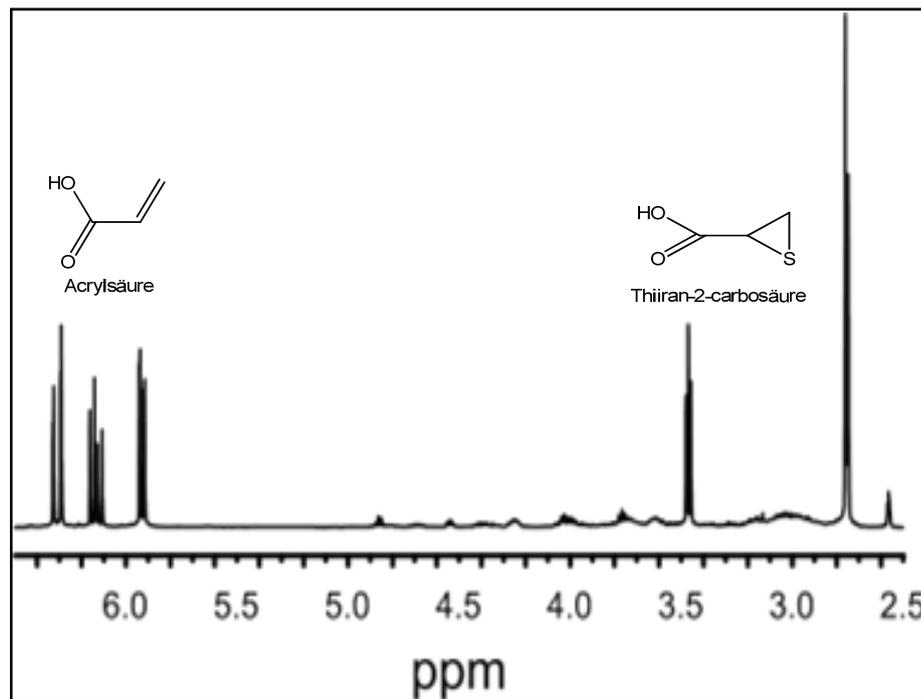


Abb. 5.69: ¹H-NMR-Spektrum von Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure in DMSO-d₆

Da S-Nitrosocystein instabil ist, musste die Substanz für jeden Versuch frisch hergestellt werden. Die Bestimmung der Konzentration von S-Nitrosocystein erfolgte photometrisch (1.26). Die Bildung der zuvor identifizierten Zerfallsprodukte Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure werden zeitlich mit Hilfe der HPLC mit einem UV/Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm verfolgt. In dem HPLC-Chromatogramm in Abb. 5.70 sind die Zerfallsprodukte Acrylsäure bei einer Retentionszeit von 6,6 min und Thiiran-2-carbonsäure bei einer Retentionszeit von 9,2 min zu sehen. Die Signale im vorderen Bereich von 2-6 min konnten noch nicht identifiziert werden. Die Zersetzung von S-Nitrosocystein wird bei einer Wellenlänge von 330 nm ebenfalls mit einem UV/Vis-Detektor aufgenommen. Hier liegt die Retentionszeit des S-Nitrosocystein Signals bei 3,5 min.

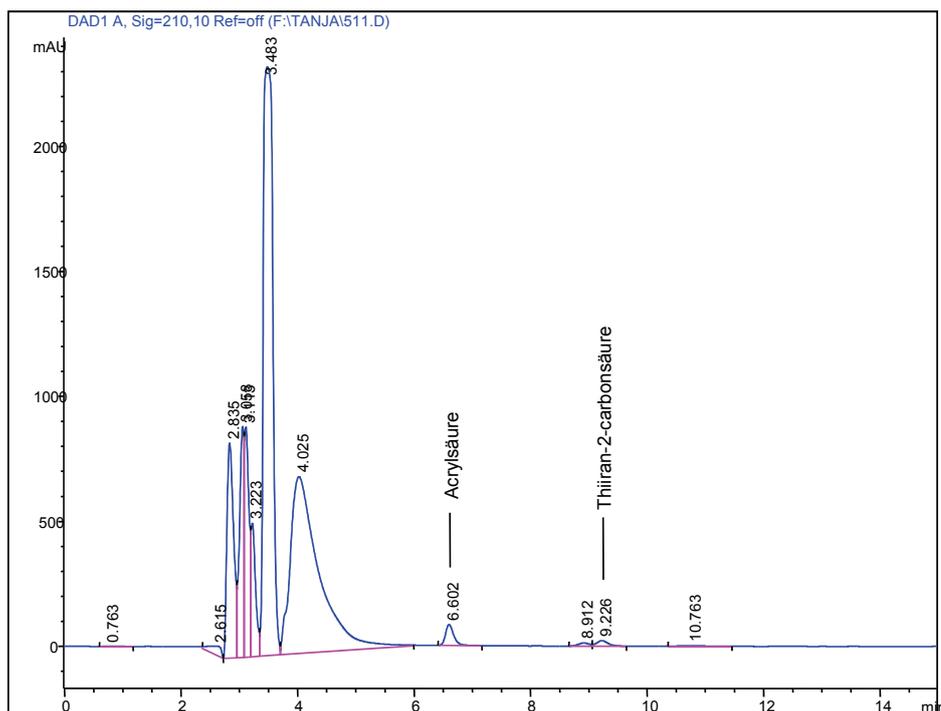


Abb. 5.70: HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches. Die Zersetzungsprodukte Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure haben eine Retentionszeit von 6,6 min und 9,2 min

1.44 Wirkung von UV-Strahlung auf die Zersetzung von S-Nitrosocystein

S-Nitrosothiole sind in relativ hohen Konzentrationen in der menschlichen Haut zu finden (Suschek et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit war es von Interesse zu untersuchen, wie sich die Bestrahlung mit UV-Licht auf den Zerfall von S-Nitrosocystein und die Bildung der Zerfallsprodukte auswirkt.

Dazu wurde eine frische Lösung von S-Nitrosocystein hergestellt und diese mit UVB- oder UVA-Licht oder einer Kombination beider UV-Bereiche bestrahlt. Bestrahlt wurden die Reaktionsansätze in einer runden Quarzglasküvette, wie sie in Abb. 5.71 dargestellt ist. Nach der Bestrahlung waren in der Küvette Gasblasen zu erkennen. Dabei könnte es sich um Stickstoff handeln, der bei der Zerfallsreaktion von S-Nitrosocystein unter Bildung von Diazoniumionen frei wird (vgl. Abb. 5.68).

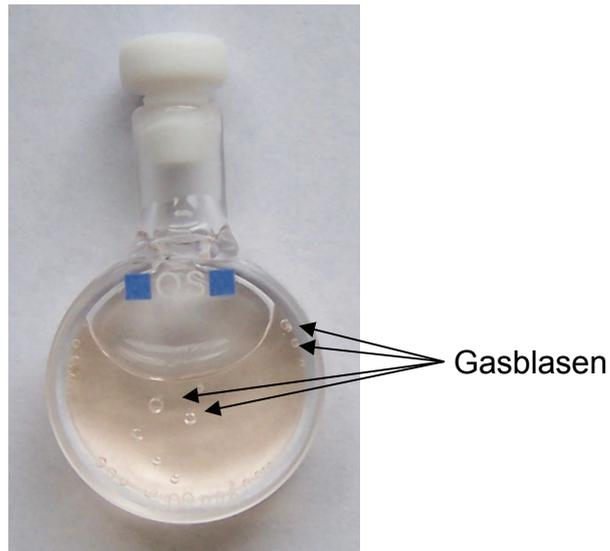


Abb. 5.71: Quarzglasküvette mit S-Nitrosocystein nach der Bestrahlung mit 2 J/cm^2 UVA

Im Folgenden sind Diagramme gezeigt, die den zeitlichen Verlauf der Zersetzung von S-Nitrosocystein und die Bildung von Acrylsäure sowie Thiiran-2-carbonsäure nach Bestrahlung mit UV-Licht zeigen. In Abb. 5.72 ist die Zersetzung von S-Nitrosocystein unter Bestrahlung mit UVB-, UVA- und UVB+UVA-Strahlung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bestrahlung den Zerfall von S-Nitrosocystein beschleunigt. Der Zerfall von S-Nitrosocystein folgt einer Reaktion erster Ordnung.

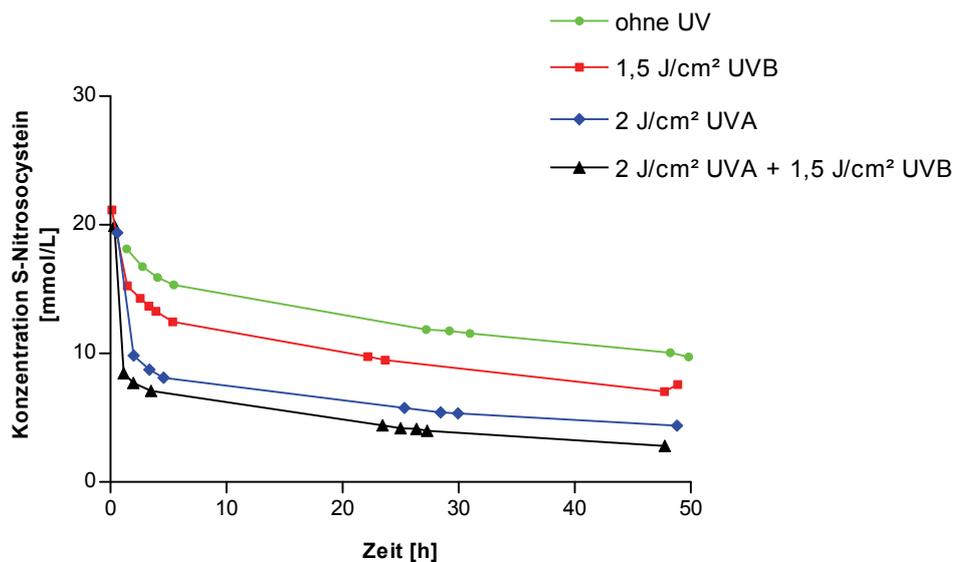


Abb. 5.72: Zersetzung von S-Nitrosocystein unter der Bestrahlung mit UV-Licht

Unter der Bestrahlung mit $1,5 \text{ J/cm}^2$ UVB nimmt die Halbwertszeit von CysNO von 46,4 h um 54% auf 21,1 h ab. Wird CysNO mit 2 J/cm^2 UVA bestrahlt, verkürzt sich die Halbwertszeit um 94% auf 2,7 h. Eine Bestrahlung mit einer Kombination aus UVA und UVB-Licht hat dabei den größten Effekt auf die Halbwertszeit von S-Nitrosocystein. Hier liegt die Halbwertszeit nur noch bei 1,9 h (96% geringer).

