

**Untersuchungen zu photoprotektiven  
und immunmodulatorischen Wirkungen  
aromatischer Carotinoide**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sarah Wagener**

aus Hamm (Sieg)

Düsseldorf, April 2013

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. Wilhelm Stahl  
Korreferent: Prof. Dr. Thomas J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2013

*Geld ist rund und rollt weg,  
aber Bildung bleibt.*

**Heinrich Heine**



**meinen Eltern**



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Aufbau der Haut . . . . .	3
1.2	UV-induzierte Zellschäden . . . . .	4
1.2.1	Direkte DNA-Schäden . . . . .	4
1.2.2	Indirekte DNA-Schäden . . . . .	6
1.2.3	Reparaturmechanismen der Zelle . . . . .	10
1.3	Carotinoide . . . . .	12
1.3.1	Lutein . . . . .	15
1.3.2	DHIR und IR . . . . .	15
1.4	Entzündung . . . . .	17
1.4.1	Der Transkriptionsfaktor $\text{Nf}\kappa\text{B}$ . . . . .	17
1.4.2	Zytokine . . . . .	18
1.5	Ziel der Arbeit . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>21</b>
2.1	Geräte . . . . .	21
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	23
2.3	Chemikalien . . . . .	24
2.4	Puffer und Gebrauchslösungen . . . . .	26
2.5	Antikörper . . . . .	28
2.6	Zellkultur . . . . .	28
2.7	Software . . . . .	29

<b>3 Methoden</b>	<b>31</b>
3.1 Zellkultur . . . . .	31
3.1.1 Kultivieren von Fibroblasten . . . . .	31
3.1.2 Kultivieren von HaCaT-Zellen . . . . .	32
3.1.3 Inkubation mit Substanzen . . . . .	32
3.1.4 UV-Bestrahlung von Zellen . . . . .	33
3.1.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen . . . . .	34
3.1.6 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung (Trypanblau Färbung) . . . . .	34
3.2 Zellviabilitätstest . . . . .	34
3.2.1 Sulforhodamin B-Assay . . . . .	35
3.2.2 Apoptose (TUNEL-Test) . . . . .	36
3.3 Zelluläre Aufnahme und UV-Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen . . . . .	37
3.4 Proteinbestimmung . . . . .	38
3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	38
3.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry . . . . .	38
3.5 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit Hilfe des alkalischen Comet Assays . . . . .	40
3.5.1 Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden . . . . .	42
3.6 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Thymindimeren . . . . .	44
3.6.1 Reinheitsüberprüfung des Standards . . . . .	45
3.6.2 UVB-abhängige Bildung von Thymindimeren . . . . .	46
3.6.3 Bestimmung von Thymindimeren in Modellsystemen . . . . .	46
3.6.3.1 Thymindimerbildung im Modellsystem (saure Hydrolyse der DNA) . . . . .	47
3.6.3.2 Thymindimerbildung im Modellsystem (enzymatische Hydrolyse der DNA) . . . . .	47
3.6.3.3 Isolierung von mononukleären Zellen . . . . .	48
3.6.3.4 DNA-Isolierung aus mononukleären Zellen . . . . .	48
3.7 Biochemische Methoden zur Bestimmung von Cyclobutanpyrimidindimeren . . . . .	48
3.7.1 Dot Blot . . . . .	49
3.7.2 Immunzytochemische Färbung . . . . .	50
3.8 Translokalisierung von NF $\kappa$ B in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	51
3.8.1 Immunzytochemische Färbung . . . . .	51

---

3.8.2	Western Blot Verfahren . . . . .	51
3.8.2.1	Trennung von Kern- und Cytosolfraction . . . . .	51
3.8.2.2	Western Blot . . . . .	52
3.9	UVB-abhängige Expression von Interleukin-6 . . . . .	55
3.10	Bestimmung von immunmodulatorischen Interleukinen mittels ELISA . . . . .	55
3.10.1	Probenvorbereitung . . . . .	56
3.10.2	Interleukin-10 . . . . .	56
3.10.3	Interleukin-12 . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
4.1	Zytotoxizitätstest . . . . .	59
4.1.1	Zytotoxizität in Hautfibroblasten (hdF) - UV-Bestrahlung und Carotinoide . . . . .	60
4.1.2	Zytotoxizität in HaCaT-Zellen - UV-Bestrahlung und Carotinoide . . . . .	64
4.1.3	TUNEL-Test . . . . .	67
4.2	Zelluläre Aufnahme und UV-Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen . . . . .	71
4.2.1	Zelluläre Aufnahme der Carotinoide . . . . .	71
4.2.2	Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung . . . . .	73
4.3	DNA-Schäden . . . . .	75
4.3.1	Alkalischer Comet Assay . . . . .	75
4.4	Thymindimere . . . . .	79
4.4.1	HPLC-Methode zur Bestimmung von Thymindimeren in einem Modell- system . . . . .	79
4.4.1.1	UVB-abhängige Bildung von Thymindimeren . . . . .	81
4.4.1.2	Untersuchung der Thymindimerbildung in Modellsystemen nach UV-Exposition . . . . .	82
4.4.2	Dot Blot . . . . .	87
4.4.3	Immunzytochemische Färbung (Immunostaining) . . . . .	90
4.5	UV-induzierte Entzündungsreaktionen . . . . .	93
4.5.1	Translokalisierung von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition . . . . .	93
4.5.1.1	Immunzytochemische Färbung von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ und Translokalisierung nach UVB-Bestrahlung . . . . .	93
4.5.1.2	Nachweis der $\text{Nf}\kappa\text{B}$ Translokalisierung nach UVB-Bestrahlung mit Western Blot Analyse . . . . .	100

---

4.5.1.3	Vergleich der Ergebnisse zur UVB-induzierten Nf $\kappa$ B Translokation in HaCaT-Zellen aus der immunzytochemischen Färbung und der Western Blot Analyse . . . . .	103
4.5.2	Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition . . . . .	105
4.5.3	Expression der immunmodulatorischen Interleukine IL-10 und IL-12 in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition . . . . .	109
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
5.1	Zellmodelle . . . . .	114
5.2	Biologische Effekte von UV-Strahlung . . . . .	114
5.2.1	Einfluss von UV-Strahlung auf die Zellen . . . . .	115
5.3	Einfluss der Carotinoide auf die Zellen . . . . .	116
5.4	Zelluläre Aufnahme der Carotinoide . . . . .	119
5.4.1	Vergleich der Aufnahme der Carotinoide: HaCaT-Zellen und humanen dermalen Fibroblasten . . . . .	119
5.4.2	Vergleich der Stabilitäten der Carotinoide unter UV-Exposition in HaCaT-Zellen und hdf . . . . .	121
5.5	Protektive Wirkungen gegen DNA-Schäden . . . . .	122
5.6	UV-induzierte Entzündungsreaktion . . . . .	125
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>153</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>155</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>157</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Definition Lichtschutzfaktor (LSF) . . . . .	2
1.2	Aufbau der Haut . . . . .	3
1.3	Bildung von Cyclobutanthymindimeren . . . . .	4
1.4	Bildung von 6-4 Photoprodukten und Dewar-Photoprodukten . . . . .	5
1.5	Bildung von Thymin-Uracil-Cyclobutandimeren durch Desaminierung der DNA-Base Cytosin in Thymin-Cytosin-Cyclobutandimeren . . . . .	5
1.6	Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) . . . . .	6
1.7	Endogene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies . . . . .	6
1.8	Besetzung des HOMO von Sauerstoff im Triplett- und Singulett-Zustand . . . . .	7
1.9	Photochemische Bildung von Singulett-Sauerstoff durch einen Sensibilisator: Typ-II Reaktion (Energietransfer) . . . . .	7
1.10	Photochemische Bildung von Superoxidanionen durch einen Sensibilisator: Typ-I Reaktionen (Elektronentransfer) . . . . .	8
1.11	Chemische Reaktion der DNA-Base Guanin mit Hydroxylradikalen . . . . .	8
1.12	Einelektronenoxidation der DNA-Base Guanin . . . . .	9
1.13	Watson-Crick Basenpaarung von 8-Oxoguanosin mit Cytidin und fehlerhafte Paarung mit Adenosin . . . . .	10
1.14	Basisstruktur und Nummerierungsschema der Carotinoide . . . . .	12
1.15	Nomenklatur der Endgruppen von Carotinoiden . . . . .	12
1.16	Photochemische Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff durch Carotinoide . . . . .	13
1.17	Chemische Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit Carotinoiden . . . . .	14
1.18	Abfangreaktionen von Radikalen durch Carotinoide . . . . .	14
1.19	Struktur von 3,3'-Dihydroxy- $\beta$ , $\epsilon$ -carotin (Lutein) . . . . .	15
1.20	Strukturformeln der aromatischen Carotinoide isoliert aus <i>Streptomyces mediolani</i> .	16
1.21	Strukturformel von 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\varphi$ , $\varphi$ -carotin-3,3'-dion . . . . .	16

---

1.22	Nf $\kappa$ B Signalweg . . . . .	18
3.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen . . . . .	31
3.2	Emmissionsspektren der verwendeten Lampen der UV-Bestrahlungseinheit BioSun . . . . .	33
3.3	Sulforhodamin B . . . . .	35
3.4	Coomassie-Brilliant-Blau G250 . . . . .	38
3.5	Prinzip und Durchführung des Comet Assays . . . . .	40
3.6	Darstellung eines „Comets“ mit der Software CometScore™ . . . . .	41
3.7	Strukturformeln von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin . . . . .	42
3.8	Prinzip und Durchführung des Comet Assays zur Bestimmung von oxidativen Schäden . . . . .	42
3.9	Bildung von Thymindimeren . . . . .	44
3.10	Absorptionsspektren von Thymin und Thymindimer . . . . .	45
3.11	Strukturformeln der Cyclobutanpyrimidindimere . . . . .	48
3.12	Struktur eines Polyacrylamidgels . . . . .	53
3.13	Semi-Dry Blot . . . . .	54
4.1	Zellkulturbedingungen: Zytotoxizitätstest . . . . .	59
4.2	Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVA-Bestrahlung in hdF. . . . .	61
4.3	Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVB-Bestrahlung in hdF. . . . .	63
4.4	Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVA-Bestrahlung in HaCaT-Zellen. . . . .	65
4.5	Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVB-Bestrahlung in HaCaT-Zellen . . . . .	66
4.6	Mikroskopische Aufnahmen: Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	68
4.7	Mikroskopische Aufnahmen: Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung (30 mJ/cm <sup>2</sup> ) und Carotinoid-Behandlung (10 $\mu$ M) . . . . .	69
4.8	Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Carotinoid-Behandlung (10 $\mu$ M) . . . . .	70
4.9	Zellkulturbedingungen: Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen . . . . .	71
4.10	Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen . . . . .	72
4.11	Carotinoidgehalt in Zellen und Medium (% der eingesetzten Menge) . . . . .	72
4.12	Stabilität von DHIR in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung . . . . .	73

---

4.13	Stabilität von Lutein in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung . . . . .	74
4.14	Auswertung eines „Comets“ mit der Software CometScore™ . . . . .	75
4.15	Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Exposition mit Wasserstoffperoxid . . . . .	76
4.16	Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung mit 300 mJ/cm <sup>2</sup> UVB . . . . .	77
4.17	Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung mit 10 J/cm <sup>2</sup> UVA und Inkubation mit dem Enzym hOGG1 . . . . .	78
4.18	Bildung von Cyclobutanthymindimeren in einer [2+2]-Cycloaddition . . . . .	79
4.19	HPLC-Chromatogramme: Thymin, Thymindimer, Thymin + Thymindimer . . . . .	80
4.20	Thymindimerbildung in wässriger Thyminlösung unter UVB-Exposition . . . . .	81
4.21	Thymindimerbildung nach 5maliger Bestrahlung mit 1 J/cm <sup>2</sup> UVB . . . . .	81
4.22	HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 1 nach UV-Exposition (saurer Hydrolysat) . . . . .	82
4.23	HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 2 nach UV-Exposition (saurer Hydrolysat) . . . . .	83
4.24	HPLC-Chromatogramme der Kalbsthymus DNA (saurer Hydrolysat) nach UV-Exposition . . . . .	84
4.25	HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 3 (enzymatisches Hydrolysat) nach UV-Exposition . . . . .	85
4.26	HPLC-Chromatogramme der humanen DNA (enzymatisches Hydrolysat) nach UV-Exposition . . . . .	86
4.27	Dot Blot: UV-abhängige CPD-Bildung im Oligonucleotid 1 . . . . .	87
4.28	Dot Blot: UVB-abhängige CPD-Bildung in hdF . . . . .	88
4.29	Dot Blot: UV-abhängige CPD-Bildung nach Behandlung mit DHIR in hdF . . . . .	88
4.30	Bildung von CPDs in hdF nach UVB-Bestrahlung . . . . .	89
4.31	Bildung von CPDs in hdF unmittelbar nach UV-Bestrahlung (0 h) . . . . .	90
4.32	Bildung von CPDs in hdF nach UV-Bestrahlung (24 h) . . . . .	91
4.33	Bildung von CPDs in hdF nach UVB Bestrahlung . . . . .	92
4.34	Immunzytochemische Färbung von NfκB nach UVB-Bestrahlung und 1h Postinkubation . . . . .	95

4.35	Immunzytochemische Färbung von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ nach UVB-Bestrahlung und 6h Postinkubation . . . . .	96
4.36	Immunzytochemische Färbung von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ nach UVB-Bestrahlung und 24h Postinkubation . . . . .	97
4.37	$\text{Nf}\kappa\text{B}$ Translokation in den Kern von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	98
4.38	Western Blot von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ nach UVB-Bestrahlung und 6 h Postinkubation . . . . .	100
4.39	$\text{Nf}\kappa\text{B}$ in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und 6 h Postinkubation . . . . .	100
4.40	Western Blot von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ nach UVB-Bestrahlung und 24 h Postinkubation . . . . .	101
4.41	$\text{Nf}\kappa\text{B}$ in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und 24h Postinkubation . . . . .	101
4.42	Vergleich der Ergebnisse zur UVB-induzierten $\text{Nf}\kappa\text{B}$ Translokation: Immunzytochemische Färbung vs. Western Blot Methode . . . . .	103
4.43	Western Blots der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	105
4.44	UVB-abhängige Induktion von IL-6 in HaCaT-Zellen . . . . .	106
4.45	IL-6 Expression nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen . . . . .	107
4.46	Interleukin-10 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	109
4.47	Interleukin-12 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung . . . . .	110
5.1	Anforderungen an Substanzen zur Photoprotektion . . . . .	113
5.2	Prooxidative Reaktionswege von Carotinoiden . . . . .	118
5.3	Strukturformeln: DHIR, 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\varphi$ , $\varphi$ -carotin-3,3'-dion . . . . .	123
8.1	HPLC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 264 nm . . . . .	133
8.2	$^1\text{H}$ -NMR von Thymin . . . . .	134
8.3	$^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR von Thymin . . . . .	134
8.4	$^1\text{H}$ -NMR von Thymindimer . . . . .	135
8.5	$^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}\}$ -NMR von Thymindimer . . . . .	135
8.6	Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVC-Bestrahlung in hdf . . . . .	136
8.7	Morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit DHIR . . . . .	137
8.8	Morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit Lutein . . . . .	138

# Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte . . . . .	22
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	23
2.3	Chemikalien . . . . .	25
2.4	Analysen-Set . . . . .	25
2.5	Puffer für den Comet Assay . . . . .	26
2.6	Blockierlösung für immunzytochemische Färbungen . . . . .	26
2.7	Western Blot Puffer . . . . .	27
2.8	Lysepuffer (pH 7,4) . . . . .	28
2.9	Antikörper . . . . .	28
2.10	Zellkulturmedien . . . . .	29
2.11	Software . . . . .	29
3.1	HPLC-Bedingungen der Carotinoid-Analytik . . . . .	37
3.2	HPLC-Bedingungen zur Reinheitsüberprüfung des Thymindimer-Standards . . . . .	45
3.3	HPLC-Bedingungen der Thymindimer-Analytik . . . . .	46
3.4	Oligonucleotide für die Modellversuche zur Thymindimerbildung . . . . .	46
3.5	Enzym-Mischungen für die enzymatische Hydrolyse der DNA . . . . .	47
3.6	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels . . . . .	52
3.7	Antikörper zur Bestimmung von NF $\kappa$ B . . . . .	54
3.8	Antikörper zur Bestimmung von IL-6 . . . . .	55
4.1	Oligonucleotide - Modellsysteme für die Thymindimerbildung . . . . .	79
5.1	Vergleich der zellulären Aufnahme von Carotinoiden in hdF und HaCaT-Zellen . . . . .	120
5.2	Stabilität von DHIR unter UV-Bestrahlung in hdF und HaCaT-Zellen . . . . .	121
5.3	Stabilität von Lutein unter UV-Bestrahlung in hdF und HaCaT-Zellen . . . . .	122



# 1 Einleitung

Ohne die UV-Strahlung der Sonne wäre ein Leben auf der Erde nicht möglich. Die Sonne bestimmt mit ihrer Strahlung das Klima der Erde und liefert die notwendige Energie zur Photosynthese der Pflanzen [1]. Nur etwa 7 % der Strahlungsintensität der Sonne erreicht die Erdoberfläche [2]. Die Ozonschicht absorbiert die energiereichere, kurzwellige UVC- und UVB-Strahlung. UVC-Strahlung wird nahezu vollständig absorbiert, während ein Teil der UVB-Strahlung die Erdoberfläche erreicht. Die energieärmere, langwelligere UVA-Strahlung wird nur zu einem geringen Anteil absorbiert und erreicht somit zu großen Teilen die Erdoberfläche.

Wärme und Sonnenstrahlen steigern das Wohlbefinden der Menschen und sind für die körpereigene Vitamin D Produktion aus 7-Dehydrocholesterin nötig. Auch die Hautbräunung nach einem Sonnenbad wird als angenehm empfunden [3].

Zum Schutz des Körpers vor UV-induzierten Zellschäden besitzt die Haut verschiedene Schutzmechanismen: die verstärkte Hautpigmentierung (Melaninsynthese) [2] und die Bildung einer Lichtschwiele. Die Melaninsynthese in den Melanozyten wird durch UVB-Strahlung angeregt [4]. Tyrosin wird mit Hilfe des Enzyms Tyrosinase zunächst zu Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und dann zu Dopachinon oxidiert [5]. Dopachinon kann unter Ringschluss zu 5,6-Indolchinon reagieren, das durch Polymerisation Eumelanin bildet. Dopachinon kann aber auch mit Cystein unter Bildung von Cysteinyl-Dopa reagieren, was zusammen mit 5,6-Indolchinon zu Phäomelanin polymerisiert [5]. Das Melanin in der Haut besteht normalerweise aus einem Gemisch beider Melanine, das Verhältnis ist genetisch definiert und bestimmt den Hauttyp [2]. Neben der Melaninsynthese wird durch UVB-Licht auch die Basalschicht der Epidermis zur vermehrten Zellteilung angeregt, woraus eine Verdickung der Epidermis, insbesondere der Hornschicht, resultiert (Lichtschwiele) [4]. Neben diesen präventiven Schutzmechanismen besitzt die Haut auch verschiedene Reparatursysteme, die in Abschnitt 1.2.3 näher beschrieben sind. Insbesondere bei intensiven Sonnenbädern reicht der Eigenschutz der Haut alleine oft nicht aus, es ist die Anwendung von topisch aufgetragenen Sonnenschutzmitteln nötig. Bei kommerziell erhältlichen Sonnenschutzmitteln unterscheidet man grundsätzlich zwischen chemischen und physikalischen UV-Schutzmitteln. Während chemische UV-Filter die energiereiche UV-Strahlung des Sonnenlichts absorbieren, schwächen physikalische UV-Schutzmittel die Strahlung durch Reflexion ab [6]. Alle in Deutschland zugelassenen UV-Filter in kosmetischen Mitteln sind in Anlage 7 der Kosmetik-Verordnung (zuletzt geändert am 21. Dezember 2012) aufgelistet. Je nach Absorptionsspektrum wird zwischen UVA-, UVB- und Breitbandfiltern unterschieden. Die Wirksamkeit der Sonnenschutzmittel wird mit Hilfe des

Lichtschutzfaktors (LSF) angegeben. Der Lichtschutzfaktor ist der Quotient der minimalen Erythemdosis (MED) geschützter Haut und ungeschützter Haut [6].

$$\text{LSF} = \frac{\text{MED (ungeschützte Haut)}}{\text{MED (geschützte Haut)}}$$

Abbildung 1.1: Definition Lichtschutzfaktor (LSF)

Die Ermittlung dieser Lichtschutzfaktoren unterliegt in Europa der COLIPA-Norm aus 2006 (Comité de Liaison des Associations Européennes de L'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmétiques et des Toilette). Die richtige Anwendung der Sonnenschutzmittel ist für den optimalen Schutz der Haut sehr wichtig. Trotz des Hinweises „Sonnenschutzmittel großzügig auftragen. Geringe Auftragsmengen reduzieren die Schutzleistung.“ (COLIPA Empfehlung Nr. 23, 2009) wird die Sonnencreme von Verbrauchern meist zu dünn aufgetragen und es wird daher der angegebene Lichtschutzfaktor nicht erreicht [7]. Grund dafür ist auch die bei der internationalen LSF-Testmethode verwendeten Auftragsmengen der Sonnenschutzmittel. Die Auftragsmenge der Testsubstanzen beträgt hierbei  $2,00 \text{ mg/cm}^2$ , das entspricht bei einer Körperoberfläche von etwa  $1,5 \text{ m}^2$  bei einmaliger Verwendung, einer Auftragsmenge von 30 g Sonnenschutzmittel.

Ein weiterer Punkt ist, dass topisch aufgetragene Sonnenschutzmittel von Verbrauchern meist nicht täglich verwendet werden, sondern oft nur bei willentlicher Exposition, z.B. im Urlaub. Die mittlere Jahresdosis an UV-Licht von Personen in Europa, die ihre Arbeit hauptsächlich Innen ausüben, beträgt  $10\,000$  bis  $20\,000 \text{ J/m}^2$  [8]. Während des Jahresurlaubs kann sich diese Dosis nochmal um  $7800 \text{ J/m}^2$  erhöhen [9]. Der Anteil der mittleren Jahresdosis, die durch die tägliche UV-Belastung hervorgerufen wird, ist somit erheblich.

Die Inzidenz maligner Hauttumore, hauptsächlich Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinom, ist mit 2 bis 3 Millionen neuen Fällen jedes Jahr sehr hoch. Melanome zählen zu den weniger häufigen Hauttumoren, sind jedoch für mehr als 70 % aller durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich [10, 11].

UV-Licht, insbesondere kurzwelligeres UVB-Licht ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs [12]. Es ist somit wichtig die Haut bestmöglich vor den schädigenden Eigenschaften von UV-Licht zu schützen. Neben den topisch aufgetragenen Sonnenschutzmitteln ist ein endogener Schutz durch photoprotektive Substanzen denkbar [13]. Unter endogenem Sonnenschutz versteht man Sonnenschutz, der durch Substanzen hervorgerufen wird, die mit der Nahrung aufgenommen werden, v.a. Antioxidantien wie  $\beta$ -Carotin. In den letzten Jahren wurde verstärkt nach endogenen Sonnenschutzmitteln gesucht. Humanstudien zeigen, dass bei einer Einnahme von 15 bis  $30 \text{ mg/Tag}$   $\beta$ -Carotin über mindestens 8 Wochen ein Schutzeffekt gegenüber der UV-induzierten Erythembildung (Erythema solarae) erzielt wird [13]. Für Carotinoid-Gemische konnten ähnliche Effekte erzielt werden [14]. Anhand einer Studie mit Tomatenmark konnte gezeigt werden, dass endogener Sonnenschutz durch Ernährung möglich ist, wenn genügend carotinoidreiche Nahrung aufgenommen wird [13, 15]. Ein endogener UV-Schutz kann jedoch nicht den Einsatz topischer

Lichtschutzmittel bei langer UV-Exposition ersetzen. Bei Kombination von endogenem und topischem Lichtschutz wurden aber synergistische Wirkungen nachgewiesen [13].

## 1.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut ist die äußere Barriere zur Umwelt und mit 1,5 bis 2 m<sup>2</sup> das größte Organ. Sie besteht aus drei Schichten: der Epidermis (Oberhaut), der darunterliegenden Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Fettgewebe).

Die äußerste Schicht ist die Epidermis, ein verhornendes Plattenepithel, welches zu etwa 90 % aus Keratinozyten besteht. Keratinozyten werden in der Basalzellschicht gebildet und erfahren dann kontinuierlich von der innersten bis zur äußersten Schicht einen Verhornungsprozess, wodurch die Hornschicht als schützende Barriere gebildet wird. Die Epidermis hat auch sekretorische Aufgaben, sie produziert beispielsweise eine Vielzahl von Mediatoren der Entzündungsreaktion, wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren [16].

Die Dermis bildet das unter der Epidermis liegende Bindegewebe. Der dominierende Zelltyp der Dermis sind die Fibroblasten. Die Dermis versorgt die Epidermis über die *Lamina densa* der Basalmembran mit Nährstoffen, da die Epidermis keine Gefäße besitzt [17]. Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen und dient somit in erster Linie zur Wärmeisolierung und Polsterung gegenüber mechanischen Einflüssen, aber auch als Wasser- und Nährstoffspeicher.

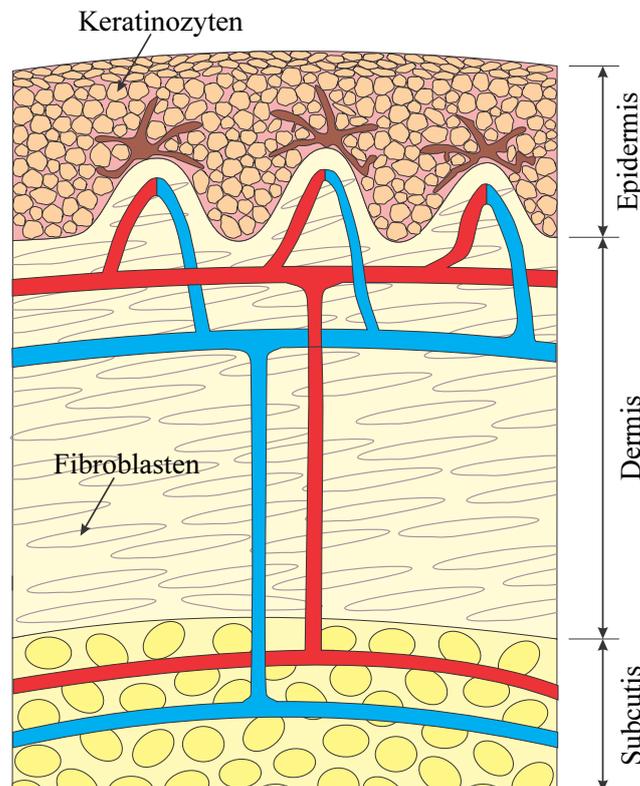


Abbildung 1.2: Aufbau der Haut

Als äußere Begrenzung des Körpers zur Umwelt, bietet die Haut somit einen Schutz gegen Austrocknung, Hitze- und Lichteinwirkung. Der größte Teil des auftreffenden Lichts wird von der Haut reflektiert. Der restliche Teil wird absorbiert und kann unterschiedliche physikalische, chemische und biochemische Reaktionen in der Haut hervorrufen.

## 1.2 UV-induzierte Zellschäden

UV-Licht ist ein wesentlicher Bestandteil des Sonnenspektrums. Das terrestrische Sonnenspektrum beginnt im UV-Bereich bei etwa 290 nm und geht weit in den IR-Bereich hinein. UVC-Licht (100 bis 280 nm) wird zwar von der Sonne emittiert, erreicht aber aufgrund der Ozonschicht die Erdoberfläche nicht.

Bei übermäßiger Exposition der Haut gegenüber UV-Licht kann es zu akuten sowie chronischen Schäden kommen. Ein akuter Schaden ausgelöst durch UV-Exposition ist der Sonnenbrand (*Erythema solare*), welcher hauptsächlich durch UVB-Licht verursacht wird. Chronische Schäden entstehen v.a. durch wiederholte UV-Einstrahlung und können zu vorzeitiger Hautalterung sowie zur Entstehung von Hautkrebs führen. Übermäßige und wiederholte UV-Bestrahlung erhöht das Risiko der Entstehung aller Hautkrebsarten [11, 18].

### 1.2.1 Direkte DNA-Schäden

Sowohl UVA- als auch UVB-Licht kann die DNA schädigen. Während UVB-Licht direkt durch Absorption mit der DNA, respektive der DNA-Basen interagieren kann, sind die UVA-induzierten Schäden meist Folge von Sekundärreaktionen. Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) zählen zu den UV-induzierten DNA-Modifikationen, sie entstehen durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidin-Basen in der DNA (siehe Abbildung 1.3). Nach den Auswahlregeln von Woodward und Hoffmann für Cycloadditionen ist eine suprafaciale [2+2]-Cycloaddition unter thermischen Bedingungen nicht symmetrieeerlaubt. Eine antarafaciale Überlappung ist zwar symmetrieeerlaubt, findet aber aus sterischen Gründen nur bei großen Ringen statt [19]. Unter photochemischen Bedingungen ist die suprafaciale [2+2]-Cycloaddition symmetrieeerlaubt, da sich bei einer photochemischen Reaktion nur einer der beiden Reaktionspartner im angeregten Zustand befindet [19].

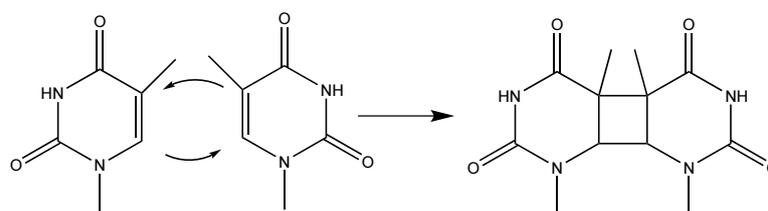


Abbildung 1.3: Bildung von Cyclobutanthymindimeren

Für Thymidindimere ist aufgrund der *cis/trans* Stereochemie des Cyclobutanrings und der *syn/anti* Regiochemie die Bildung verschiedener Isomere denkbar, wobei jedoch aufgrund sterischer Hinderung lediglich *syn*-Isomere in der DNA und Oligonucleotiden gebildet werden [20].

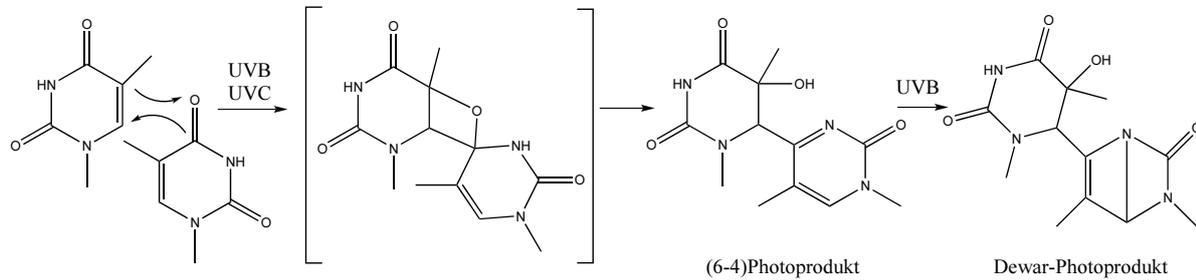


Abbildung 1.4: Bildung von 6-4 Photoprodukten und Dewar-Photoprodukten

Neben CPDs werden auch 6-4 Photoprodukte aus zwei benachbarten Pyrimidin-Basen gebildet, wobei die Cycloaddition im Falle von Thymindimeren aber über die C5-C6-Doppelbindung der Thyminbase des 5'-Endes und die C4-Carbonylgruppe der Thyminbase des 3'-Endes im DNA-Strang erfolgt (siehe Abbildung 1.4) [21, 20]. Unter UVB- und UVC-Bestrahlung stellen *cis-syn* Cyclobutanthymindimere in der UV-exponierten Haut das Hauptprodukt (ca. 40 %) dar, während das 6-4 Photoprodukt (6-4 TT) nur in geringen Mengen (< 5 %) entsteht [22, 23]. Cyclobutandimere von Thymin und Cytosin (TC-CPD (30 %), CT-CPD (10 %)) sind auch Hauptprodukte der Photoreaktionen [23]. Das Dewar-Photoprodukt wurde in menschlichen Zellen nach Bestrahlung mit physiologisch relevanten UVB-Dosen nicht nachgewiesen [22].

Neben Cyclobutanpyrimidindimeren entstehen auch geringe Mengen anderer Photoprodukte, wie hydratisierte Cytosin- und Uracil-Derivate, Thymin-Adenin-Dimere und Adenin-Dimere [20].

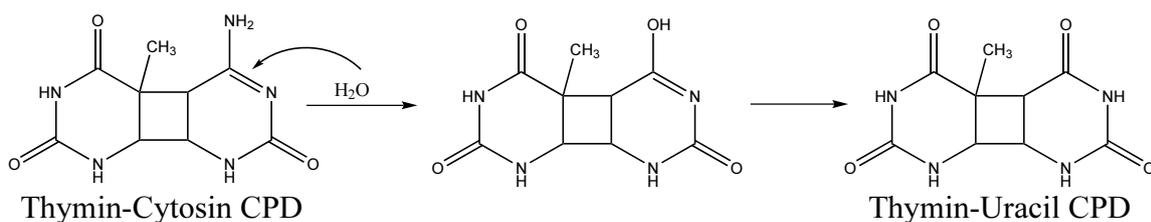


Abbildung 1.5: Bildung von Thymin-Uracil-Cyclobutandimeren durch Desaminierung der DNA-Base Cytosin in Thymin-Cytosin-Cyclobutandimeren

Die meisten UVB-induzierten Mutationen in menschlichen Zellen werden durch CPDs und nicht durch 6-4 Photoprodukte hervorgerufen. 6-4 Photoprodukte werden viel effizienter repariert und führen daher zu weniger Mutationen. Außerdem werden wie bereits beschrieben auch mengenmäßig mehr CPDs gebildet als 6-4 Photoprodukte. Innerhalb der CPDs stellen aber nicht die Cyclobutanthymindimere (TT-CPD), sondern Cytosin enthaltene CPDs die Läsionen mit dem höchsten Mutagenitätspotential dar. Cytosin kann durch Desaminierung in Uracil umgewandelt werden, was zu einer C-T Transition führt [20].

## 1.2.2 Indirekte DNA-Schäden

Eine Bestrahlung von Gewebe mit UVA-Licht führt hauptsächlich zu oxidativen Schäden an der DNA. Diese Schäden entstehen nicht direkt durch Interaktion von UVA-Licht mit der DNA, sondern vielmehr indirekt über Sensibilisatoren oder Sekundärreaktionen, welche die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren. ROS sind reaktive Verbindungen, die Sauerstoff enthalten (siehe Tabelle 1.6) [24].

Formel	Bezeichnung	Anmerkung
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff	angeregter Zustand
$\text{RO}\cdot$	Alkoxy-Radikal	
$\text{ROO}\cdot$	Peroxy-Radikal	
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxid-Anion	Radikal
$\text{HO}\cdot$	Hydroxyl-Radikal	
$\text{HOO}\cdot$	Hydroperoxid-Radikal	
$\text{ROOH}$	Hydroperoxid	nicht-radikalische Moleküle
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid	

Abbildung 1.6: Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)

Endogen werden in der mitochondrialen Elektronentransportkette (Atmungskette) sowie durch die Enzyme NAD(P)H Oxidase und Xanthin Oxidase, Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) chemisch durch Reduktion von Sauerstoff gebildet (siehe Abbildung 1.7) [25]. Superoxidanionen werden durch die Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Wasserstoffperoxid wird dann entweder durch Enzyme (Katalase (K), Glutathionperoxidase (GPX)) weiter zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt oder in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  oder anderen Übergangsmetallionen in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgewandelt. Hydroxylradikale sind sehr reaktiv und können sofort mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren [26].

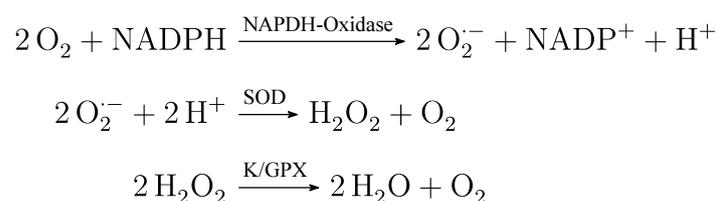


Abbildung 1.7: Endogene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Sauerstoff ist mit ca. 20 % neben Stickstoff ein Hauptbestandteil der Luft und daher nahezu allgegenwärtig. Für die Existenz von Leben unter aeroben Bedingungen ist es von zentraler Bedeutung, dass molekularer Sauerstoff relativ reaktionsträge, metastabil ist. Anders als die meisten organischen Verbindungen liegt molekularer Sauerstoff im Grundzustand als Triplett mit zwei ungepaarten Elektronen vor (siehe Abbildung 1.8). Chemische Reaktionen mit Molekülen im Singulett-Zustand sind daher ohne Aktivierung nicht möglich, weshalb molekularer Sauerstoff relativ reaktionsträge ist [27].

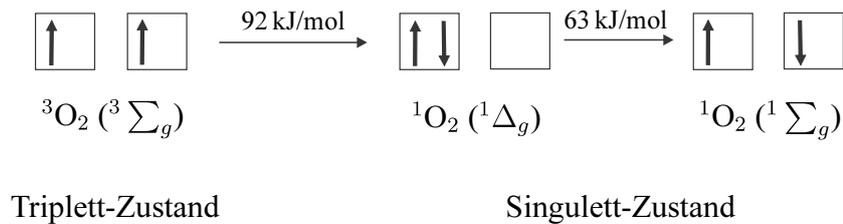


Abbildung 1.8: Besetzung des HOMO von Sauerstoff im Triplett- und Singulett-Zustand [27]

Im Gegensatz zu Triplett-Sauerstoff ist Singulett-Sauerstoff reaktionsfreudig und reagiert mit einer Reihe von biologisch wichtigen Molekülen (DNA, Proteine, Lipide) [28]. Singulett-Sauerstoff wird *in-vivo* hauptsächlich in photochemischen Reaktionen bei Anwesenheit eines geeigneten Sensibilisators erzeugt. Hierbei geht der Sensibilisator ( ${}^1\text{S}_0$ ) durch Absorption von Licht entsprechender Wellenlänge in einen angeregten Zustand ( ${}^1\text{S}_1$ ) (siehe Abbildung 1.9) über. Dieser angeregte Zustand kann durch „Intersystem Crossing“ (ISC) mit Spin-Umkehr in den Triplett-Zustand übergehen ( ${}^3\text{S}_1$ ).

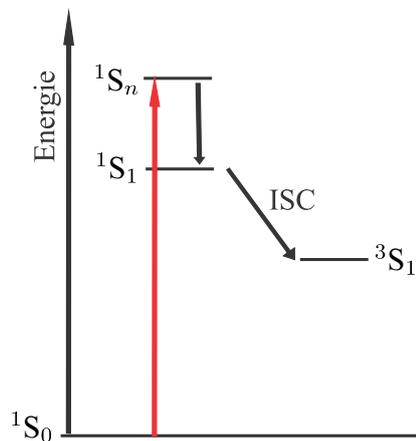


Abbildung 1.9: Photochemische Bildung von Singulett-Sauerstoff durch einen Sensibilisator  
Typ-II Reaktion (Energietransfer)

Der Sensibilisator im Triplett-Zustand ( ${}^3\text{S}_1$ ) kann seine Energie auf Sauerstoff im Triplett-Zustand ( ${}^3\text{O}_2$ ) übertragen und fällt selbst dabei wieder in den Grundzustand ( ${}^1\text{S}_0$ ) zurück (siehe Abbildung

1.9). Diese photochemische Reaktion (Energietransfer) gehört zu den Typ-II Reaktionen. Biologisch relevante Sensibilisatoren sind u.a. Porphyrine [29] und Flavine [30].

Superoxid-Anionen werden in Typ-1 Reaktionen (Elektronentransfer) gebildet. Ähnlich wie bei Typ-II Reaktionen wird zunächst ein Sensibilisator durch Lichtabsorption in einen angeregten Zustand ( $^1S_1$ ) und durch ISC in einen Triplettzustand ( $^3S_1$ ) überführt. Bei Typ-I Reaktionen kommt es zu einem Elektronentransfer von Sensibilisator im Triplettzustand zu Sauerstoff im Triplettzustand, wodurch Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) und Sensibilisator-Kationen ( $S^+$ ) entstehen (siehe Abbildung 1.10).

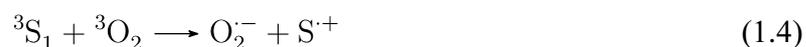


Abbildung 1.10: Photochemische Bildung von Superoxidationen durch einen Sensibilisator Typ-I Reaktionen (Elektronentransfer)

Superoxidationen werden wie bereits erwähnt zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgesetzt, der eventuell weiter in der Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen reagiert [26].

Zu den am häufigsten vorkommenden oxidativen DNA-Schäden gehören die Basenmodifikationen 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-Oxoguanin) und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) [31]. Die Oxidation von Guanin kann entweder über Hydroxylradikale (siehe Abbildung 1.11) oder eine Einelektronenoxidation (siehe Abbildung 1.12) erfolgen. Guanin besitzt von allen vier DNA-Basen mit 1,29 V das niedrigste Redoxpotential, weshalb Guanin häufig oxidativ geschädigt wird [32, 33].

Hydroxylradikale können mit der DNA-Base Guanin direkt reagieren. Hierbei wird zunächst ein C<sub>8</sub>-Hydroxylradikal **5** des Guanins gebildet, welches dann entweder unter Elektronenabgabe (Oxidation) zu 8-Oxoguanin **7** oder unter Elektronenaufnahme (Reduktion) und Ringöffnung zu FapyG **8** weiterreagiert (siehe Abbildung 1.11) [34, 35].

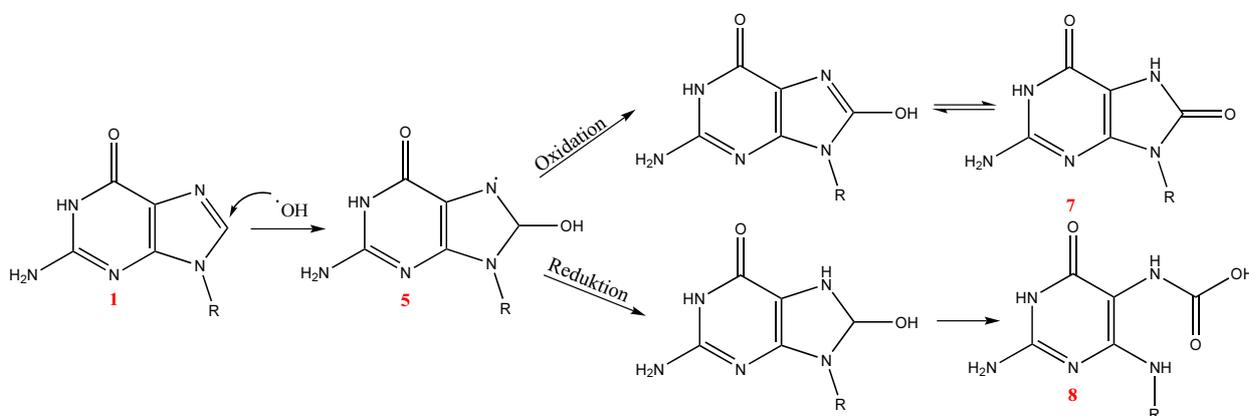


Abbildung 1.11: Chemische Reaktion der DNA-Base Guanin mit Hydroxylradikalen

Die Bildung von 8-Oxoguanin und FapyG kann nicht nur über Hydroxylradikale erfolgen, sondern auch über eine Einelektronenoxidation. Dabei entsteht zunächst aus der Purinbase Guanin **1** durch

Elektronenabgabe ein Radikalkation **2**, welches unter basischen Bedingungen über ein instabiles Zwischenprodukt **5** zu 8-Oxoguanosin **7** oder zu FapyG **8** weiterreagiert [34].

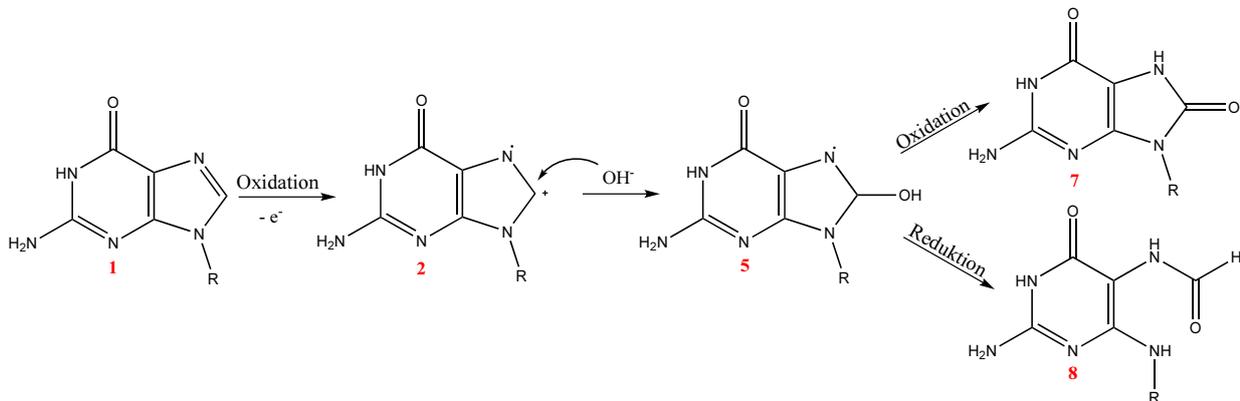


Abbildung 1.12: Einelektronenoxidation der DNA-Base Guanin

Normalerweise existieren unter aeroben Bedingungen verschiedene reaktive Sauerstoffspezies nebeneinander, weshalb es schwierig ist, das für den jeweiligen biologischen Effekt verantwortliche Agens zu bestimmen [25]. Die Basenmodifikation Guanin zu 8-Oxoguanin ist relativ häufig und findet unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus etwa 10.000 Mal pro Zelle und Tag statt [36, 37, 38].