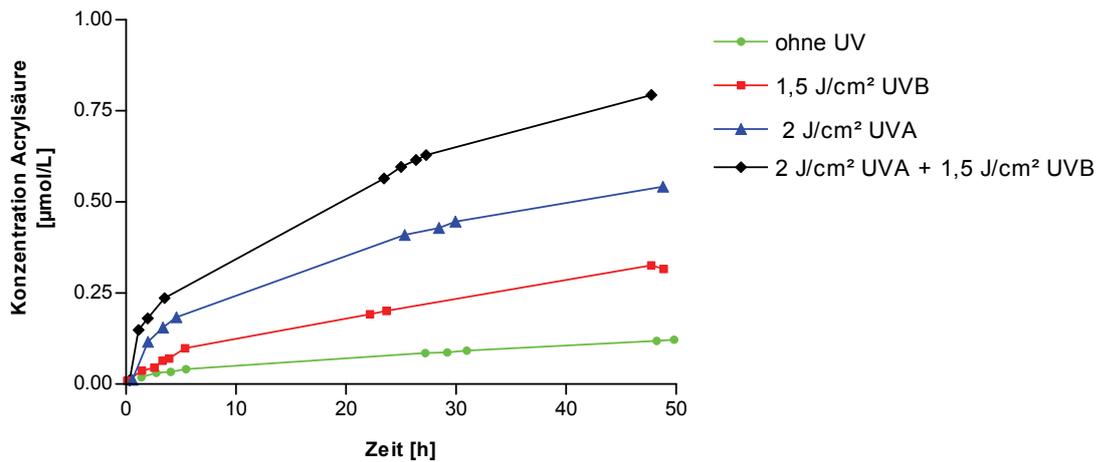


Abb. 5.73: Zeitabhängige Bildung von Acrylsäure unter Bestrahlung mit UV-Licht

In dem Diagramm in Abb. 5.73 ist die Bildung von Acrylsäure unter der Bestrahlung von CysNO mit UV-Strahlung gezeigt. Hier ist gerade in den ersten 5 h nach der Bestrahlung die Bildung von Acrylsäure gegenüber dem unbestrahlten Reaktionsansatz erhöht. Dies korreliert mit den Beobachtungen aus dem Zerfall von S-Nitrosocystein. Dabei steigt die Bildung von Acrylsäure mit der Bestrahlung von $1,5 \text{ J/cm}^2$ UVB über 2 J/cm^2 UVA zu einer Kombination aus UVA + UVB an.

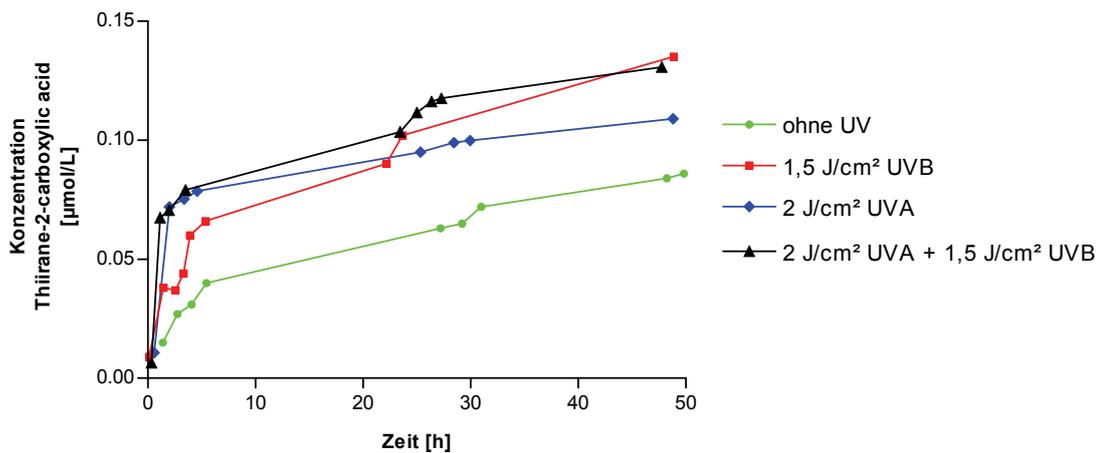


Abb. 5.74: Zeitabhängige Bildung von Thiirane-2-carboxylic acid unter Bestrahlung mit UV-Licht

In dem Diagramm in Abb. 5.73 ist die Bildung von Thiiran-2-carbonsäure unter Bestrahlung mit UV-Licht dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass in den ersten 5 h nach der Bestrahlung die Bildung von Thiiran-2-carbonsäure deutlich erhöht ist im Gegensatz zum unbestrahlten S-Nitrosocystein. Dabei scheint die Bildung dieses Zerfallsproduktes nahezu unabhängig von der Bestrahlungsdosis zu sein, da der Anstieg in allen bestrahlten Reaktionsansätze im Vergleich zu den unbestrahlten Reaktionslösungen nahezu gleich verläuft.

In Tabelle 5.4 ist die prozentuale Bildung von Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure sowie die Halbwertszeit von S-Nitrosocystein unter verschiedenen Bestrahlungen mit UV-Licht angegeben. Der Zerfall von S-Nitrosocystein folgt einer Reaktion erster Ordnung. Die Bildung von Acrylsäure steigt von der unbestrahlten Probe mit 0,7%, über die Bestrahlung mit UVB (2,2%) zu UVA (2,8%) und der Kombination aus UVA + UVB (4,6%), deutlich an. Die Bildung von Thiiran-2-carbonsäure nimmt nach der Bestrahlung mit UV-Licht leicht zu. Dabei ist kein Unterschied in der Zunahme von Thiiran-2-carbonsäure unter Bestrahlung mit Licht im UVB- und UVA-Bereich oder einer Kombination aus UVB- und UVA-Licht zu beobachten. Die Halbwertszeit von S-Nitrosocystein halbiert sich etwa unter der Bestrahlung mit 1,5 J/cm² UVB-Licht. Bei einer Bestrahlung mit 2 J/cm² UVA-Licht sinkt die Halbwertszeit deutlich auf 2,7 h. Bei

einer Bestrahlung mit UVA- und UVB-Licht sinkt die Halbwertszeit ebenfalls deutlich auf 1,9 h.

Tabelle 5.4: Halbwertszeiten von S-Nitrosocystein und Ausbeuten der Zerfallsprodukte Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure

Bestrahlung	Bildung von Acrylsäure	Bildung von Thiiran-2-carbonsäure	Halbwertszeit [h] S-Nitrosocystein
Ohne UV	0,7%	0,5%	46,4
UVB (1,5 J/cm ²)	2,2%	0,7%	21,1
UVA (2 J/cm ²)	2,8%	0,6%	2,7
UVB (1,5 J/cm ²) + UVA (2 J/cm ²)	4,6%	0,7%	1,9

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die photoprotektiven Eigenschaften der Carotinoide DHIR und IR im Vergleich zum strukturähnlichen Lutein untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten zunächst in Modellsystemen und weiter in dermalen Fibroblasten um einen Vergleich zwischen Modell und lebenden Zellen zu ermöglichen.

1.45 Stabilität der Carotinoide

Carotinoide absorbieren aufgrund ihrer polyenen Struktur im sichtbaren Bereich des Lichts. Aus Experimenten in Blättern und isolierten Organellen der pflanzlichen Photosynthese wird deutlich, dass sich die Zusammensetzung der Carotinoide unter Einwirkung von UV-Licht stark ändert (Cvetkovic & Markovic, 2008). Die Stabilität der drei Carotinoide Lutein, IR und DHIR wurde sowohl in einer Mischung aus MeOH/ACN/Wasser/2-Propanol (Lösemittel) als auch in dermalen Fibroblasten unter UV-Bestrahlung untersucht.

Die Konzentrationen von Lutein, IR und DHIR im organischen Lösemittel nehmen unter Bestrahlung mit UVB-Licht (0,5 und 1,5 J/cm²) um 20% bzw. 35% ab. Hier ist kein statistisch signifikanter Unterschied in der Stabilität der Carotinoide zu beobachten. Werden die Carotinoide im Lösemittel mit 10 J/cm² UVA-Licht bestrahlt, ist eine Abnahme der Carotinoide um 30% zu verzeichnen. Auch hier ist kein statistisch signifikanter Unterschied in der Stabilität der Carotinoide zu erkennen. Unter Bestrahlung mit 27,5 J/cm² UVA erweist sich IR mit einer Abnahme um 37% stabiler als Lutein (Abnahme 70%) und DHIR (Abnahme 70%) (vgl. 1.30).

Werden die Carotinoide in dermalen Fibroblasten mit Licht im UVB-Bereich bestrahlt ist, wie im Lösemittel kein signifikanter Unterschied in der Stabilität zwischen Lutein, IR und DHIR zu beobachten. Unter Bestrahlung mit Licht im UVA-Bereich kann ein Unterschied in der Stabilität der Substanzen beobachtet werden. Unter Bestrahlung der Zellen mit 27,5 J/cm² UVA nimmt die

Luteinkonzentration um 83% ab. Die Abnahme von IR und DHIR liegt nur bei 53% bzw. 52% (bei einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ DHIR im Kulturmedium) (vgl. 1.38).

Dass sich die Stabilitäten von Lutein, IR und DHIR im Modellsystem und in Zellen unterscheiden, ist auf die Einfachheit des Modellsystems und auf die Komplexität der Zelle zurückzuführen. Im Modellsystem erweist sich unter UVA-Bestrahlung das Carotinoid IR stabiler als die Xanthophylle Lutein und IR. Dieser Unterschied in der Stabilität von Carotinoiden und Xanthophyllen konnte ebenfalls von Cvetkovic und Markovic in organischer Lösung (Hexan) zwischen dem Carotinoid Lycopin und dem Xanthophyll Neoxanthin beobachtet werden (Cvetkovic & Markovic, 2008). Allerdings ist dieser Zusammenhang weder allgemein gültig, noch durch den strukturellen Unterschied von Carotinoid und Xanthophyll bedingt. So fanden die Autoren z. B. keinen Unterschied in der Stabilität von β -Carotin und Lutein. In der Zelle können unter UV-Bestrahlung nicht nur degenerative Effekte einen Einfluss auf die Stabilität von Carotinen haben. Hier gibt es verschiedene weitere Antioxidantien, wie z. B. α -Tocopherol (Vitamin E) oder Ascorbinsäure (Vitamin C). Beide Substanzen können z. B. gebildete Carotinoid-Radikal-Kationen regenerieren oder prooxidative Prozesse unterbinden (Young & Lowe, 2001; Mortensen & Skibsted, 1997). Böhm et al. konnten zeigen, dass es in Zellkultur unter UV-Bestrahlung zu synergistischen antioxidativen Effekten von β -Carotinoiden mit Vitamin E und C kommt (Böhm et al, 1998).

1.46 Zytotoxizität der Carotinoide

Für die Untersuchungen im Zellsystem ist es notwendig zu ermitteln, ob die Carotinoide Lutein, IR und DHIR ohne Einfluss von UV-Strahlung eine toxische Wirkung auf die Zellen haben und ob sich unter Bestrahlung mit UV eine Zytotoxizität durch mögliche Zerfallsprodukte entwickelt. Dazu werden dermale Fibroblasten mit drei verschiedenen Konzentrationen an Lutein, IR und DHIR (1,5/5/10 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert und mit UVA- und UVB-Licht bestrahlt. Mit Hilfe des Sulforhodamin B Assays kann die Zellviabilität und somit auch die Zytotoxizität

von Substanzen mit denen die Zellen inkubiert wurden bestimmt werden (Skehan et al., 1990). Die Sulfoniumgruppe des rosa Farbstoffes Sulforhodamin B lagert sich an Aminosäuren zellulärer Proteine. Da die Proteinmenge mit der Zellzahl korreliert, kann somit bestimmt werden wie viele Zellen im Experiment, z. B. die Bestrahlung mit UV-Licht, überlebt haben. Der Farbstoff Sulforhodamin B lässt sich photometrisch vermessen.

Betrachtet man die unbehandelten Zellen unter Bestrahlung mit UV-Licht wird deutlich, dass die Bestrahlung mit UVA im Bereich von 5 und 10 J/cm² keine toxische Wirkung zeigt. Ab einer Dosis von 20 und 27,5 J/cm² UVA nimmt die Zellviabilität um 25% und 50% ab. Obwohl diese Dosen im Experiment toxisch für die Zellen sind, handelt es sich nicht um unphysiologische Werte. Messungen in der Region des 35. nördlichen Breitengrades an einem wolkenlosen Sommertag zeigen, dass die UVA-Dosis zur Mittagszeit binnen 70 min 25 J/cm² beträgt (Frederick & Lubin, 1988).

Werden die Fibroblasten mit UVB-Licht bestrahlt, nimmt die Zellviabilität bereits ab einer Dosis von 0,5 J/cm² um 40% und bei 1,5 J/cm² UVB um 45% ab. Die Intensität der UVB-Strahlung liegt im Experiment immer bei 0,00167 J/cm² sec, nur die Bestrahlungszeit variierte. Im Vergleich dazu liegt zur Mittagszeit am Äquator die Intensität bei 0,00025 J/cm² sec (Ball, 1995). Die hier eingesetzten UVB-Dosen sind somit unphysiologisch hoch. Diese hohen, nicht physiologischen Bestrahlungsdosen sind allerdings in den Untersuchungen notwendig, da die Effekte ansonsten nicht messbar sind.

Alle drei Carotinoide sind unter den gegebenen Bedingungen ohne Bestrahlung nicht zytotoxisch. Des Weiteren treten auch unter Bestrahlung mit 0,5 und 1,5 J/cm² UVB keine toxischen Wirkungen auf. Werden die Zellen mit UVA-Licht bestrahlt sind bei einer Konzentration von 10 µmol/L Lutein und ab einer Dosis von 20 J/cm² UVA zytotoxische Effekte zu beobachten. Diese Zytotoxizität ist ebenfalls bei DHIR ab einer Konzentration von 5 µmol/L und einer Bestrahlungsdosis ab 20 J/cm² UVA zu beobachten. Hier ist die Zellviabilität 20% niedriger im Vergleich zur Kontrolle. Alle niedrigeren Konzentrationen

erweisen sich unter Bestrahlung als nicht zytotoxisch. IR weist ebenfalls in keiner Konzentration und Bestrahlungsdosis toxische Effekte auf.

Die Zytotoxizität von Lutein und DHIR kann auf prooxidative Wirkungen von Carotinoiden zurückgeführt werden. Diese Effekte wurden bereits von Mayne et al. sowie Wang und Russell beschrieben (Mayne et al., 1996; Wang & Russell, 1999). Die anti- oder prooxidative Wirkung von Carotinoiden ist dabei nicht nur von der chemischen Struktur und der Konzentration der Carotinoide abhängig, sondern auch vom Sauerstoffpartialdruck, dem Redoxstatus der Zelle und möglichen Interaktionen mit anderen redoxreaktiven Verbindungen (Palozza et al., 2004). Prooxidative Effekte werden im Zusammenhang mit der MDA-Bildung in Liposomen und dermalen Fibroblasten weiter diskutiert (vgl. 1.48).

Der bereits erwähnte Einfluss des Redoxstatus einer Zelle auf die anti- oder prooxidative Wirkung von Carotinoiden kommt besonders bei Rauchern zum tragen. Raucher weisen einen geringeren Gehalt an Vitamin C auf als Nichtraucher. Die stark oxidierend wirkenden ROS aus Zigarettenrauch können wiederum Carotinoide zu Radikalen oxidieren. Diese Carotinoidradikale können mit biologischen Substraten weiterreagieren und werden, aufgrund des Vitamin C mangels, nicht regeneriert (El-Agamey et al., 2004).

1.47 Aufnahme der Carotinoide in dermale Fibroblasten

Um die Wirkung der drei untersuchten Carotinoide auf dermale Fibroblasten beurteilen zu können, wird die Aufnahme von Lutein, IR und DHIR in die Zelle untersucht. Dabei stellt sich heraus, dass nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Carotinoid in einer Konzentration von 10 µmol/L maximal 44% (Lutein, IR) bzw. 50% (DHIR) aufgenommen wird (normiert auf die Proteinmenge).

In der Zellkultur werden die in THF gelösten Carotinoide in das wässrige Kulturmedium gespritzt, so dass die Verbindungen sich dispers verteilen. In dieser Carotinoiddispersion beträgt der Anteil an THF 0,1% und ist für die Zellen nicht toxisch. Das dispergierte Carotinoid wird dann entweder durch THF

(„drug-delivery vehicle“) (Bertram et al., 1991) oder durch Proteine wie BSA die im Kulturmedium vorhanden sind, zur Zellmembran transportiert (Gouranton et al., 2008). Die Carotinoide können sich dann in die lipophilen Zellmembranen einlagern. Diese Aufnahme der Carotinoide ist auch visuell durch eine orange bis gelbliche Färbung der Zellen zu beobachten. Die Aufnahme der Carotinoide ins Zellinnere erfolgt anschließend durch (nicht rezeptorvermittelte) Endozytose. Diese Annahme wird durch die elektronenmikroskopischen Bilder dermalen Fibroblasten, welche mit DHIR behandelt wurden, belegt. Hier sind an der Zellmembran endozytotische Vesikel zu erkennen (vgl. 1.37). Über die intrazellulären Transportwege von Carotinoiden ist bisher wenig bekannt. Allerdings decken sich die Beobachtungen mit dem von Gugger und Erdman postulierten intrazellulären Transport über Vesikel oder membrangebundene Proteine (Gugger & Erdmann, 1996).

In vivo werden die Carotinoide im Dünndarm über Gallensäuremizellen in die Enterozyten aufgenommen. Dort werden sie in Chylomikronen verpackt und gelangen über die Lymphbahnen ins Blut und schließlich zur Leber. Die Leber sezerniert u.a. die Lipidtransportvesikel VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Diese Lipoproteine werden im Plasma in LDL (Low Density Lipoprotein) umgebaut und können dann durch rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen aufgenommen werden. Über die VLDL sowie auch die anderen Lipoproteine LDL und HDL (High Density Lipoprotein) werden Carotinoide transportiert. Tyssandier et al. beschreiben einen Austausch von Carotinoiden zwischen den einzelnen Lipoproteinen (Tyssandier et al., 2002). Dies könnte auch bedeuten, dass Zellen, die keine Lipoproteinrezeptoren besitzen, in der Lage sind Carotinoide aufzunehmen. Aufgrund eines Konzentrationsgefälles könnte es zu einem Austausch von Carotinoiden zwischen einem Lipoprotein im Blut und der ebenfalls lipophilen Membran einer Zelle kommen. Wie in den dermalen Fibroblasten beobachtet, könnte dann das Carotinoid durch eine nicht rezeptorvermittelte Endozytose ins Zellinnere gelangen. Somit dürfte der in Zellkultur beobachtete Prozess auch *in vivo* von Bedeutung sein.

1.48 Lipidperoxidation in Liposomen und dermalen Fibroblasten

Die Wirkung der drei Carotinoide Lutein, IR und DHIR auf die UV-induzierte Lipidperoxidation wird in Liposomen und dermalen Fibroblasten untersucht. Liposomen aus Phosphatidylcholin und die Membranen dermalen Fibroblasten sind aufgrund ihres hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren sensitiv gegenüber UV- und ROS-induzierter Lipidperoxidation (vgl. 1.3). Ein kanzerogenes Abbauprodukt dieser Lipidperoxidation ist MDA (Valko et al., 2007). MDA kann mit Thiobarbitursäure zu einem Farbkomplex derivatisiert werden. Der entstehende Farbstoff wird mit Hilfe der HPLC quantitativ bestimmt und ist ein Maß für die Bildung von MDA bzw. für die oxidative Schädigung der Liposomen und Zellmembranen (Placer et al., 1966).

Die Liposomen werden in einem Konzentrationsbereich von 0,005-50 nmol/mg PC mit den drei Carotinoiden Lutein, IR und DHIR beladen. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit Licht im UVB- und UVA-Bereich.

In Liposomen zeigt sich eine deutliche antioxidative Wirkung von DHIR gegenüber IR und Lutein. DHIR kann unter UVB- und UVA-Bestrahlung die MDA-Bildung verhindern. In geringen Konzentrationen weist Lutein im Vergleich zu IR einen leicht antioxidativen Effekt auf.

Dermale Fibroblasten wurden ebenfalls mit Lutein, IR und DHIR inkubiert (Konzentrationen im Kulturmedium 1,5/5/10 $\mu\text{mol/L}$) und mit Licht im UVA-Bereich bestrahlt. Die Bestrahlung mit Licht im UVB-Bereich (0,5 und 1,5 J/cm^2) führte in unbehandelten Zellen zu keinem statistisch signifikanten Anstieg der MDA-Konzentration. Eine weitere Erhöhung der Bestrahlungsdosis im UVB-Bereich ist nicht sinnvoll, da diese Dosen stark toxisch auf die Zellen wirken und keine aussagekräftigen Ergebnisse gebracht hätten.

Lutein und DHIR können dermale Fibroblasten vor der UVA-induzierten Lipidperoxidation schützen. Beide Xanthophylle verhindern statistisch signifikant die Bildung von MDA. Das Carotinoid IR hingegen wirkt stark prooxidativ. So

steigt bereits in IR behandelten, unbestrahlten Zellen die MDA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um das 4-fache an.