Die DNA-Base Guanin bildet in der DNA mit der Base Cytosin ein Watson-Crick-Basenpaar unter Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen, während Thymin mit Adenin unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrückenbindungen paart. Die modifizierte DNA-Base, 8-Oxoguanin, paart nicht mehr ausschließlich mit Cytosin, sondern kann auch mit Adenin ein stabiles Basenpaar bilden [39]. Die Ausbildung dieses Basenpaars führt bei der Replikation der DNA zu einer Guanin-Thymin-Transversion [40, 41, 42, 43] (siehe Abbildung 1.13). Der Austausch einer Base muss nicht zwingendermaßen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen („Silent Mutation“), da meist mehrere Basentriplets für die gleiche Aminosäure codieren [44]. Codiert das neu entstandene Basentriplett aber für eine andere Aminosäure, wird die Primärstruktur des Proteins verändert („Missense-Mutation“). Eine veränderte Primärstruktur kann zu einer veränderten Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur und damit zum Funktionsverlust des betroffenen Proteins führen.

Für 8-Oxoguanin ist neben der Paarung mit Cytosin und Adenin auch eine Paarung mit Thymin oder Guanin möglich. Die Paarung mit Adenin stellt aber die häufigste der fehlerhaften Paarungen dar.

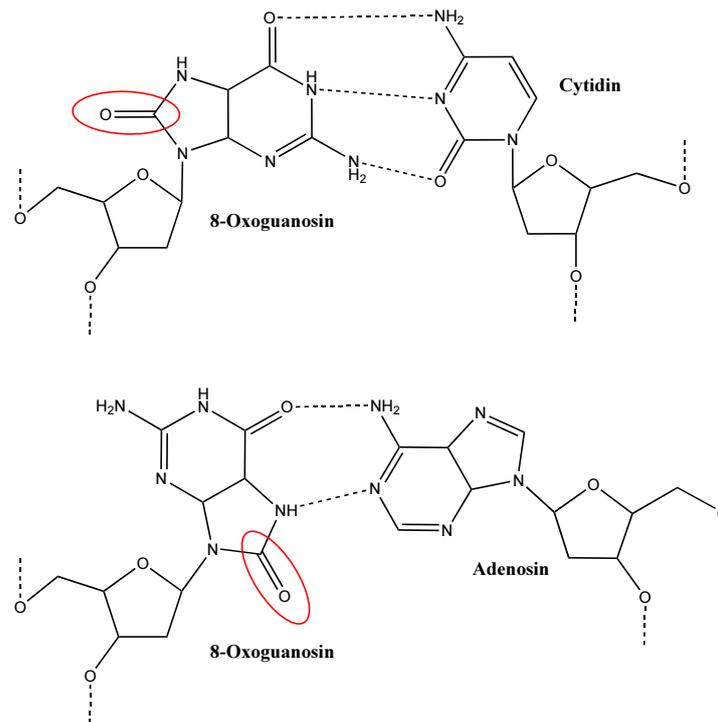


Abbildung 1.13: Watson-Crick Basenpaarung von 8-Oxoguanosin mit Cytidin und fehlerhafte Paarung mit Adenosin

### 1.2.3 Reparaturmechanismen der Zelle

Es entstehen ständig durch endogene und exogene Einflüsse Schäden an der DNA. Daher ist es wichtig, dass der menschliche Organismus über wirksame Reparaturmechanismen verfügt. Einer dieser Reparaturmechanismen ist die Basen-Exzisionsreparatur. Hierzu wird eine ganze Reihe von DNA-Glykosylasen benötigt, da jede einzelne nur einen bestimmten Typ einer veränderten Base erkennt [45]. Die spezifische DNA-Glykosylase schneidet die defekte Base aus und es entsteht eine purin- bzw. pyrimidin-freie Stelle (AP-site). Die AP-Endonuklease und Phosphodiesterase entfernen zusammen den Zuckerphosphatrest und anschließend fügt die DNA-Polymerase ein neues Nukleotid ein. Nachdem die DNA-Ligase das Zucker-Phosphat-Rückgrat geschlossen hat, ist der Fehler behoben [45].

Die humane 8-Oxoguanin-Glykosylase I (hOGG1) entfernt beispielsweise spezifisch 8-Oxoguanin und FapyG aus der DNA [36]. Die Basen werden anschließend über den Urin ausgeschieden. Die Konzentration im Urin kann daher als Biomarker für oxidative Schäden bestimmt werden, wobei die Messung mit HPLC-MS und HPLC-ECD die am häufigsten verwendeten Methoden für Urinproben sind [36]. Mit steigendem Alter nimmt auch die Gesamtbelastung an oxidativen Basenmodifikationen zu, wobei die Konzentration an Reparaturenzymen gleichzeitig abnimmt [46]. Es kommt somit immer leichter zu Punktmutationen, welche zu einer malignen Transformation führen können.

Der zweite wichtige Reparaturmechanismus des Organismus ist die Nukleotid-Exzisionsreparatur. Hiermit können DNA-Schäden, wie Cyclobutanpyrimidindimere oder DNA-Addukte repariert wer-

den, die durch ihre Größe die Tertiärstruktur der DNA stören und daher die Replikation und Transkription der DNA stoppen [47]. Solche Schäden werden durch einen Multienzymkomplex erkannt und beseitigt. Die fehlerhafte Stelle wird mit benachbarten Nukleotiden als einsträngiges Oligonukleotid entfernt und anschließend durch DNA-Polymerase und DNA-Ligase neu synthetisiert [45]. Die Exzisionsreparatur kann auch transkriptionsgekoppelt ablaufen. Wird ein Defekt bei der Transkription entdeckt, so stoppt die DNA-Polymerase und sorgt durch den Einsatz von Kopplungsproteinen für eine sofortige Beseitigung des DNA-Schadens über Exzisionsreparatur [45].

Im Falle einer starken Schädigung der DNA stoppen die replikativen DNA-Polymerasen und es kommen Reservepolymerasen zum Einsatz. Diese können trotz starker DNA-Schäden die DNA replizieren, haben aber den Nachteil, dass sie nicht die Korrekturlesefähigkeiten der replikativen DNA-Polymerasen besitzen und es daher leichter zu Fehlern kommt [45].

Die große Bedeutung dieser Reparaturmechanismen wird deutlich, wenn man Gendefekte, wie bei der autosomal rezessiven Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum betrachtet [48]. Bei Xeroderma pigmentosum ist die Exzisionsreparatur gestört, so dass das Risiko nach Sonnenbestrahlung an Hautkrebs zu erkranken im Vergleich zu gesunden Personen sehr hoch ist [49].

## 1.3 Carotinoide

Carotinoide sind natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe, die sich aus acht Isopren-Einheiten zusammensetzen. Charakteristisch für Carotinoide sind das  $C_{40}$ -Kohlenstoffgerüst, sowie das System konjugierter Doppelbindungen. Durch Modifizierung dieses Grundgerüsts können durch Cyclisierung der Endgruppen oder durch Einführen von Sauerstoffgruppen zahlreiche verschiedene Verbindungen entstehen, welche alle zur Klasse der Carotinoide gehören [50].

Fast alle Carotinoide bestehen aus dem gleichen Grundgerüst, welches in Abbildung 1.14 gezeigt ist. Dieses  $C_{40}$ -Grundgerüst entsteht während der Biosynthese jeweils aus zwei Geranylgeranylpyrophosphaten. In Abbildung 1.14 ist das Nummerierungsschema an einem azyklischen und einem bicyklischen Carotinoid dargestellt.

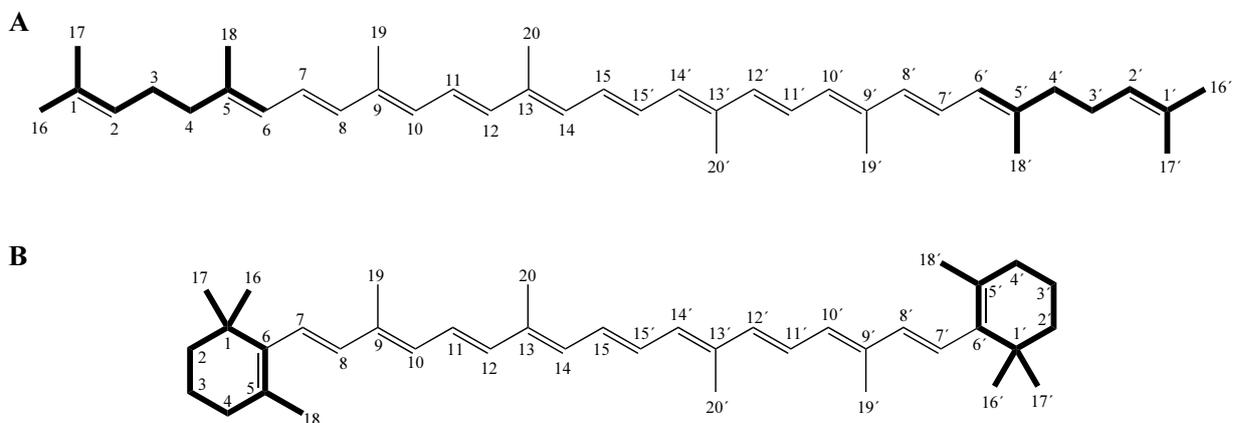


Abbildung 1.14: Basisstruktur und Nummerierungsschema: **A** eines azyklischen Carotinoids (Lycopin) und **B** eines dicyklischen Carotinoids ( $\beta, \beta$ -Carotin) [50]

Häufig wurden Carotinoide nach der biologischen Quelle, aus der sie zum ersten Mal isoliert wurden mit Trivialnamen benannt. Es gibt jedoch auch ein semi-systematisches Nomenklatur-Prinzip. Hierbei tragen alle Verbindungen den Stammnamen „Carotin“. Die sieben häufigsten Endgruppen, werden durch griechische Buchstaben beschrieben (siehe Abbildung 1.15).

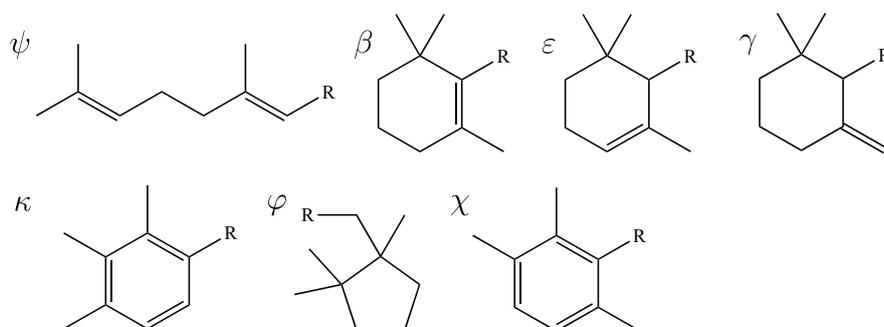


Abbildung 1.15: Nomenklatur der Endgruppen von Carotinoiden [50]

Bis heute sind mehr als 750 verschiedene Carotinoide charakterisiert. Ein Maximum im Absorptionsspektrum der meisten Carotinoide liegt im Wellenlängenbereich von 400-500nm, es sind gelb-

rote Farbstoffe. Je mehr konjugierte Doppelbindungen ein Carotinoid besitzt, desto stärker verlagert sich das Absorptionsmaximum in den energieärmeren (langwelligeren) Bereich des Lichts. Die Substanzklasse der Carotinoide lässt sich in zwei Unterklassen einteilen, die Carotine und die Xanthophylle. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffverbindungen, die Xanthophylle hingegen enthalten Sauerstoffatome in funktionellen Gruppen.

Carotinoide sind lipophile Substanzen, die ubiquitär in der Pflanzenwelt vorkommen. Sie dienen den Pflanzen nicht nur zur Pigmentierung von Blüten und Blättern, sondern sind auch für die Photosynthese von entscheidender Bedeutung. Zum einen schützen sie das Chlorophyll in den Pflanzen durch Desaktivierung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoffspezies vor Photooxidation und zum anderen erweitern sie das Absorptionsspektrum und erhöhen somit die Photosyntheseeffizienz. Da nur Bakterien, Pflanzen und Pilze Carotinoide *de-novo* synthetisieren können, sind Tiere und Menschen auf die Versorgung mit der Nahrung angewiesen. Im menschlichen Plasma lassen sich bis zu 40 verschiedene Carotinoide nachweisen, die wichtigsten sind  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und Lycopin als Vertreter der Carotine und Zeaxanthin, Lutein sowie  $\beta$ -Cryptoxanthin als Vertreter der Xanthophylle [51]. Das Carotinoidmuster der Haut ähnelt dem des Blutplasmas. Die absoluten Konzentrationen variieren jedoch stark je nach Hautareal [52].



Abbildung 1.16: Photochemische Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff durch Carotinoide

Carotinoide sind aufgrund ihrer konjugierten Polyenstruktur wirksame Antioxidantien. Sie gehören zu den effizientesten natürlich vorkommenden „Löschern“ von Singulett-Sauerstoff [53, 54]. Bei der Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff durch Carotinoide entstehen Carotinoide im angeregten Triplettzustand. Carotinoide im Triplettzustand können die Anregungsenergie in Form von Wärme wieder abgeben (siehe Abbildung 1.16) [55].

Carotinoide können nicht nur physikalisch unter Inaktivierung („Löschung“) mit Singulett-Sauerstoff, sondern auch chemisch unter Bildung von Endoperoxiden in einer [2+2]- oder [2+4]-Cycloaddition und in einer Hetero-En-Reaktion unter Bildung von Hydroperoxiden reagieren [27]. Die entstandenen Endoperoxide zerfallen in weiteren Reaktionen zu Apocarotinoiden, Aldehyden und Ketonen [56]. Anders als bei der photochemischen Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff, werden die Carotinoide bei der chemischen Inaktivierung abgebaut.

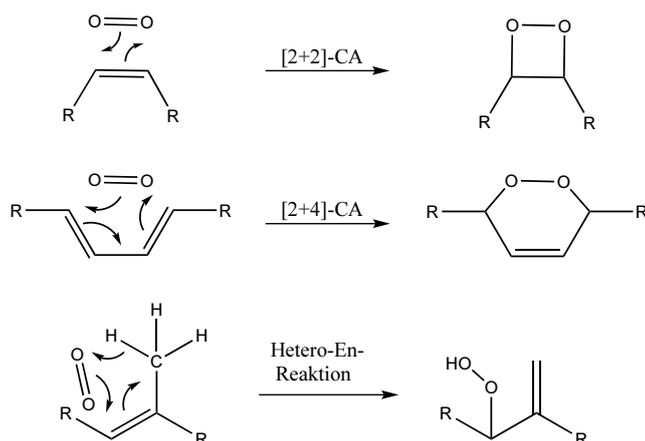


Abbildung 1.17: Chemische Reaktionen von Singulett-Sauerstoff mit der elektronenreichen Polyenkette der Carotinoide, CA = Cycloaddition, R = Rest

Neben der Fähigkeit mit Singulett-Sauerstoff zu reagieren, können Carotinoide auch Radikale abfangen (siehe Abbildung 1.18). Diese Eigenschaft der Carotinoide beruht auf der Fähigkeit Elektronen oder Wasserstoffatome abzugeben (Oxidierbarkeit) [57]. Wie auch bei der chemischen Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff, werden Carotinoide beim Abfangen von Radikalen abgebaut. Der oxidative Abbau der Carotinoide wird durch elektrophile Angriffe auf die elektronenreiche Polyenkette initiiert (siehe Abbildung 1.18). Für das Abfangen von Radikalen gibt es drei mögliche Mechanismen: die Addition des Radikals (1.7), die Abstraktion eines Wasserstoffatoms (1.8) und den Elektronentransfer (1.9). Dabei entstehen mesomeriestabilisierte Carotinoidradikale bzw. Carotinoidradikalkationen. Es wird postuliert, dass die Bildung stabiler Carotinoidradikale Radikalkettenreaktionen durch Kettenabbruch stoppen (1.10, 1.11) [58]. Von besonderer biologischer Bedeutung ist dabei die Unterbrechung der Lipidperoxidation.



Abbildung 1.18: Abfangreaktionen von Radikalen durch Carotinoide [58]

Car = Carotinoid, R = Rest

### 1.3.1 Lutein

Lutein gehört zu der Gruppe der Xanthophylle und ist mit  $\beta$ -Carotin und Lycopin zusammen das häufigste im Blutplasma vorkommende Carotinoid. In Lebensmitteln kommt es vor allem in dunklem Blattgemüse, wie Grünkohl und Spinat vor.

Ferner ist Lutein (E 161b) nach § 3(1) der Zusatzstoffzulassungsverordnung (zuletzt geändert am 21.05.2012) zum Färben von Lebensmitteln bzw. zum Erzielen von Farbeffekten in bestimmten Lebensmitteln, wie Senf, Soßen, Suppen und Spirituosen bis zu einer Höchstmenge von 500 mg/kg und in Konfitüren, Gelees und Marmeladen i.S.d. Konfitürenverordnung bis 100 mg/kg zugelassen. Zusammen mit Zeaxanthin kommt Lutein auch in der *Macula lutea*, dem gelben Fleck des menschlichen Auges vor. Beide Xanthophylle agieren in der *Macula lutea* als Filter für das energiereiche blaue Licht und schützen die Photorezeptorzellen als Antioxidantien vor photooxidativen Schäden. Studien zeigen, dass eine hohe Konzentration dieser Xanthophylle in der Retina das Risiko an altersbedingter Makuladegeneration zu erkranken, reduziert [59, 60]. Altersbedingte Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für die Erblindung von Personen im Alter über 65 Jahre in der westlichen Welt [60].

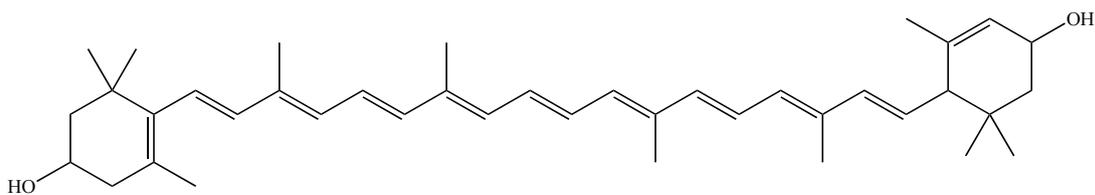


Abbildung 1.19: Struktur von 3,3'-Dihydroxy- $\beta$ ,  $\epsilon$ -carotin (Lutein)

### 1.3.2 DHIR und IR

3,3'-Dihydroxyisorenieratin und Isorenieratin sind natürlich vorkommende aromatische Carotinoide. Sie besitzen ebenso wie alle Carotinoide ein  $C_{40}$ -Grundgerüst, haben allerdings als Besonderheit zwei aromatische Endgruppen.

Aromatische Carotinoide wurden erstmals 1957 beschrieben. Das damals entdeckte Carotinoid wurde nach dem Meeresschwamm *Reniera japonica*, aus dem es erstmals isoliert wurde, mit Renieratin benannt [61]. Später stellte sich jedoch heraus, dass dieses Carotinoid nicht aus dem Schwamm, sondern aus Bakterien stammte, die mit dem Meeresschwamm in Symbiose leben [62]. 1969 wurden weitere aromatische Carotinoide, Isorenieratin, 3-Hydroxyisorenieratin und 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (siehe Abbildung 1.20), in *Streptomyces mediolani* nachgewiesen und isoliert [63]. Das aromatische Carotinoid 3,3'-Dihydroxyisorenieratin konnte 1983 auch als Hauptkomponente neben Isorenieratin und 3-Hydroxyisorenieratin in dem Bakterium *Brevibacterium linens* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1.20) [64]. Dieses Bakterium wird u.a. in der Käseherstellung verwendet und verleiht Tilsiter, Romadour, Limburger und Münster seine charakteristische

gelb-orangefarbene Färbung und durch die Biosynthese von Methanthiol sein charakteristisches Aroma [65].

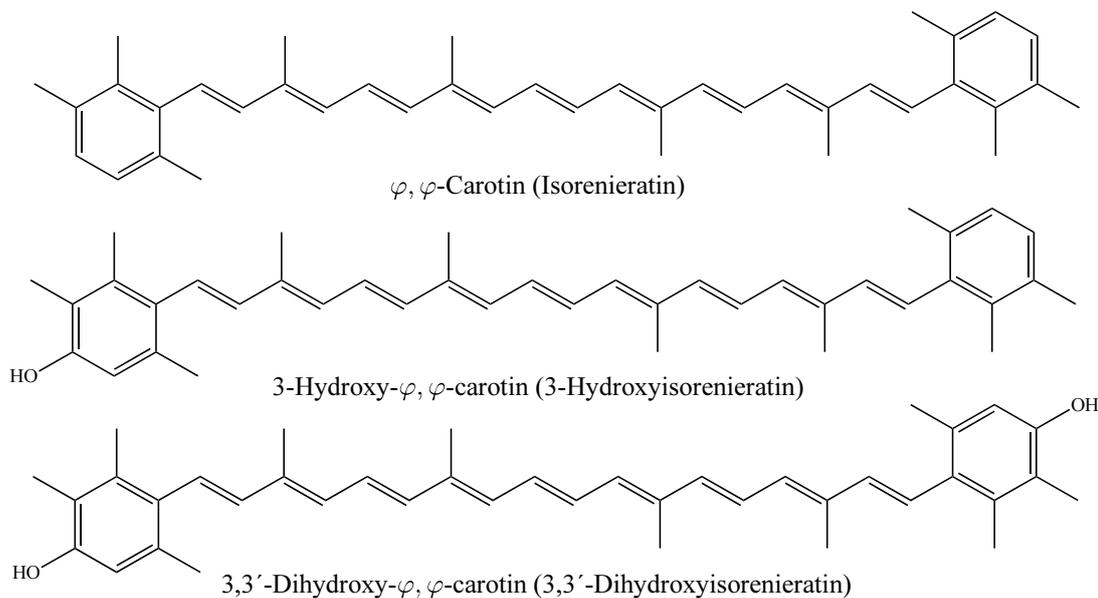


Abbildung 1.20: Strukturformeln der aromatischen Carotinoide isoliert aus *Streptomyces mediolani*

Das aromatische Carotinoid DHIR ist oxidationsempfindlich. Schon unter Einwirkung von Luft-sauerstoff bildet sich 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\varphi, \varphi$ -carotin-3,3'-dion, das entsprechende Chinon. Hierbei ändert sich durch die Erweiterung des konjugierten  $\Pi$ -Elektronensystems die Farbe von orange zu blau [62].

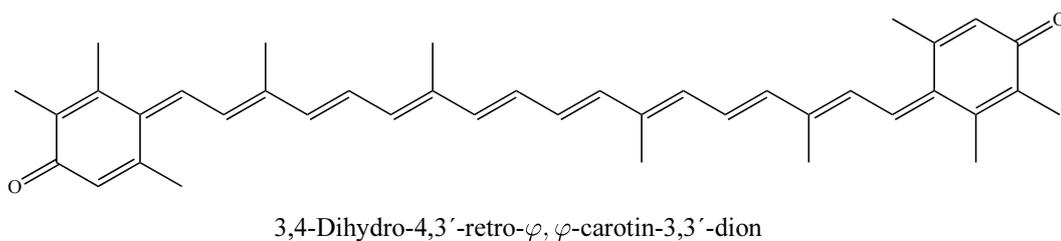


Abbildung 1.21: Strukturformel von 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\varphi, \varphi$ -carotin-3,3'-dion

## 1.4 Entzündung

Unter Entzündung versteht man die Reaktion des Organismus auf einen inneren oder äußeren, schädigenden Reiz (z.B. UV-Licht). Eine klassische Entzündungsreaktion äußert sich mit fünf Kardinalsymptomen: Tumor (Schwellung), Rubor (Rötung), Calor (Überwärmung), Dolor (Schmerz) und Functio laesa (eingeschränkte Funktion) [66].

Das UV-Erythem (*Erythema solare*) erfüllt alle fünf Entzündungszeichen. Die Ausbildung des UV-Erythems (Sonnenbrand) ist daher eine klassische Entzündungsreaktion. Durch UV-Licht entstehen Zellschäden, wobei verschiedene Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, welche wiederum zur Entstehung einer lokalen Entzündung führen. Keratinozyten setzen nach Verletzung Zytokine aus intrazellulären Speichern frei [67]. Zu den sogenannten primären Zytokinen zählen IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [67]. Die Freisetzung der primären Zytokine führt zu einer Ausschüttung weiterer Zytokine und der Stimulation von Fibroblasten, welche sekundäre Zytokine (wie IL-6) sezernieren. Die Hauptaufgabe der Fibroblasten in der Entzündungsreaktion ist die Verstärkung, der durch die Keratinozyten ausgelösten Entzündungskaskade [67]. Die resultierende lokale Entzündung schafft Voraussetzungen für die Reparatur der entstandenen Schäden. Im Grunde ist daher die Entzündung eine positive Reaktion zum Erhalt der Gesundheit des Gesamtorganismus. Entzündungen verursachen auch ungerichtet wirkende Abwehrmechanismen, welche zu Gewebeschäden führen [66]. Diese Gewebeschäden treten häufig bei chronischen Entzündungen auf. Es ist daher von zentraler Bedeutung, dass die Entzündungsreaktion nach Beseitigung der auslösenden Noxe wieder abklingt und sich keine chronische Entzündung manifestiert.

UVB-Strahlung im Dosisbereich der minimalen Erythemdosis (10 bis 30 mJ/cm<sup>2</sup>) kann eine Immundefizienz bewirken [67, 68]. Da Immunreaktionen bei der Beseitigung präkanzerogener Zellen eine zentrale Rolle spielen, geht man von einer Verbindung zwischen der UVB-induzierten Immundefizienz und der Karzinogenese von Hauttumoren aus [67]. Erste Hinweise auf eine immunsuppressive Wirkung von UVB lieferten Kripke et al. [69, 70].

### 1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Nf $\kappa$ B

Ein wichtiger Signalweg in der Entzündungsreaktion ist der Nf $\kappa$ B Signalweg, mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf $\kappa$ B [71].

Die Rel/Nf $\kappa$ B Transkriptionsfaktorfamilie besteht aus fünf Mitgliedern, welche in zwei Klassen eingeteilt werden können. Sie regulieren Gene, die vor allem in Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Die Rel-Proteine (RelA, RelB und c-Rel) besitzen am N-Terminus eine Domäne zur Dimerisierung und DNA-Bindung sowie am C-Terminus eine Transkriptions-Domäne [71]. Die beiden anderen Mitglieder Nf $\kappa$ B1 und Nf $\kappa$ B2 besitzen ebenfalls am N-Terminus eine Domäne zur Dimerisierung und DNA-Bindung. Die fünf Mitglieder der Rel/Nf $\kappa$ B-Familie kommen als hetero- oder homodimere Transkriptionsfaktoren vor, wobei das Heterodimer RelA/Nf $\kappa$ B1 das am häufigsten

vorkommende Protein ist [71]. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt dieses Heterodimer als inaktiver Komplex im Cytosol vor, es wird im Folgenden  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  genannt. In inaktiver Form ist es im Cytosol an Proteine der  $\text{I}\kappa\text{B}$  Familie gebunden.

$\text{Nf}\kappa\text{B}$  kann durch verschiedene Stimuli wie Lipopolysaccharide, UV-Licht und Zytokine (IL-1,  $\text{TNF-}\alpha$ ) induziert werden [71]. Hierbei werden  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinasen (IKK) aktiviert, die den Inhibitor-Teil der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine phosphorylieren. Die Phosphorylierung der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine führt zu einer Polyubiquitinierung der Lysine 21 und 22 und zum Abbau des Inhibitors im Proteasom [72].  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  wird freigesetzt und kann nun in den Zellkern wandern (Translokation), bindet an die DNA und beeinflusst so die Genexpression zahlreicher Zielgene.

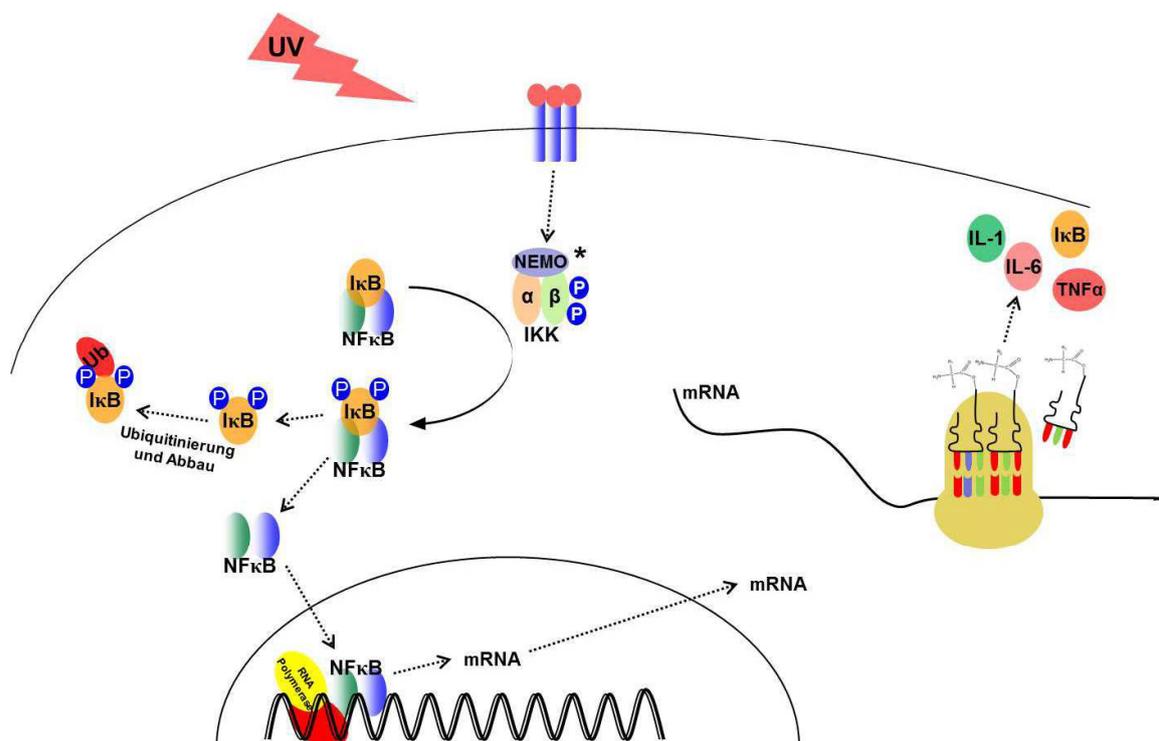


Abbildung 1.22:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Signalweg

## 1.4.2 Zytokine

Zytokine sind meist kleine Proteine (Botenstoffe) mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 40 kD [73], die das Zusammenspiel von Zellen regeln. Sie werden nach ihrer biologischen Aktivität in verschiedene Klassen eingeteilt. Im Wesentlichen sind Zytokine für die Reaktion des Organismus auf Verletzungen, Infektionen und Krankheiten verantwortlich [74]. In der Regel sind Zytokinrezeptoren hoch sensitiv, so dass sehr geringe Mengen an Zytokinen zur Signalübermittlung ausreichen. Sie werden anders als Hormone in der Regel nicht gespeichert, sondern im Bedarfsfall gebildet. Zytokine wirken meist parakrin (auf benachbarte) oder autokrin (auf die ausschüttende Zelle selbst), da die Konzentrationen normalerweise nicht für eine endokrine Reaktion ausreicht [16]. Eine Dysregulation von Zytokinen kann zur Entstehung bzw. zum Ausbruch einer Krankheit

beitragen [75].

Zytokine werden oft in pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine eingeteilt. Pro-inflammatorische Zytokine begünstigen und fördern die Entzündungsreaktion (z.B. IL-6), während anti-inflammatorische Zytokine die Expression pro-inflammatorischer Zytokine unterdrücken (z.B. IL-10, IL-4).

Interleukin-6 (IL-6) ist ein klassisches pro-inflammatorisches Zytokin, wichtig für die angeborene und adaptive Immunabwehr. Es wurde erstmals in dem Zellüberstand von Mitogen-aktivierten peripheren Monozyten nachgewiesen und induziert die Produktion von Immunglobulinen in den B-Zellen. Aus diesem Grund wurde IL-6 zunächst „B cell differentiation factor“ (BCDF) genannt [76, 77]. Außerdem spielt IL-6 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Akut-Phase Proteine, der Cortisol-Freisetzung und bei der Induktion von Fieber [78]. Unter den Akut-Phase Proteinen werden mehr als 40 Plasmaproteine zusammengefasst, deren Konzentrationen nach einem starken inflammatorischen Stimulus um mindestens 25 % ansteigen [78, 79]. Eine Dysregulierung von IL-6 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen [75]. Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist wichtig für das Fortschreiten und den Ausgang der Entzündung. Beispielsweise entwickeln IL-10 Knockout-Mäuse chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis Ulcerosa, Morbus Chron) [74]. IL-10 ist demnach ein wichtiges Zytokin, um eine übersteigerte Entzündungsreaktion und damit durch chronische Entzündungen entstehende Zellschäden zu verhindern. IL-10 gehört wie bereits erwähnt zu den anti-inflammatorischen Zytokinen, es unterdrückt die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine durch die Unterdrückung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  [80]. IL-4 gehört ebenfalls zu den anti-inflammatorischen Zytokinen. Im Gegensatz zu IL-10 wirkt IL-4 anti-inflammatorisch durch Destabilisierung der mRNA proinflammatorischer Zytokine [80].

Interleukin-12 oder auch „Natural Killer Cell Stimulatory Factor“ ist ein immunmodulatorisches Zytokin, welches die Stimulierung der zytotoxischen Aktivität, die Zellproliferation und das Wachstum sowie die Funktion von T-Helferzellen reguliert [81]. UVB-Bestrahlung ruft in Keratinozyten verschiedene DNA-Schäden (z.B. CPDs) hervor. Je nach Schweregrad des DNA-Schadens kann die Zelle entweder Apoptose oder DNA-Reparatur-Mechanismen einleiten. Ist die Zelle irreparabel geschädigt, so wird sie in eine sogenannte „sunburn cell“ überführt. Die Entstehung von „sunburn cells“ ist ein erstes morphologisches Anzeichen für epidermale Apoptose [82]. IL-12 verstärkt die Nukleotidexzisionsreparatur, sorgt für die Reparatur der entstandenen Schäden und unterdrückt die UV-induzierte Apoptose [83].

## 1.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund vorheriger Untersuchungen und Überlegungen zu Struktur und Wirkung wird vermutet, dass das Carotinoid DHIR photoprotektive Eigenschaften hat und neben Lipiden und Proteinen auch die DNA vor UV-induzierten Schädigungen schützt. Idealerweise soll eine photoprotektive Substanz Photoschäden verhindern, aber keinen Einfluss auf Sekundärreaktionen (Entzündung) nehmen, die infolge von Läsionen entstehen, die primär nicht verhindert werden konnten.

Ziel dieser Arbeit ist es an Modellsystemen und in Zellkultur zu untersuchen, ob DHIR und entsprechende Vergleichssubstanzen (IR, Lutein) diese Anforderungen erfüllen.

An humanen dermalen Fibroblasten soll dazu die Aufnahme und Toxizität der Verbindungen allein und unter Bestrahlung beurteilt werden. Mit Hilfe verschiedener Varianten des Comet Assays soll untersucht werden, welche UV-induzierten DNA-Schäden entstehen und welche durch die verwendeten Verbindungen ggf. verhindert werden. Die Untersuchung soll insbesondere die Bildung von DNA-Strangbrüchen und oxidierten DNA-Basen einbeziehen. Im Modellsystem (Oligonucleotide) und an Zellen wird die UVB-abhängige Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren mit verschiedenen Methoden (HPLC, immunologische Methoden) untersucht und der Einfluss der Carotinoide darauf bewertet. Die Untersuchungen zu eventuell modulatorischen Wirkungen der Verbindungen auf Entzündungsreaktionen erfolgen an HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) mit Fokus auf dem  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Signalweg. Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern, sowie die Expression der Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12 sollen mit molekularbiologischen Methoden erfolgen. Dabei werden die Effekte der Verbindungen allein und in Kombination mit UV-Bestrahlung bewertet.

Die so erhobenen Daten sollen das Grundlagenwissen für die Entwicklung von aromatischen Carotinoiden als Komponenten des endogenen Sonnenschutzes erweitern.

## 2 Materialien und Geräte

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage TE124S	Sartorius, Göttingen, D
Begasungsbrutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Blotter „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Blotter „EBU-4000“	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA
Blotter „Semi-Dry Blotter V10-SDB“	Sci-Plas Ltd., Cambridge, UK
Camera Controller C4742-95	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
Digital Camera C4742-95	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
Elektrophoresekammer „X Cell Sure Lock <sup>TM</sup> “	Invitrogen, Karlsruhe, D
Filmkassette BAS 2040	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, D
Heizblock	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
HPLC Pumpe LaChrom L-7100	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
HPLC DAAD LaChrom L-7450	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
HPLC UV/Vis Detektor L-4250	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
HPLC Interface D-7000	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
HPLC Autosampler LaChrom Elite L-2200	Merck-Hitachi, Darmstadt, D
Inversmikroskop ID 03	Carl Zeiss, Jena, D
Inversmikroskop DM IL LED	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, D
Magnetrührer mit Heizplatte RET	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
Mikroplattenspektrophotometer „Power-Wave X Select“	Biotek Instruments Inc, Bad Friedrichshall, D
Mikroskop Axiovert 100TV	Carl Zeiss, Jena, D
Mikrozentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, D

Gerät	Hersteller
Milli-Q-Anlage	Millipore, Eschborn, D
„M.S.E. Ultrasonic Disintegrator, 100W Modell“	Colora Messtechnik GmbH, Lorch, D
pH-Meter pH211	HANNA® Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, D
Pipetten (Einkanal- und Mehrkanalpipetten)	Eppendorf, Hamburg, D
Power Supply E835, EV265	Consort bvba, Turnhout, B
Power Supply Power Pack HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Schüttler „Minishaker MS1“	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
Schüttler „Vibrax VXR basic“	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D
Schüttler „Vortex Genie 2“	Bender und Hobein Ag, Zürich, CH
Sterilbank Gelaire BSB 4A	Flow Laboratories, Michigan City, USA
Trockenschrank UT	Heraeus Instruments, Düsseldorf, D
UV-Bestrahlungsanlage BioSun	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, D
UV/Vis Spektralphotometer DU®730	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
UV/Vis Spektralphotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
UV/Vis Spektrometer EPP 2000C	StellarNet inc., Tampa, FL, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Zellzählgerät „Countess™ automated cell counter“	Invitrogen, Karlsruhe, D

Tabelle 2.1: Geräte

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläschen Ø25 mm, Ø8 mm (Zellkultur)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Einweg-Zellzählkammern „Countess™“	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gel-Blotting-Paper	Roth, Karlsruhe, D
Gelkämme 1,0 mm	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gelkassetten 1,5 mm (Elektrophorese)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Küvetten, REF 67742, 10 × 4 × 4, 5mm,	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polystyrol/Polystyrene	
Küvetten 5 mm aus Quarzglas, Suprasil®	Hellma, Müllheim, D
Nitrocellulose-Membran (Hybond™-C Extra)	GE Healthcare, München, D
Objektträger Super-Frost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Positivgeladene Nylonmembran (Hybond-N <sup>+</sup> )	GE Healthcare, München, D
Reaktionsgefäß (steril) 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß (steril) 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Röntgenfilm „Chemiluminescence BioMax Light Film“	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Röntgenfilm „Amersham Hyperfilm™ ECL“	GE Healthcare, Solingen, D
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> , 550 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten (6 Well, 24 Well, 96 Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen, Ø3 cm, Ø6 cm, Ø10 cm	Greiner, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen (steril) 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen (steril) 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zentrifugenseparationsfilter „Amicon® Ultra-15“	Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, IRL

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

## 2.3 Chemikalien

Die Carotinoide 3,3'-Dihydroxyisorenieratin (DHIR), Isorenieratin (IR) und Lutein wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Bernd Schäfer (BASF, Ludwigshafen, D) zur Verfügung gestellt.

Die Gase Stickstoff (Reinheit 5,0) und Kohlendioxid wurden von Linde (Höllriegelskreuth, D) bezogen.

Für verschiedene Untersuchungen in Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden fertige Analysensets bezogen. Sie sind in Tabelle 2.4 dargestellt und werden im Folgenden als „Kits“ bezeichnet.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	VWR, Langenfeld, D
Albumin (BSA) Fraktion V $\geq 98\%$	Roth, Karlsruhe, D
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Fluka, Seelze, D
Butylhydroxytoluol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Chemilumineszenz-Kit SuperSignal <sup>®</sup> West	Pierce, Bonn, D
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO-d <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, D
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, vergällt	Merck, Darmstadt, D
Fixiererkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach, D
Glycin Pufferan <sup>®</sup> $\geq 99\%$ p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt, D
Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe, D
Methanol, HPLC gradient grade	VWR, Langenfeld, D
Midori Green DNA Farbstoff	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, D
Milchpulver, fettfrei, blotting grade	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg, D
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Prestained Protein Ladder (10 bis 170 kDa)	Thermo Scientific, Bonn, D
ProLong <sup>®</sup> gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe, D

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Merck, Darmstadt, D
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Bonn, D
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe, D
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure, 25 %	Merck, Darmstadt, D
Sulforhodamine B (SRB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Rochford, IL, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rochford, IL, USA
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tetrahydrofuran, Stabilisator-frei	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt, D
TRIS Pufferan®	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween-20	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt, D
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt, D

Tabelle 2.3: Chemikalien

<b>Analysen-Set</b>	<b>Hersteller</b>
DNA Fragmentation Imaging Kit	Roche, Mannheim, D
hOGG1 FLARE™ Assay Kit	Qiagen, Hilden, D
DNA-Extraktions-Kit QiAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, Bonn, D
ELISA-Kit Human IL-12 p40/p70	Invitrogen, Karlsruhe, D
ELISA-Kit Human IL-10 Ultrasensitive	Invitrogen, Karlsruhe, D
RC DC Protein Assay (Lowry)	BioRad, München, D

Tabelle 2.4: Analysen-Set

## 2.4 Puffer und Gebrauchslösungen

---

<b>Comet Assay Puffer</b>	
<b>Lysepuffer</b>	
Natriumchlorid	2,5 M
EDTA	100 mM
TRIS	10 mM
Natriumhydroxid	300 mM
<i>Vor Gebrauch zu 135 ml Puffer hinzufügen:</i>	<i>1,5 ml Triton X-100 und 15 ml DMSO</i>

---

<b>Neutralisationspuffer</b>	
TRIS	0,4 mM
Konzentrierte Salzsäure	≈30 ml
<i>Mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen.</i>	

---

<b>Elektrophoresepuffer</b>	
Natriumhydroxid	10 N
EDTA	200 mM
<i>pH-Wert kontrollieren (pH ≥ 13).</i>	

---

Tabelle 2.5: Puffer für den Comet Assay

---

<b>Blockierlösung</b>	
Ziegennormalserum	3,0 %
Triton X-100	0,3 %
in PBS	

---

Tabelle 2.6: Blockierlösung für immunzytochemische Färbungen

---

**Western Blot Puffer**


---

**Blaupuffer (5x, pH 6,8)**

SDS	10 %
TRIS	0,25 M
Saccharose	30 %
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
DTT	eine Spatelspitze

---

**Laufpuffer**

TRIS	50 mM
Glycin	384 mM
SDS	3,47 mM

---

**Anodenpuffer I (pH 10,4)**

TRIS	30 mM
Methanol	10 %

---

**Anodenpuffer II (pH 9,4)**

TRIS	300 mM
Methanol	10 %

---

**Kathodenpuffer**

TRIS	30 mM
Glycin	40 mM
Methanol	10 %

---

**TBST (10X)**

TRIS	500 mM
NaCl	1,5 M

*Mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen*

Tween 20	20 ml
----------	-------

*Auf 1000 ml mit bidest. Wasser auffüllen.*

---

Tabelle 2.7: Western Blot Puffer

<b>Lysepuffer (pH 7,4)</b>	
TRIS	20 mM
NaCl	139 mM
NaF	10 mM
Na-Pyrophosphat·10 H <sub>2</sub> O	9,9 mM
Triton X-100	1 %
EDTA pH 8	4 mM
EGTA pH 8	4 mM
Na-Vanadat	1,6 mM
$\beta$ -Glycerolphosphat	

Tabelle 2.8: Lysepuffer (pH 7,4)

## 2.5 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor <sup>®</sup> 546 Goat Anti-Rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe, D
Anti-GAPDH, polyclonal, mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Anti-Thymindimer, monoclonal, mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Goat Anti-Mouse HRP-conjugated	Abcam plc, Cambridge, UK
Goat Anti-Rabbit HRP-conjugated	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti- $\beta$ -Actin	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Lamin B Rezeptor	Epitomics, Inc., Burlingame, USA
Anti-Nf $\kappa$ B	BD Biosciences, Heidelberg, D
Anti-Interleukin-6	Epitomics, Inc., Burlingame, USA

Tabelle 2.9: Antikörper

## 2.6 Zellkultur

Die humanen dermalen Fibroblasten (hdF) stammen von ATCC<sup>®</sup>, USA (CCD-1064 Sk). Sie wurden aus dem Präputium eines gesunden, eurasischen Neugeborenen gewonnen. Für die Experimente wurden Zellen in den Passagen 5-20 verwendet.

Die HaCaT-Zellen wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg bezogen. Es handelt sich um eine spontan transformierte, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie.