Die Ergebnisse aus dem Modellsystem und dermalen Fibroblasten stimmen in Bezug auf die antioxidativen Eigenschaften von Lutein und DHIR überein. Beide Substanzen können Liposomen und dermale Fibroblasten vor der UV-induzierten Lipidperoxidation schützen. DHIR ist Lutein in seiner antioxidativen Wirkung überlegen. Dies kann auf die außergewöhnliche Struktur dieses Carotinoids zurückgeführt werden. Die phenolischen Endgruppen von DHIR absorbieren Licht im UV-Bereich zwischen 250-300 nm. Zusätzlich kann DHIR durch die Hydroxyl-Gruppe des phenolischen Rings unter Bildung eines Chinons zwei Radikale abfangen, ohne dass das konjugierte π -Bindungssystem zerstört wird. Dadurch ist die chinoide Form des DHIRs weiterhin in der Lage als Singulett-Sauerstoff oder Triplett-Löscher zu agieren. IR und Lutein sind zwar ebenfalls in der Lage durch das konjugierte Doppelbindungssystem Singulett-Sauerstoff oder Triplett- Zustände zu löschen, werden aber durch die Reaktion mit Radikalen deaktiviert.

Die Ergebnisse für die MDA-Bildung in Liposomen und Zellen, behandelt mit IR, weichen voneinander ab. So hat IR im Modellsystem keinen Einfluss auf die Lipidperoxidation. In dermalen Fibroblasten hingegen wirkt IR stark prooxidativ. Diese prooxidative Wirkung von IR ist wahrscheinlich auf den Einfluss des Carotinoids auf die Membraneigenschaften zurückzuführen. IR lagert sich aufgrund seiner unpolaren Struktur wie β -Carotin mit hoher Wahrscheinlichkeit horizontal in die Zellmembran ein und hat dadurch einen starken Einfluss auf die Membraneigenschaften (vgl. 1.8). Es ist bereits bekannt, dass β -Carotin die Mobilität der Lipide im hydrophilen Teil der Membran moduliert, wodurch das Eindringen von kleinen Molekülen und Ionen in die polaren Zonen der Zellmembran erleichtert wird (Britton et al., 2008). Wenn IR ein ähnliches Verhalten in der Zellmembran von dermalen Fibroblasten aufweist, ist durch eine verminderte Barrierefunktion der Membran gegen extrazellulär gebildete ROS der stark prooxidative Effekt zu erklären. Zusätzlich kann IR nur mit ROS reagieren die sich im lipophilen Teil der Membran befinden, da IR aufgrund seiner unpolaren Struktur sich nur in diesem Teil der Zellmembran orientiert.

Lutein und DHIR können auch mit ROS interagieren die sich im hydrophoben Teil der Zelle befinden, da die Carotinoide die Membran aufgrund ihrer polaren Endgruppen durchspannen (Brittton, 1995). Es ist also nicht nur das antioxidative Potential der Substanzen zu berücksichtigen, sondern auch wie sich die Carotinoide in der Membran orientieren und welchen Einfluss sie auf die Fluidität, Stabilität und Barriereigenschaften der Zellmembran haben.

Prooxidative Wirkungen, wie IR sie aufweist, wurden bereits von Mayne et al. sowie Wang und Russell beschrieben (Mayne et al., 1996; Wang & Russell, 1999). Die prooxidative Wirkung ist dabei nicht nur von der chemischen Struktur und der Konzentration der Carotinoide abhängig, sondern auch vom Sauerstoffpartialdruck, dem Redoxstatus der Zelle und möglichen Interaktionen mit anderen redoxreaktiven Verbindungen (Palozza et al., 2004). So können Carotinoide u.a. mit Lipidperoxyl-Radikalen, welche im Verlauf der Lipidperoxidation in Liposomen und Zellmembranen gebildet werden, reagieren. Bei hohen Konzentrationen an Lipidperoxyl-Radikalen können in der Reaktion mit Carotinoiden Intermediate entstehen, welche prooxidative Reaktionswege initiieren (Burton & Ingold, 1984).

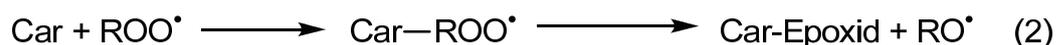


Abb. 6.1: Prooxidative Reaktionswege von Carotinoiden

Durch Anlagerung eines Peroxyl-Radikals an ein Carotinoid entsteht ein resonanzstabilisiertes Radikal-Addukt. Dieses kann reversibel mit Sauerstoff zu einem weiteren Peroxid-Radikal reagieren (Abb. 6.1 (1)) Dieses Peroxyl-Radikal kann dann ein weiteres Carotinoid oxidieren. In einem zweiten Reaktionsweg kann das Radikal-Addukt zu einem Carotinoid-Epoxid und einem Alkoxy-Radikal zerfallen (Abb. 6.1 (2)). Das entstandene Alkoxy-Radikal ist reaktiver als das Peroxyl-Radikal. Beide Reaktionswege beschreiben somit einen prooxidativen Verlauf (Kennedy & Liebler, 1991). Diese prooxidativen Reaktionswege können auch zu einer Zytotoxizität von Carotinoiden unter vermehrter UV-Einwirkung führen (vgl. 1.46). Durch UV-Licht steigt die

Konzentration an Lipidperoxiden wodurch ein prooxidativer Reaktionsweg der Carotinoide begünstigt wird.

1.49 ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten

Die UVA-induzierte Bildung von ROS wurde in dermalen Fibroblasten untersucht. Die ROS-Bildung in Zellen lässt sich mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (H₂DCF-DA) verfolgen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist membrangängig und wird nach Abspaltung der Acetatgruppen im Cytosol durch intrazelluläre Esterasen membranimpermeabel. Die im Cytosol gebildeten ROS oxidieren H₂DCF zu DCF (Dichlorofluorescein). Dieser grün-gelblich fluoreszierende Farbstoff lässt sich mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektieren. Es können nur stabilere ROS wie z.B. Peroxide gemessen werden, da der Farbstoff aufgrund seiner Photoinstabilität erst nach der Bestrahlung zugesetzt werden kann (Keller et al., 2004).

Humane dermale Fibroblasten werden mit 0, 5, 10 und 20 J/cm² UVA bestrahlt. Die Untersuchung erfolgte unmittelbar nach der Bestrahlung. Dabei zeigt Lutein in keiner der verwendeten Konzentrationen (1,5/5/10 µmol/L) einen signifikanten Einfluss auf die Bildung von ROS. In Zellen, welche mit IR und DHIR behandelt werden, zeigt sich eine statistisch signifikant geringere ROS-Bildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dabei ist kein statistisch signifikanter Unterschied in der ROS-Bildung zwischen IR und DHIR behandelten Zellen zu beobachten. Obwohl DHIR aufgrund seiner polyenen und phenolischen Struktur als bifunktionaler Radikalfänger IR in seinen antioxidativen Eigenschaften überlegen sein sollte, sind in diesem Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Carotinoiden in Bezug auf die Bildung von ROS in dermalen Fibroblasten zu erkennen (Martin et al, 2009). Da in diesem Testverfahren ausschließlich stabilere ROS gemessen werden können, wird die Bildung von kurzlebigen ROS wie Singulett-Sauerstoff oder Hydroxyl-Radikalen nicht erfasst. Durch sensitivere Untersuchungsmethoden könnten mögliche Unterschiede im antioxidativen Wirkpotential von IR und DHIR ermittelt werden.

1.50 Wirkung von UV-Strahlung auf die Freisetzung von komplexierten Metall-Ionen in dermalen Fibroblasten und aus Peptiden

In Kooperation mit Frau Dr. Lutter wurde die UV-induzierte Zink(II)-Freisetzung in dermalen Fibroblasten untersucht (Lutter et al., 2009). Kommt es durch UV-Einstrahlung zur Bildung einer Disulfidbrücke im Zinkfinger-Motiv, kann das Zink(II) nicht mehr komplexiert werden und das Metall-Ion wird aus dem Zinkfinger-Protein freigesetzt. Dies kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin, welcher nach spezifischer Bindung an freie Zink(II)-Ionen stark fluoresziert, untersucht werden (Zalewski et al., 1993). Die Bildung der fluoreszierenden Zinquin-Zink(II)-Komplexe wurde visuell mit dem Axiovert 100TV Fluoreszenzmikroskop untersucht. Durch Zugabe der Carotinoide Lutein und DHIR soll eine mögliche Verminderung der UV-induzierten Zink(II)-Freisetzung untersucht werden. Dazu werden die Zellen mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ Lutein oder DHIR inkubiert und mit einer Dosis von 0, 5, 10 und 20 J/cm^2 UVA bestrahlt. Die semiquantitative Auswertung der Bilder zeigt, dass die Zink(II)-Freisetzung in dermalen Fibroblasten mit dem Anstieg der Bestrahlungsdosis korreliert. Das freie Zink(II) steigt unter Bestrahlung mit 20 J/cm^2 um das 4-fache. Lutein zeigt keinen Einfluss auf die Zink(II)-Freisetzung in dermalen Fibroblasten. Es sind keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. DHIR hat einen protektiven Effekt auf die Zink(II)-Freisetzung. Während sich das freie Zink in unbehandelten Zellen unter Bestrahlung mit 20 J/cm^2 vervierfacht, liegt sie in Zellen welche mit DHIR behandelt wurden nur doppelt so hoch.

Die Metall-Ionen-Freisetzung wird zusätzlich in einem vereinfachten Modellsystem untersucht. Dazu wird ein Polypeptid, welches ein Zink-Finger-Motiv aufweist, synthetisiert. Dieses Polypeptid komplexiert Metall-Ionen durch zwei Cystein- und zwei Histidinreste. Die Komplexierung des Metall-Ions wird photometrisch untersucht. Dazu muss das photometrisch nicht detektierbare Zink durch das photometrisch nachweisbare Cobalt substituiert werden (vgl. 1.34). Die Absorption des komplexierten Co(II) liegt in einem Bereich von

550-700 nm und weist ein Maximum bei 642 nm auf. Durch UV-Einwirkung kann es unter Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zur Oxidation der beiden Cysteinreste kommen. Das Cobalt(II) kann nicht mehr komplexiert werden und wird aus dem Peptid freigesetzt. Die beobachtete Absorption im Bereich zwischen 550-700 nm nimmt dadurch ab (vgl. 4.1.4). Damit ist die Abnahme der Absorption ein Maß für die Modifikation des Peptids.