<b>Medium</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tabelle 2.10: Zellkulturmedien

## 2.7 Software

<b>Software</b>	
AquaCosmos 1.2	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, D
ACD/Chem Sketch 12.0	ACD Labs, Frankfurt, D
Corel Draw® X6	Corel™
ImageJ 1.36b	NIH, Bethesda, MD, <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/">rsbweb.nih.gov/ij/</a>
KC4 3.1	BioTek Instruments, Vermont, USA
HPLC System Manager, D-7000 (HSM)	Merck Hitachi, Darmstadt, D
ChemDraw Ultra 12.0	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Jügesheim, D
MestReNova LITE v5.2.5-5780	MestreLab Research S.L., Santiago de Compostela, ES
CometScore™ Freeware v1.5	Tritek Corp., Sumerduck, VA, USA

Tabelle 2.11: Software



## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Für das Arbeiten mit Zellkulturen werden sämtliche Materialien und Lösungen vor Gebrauch autoklaviert oder bereits steril vom Hersteller bezogen. Zusätzlich wird grundsätzlich unter einer Sterilbank gearbeitet.

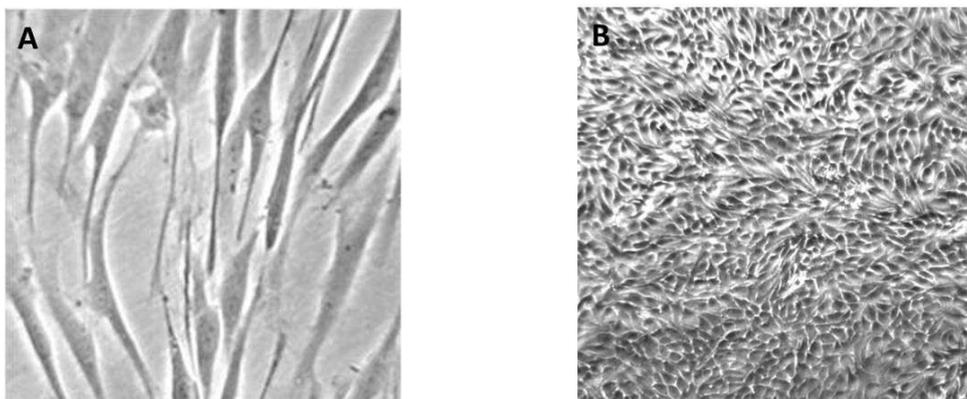


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zellen: **A** humane dermale Fibroblasten (Vergrößerung 1:1000) **B** HaCaT-Zellen (Vergrößerung 1:630)

#### 3.1.1 Kultivieren von Fibroblasten

Bei den verwendeten humanen dermalen Fibroblasten (hdF) handelt es sich um eine Zelllinie, die als Monolayerkultur wächst. Die Zellen werden zur Kultivierung mit Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FBS), sowie mit jeweils 2 mM Glutamax und Penicillin/Streptomycin (Mischung aus 2 mM Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) angereichert wird, behandelt.

Das Medium wird zweimal pro Woche gewechselt, da Mediumkomponenten von den Zellen verstoffwechselt werden oder bei den Kultivierungsbedingungen von 37 °C und 5 % Kohlendioxid zerfallen [84]. Das Zellwachstum wird täglich mit einem Inversmikroskop kontrolliert.

Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % werden die Zellen passagiert. Dazu werden die adhären-

Zellen mit PBS gewaschen, da auch nur geringe Mengen an serumhaltigem Medium die Wirkung von Trypsin beeinträchtigen können und sich die Einwirkzeit der Trypsinmischung wesentlich verlängern kann. Anschließend werden die Zellen durch ca. 5-minütiges Inkubieren mit einer Trypsin/EDTA-PBS-Mischung (1:1) von der Flaschenwand abgelöst. Erheblich längere Einwirkzeiten können die Zellen irreversibel schädigen, der Fortschritt des Ablösens wird daher mit dem Inversmikroskop beobachtet. Durch Zugabe von Komplettmedium (DMEM mit 10 % FBS, Glutamax und Penicillin/Streptomycin) wird die Trypsinierung gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wird zum Passagieren in einem Teilungsverhältnis von 1:5 mit Medium verdünnt und auf mehrere Flaschen verteilt, oder mit Medium verdünnt (1:10 bis 1:14) in entsprechende Kulturschalen überführt.

### 3.1.2 Kultivieren von HaCaT-Zellen

Bei den verwendeten HaCaT-Zellen handelt es sich um eine spontan transformierte, nicht tumorigene Zelllinie humaner Epithelzellen [85]. Die HaCaT-Zellen wurden aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms eines kaukasischen, 62-jährigen Mannes isoliert. Zur Kultivierung werden die Zellen mit RPMI-1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute), welches mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS), sowie mit jeweils 2 mM Glutamax und Penicillin/Streptomycin (Mischung aus 2 mM Penicillin und 100 U/ml Streptomycin) angereichert wird, behandelt. Das Medium wird zweimal pro Woche gewechselt und das Zellwachstum täglich mittels Inversmikroskop beobachtet. Die Passagierung erfolgt bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Hierzu werden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-PBS-Mischung (3:1) für ca. 10 min, bis sich die Zellen von der Flaschenwand gelöst haben, inkubiert. Durch Zugabe von Komplettmedium (RPMI mit 10 % FBS, Glutamax und Penicillin/Streptomycin) wird der Trypsinierungsvorgang gestoppt und die Zellen können in einem Teilungsverhältnis von 1:5 bis 1:10 in eine neue Kulturflasche oder mit Komplettmedium verdünnt (1:10 bis 1:20) in entsprechende Kulturschalen überführt werden.

### 3.1.3 Inkubation mit Substanzen

Für die Inkubation mit Substanzen werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit FBS-freiem Medium inkubiert, welches die ausgewählte Verbindung enthält. Stammlösungen aller Substanzen werden in THF hergestellt (10 mM). Diese werden mit FBS-freiem Medium auf eine Konzentration von 10  $\mu$ M verdünnt. Werden weitere Konzentrationen der Substanzen benötigt, wird von diesen ebenfalls zunächst eine entsprechende Stammlösung in THF hergestellt, um eine gleich bleibende THF-Konzentration (0,1 %) zu gewährleisten. Als Lösungsmittelkontrolle wird Medium hergestellt, welches THF ohne weitere Substanzen enthält (0,1 % THF). Die Zellen werden mit den so hergestellten Inkubationslösungen für 24 h bei 37 °C im Inkubator behandelt.

Im ersten Teil dieser Arbeit, in dem photoprotektive Effekte in h<sub>2</sub>F untersucht werden, werden die Eigenschaften der aromatischen Carotinoide Dihydroxyisorenieratin (DHIR) und Isorenieratin (IR) mit den Eigenschaften des nicht-aromatischen Carotinoids Lutein verglichen. Im zweiten Teil soll untersucht werden, ob das aromatische Carotinoid DHIR im Vergleich zu Lutein immunmodulatorische Eigenschaften auf die UV-induzierte Immunantwort von HaCaT-Zellen zeigt.

### 3.1.4 UV-Bestrahlung von Zellen

Die Zellen werden unmittelbar vor der Bestrahlung zweimal mit PBS gewaschen. Die Bestrahlung erfolgt in Hank's balanced salt solution (HBSS) mit der Bestrahlungseinheit BioSun (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, F). Je nach Zielsetzung werden Bestrahlungsdosen von 5 bis 27,5 J/cm<sup>2</sup> UVA und 10 bis 1500 mJ/cm<sup>2</sup> UVB verwendet. Die Lampenintensität beträgt im UVA-Bereich durchschnittlich 4,5 mW/cm<sup>2</sup> und im UVB-Bereich 1,5 mW/cm<sup>2</sup>. Die Spektren, der in der Be-

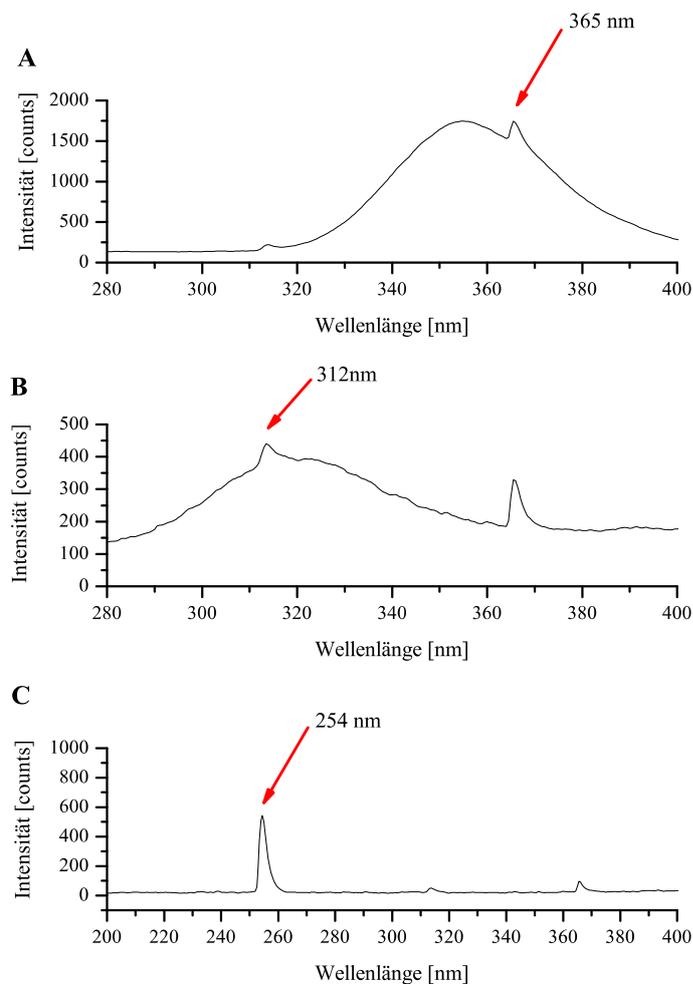


Abbildung 3.2: Emissionsspektren der Lampen der UV-Bestrahlungseinheit BioSun:

**A** UVA Bereich mit einem Intensitätspeak bei 365 nm **B** UVB Bereich mit einem Intensitätspeak bei 312 nm **C** UVC Bereich mit einem Intensitätspeak bei 254 nm

strahlungseinheit BioSun verwendeten Lampen, sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Aufnahme der Emmissionsspektren wurde mit dem UV-Vis-Spektrometer EPP2000C durchgeführt.

### 3.1.5 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wird ein spezielles Einfriermedium verwendet, damit die Zellen während des Prozesses selbst und der anschließenden Lagerung möglichst nicht geschädigt oder zerstört werden. Dabei handelt es sich um DMEM mit 20 % FBS und 10 % DMSO. DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle. Das zusätzliche FBS hat ebenfalls einen schützenden Effekt [84]. Die Zellen sollten sich zum Einfrieren kurz vor Erreichen der Konfluenz befinden. Etwa 24 h vor dem Einfrieren wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Zellen möglichst wenig Stress auszusetzen.

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-PBS-Mischung trypsiniert. Nach Ablösen der Zellen wird der Trypsinierungsvorgang mit 6 ml Kompletmedium gestoppt und die Suspension für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und eine neue Zellsuspension in Einfriermedium mit einer Zellzahl von mindestens  $10^6$  / ml hergestellt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird in sterile Einfriereröhrchen gegeben und direkt bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 3.1.6 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung (Trypanblau Färbung)

Zur Zellzahlbestimmung werden 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  Trypanblau in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit einem optisch-elektronischen Zellzählgerät. Dieses Gerät verwendet zur Viabilitätsbestimmung die Trypanblau Farbausschlussmethode. Tote Zellen mit geschädigter Zellmembran werden im Gegensatz zu lebenden Zellen von Trypanblau vollständig gefärbt. Anhand der unterschiedlichen Färbung kann zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Die digitale Bildauswertungssoftware errechnet die Zellzahl sowie die Viabilität in % lebende Zellen zur Gesamtzellzahl.

## 3.2 Zellviabilitätstest

Vor Versuchsbeginn werden die toxischen Effekte der UV-Bestrahlung und mögliche Eigentoxizitäten der verwendeten Substanzen im Zellsystem getestet. Hierzu wird bei allen verwendeten UV-Dosen und allen Konzentrationen der Carotinoide der Viabilitätstest mit der Sulforhodamin B Methode durchgeführt. Zusätzlich wird an HaCaT-Zellen ein Apoptose-Assay durchgeführt. Untersucht wird bei allen verwendeten UV-Dosen; die Konzentration der Carotinoidlösungen wird dabei auf 10  $\mu\text{M}$  festgelegt.

### 3.2.1 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) ist eine schnelle, sensitive in-vitro Methode zur Bestimmung der Zellviabilität in Multiwellplatten. Unter leicht sauren Bedingungen binden die negativ geladenen Sulfonium-Gruppen des Sulforhodamin B an die basischen Seitenketten der Aminosäuren zellulärer Proteine. Nicht adhärente Zellen und ungebundener Farbstoff werden durch mehrmaliges Waschen aus dem Ansatz entfernt. Da die Proteinmenge mit der Zellzahl korreliert, kann mit diesem Test bestimmt werden, wie viele Zellen nach 24 h Postinkubation noch an der Plattenoberfläche haften [86]. Adhärente Zellen werden in diesem Assay mit lebenden Zellen gleichgesetzt. Zur Bestimmung der Zellviabilität werden die Zellen in 24-Well Platten kultiviert. Nach Erreichen

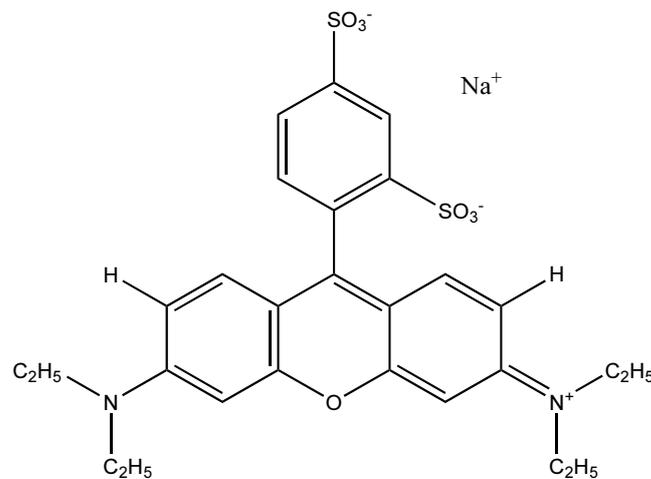


Abbildung 3.3: Sulforhodamin B

einer Konfluenz von 80 bis 90 % erfolgt die Inkubation mit den Carotinoiden (1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) sowie die Bestrahlung mit verschiedenen UVA- und UVB-Dosen. Nach einer 24-stündigen Postinkubation in FBS-freiem DMEM-Medium werden die Zellen für 1 h bei 4 °C mit Trichloressigsäure (TCA) fixiert, mit Reinstwasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die fixierten Zellen werden für 10 min mit 0,4%iger Sulforhodamin B Lösung in 1%iger Essigsäure gefärbt, anschließend 5 Mal mit 1%iger Essigsäure gewaschen und getrocknet. Zum Freisetzen des Farbstoffs werden die Zellen mit einer TRIS-Lösung (10 mM) für 5 min inkubiert und 100  $\mu\text{l}$  der Lösung zur photometrischen Messung in 96-Well Platten überführt. Die Absorption wird mit Hilfe eines Mikroplattenspektralphotometers bei 492 nm und 620 nm gemessen. Zur Korrektur der Hintergrundabsorption wird die Differenz der beiden Wellenlängen zur Auswertung verwendet.

### 3.2.2 Apoptose (TUNEL-Test)

Bei der Apoptose handelt es sich um den „programmierten Zelltod“. Die Zelle induziert eine Apoptose u.a., um die Funktionalität des gesamten Organismus zu erhalten. Veränderungen in der Regulation apoptotischer Signalwege können weitreichende Folgen für den Organismus haben und u.a. zu Krebs, Autoimmunerkrankungen sowie Herzinfarkt und Schlaganfall führen [45]. Apoptotische Zellen sind gekennzeichnet durch Veränderungen in der Morphologie der Zelle, wie das „Blebbing“ der Zellmembran (Bildung von membranumschlossenen apoptotischen Körperchen) und die Bildung von apoptotischen Vesikeln [84]. Außerdem kommt es in apoptotischen Zellen zur Fragmentierung der DNA [45]. Diese DNA-Fragmentierung wird in dem TUNEL-Assay (terminal dUTP nick end-labeling) analysiert. Der Assay beruht auf dem Prinzip, dass durch Endonucleasen gebildete DNA-Strangbrüche von terminalen Transferasen mit fluoreszierenden UTP-Derivaten markiert und so sichtbar gemacht werden können.

Der TUNEL-Test wird mit dem DNA-Fragmentation Imaging Kit von Roche Diagnostics (Mannheim, D) durchgeführt. Dieses Kit besteht aus einer Kernfärbelösung (Hoechst 33342,  $\lambda_{\text{ex}} = 361 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ nm}$ ), einer Enzymlösung (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase), um freie 3'-OH-Gruppen mit Fluorescein dUTP zu konjugieren und einer „Label“-Lösung ( $\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$ ), welche einen Nukleotidmix mit Fluorescein dUTP enthält. Für diesen Versuch werden die HaCaT-Zellen in 96-Well-Platten kultiviert, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben mit den Substanzen inkubiert und nach einer Inkubationszeit von 24 h, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit  $0 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $10 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt und für 24 h in RPMI-Medium postinkubiert. Nach der Postinkubation wird 90 % des Zellmediums entfernt, durch das gleiche Volumen an Fixierlösung (4 % Formaldehyd, 0,1 % Triton X-100) ersetzt und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur (23 bis  $27^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend wird der komplette Überstand entfernt und die fixierten Zellen mit  $200 \mu\text{l}$  PBS gewaschen. PBS wird nach dem Waschen wieder vollständig entfernt und die Zellen mit  $45 \mu\text{l}$  Reaktionslösung für 60 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Reaktionslösung wird unmittelbar vor Gebrauch aus Enzym- und „Label“-Lösung hergestellt (1:10). Nach 60 Minuten werden  $150 \mu\text{l}$  der frisch verdünnten Kern-Färbelösung (1:1000 in PBS) zu der Reaktionslösung gegeben und erneut für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (23 bis  $27^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend wird der komplette Überstand entfernt und  $200 \mu\text{l}$  PBS auf die Zellen gegeben. Bis zur Vermessung im Fluoreszenz-Mikroskop werden die Platten vor Licht geschützt aufbewahrt und am gleichen Tag mikroskopiert. Die abschließende Auswertung erfolgt mit der Software ImageJ.

### 3.3 Zelluläre Aufnahme und UV-Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen

Um die Aufnahme der untersuchten Carotinoide in HaCaT-Zellen, sowie deren Stabilität nach Bestrahlung zu untersuchen, werden die Zellen in 10 cm-Dishes wie in Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben kultiviert und mit den Substanzen inkubiert. Die Zellen werden jeweils mit 1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DHIR- bzw. Lutein-Lösungen inkubiert und wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 1500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB sowie 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 27,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA bestrahlt. Nach einer 24-stündigen Postinkubation werden 900  $\mu\text{l}$  Medium (Zellüberstand) für die Carotinoid-Analytik entnommen. Die adhärennten Zellen werden mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in 1 ml PBS suspendiert. Für die Proteinbestimmung nach Bradford werden ca. 100  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension entnommen, die restlichen 900  $\mu\text{l}$  werden für die Carotinoid-Bestimmung in ein Probenröhrchen überführt. Für die Carotinoid-Analytik per HPLC werden die

---

#### HPLC-Bedingungen

---

Säule	Suplex pKb-100, 250×4,6 mm
Flussrate	1 ml/min
Detektionswellenlänge	DHIR: 460 nm, Lutein: 444 nm
Laufmittel	(Methanol/Acetonitril/Wasser/2-Propanol) (52/42/4/2) (v/v/v/v)

---

Tabelle 3.1: HPLC-Bedingungen der Carotinoid-Analytik

Carotinoide aus den Zellen extrahiert. Hierzu werden 500  $\mu\text{l}$  THF und 100  $\mu\text{l}$  Lösung des internen Standards ( $\beta$ -Apo-8'-carotenal) zu der Zellsuspension zugegeben. Um die Carotinoide aus den Zellen und der Zellmembran zu lösen wird diese Lösung gut gemischt und für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Extraktion der Carotinoide erfolgt anschließend in 3 ml n-Hexan durch erneutes Mischen und Ultraschallbehandlung. Ein Aliquot der organischen Phase (2,5 ml) wird in ein neues Probenröhrchen überführt und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wird mit etwas THF gespült und erneut getrocknet. Anschließend wird der Rückstand zunächst in 50  $\mu\text{l}$  THF aufgenommen und dann weiter mit 400  $\mu\text{l}$  Laufmittel verdünnt. Für die HPLC-Analyse werden 50 bis 75  $\mu\text{l}$  dieser Lösung auf die Säule gegeben.

Die Quantifizierung erfolgt über das Peakflächenverhältnis der einzelnen Carotinoide und dem internen Standard. Die Carotinoidmenge in der Probe wird über eine extern erstellte Kalibriergerade berechnet.

## 3.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach Bradford oder Lowry. Der Proteingehalt der Proben wird u.a. zum Einstellen einer konstanten Proteinmenge bei Western Blot Versuchen oder für die Normierung der aufgenommenen Carotinoid-Menge in die Zellen benötigt.

### 3.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine schnelle und sensitive Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Zelllysaten [87]. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der Triphenylfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 unter sauren Bedingungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. In ungebundener Form hat er ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, welches sich nach Bindung an Proteine zu 595 nm verschiebt. Zur

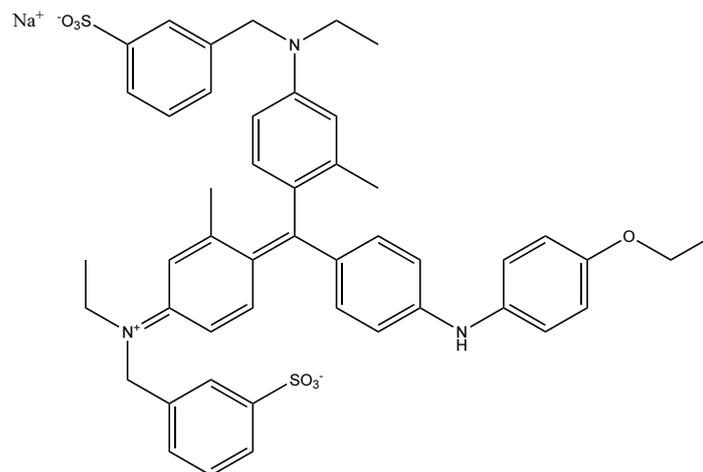


Abbildung 3.4: Coomassie-Brilliant-Blau G250

Quantifizierung der Proteine im Zelllysate wird eine externe Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt (0 bis 1,5 mg/ml). Für die Bestimmung wird das Bradford-Reagens 1:2 mit Reinstwasser verdünnt und jeweils 1 ml dieser Lösung in eine Mikroküvette gegeben. Von den sonifizierten Zelllysaten (siehe Abschnitt 3.9) werden jeweils 6 µl entnommen und zu der Bradford-Lösung in die Küvetten gegeben. Der Blindwert enthält statt des Probenlysats die gleiche Menge Lysepuffer. Der Küvetteninhalt wird gut gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wird die Lösung bei 590 nm in einem Photometer vermessen.

### 3.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist ebenfalls eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen und geeignet für Messungen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,5 µg/ml [88]. Die

Proteinbestimmung des Cytosol- bzw. Kern-Extraktes erfolgt mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad (München, D). Das Kit besteht aus den Lösungen A, B und S. Bei Lösung A handelt es sich um eine alkalische Kupfertartratlösung, Lösung B enthält das Folin-Reagens und Lösung S eine Tensidlösung. Die Arbeits-Lösung A' wird jedes Mal frisch aus Lösung S und Lösung A (1:50) hergestellt. 100 µl dieser Arbeitslösung werden zusammen mit 6 µl Probenlysat in eine Mikroküvetten gegeben und vermischt. Anschließend werden 800 µl Lösung B hinzugegeben und erneut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten kann die Absorption photometrisch bei 750 nm gemessen werden. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls über eine externe Kalibriergerade, die mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt wird.

### 3.5 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit Hilfe des alkalischen Comet Assays

Der Comet-Assay beruht auf dem Prinzip der Einzelzellgelelektrophorese (single-cell gel electrophoresis), die von Östling und Johanson (1984) erstmals eingeführt und später zur alkalischen Variante weiterentwickelt wurde [89, 90]. Dazu werden kernhaltige Zellen nach Behandlung mit potentiell genotoxischen Agenzien in Agarose aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Die so fixierten Zellen werden unter alkalischen Bedingungen lysiert, wobei auch Zellmembranen zerstört werden und eine alkalische Denaturierung der DNA erfolgt. Anschließend werden die Präparate einer Elektrophorese unterzogen. Nach Durchführung der Elektrophorese wird die DNA mit einem DNA-bindenden Farbstoff (z.B. Midori Green oder Ethidiumbromid) angefärbt und das Elektrophoresebild mikroskopisch ausgewertet. Ungeschädigte Zellen zeigen das Bild eines Kreises (ursprünglicher Zellkern). In geschädigten Zellen orientieren sich DNA-Bruchstücke während der Elektrophorese in Richtung Anode und bilden einen „Schweif“.

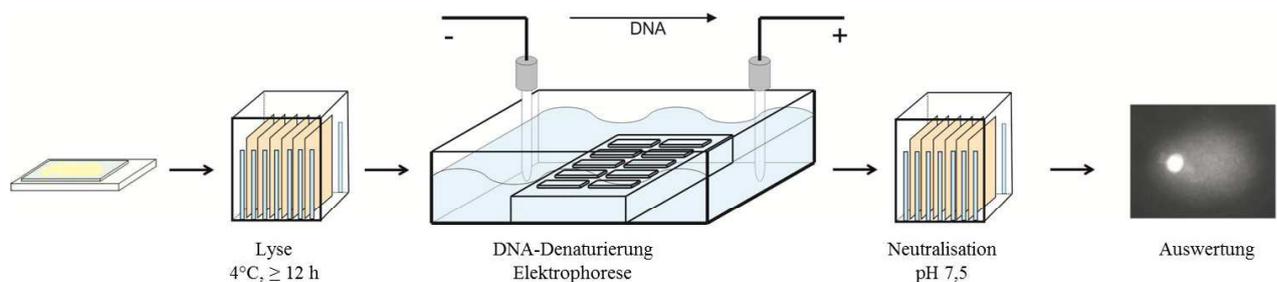


Abbildung 3.5: Prinzip und Durchführung des Comet Assays

Für den Comet-Assay werden die humanen dermalen Fibroblasten (hdF) in 6 cm-Zellkulturschalen kultiviert und wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach Inkubation mit den Carotinoiden werden Strangbrüche durch Bestrahlung (300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB, 10 J/cm<sup>2</sup> UVA) oder Inkubation mit Wasserstoffperoxid (500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 2 h) hervorgerufen. Nach der Induktion der Strangbrüche werden die Zellen abgelöst, die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 16 000 g/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 200  $\mu$ l „Low-Melting-Point“ Agarose bei 37 °C suspendiert, auf mit Agarose beschichtete Objektträger aufgetragen und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die beschichteten Objektträger müssen abkühlen, anschließend wird das Deckgläschen vorsichtig entfernt. Die Objektträger werden über Nacht (mind. 12 h) bei 4 °C in Lysepuffer (siehe Tabelle 2.5) inkubiert, dabei werden die Kernmembran sowie cytosolische und nukleäre Proteine zerstört. Die DNA verbleibt vorerst an der ursprünglichen Position des Zellkerns [91]. Der Lysepuffer wird durch vorsichtiges Waschen mit Reinstwasser entfernt und die Objektträger waagrecht in die Elektrophorese-Kammer gelegt. Die Inkubation (25 Minuten) mit alkalischem Elektrophorese-Puffer (pH  $\geq 13$ ) sorgt für eine Aufwindung der DNA und generiert Einzelstränge. Außerdem werden alkali-labile Stellen in Strangbrüche überführt. Die Elektrophorese wird anschließend für

25 Minuten bei 25 V und 300 mA durchgeführt. Die entstandenen Strangbrüche sorgen für eine Orientierung der chromosomalen DNA im elektrischen Feld. Wie DNA-Strangbrüche die Ausprägung und Umfang der „Kometen“ bestimmen, ist nicht vollständig aufgeklärt. Nach heutiger Auffassung bildet die intakte DNA unter den Bedingungen des Comet Assays superspiralisierte Schleifenstrukturen aus, die an Bestandteile der Zellmatrix (z.B. Proteine) über ionische Wechselwirkungen gebunden sind und im elektrischen Feld kaum wandern (Kopf des Kometen). DNA Strangbrüche führen zum Verlust der Superspiralisierung und in der Folge kann die DNA sich Richtung Anode orientieren (Schweifbildung). Die Schweife würden in diesem Fall hauptsächlich aus gestreckten DNA-Schleifen bestehen. In welchem Umfang einzelne Bruchstücke insbesondere bei umfangreicher Fragmentierung der DNA zur Schweifbildung beitragen ist nicht abschließend geklärt. Bei schwerer Schädigung findet man im Comet Assay in zunehmendem Maße DNA Fragmente ohne Verbindung zum Kern was zu Kometen führt, deren DNA vollständig beweglich geworden ist und ausschließlich im Schweif vorliegen [91, 92].

Nach erfolgter Elektrophorese werden die Objektträger vorsichtig mit Reinstwasser und anschließend dreimal für 5 Minuten mit Neutralisationspuffer gewaschen. Nach der Fixierung mit 80 %igem Ethanol werden die Objektträger über Nacht (mind. 12 h) getrocknet. Vor dem Mikroskopieren werden jeweils 100 µl „Midori Green“-Lösung (1,5 µl Midori Green DNA Farbstoff auf 100 ml Reinstwasser) auf die Objektträger gegeben und somit die DNA angefärbt. Die Proben werden zügig mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert, wobei 30-50 Zellkerne fotografiert werden, welche anschließend mit der Software CometScore™ ausgewertet werden.

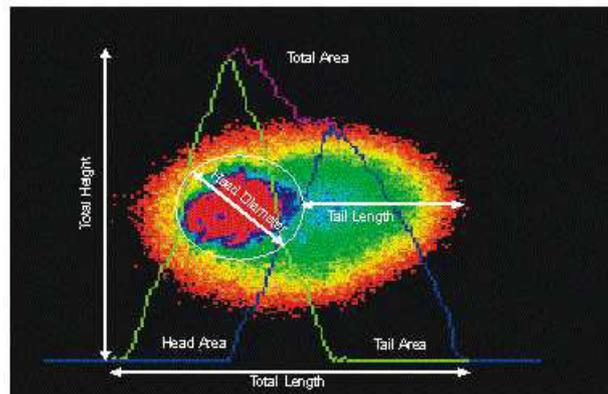


Abbildung 3.6: Darstellung eines „Comets“ mit der Software CometScore™

Für die Auswertung der Kometen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Methode beruht auf der Auswertung der Längen des Kometenschweifs („Tail Length“), wobei die Länge des Schweifs als direkt proportional zur Fragmentgröße angesehen wird. Weitere Möglichkeiten zur Auswertung sind die Bestimmung der Intensität der Schweiffärbung („Tail Moment“) und die Bestimmung des relativen Verhältnisses der Intensitäten im Schweif zum Kern („Tail Intensity“). Aus der „Tail Intensity“ lässt sich der prozentuale Anteil der DNA im Schweif berechnen (siehe Abbildung 3.6),

welcher als direkt proportional zum prozentualen Anteil der geschädigten DNA angesehen wird [93].

### 3.5.1 Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden

Mit einer weiteren Variante des Comet Assays können oxidative Schäden an der Purinbase Guanin bestimmt werden. Hierzu wird die Probe vor der Elektrophorese mit 8-Oxoguanin DNA Glykosylase-1 behandelt. Das Enzym gehört zu den Reparaturenzymen der Basenexzisionsreparatur. Es erkennt selektiv Stellen auf der DNA mit den oxidierten Basen 7,8-Dihydro-8-oxoguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) und katalysiert deren hydrolytische Entfernung. Durch die Entfernung der veränderten Basen entstehen „apurine“ Stellen, welche durch die

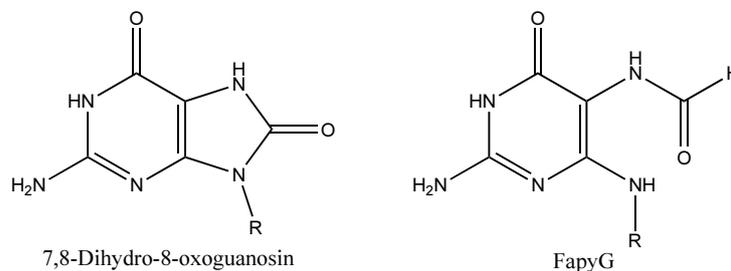


Abbildung 3.7: Strukturformeln von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG)

alkalische Behandlung in Strangbrüche umgesetzt werden.

Zur Analyse dieser Schäden wird das hOGG1 FLARE<sup>TM</sup> Assay Kit von Trevigen<sup>®</sup> verwendet. Das Kit besteht aus einer Enzymlösung (hOGG1: 100 U), einem Puffer zur Enzymverdünnung (REC<sup>TM</sup> Dilution Buffer), einer weiteren Pufferlösung (FLARE<sup>TM</sup> Buffer 1) und einer BSA-Lösung (BSA Additive). Die Enzymlösung wird zunächst 1:1000 in dem mitgelieferten Puffer (REC<sup>TM</sup>

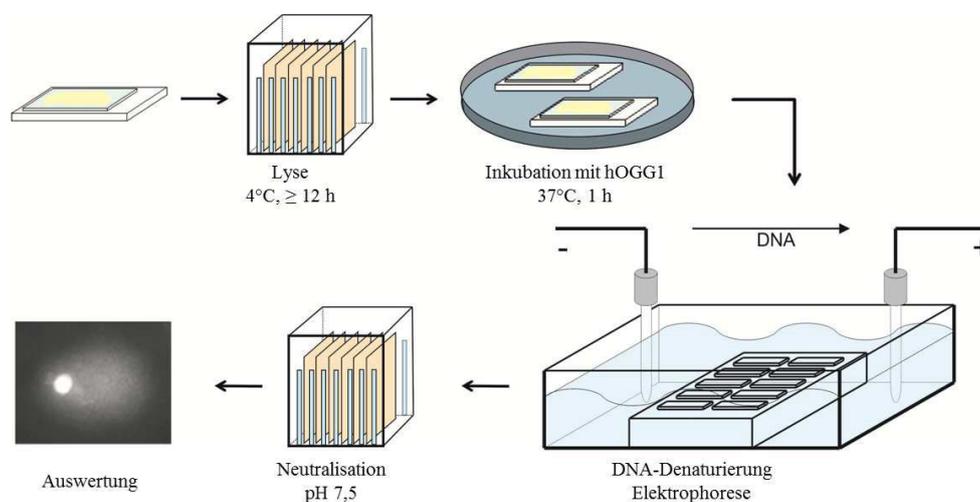


Abbildung 3.8: Prinzip und Durchführung des Comet Assays zur Bestimmung von oxidativen Schäden

Dilution Buffer) verdünnt. Die verdünnte Enzymlösung wird unmittelbar vor Gebrauch weiter in Reaktionspuffer (FLARE™ Buffer 1 (4 %), BSA Additive (1 %) in Reinstwasser) 1:75 verdünnt. Die Ausführung dieser Variante des Comet Assays ist bis zur Lyse analog der Durchführung des im vorherigen Abschnitt beschriebenen alkalischen Comet Assays. Die Induktion der DNA-Schäden erfolgt hier mit UVA-Bestrahlung ( $10 \text{ J/cm}^2$ ). Nach der Inkubation mit Lysepuffer über Nacht (mind. 12 h) bei  $4^\circ\text{C}$  werden die Zellen vorsichtig dreimal mit einer Pufferlösung (FLARE™ Buffer 1 (1:25) in Reinstwasser) gewaschen und für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $75 \mu\text{l}$  hOGG1 Enzymlösung in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Anschließend werden die Zellen zur Entwindung der DNA für 25 Minuten in Elektrophorese-Puffer in der waagerechten Elektrophorese-Kammer inkubiert. Die weitere Durchführung entspricht der des alkalischen Comet Assays. Für die Auswertung werden zusätzlich zu jeder bestrahlten Probe unbestrahlte Proben mit Enzym (Kontrollen) behandelt. Für die Bestimmung der UVA-induzierten DNA-Modifikationen, werden die Kontrollen anschließend jeweils von der Probe abgezogen.

### 3.6 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Thymindimeren

Thymindimere sind eine der häufigsten UV-induzierten DNA-Modifikationen. Sie entstehen nach der Absorption von Licht im UVB- und UVC-Bereich durch [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Thymin-Basen in der DNA. Neben der Bildung von Cyclobutanthyminindimeren (siehe Abbildung 4.18) ist auch die Bildung von weiteren Photoprodukten (6-4 Photoprodukt, Dewar-Photoprodukt) möglich. Außerdem ist die Bildung weiterer Cyclobutanpyrimidindimere, z.B. das Homodimer der DNA-Base Cytosin sowie das Heterodimer der Basen Thymin und Cytosin möglich. Mit der hier beschriebenen Methode wird selektiv die Bildung von Cyclobutanthyminindimeren untersucht, wobei nicht zwischen den verschiedenen Isomeren unterschieden wird. Im Folgenden werden diese Cyclobutanthyminindimere mit dem Begriff „Thymindimere“ (TD) beschrieben.

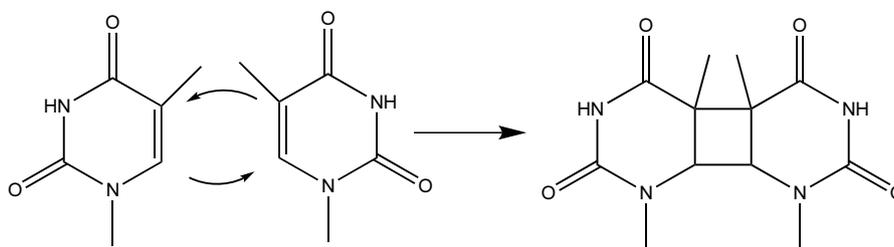


Abbildung 3.9: Bildung von Thymindimeren

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Thymindimeren entwickelt. Ein Standard für Thymindimere ist nicht erhältlich, daher wird der Standard synthetisiert. Zur Herstellung der Thymindimere wird zunächst eine wässrige Thymin-Lösung hergestellt (400 mg/l). Diese wird in Portionen à 35 ml in 14,5 cm-Kulturschalen aufgeteilt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefroren. Die gefrorenen Lösungen werden 30 Minuten mit UVC (254 nm) bestrahlt und anschließend aufgetaut. Dieser Gefrier-Bestrahl-Auftau-Zyklus wird 5mal wiederholt [94]. Aufgrund der Unlöslichkeit von Thymin in Ethanol, wird Ethanol als Extraktionsmittel verwendet, um nicht umgesetzte Edukt-Reste abzutrennen. Nach vollständiger Abtrennung von Thymin-Resten wird das Produkt in siedendem Wasser umkristallisiert und unter Vakuum getrocknet [94].

Die Reinheit des erhaltenen Produkts wird mit folgenden Methoden überprüft: HPLC-Bestimmung bei einer Detektionswellenlänge von 264 nm, Massenspektrum,  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR.

### 3.6.1 Reinheitsüberprüfung des Standards

In Abbildung 3.10 sind die Absorptionsspektren von Thymin und TD dargestellt. Es ist zu erkennen, dass TD bei der Wellenlänge 264 nm keine Absorption mehr besitzen.

Wenn das Edukt Thymin vollständig entfernt wurde, besitzt der hergestellte Standard bei 264 nm keine Absorption mehr (siehe Abbildung 3.10) [94].

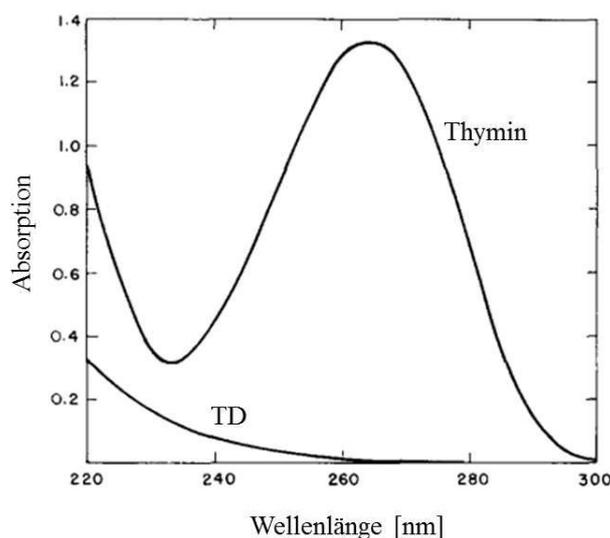


Abbildung 3.10: Absorptionsspektren von Thymin und Thymindimer [95]

Zur Überprüfung des Standards auf Restmengen an Edukt, wurde ein HPLC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 264 nm aufgenommen (siehe Anhang).

Zur weiteren Reinheitsüberprüfung und zur näheren Charakterisierung des synthetisierten Standards werden jeweils vom Edukt Thymin sowie vom Produkt Thymindimer  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMRs aufgenommen, welche im Anhang abgebildet sind. Für den Thymindimer-Standard wird zudem ein Massenspektrum aufgenommen, das ebenfalls im Anhang gezeigt ist.

---

#### HPLC-Bedingungen

---

Säule	RP-18, 250×4,6 mm
Flussrate	1 ml/min
Wellenlänge	264 nm
Laufmittel	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5)

---

Tabelle 3.2: HPLC-Bedingungen zur Reinheitsüberprüfung des Thymindimer-Standards

### 3.6.2 UVB-abhängige Bildung von Thymindimeren

Nach Herstellung der Standardverbindung soll die Abhängigkeit der Thymindimerbildung von der UVB-Dosis bestimmt werden, wozu eine wässrige 2 mM Thyminlösung im gefrorenen Zustand mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$ ,  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $2 \text{ J/cm}^2$  und  $3 \text{ J/cm}^2$  UVB bestrahlt wird. Die Bestrahlung wird 5 Mal wiederholt, wobei nach jeder Bestrahlung eine Probe entnommen wird, um die UVB-abhängige Thymindimerbildung und den Einfluss der wiederholten UVB-Exposition im Modellsystem zu bestimmen. Die Proben werden in die HPLC injiziert und bei 220 nm vermessen. Die HPLC-Bestimmung erfolgt nach [96], wobei in Abänderung der Methode statt Wasser ein Phosphat-Puffer als Laufmittel verwendet wird (siehe Tabelle 3.3).

<b>HPLC-Bedingungen</b>	
Säule	RP-18, 250×4,6 mm
Flussrate	1 ml/min
Wellenlänge	220 nm
Laufmittel	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,5)

Tabelle 3.3: HPLC-Bedingungen der Thymindimer-Analytik

### 3.6.3 Bestimmung von Thymindimeren in Modellsystemen

Die UVB-abhängige Thymindimerbildung konnte im vereinfachten Modellsystem der gefrorenen Thyminlösung gezeigt werden. Im Folgenden wird die UV-abhängige Thymindimerbildung in komplexeren Modellsystemen (Oligonucleotide, Blutproben) untersucht. Für diesen Versuch werden die Oligonucleotide (siehe Tabelle 3.4) bzw. die DNA aus menschlichen Blutproben mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend werden die Basen aus der DNA durch Hydrolyse freigesetzt und isoliert. Hierzu werden zwei verschiedene Methoden verwendet: eine saure DNA Hydrolyse mit Trifluoressigsäure und eine enzymatische Hydrolyse.

<b>Verwendete Oligonucleotide</b>	
Oligonucleotid 1	5'-ATCTCCTCTTCTCGTTCCTC
Oligonucleotid 2	5'-GTGTTGCCTGCTGCCTTC
Oligonucleotid 3	5'-GGTTGG

Tabelle 3.4: Oligonucleotide für die Modellversuche zur Thymindimerbildung

### 3.6.3.1 Thymindimerbildung im Modellsystem (saure Hydrolyse der DNA)

Für die Versuchsreihe wird zunächst eine wässrige Lösung des Oligonucleotids 1 (siehe Tabelle 3.4) (100  $\mu\text{M}$ ) hergestellt und in Quarzküvetten 3 Mal für 30 Minuten mit UVC bestrahlt. Zwischen den Bestrahlungen wird die Lösung gut gemischt. Nach der Bestrahlung wird die Lösung bei 160 °C bis zur Trockne eingedampft. Für die Hydrolyse werden 1 ml Trifluoressigsäure (TFA) hinzugegeben und für 2 h bei 160 °C inkubiert [96]. Nach erfolgter Hydrolyse wird das Gemisch mit 3 ml Toluol versetzt und anschließend im Rotationsverdampfers die Flüssigkeit vollständig abgezogen. Der Rückstand wird in 50  $\mu\text{l}$  Laufmittel aufgenommen und auf die HPLC-Säule gegeben. In der Versuchsreihe wird auch eine wässrige Lösung von Kalbs-Thymus DNA hergestellt und in Quarzküvetten mit 2 J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Die Hydrolyse und Aufarbeitung der Probe erfolgt analog.

### 3.6.3.2 Thymindimerbildung im Modellsystem (enzymatische Hydrolyse der DNA)

Für die Versuchsreihe wird ein weiteres Oligonucleotid sowie humane DNA, extrahiert aus mononukleären Zellen, verwendet. Das Oligonucleotid 3 wird für 40 min mit UVC oder mit 2 J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Die humane DNA Probe wird für 30 min mit UVC bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Lösungen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei 60 °C bis zur Trockne eingedampft. Durch die Zugabe von 34  $\mu\text{l}$  Enzym-Cocktail I (siehe Tabelle 3.5) wird die enzymatische Hydrolyse der DNA gestartet. Die Inkubation erfolgt für 3 h bei 37 °C. Anschließend werden 70  $\mu\text{l}$  Enzym-Cocktail II (siehe Tabelle 3.5) zugegeben und über Nacht (mind. 12 h) bei 37 °C inkubiert. Die Cut-off-Spin Filter werden mit 300  $\mu\text{l}$  Reinstwasser gespült (45 min, 6000 g/min). Die hydrolysierte DNA wird auf die Zentrifugenseparationsfilter gegeben und 45 min bei 6000 g/min zentrifugiert. Die erhaltene Lösung wird direkt für die HPLC-Bestimmung eingesetzt.

---

#### Enzym-Mischungen

---

Enzym-Cocktail I	4000 U/ml DNase I, 200 U/ml Nuklease P1, 10 mM Zinkchlorid, 100 mM Butylhydroxytoluol in 30 mM Natriumacetat-Lösung (pH 6,8)
Enzym-Cocktail II	100 U/ml Phosphodiesterase I, 17 000 U/ml alkalische Phosphatase in 30 mM Natriumacetat-Lösung (pH 7,8)

---

Tabelle 3.5: Enzym-Mischungen für die enzymatische Hydrolyse der DNA [21, 97]

### 3.6.3.3 Isolierung von mononukleären Zellen

Mittels Venenpunktion werden 30 ml Blut in EDTA/Heparinröhrchen entnommen und mit PBS (1:2) gemischt. In zwei sterilen 50 ml Proben-Röhrchen werden jeweils 15 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig jeweils 30 ml Blut/PBS-Gemisch mit einer sterilen Pipette zu Ficoll gegeben. Das Gemisch wird bei 1500 g/min und 20 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Interphasen vorsichtig abgenommen und in neue Proben-Röhrchen überführt. Die Interphasen werden für 10 min bei 500 g/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die erhaltenen Pellets werden zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellpellets, die nun die mononukleären Zellen enthalten, jeweils in 1 ml PBS aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 3.6.3.4 DNA-Isolierung aus mononukleären Zellen

Die Extraktion der DNA aus mononukleären Zellen erfolgt mit einem DNA-Extraktions-Kit nach dem Spin-Protokoll (DNA Purification from Blood and Body Fluids, <http://www.qiagen.com/literature/>), wobei jeweils 200 µl Probe eingesetzt werden. Für die Konzentrationsbestimmung werden jeweils 2 µl abgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Die so erhaltene Lösung wird direkt für die Bestrahlungsversuche verwendet.

## 3.7 Biochemische Methoden zur Bestimmung von Cyclobutanpyrimidindimeren

Die in diesem Abschnitt beschriebenen biochemischen Methoden zur Bestimmung von Cyclobutanpyrimidindimeren, Dot Blot und die immunzytochemische Färbung, beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion der Cyclobutanpyrimidine als Antigene mit entsprechenden Antikörpern. Der verwendete primäre Antikörper reagiert mit (5'-6')-Cyclobutanpyrimidindimeren der Basen Thymin und Cytosin (siehe Abbildung 3.11). Im Folgenden werden diese Verbindungen unter dem Begriff Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) zusammengefasst.

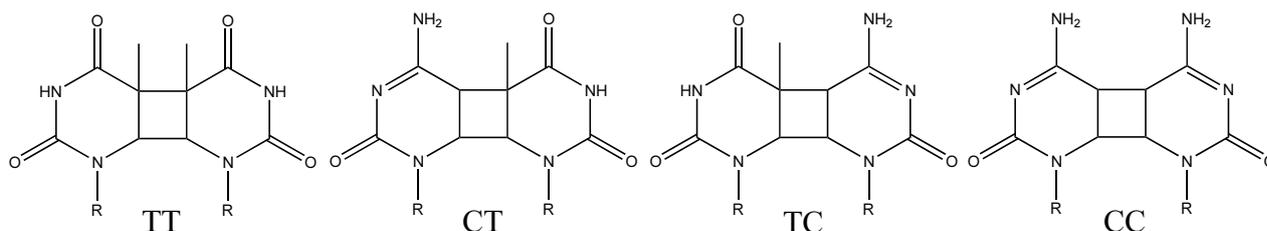


Abbildung 3.11: Strukturformeln der Cyclobutanpyrimidindimere, die in der Reaktion mit dem primären Antikörper erfasst werden

### 3.7.1 Dot Blot

Der Dot Blot ist eine einfache Methode zur Bestimmung von Molekülen, die mit Antikörpern markiert sind. Die Proben werden punktförmig auf eine Trägermembran aufgetragen und anschließend wird die Zielstruktur (hier CPDs) über eine Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Es erfolgt keine weitere elektrophoretische Auftrennung, wie z.B. bei der Southern Blot Analyse.

Zunächst wird der Dot Blot mit dem bestrahlten Oligonucleotid 1 (siehe Tabelle 3.4) durchgeführt, um eine CPD-Bildung in diesem Modellsystem nachzuweisen. Hierzu werden drei Aliquots der wässrigen Oligonucleotid-Lösung 1 in Quarzküvetten jeweils dreimal für 30 min mit UVC bestrahlt und anschließend auf die Trägermembran aufgetragen.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, werden mögliche Bindungsstellen der DNA auf der getrockneten Membran für 1h in 5%igem Milchpulver geblockt und nach Entfernen des Milchpulvers 1h bei Raumtemperatur (23 bis 25 °C) mit dem primären Antikörper (anti-Thymindimer, mouse, T1192, clone H3) inkubiert. Alle verwendeten Antikörper werden in 5%iger Milchpulverlösung (w/v TBST) verdünnt. Nach vollständigem Entfernen des ungebundenen primären Antikörpers durch mehrmaliges Waschen mit TBST, erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Goat anti-mouse IgG (HRP)). Der sekundäre Antikörper wird mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits auf Meerrettichperoxidase-(HRP)-Basis auf einem Röntgenfilm (Exposition ca. 5 bis 40 min) in einer lichtundurchlässigen Kassette sichtbar gemacht.

Als nächstes wurde die Dot Blot Methode mit Zellkulturproben durchgeführt, um herauszufinden, ob eine UV-induzierte CPD-Bildung auch in hdF nachgewiesen werden kann und ob die verwendeten Carotinoide möglicherweise die Bildung verhindern. Für diesen Versuch werden hdF in 10 cm-Zellkulturplatten kultiviert, wie in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben inkubiert und mit unterschiedlichen UVB-Dosen (300 mJ/cm<sup>2</sup>, 500 mJ/cm<sup>2</sup>, 1000 mJ/cm<sup>2</sup> und 1500 mJ/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Als Positivkontrolle werden Zellen mit UVC (5 min, 254 nm) bestrahlt. Nach einer Postinkubation in FBS-freiem DMEM für 24 h werden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-PBS-Mischung (1:1) von den Zellkulturplatten abgelöst. Durch Zugabe von Kompletmedium wird der Trypsinierungsvorgang abgestoppt und die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS aufgenommen. Die Proben werden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Die Extraktion der DNA erfolgt mit einem DNA-Extraktions-Kit gemäß Herstellerangaben, wobei jeweils 200 µl Probe eingesetzt werden und zweimal mit 30 µl Reinstwasser eluiert wird. Für die Konzentrationsbestimmung werden jeweils 2 µl abgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt, wobei eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Die Konzentrationsbestimmung dient zur Normierung der Ergebnisse auf die eingesetzte DNA-Menge. Die Proben werden anschließend komplett punktförmig auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup> Membran) aufgetragen.

Die Durchführung des immunologischen Nachweises erfolgt analog zur Bestimmung der CPDs in Oligonucleotiden.

### 3.7.2 Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Färbung (Immunostaining) ist eine immunchemische Methode zur Bestimmung von Antigenen in fixierten Zellen. Antigene, in diesem Fall Cyclobutanpyrimidindimere, werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern über eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung nachgewiesen. Die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper können unter dem Mikroskop mit geeigneten Anregungswellenlängen sichtbar gemacht werden. Diese Methode wurde erstmals von Coons et al. zum Nachweis von Antigenen in Geweben verwendet [98].

Hierzu werden hdf in 24-Well Platten auf runden Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90% kultiviert. Anschließend werden die Zellen für 24 h mit Carotinoiden behandelt und in HBSS mit verschiedenen UVB-Dosen (100 mJ/cm<sup>2</sup>, 200 mJ/cm<sup>2</sup> und 300 mJ/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Zellen entweder direkt bei –20°C für 10 Minuten in Methanol fixiert (0h Postinkubation) oder vor der Fixierung für 24 h in FBS-freiem DMEM postinkubiert. Nach der Fixierung werden die Zellen mit einer Blockierlösung (siehe Tabelle 2.6) für 1h behandelt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen primären Antikörper gegen Cyclobutanpyrimidindimere (mouse, Sigma-Aldrich, T1192, clone H3) inkubiert. Dieser Antikörper reagiert spezifisch mit (5'-6')-Cyclobutanpyrimidindimeren der Basen Thymin und Cytosin (siehe Abbildung 3.11). Der sekundäre Antikörper (ALEXA Fluor<sup>®</sup> 556) wird für 45 Minuten bei 37°C im Dunkeln auf die Zellen gegeben. Nachdem der ungebundene sekundäre Antikörper vollständig entfernt ist, werden die Deckgläschen mit ProLong<sup>®</sup> gold antifade (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) auf Objektträgern fixiert. Dieses Reagens enthält bereits ein Fixiermittel, Bleichmittel und den DNA Farbstoff 4',6'-Diamidin-2-phenylindolhydrochlorid (DAPI). Die Objektträger werden mindestens 12 h getrocknet und bei 4°C gelagert. Die Proben werden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100TV analysiert (em: 461 nm, 573 nm, 519 nm; ex: 258 nm, 556 nm, 495 nm). Zur densitometrischen Auswertung der Bilder werden zufällig ausgewählte Kerne verwendet und mit ImageJ analysiert. Bestrahlte Kontrollen (0h) werden als Referenz herangezogen und auf 100% gesetzt.

## 3.8 Translokalisierung von NF $\kappa$ B in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung

Die Translokalisierung von NF $\kappa$ B vom Cytosol in den Kern von HaCaT-Zellen wird mit immunzytochemischer Färbung sowie mittels Western Blot Verfahren untersucht, wobei für letzteres Verfahren zunächst die Cytosol- und Kernfraktion isoliert werden.

### 3.8.1 Immunzytochemische Färbung

Die Durchführung der immunzytochemischen Färbung von NF $\kappa$ B in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung ist in weiten Teilen identisch mit der immunzytochemischen Bestimmung der Thymindimere in hdF (siehe Abschnitt 3.7.2). HaCaT-Zellen werden in 24-Well Platten auf runden Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert und wie in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, inkubiert und bestrahlt. Nach der Bestrahlung werden die Zellen entweder direkt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten fixiert (0h Postinkubation) oder vor der Fixierung für 6 bzw. 24 h in FBS-freiem RPMI postinkubiert. Nach der Fixierung werden die Zellen mit einer Blockierlösung (siehe Tabelle 2.6) für 1 h behandelt und anschließend über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem spezifischen primären Antikörper (siehe Tabelle 3.7) inkubiert. Die weitere Durchführung ist identisch mit der immunzytochemischen Bestimmung der Thymindimere in hdF, wobei als sekundärer Antikörper ALEXA Fluor<sup>®</sup> 488 verwendet wurde (siehe Abschnitt 3.7.2).

### 3.8.2 Western Blot Verfahren

Für die Probenvorbereitung zur NF $\kappa$ B-Bestimmung werden die HaCaT-Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert und wie in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben inkubiert und bestrahlt. Nach erfolgter Postinkubation (6 h, 24 h) wird das Medium entfernt und das Zelllysat wie im folgenden Abschnitt beschrieben in eine cytosolische und eine Kernfraktion aufgetrennt. Die Proteinbestimmung der Extrakte erfolgt nach der Methode von Lowry. Zur Western Blot Analyse werden jeweils 20  $\mu\text{g}$  Protein mit Blaupuffer versetzt und für 5 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

#### 3.8.2.1 Trennung von Kern- und Cytosolfraktion

Für die Untersuchung der Translokalisierung von NF $\kappa$ B ist es notwendig die Cytosol- und Kernfraktion getrennt voneinander zu untersuchen. Zur Trennung wird ein Kit „NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ von Thermo Scientific verwendet. Dieses Kit besteht aus den Lösungen „Cytoplasmic Extraction Reagent“ (CER) I, CER II und „Nuclear Extraction Reagent“ (NER).

Die adhärennten Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers von der

Oberfläche gelöst und in 500 µl PBS suspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte werden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Das Zelllysate wird in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei 35 000 g/min und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Zellüberstand abgenommen und verworfen. Um die cytosolische Membran aufzubrechen werden zunächst 100 µl CER I hinzugefügt und gründlich gemischt, so dass das Zellpellet komplett suspendiert ist. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis werden 5,5 µl CER II zugegeben, gemischt und erneut für 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wird wieder gründlich gemischt und dann bei 55 000 g/min für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Zellüberstand (Cytosol-Extrakt) wird abgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Für die Kernextraktion wird das Zellpellet in 50 µl NER suspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang (Mischen, Inkubation auf Eis) wird weitere 4 Mal wiederholt. Der Extrakt wird erneut bei 55 000 g/min für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand (Kernfraktion) ebenfalls in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben. Die Extrakte werden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.8.2.2 Western Blot

Unter „Blotting“ versteht man die Übertragung von Proteinen, DNA oder RNA auf eine Trägermembran. Je nachdem welche Substanz übertragen wird, handelt es sich daher um einen Southern Blot (DNA) [99], Northern Blot (RNA) oder Western Blot (Protein) [100]. Western Blot ist eine Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen in Zelllysaten. Diese Technik wurde 1980 von W. Neal Burnette entwickelt [101]. Zur Auftrennung des Proteingemisches wird die diskontinu-

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammegel</b>
Wasser	43,0 %	70,4 %
Rotiphorese Gel 40	30,0 %	14,5 %
1,5 M TRIS pH 8,8	25,0 %	13,0 %
10 % SDS	1,0 %	1,0 %
10 % APS	1,0 %	1,0 %
TEMED	0,1 %	0,1 %

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels (Gewichts %)

ierliche SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet. Es wird ein aus Acrylamidmonomeren bestehendes Polymer, welches zusammen mit N,N'-Methylenbisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk bildet, verwendet, in dem sich die Proteine im elektrischen Feld aufgrund ihres Molekulargewichts auftrennen. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet (siehe Abbildung 3.12).

Das Elektrophorese-Gel setzt sich aus Sammel- und Trenngel zusammen. Das neutrale Sammelgel dient zur Fokussierung der Proben, während im basischen Trenngel die Probenauftrennung erfolgt. Durch Denaturierung und bei basischem pH-Wert des Trenngels liegen die Proteine in linearer Form vor, wobei die negative Ladung der SDS-Moleküle die Eigenladung der Proteine überkompensiert. Aus diesem Grund erfolgt die Auftrennung bei SDS-PAGE ausschließlich nach Molekulargewicht und Porengröße des Gels. Die Eigenladung der Proteine ist vernachlässigbar. Das Gel wirkt hierbei als Molekularsieb, in dem Proteine mit höherem Molekulargewicht durch

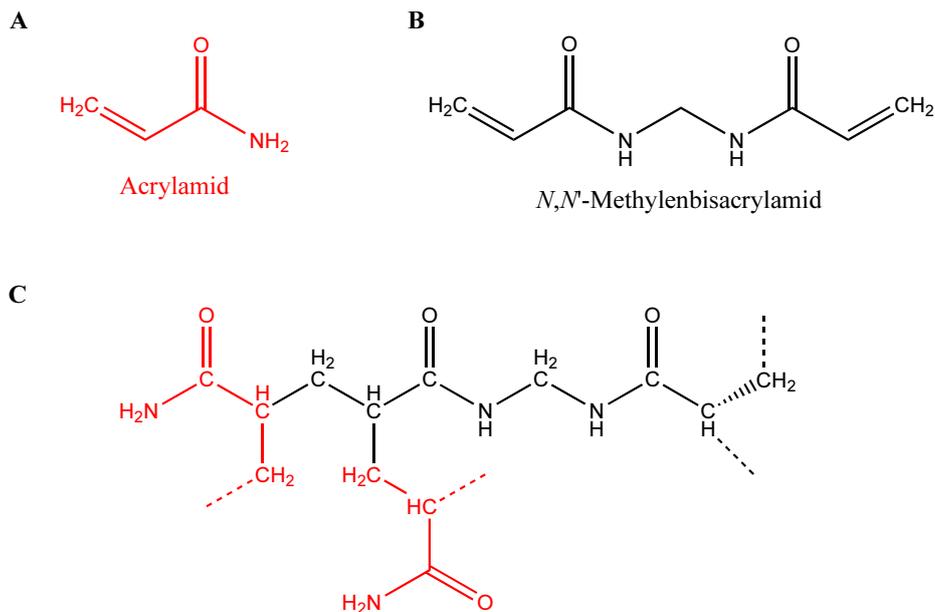


Abbildung 3.12: Struktur eines Polyacrylamidgels

das Gel stärker retardiert werden. Aus diesem Grund muss die Porengröße des Gels auf das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine angepasst werden. Die Gele werden in Plastikassettens (10×10 cm) gegossen, gegen Austrocknung geschützt verpackt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Elektrophorese erfolgt in einem Laufpuffer (Tabelle 2.7) bei 25 mA/Gel im Sammel- bzw. 40 mA/Gel im Trenngel. Als Größenmarker werden 5  $\mu$ l „Prestained Protein Ladder (10 bis 170 kDa)“ aufgetragen. Nach erfolgreicher Proteinauftrennung im Gel erfolgt die Übertragung der Proteine von dem Gel auf eine Trägermembran. Hierzu wird eine Nitrocellulosemembran verwendet. Die Übertragung wird als Semi-Dry Blot (siehe Abbildung 3.13) durchgeführt. Die Blot Anordnung setzt sich aus jeweils 2 Lagen Whatmanpaper getränkt mit Anodenpuffer 1 bzw. 2, der Membran, dem Gel und zwei Lagen Whatmanpaper getränkt mit Kathodenpuffer zusammen (siehe Abbildung 3.13). Dieses als „Sandwich“ bezeichnete System wird zwischen Anode und Kathode gespannt, um eine Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran zu erreichen. Der Transfer erfolgt bei 60 mA/Gel für 2,5 h. Zur Transferkontrolle wird die Membran anschließend mit Ponceau-S gefärbt. Die Ponceau-S-Färbung kann durch mehrmaliges Waschen mit TBST wieder entfernt werden. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen, wird die Membran vor der Inkubation mit primärem Antikörper in einer 5 %igen (w/v) Milchpul-

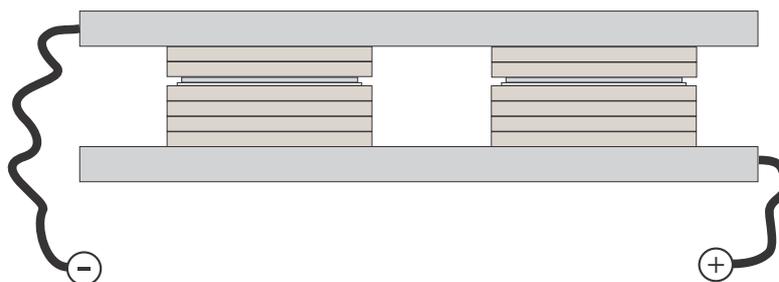


Abbildung 3.13: Semi-Dry Blot

verlösung in TBST für 1 h geblockt. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgt über Nacht (mind. 12 h) bei 4 °C. Anschließend wird der ungebundene primäre Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur (23 bis 25 °C) mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen an primären und sekundären Antikörpern sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Zur Visualisierung des Enzym-markierten sekundären Antikörpers werden je nach zu erwartender Signalstärke 500 µl SuperSignal®Pico bzw. 300 µl SuperSignal®Femto auf die Membran gegeben und nach kurzer Einwirkzeit wieder entfernt. Das gekoppelte Enzym (Meerrettichperoxidase - HRP) setzt das zugegebene Substrat zu einem lumineszierenden Produkt um, welches auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgt anschließend mit der Software ImageJ. Ladekontrollen dienen zur Überprüfung der gleichmäßigen Auftragung der Proteinmenge in al-

	<b>Verdünnung primärer AK</b>	<b>Verdünnung sekundärer AK</b>
NF $\kappa$ B	1:1000	1:10000
$\beta$ -Actin	1:1000	1:10000
Lamin B Rezeptor	1:1000	1:10000

Tabelle 3.7: Antikörper zur Bestimmung von NF $\kappa$ B

len Taschen des Gels. Hierzu sollten Proteine verwendet werden, deren Expression in den Zellen konstant ist („housekeeping proteins“). Bei diesem Versuchen wird als Ladekontrolle des Cytosols die Expression von  $\beta$ -Actin und des Kerns die Expression des Lamin B Rezeptors verwendet. Die verwendeten Konzentrationen der eingesetzten Antikörper zur Bestimmung der Ladekontrolle sind ebenfalls in Tabelle 3.7 dargestellt.

### 3.9 UVB-abhängige Expression von Interleukin-6

HaCaT-Zellen werden in 10 cm-Zellkulturschalen wie in Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben kultiviert und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h werden die Zellen wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit 0 mJ/cm<sup>2</sup>, 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 30 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und für 1 h, 6 h und 24 h in RPMI-Medium postinkubiert. Nach erfolgter Postinkubation wird das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min auf Eis mit 200 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 2.8) behandelt. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und zur Lagerung in ein steriles Probengefäß überführt. Die Proben werden kurzfristig bei –20 °C bzw. längerfristig bei –80°C gelagert.

	Verdünnung primärer AK	Verdünnung sekundärer AK
IL-6	1:1000	1:10000
GAPDH	1:2000	1:20000

Tabelle 3.8: Antikörper zur Bestimmung von IL-6

Unmittelbar vor der Proteinbestimmung nach Bradford werden die Zellen ca. 30 s mit einem Stabsonifizierer behandelt. Zur weiteren Bestimmung werden 40 µg Protein eingesetzt und mit Blaupuffer versetzt. Zur vollständigen Proteindenaturierung werden die Proben mit Blaupuffer für 10 min bei 95 °C erhitzt und danach direkt auf Eis gestellt. Die weitere Bestimmung mit Western Blot erfolgt analog zur Bestimmung von NfκB (siehe Abschnitt 3.8.2.2). Die verwendeten Antikörper und die jeweils eingesetzten Verdünnungen sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

### 3.10 Bestimmung von immunmodulatorischen Interleukinen mittels ELISA

Der ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zählt zu den Immunassay-Verfahren und basiert auf einer Enzym-vermittelten Farbreaktion. Er wurde 1971 von E. Engvall und P. Perlmann eingeführt und ist seitdem eine wichtige Methode zur Bestimmung von Antigenen in Proben.

Eine für die Quantifizierung verwendete Variante ist der Sandwich-ELISA. Hierbei verwendet man zwei spezifische Antikörper, die beide an unterschiedliche Epitope des Antigens binden. Der erste Antikörper („capture antibody“) ist an den Boden der Mikrotiterplatte gebunden und reagiert während der Inkubationsphase mit dem in der Probe enthaltenen Antigen. Der zweite Antikörper („detection antibody“) bindet an ein Reporterenzym. Aufgrund des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes bezeichnet man diese Variante als Sandwich-ELISA. Zu diesem Komplex wird letztlich ein passendes Substrat zugegeben, das durch das Reporterenzym umgesetzt wird und

dessen Produkt durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann.

### 3.10.1 Probenvorbereitung

Für die Bestimmung von Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-12 (IL-12) im Zellüberstand von HaCaT-Zellen, werden  $3 \cdot 10^4$  Zellen/ml in 10 cm-Zellkulturschalen wie in Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben kultiviert und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h werden die Zellen wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit  $0 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $10 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt und für 24 h in FBS-freiem RPMI-Medium postinkubiert. Nach der Postinkubation werden jeweils 500  $\mu\text{l}$  des Zellüberstandes für die Bestimmung von IL-10 bzw. IL-12 abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.10.2 Interleukin-10

Für die Bestimmung von Interleukin-10 wird das ELISA-Kit Human IL-10 UltraSensitive von Invitrogen verwendet. Zur Quantifizierung werden Standards mit Konzentrationen an IL-10 von 0 pg/ml, 0,78 pg/ml, 1,56 pg/ml, 3,12 pg/ml, 6,25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 25 pg/ml und 50 pg/ml hergestellt. Für die Bestimmung werden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Proben in ein Well der beschichteten 96-Well-Platte pipettiert und für 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend werden nach mehrmaligem Waschen 100  $\mu\text{l}$  Biotin Konjugat zugegeben und erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur ( $23$  bis  $25^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Die Wells werden erneut mehrmals gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23$  bis  $25^\circ\text{C}$ ) mit 100  $\mu\text{l}$  Streptavidin-HRP-Lösung (Reporterezym) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird überschüssige Streptavidin-HRP-Lösung durch gründliches Waschen entfernt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur ( $23$  bis  $25^\circ\text{C}$ ) mit stabilisierter Chromogen-Lösung inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden nach 30 Minuten 100  $\mu\text{l}$  Stop-Lösung hinzugegeben und die Farbentwicklung bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels linearer Regression unter Verwendung der Standardkonzentrationen und -extinktionen.

### 3.10.3 Interleukin-12

Für die Bestimmung von Interleukin-12 wird das ELISA-Kit Human IL-12 p40/p70 von Invitrogen verwendet. Zur Quantifizierung werden Standards mit Konzentrationen an IL-12 von 0 pg/ml, 7,8 pg/ml, 15,6 pg/ml, 31,2 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml und 500 pg/ml hergestellt. Für die Bestimmung werden jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Standards, Kontrollen sowie Proben in ein Well der beschichteten 96-Well-Platte zusammen mit 100  $\mu\text{l}$  Biotin Konjugat pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur ( $23$  bis  $25^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Anschließend werden nach mehrmaligem Waschen

100 µl Streptavidin-HRP-Lösung (Reporterenzym) hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 bis 25 °C) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird überschüssige Streptavidin-HRP-Lösung durch gründliches Waschen entfernt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 bis 25 °C) mit 100 µl stabilisierter Chromogen-Lösung inkubiert. Zur Reaktionsabstoppung werden nach 30 Minuten 100 µl Stop-Lösung hinzugegeben und die Farbentwicklung bei 450 nm photometrisch gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels linearer Regression unter Verwendung der Standardkonzentrationen und -extinktionen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zytotoxizitätstest

UVA-, UVB- und UVC-Strahlen haben zelltoxische Wirkungen, die durch bestimmte Verbindungen oder Faktoren abgeschwächt bzw. verstärkt werden können. Zur Festlegung der experimentellen Anordnung aller weiteren Arbeiten mit Zellkulturen war es daher unerlässlich die zytotoxischen Effekte der UV-Bestrahlung, der Substanzen alleine und deren Kombination im gewählten Zellsystem und Kulturbedingungen zu untersuchen. Zytotoxizität ist definiert als die Fähigkeit eines Agens (Substanz) Zellen zu schädigen. Zur Bewertung der Toxizität wurde der SRB-Assay verwendet (siehe Abschnitt 3.2.1). Mit Hilfe dieses Tests können an der Kulturschale anheftende (adhärente) und abgelöste Zellen unterschieden und quantifiziert werden. Adhärenz Zellen werden in diesem Test mit lebenden Zellen gleichgesetzt. Mit steigender Toxizität einer Substanz nimmt die Zahl lebender Zellen ab, d.h. die Zellviabilität sinkt. In den vorliegenden Untersuchungen wird die Zellviabilität im Vergleich zur unbestrahlten Lösemittelkontrolle (100 %) angegeben.

In den Testansätzen wurde die Zytotoxizität der UV-Bestrahlung über verschiedene Dosisbereiche sowie die der Carotinoide in verschiedenen Konzentrationen ermittelt. Die Ergebnisse lassen auch Rückschlüsse zu verstärkenden oder abschwächenden Wirkungen der Carotinoide bzw. deren Metabolite oder Abbauprodukte auf die Toxizität zu. Ein Vergleich der Daten mit den Ergebnissen des TUNEL-Tests (Apoptose-Assay) zeigt mögliche Einflüsse der Substanzen auf apoptotische Signalwege.

In Abbildung 4.1 ist die zeitliche Abfolge der Zytotoxizitätsuntersuchung dargestellt. Die Zellen werden in einem Zeitraum von 24 h mit dem zu untersuchenden Carotinoid inkubiert, so dass die

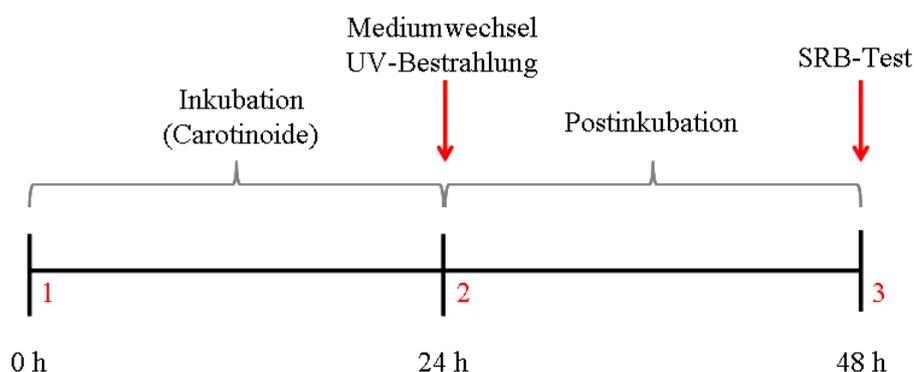


Abbildung 4.1: Zellkulturbedingungen: Zytotoxizitätstest

Zelle die Verbindung aufnehmen kann. Unmittelbar vor der Bestrahlung erfolgt ein Mediumwechsel, um die überschüssige (nicht aufgenommene) Substanz zu entfernen. Nach der Bestrahlung werden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank gehalten (Postinkubation). Neben direkt toxischen Wirkungen können so auch sekundäre toxische Effekte erfasst werden. Die Viabilität (prozentualer Anteil lebender Zellen) wird 48 h nach Versuchsbeginn gemessen. Für die statistische Auswertung wurde die Viabilität in drei unabhängigen Experimenten bestimmt ( $n = 3$ ). Die Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test; das Signifikanzniveau wurde auf  $*p \leq 0,05$  gesetzt.

#### 4.1.1 Zytotoxizität in Hautfibroblasten (hdF) - UV-Bestrahlung und Carotinoide

Die Fibroblasten wurden wie beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.3, 3.1.4) mit den Carotinoiden in Konzentrationen von 1,5 bis 10  $\mu\text{M}$  (Endkonzentration im Medium) inkubiert und UVA-Licht (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 20  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) oder UVB-Licht (100  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 200  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) ausgesetzt. Nach erfolgter Postinkubation wurde die Viabilität bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von UVA-Bestrahlung und Carotinoiden auf die Viabilität von hdF sind in Abbildung 4.2 zusammengefasst. Bei alleiniger UVA-Bestrahlung wurde im Dosisbereich von 5 bis 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  keine statistisch signifikante Abnahme der Viabilität beobachtet (siehe Abbildung 4.2 LM). Die Viabilität unbestrahlter Zellen ist durch Vorinkubation mit den Substanzen im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 10  $\mu\text{M}$  ebenfalls nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 4.2 und 4.3 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Bei Kombination von UVA-Bestrahlung und DHIR-Behandlung der Zellen (siehe Abbildung 4.2 A) wurden nur im Dosisbereich von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  statistisch signifikante toxische Effekte beobachtet. Die Wirkung von IR in Kombination mit UVA-Bestrahlung ist vergleichbar (siehe Abbildung 4.2 B). Auch hier treten bei einer Dosis von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  toxische Effekte auf. Ähnliche Tendenzen zeigen sich bei einer Behandlung mit Lutein (siehe Abbildung 4.2 C), wobei aber keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Die zytotoxische Wirkung einer UVB-Bestrahlung auf hdF ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Mit zunehmender UVB-Dosis nimmt die Zellviabilität ab (LM) (siehe Abbildung 4.3). Die Abnahme ist bei Bestrahlungsdosen von 200  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle statistisch signifikant. Eine Vorbehandlung der Zellen mit DHIR schützt nur geringfügig vor der toxischen Wirkung der UVB-Strahlen. Unter den gewählten Bedingungen ist keine statistisch signifikante Abnahme der UVB-Toxizität durch Vorbehandlung mit DHIR nachweisbar (siehe Abbildung 4.3 A). Eine statistisch signifikante Verminderung der UVB-Toxizität konnte auch durch eine Vorbehandlung mit IR nicht erzielt werden (siehe Abbildung 4.3 B). Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch bei Vorbehandlung der Zellen mit Lutein.

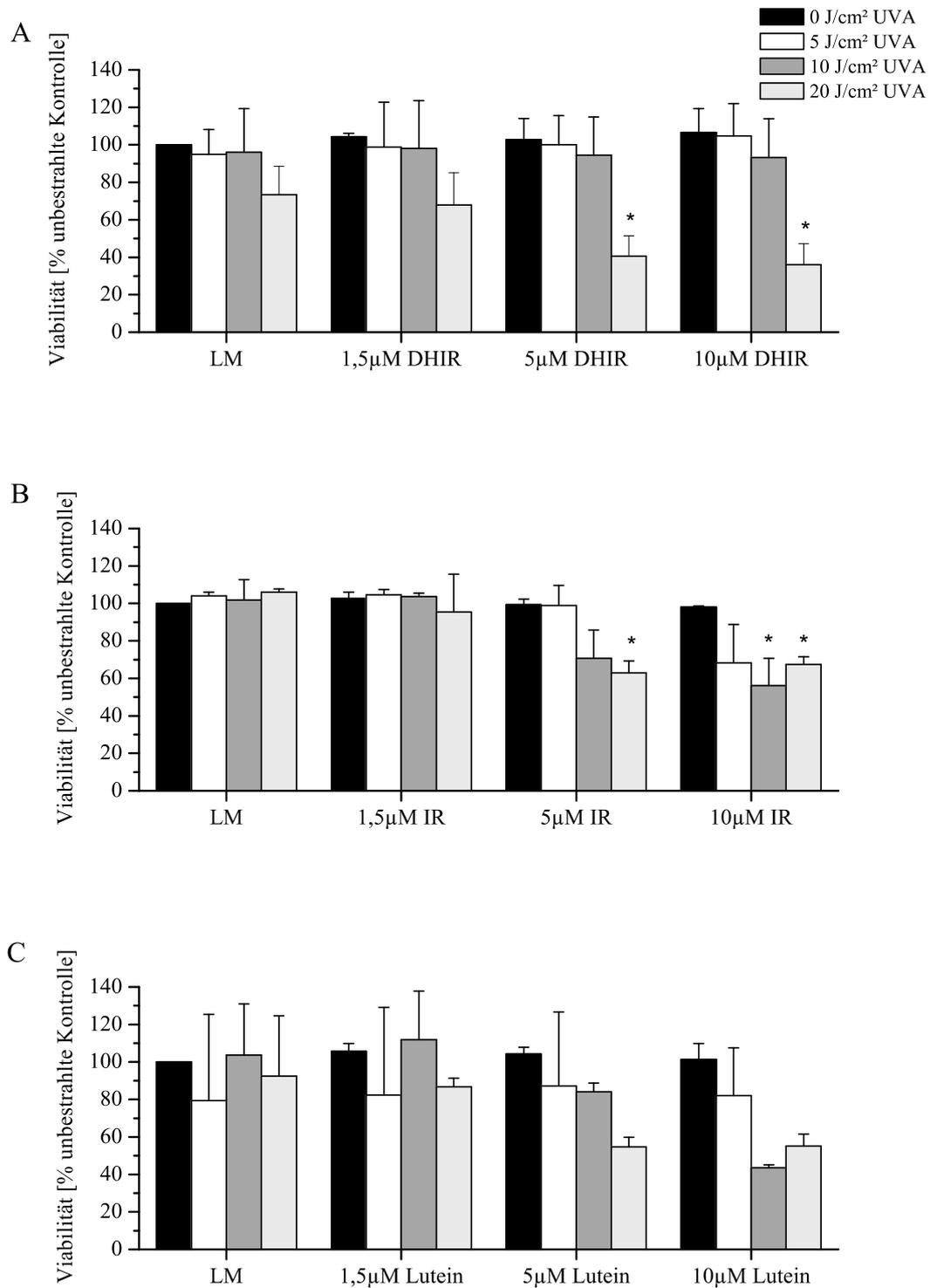


Abbildung 4.2: Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVA-Bestrahlung in hdF.  
**A** DHIR **B** IR **C** Lutein; LM = Lösungsmittel (0,1 % THF); LM (0 J/cm<sup>2</sup> UVA) = 100 %; n = 3; \*p ≤ 0,05 bezogen auf jeweilige LM-Kontrollzellen

Für eine Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Lutein zeigte sich in unbestrahlten Zellen eine erhöhte Viabilität. In bestrahlten Zellen wurde bei Behandlung mit 1,5  $\mu\text{M}$  Lutein eine statistisch signifikant verminderte Toxizität in hdF festgestellt, welche sich aber nicht bei allen Bestrahlungsdosen zeigte.

Um die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren zu initiieren, sollten in späteren Versuchen hdF auch mit UVC-Licht bestrahlt werden. Daher wurde auch unter UVC-Bestrahlung ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Die UVC-Dosis kann mit der verwendeten Bestrahlungseinheit nur über die Bestrahlungsdauer reguliert werden. Unter allen gewählten Bedingungen wurde eine zytotoxische Wirkung der UVC-Bestrahlung nachgewiesen. Eine Zunahme der UVC-Toxizität durch Vorbehandlung mit Carotinoiden, wurde nicht festgestellt. DHIR und IR schützen geringfügig, aber nicht statistisch signifikant vor der toxischen Wirkung von UVC-Licht. Bei Behandlung der Zellen mit Lutein nimmt die UVC-Toxizität statistisch signifikant ab. Details zu den zytotoxischen Effekten der UVC-Bestrahlung auf hdF sind im Anhang abgebildet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass keine Verbindung im untersuchten Konzentrationsbereich (1,5 bis 10  $\mu\text{M}$ ) eine direkt toxische Wirkung auf hdF hat. Die UVA-induzierte Toxizität im hohen Dosisbereich wird bei Anwesenheit der Verbindungen in höheren Konzentrationen verstärkt. Dagegen führt die Vorbehandlung der Zellen mit den Carotinoiden zu einer leichten Verminderung der UVB-abhängigen toxischen Effekte. Moderat protektive Wirkungen wurden auch bei UVC-Bestrahlung nachgewiesen.

Basierend auf den vorliegenden Toxizitätsuntersuchungen wurden alle weiteren Versuche mit einer 10  $\mu\text{M}$ -Konzentration der Verbindungen durchgeführt. Mit Ausnahme der Untersuchungen zur CPD-Bildung mit Hilfe des Dot-Blots wurde als höchste UVB-Bestrahlungsdosis 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  gewählt. Im UVA-Bereich lag die höchste Bestrahlungsdosis bei 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

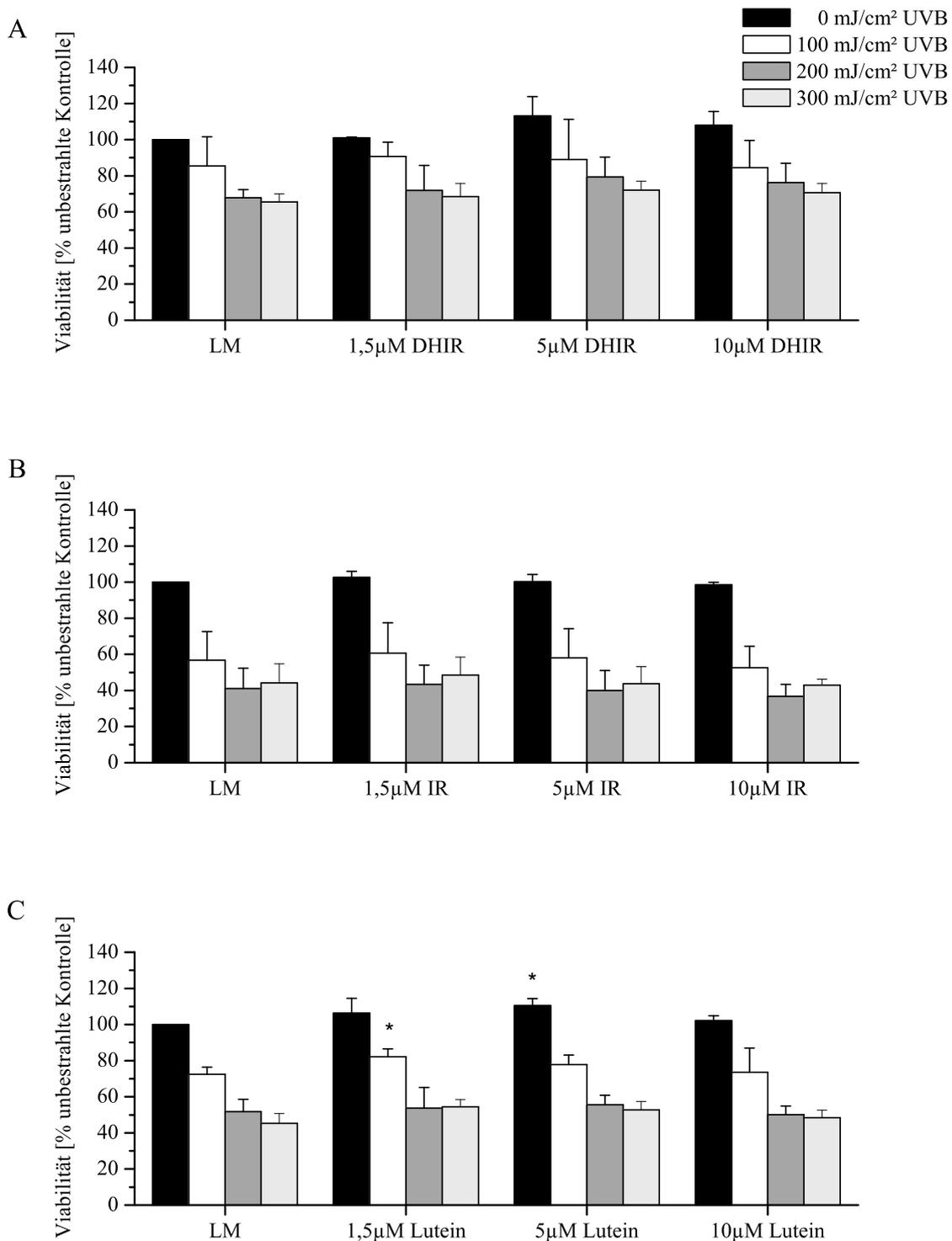


Abbildung 4.3: Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVB-Bestrahlung in hdF.

**A** DHIR **B** IR **C** Lutein; LM = Lösungsmittel (0,1 % THF); LM (0 J/cm<sup>2</sup> UVB) = 100%; n = 3; \*p ≤ 0,05 bezogen auf jeweilige LM-Kontrollzellen

### 4.1.2 Zytotoxizität in HaCaT-Zellen - UV-Bestrahlung und Carotinoide

Für die Bestimmung der Zytotoxizität einer UV-Bestrahlung bzw. einer Behandlung mit den Verbindungen wurden die HaCaT-Zellen wie beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.3, 3.1.4) mit den Carotinoiden in Konzentrationen von 1,5 bis 10  $\mu\text{M}$  (Endkonzentration im Medium) behandelt und UVA-Licht (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 27,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) oder UVB-Licht (10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 1000  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 1500  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) ausgesetzt. Nach erfolgter Postinkubation wurde die Viabilität bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss von UVA-Bestrahlung und Behandlung mit den Carotinoiden sind in Abbildung 4.4 gezeigt. In HaCaT-Zellen wurde eine dosis-abhängige Viabilitätsabnahme durch UVA-Bestrahlung gezeigt (siehe Abbildung 4.4 LM), statistisch signifikant für die Bestrahlungsdosen 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 27,5  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Eine Behandlung der HaCaT-Zellen mit den Carotinoiden ohne UV-Bestrahlung im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 10  $\mu\text{M}$  hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (siehe Abbildung 4.4 und 4.5 0  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Die durch UVB-Bestrahlung verursachten toxischen Effekte konnten durch Vorbehandlung der Zellen mit den Carotinoiden nicht verhindert werden. Die UVA-induzierte Abnahme der Viabilität war bei behandelten und unbehandelten Zellen nicht signifikant unterschiedlich.

Die zytotoxische Wirkung der UVB-Bestrahlung auf HaCaT-Zellen ist in Abbildung 4.5 gezeigt. Mit zunehmender UVB-Dosis nimmt die Zellviabilität ab. Die Abnahme ist bei Bestrahlungsdosen ab 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB statistisch signifikant (siehe Abbildung 4.5 LM).

Eine Vorbehandlung der Zellen mit DHIR schützt nicht vor der toxischen Wirkung von UVB-Strahlen. Die Vorbehandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR führt eher zu einer leichten Verstärkung der UVB-Toxizität, welche für die Bestrahlungsdosis 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  statistisch signifikant ist (siehe Abbildung 4.5 A).

Es konnte kein Einfluss einer Vorbehandlung mit Lutein auf die UVB-induzierte Toxizität in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.5 B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass weder DHIR noch Lutein im untersuchten Konzentrationsbereich (1,5 bis 10  $\mu\text{M}$ ) eine direkt toxische Wirkung auf HaCaT-Zellen hat. Eine leichte Zunahme der UVB-Toxizität konnte bei einer Vorbehandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR beobachtet werden. Eine Behandlung mit Lutein hingegen zeigte weder in Kombination mit UVA- noch mit UVB-Bestrahlung einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen.