Im Modellsystem kann gezeigt werden, dass die Cobalt(II)-Freisetzung mit steigender Bestrahlungsdosis mit UVB- und UVA-Licht korreliert. Wird das Cobalt(II) komplexierende Peptid mit Lutein oder DHIR gemischt, ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle im unbestrahlten Zustand zu beobachten. IR hingegen führt unter unbestrahlten Bedingungen bereits zu einer signifikanten Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex.

Unter Bestrahlung mit Licht aus dem UVB-Bereich (0,5/1,5/2,5 J/cm²) zeigen Lutein und IR keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Co(II)-Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. DHIR weist eine statistisch signifikante Verminderung der Cobalt(II)-Freisetzung aus dem Peptidkomplex auf.

Werden die Peptidkomplexe mit Licht im UVA-Bereich bestrahlt, ist durch die Zugabe von Lutein oder IR unter keiner Bestrahlungsdosis eine signifikante Verminderung der Cobalt(II)-Freisetzung zu beobachten. DHIR hingegen verhindert die UV-induzierte Co(II)-Freisetzung.

Aus den Untersuchungen der Zink(II)- bzw. Cobalt(II)-Freisetzung in dermalen Fibroblasten und Metall-komplexierenden Peptiden wird deutlich, dass DHIR in beiden Systemen vor der UV-induzierten Metall-Ionen-Freisetzung schützen kann. Dies ist wahrscheinlich auf die antioxidativen Eigenschaften dieses Carotinoids zurückzuführen. Da DHIR die Bildung von ROS unter UV-Einwirkung in dermalen Fibroblasten vermindern kann, sind somit die Thiolgruppen der Cysteine vor der Oxidation durch ROS geschützt (vgl. 1.49). Lutein und IR haben hingegen in beiden Systemen keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von Metall-Ionen.

1.51 Wirkung von Carotinoiden auf MMP-1

Nachdem die Wirkung von Carotinoiden auf die Bildung von ROS und die Lipidperoxidation in dermalen Fibroblasten untersucht wurde, war es von Interesse auch in komplexeren Systemen die Wirkung von Lutein, IR und DHIR zu untersuchen. Dazu wird die UVB-induzierte MMP-1 Sekretion von dermalen Fibroblasten untersucht. Die Zellen werden mit Lutein, IR und DHIR für 24 h inkubiert und anschließend mit 20 mJ/cm^2 UVB bestrahlt. Die MMP-1 Konzentration im Kulturmedium der Zellen wird nach einer 48-stündigen Postinkubation mittels ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigen, dass die MMP-1 Sekretion aus dermalen Fibroblasten unter Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVB um das 1,5-fache zunimmt. Die Behandlung dermalen Fibroblasten mit Lutein, IR und DHIR unter nicht bestrahlten Bedingungen hat in fast allen Konzentrationen ($1,5/5/10 \text{ } \mu\text{mol/L}$) zu einem signifikanten Anstieg der MMP-1 Sekretion geführt. Werden die mit Carotinoid behandelten Zellen hingegen mit 20 J/cm^2 UVB bestrahlt ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (unbehandelte Zellen) zu beobachten.

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5 mmol/L N-Acetylcysteine inkubiert. Hier zeigte sich unter Bestrahlung der Zellen mit 20 J/cm^2 UVB eine Abnahme der MMP-1 Konzentration um das 0,7-fache im Vergleich zur Kontrolle.

Die UVB-vermittelte Hochregulierung von MMP-1 kann über zwei Signalwege erfolgen. Zum Einen korreliert die MMP-1-mRNA-Menge mit einem Anstieg von DNA Schäden in Form von Thymindimeren. Zum Anderen wird die MMP-1 expression durch die UV-induzierte Bildung von ROS hochreguliert (Mount, 1996; Brenneisen, 2002). DHIR verhindert sowohl die Thymindimerbildung (Lutter et al., 2009), als auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, die ROS-Bildung in dermalen Fibroblasten. Somit wäre eine Verminderung in der Sekretion von MMP-1 aus dermalen Fibroblasten zu erwarten gewesen. Da die eingesetzten Zellen unter UVB-Bestrahlung nur mit einem geringen Anstieg der MMP-1 Sekretion reagierten, ist es möglich, dass die schützende Effekte von DHIR

(Lutein und IR) nicht beobachtet werden konnten. In Studien von Brenneisen et al. führte bereits eine Bestrahlung mit 10 mJ/cm^2 UVB zu einem 6-fachen Anstieg der MMP-1 Sekretion aus Fibroblasten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Brenneisen et al., 2002). Aus Humanstudien ist bekannt, dass verschiedene Individuen unterschiedlich auf äußere Einflüsse, wie UV-Strahlung reagieren. Dies könnte bei der Verwendung von primären Fibroblasten von Bedeutung sein. Die Zellen jedes individuellen Spenders reagieren in Kultur unterschiedlich auf die äußerlichen Bedingungen.

1.52 Stabilität von S-Nitrosocystein unter UV-Bestrahlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zerfallsprodukte von S-Nitrosocystein unter physiologischen Bedingungen untersucht. Als stabile Produkte können Acrylsäure und Thiiran-2-carbonsäure nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Zerfall von S-Nitrosocystein über eine S- zu N-Transnitrosierung von Bedeutung, da nur über diesen Reaktionsweg Diazoniumionen entstehen können, die zu dem Produkt Thiiran-2-carbonsäure führen. Der Transfer der NO-Gruppe kann entweder intra- oder intermolekular erfolgen (Adam et al., 2006). Die Quelle der entstandenen Acrylsäure ist noch nicht bekannt. Möglich ist die Bildung von Acrylsäure über das reaktive Diazoniumion, oder durch die Umlagerung von Thiirane-2-carbonsäure zu 2-Mercaptoacrylsäure. 2-Mercaptoacrylsäure kann unter reduzierenden Bedingungen Acrylsäure bilden (Campaigne & Abe, 1975). Allerdings verläuft der Zerfall von S-Nitrosocystein nur zu einem sehr geringen Anteil über eine S- zu N-Transnitrosierung, da die Zerfallsprodukte Thiirane-2-carbonsäure und Acrylsäure nur 1-2% der Zerfallsreaktion ausmachen. Der Hauptreaktionsweg ist die Denitrosierung des CysNO unter Bildung von Cystin (GSSG). Das in Wasser schwerlösliche Cystin fiel in der Reaktionslösung zu einem großen Anteil aus.

Des Weiteren wurde die Stabilität von S-Nitrosocystein unter UV-Bestrahlung untersucht. Diese nimmt unter Bestrahlung mit UVA sowie UVB-Licht deutlich ab. Eine Bestrahlung mit einer Kombination aus UVA und UVB-Licht hat dabei

den größten Effekt auf die Zersetzungsgeschwindigkeit bzw. die Halbwertszeit von S-Nitrosocystein (vgl. 1.44).

Die Bildung von Acrylsäure liegt bei unbestrahltem CysNO bei 0,7% und steigt unter Bestrahlung mit UVB-, UVA-Licht und einer Kombination aus UVB- und UVA-Licht an. Die Bildung von Thiiran-2-carbonsäure nimmt nach der Bestrahlung mit UV-Licht nicht signifikant zu. Dabei ist allerdings kein Unterschied zwischen der Bildung von Thiiran-2-carbonsäure unter Bestrahlung mit Licht im UVB- und UVA-Bereich oder einer Kombination aus UVB- und UVA-Licht zu beobachten.

Der Anstieg des Zerfallsproduktes Acrylsäure unter UV-Strahlung deutet darauf hin, dass der Zerfall von S-Nitrosocystein unter diesen Bedingungen vermehrt über eine S- zu N-Transnitrosierung verläuft. Dies bedeutet auch einen Anstieg der reaktiven Diazoniumionen. Wenn diese Reaktion *in vivo* stattfindet, können die gebildeten reaktiven Intermediate kovalente Addukte mit DNA oder Proteinen bilden und somit diese Moleküle schädigen. Kommt es zur S-Nitrosierung einer Thiolgruppe eines im Protein gebundenen Cysteins, kann es zur intramolekularen Übertragung der NO-Gruppe zu einer Aminogruppe einer benachbarten Aminosäure (z. B. Lysin) kommen. Das dadurch generierte reaktive Molekül in unmittelbarer Nähe eines nucleophilen Thiols führt über die Bildung einer Thiol-Amin Quervernetzung zum irreversiblen Funktionsverlust des Proteins (Peterson et al., 2006).

7 Zusammenfassung

Sonnenbrand, vorzeitige Hautalterung, sowie ein erhöhtes Risiko für Hauttumore sind die Folge übermäßiger Sonnenexposition. Molekulare Ursache sind u.a. photooxidative Prozesse bei denen die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) eine bedeutende Rolle spielt. Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen freie Radikale wie das Hydroperoxid-Anion, Peroxylradikale und das Hydroxyl-Radikal, aber auch nichtradikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid. Oxidativer Stress bezeichnet eine Störung der Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien, die zu Veränderungen im Redoxsignalweg und zu Schäden an Molekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen führt. Antioxidative Mikronährstoffe wie Vitamine und Carotinoide werden zur endogenen Photoprotektion im Menschen eingesetzt.

DHIR und IR sind natürliche Carotinoide die u.a. im *Brevibacterium linens* vorkommen und phenolische bzw. aromatische Strukturelemente aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die photoprotektiven Eigenschaften der Carotinoide DHIR, IR und dem strukturähnlichen Lutein in Modellsystemen und dermalen Fibroblasten untersucht. Keine der Substanzen wirkte ohne UV-Einwirkung toxisch auf die Zellen. Unter Bestrahlung mit Licht im UVB- (0,5 und 1,5 J/cm²) und UVA-Bereich (10 und 20 J/cm²) zeigte sich ebenfalls keine Toxizität der Carotinoide. Die Wirkung von DHIR, IR und Lutein auf die UV-induzierte Lipidperoxidation wurde in einem Liposomenmodell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DHIR im Vergleich zu IR und Lutein vor der UV-induzierten Lipidperoxidation schützt. Die protektive Wirkung von DHIR auf die Lipidperoxidation konnte zudem in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Die Schutzeffekte korrelieren mit der antioxidativen Wirkung von DHIR, gemessen als verminderte Bildung von ROS in den Zellen. DHIR verhindert die UV-induzierte Metall-Ionen-Freisetzung aus einem Modellpeptid mit Zinkfinger-Motiv und in dermalen Fibroblasten. Der Effekt wird auf einen Schutz der Thiolliganden vor Oxidation zurückgeführt. Elektronenmikroskopische

Aufnahmen von dermalen Fibroblasten zeigten, dass DHIR in der Zellmembran akkumuliert und durch Endozytose in das Zellinnere aufgenommen wird. Die Untersuchungen im Modellsystem und in Zellen bestätigen, dass DHIR aufgrund seiner außergewöhnlichen Struktur besondere antioxidative Eigenschaften aufweist. Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems und der phenolischen Strukturelemente wirkt die Verbindung als bifunktionaler Radikalfänger und absorbiert Licht im UV-Bereich.

Des Weiteren wurde im Rahmen der Arbeit die Zersetzung von S-Nitrosothiolen am Beispiel des S-Nitrosocysteins unter UV-Bestrahlung untersucht. S-Nitrosothiole werden *in vivo* durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Thiolgruppen gebildet. S-Nitrosothiole sind Intermediate in Stickstoffmonoxid-Signalwegen und dienen als endogene NO Speicher.

Bei der Zersetzung von S-Nitrosocystein kommt es zur intra- oder intermolekularen Übertragung der NO-Gruppe auf eine Aminogruppe. Durch diese S- zu N-Transnitrosierung werden reaktive elektrophile Intermediate gebildet, die Proteine schädigen können. Der Reaktionsweg wurde durch Nachweis der Zerfallsprodukte Thiiran-2-carbonsäure und Acrylsäure. Die Halbwertszeit von S-Nitrosocystein nimmt unter UV-Bestrahlung ab.

8 Summary

Solar irradiation causes sunburn, skin aging and is associated with an increasing risk for skin cancer. Reactive oxygen species (ROS) play an important role and are generated in these photooxidative processes. ROS are free radicals like hyperoxid-anion, peroxy-radical and hydroxyl-radical or non-radical molecules such as singlet-oxygen or hydrogenperoxide. Oxidative stress characterizes an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and damages proteins, lipids and DNA. To protect human skin from photooxidation endogenous, antioxidative micronutrients like vitamins and carotenoids are used.

DHIR and IR are natural carotenoids present in *Brevibacterium linens* with phenolic and aromatic structural elements. Photoprotective properties of DHIR, IR and lutein were investigated in model systems and in human dermal fibroblasts. The carotenoids showed no toxicity in cells without irradiation. Upon irradiation with UVB- (0,5 and 1,5 J/cm²) and UVA-light (10 and 20 J/cm²) also no toxic effects were observed. The photoprotective activity of DHIR, IR and lutein against UV-induced lipidperoxidation was investigated in a liposomal system. In comparison to lutein and IR, DHIR protected liposoms and cells against UV-induced lipidperoxidation. The protecting effect of DHIR was correlated with a decreased formation of ROS in cells. In addition, DHIR inhibited UV-induced zink-release in a synthetic proteincomplex (model system) and dermal fibroblasts. The effect is ascribed to a protection of thiol ligands against oxidation. Electron microscope images illustrated that DHIR was present in the cell membrane and was absorbed by endocytotic vesicles. The studies demonstrated that DHIR exhibited specific antioxidant properties due to its exceptional molecular structure. It acts as bifunctional radical scavenger and UV-absorber due to the conjugated double bond system and the phenolic elements in the structure.

Further the decomposition of S-nitrosothiols was investigated. *In vivo* reactions of nitric oxide with thiol groups yield to S-nitrosothiols. It is supposed that S-nitrosothiols are important intermediates in nitric oxide signaling and serve as an endogenous nitric oxide pool. Several S-nitrosothiols have been detected in human blood and tissue. One of those thiols is S-nitrosocysteine.

During decomposition of S-nitrosocysteine the NO group may be transferred intra- or intermolecularly to the amino group. Such an S- to N-transnitrosation results in the formation of reactive intermediates. Thiirane-2-carboxylic acid and acrylic acid are decomposition products of S-nitrosocysteine which could only result from the S- to N-transnitrosation reaction. The half life of S-nitrosocysteine is decreased under irradiation with UV-light.

9 Literaturverzeichnis

- Adam, C.; García-Río, L.; Leis, J. R.; Ribeiro, L. (2005):** Nitroso group transfer in S-nitrosocysteine: evidence of a new decomposition pathway for nitrosothiols. *J. Org. Chem.*, **70** (16), S. 6353–6361.
- Al-Mustafa, A. H.; Sies, H.; Stahl, W. (2001):** Sulfur-to-nitrogen transnitrosation: transfer of nitric oxide from S-nitroso compounds to diethanolamine and the role of intermediate sulfur-to-sulfur transnitrosation. *Toxicology*, **163** (2-3), S. 127–136.
- Alves-Rodrigues, A.; Shao, A. (2004):** The science behind lutein. *Toxicol. Lett.*, **150** (1), S. 57–83.
- Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A. (2006):** Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.*, **5** (1), S. 196-201.
- Arcamone, F.; Camerino, B.; Cotta, E.; Franceschi, G.; Grein, A.; Penco, S.; Spalla, C. (1969):** New carotenoids from *Streptomyces mediolani* n. sp. *Experientia*, **25** (3), S. 241–242.
- Augustin, A. J.; Gärtner, C.; Stahl, W. (2004):** Lutein in der Prävention der altersabhängigen Makuladegeneration. *Apotheken Magazin*, (Sonderdruck), S. 1–7.
- Baldwin, M. A.; Benz, C. C. (2002):** Redox control of zinc finger proteins. *Meth. Enzymol.*, **353**, S. 54–69.
- Ball, J. (1995):** A comparison of the UV-B irradiance of low-intensity, full spectrum lamps with natural sunlight, **30**, 1995, S. 69–71.
- Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (1997):** Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **272** (33), S. 20313–20316.

- Bertram, C.; Hass, R. (2008):** Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol. Chem.*, **389** (3), S. 211–220.
- Bertram, J. S.; Pung, A.; Churley, M.; Kappock, T. J.; Wilkins, L. R.; Cooney, R. V. (1991):** Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis*, **12** (4), S. 671–678.
- Biesalski, H. K.; Köhrle, J.; Schümann, K. (Hg.) (2002):** Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Stuttgart: Thieme.
- Bone, R. A.; Landrum, J. T.; Fernandez, L.; Tarsis, S. L. (1988):** Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **29** (6), S. 843–849.
- Böhm, F.; Edge, R.; Lange, L.; Truscott, T. G. (1998):** Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **44** (3), S. 211–215.
- Breitmaier, E.; Jung, G. (2001):** Organische Chemie. 4., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Brenneisen, P.; Wenk, J.; Klotz, L. O.; Wlaschek, M.; Briviba, K.; Krieg, T. et al. (1998):** Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **273** (9), S. 5279–5287.
- Brenneisen, P.; Sies, H.; Scharffetter-Kochanek, K. (2002):** Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, S. 31–43.

- Brenneisen, P.; Wlaschek, M.; Schwamborn, E.; Schneider, L.-A.; Ma, W.; Sies, H.; Scharffetter-Kochanek, K. (2002):** Activation of protein kinase CK2 is an early step in the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *Biochem. J.*, **365** (Pt 1), S. 31–40.
- Britton, G. (1995):** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, **9** (15), S. 1551–1558.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (2008):** Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. Basel: Birkhäuser Basel (Carotenoids, 4).
- Briviba, K.; Klotz, L. O.; Sies, H. (1997):** Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol. Chem.*, **378** (11), S. 1259–1265.
- Burton, G. W.; Ingold, K. U. (1984):** beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224** (4649), S. 569–573.
- Cadenas, E.; Sies, H. (1998):** The lag phase. *Free Radic. Res.*, **28** (6), S. 601–609.
- Campaigne, E.; Abe, Y. (1975):** Benzo[b]thiophene derivatives. XXII Synthesis of the isomeric 5-methyl-6-methoxy- and 5-methoxy-6-methylbenzo[b]thiophene-2-carboxylic acids. *J. Heterocycl. Chem.*, **12**, S. 889–892.
- Cho, H.; Kim, M. K.; Lee, J. K.; Son, S. K.; Lee, K.-B.; Lee, J.-M. et al. (2009):** Relationship of serum antioxidant micronutrients and sociodemographic factors to cervical neoplasia: a case-control study. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **47** (8), S. 1005–1012.
- Cvetkovic, D.; Markovic, D. (2008):** Stability of carotenoids toward UV-irradiation in hexan solution. *J. Serb. Chem. Soc.*, **73** (1), S. 15–27.

- Di Girolamo, N.; Coroneo, M.; Wakefield, D. (2005):** Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am. J. Pathol.*, **167** (2), S. 489–503.
- Dufossé, L.; Mabon, P.; Binet, A. (2001):** Assessment of the coloring strength of *brevibacterium linens* strains: spectrophotometry versus total carotenoid extraction/quantification. *J. Dairy Sci.*, **84** (2), S. 354–360.
- El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortensen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J. (2004):** Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **430** (1), S. 37–48.
- Frank, H. A. (1997):** On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis. *Pure & Appl. Chem.*, **69** (10), S. 2117–2124.
- Frank, H.; Young, A.; Britton, G., et al. (Hg.) (1999):** The Photochemistry of Carotenoids. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Group.
- Frederick, J. E.; Lubin, D. (1988):** Possible long-term changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the ground. *Photochem. Photobiol.*, **47** (4), S. 571–578.
- Fygle, K. E.; Melo T. B. (1996):** Optical absorption studies of the kinetics of UV- and self-initiated autoxidation of linoleate micelles. *Chem. Phys. Lipids*, **79**, 1996, S. 39–46.
- Gabrielska, J.; Gruszecki, W. I. (1996):** Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285** (2), S. 167–174.
- Gilchrest, B. A.; Krutmann, J. (Hg.) (2006):** Skin Aging: Springer Berlin.

- Girotti, A. W. (2001):** Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **63** (1-3), S. 103–113.
- Gouranton, E.; Yazidi, C. E.; Cardinault, N.; Amiot, M. J.; Borel, P.; Landrier, J.-F. (2008):** Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **46** (12), S. 3832–3836.
- Gruszecki, W. I.; Siewiesiuk, J. (1990):** Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1023** (3), S. 405-412.
- Gugger, E. T.; Erdman, J. W. (1996):** Intracellular beta-carotene transport in bovine liver and intestine is not mediated by cytosolic proteins. *J. Nutr.*, **126** (5), S. 1470–1474.
- Guyomarch, F.; Binet, A.; Dufossé, L. (2000):** Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrophotometry. *Int. J. Food Microbiol.*, **57** (3), S. 201–210.
- Halliwell, B. (1989):** Tell me about free radicals, doctor: a review. *J. Roy. Soc. Med.*, **82** (12), S. 747–752.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (1984):** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, **219** (1), S. 1–14.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1989):** Free radicals in biology and medicine. 2. ed. Oxford: Oxford Univ. Press (Oxford science publications).
- Hawkins, C. L.; Morgan, P. E.; Davies, M. J. (2009):** Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **46** (8), S. 965–988.