Basierend auf den vorliegenden Toxizitätsuntersuchungen wurden alle weiteren Versuche mit einer 10  $\mu\text{M}$ -Konzentration der Verbindungen durchgeführt. Trotz geringer Erhöhung der UVB-Toxizität durch eine Vorbehandlung mit 10  $\mu\text{M}$  DHIR wurde diese Konzentration gewählt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten aus beiden Zellsystemen zu gewährleisten. Für weitere Untersuchungen wurden folgenden UVB-Bestrahlungsdosen ausgewählt: 10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Zur Untersuchung von Entzündungsparametern in HaCaT-Zellen wurde ausschließlich UVB-Strahlung verwendet, da Strahlung in diesem Wellenlängenbereich hauptsächlich für die Erythembildung verantwortlich gemacht wird.

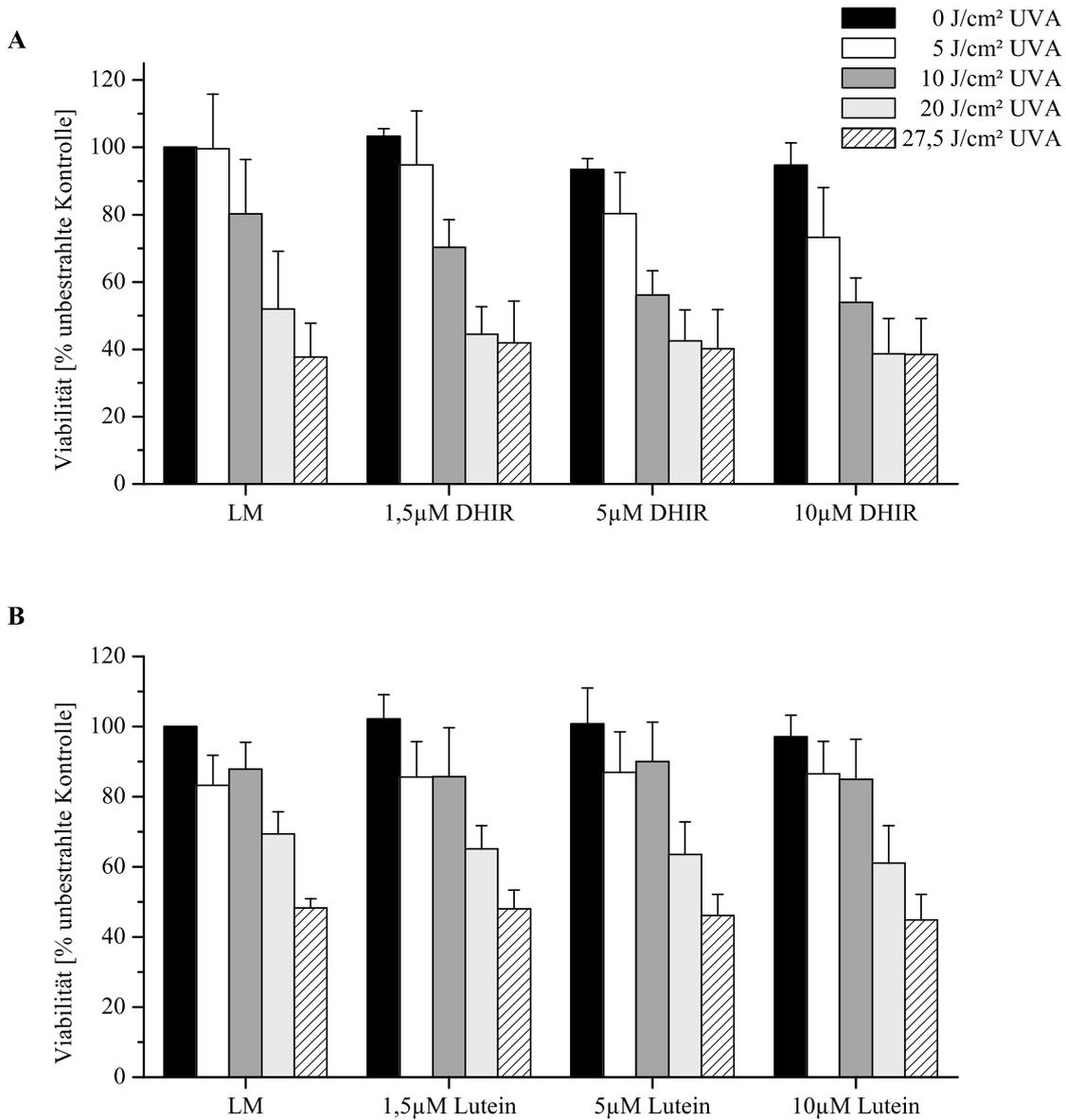


Abbildung 4.4: Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVA-Bestrahlung in HaCaT-Zellen.

**A** DHIR **B** Lutein; LM = Lösungsmittel (0,1 % THF); LM (0 J/cm<sup>2</sup> UVA) = 100 %; n = 3; \*p ≤ 0,05 bezogen auf jeweilige LM-Kontrollzellen

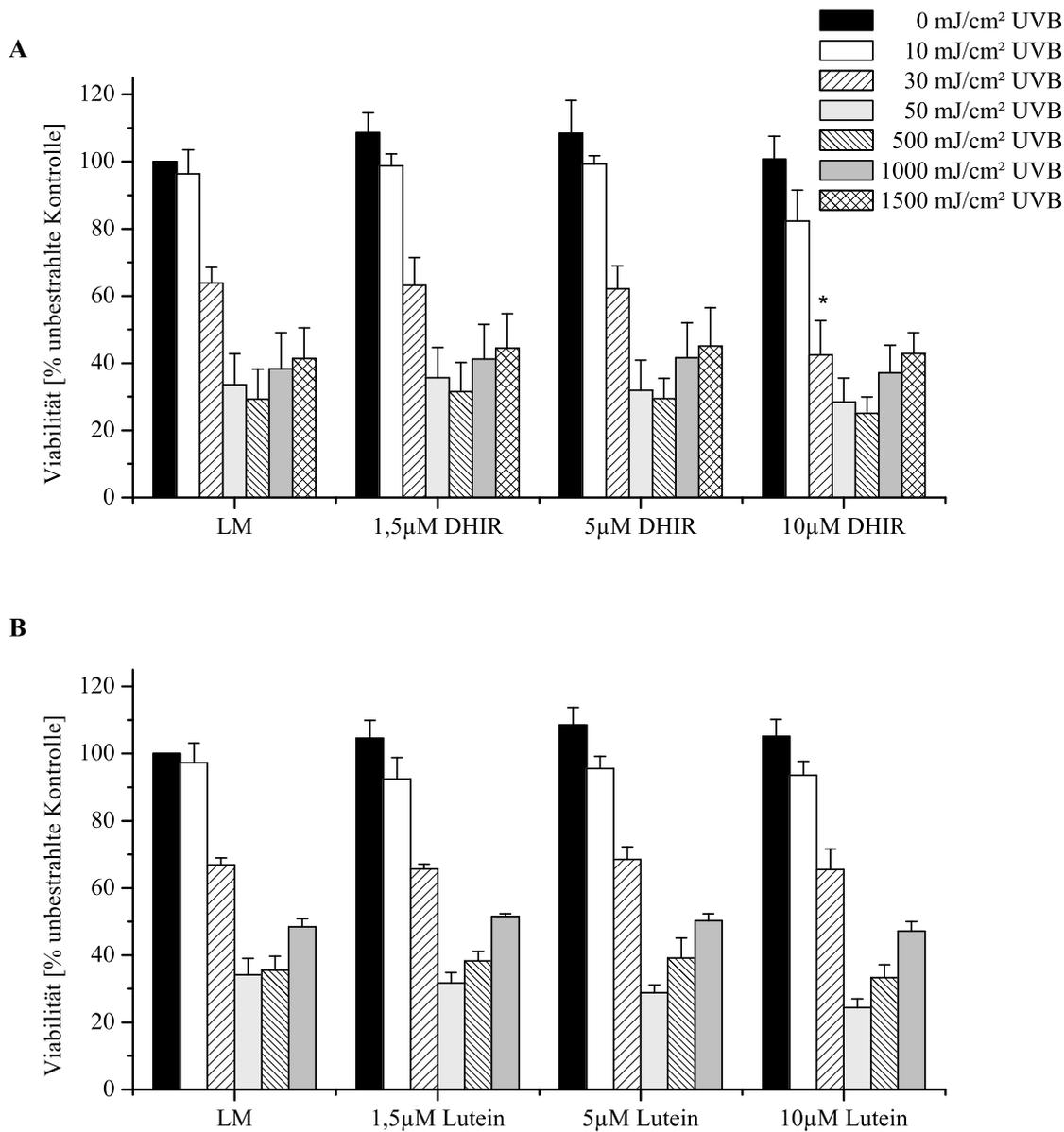


Abbildung 4.5: Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVB-Bestrahlung in HaCaT-Zellen.  
**A** DHIR **B** Lutein; LM = Lösungsmittel (0,1 % THF); LM (0 J/cm<sup>2</sup> UVA) = 100 %;  
 n = 3; \*p ≤ 0,05 bezogen auf jeweilige LM-Kontrollzellen

### 4.1.3 TUNEL-Test

Der TUNEL-Assay (terminal dUTP nick end-labeling) beruht auf der Messung der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen. In apoptotischen Zellen entstehen DNA-Bruchstücke, welche durch terminale Desoxynukleotid Transferasen mit Fluoreszenz-markierten UTP-Derivaten markiert werden. Die gekoppelten Fluorochrome können bei der entsprechenden Anregungswellenlänge ( $\lambda_{ex} = 494 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch ausgewertet werden. Die Fluoreszenz ist ein Maß der apoptotischen Aktivität der Zelle.

Dieser Test wurde für die Carotinoide DHIR und Lutein in der Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  und bei UVB-Bestrahlung von  $0 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $10 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  durchgeführt. Informationen zum Einfluss von Carotinoiden auf apoptotische Signalwege sind wichtig für die weitere Versuchsplanung sowie die Interpretation der Ergebnisse.

Ausgewählte mikroskopische Aufnahmen zur apoptotischen Aktivität der HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition (ohne Carotinoide) sind in Abbildung 4.6 gezeigt. Die Aufnahmen der behandelten Zellen für die Bestrahlungsdosis  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist in Abbildung 4.7 dargestellt. In behandelten Zellen war im Vergleich zu Kontrollzellen (Medium) kein Unterschied in der apoptotischen Aktivität zu erkennen. Alle weiteren Aufnahmen der behandelten Zellen sind im Anhang abgebildet. Die Fluoreszenz wurde für alle Proben bei den Anregungswellenlängen  $361 \text{ nm}$  (Abbildung 4.6 A Kernfärbung) und  $494 \text{ nm}$  (Abbildung 4.6 B Apoptotische Aktivität) gemessen. In Abbildung 4.6 C sind die Aufnahmen übereinandergelagert gezeigt.

Alle Aufnahmen wurden densitometrisch mit der Software ImageJ ausgewertet. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung des TUNEL-Tests nach Inkubation mit den Carotinoiden sowie UVB-Bestrahlung in HaCaT-Zellen ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Im Dosisbereich von 0 bis  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB wurde keine Apoptoseinduktion beobachtet. Erst eine Bestrahlung mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB führte zu einer sichtbaren, aber statistisch nicht signifikanten Apoptose-Induktion in HaCaT-Zellen. Ein modulatorischer Effekt der Carotinoide ( $10 \mu\text{M}$ ) auf die UVB-induzierte Apoptose in HaCaT-Zellen wurde nicht beobachtet.

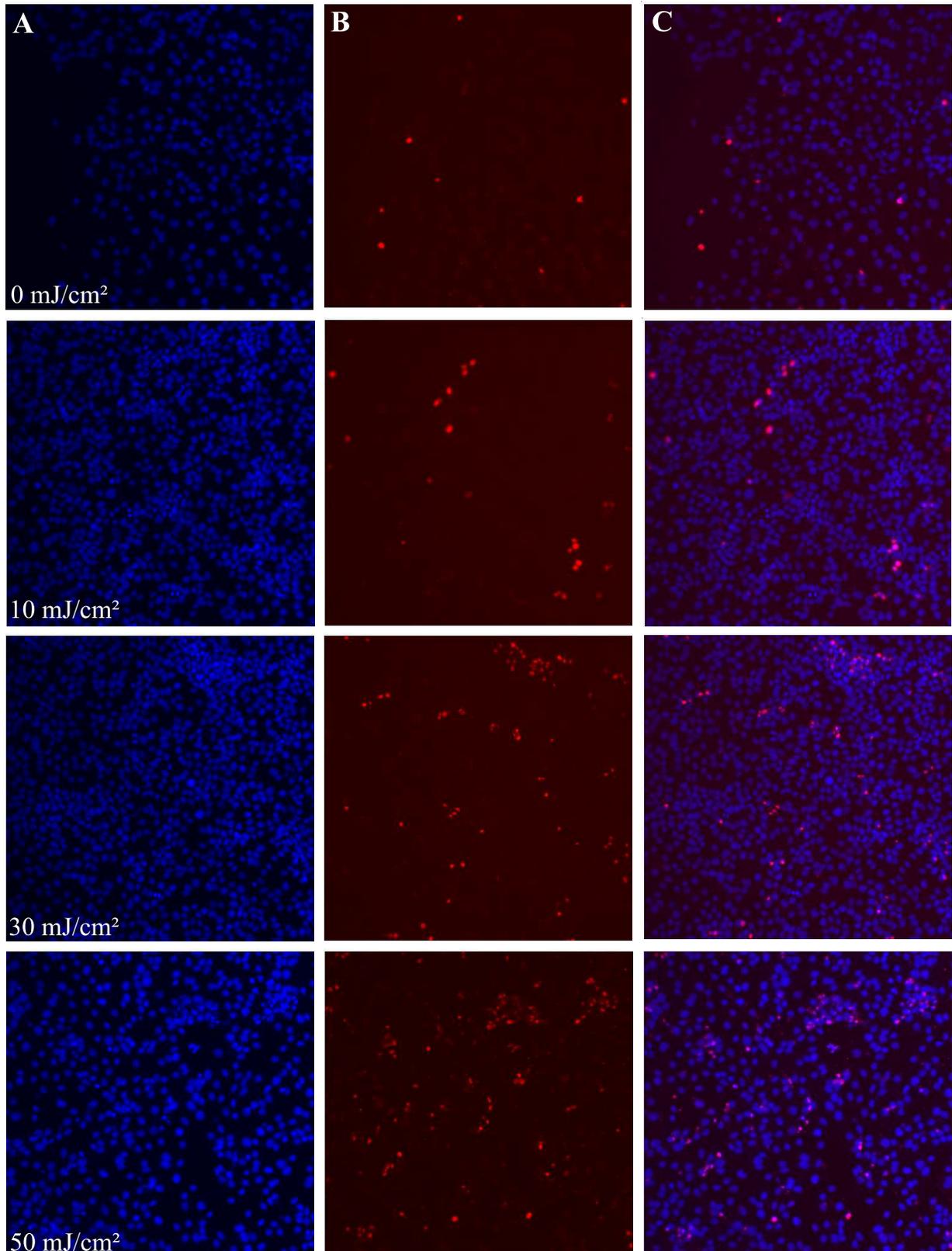


Abbildung 4.6: Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung.

**A** Zellkernfärbung (Hoechst 33342) **B** Apoptotische Aktivität (TUNEL-Assay)

**C** Überlagerung von A und B

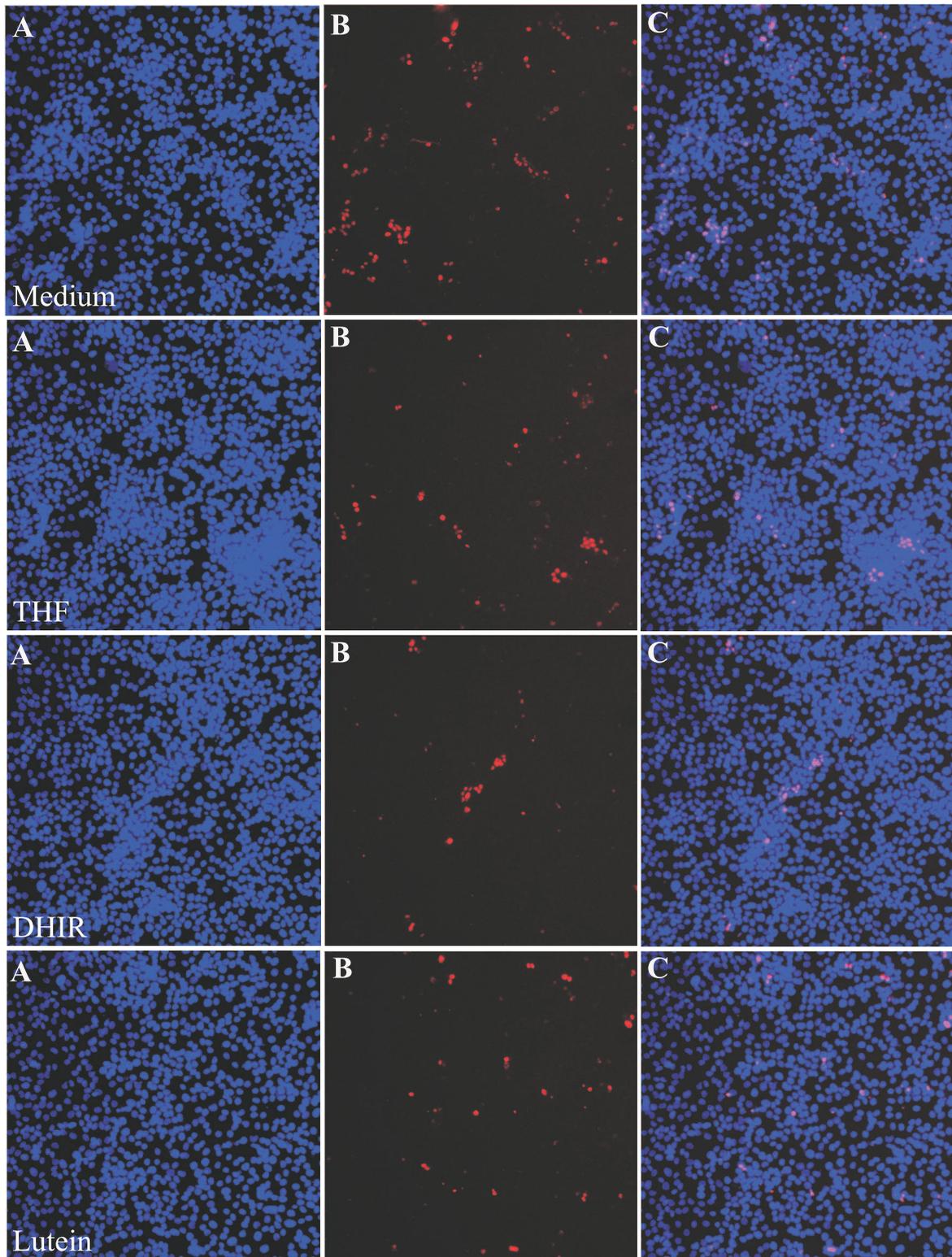


Abbildung 4.7: Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung ( $30 \text{ mJ/cm}^2$ ) und Carotinoid-Behandlung ( $10 \mu\text{M}$ ).

**A** Zellkernfärbung (Hoechst 33342) **B** Apoptotische Aktivität (TUNEL-Assay)

**C** Überlagerung von A und B

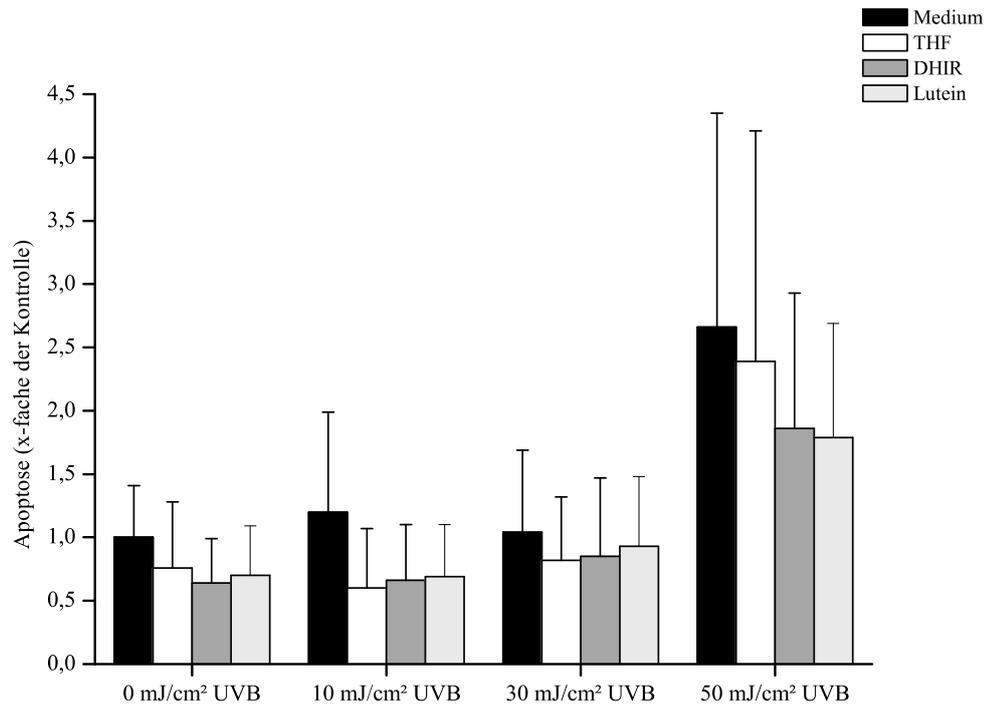


Abbildung 4.8: Apoptotische Aktivität in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Carotinoid-Behandlung (10 µM).  
Kontrolle = unbestrahlte Zellen in Medium, n = 3

## 4.2 Zelluläre Aufnahme und UV-Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen

Um die Wirkung der Carotinoide auf die HaCaT-Zellen bzw. intrazelluläre Signalwege bewerten zu können, ist es notwendig zunächst die Aufnahme der Carotinoide in die Zellen, sowie deren Stabilität bei Bestrahlung zu bestimmen. Alle Untersuchungen in HaCaT-Zellen wurden mit den Carotinoiden DHIR und Lutein durchgeführt. Daher wird die Aufnahme in HaCaT-Zellen auch nur für diese Verbindungen bestimmt. Für die Bestimmung der zellulären Aufnahme werden die Zellen für 24 h mit den Carotinoiden (1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und nach Inkubation mit 10 J/cm<sup>2</sup>, 20 J/cm<sup>2</sup> und 27,5 J/cm<sup>2</sup> UVA bzw. 0,5 J/cm<sup>2</sup> und 1,5 J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Es wird sowohl die Konzentration im Überstand (Zellkulturmedium) als auch die Konzentration in den Zellen bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung im Zellkulturmedium und in den Zellen erfolgt, nach Extraktion der Carotinoide, mittels HPLC. Zur Auswertung werden die Peakflächenverhältnisse der Carotinoide zu einem internen Standard verwendet und die Konzentration über eine Kalibriergerade berechnet.

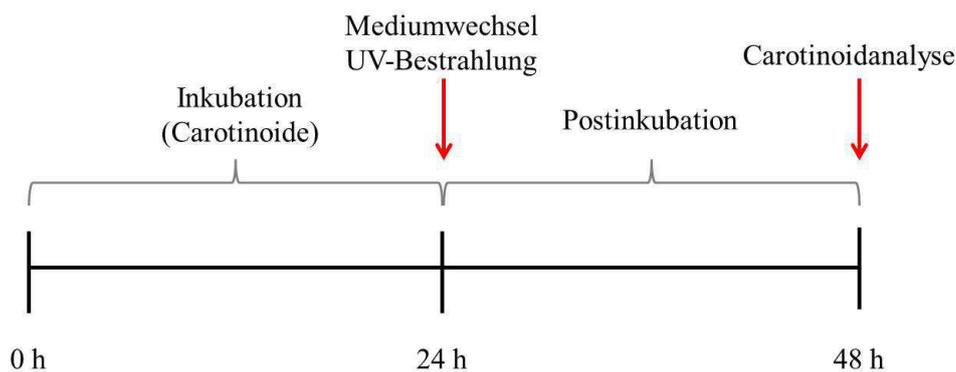


Abbildung 4.9: Zellkulturbedingungen: Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen

### 4.2.1 Zelluläre Aufnahme der Carotinoide

In Abbildung 4.10 A ist die Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Protein dargestellt. Da der Proteingehalt mit der Zellzahl korreliert, wird so die Konzentration indirekt auf die Zellzahl normiert. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Konzentration von DHIR in der Inkubationslösung auch die Konzentration in den Zellen zunimmt. Demnach ist die maximale Aufnahmekapazität der HaCaT-Zellen für das Carotinoid DHIR noch nicht erreicht. Die Luteinkonzentration in den Zellen nimmt ebenfalls mit steigender Konzentration der Inkubationslösung zu, wobei der Konzentrationsanstieg in den Zellen für DHIR deutlich höher ist als für Lutein. Die DHIR-Konzentration in den Zellen ist um das 2 bis 6-fache höher als die entsprechende Luteinkonzentration in den Zellen bei gleicher Konzentration in der Inkubationslösung.

Die DHIR-Aufnahme (in % der Dosis) ist für alle Konzentrationen (1,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) annähernd

gleich, d.h. unabhängig von der Dosis werden ca. 50 % des angebotenen DHIR aufgenommen (siehe Abbildung 4.10 B). Im Gegensatz zu DHIR sinkt die prozentuale Aufnahme von Lutein mit steigender Konzentration der Inkubationslösung statistisch signifikant von 35 % auf unter 10 %.

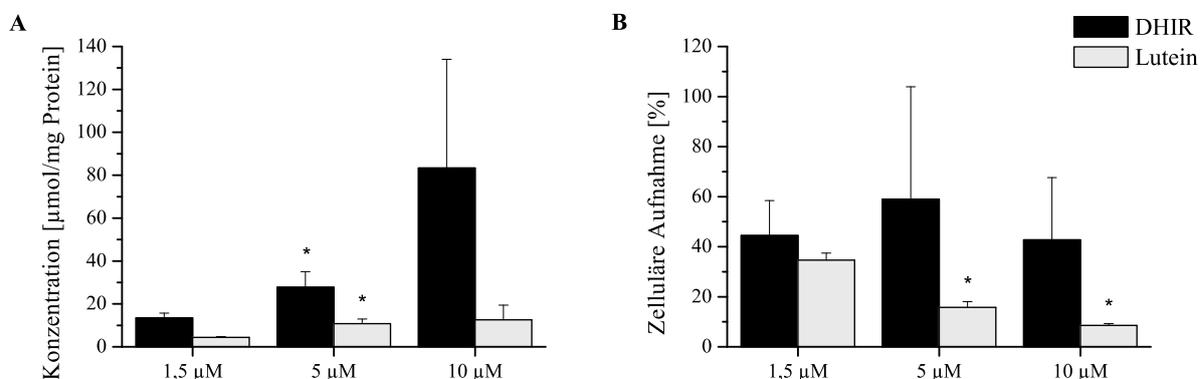


Abbildung 4.10: Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen.

**A**  $\mu\text{mol}/\text{mg Protein}$  **B** % der eingesetzten Menge,  $n = 4$ ; \* $p \leq 0,05$  bezogen auf die jeweils niedrigere Dosis

In Abbildung 4.11 sind die Carotinoidekonzentration in Zellen und Medium addiert und als % der eingesetzten Carotinoide angegeben. Sind die Verbindungen unter den gegebenen Versuchsbedingungen chemisch und metabolisch stabil, sollte die Summe des Carotinoidgehalts (% eingesetzte Menge) in der Zelle und im Zellkulturmedium annähernd 100 % der eingesetzten Menge betragen.

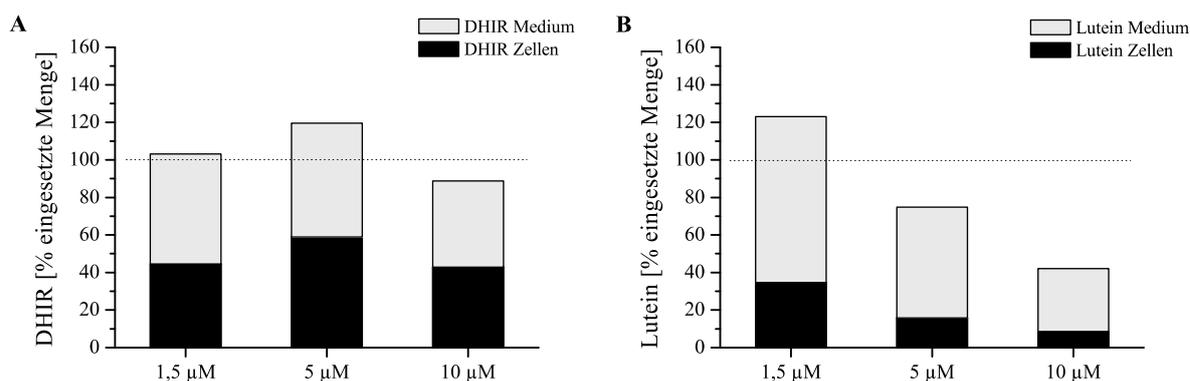


Abbildung 4.11: Carotinoidgehalt in Zellen und Medium (% der eingesetzten Menge)

**A** DHIR **B** Lutein;  $n = 4$

Im Falle von DHIR liegt die Summe der Carotinoidgehalte (in %) bei den Versuchsbedingungen nicht unter 90 % (siehe Abbildung 4.11 A). Das Carotinoide DHIR ist unter den gewählten Versuchsbedingungen stabil. Bei Lutein sinkt die Summe der Carotinoidgehalte jedoch mit steigender Konzentration (siehe Abbildung 4.11 B). Die Verbindung wird im Zellkulturmedium und in den Zellen während der Inkubationszeit abgebaut.

## 4.2.2 Stabilität der Carotinoide in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung

Die Stabilität der Verbindungen in den Zellen unter UV-Bestrahlung in unterschiedlichen Dosen und Wellenlängenbereichen ist in Abbildung 4.12 und 4.13 gezeigt. Hierbei ist der Carotinoid-Gehalt in den bestrahlten Zellen auf den Carotinoid-Gehalt unbestrahlter Zellen unter gleichen Inkubationsbedingungen bezogen. Eine hohe Stabilität unter UV-Bestrahlung ist gegeben, wenn der Carotinoid-Gehalt in bestrahlten Zellen annähernd 100 % des Gehaltes unbestrahlter Zellen ist.

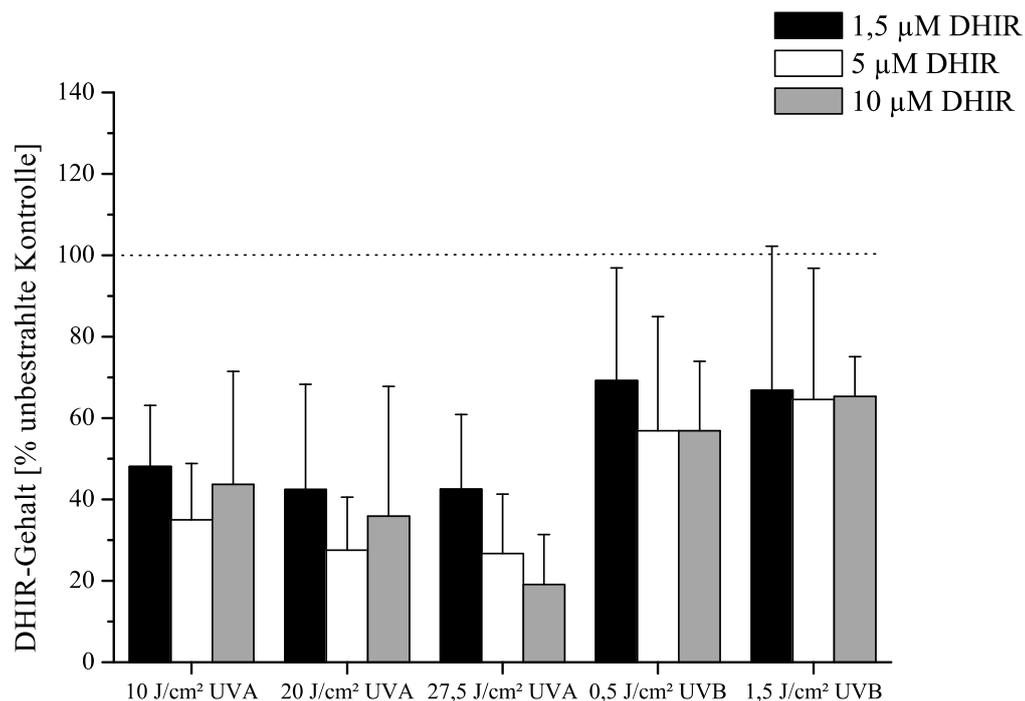


Abbildung 4.12: Stabilität von DHIR in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung.  
Unbestrahlte Kontrolle = 100 %; n = 4

Der DHIR-Gehalt in den Zellen nimmt unter UV-Exposition deutlich ab, wobei die Abnahme bei UVA-Bestrahlung höher ist als bei UVB-Bestrahlung (Abbildung 4.12). In keinem Fall ist jedoch eine statistisch signifikante Änderung in Abhängigkeit von der Dosis zu erkennen.

Im Gegensatz zu DHIR ist bei Lutein weder in UVB-bestrahlten noch in UVA-bestrahlten Zellen eine Abnahme der Konzentration in den Zellen feststellbar. Lutein weist in HaCaT-Zellen eine hohe Stabilität unter UV-Bestrahlung auf (Abbildung 4.13).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass DHIR im Vergleich zu Lutein während der Inkubation im Zellkulturmedium deutlich stabiler ist als Lutein. Zudem wird DHIR von HaCaT-Zellen deutlich besser aufgenommen. Die DHIR-Konzentration in den Zellen ist abhängig von der Konzentration der Inkubationslösung 2 bis 6 mal so hoch wie die von Lutein. In den Zellen zeigt jedoch Lutein eine wesentlich höhere Stabilität unter UV-Bestrahlung als DHIR.

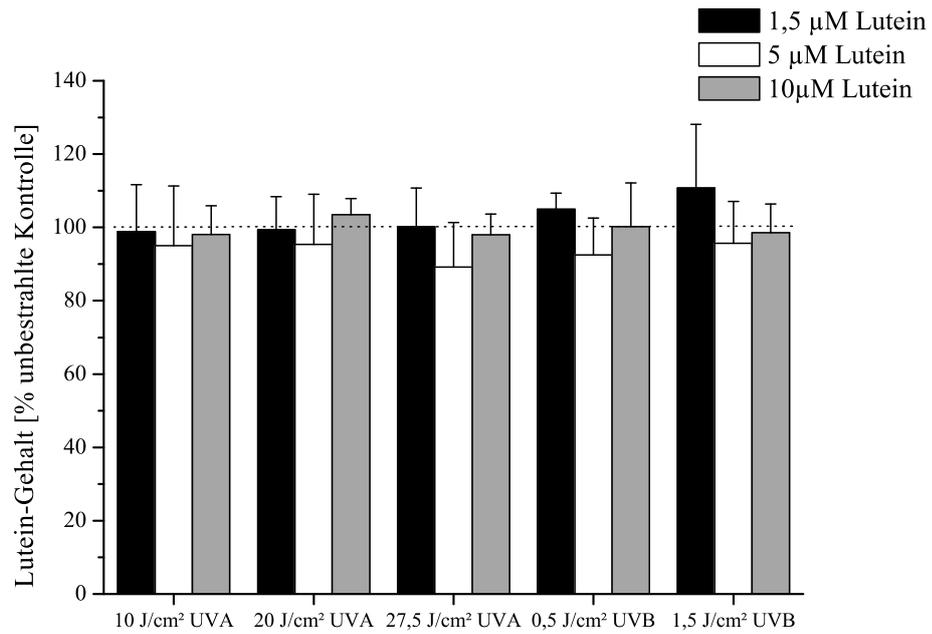


Abbildung 4.13: Stabilität von Lutein in HaCaT-Zellen unter UV-Bestrahlung.  
Unbestrahlte Kontrolle = 100 %; n = 4

## 4.3 DNA-Schäden

Zu den DNA-Schäden zählen u.a. DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie oxidative Basenmodifikationen, welche u.a. durch UVA- oder UVB-Licht induziert werden. DNA-Strangbrüche sind entweder eine direkte Folge der UV-Exposition oder ein Resultat der enzymatischen Exzisionsreparatur geschädigter DNA-Basen (transiente Strangbrüche).

Zur Untersuchung der Schutzwirkung der Verbindungen vor DNA-Schäden werden hdf für 24 h mit den Substanzen (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend werden die Strangbrüche mit verschiedenen Noxen (siehe folgende Abschnitte) induziert und mit Hilfe des alkalischen Comet Assays bestimmt.

### 4.3.1 Alkalischer Comet Assay

Mit dem alkalischen Comet Assay („Single Cell Gel Electrophoresis“) werden DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche in einzelnen Zellen nachgewiesen. Die Ausprägung des Schweifs ist ein Maß für die DNA-Schädigung. Im ersten Versuchsteil wurden die Strangbrüche durch eine Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid (500  $\mu\text{M}$ , 2 h) induziert. Wasserstoffperoxid zählt zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen und wird endogen aus  $\text{O}_2^-$  durch die Superoxiddismutase gebildet (siehe Abschnitt 1.2.1). Die Verbindung kann durch das Enzym Katalase zu Wasser abgebaut werden oder in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  oder anderen Übergangsmetallionen in einer Fenton-Reaktion Hydroxylradikale bilden, welche die DNA oxidativ schädigen können.

Mit Hilfe der Software CometScore™ wurde die „Tail Intensity“ der ausgewählten Zellkerne bestimmt (siehe Abschnitt 3.5). Aus der „Tail Intensity“ wurde der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Comet) berechnet, welcher direkt proportional zum prozentualen Anteil der geschädigten DNA gesetzt wird [93]. In Abbildung 4.14 ist die Auswertung der „Comets“ mit der Software CometScore™ gezeigt. Die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss der Carotinoide auf die Bil-

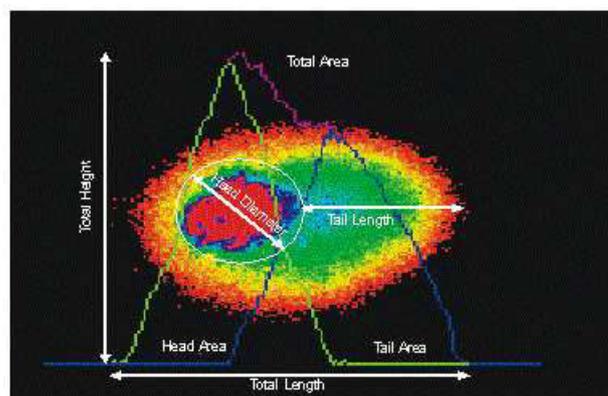


Abbildung 4.14: Auswertung eines „Comets“ mit der Software CometScore™

dung von DNA-Strangbrüchen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Zur Positivkontrolle werden Zellen nur mit Wasserstoffperoxid versetzt und der Anteil geschädigter DNA auf 100 % gesetzt. Ein protektiver Effekt der Verbindungen ist demnach bei Werten unter 100 % gegeben.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit DHIR und IR (10  $\mu\text{M}$ ) führt zu einer statistisch signifikanten Verminderung der DNA-Schädigung, wobei der protektive Effekte von IR etwas stärker (statistisch nicht signifikant) ist als der von DHIR (Abbildung 4.15). Eine Behandlung der Zellen mit Lutein hat keinen Einfluss auf das Ausmaß der DNA-Schädigung durch Wasserstoffperoxid.

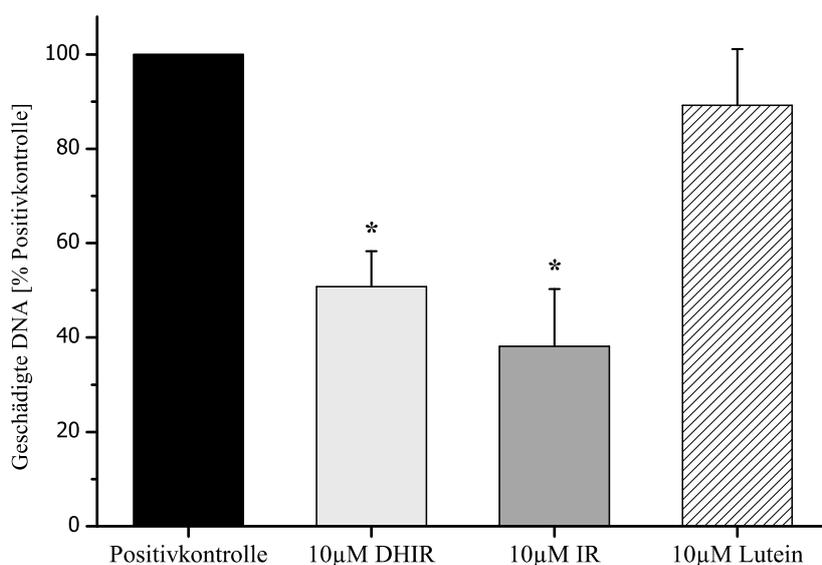


Abbildung 4.15: Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Exposition mit Wasserstoffperoxid (500  $\mu\text{M}$ , 2 h). Positivkontrolle = 500  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid, 2 h (100 %);  $n = 4$ ,  $*p \leq 0,05$  bezogen auf die Positivkontrolle

Im zweiten Versuchsteil wurden die Strangbrüche durch Bestrahlung der Zellen mit 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB-Licht induziert. UVB-Licht kann von den DNA-Basen absorbiert werden und so direkt mit der DNA interagieren. Über eine [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidin-Basen entstehen in der DNA Cyclobutanpyrimidindimere (siehe Abschnitt 1.2.1). Die DNA-Schäden führen bei Exzisionsreparatur zu transienten DNA-Strangbrüchen und können mit dem Comet-Assay nachgewiesen werden.

In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss der Carotinoide auf die Bildung von DNA-Strangbrüchen nach Bestrahlung mit UVB-Licht gezeigt. Die Auswertung erfolgte analog zum ersten Versuchsteil. Die Bestrahlung der Zellen mit 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB-Licht führt zu einem 5-fach höheren Anteil geschädigter DNA verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (0,1 % THF). Bei Vorbehandlung der Zellen mit den Substanzen (10  $\mu\text{M}$ ) sinkt der Anteil UV-geschädigter DNA statistisch signifikant auf durchschnittlich 40 %. In diesem Versuch ist kein Unterschied in der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen zu erkennen.

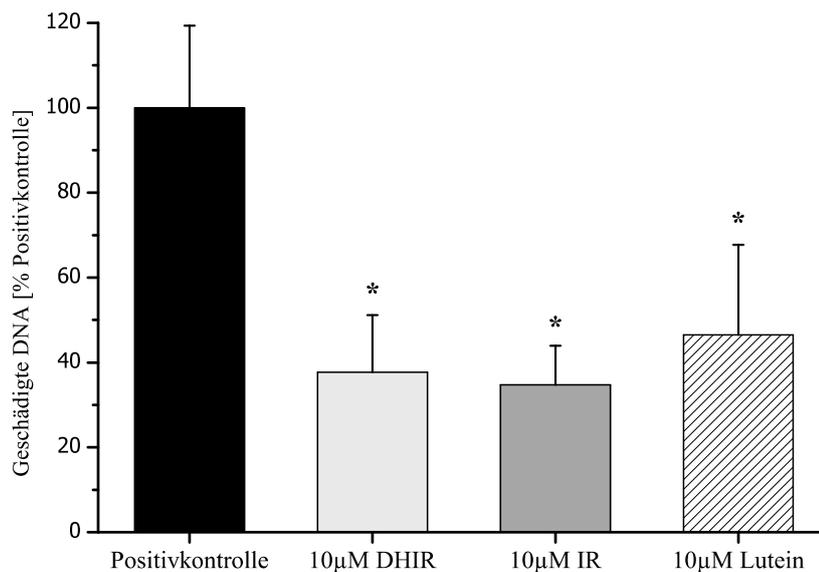


Abbildung 4.16: Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung mit 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. Positivkontrolle = 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB (100 %); Unbestrahlte Kontrolle = 0,1 % THF (7,9 ± 2,1 % DNA im Schweif (Comet)); n = 4, \*p ≤ 0,05 bezogen auf die Positivkontrolle

Im dritten Versuchsteil wurden die Zellen zunächst UVA-Licht (10 J/cm<sup>2</sup>) ausgesetzt. UVA-Licht induziert in Zellen oxidative Schäden, wie u.a. oxidierte DNA-Basen. Die Proben werden vor der Elektrophorese mit dem Enzym 8-Oxoguanin DNA-Glycosylase (hOGG1) behandelt. Das Enzym erkennt selektiv die oxidierten Basen 7,8-Dihydroxy-8-oxoguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) in DNA-Strängen und katalysiert deren hydrolytische Entfernung. Durch die Entfernung entsteht unter den Bedingungen des alkalischen Comet Assays an den Stellen ein DNA-Strangbruch. Eine alleinige Bestrahlung der Zellen mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA-Licht ohne Enzymbehandlung führt zu keinem statistisch signifikanten Anstieg an geschädigter DNA. Der Anteil anderer durch UVA-Bestrahlung ausgelöster DNA-Schäden ist demnach unter diesen Bedingungen zu vernachlässigen.