- 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 humans from UV-induced erythema. *J. Nutr.*, **133** (1), S. 98–101.
- Hempel, S. L.; Buettner, G. R.; O'Malley, Y. Q.; Wessels, D. A.; Flaherty, D. M. (1999):** Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (1-2), S. 146–159.
- Hijova, E. (2005):** Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl. Lek. Listy.*, **106** (3), S. 127–132.
- Hogg, N. (2000):** Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic. Biol. Med.*, **28** (10), S. 1478–1486.
- Holleman, A. F.; Wiberg, E.; Wiberg, N.; Holleman-Wiberg (1995):** Lehrbuch der anorganischen Chemie. 102. Aufl. Berlin: de Gruyter.
- Hummel, S. G.; Fischer, A. J.; Martin, S. M.; Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. (2006):** Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free Radic. Biol. Med.*, **40** (3), S. 501–506.
- Jakob, U.; Eser, M.; Bardwell, J. C. (2000):** Redox switch of hsp33 has a novel zinc-binding motif. *J. Biol. Chem.*, **275** (49), S. 38302–38310.
- Johnson, J. D. (2009):** Do carotenoids serve as transmembrane radical channels? *Free Radic. Biol. Med.*, **47** (3), S. 321–323.
- Kashiba, M.; Kasahara, E.; Chien, K. C.; Inoue, M. (1999):** Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **363** (2), S. 213–218.

- 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** (12), S. 1257–1267.
- Kennedy, T. A.; Liebler, D. C. (1992):** Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J. Biol. Chem.*, **267** (7), S. 4658–4663.
- Kohen, R.; Nyska, A. (2002):** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, **30** (6), S. 620–650.
- Kohl, W.; Achenbach, H.; Reichenbach, H. (1983):** The pigments of *brevibacterium linens*: Aromatic carotenoids. *Phytochemistry*, **1983** (22), S. 207–210.
- Köpcke, W.; Krutmann, J. (2008):** Protection from sunburn with beta-Carotene - A meta-analysis. *Photochem. Photobiol.*, **84** (2), S. 284–288.
- Krinsky, N. I. (1998):** The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **854**, S. 443–447.
- Kröncke, K.-D. (2007):** Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **463** (2), S. 183–187.
- Lancrajan, I.; Diehl, H. A.; Socaciu, C.; Engelke, M.; Zorn-Kruppa, M. (2001):** Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and beta-cyclodextrins. *Chem. Phys. Lipids*, **112** (1), S. 1–10.
- Lee, J. E.; Männistö, S.; Spiegelman, D.; Hunter, D. J.; Bernstein, L.; van den Brandt, P. A. et al. (2009):** Intakes of fruit, vegetables, and carotenoids and renal cell cancer risk: a pooled analysis of 13 prospective studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18** (6), S. 1730–1739.

- Li, H.-R.; Wu, L.-Z.; Tung, C.-H. (2000):** Reactions of singlet oxygen with olefins and sterically hindered amine in mixed surfactant vesicles. *J. Am. Chem. Soc., Ausgabe 122*, 2000, S. 2446–2451.
- Liochev, S. I.; Fridovich, I. (2002):** The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.*, **7** (1), S. 55-7.
- Lutter, K.; Spirt, S. de; Kock, S.; Kröncke, K. D.; Martin, H. D.; Wagener, T.; Stahl, W. (2009):** 3,3'-Dihydroxyisorenieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts. *Mol. Nutr. Food Res.*, *in print*.
- Lutter, K. (2009):** Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin und Vitamin E Derivaten. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Mares-Perlman, J. A.; Millen, A. E.; Ficek, T. L.; Hankinson, S. E. (2002):** The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutr.*, **132** (3), S. 518S-524.
- Maret, W.; Vallee, B. L. (1993):** Cobalt as probe and label of proteins. *Meth. Enzymol.*, **226**, S. 52–71.
- Marian, C. M.; Kock, S. C.; Hundsdörfer, C.; Martin, H.-D.; Stahl, W.; Ostroumov, E. et al. (2009):** Spectroscopic properties of phenolic and quinoid carotenoids: a combined theoretical and experimental study. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8** (2), S. 270–278.
- Marnett, L. J.; Tuttle, M. A. (1980):** Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and the side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Res.*, **40** (2), S. 276–282.
- Martin, H.-D.; Kock, S.; Scherrers, R.; Lutter, K.; Wagener, T.; Hundsdörfer, C. et al. (2009):** 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48** (2), S. 400–403.

- Mathews, W. R.; Kerr, S. W. (1993):** Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **267** (3), S. 1529–1537.
- Mayne, S. T. (1995):** Beta-carotene; carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.*, S. 690–701.
- Mehrdad, Z. (2002):** Der Einfluß von Charge Transfer Wechselwirkungen auf die Bildung von $O_2(1\Sigma_g^+)$, $O_2(1\Delta_g)$ und $O_2(3\Sigma_g^-)$ bei der Löschung von $\pi\pi^*$ und $n\pi^*$ -angeregten Triplettzuständen durch O_2 . Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Miersch, S.; Mutus, B. (2005):** Protein S-nitrosation: biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals. *Clin. Biochem.*, **38** (9), S. 777–791.
- Mnich, C. D.; Hoek, K. S.; Virkki, L. V.; Farkas, A.; Dudli, C.; Laine, E. et al. (2009):** Green tea extract reduces induction of p53 and apoptosis in UVB-irradiated human skin independent of transcriptional controls. *Exp. Dermatol.*, **18** (1), S. 69–77.
- Mortensen, A.; Skibsted, L. H. (1997):** Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Lett.*, **417** (3), S. 261–266.
- Mount, D. W. (1996):** DNA repair. Reprogramming transcription. *Nature*, **383** (6603), S. 763–764.
- Muller, F. L.; Liu, Y.; van Remmen, H. (2004):** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, **279** (47), S. 49064–49073.
- Murphy, M. E.; Sies, H. (1990):** Visible-range low-level chemiluminescence in biological systems. *Meth. Enzymol.*, **186**, S. 595–610.

- Nasir, M. S.; Fahrni, C. J.; Suhy, D. A.; Kolodsick, K. J.; Singer, C. P.; O'Halloran, T. V. (1999):** The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc-quinolinesulfonamide complex. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4** (6), S. 775–783.
- Noble, D. R.; Williams, D. L. (2000):** Structure-reactivity studies of the Cu(2+)-catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-Nitrosocysteine/S-nitrosoglutathione structures. *Nitric Oxide*, **4** (4), S. 392-398.
- Nybraaten, G.; Liaaen-Jensen, S. (1974):** Bacterial carotenoids. VLIV. Zeaxanthin mono- and dirhamnoside. *Acta Chem. Scand., B, Org. Chem. Biochem.*, **28** (10), S. 1219–1224.
- Ogura, R.; Sugiyama, M. (1993):** Reaktiv oxidants in skin: UV induced lipid peroxidation. *Oxidativ Stress in Dermatology*. Fuchs, J.; Packer, L. (Hg.). New York: Dekker.
- Okulski, W.; Sujak, A.; Gruszecki, W. I. (2000):** Dipalmitoylphosphatidylcholine membranes modified with zeaxanthin: numeric study of membrane organisation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509** (1-2), S. 216–228.
- Opländer, C.; Wetzel, W.; Cortese, M. M.; Pallua, N.; Suschek, C. V. (2008):** Evidence for a physiological role of intracellularly occurring photolabile nitrogen oxides in human skin fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **44** (9), S. 1752–1761.
- Palozza, P. (2004):** Carotenoid antioxidant activity in carotenoids in health and disease. In: Krinsky, N.; Mayne, S.; Sies, H. (Hg.): *Carotenoid antioxidant activity in carotenoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker Verlag, S. 127 ff.

- Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E.; Brenowitz, M. (2000):** A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.*, **304** (1), S. 55–68.
- Peng, Y. M.; Peng, Y. S.; Lin, Y. (1993):** A nonsaponification method for the determination of carotenoids, retinoids, and tocopherols in solid human tissues. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2** (2), S. 139–144.
- Peterson, L. A.; Wagener, T.; Sies, H.; Stahl, W. (2007):** Decomposition of S-nitrosocysteine via S- to N-transnitrosation. *Chem. Res. Toxicol.*, **20** (5), S. 721–723.
- Piette, J. (1991):** Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **11** (3-4), S. 241–260.
- Placer, Z. A.; Cushman, L. L.; Johnson, B. C. (1966):** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, **16** (2), S. 359–364.
- Pryor, W. A. (1986):** Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, **48**, S. 657–667.
- Ramos, M. C.; Steinbrenner, H.; Stuhlmann, D.; Sies, H.; Brenneisen, P. (2004):** Induction of MMP-10 and MMP-1 in a squamous cell carcinoma cell line by ultraviolet radiation. *Biol. Chem.*, **385** (1), S. 75–86.
- Recknagel, R. O.; Glende, E. A. (1984):** Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Meth. Enzymol.*, **105**, S. 331–337.
- Ridnour, L. A.; Thomas, D. D.; Mancardi, D.; Espey, M. G.; Miranda, K. M.; Paolucci, N. et al. (2004):** The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem.*, **385** (1), S. 1–10.

- Schieberle, P.; Terbert, Y.; Firl, J.; Grosch, W. (1985):** Photolysis of unsaturated fatty acid hydroperoxides. *Chem. Phys. Lipids*, **37**, 1985, S. 99-114.
- Sies, H.; Jones, D. P. (2007):** Oxidative stress. In: Fink G. (Hg.): *Encyclopaedia of stress*. San Diego: Elsevier, S. 45-48.
- Sies, H.; Menck, C. F. (1992):** Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. Res.*, **275** (3-6), S. 367–375.
- Sies, H.; Stahl, W. (2004):** Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.*, **24**, S. 173–200.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. et al. (1990):** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82** (13), S. 1107–1112.
- Snitsarev, V.; Budde, T.; Stricker, T. P.; Cox, J. M.; Krupa, D. J.; Geng, L.; Kay, A. R. (2001):** Fluorescent detection of Zn(2+)-rich vesicles with Zinquin: mechanism of action in lipid environments. *Biophys. J.*, **80** (3), S. 1538–1546.
- Stadtman, E. R. (2004):** Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.*, **11**, S. 1105–1112.
- Stahl, W. (2005):** Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin. *Developments in Ophthalmology*, **38**, S. 70–88.
- Stahl, W.; Heinrich U.; Jungmann H.; Laar J.; Schietzel M.; Sies H. & Tronnier von (1998):** Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectroscopy correlate with serum levels in women ingesting Betatene. *J. Nutr.*, **5**, 128, 1998, S. 903–907.
- Stahl, W.; Krutmann, J. (2006):** Systemic photoprotection through carotenoids. *Der Hautarzt*, **57** (4), S. 281–285.