In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss der Carotinoide auf die Bildung der oxidierten Basen 7,8-Dihydroxy-8-oxoguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) nach UVA-Exposition dargestellt. Die Auswertung erfolgte analog zum ersten Versuchsteil. Eine Vorbehandlung der hdf mit den Verbindungen vermindert den Anteil der oxidierten Basen statistisch signifikant auf durchschnittlich 40 %. Auch in diesem Versuch wurde kein Unterschied in der Wirksamkeit der Carotinoide gegenüber der UVA-Schädigung der DNA nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Behandlung der Zellen mit den aromatischen Carotinoide DHIR und IR in allen drei Versuchsteilen den Anteil geschädigter DNA statis-

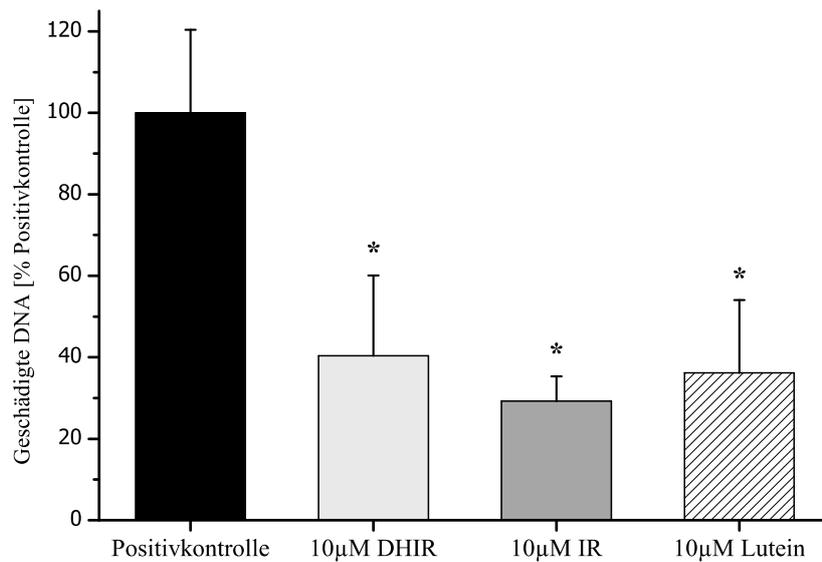


Abbildung 4.17: Alkalischer Comet Assay: DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung mit  $10\text{ J/cm}^2$  UVA und Inkubation mit dem Enzym hOGG1;  $n = 3$ ,  $*p \leq 0,05$  bezogen auf die Positivkontrolle

tisch signifikant vermindern konnte. Für Lutein wurde eine schützende Wirkung gegenüber eines UVB-induzierten DNA-Schadens und gegenüber der Bildung der oxidativ geschädigten DNA-Basen 7,8-Dihydroxy-8-oxoguanin und FapyG gezeigt. Die Schädigung der DNA durch Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid konnte durch Behandlung mit Lutein nicht vermindert werden.

Basierend auf den Ergebnissen wurden weitere Versuche durchgeführt, um die protektive Wirkung der Carotinoide auf DNA-Schäden charakterisieren zu können.

## 4.4 Thymindimere

Thymindimere im DNA-Strang zählen zu den UV-induzierten DNA-Modifikationen. Sie entstehen nach Absorption von UVB- und UVC-Licht in einer [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Thymin-Basen in der DNA. Neben der Bildung von Cyclobutanthymindimeren (siehe Abbildung 4.18) ist auch die Bildung weiterer Photoprodukte (siehe Abschnitt 1.2.1) möglich.

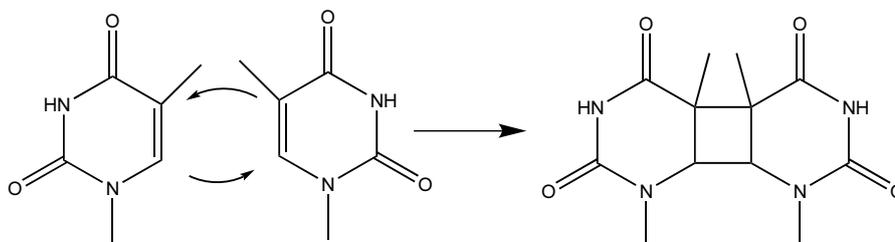


Abbildung 4.18: Bildung von Cyclobutanthymindimeren in einer [2+2]-Cycloaddition

Für die Carotinoide wurde mit Hilfe des Comet Assays ein protektiver Effekt vor UVB-induzierter DNA-Strangbrüche aufgezeigt. Diese entstehen entweder direkt durch UV-Exposition oder indirekt durch Exzisionsreparatur der entstandenen DNA-Schäden. Thymindimere im DNA-Strang zählen zu den UV-induzierten DNA-Modifikationen. Daher soll der Einfluss der Substanzen auf die Bildung von Thymindimeren untersucht werden. Dazu wurden verschiedene *in-vitro* Modellsysteme eingesetzt, die auf dem Nachweis der Thymindimere mittels HPLC beruhen. Die Anwendbarkeit dieser Modelle wurde in Rahmen der Arbeit überprüft.

### 4.4.1 HPLC-Methode zur Bestimmung von Thymindimeren in einem Modellsystem

Strukturelle Voraussetzung für die Bildung von Thymindimeren sind zwei benachbarte Thymin-Basen in der DNA-Sequenz. Um das Modellsystem für die Untersuchung der Thymindimerbildung zunächst möglichst einfach zu halten, wurden die ersten Versuche mit Oligonucleotiden durchgeführt, die in ihrer Sequenz mindestens zwei benachbarte Thymin-Basen enthalten (siehe Tabelle

Verwendete Oligonucleotide	
Oligonucleotid 1	5'-ATCTCCTCTTCTCGTTTCCTC
Oligonucleotid 2	5'-GTGTTGCCTGCTGCCTTC
Oligonucleotid 3	5'-GGTTGG

Tabelle 4.1: Oligonucleotide - Modellsysteme für die Thymindimerbildung

4.1). Es wurden Oligonucleotide unterschiedlicher Länge (6 - 20 Basen) und Position der benachbarten Thymin-Basen untersucht. Neben den o.g. Oligonucleotiden wurden Kalbsthymus-DNA und humane DNA (Extrakt aus mononukleären Zellen - Lymphozyten) als Modellsysteme verwendet.

Die Bestimmung der DNA-Basen und deren Reaktionsprodukte nach Bestrahlung und Hydrolyse der Oligonucleotide wurde per HPLC durchgeführt. Für die Methodenentwicklung und Untersuchung von Thymindimeren ist ein entsprechender Standard nötig, der wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, synthetisiert wurde.

In Abbildung 4.19 **A** ist ein HPLC-Chromatogramm von Thymin, in **B** ein Chromatogramm des Thymindimerstandards und in **C** ein Overlay beider Chromatogramme gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Thymindimere unter diesen Bedingungen mit einer Retentionszeit von etwa 20 Minuten und Thymin mit einer Retentionszeit von etwa 22 Minuten eluieren. Die HPLC-Bedingungen sind geeignet beide Analyte basisliniengetrennt zu detektieren.

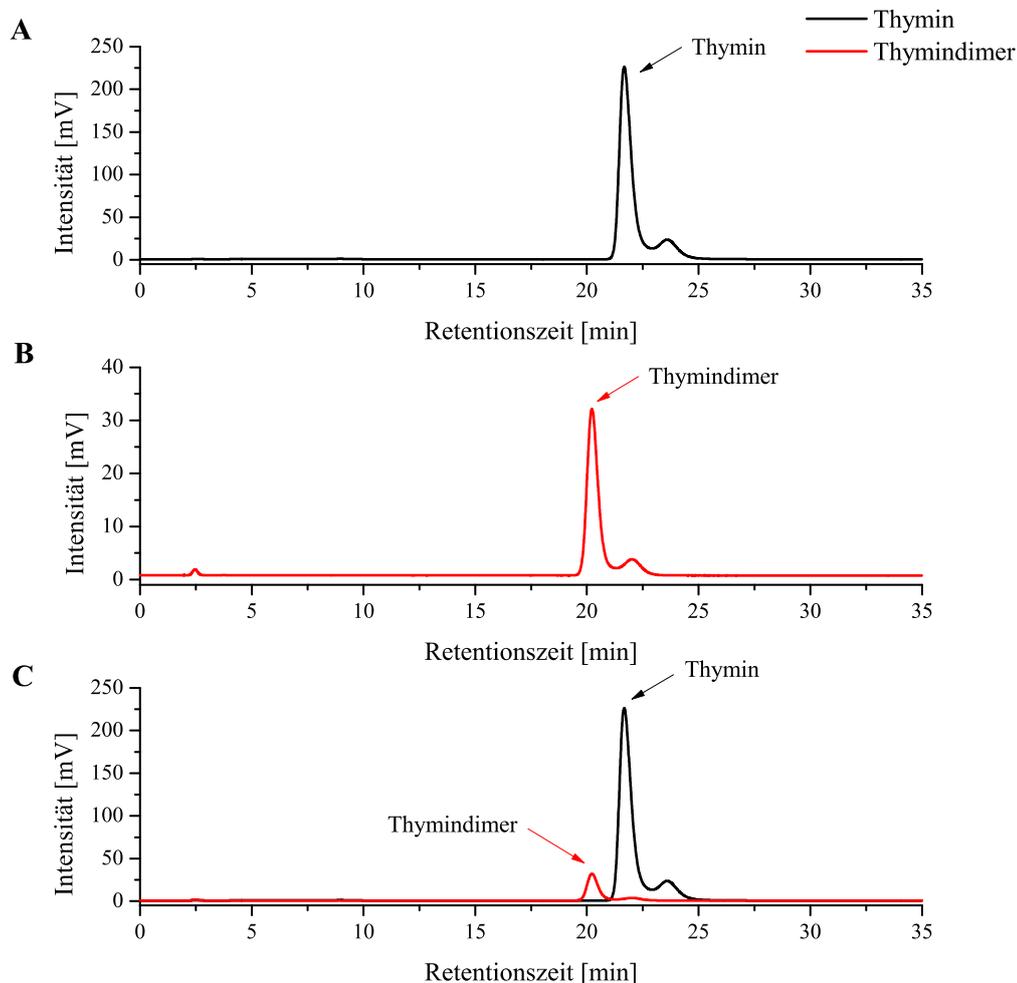


Abbildung 4.19: HPLC-Chromatogramme: **A** Thymin **B** Thymindimer **C** Thymin + Thymindimer  
HPLC-Bedingungen: Säule (RP-18, 250×4,6 mm); Flussrate (1 ml/min); Wellenlänge (220 nm); Laufmittel (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,5))

#### 4.4.1.1 UVB-abhängige Bildung von Thymindimeren

Um die UVB-abhängige Thymindimerbildung zu bestimmen, wurde eine 2 mM wässrige Thyminlösung in gefrorenem Zustand mit verschiedenen UVB-Dosen ( $0,3 \text{ J/cm}^2$ ,  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $1 \text{ J/cm}^2$ ,  $2 \text{ J/cm}^2$  und  $3 \text{ J/cm}^2$ ) bestrahlt. Die Bestrahlung wurde fünfmal wiederholt, wobei nach jeder Bestrahlung eine Probe entnommen wurde. Die UVB-abhängige Thymindimerbildung ist in Abbil-

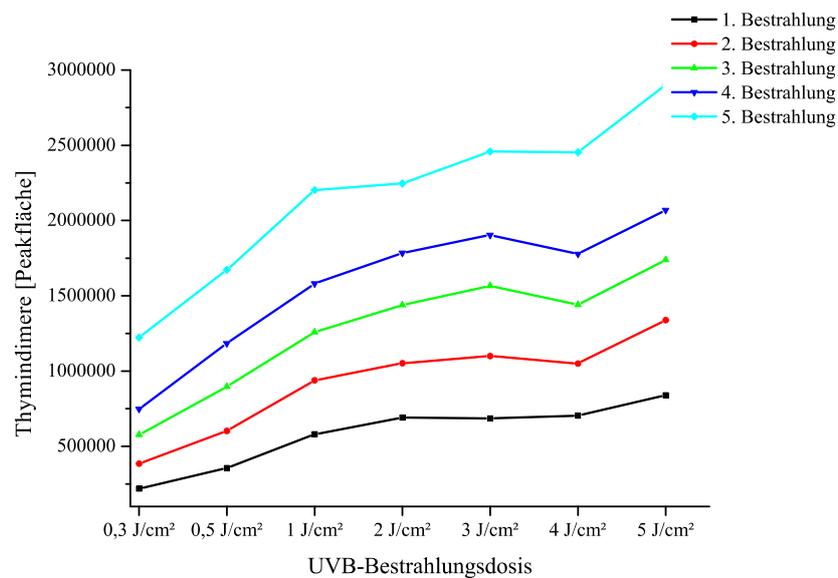


Abbildung 4.20: Thymindimerbildung in wässriger Thyminlösung unter UVB-Exposition

Abbildung 4.20 dargestellt. Es ist eine dosis-abhängige Thymindimerbildung zu erkennen. Außerdem steigt die Thymindimerbildung mit jeder weiteren Bestrahlung an. In Abbildung 4.21 ist ein Chromatogramm aus einem ausgewählten Versuch (5 Bestrahlungen mit je  $1 \text{ J/cm}^2$  UVB) gezeigt. Eine

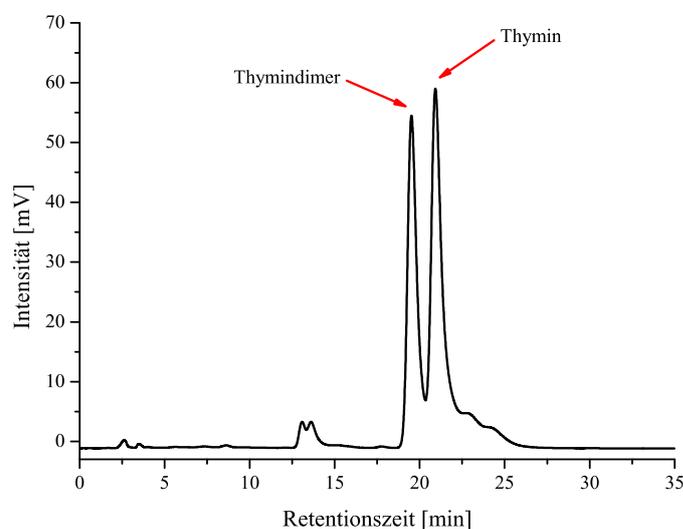


Abbildung 4.21: Thymindimerbildung nach 5maliger Bestrahlung mit  $1 \text{ J/cm}^2$  UVB

Thymindimerbildung wurde eindeutig nachgewiesen. Thymindimere wurden mit dieser Methode bereits bei einmaliger Bestrahlung mit  $0,3 \text{ J/cm}^2$  eindeutig nachgewiesen (siehe Abbildung 4.20).

#### 4.4.1.2 Untersuchung der Thymindimerbildung in Modellsystemen nach UV-Exposition

Um Thymindimere (TT) in den Modellsystemen mit der HPLC-Methode untersuchen zu können, müssen die Oligonucleotide durch Hydrolyse gespalten und die DNA-Basen freigesetzt werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: saure DNA-Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) und eine enzymatische Hydrolyse.

Im ersten Ansatz wurde eine  $100 \mu\text{M}$  wässrige Lösung des Oligonucleotids 1 (siehe Tabelle 4.1) hergestellt. Diese wurde in Quarzküvetten dreimal für jeweils 30 Minuten bei  $254 \text{ nm}$  bestrahlt und wie in Abschnitt 3.6.3.1 beschrieben, unter sauren Bedingungen hydrolysiert.

In Abbildung 4.22 sind die HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 1 nach UV-Exposition (saures Hydrolysat) übereinandergelegt abgebildet. Hierbei zeigt die schwarze Linie das Chromatogramm des bestrahlten Oligonucleotidhydrolysats und die rote das Chromatogramm der Lösung nach Zusatz von Thymindimer-Standard. Es ist zu erkennen, dass die saure Hydrolyse des Oligonucleotids und die Trennung der relevanten DNA-Basen mit der beschriebenen HPLC-Methode möglich ist. Die Basen Adenin, Guanin sowie Thymin sind in dem Chromatogramm zu erkennen. Die DNA-Basen Adenin und Guanin sind nur zu 5 % in dem Oligonucleotid (siehe Tabelle

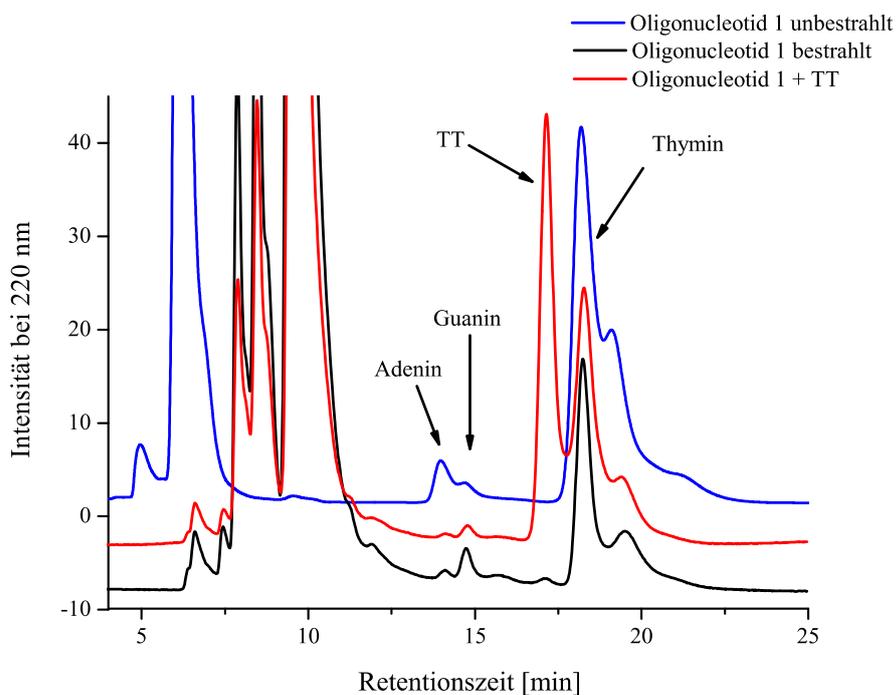


Abbildung 4.22: HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 1 nach UV-Exposition (saures Hydrolysat)

4.1) enthalten, dementsprechend sind auch deren Peakflächen im Vergleich zu Thymin deutlich kleiner. Die ebenfalls im Oligonucleotid enthaltene DNA-Base Cytosin ist unter diesen HPLC-Bedingungen nicht nachzuweisen, da sie mit dem Lösungsmittelpeak (RT = 6 min) koeluiert.

Anhand der Chromatogramme ist weiter zu erkennen, dass die Thymindimerbildung durch Bestrahlung des Oligonucleotids unter den gewählten Bedingungen nur gering und mit der beschriebenen HPLC-Methode nicht mit der notwendigen Empfindlichkeit nachweisbar ist.

Im nächsten Versuch wurde ein Oligonucleotid annähernd gleicher Länge, aber mit anderen Positionen der benachbarten Thymin-Basen untersucht. Ziel war es zu untersuchen, ob diese strukturelle Veränderung zu einer vermehrten Bildung von Thymindimeren führt.

In Abbildung 4.23 sind die HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 2 (siehe Tabelle 4.1) nach UV-Exposition (saurer Hydrolysat) übereinandergelegt dargestellt. Die blaue Linie zeigt das Chromatogramm des unbestrahlten Oligonucleotids, die schwarze des bestrahlten und die rote Linie des mit Standard dotierten Oligonucleotids. In diesem Fall wurde ebenfalls eine 100 µM wässrige Lösung des Oligonucleotids 2 (siehe Tabelle 4.1) hergestellt und mit 2 J/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Diese Bestrahlungsdosis induziert in gefrorener Thyminlösung eine deutliche Thymindimerbildung (Abbildung 4.20). Die saure Hydrolyse erfolgte analog zu Oligonucleotid 1. Die DNA-Basen Guanin und Thymin sind in dem Chromatogramm deutlich zu erkennen. Eine UV-induzierte Thymindimerbildung war aber auch unter diesen Bedingungen nicht mit der notwendigen Empfindlichkeit nachweisbar.

Zusätzlich zu den o.g. Oligonucleotiden wurde Kalbsthymus-DNA (KT-DNA) als weiteres Modellsystem verwendet. Es wurde eine wässrige Lösung hergestellt, welche mit 2 J/cm<sup>2</sup> UVB be-

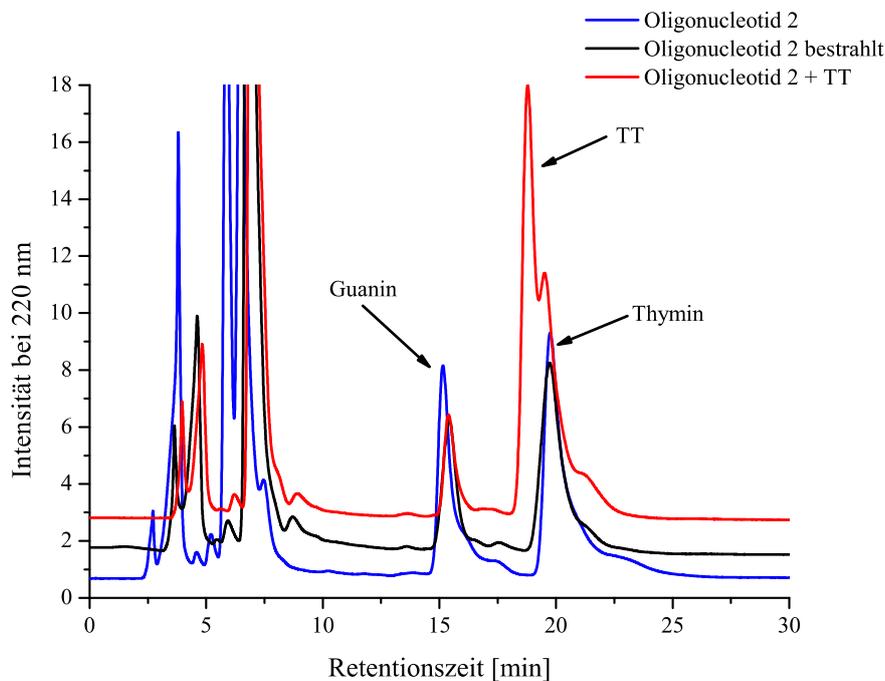


Abbildung 4.23: HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 2 nach UV-Exposition (saurer Hydrolysat)

strahlt und sauer hydrolysiert wurde.

In Abbildung 4.24 **A** sind Chromatogramme übereinandergelagert dargestellt, wobei die schwarze Linie die unbestrahlte Probe und die rote die bestrahlte Probe repräsentiert. In **B** sind die Chromatogramme der beiden, mit Standard dotierten Proben, übereinandergelagert abgebildet. Auch hier sind die DNA-Basen Adenin, Guanin und Thymin deutlich zu erkennen, ein Nachweis der UVB-abhängigen Thymindimerbildung konnte aber auch in diesem Modellsystem nicht mit der notwendigen Empfindlichkeit erbracht werden.

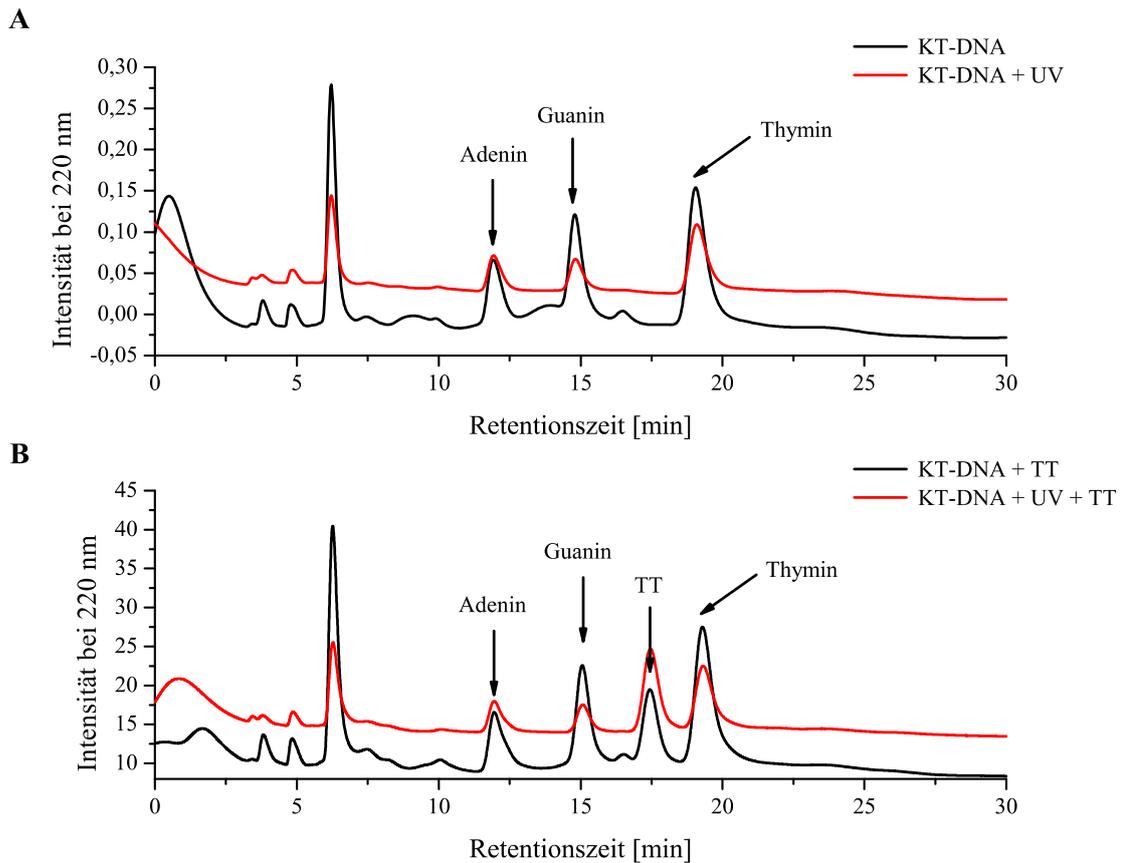


Abbildung 4.24: HPLC-Chromatogramme der Kalbsthymus DNA (saures Hydrolysat) nach UV-Exposition: **A** Originalprobe **B** Dotierte Probe

Im zweiten Ansatz wurde die Thymindimerbildung in einem kurzen Oligonucleotid (6 Basen) untersucht. Ziel war es herauszufinden, ob bei schonender Hydrolyse der Nachweis der Thymindimerbildung mittels HPLC möglich ist. Dazu wurde eine wässrige Lösung von Oligonucleotid 3 (siehe Tabelle 4.1) für 40 Minuten mit UVC bzw. mit  $2 \text{ J/cm}^2$  UVB bestrahlt. Die bestrahlten Proben wurden enzymatisch aufgearbeitet (siehe Abschnitt 3.5) und in die HPLC injiziert.

In Abbildung 4.25 sind die Chromatogramme des Oligonucleotids 3 (siehe Tabelle 4.1) nach UV-Exposition (enzymatisches Hydrolysat) dargestellt. In **A** sind Chromatogramme der Proben gezeigt, wobei die blaue Linie die unbestrahlte Probe, die schwarze Linie die mit  $2 \text{ J/cm}^2$  UVB bestrahlte Probe und die rote Linie die mit UVC bestrahlte Probe repräsentiert. In **B** sind die Chromatogramme der dotierten Proben abgebildet. Das Oligonucleotid 3 besteht ausschließlich aus

den DNA-Basen Guanin und Thymin. Dementsprechend sind in den Chromatogrammen nur diese DNA-Basen wiederzufinden. Die Methode der HPLC-Analyse nach enzymatischer Hydrolyse der DNA ist für die Aufarbeitung prinzipiell geeignet. Eine Thymindimerbildung nach UV-Exposition konnte aber auch in diesem Modellsystem nicht mit der notwendigen Empfindlichkeit nachgewiesen werden.

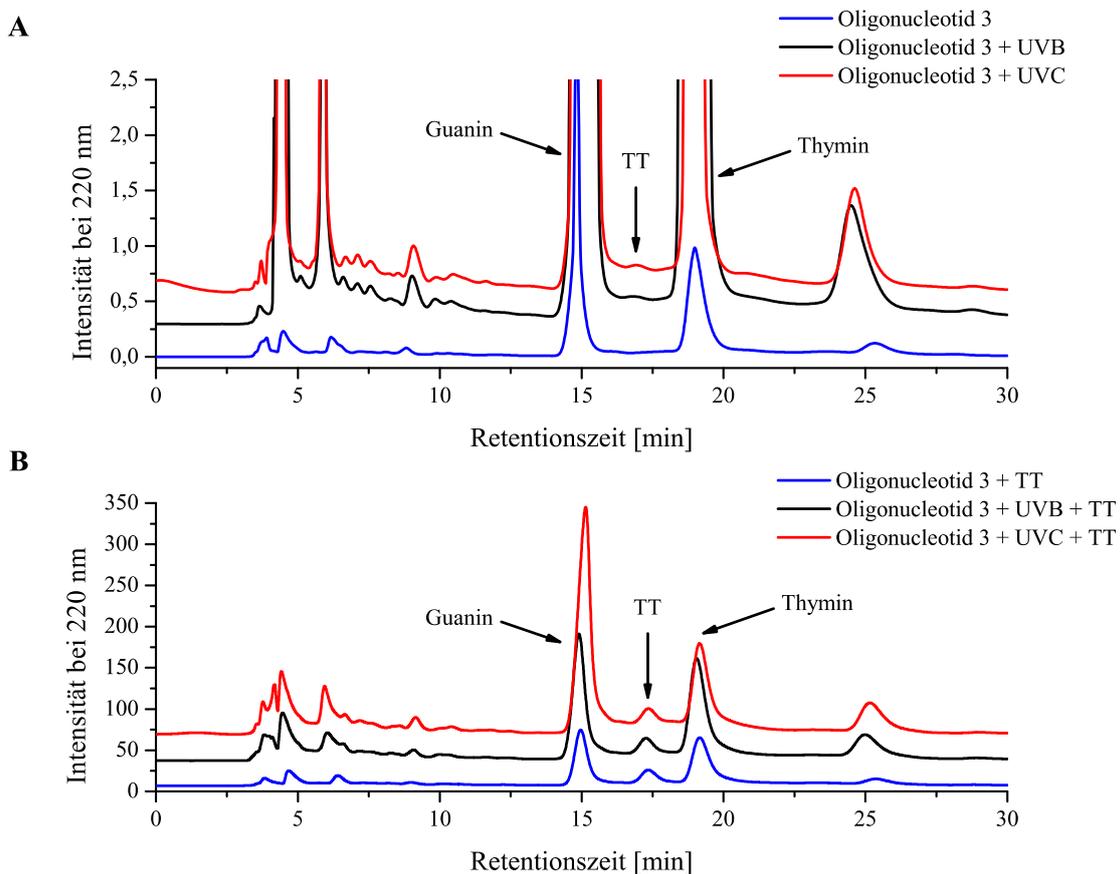


Abbildung 4.25: HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids 3 (enzymatisches Hydrolysat) nach UV-Exposition: **A** Originalproben **B** Dotierte Proben

Nachdem es nicht möglich war eine Thymindimerbildung in den verwendeten Oligonucleotiden und Kalbsthymus-DNA nachzuweisen, wurde als letzter Versuch die Thymindimerbildung in humaner DNA (Extrakt) nach UV-Exposition untersucht. Für die Bestimmung der UV-induzierten Thymindimerbildung in humaner DNA (Extrakt) wurden zunächst mononukleäre Zellen (Lymphozyten) aus Vollblut isoliert. Aus den mononukleären Zellen wurde mit einem DNA-Extraktions-Kit (QIamp DNA Mini Kit) nach dem Spin-Protokoll die DNA extrahiert. Die so erhaltene wässrige DNA-Lösung wurde mit UVC-Licht bestrahlt, enzymatisch hydrolysiert und das Hydrolysat mittels HPLC analysiert.

In Abbildung 4.26 **A** ist das HPLC-Chromatogramm der UVC-behandelten Probe gezeigt. Die DNA-Basen Adenin, Guanin und Thymin sind eindeutig zu identifizieren, d.h. die Methode der enzymatischen DNA-Hydrolyse ist auf menschliche Blutproben anwendbar.

In Abbildung 4.26 **B** ist das Chromatogramm einer mit Thymindimer dotierten Probe dargestellt. Der Vergleich mit der undotierten Probe zeigt, dass auch dieses Modell nicht sensitiv genug ist, um Thymindimere nachzuweisen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit den vorgestellten Modellen eine UV-induzierte Thymindimerbildung weder in Oligonucleotiden, Kalbsthymus-DNA noch in menschlicher DNA aus mononukleären Zellen eindeutig nachgewiesen wurden. Die Sensitivität des verwendeten HPLC-Systems reicht nicht aus, um die sehr geringen Mengen an Thymindimeren qualifizieren bzw. quantifizieren zu können. Daher wurde für den Nachweis der UV-induzierten Thymindimerbildung in Oligonucleotiden ein Immunblot Verfahren (Dot Blot) herangezogen.

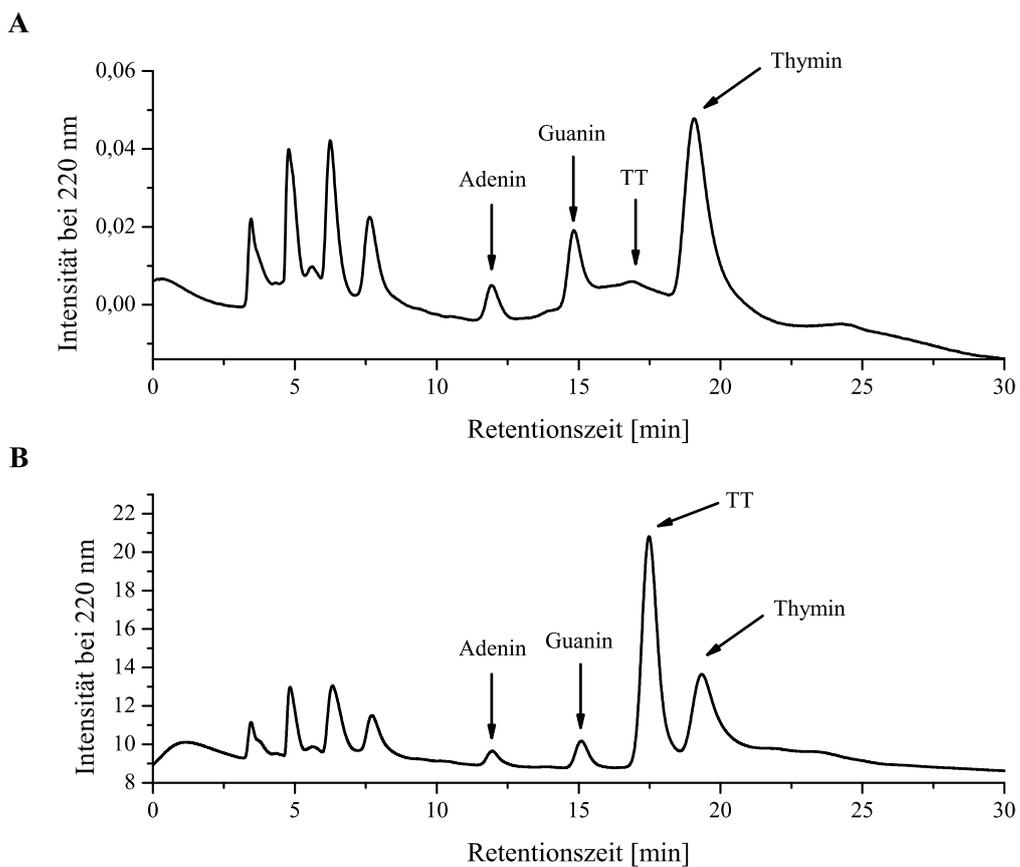


Abbildung 4.26: HPLC-Chromatogramme der humanen DNA (enzymatisches Hydrolysat) nach UV-Exposition

### 4.4.2 Dot Blot

Der Dot Blot gehört zu den Immunoassays und ist eine im Vergleich zu anderen Blot-Methoden vereinfacht, da die Probe ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung punktförmig auf eine Trägermembran aufgetragen wird. In diesem speziellen Fall ist die Zielstruktur die DNA und Modifikation werden über eine Antikörper-Reaktion nachgewiesen.

Der verwendete primäre Antikörper bindet spezifisch mit (5'-6')-Cyclobutanpyrimidindimeren der Basen Thymin und Cytosin. Mit diesem Assay werden daher anders als mit der zuvor beschriebenen HPLC-Methode neben den Thymindimeren auch Heterodimere der beiden Basen und das Homodimer der DNA-Base Cytosin nachgewiesen. Diese Dimere werden im Folgenden mit dem Begriff Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) beschrieben.

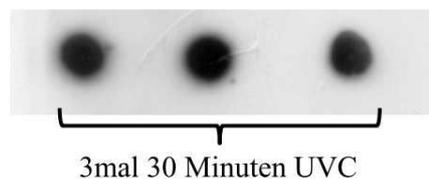


Abbildung 4.27: Dot Blot: UV-abhängige CPD-Bildung im Oligonucleotid 1

Zum Nachweis der CPD-Bildung in Oligonucleotiden nach UV-Exposition, wurde das Oligonucleotid 1 (siehe Tabelle 4.1) dreimal für 30 Minuten mit UVC-Licht bestrahlt. Mit Hilfe des Dot Blots konnte eine CPD-Bildung nach UVC-Exposition eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 4.27). In unbestrahlten Zellen wurde keine CPD-Bildung gezeigt.

Um die Bildung von CPDs in hdF nach UV-Exposition untersuchen zu können, wurden hdF verschiedenen UVB-Dosen ausgesetzt und die DNA mit einem DNA-Extraktions-Kit (QIAamp DNA Mini Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die DNA wird anschließend wie in Abschnitt 4.29 beschrieben, auf eine Trägermembran aufgetragen und die CPDs immunochemisch bestimmt. Es konnte auch in hdF eine dosisabhängige Bildung von CPDs gezeigt werden (Abbildung 4.28). In unbestrahlten Zellen wurden keine CPDs nachgewiesen. Um die Ergebnisse aus den drei Versuchen miteinander vergleichen zu können, wurde das CPD-Signal nach einer Bestrahlung der Zellen mit  $300 \text{ mJ/cm}^2$  auf 1 gesetzt und alle weiteren Ergebnisse darauf bezogen.

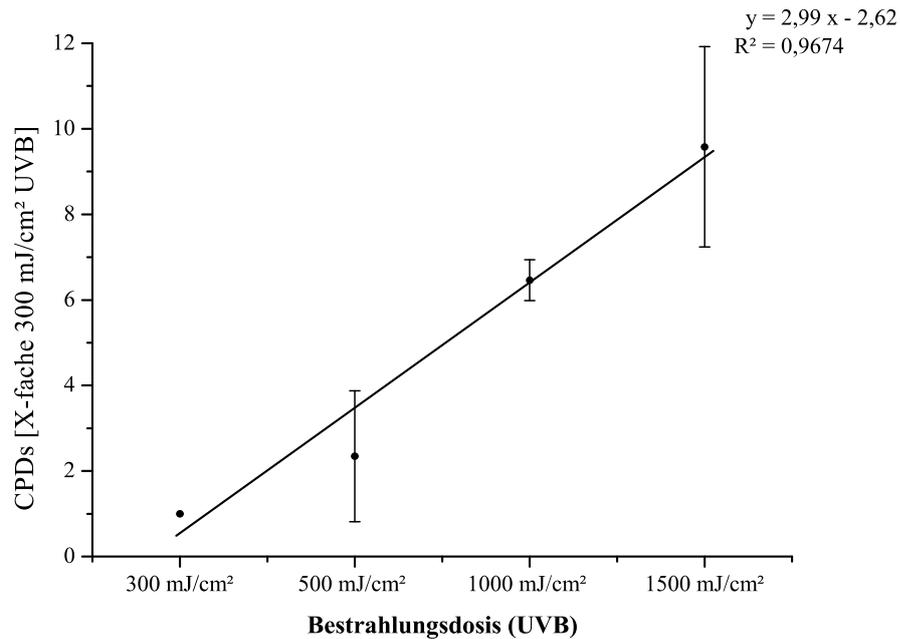


Abbildung 4.28: Dot Blot: UVB-abhängige CPD-Bildung in hF  
 CPDs (300 mJ/cm<sup>2</sup>) = 1, n = 3

Nachdem eine dosisabhängige CPD-Bildung in hF gezeigt werden konnte, wurde als nächstes der Einfluss der Carotinoide auf die CPD-Bildung nach UV-Exposition untersucht.

In Abbildung 4.29 ist beispielhaft ein Blot von DNA-Proben aus hF nach UVB-Bestrahlung abgebildet. Von jeder Bestrahlungsdosis sind die Blots der Kontrollzellen (0,1 % THF) und der mit DHIR behandelten Zellen dargestellt. Bei unbestrahlten Zellen ist noch keine CPD-Bildung zu erkennen, wohingegen bei einer Bestrahlung mit 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bereits eine deutliche CPD-Bildung zu sehen ist. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung aus einer Dreifachbestimmung sind in Abbildung 4.30 gezeigt.

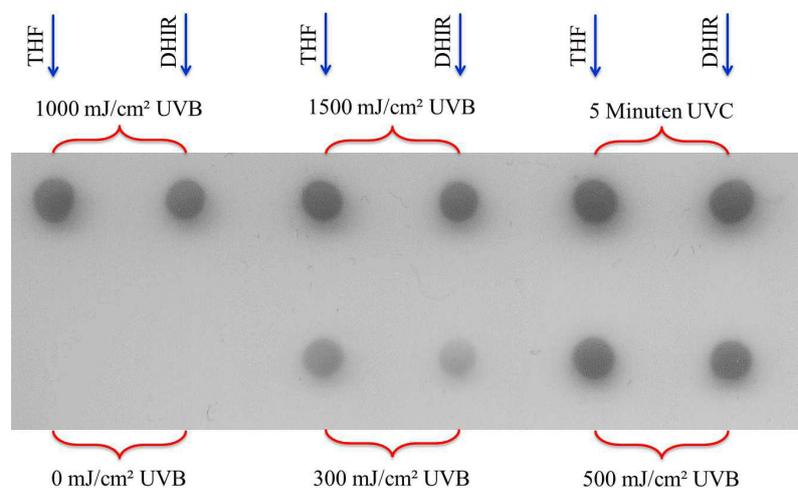


Abbildung 4.29: Dot Blot: UV-abhängige CPD-Bildung nach Behandlung mit DHIR in hF

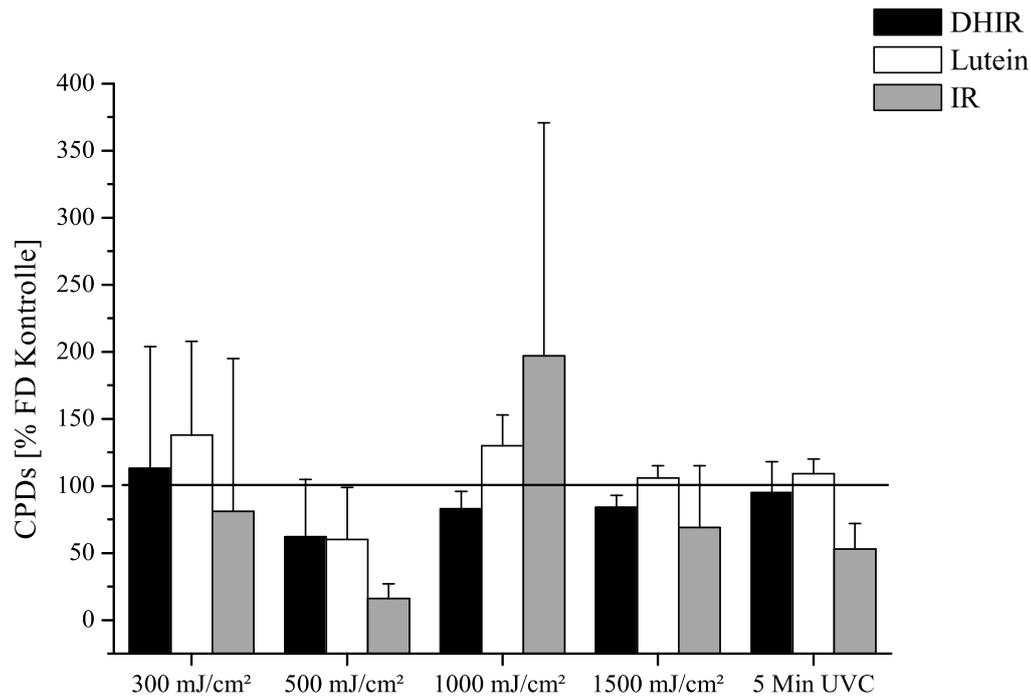


Abbildung 4.30: Bildung von CPDs in hdF nach UVB-Bestrahlung; Kontrolle = 0,1 % THF

Die Farbdichte (FD) der Dot Blot Signale wurde für die Auswertung jeweils auf die DNA-Konzentration normiert.

Während eine dosisabhängige CPD-Bildung in hdF mit dieser Methode eindeutig nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 4.28), konnte eine Veränderung der CPD-Bildung durch die Carotinoide nicht eindeutig gezeigt werden (siehe Abbildung 4.30). Die Ergebnisse der Dot Blot Methode unterliegen beträchtlichen Schwankungen und geben daher nur einen Hinweis darauf, dass die Substanzen, insbesondere DHIR und IR, einen schützenden Effekt gegen die UV-induzierte CPD-Bildung ausüben.

Um den Einfluss der Carotinoide auf die Bildung von CPDs in hdF nach UV-Exposition weiter zu untersuchen, wurde eine immunzytochemische Färbung in den Zellen selbst mit dem primären Antikörper durchgeführt, der bereits für die Dot Blot Methode verwendet wurde.

### 4.4.3 Immunzytochemische Färbung (Immunostaining)

Die immunzytochemische Färbung (Immunostaining) ist eine Methode zur Bestimmung von Antigenen in fixierten Zellen. Antigene, in diesem Fall CPDs werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern über eine Antigen-Antikörper Wechselwirkung nachgewiesen. Um den Einfluss der Verbindungen auf die UV-induzierte CPD-Bildung untersuchen zu können, wurden die hdF für 24 h mit den Carotinoiden (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend verschiedenen UV-Dosen ausgesetzt. Die Färbung wurde zum einen unmittelbar nach Bestrahlung (0 h Postinkubation) und zum anderen nach 24 h Postinkubation durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop und anschließender densitometrischer Auswertung der Bilder mit ImageJ.

In Abbildung 4.31 und 4.32 sind mikroskopische Aufnahmen der immunzytochemischen Färbung in hdF gezeigt, wobei die blau eingefärbten Bereiche die DNA im Zellkern und die rot eingefärbten die CPDs zeigen.

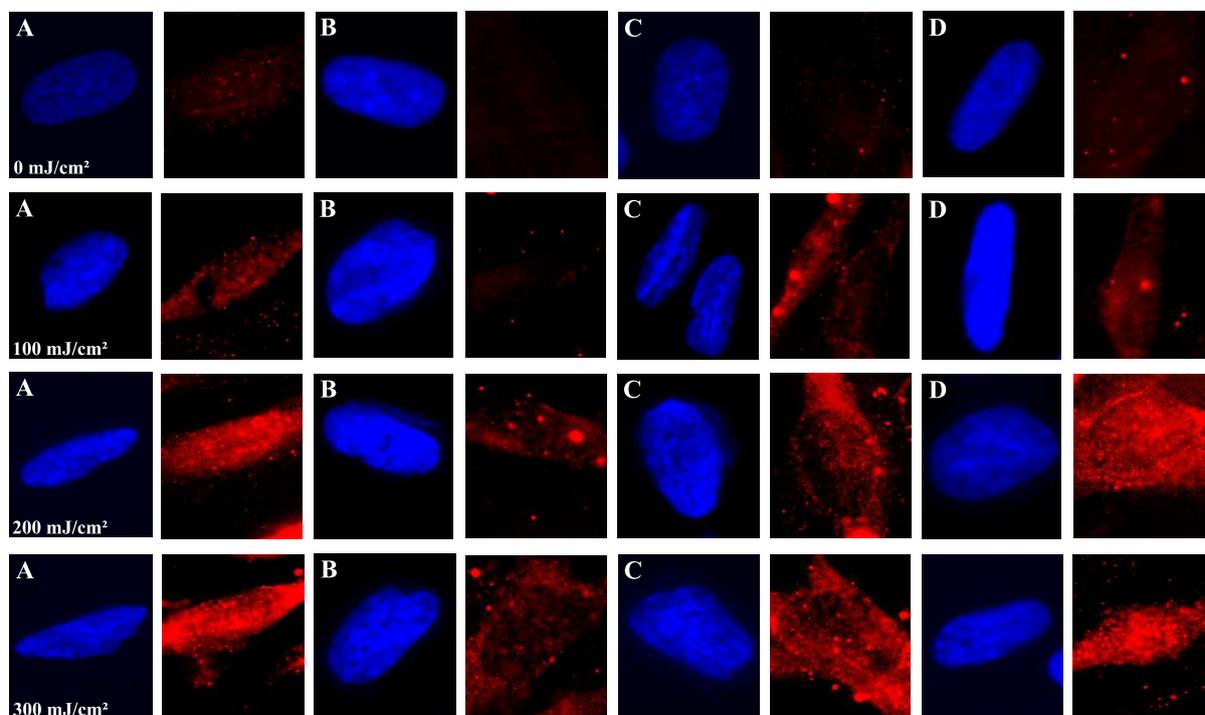


Abbildung 4.31: Bildung von CPDs in hdF unmittelbar nach UV-Bestrahlung (0 h):

A Kontrollzellen B 10  $\mu\text{M}$  DHIR, C 10  $\mu\text{M}$  IR D 10  $\mu\text{M}$  Lutein

In Abbildung 4.33 sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der UV-induzierten CPD-Bildung in hdF dargestellt. Auch mit dieser Methode wurde eine dosis-abhängige CPD-Bildung in hdF gezeigt (siehe Abbildung 4.33 A). Die Hintergrundfärbung unbestrahlter Kontrollzellen (0,1 % THF) beträgt  $11,7 \pm 2,9$  FD (Farbdichte). In B ist das CPD-Level nach 0 h Postinkubation in hdF bezogen auf bestrahlte Kontrollzellen, welche auf 100 % gesetzt wurden, gegen die UVB-Dosen abgebildet. Bei allen gewählten UVB-Dosen ist eine statistisch signifikante Verminderung der CPD-Bildung in Zellen, die mit den aromatischen Carotinoiden (IR, DHIR) behandelt wurden, zu erkennen. Beide Carotinoide zeigen somit in diesem Modellsystem protektive

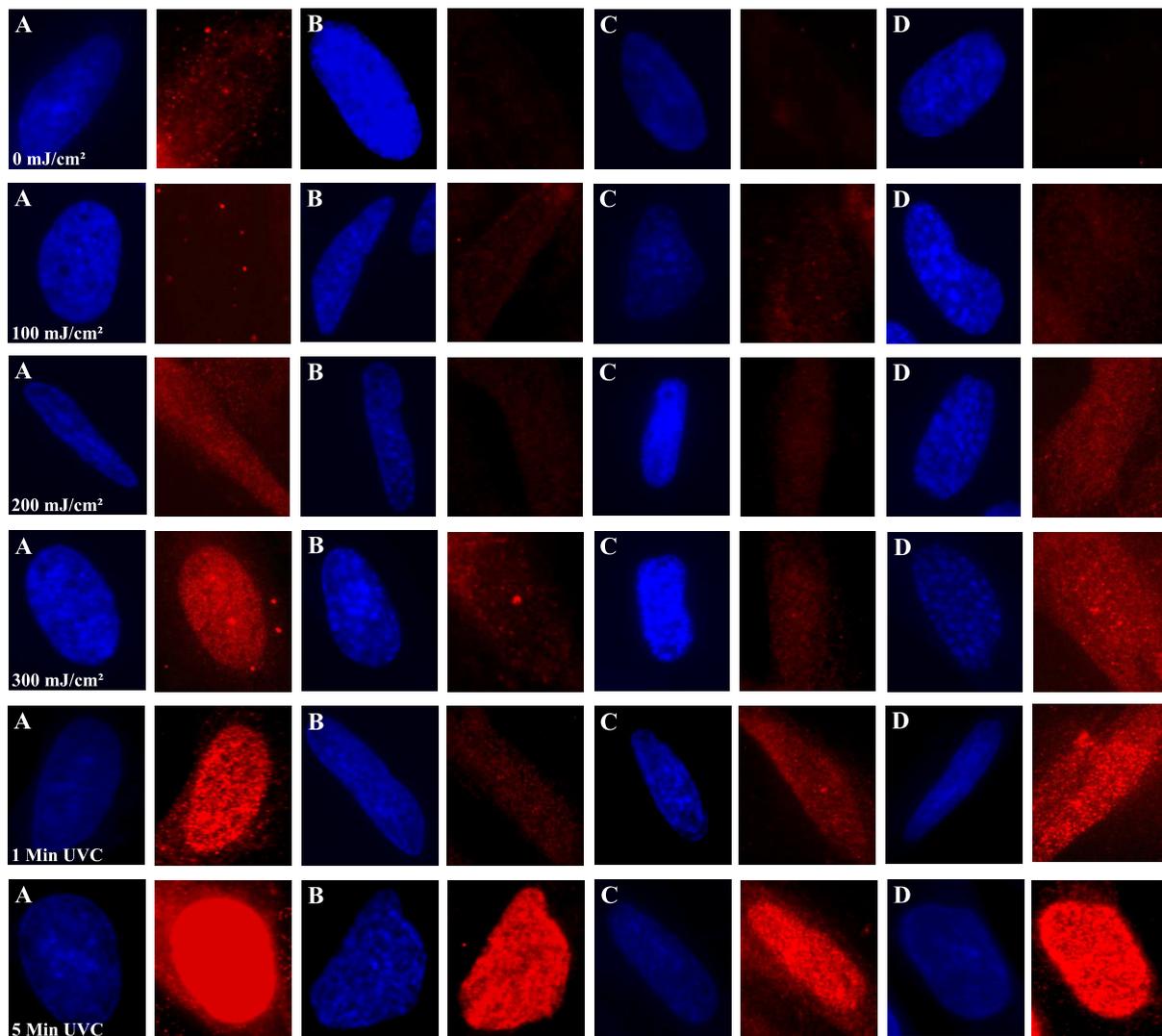


Abbildung 4.32: Bildung von CPDs in hF nach UV-Bestrahlung und 24 h Postinkubation:  
 A Kontrollzellen B 10 µM DHIR, C 10 µM IR D 10 µM Lutein

Effekte gegenüber der CPD-Bildung, wobei der Effekt des DHIRs etwas stärker ist. Das nicht-aromatische Carotinoid Lutein zeigt keinen Effekt auf die UV-abhängige CPD-Bildung. In C ist die CPD-Bildung in den hF nach 24 h Postinkubation abgebildet. Der schwarze Balken repräsentiert hierbei das jeweilige CPD-Level der bestrahlten Kontrollzellen nach 0 h Postinkubation. Es ist zu sehen, dass nach 24 h bereits teilweise eine Reparatur erfolgt ist, aber noch etwa 80 % der gebildeten CPDs vorhanden sind. Nach 24 h ist der protektive Effekt der aromatischen Carotinoide nur noch für DHIR bei den UVB-Dosen 200 mJ/cm<sup>2</sup> und 300 mJ/cm<sup>2</sup> statistisch signifikant. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit der immunzytochemischen Färbung sowohl eine dosisabhängige Thymindimerbildung als auch der Einfluss der Carotinoide auf die UV-induzierte Thymindimerbildung in hF gezeigt wurde. Durch die Untersuchung der beiden Zeitpunkte (0h, 24h) konnte auch der Einfluss der Reparatur abgeschätzt werden.

Die aromatischen Carotinoide (DHIR, IR) zeigen in diesem Modellsystem einen statistisch signifikanten protektiven Effekt gegen UV-induzierte Thymindimerbildung.

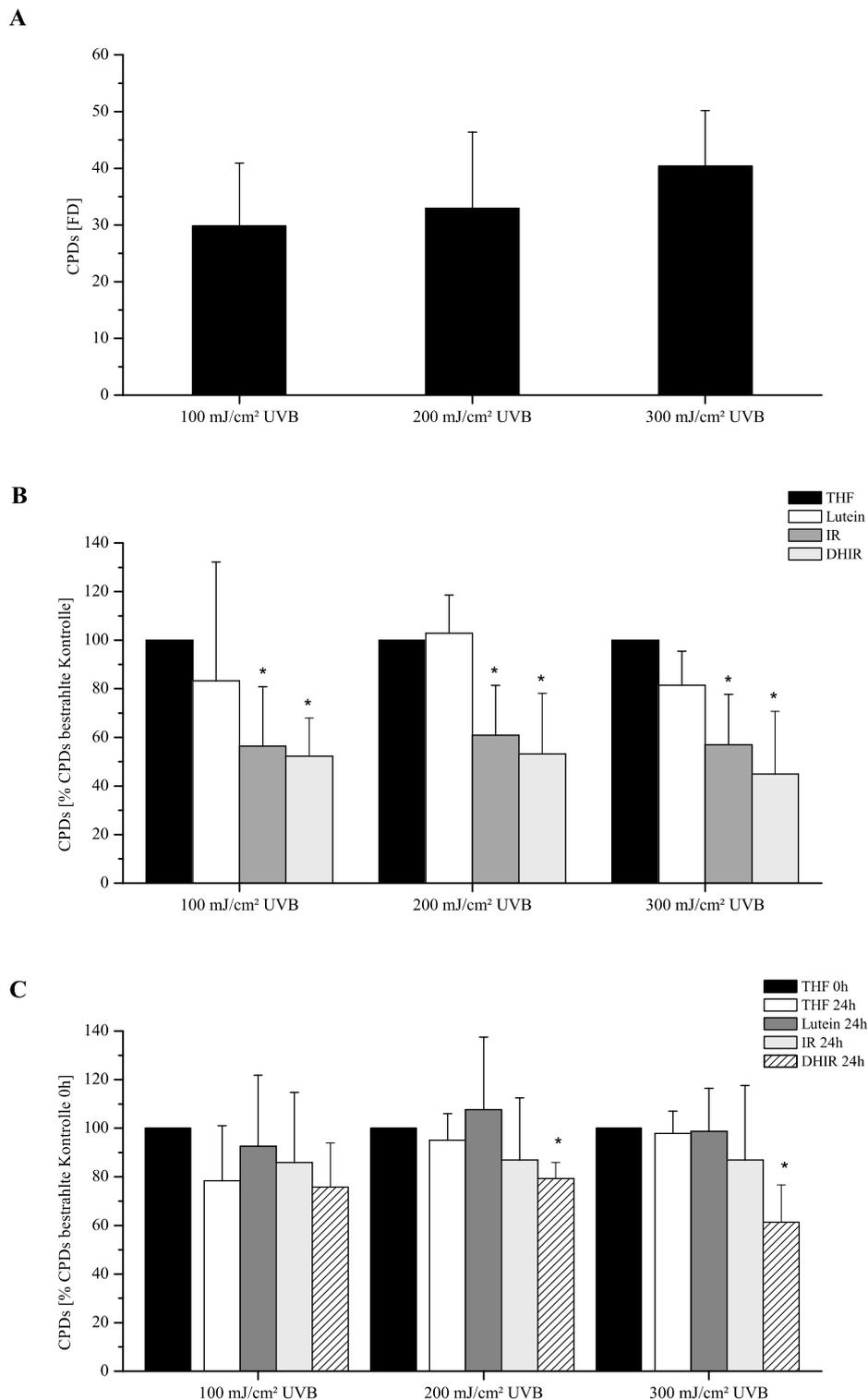


Abbildung 4.33: Bildung von CPDs in hdF nach UVB Bestrahlung: **A** dosis-abhängige CPD-Bildung, die Hintergrundfärbung unbestrahlter Kontrollzellen beträgt  $11,7 \pm 2,9$  FD **B** CPD-Level nach 0 h in hdF bezogen auf bestrahlte Kontrollzellen **C** CPD-Level nach 24 h in hdF bezogen auf bestrahlte Kontrollzellen nach 0 h (schwarze Balken); , n=3, \* $p \leq 0,05$  bezogen auf jeweilige Kontrollzellen

## 4.5 UV-induzierte Entzündungsreaktionen

Das UV-induzierte Erythem ist eine primäre Entzündungsreaktion der Haut als Folge von UV-induzierten Schäden. Diese Entzündungsreaktion soll im Modellsystem (Zellkultur) anhand verschiedener Entzündungsparameter untersucht werden. In Abschnitt 4.3 und 4.4 konnten protektive Wirkungen der aromatischen Carotinoide, insbesondere DHIR auf UV-induzierte DNA-Schäden gezeigt werden. Im Rahmen biologischer Photoprotektion ist es wünschenswert die Zell-Schäden und somit die Entstehung des Erythems zu verhindern. Nicht erstrebenswert ist es eine bereits initiierte Erythembildung zu unterdrücken. Es soll daher untersucht werden, ob das aromatische Carotinoid DHIR sowie das nicht-aromatische Carotinoid Lutein die Entzündungsreaktion nach UV-Einwirkung modulieren.

Für die Untersuchung der UV-induzierten Entzündungsreaktion wurden Keratinozyten verwendet, da UV-induzierte Zytokine (als Entzündungsmarker) vor allem von Keratinozyten und Langerhans-Zellen freigesetzt werden [73, 102]. HaCaT-Zellen sind als immortalisierte, nicht tumorigene Zelllinie humaner Epithelzellen als Modellsystem gut geeignet, da sie über eine hohe Passagenzahl ohne Veränderung der biochemischen Parameter kultivierbar sind.

### 4.5.1 Translokation von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition

UV-Bestrahlung aktiviert eine Reihe von Signalkaskaden in der Zelle, eine davon ist der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Signalweg (siehe Abbildung 4.38). Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  als inaktiver Komplex im Cytosol vor. Hierbei ist  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  an  $\text{I}\kappa\text{B}$  Proteine gebunden. Werden  $\text{I}\kappa\text{B}$  Proteine durch  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinasen (IKK) phosphoryliert, verändern die  $\text{I}\kappa\text{B}$  Proteine ihre Konformation und  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  wird freigesetzt [72]. Der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Komplex kann nun in den Zellkern wandern und dort die Expression von Zielgenen aktivieren (Translokation).  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der u.a. die Expression von zahlreichen Proteinen bei dermalen Entzündungsprozessen moduliert.

#### 4.5.1.1 Immunzytochemische Färbung von $\text{Nf}\kappa\text{B}$ und Translokation nach UVB-Bestrahlung

Um die Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung untersuchen zu können, wurde zunächst eine immunzytochemische Färbung von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  im Zytosol und Zellkern nach 1 h, 6 h und 24 h Postinkubation durchgeführt. Mikroskop-Bilder wurden mit einer digitalen Kamera in schwarz/weiß aufgenommen und anschließend mit der Software AquaCosmos 1.2 gefärbt. Ausgewählte Bilder aus den Inkubationsansätzen sind in den Abbildungen 4.34, 4.35 und 4.36 für 1 h, 6 h und 24 h Postinkubation dargestellt.

In Abbildung 4.34 **A** sind die Kontrollzellen mit THF, in **B** mit DHIR inkubierte Zellen, in **C** mit

Lutein inkubierte Zellen gezeigt. Die blauen Bereiche zeigen den Zellkern (DAPI-Färbung), die grünen Bereiche zeigen die Lokalisation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ . In den unbestrahlten Kontrollzellen ist nach 1 h Postinkubation eine geringe Menge von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  im Cytosol zu erkennen. Nach Bestrahlung mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist die Menge an  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  im Cytosol bereits leicht angestiegen. Im Kern ist noch keine Veränderung zu erkennen. Nach einer Bestrahlung mit  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist ein weiterer Anstieg der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge im Cytosol zu erkennen, wobei im Kern weiterhin kaum eine Veränderung festzustellen ist. Erst nach einer Bestrahlung von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist eine geringe Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Kern zu sehen.

In Abbildung 4.35 sind ausgewählte Bilder der immunzytochemischen Färbung nach UVB-Bestrahlung und 6h Postinkubation gezeigt. In unbestrahlten Zellen ist nach einer Postinkubation von 6 h, wie zu erwarten war, eine geringe Menge  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  im Cytosol zu erkennen. In bestrahlten Zellen ( $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB) ist im Gegensatz zu einer Postinkubationszeit von 1 h nach 6 h ein deutlicher Anstieg des  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge im Cytosol, sowie eine Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern zu erkennen. Bei einer Erhöhung der Bestrahlungsdosis auf  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB zeigt sich im Vergleich zu  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB keine Veränderung. Erst bei einer Bestrahlung der Zellen mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB erhöht sich der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Gehalt im Cytosol und die Translokation in den Zellkern nimmt zu. Außerdem ist eine Anreicherung des  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ s im Cytosol um den Zellkern zu erkennen.

Der Vergleich der beiden Zeitpunkte macht deutlich, dass eine Postinkubationszeit von 1 h nicht ausreicht um eine Translokation des  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern bei UVB-Dosen von  $10 \text{ mJ/cm}^2$  und  $30 \text{ mJ/cm}^2$  unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Nach 6 h Postinkubation wird bei allen verwendeten UVB-Dosen die Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern beobachtet.

Die Untersuchung der Zellen nach einer Postinkubation von 24 h soll zeigen, ob die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern nach 24 h im Vergleich zu 6 h weiter ansteigt oder bereits wieder abnimmt. In bestrahlten Zellen ist die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern nach einer Postinkubation von 24 h wieder deutlich zurückgegangen. Bei einer Bestrahlung mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  und  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist im Vergleich zu unbestrahlten Zellen nur noch eine leicht erhöhte Menge an  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  im Cytosol zu erkennen. Nur bei der Bestrahlungsdosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB ist nach einer Postinkubation von 24 h noch eine Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern zu beobachten. Eine Modulierung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Menge im Cytosol und Translokation in den Zellkern ist durch die Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden (DHIR, Lutein) nicht zu erkennen (siehe Abbildung 4.34 bis 4.36).

Zur weiteren Analyse dieser Daten wurden die Bilder densitometrisch ausgewertet.

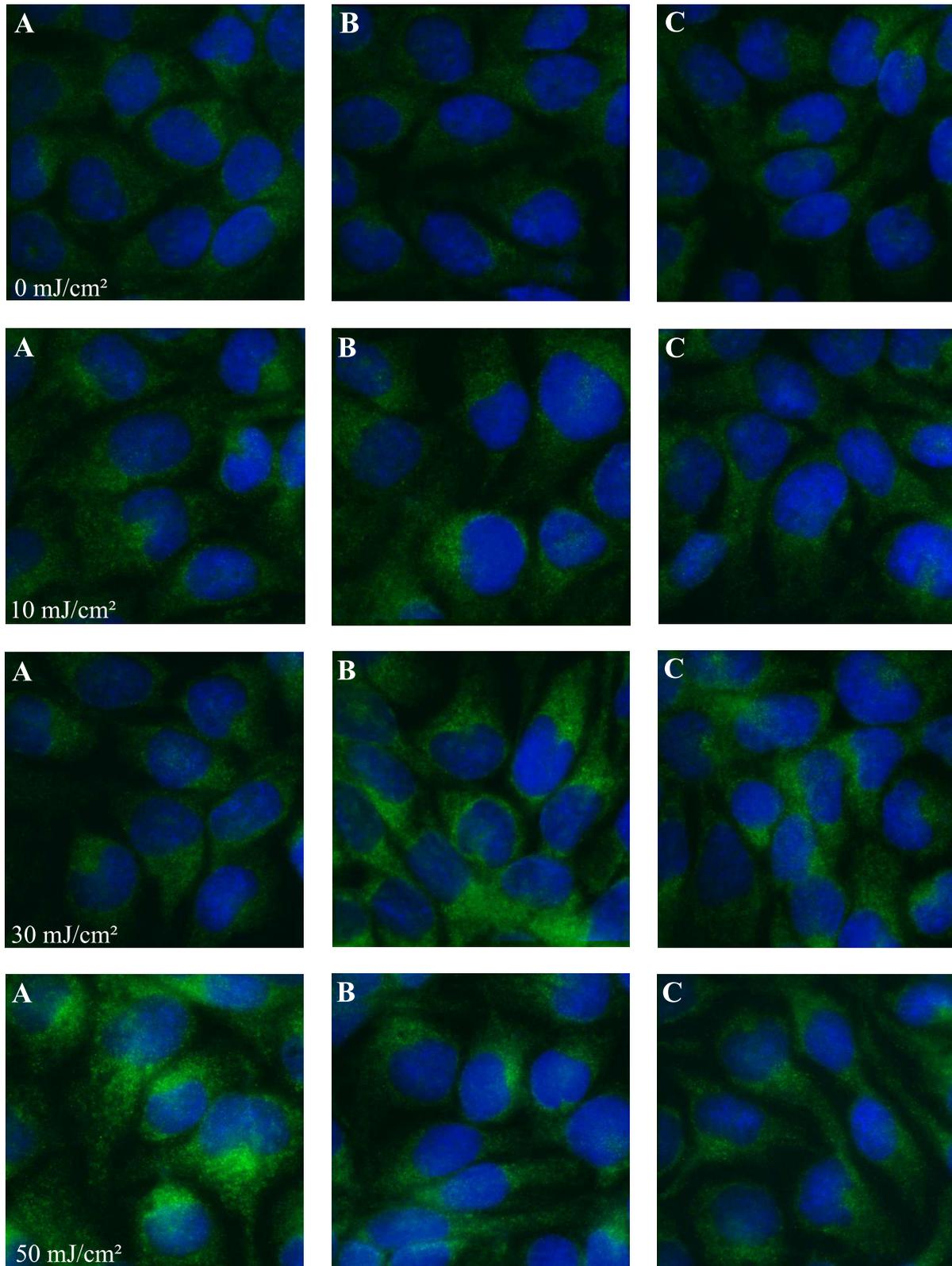


Abbildung 4.34: Immunzytochemische Färbung von Nf $\kappa$ B nach UVB-Bestrahlung und 1h Postinkubation in HaCaT-Zellen: A Kontrollzellen, B 10  $\mu$ M DHIR, C 10  $\mu$ M Lutein

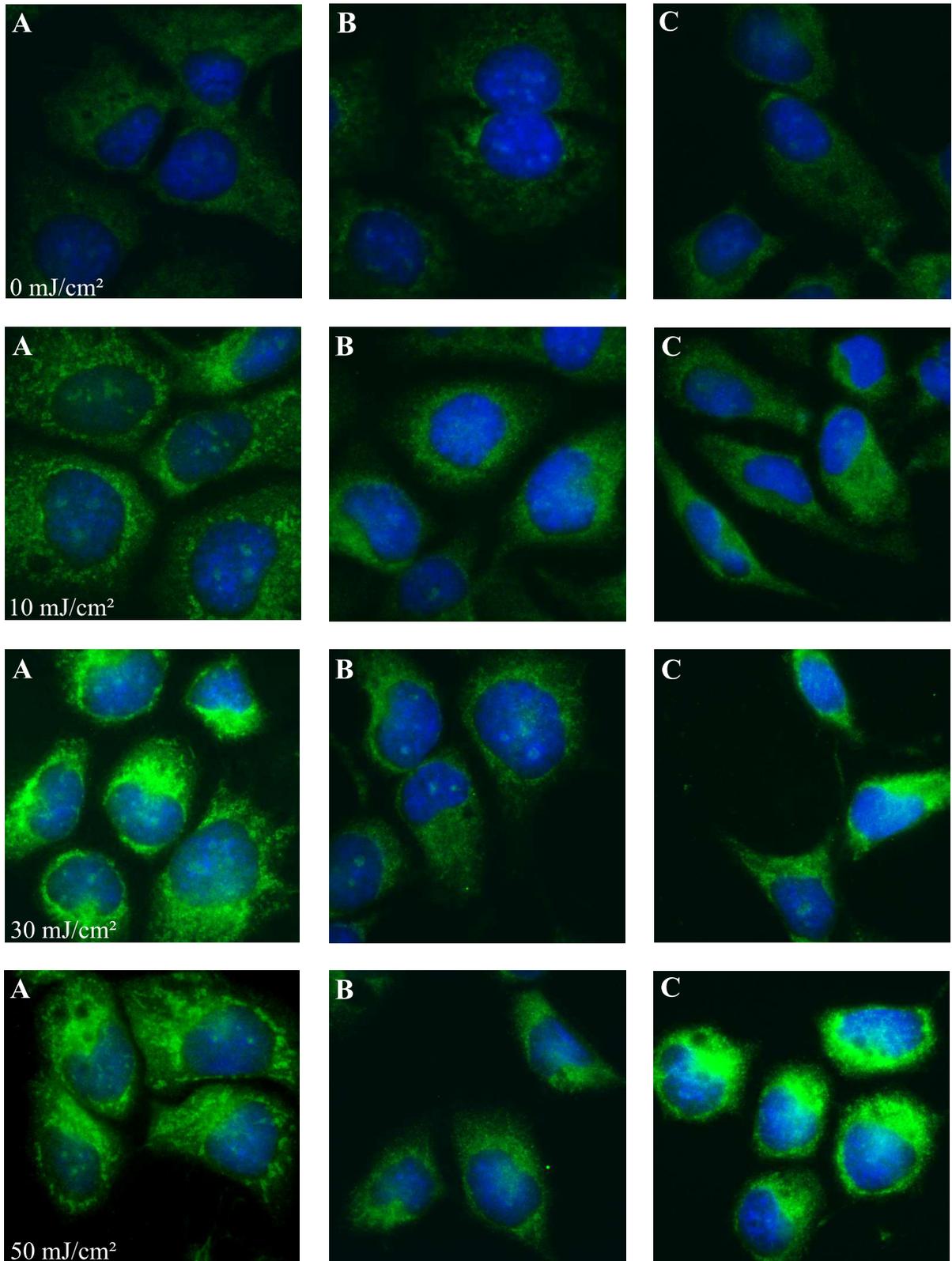


Abbildung 4.35: Immunzytochemische Färbung von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  nach UVB-Bestrahlung und 6h Postinkubation in HaCaT-Zellen: **A** Kontrollzellen, **B** 10  $\mu\text{M}$  DHIR, **C** 10  $\mu\text{M}$  Lutein

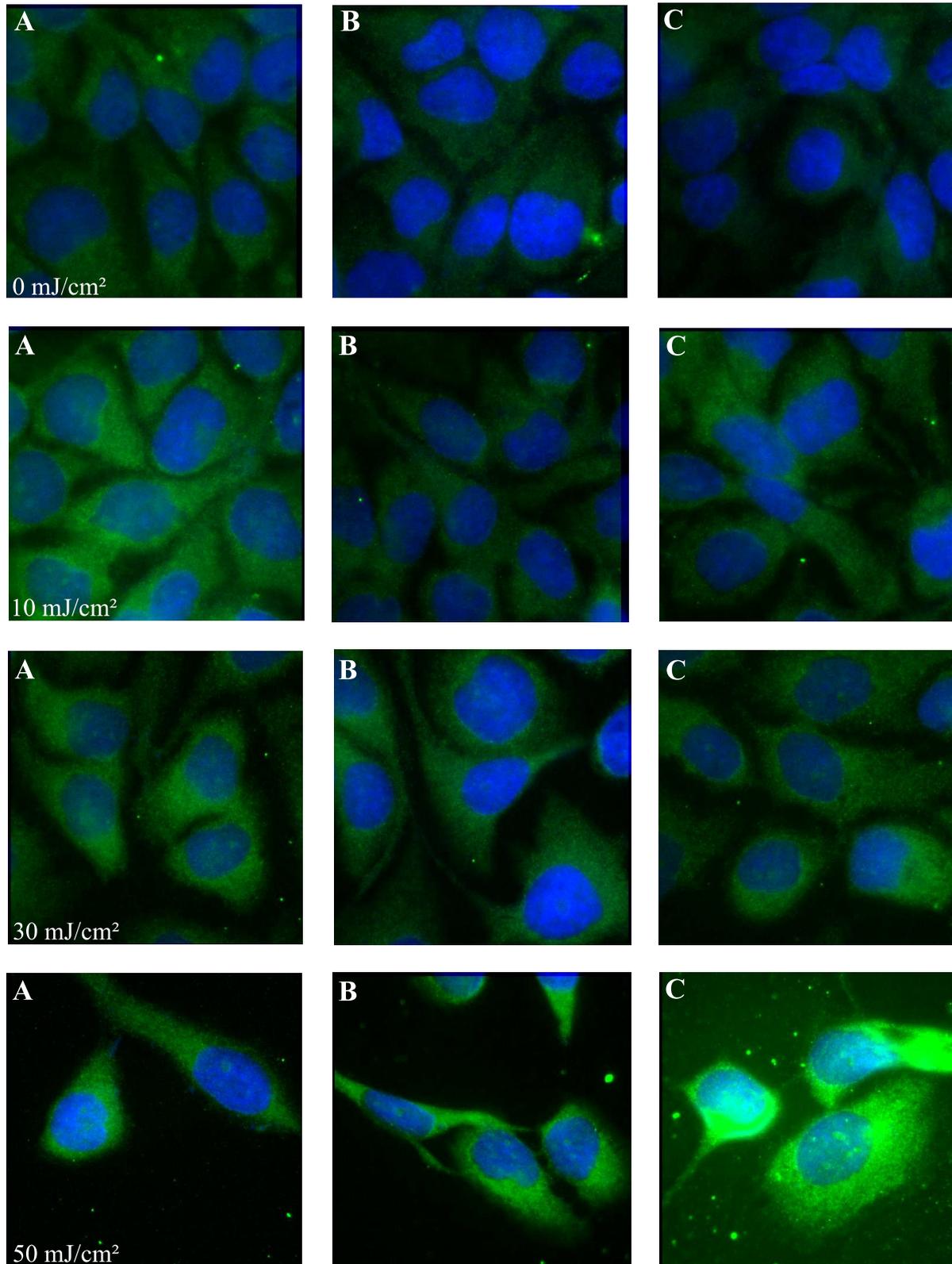


Abbildung 4.36: Immunzytochemische Färbung von Nf $\kappa$ B nach UVB-Bestrahlung und 24h Postinkubation: A Kontrollzellen, B 10  $\mu$ M DHIR, C 10  $\mu$ M Lutein

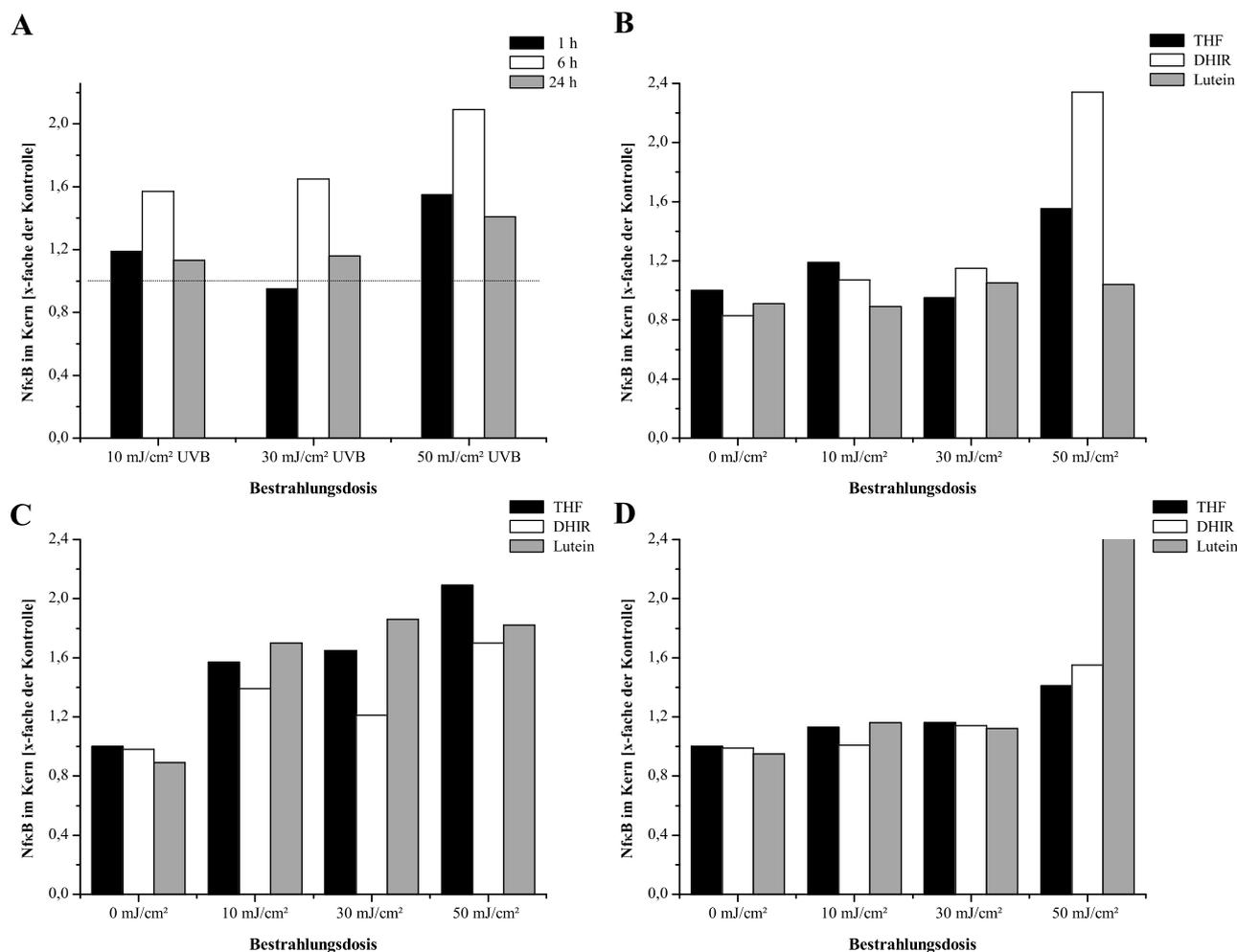


Abbildung 4.37: NfκB Translokation in den Kern von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung:

**A** Vergleich Postinkubationszeiten: NfκB Expression in Kontrollzellen (0,1 % THF) **B** Postinkubation 1 h **C** Postinkubation 6 h **D** Postinkubation 24 h

Die Bilder der immunzytochemischen Färbung wurden densitometrisch mit der Software ImageJ ausgewertet, die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abbildung 4.37 gezeigt. Die NfκB Translokation in den Kern ist als x-fache der Kontrolle (0,1 % THF) dargestellt. In Abbildung 4.37 A ist die Translokation nach UVB-Bestrahlung der unbestrahlten Zellen für alle Postinkubationszeitpunkte gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Translokation nach 1 h nur in geringem Umfang stattgefunden hat. Nach 6 h ist ein deutlicher Anstieg der NfκB Translokation in den Zellkern der bestrahlten Zellen zu sehen. Nach 24 h ist die NfκB Translokation in den Kern wieder deutlich gesunken und entspricht in etwa der NfκB Translokation nach 1 h. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der NfκB Translokation in den Zellkern entsprechen den qualitativen Ergebnissen aus Abbildung 4.34 bis 4.36.

In den Abbildungen 4.37 B, C und D ist die NfκB Translokation in den Kern behandelte Zellen (DHIR, Lutein) für die Postinkubationszeiten 1 h, 6 h und 24 h dargestellt. Auch in der densitome-

trischen Auswertung der mikroskopischen Bilder ist keine Modulierung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern durch Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden (DHIR, Lutein) feststellbar.

#### 4.5.1.2 Nachweis der $\text{Nf}\kappa\text{B}$ Translokation nach UVB-Bestrahlung mit Western Blot Analyse

Um die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung abzusichern und um die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge in Cytosol und Zellkern nach UVB-Bestrahlung mengenmäßig zu erfassen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Das Zelllysate wurde in eine Cytosol- und Kernfraktion aufgetrennt, und eine separate Bestimmung von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in beiden Fraktionen durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den beiden Fraktionen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt ( $n = 3$ ). Die Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test; das Signifikanzniveau wurde auf  $*p \leq 0,05$  gesetzt.

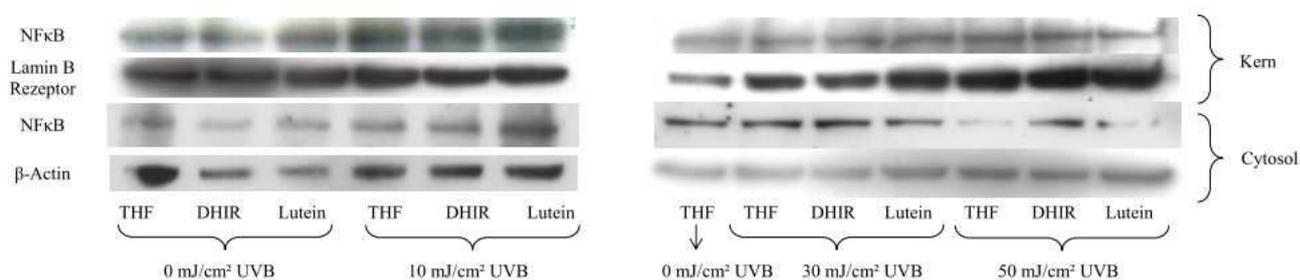


Abbildung 4.38: Western Blot von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  nach UVB-Bestrahlung und 6 h Postinkubation

In Abbildung 4.38 ist ein exemplarischer Western Blot von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in Cytosol und Zellkern nach UVB-Bestrahlung und 6 h Postinkubation gezeigt. In dieser Darstellung ist die Kernfraktion mit Ladekontrolle (Lamin B Rezeptor) jeweils oben und die cytosolische Fraktion mit Ladekontrolle ( $\beta$ -Actin) jeweils unten abgebildet. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western Blots sind in Abbildung 4.39 gezeigt (Mittelwert  $n = 3$ ). Die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge ist jeweils als x-fache

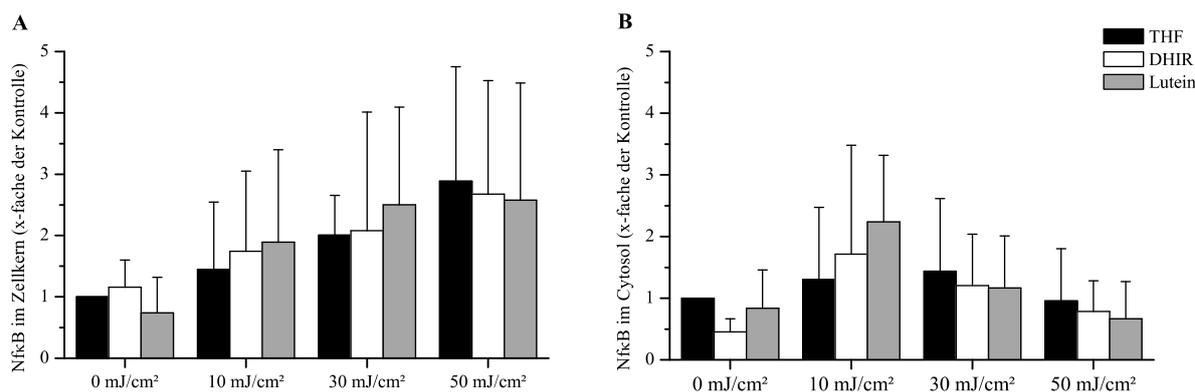


Abbildung 4.39:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und 6 h Postinkubation  
**A** Kernfraktion **B** Cytosolfraction

der Kontrolle dargestellt. Es ist eine dosisabhängige Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Kern nach UVB-Exposition zu erkennen (Abbildung 4.39 A). Die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern steigt unter den Versuchsbedingungen auf das bis zu 2,9-fache der Kontrolle an. Die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge im Cytosol steigt zunächst unter UVB-Exposition auf das 1,3-fache der Kontrolle an und sinkt dann

bei höherer UVB-Bestrahlungsdosis wieder auf den Ausgangswert der Kontrolle ab (siehe Abbildung 4.39 B). Ein statistisch signifikanter Effekt der Carotinoide (10  $\mu\text{M}$ ) auf  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  wurde nicht beobachtet.

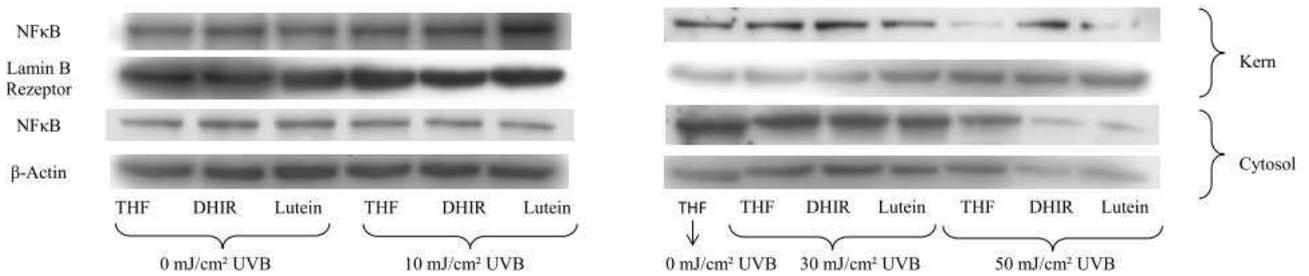


Abbildung 4.40: Western Blot von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  nach UVB-Bestrahlung und 24 h Postinkubation

In Abbildung 4.40 sind die Western Blots von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  nach UVB-Bestrahlung und 24 h Postinkubation gezeigt. In der Darstellung ist die Kernfraktion mit Ladekontrolle (Lamin B Rezeptor) jeweils oben und die cytosolische Fraktion mit Ladekontrolle ( $\beta\text{-Actin}$ ) jeweils unten abgebildet.

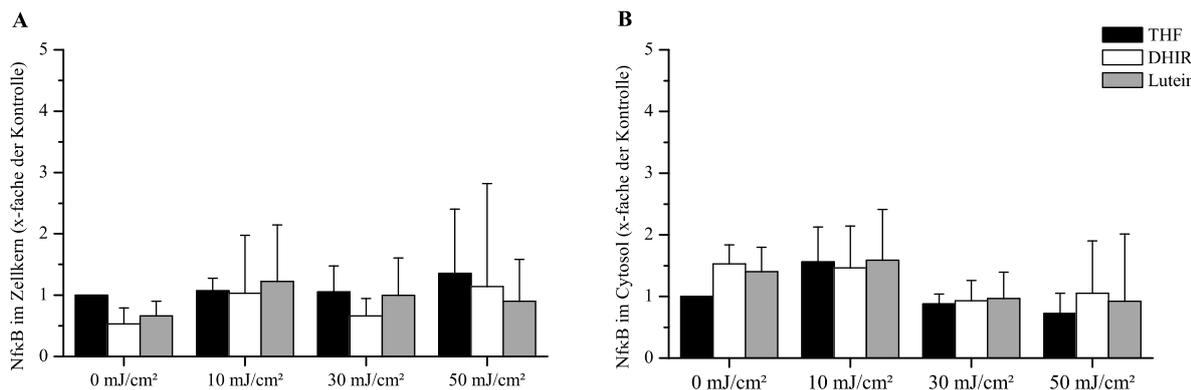


Abbildung 4.41:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und 24h Postinkubation  
**A** Kernfraktion **B** Cytosolfraktion

Die Auswertung der immunzytochemischen Färbung zeigt für diesen Zeitpunkt (24 h) eine deutlich geringere  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern als nach 6 h Postinkubation. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ist in Abbildung 4.41 zusammengefasst.