- Stahl, W.; Sies, H. (2002):** Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **15** (5), S. 291–296.
- Sujak, A.; Okulski, W.; Gruszecki, W. I. (2000):** Organisation of xanthophyll pigments lutein and zeaxanthin in lipid membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1509** (1-2), S. 255-263.
- Suschek, C. V.; Paunel, A.; Kolb-Bachofen, V. (2005):** Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure. *Meth. Enzymol.*, **396**, S. 568–578.
- Tyssandier, V.; Choubert, G.; Grolier, P.; Borel, P. (2002):** Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **72** (5), S. 300–308.
- 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** (1), S. 44–84.
- Vielhaber, G.; Grether-Beck, S.; Koch, O.; Johncock, W.; Krutmann, J. (2006):** Sunscreens with an absorption maximum of \geq 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5** (3), S. 275–282.
- Wagner, 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** (25), S. 18502-18506.
- Wang, X. D.; Russell, R. M. (1999):** Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr. Rev.*, **57** (9 Pt 1), S. 263–272.

- Wei, R. R.; Wamer, W. G.; Lambert, L. A.; Kornhauser, A. (1998):** beta-Carotene uptake and effects on intracellular levels of retinol in vitro. *Nutr. Cancer*, **30** (1), S. 53–58.
- Yamaguchi, M. (1957):** On Carotenoids of a Sponge "Reniera japonica". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (30), S. 111–114.
- Young, A. J.; Lowe, G. M. (2001):** Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **385** (1), S. 20–27.
- 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-toluene-sulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem. J.*, **296 (Pt 2)**, S. 403–408.

10 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cycloaddition
CysNO	S-Nitrosocystein
DAD	Dioden Array Detektor
DCF	Dichlorofluorescein
DCM	Dichlormethan
DHIR	3,3'-Dihydroxyisorenieratin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSSG	Oxidiertes Glutathion (Disulfid)
h	Stunde
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat
HBSS	Hank's Buffered Saline
HDL	Hight Density Lipoprotein
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography

HSM	HPLC System Manager
IR	Isorenieraten
ISC	Intersystem Crossing
LDL	Low Density Lipoprotein
LSF	Lichtschuttfaktor
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MMP-1	Matrixmetalloprotease-1
MPO	Myelo-Peroxidase
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate-buffered Saline (Natriumphosphatpuffer)
PC	Phosphatidylcholin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactiv oxygen species)
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SOD	Superoxid-Dismutase
SRB	Sulforhodamin B
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
TCA	Trichloressigsäure

THF	Tetrahydrofuran
TIMPs	Tissue Inhibitors of MMPs
TMP	1,1,3,3-Tetramethoxypropan
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
w	Gewichtsprozent

11 Anhang

Emissionsspektren der Lampen in der Bestrahlungsapparatur BioSun:

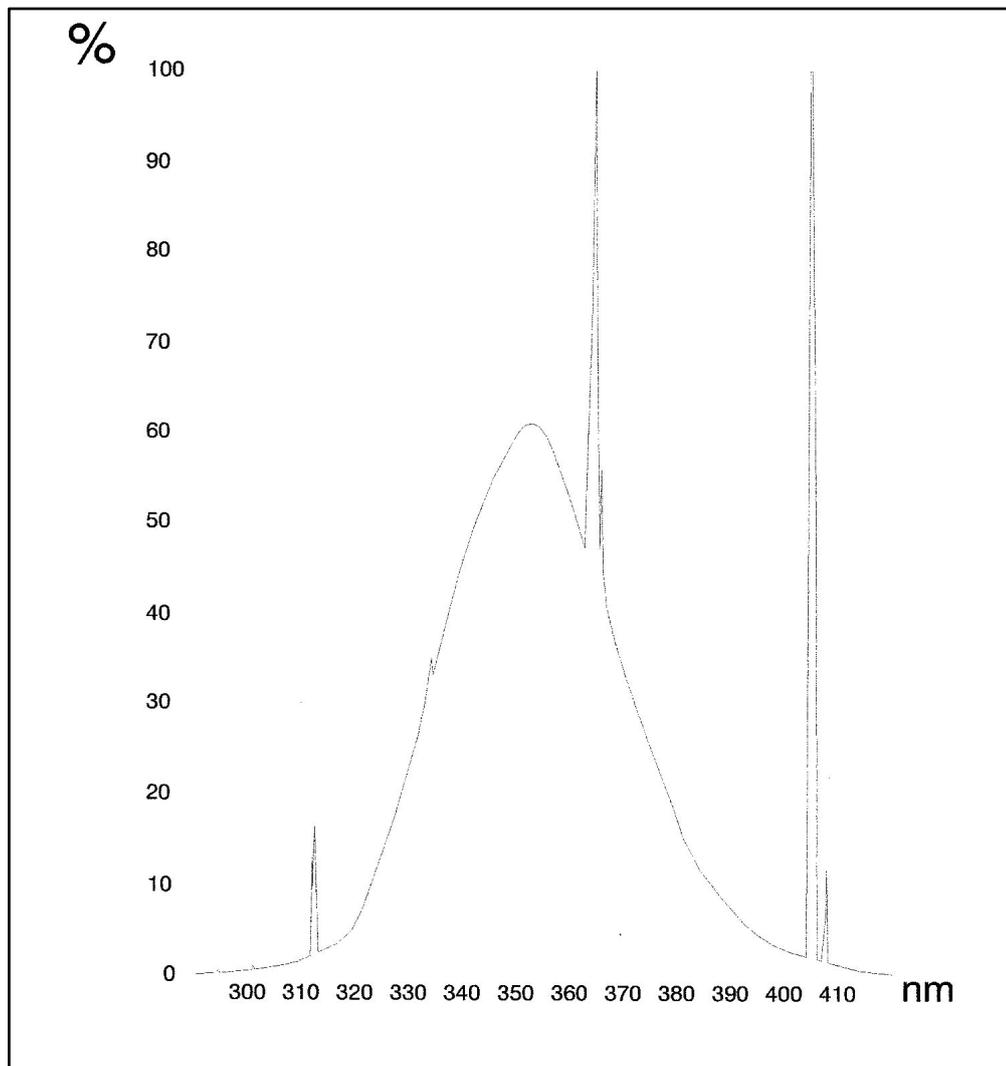


Abb. 11.1: Emissionsspektrum der UVA Lampe der Bestrahlungsapparatur BioSun mit einem Wellenlängenmaximum bei 365 nm

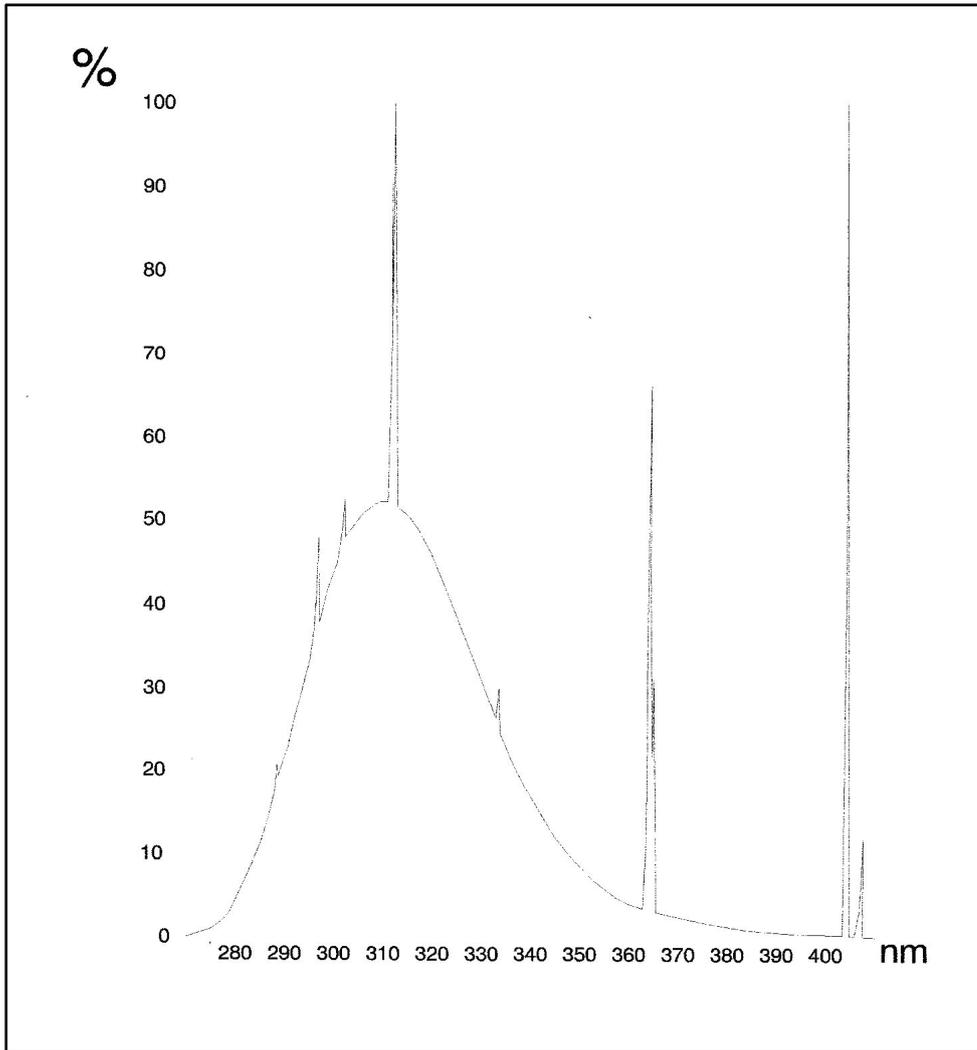


Abb. 11.2: Emissionsspektrum der UVB Lampe der Bestrahlungsapparatur BioSun mit einem Wellenlängenmaximum bei 312 nm

12 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Stahl, bedanken. Er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen und immer neuen Ideen für das Gelingen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Weinkauf bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Andrea Borchert möchte ich für die Unterstützung bei der Präparation der Zellproben und Herrn Ferdi Grawe vom Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Peter Graf, der mich in die Geheimnisse der HPLC einwies und immer ein offenes Ohr für mehr oder auch mal weniger wissenschaftliche Fragen hatte.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, die da wären: Heide Krahl, Tanja Portugall, Silke De Spirt, Tatjana Brosette, Kaya Lutter und Claas Hundsdörfer. Es hat in wissenschaftlicher und privater Hinsicht sehr viel Freude gemacht, mit Euch zu arbeiten.

Last but not least möchte ich meine Eltern, meinen Freund Andreas, Heike und Opi nennen. Ohne Eure immerwährende, vorbehaltlose Unterstützung, Motivation und Liebe wäre ich nie so weit gekommen – Danke!

13 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 _____

Tanja Wagener