Wie zu erwarten war, ist nach 24 h Postinkubation keine dosisabhängige Zunahme der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern zu erkennen. Nur bei der höchsten Bestrahlungsdosis ist noch eine schwache Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern nachweisbar.

Die UVB-induzierte  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge im Cytosol ist auch nach 24 h im Vergleich zu 6 h wieder deutlich zurückgegangen. Nur bei der Bestrahlungsdosis von 10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB ist noch eine leicht höhere  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Menge (1,5-fache der Kontrolle) nachweisbar (siehe Abbildung 4.41). Ein statistisch signifikanter Einfluss der Carotinoide auf  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  und dessen Translokation konnte auch in diesem Versuch nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine dosisabhängige UVB-induzierte  $\text{Nf}\kappa\text{B}$

Translokation in den Zellkern gezeigt werden konnte (6 h Postinkubation). Nach 24 h Postinkubation ist die Nf $\kappa$ B Menge wieder deutlich zurückgegangen und sinkt auf die Ausgangsmenge in der Kontrolle.

Ein statistisch signifikanter Effekt der Carotinoide auf Nf $\kappa$ B und dessen Translokation wurde nicht nachgewiesen.

### 4.5.1.3 Vergleich der Ergebnisse zur UVB-induzierten $\text{Nf}\kappa\text{B}$ Translokation in HaCaT-Zellen aus der immunzytochemischen Färbung und der Western Blot Analyse

Die Abbildung 4.42 zeigt den Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden zur Bestimmung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in HaCaT-Zellen als x-fache der Kontrolle.

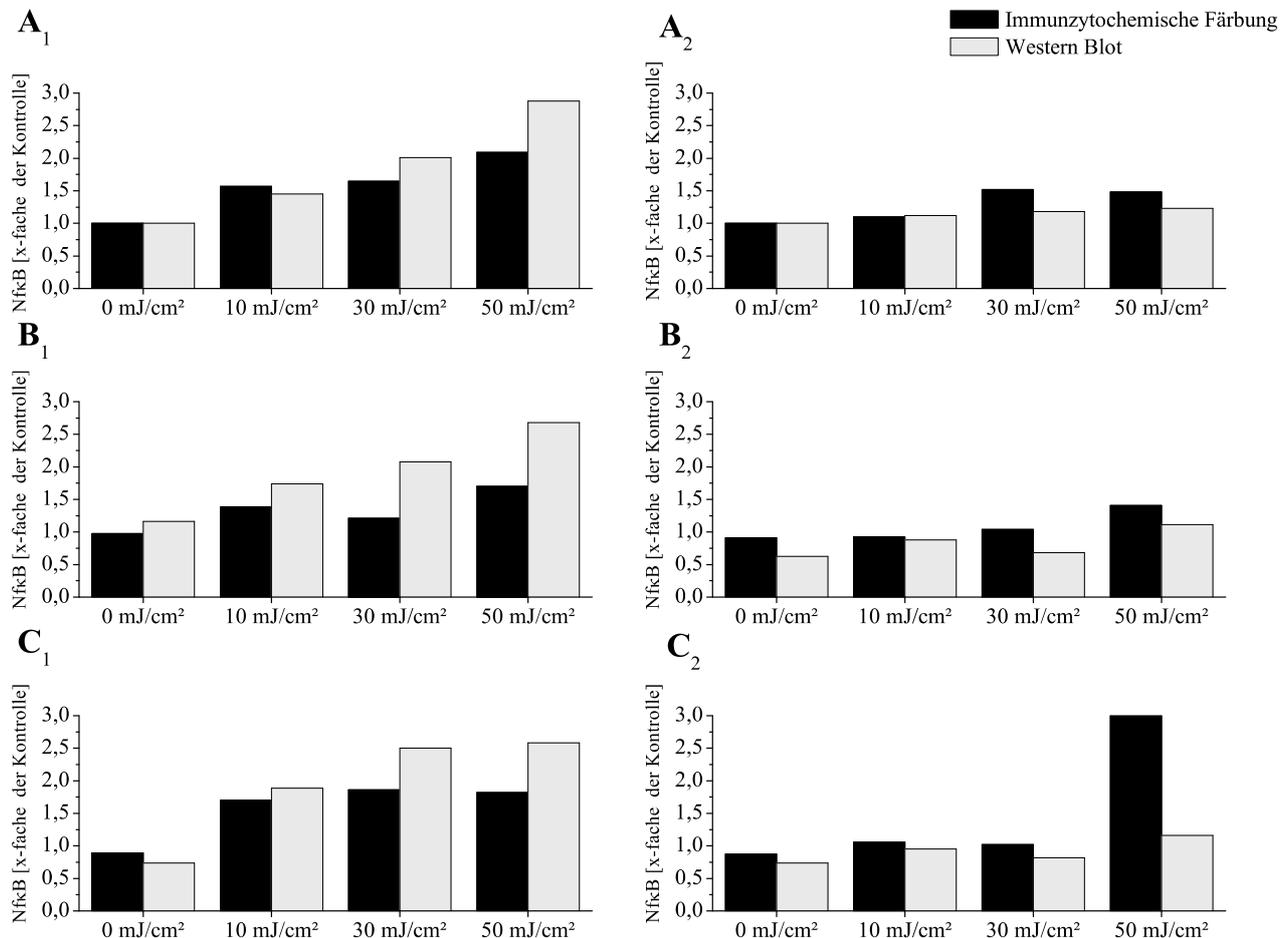


Abbildung 4.42: Vergleich der Ergebnisse zur UVB-induzierten  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation: Immunzytochemische Färbung vs. Western Blot Methode

1 6 h Postinkubation 2 24 h Postinkubation A THF B DHIR C Lutein

Generell konnte mit beiden Methoden eine dosisabhängige UVB-abhängige Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern gezeigt werden. Die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern nach 6 h Postinkubation wird mit der Western Blot Methode etwas höher bestimmt als bei der immunzytochemische Färbung (siehe Abbildung 4.42 A<sub>1</sub> - C<sub>1</sub>). Bei einer Postinkubationszeit von 24 h ist der Unterschied der Ergebnisse beider Methoden geringer. Bei einer Postinkubationszeit von 24 h zeigt die immunzytochemische Färbung im Vergleich zur Western Blot Methode leicht höhere Werte (siehe Abbildung 4.42 A<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beiden Methoden zur Bestimmung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in HaCaT-Zellen vergleichbare Ergebnisse ergaben. Weder DHIR noch Lutein

verändern die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation nach UV-Exposition. Modulatorische Wirkung der Carotinoide auf diesen Signalweg des Entzündungsgeschehens wurden somit nicht beobachtet.

## 4.5.2 Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition

Interleukin-6 (IL-6) gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche die Entzündungsreaktion regulieren. In Hautzellen kann es durch UV-Bestrahlung induziert werden. Posttranslational werden u.a. durch Abspaltung von Peptiden, Glykosylierung und Phosphorylierung verschiedene Isoformen erzeugt. Die genaue biologische Funktion der einzelnen Isoformen ist jedoch nicht vollständig geklärt [103].

Für die Bestimmung der Expression von IL-6 in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition wurden die Zellen gemäß Abschnitt 3.9 kultiviert, mit den Carotinoiden inkubiert und verschiedenen UVB-Dosen ausgesetzt. Nach 1, 6 bzw. 24 h Postinkubation wurden die Zellen lysiert und die IL-6-Expression im Zelllysat mit Hilfe des Western Blots bestimmt.

Für die statistische Auswertung wurde die Interleukin-6 Expression in drei unabhängigen Experimenten bestimmt ( $n = 3$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test; das Signifikanzniveau wurde auf  $*p \leq 0,05$  gesetzt.

Die exemplarischen IL-6 Western Blots sind in Abbildung 4.43 gezeigt. Die Proteinbanden von IL-6 sind jeweils oben dargestellt, die der Ladekontrolle (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase - GAPDH) jeweils unten. Für Interleukin-6 findet man in fast allen Blots zwei Proteinbanden. In der

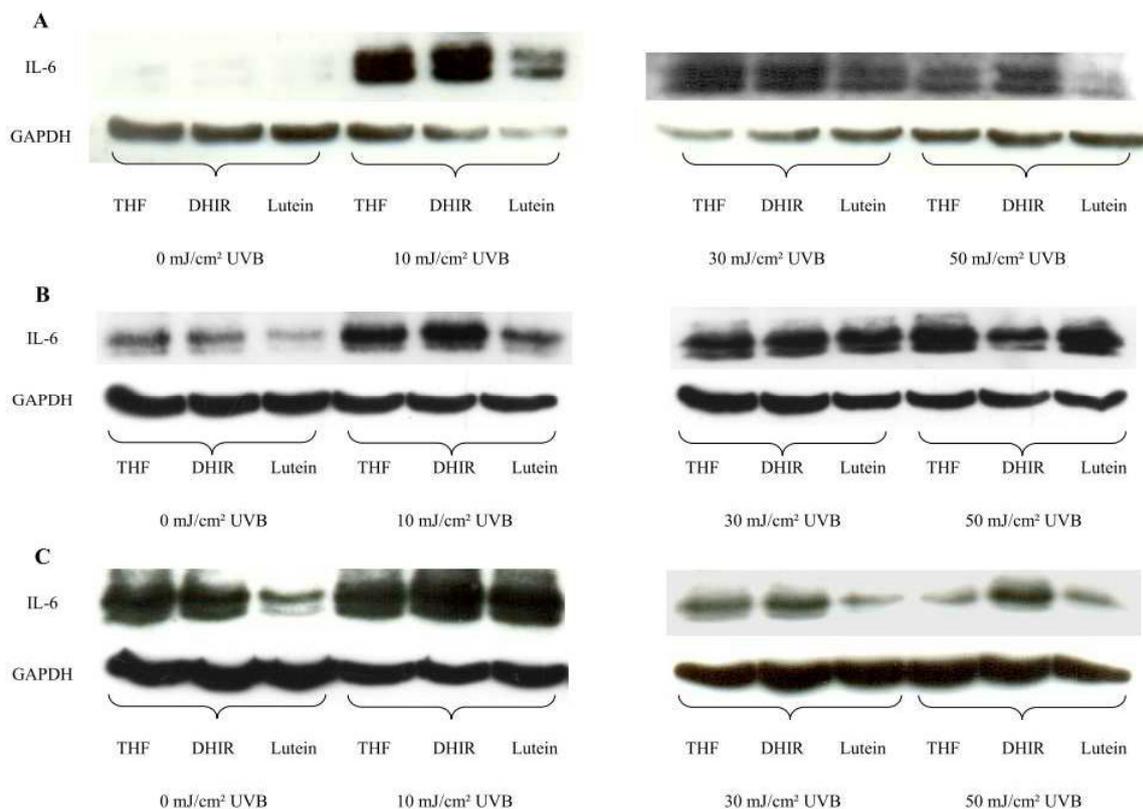


Abbildung 4.43: Western Blots der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung: **A** 1 h Postinkubation, **B** 6 h Postinkubation, **C** 24 h Postinkubation

densitometrischen Auswertung wurden beide Proteinbanden berücksichtigt.

Die densitometrische Auswertung der Interleukin-6 Expression in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung ist in Abbildung 4.44 dargestellt. In dieser Darstellung ist bei einer Postinkubationszeit von 6 h eine dosisabhängige Zunahme der IL-6 Expression zu erkennen. Werden die Zellen einer UVB-Dosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt, steigt die IL-6 Expression auf das 8-fache der Kontrolle an. Bei einer Postinkubationszeit von 1 h ist kein Anstieg der IL-6 Expression in den Zellen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu erkennen. Nach 24 h ist der UV-induzierte Anstieg der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen wieder geringer als nach 6 h.

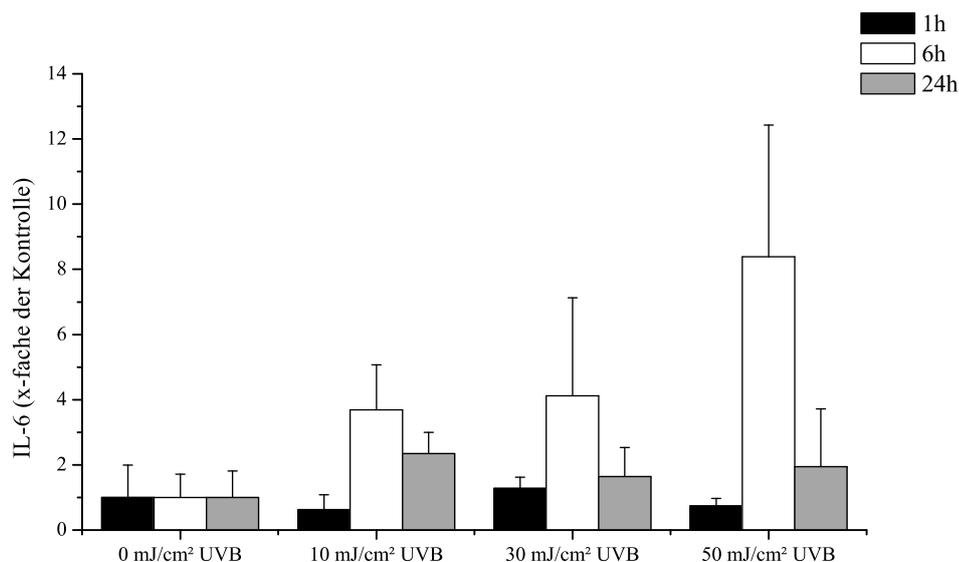


Abbildung 4.44: UVB-abhängige Induktion von IL-6 in HaCaT-Zellen  
Kontrolle = unbestrahlt; 0,1 % THF

Nachdem ein UV-induzierter Anstieg der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen gezeigt wurde, liegt der Fokus im Folgenden auf der Untersuchung des Einflusses der Carotinoide (DHIR, Lutein) auf die IL-6 Expression. In Abbildung 4.45 ist die IL-6 Expression der Kontrollzellen (0,1 % THF) jeweils auf 100 % gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen.

In Abbildung 4.45 **A** ist der Einfluss der Carotinoide auf die IL-6 Expression nach 1 h Postinkubation dargestellt. In unbestrahlten und mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlten Zellen ist die IL-6 Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen etwas erhöht. Bei höheren UVB-Dosen ( $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) ist die IL-6 Expression in behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen niedriger. Diese Effekte sind aber nur bei einer Bestrahlung mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB in Kombination mit einer Behandlung der Zellen mit Lutein statistisch signifikant.

Für die Postinkubationszeit von 6 h ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 4.45 **B**).

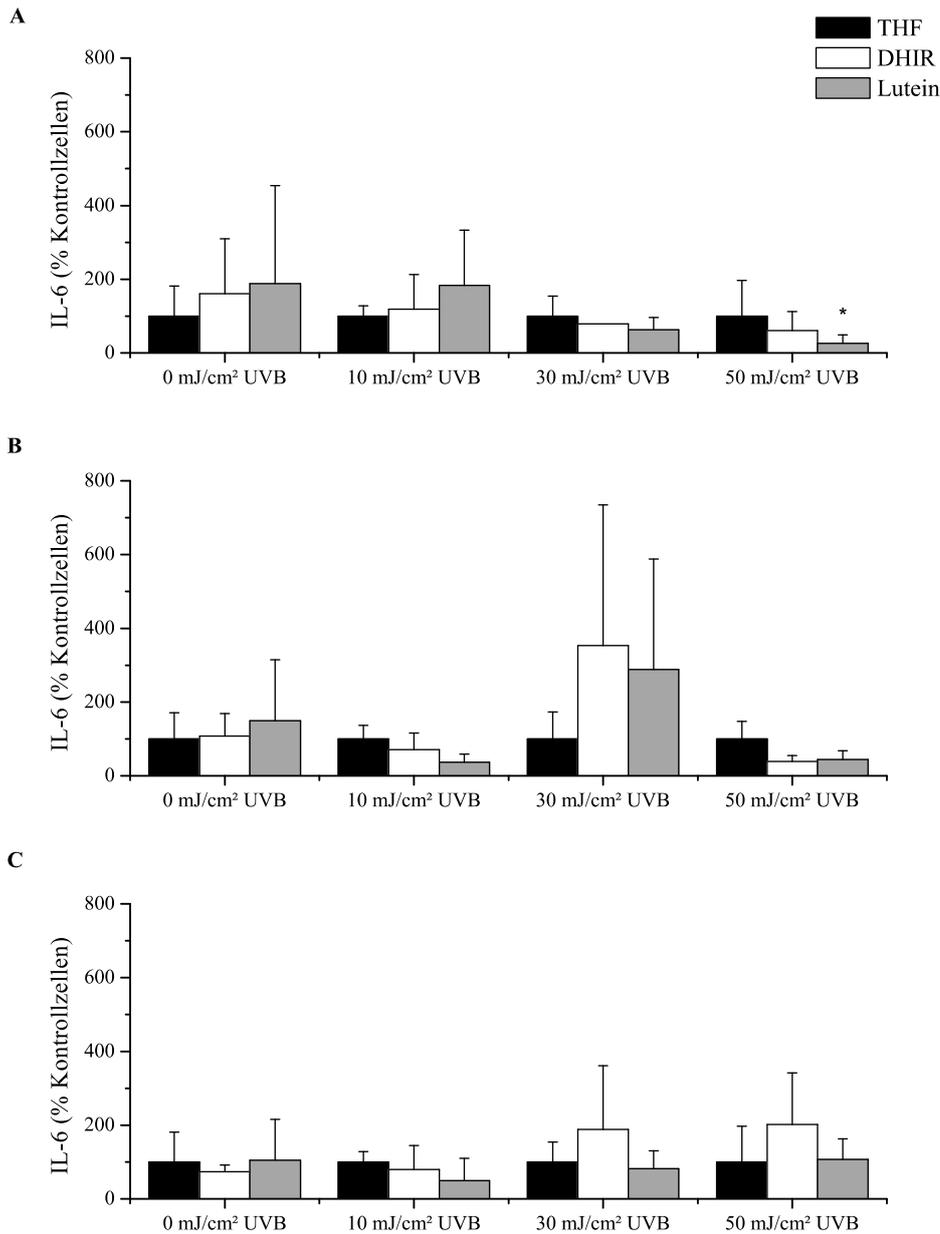


Abbildung 4.45: IL-6 Expression nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen:  
**A** 1 h Postinkubation, **B** 6 h Postinkubation, **C** 24 h Postinkubation  
 Kontrollzellen = 0,1 % THF; \* $p \leq 0,05$  bezogen auf jeweilige Kontrolle

Eine Bestrahlung der Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und Behandlung mit den Carotinoiden führt zu einer leicht geringeren IL-6 Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu wurde für eine Bestrahlung der Zellen mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und einer Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden eine leicht erhöhte IL-6 Expression festgestellt. Keiner dieser Effekte ist jedoch statistisch signifikant.

Die IL-6 Expression nach UVB-Bestrahlung und einer Postinkubation von 24 h ist in Abbildung 4.45 C dargestellt. Lutein bewirkt 24 h nach UVB-Bestrahlung keine Veränderung der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen. Für DHIR ist eine höhere IL-6 Expression im Vergleich zu Kontrollzellen für die Bestrahlungsdosen 30 mJ/cm<sup>2</sup> und 50 mJ/cm<sup>2</sup> UVB erkennbar. Dieser Effekt ist aber statis-

tisch nicht signifikant.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 6 h nach Bestrahlung eine dosisabhängige UV-Induktion der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden konnte. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Carotinoide auf die IL-6 Expression in HaCaT-Zellen konnte aber nicht gezeigt werden. Allein in den mit Lutein behandelten Zellen findet man in Kombination mit der höchsten UVB-Dosis ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) eine statistisch signifikant erniedrigte IL-6 Expression.

### 4.5.3 Expression der immunmodulatorischen Interleukine IL-10 und IL-12 in HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition

Bei Interleukin-10 handelt es sich um ein immunsuppressives Zytokin, welches u.a. regulatorische T-Zellen aktivieren kann [104]. Es ist ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin, das nach Bestrahlung mit UVB in humanen Keratinocyten und anderen Hautzellen induziert wird [105]. Als wichtiger Immunmodulator bewahrt es den Organismus vor übersteigerten Entzündungsreaktionen und sorgt bei erfolgter Reparatur des Schadens für ein Abklingen der Entzündungsreaktion [106]. In der UV-Protektion ist es daher nicht wünschenswert dieses anti-inflammatorische Zytokin durch lichtschutzaktive Substanzen (DHIR, Lutein) zu beeinflussen.

Zur Bestimmung von Interleukin-10 im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung wurden die Zellen gemäß Abschnitt 3.10.1 kultiviert, mit Carotinoiden inkubiert und mit verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt. Nach 24 h Postinkubation wurde eine Probe des Kulturmediums für die immunologische IL-10-Bestimmung entnommen. Für die statistische Auswertung wurde die Interleukin-10 Konzentration im Kulturmedium in drei unabhängigen Experimenten bestimmt ( $n = 3$ ). Die Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student's t-Test; das Signifikanzniveau wurde auf  $*p \leq 0,05$  gesetzt.

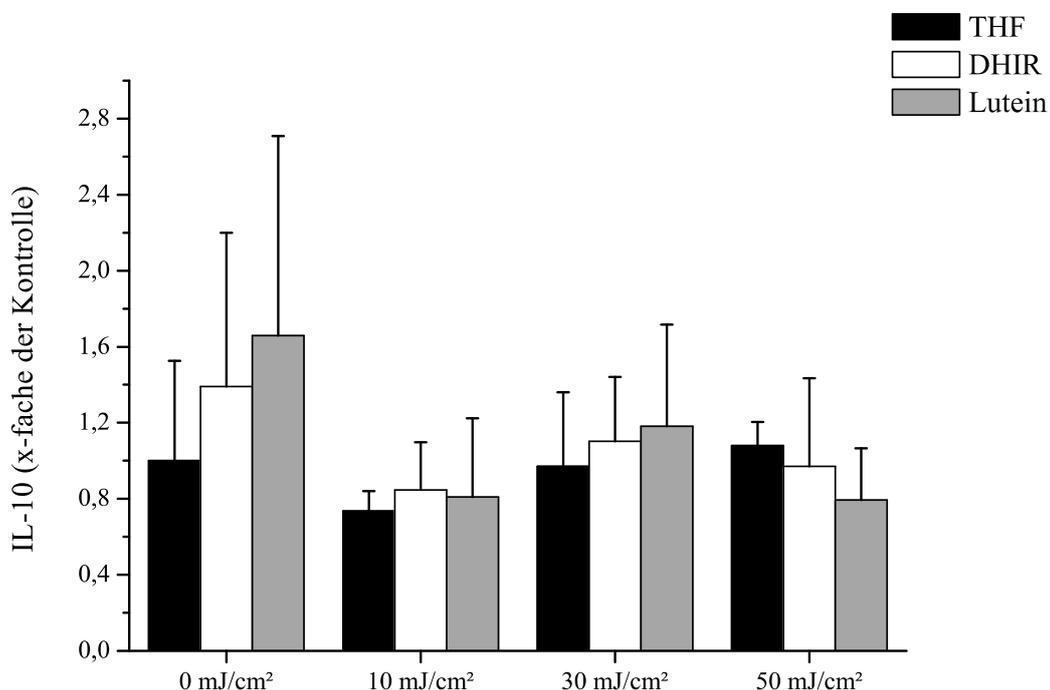


Abbildung 4.46: Interleukin-10 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung

Abbildung 4.46 zeigt die UVB-abhängige IL-10 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach einer Postinkubationszeit von 24 h. Hierbei ist die IL-10 Induktion als x-fache der

Kontrolle dargestellt. Die Konzentration von Interleukin-10 im Kulturmedium unbestrahlter Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt und alle weiteren Werte darauf bezogen. Es ist zu erkennen, dass die Interleukin-10 Konzentration in unbestrahlten Zellen leicht zunimmt, wenn diese mit den Carotinoiden DHIR und Lutein inkubiert werden. Diese Zunahme ist jedoch im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant. Eine Bestrahlung der Zellen mit UVB führt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu keiner Induktion von IL-10 in HaCaT-Zellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine UVB-abhängige Induktion von IL-10 in HaCaT-Zellen nicht beobachtet wurde und dass keine statistisch signifikante Beeinflussung der Expression des immunmodulatorischen Zytokins IL-10 durch eine Behandlung der HaCaT-Zellen mit den Carotinoiden DHIR und Lutein gezeigt wurde.

Interleukin-12 ist ein weiteres immunmodulatorisches Zytokin, welches u.a. das Wachstum und die Funktion von T-Helferzellen in der zellulären Abwehr reguliert, sowie immunstimulierend wirkt [107]. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung von UV-Licht ist mit steigender UVB-Dosis ein niedrigeres IL-12 Level zu erwarten.

Die Versuchsdurchführung erfolgt analog zur Bestimmung von Interleukin-10 im Kulturmedium der HaCaT-Zellen.

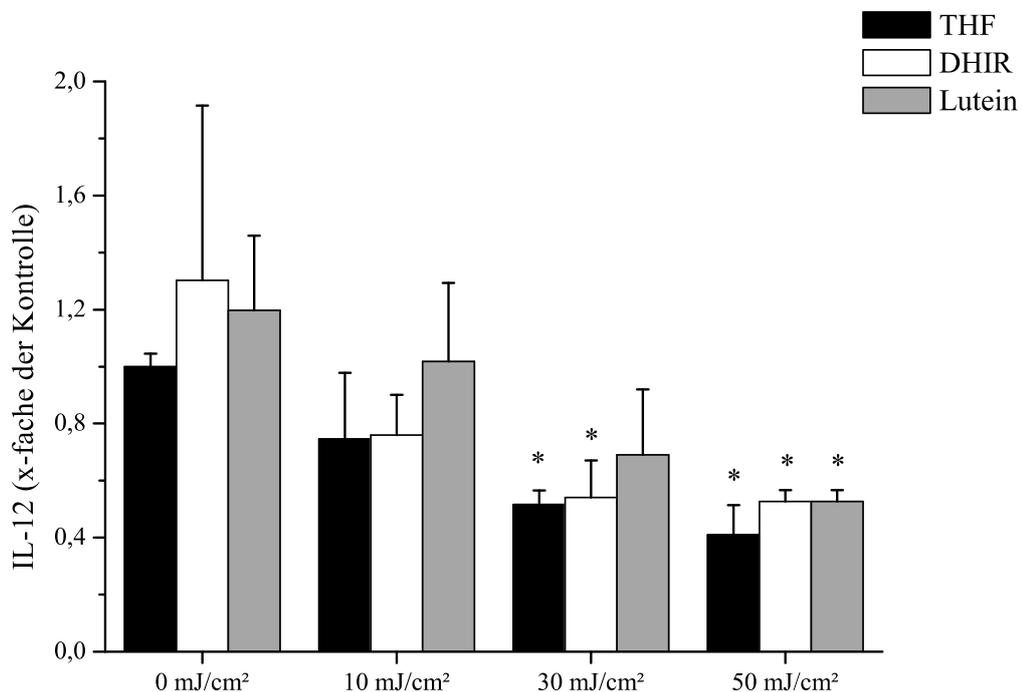


Abbildung 4.47: Interleukin-12 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung, \* $p \leq 0,05$  bezogen auf unbestrahlte Kontrolle

In Abbildung 4.47 ist die IL-12 Konzentration im Kulturmedium von HaCaT-Zellen nach UVB-Exposition und einer Postinkubationszeit von 24 h gezeigt. Die IL-12-Konzentration im Kulturme-

dium unbestrahlter Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt und alle weiteren Werte hierauf bezogen. Es ist zu erkennen, dass mit steigender UVB-Dosis die IL-12 Konzentration im Kulturmedium von 1,0 auf bis zu 0,4 abnimmt. Eine Bestrahlung mit  $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der IL-12 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Mit den Carotinoiden behandelte Zellen weisen leicht höhere IL-12 Konzentration im Kulturmedium auf als unbehandelte Zellen. Eine statistische Signifikanz konnte aber nicht nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine steigende UVB-Dosis zu einer niedrigeren Konzentration an IL-12 im Kulturmedium der bestrahlten Zellen führt. Eine Beeinflussung der IL-12 Konzentration im Kulturmedium durch eine Behandlung mit den Carotinoiden DHIR und Lutein konnte nicht nachgewiesen werden.



## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es im Zellsystem zu untersuchen, ob eine endogene Photoprotektion durch aromatische Carotinoide möglich ist. Durch UV-Licht entstehen direkte und indirekte Zellschäden (siehe Abschnitt 1.2). Die UV-bedingten Zellschäden betreffen DNA, Proteine und Lipide. In der vorliegenden Arbeit wurden UV-bedingte DNA-Schäden untersucht. Diese Zellschäden führen dazu, dass verschiedene Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, welche wiederum zur Entstehung einer lokalen Entzündung führen (siehe Abbildung 5.1). Die lokale Entzündung schafft u.a. auch Voraussetzungen für die Reparatur der entstandenen Schäden. In der Photoprotektion ist es somit wünschenswert, dass die eingesetzten Substanzen UV-induzierte Schäden vermindern ohne die Entzündungsreaktion ganz oder teilweise zu unterdrücken.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die aromatischen Carotinoide DHIR und IR auf photoprotektive Wirkungen gegenüber DNA-Schäden in humanen dermalen Fibroblasten untersucht (siehe Abbildung 5.1). Das strukturell ähnliche nicht-aromatische Carotinoid Lutein diente als Vergleichssubstanz. Der zweite Teil dieser Arbeit ist auf die Untersuchung der UV-induzierten Entzündungsreaktion in Hautzellen fokussiert. Es wurde untersucht, ob das aromatische Carotinoid DHIR oder das strukturell ähnliche Lutein ausgewählte Entzündungsparameter beeinflussen (siehe Abbildung 5.1).

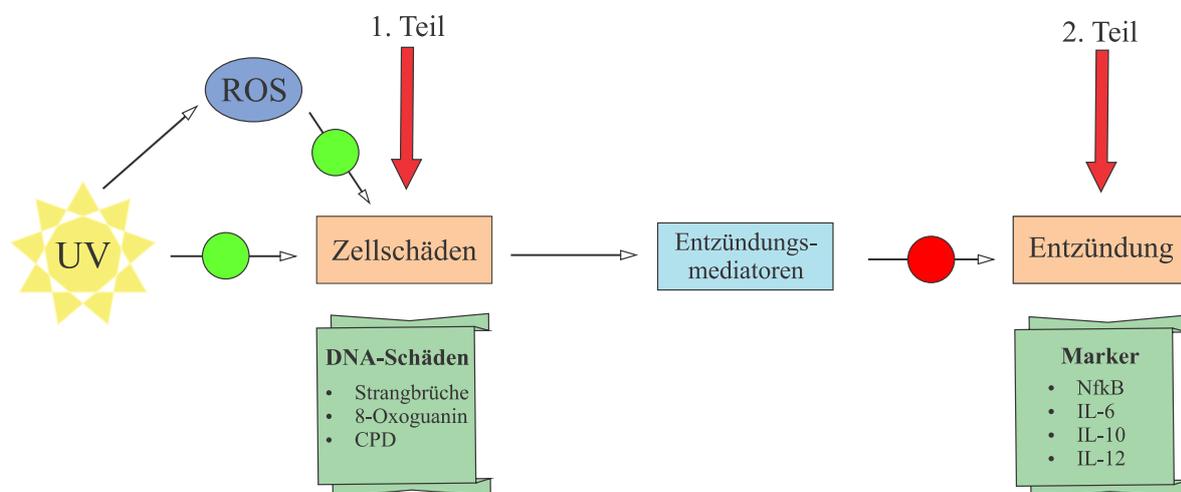


Abbildung 5.1: Anforderungen an Substanzen zur Photoprotektion

## 5.1 Zellmodelle

Die Haut dient, als äußere Barriere des menschlichen Körpers u.a. dem Schutz gegen externe Noxen, wie z.B. UV-Licht. Für die Untersuchung der Carotinoide auf eine mögliche Eignung zum Einsatz in der Photoprotektion, bieten sich Zellmodelle kultivierter Hautzellen an. Für die Bearbeitung der genannten Fragestellungen wurden zwei verschiedene Zellmodelle verwendet.

Das erste Zellmodell (humane dermale Fibroblasten) hat sich bereits in vorangegangenen Arbeiten [24, 108] für die Untersuchung der Photoprotektion als geeignet erwiesen. Humane dermale Fibroblasten sind ein häufig verwendetes Zellmodell zur Untersuchung des photoprotektiven Potentials von Substanzen [109, 110, 111]. Die verwendeten Fibroblasten wurden aus Präputiumzellen eines gesunden, eurasischen Neugeborenen isoliert (CCD-1064 Sk). Fibroblasten sind der dominierende Zelltyp in der Dermis, welche die Epidermis über die *Lamina densa* mit Nährstoffen versorgt [17]. Das UV-Erythem (*Erythema solare*) ist wie oben beschrieben Teil der primären Entzündungsreaktion des Körper auf UV-Exposition. Als äußere Hautschicht kommt die Epidermis, welche zu etwa 90 % aus Keratinozyten besteht, als erstes mit den UV-Strahlen in Kontakt. Primäre Zytokine, als Mediatoren der Entzündung werden von Keratinozyten und Langerhans-Zellen freigesetzt [73, 102]. Sie besitzen die Fähigkeit auf verschiedene Noxen mit der Sekretion spezifischer Zytokine zu reagieren [67]. Fibroblasten können keine primären Zytokine sezernieren, sind aber in der Lage nach Aktivierung mit primären Zytokinen eine Reihe von sekundären Zytokinen auszuscheiden [67]. Für die Bearbeitung des zweiten Teils wurde daher eine Keratinozyten-Zelllinie gewählt, die einfach und reproduzierbar kultiviert werden kann. Bei den verwendeten HaCaT-Zellen handelt es sich um eine spontan transformierte, nicht tumorigene Zelllinie humaner Epithelzellen eines 62-jährigen Mannes [85].

## 5.2 Biologische Effekte von UV-Strahlung

Eine Behandlung der Zellen mit UV-Strahlen erzeugt Schäden an biologisch relevanten Molekülen und hat zelltoxische Wirkungen. Die Stärke der Toxizität ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts, der verwendeten UV-Dosis und der verwendeten Zelllinie. Um die Toxizität der UV-Dosen auf die beiden Zelllinien zu bestimmen, wurde mit beiden Zelllinien ein SRB-Assay durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, binden die negativ geladenen Sulfonium-Gruppen des Sulforhodamin B unter leicht sauren Bedingungen elektrostatisch an die basischen Aminosäurereste zellulärer Proteine. Die bei 492 nm gemessene Absorption des Sulforhodamin B ist somit proportional zur Zahl an der Kulturschale anhaftenden (adhärenten) Zellen [86]. Zur Berechnung der Zellviabilität werden in diesem Assay adhärente mit lebenden Zellen gleichgesetzt. Im Gegensatz zu anderen Viabilitäts- bzw. Zytotoxizitätstests lässt der SRB-Assay keine Aussage über die metabolische Aktivität der Zellen sowie den Grad der Zellschädigung zu. Daher wurde als Messzeitpunkt eine Postinkubationszeit von 24 h nach Bestrahlung gewählt, um falsch positive Werte,

die geschädigte aber noch adhärenente Zellen erfassen, zu minimieren. Es handelt sich bei dem SRB-Assay um eine schnelle, einfache und sensitive in-vitro Methode zur Bestimmung der Zellviabilität in 96-Well-Platten [112]. Er zeichnet sich im Vergleich zu anderen Tests (z.B. MTT-Test) durch ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis, eine gute Linearität und durch einen sehr stabilen kolorimetrisch erfassbaren Endpunkt aus [112, 113].

### 5.2.1 Einfluss von UV-Strahlung auf die Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von UVA-Strahlen auf h<sub>2</sub>F wurden die Zellen mit 5 J/cm<sup>2</sup>, 10 J/cm<sup>2</sup> und 20 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Dies entspricht in etwa der UVA-Dosis in der Region des 35. nördlichen Breitengrades (z.B. Kreta, Griechenland) an einem Wolken freien Sommertag binnen 28 Minuten (10 J/cm<sup>2</sup>) [114]. Bei den verwendeten UVA-Dosen handelt es sich somit um physiologisch relevante UVA-Dosen. Für die Untersuchung von DNA-Schäden nach UVA-Exposition setzten Courdavault et al. humane Fibroblasten und Keratinozyten UVA-Dosen im Dosisbereich von 0 bis 200 J/cm<sup>2</sup> aus [115]. Andere Studien zur Untersuchung UVA-induzierter DNA-Schäden verwendeten UVA-Dosen bis 20 J/cm<sup>2</sup> [116]. Die o.g. UVA-Bestrahlungsdosen stimmen somit mit den üblicherweise verwendeten UVA-Dosen zur Untersuchung von UVA-induzierten DNA-Schäden überein.

Im SRB-Assay konnte unter den beschriebenen Versuchsbedingungen für die genannten UVA-Dosen keine toxische Wirkung in h<sub>2</sub>F gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.1.1). In vorangegangenen Studien zeigten UVA-Dosen ab 20 J/cm<sup>2</sup> zelltoxische Wirkungen [24]. In vergleichbaren Studien liegt die toxische UVA-Dosis bei 10 J/cm<sup>2</sup> [116] bzw. 25 J/cm<sup>2</sup> [115]. Neben den o.g. Parametern wird das Ausmaß der Toxizität von UV-Licht in der Zellkultur auch von der Zelldichte und dem Alter der Zellen (Passagenzahl) beeinflusst. Die Empfindlichkeit der Zellen nimmt mit steigender Passagenzahl und Zelldichte ab. Eine mögliche Erklärung für die leicht abweichenden Ergebnisse der Zelltoxizitätsmessungen sind daher u.a. verschiedene Zelldichten und Passagenzahlen.

Die Intensität der UVB-Strahlung beträgt zur Mittagszeit am Äquator 0,000 25 J/cm<sup>2</sup>s [117]. Die verwendeten UVB-Bestrahlungsdosen (100 mJ/cm<sup>2</sup>, 200 mJ/cm<sup>2</sup> und 300 mJ/cm<sup>2</sup>) entsprechen somit einem Aufenthalt in der Mittagssonne in der Nähe des Äquators von etwa 10 bzw. 20 Minuten. Diese UVB-Dosen wurden für die Induktion der UV-induzierten CPD-Bildung in dem beschriebenen Modellsystem benötigt. Die CPD-Bildung wurde auch für UVB-Dosen ab 5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB beschrieben [118]. Für den Nachweis dieser geringen Mengen an CPDs ist eine HPLC-MS/MS Methode nötig, die Sensitivität der beschriebenen immunologischen Methoden reicht nicht aus. Die Verwendung der relativ hohen UVB-Dosen sind daher lediglich durch die Sensitivität der immunologischen Nachweismethode und nicht durch die CPD-Bildung begründet. Um die Schutzwirkung der Substanzen gegen die UV-induzierte CPD-Bildung zu untersuchen, ist daher auch die Verwendung dieser UVB-Dosen möglich.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen sind UVB-Dosen von 200 mJ/cm<sup>2</sup> und 300 mJ/cm<sup>2</sup> zelltoxisch. Vergleichbare Ergebnisse ergaben auch vorangegangene Untersuchungen

[108]. In Studien zur CPD-Bildung in hdF von Courdavault et al. führte eine Bestrahlung der Zellen mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  nach 24 h Postinkubation zu einer Verringerung der Zellzahl um 30 % [118]. Eine Bestrahlung hdF mit  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UVB zeigte auch in der vorliegenden Studie eine Verringerung der Zellzahl um 30 % (siehe Abbildung 4.3). Die erhaltenen Ergebnisse zur Toxizität von UVB-Licht sind somit mit denen anderer Gruppen vergleichbar.

Für die Untersuchung des Einflusses von UV-Strahlung auf HaCaT-Zellen wurden diese wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben mit  $5 \text{ J/cm}^2$ ,  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $20 \text{ J/cm}^2$  und  $27,5 \text{ J/cm}^2$  UVA sowie  $10 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $30 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $50 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $500 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  und  $1500 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. In HaCaT-Zellen wurde eine dosisabhängige Viabilitätsabnahme nach UVA-Exposition gezeigt (siehe Abschnitt 4.1.2) und toxische Wirkungen ab  $20 \text{ J/cm}^2$  nachgewiesen. In der Literatur ist für HaCaT-Zellen eine statistisch signifikante dosisabhängige Viabilitätsabnahme für eine UVA-Exposition ab  $15 \text{ J/cm}^2$  beschrieben [119]. Die erhaltenen Daten zur Toxizität von UVA-Licht in HaCaT-Zellen sind somit mit den Ergebnissen in der Literatur vergleichbar. Geringe Abweichungen sind wie bereits beschrieben durch unterschiedliche Zelldichten, aber auch durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der Toxizität zu erklären. Vergleicht man die Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen der HaCaT-Zellen mit denen der hdF so stellt man fest, dass beide Zelltypen ähnlich auf UVA-Exposition reagieren.

Auch für eine Bestrahlung der Zellen mit UVB-Licht wurde eine dosisabhängige Viabilitätsabnahme im Dosisbereich von 0 bis  $50 \text{ mJ/cm}^2$  beobachtet. Im Gegensatz zu Fibroblasten wirkt eine UVB-Bestrahlung auf HaCaT-Zellen bereits ab einer UVB-Dosis von  $30 \text{ mJ/cm}^2$  toxisch (siehe Abschnitt 4.1.2). Die toxische Wirkung vergleichbarer UVB-Dosen wurde auch in anderen Untersuchungen gezeigt [120, 121]. UVB-Dosen ab  $500 \text{ mJ/cm}^2$  UVB zeigten eine letale Wirkung auf HaCaT-Zellen. Aus diesem Grund wurden die UVB-Dosen  $500 \text{ mJ/cm}^2$ ,  $1000 \text{ mJ/cm}^2$  und  $1500 \text{ mJ/cm}^2$  für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet.

### 5.3 Einfluss der Carotinoide auf die Zellen

Für das Arbeiten in Zellkultur ist es wichtig, dass die Substanzen in den verwendeten Konzentrationen keine direkte Toxizität (Eigentoxizität) auf die Zellen ausüben. Neben der Eigentoxizität wurde auch die Toxizität durch mögliche Zerfallsprodukte der Substanzen nach UV-Exposition untersucht. Zur Untersuchung der Carotinoide auf toxische Wirkungen in beiden Zellsystemen, wurden die Zellen jeweils wie in den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben, für 24 h mit den Substanzen ( $1,5 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{M}$  und  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend bestrahlt.

Unter den gewählten Bedingungen zeigt keines der Carotinoide (DHIR, IR, Lutein) einen direkt toxischen Effekt in hdF und HaCaT-Zellen. Auch in der höchsten Konzentration ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ) konnte für keines der Carotinoide ein toxischer Effekt auf die Zellen beobachtet werden. Dies ist in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien [24, 108]. Weitere Zellkulturstudien mit den verwendeten aromatischen Carotinoide sind nicht beschrieben. Grundsätzlich liegt der Konzentrationsbereich mit  $1,5$  bis  $10 \text{ }\mu\text{M}$  in dem üblicherweise verwendeten Bereich für Carotinoide in Zellkultur. Ching

et al. verwendeten Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  Lycopin [122]. Für die Untersuchung der interzellulären Kommunikation über „Gap Junctions“ in primären humanen Fibroblasten verwendeten Daubrawa et al. Carotinoide in Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  [123, 124]. Für die Carotinoide (Ausnahme: Canthaxanthin) wurde in diesem Konzentrationsbereich keine direkte toxische Wirkung in Zellkultur nachgewiesen [124].

Bei Behandlung der hdF mit den Carotinoiden in Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$  in Kombination mit einer Bestrahlung von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA wurde eine Verstärkung der UV-abhängigen Toxizität beobachtet. Die Verstärkung der Toxizität ist bei DHIR und IR statistisch signifikant. Ähnliche Effekte wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben [24, 108]. Für  $\beta$ -Carotin in Konzentrationen von 0,5 bis 5  $\mu\text{M}$  und einer UVA-Bestrahlungsdosis von 20  $\text{J}/\text{cm}^2$  wurde eine Toxizitätszunahme in Hautfibroblasten gezeigt [125]. Der genaue Hintergrund dieser Toxizitätszunahme ist bisher nicht geklärt. Es werden prooxidative Wirkungen der Carotinoide als Ursache diskutiert [24, 108]. Carotinoide können Reaktionen mit Peroxylradikalen eingehen und dabei antioxidativ wirken (siehe Abschnitt 1.3) [126]. Unter hohem Sauerstoffpartialdruck können Carotinoidradikale aber auch mit Sauerstoff zu Carotinoidperoxylradikalen reagieren.



Die gebildeten Carotinoidperoxylradikale führen u.a. durch Reaktion mit Lipiden (LH) zur vermehrten Lipidperoxidation [58, 126].



Neben der Lipidperoxidation können Carotinoidperoxylradikale aber auch durch Umlagerung cyclische Carotinoidperoxylradikale bilden, welche im weiteren Verlauf zu reaktiven Aldehyden ( $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindungen) abgebaut werden. Sie können u.a. mit Lysin-, Histidin- und Cystein-Seitenketten von Proteinen in einer Michael-Addition reagieren. Diese Proteinmodifikationen führen normalerweise zum Funktionsverlust der Proteine, können aber auch Signalwirkungen ausüben (siehe Abbildung 5.2) [127].

Carotinoidperoxylradikale können auch Carotinoidepoxide bilden, welche mögliche Alkylantien darstellen. Alkylantien können Alkylgruppen in DNA und Proteine einführen. Im Falle von bifunktionellen Alkylantien sind Intra- und Inter-Strang-Quervernetzungen („Crosslinks“) sowie DNA-Protein-Quervernetzungen möglich (siehe Abbildung 5.2) [128].

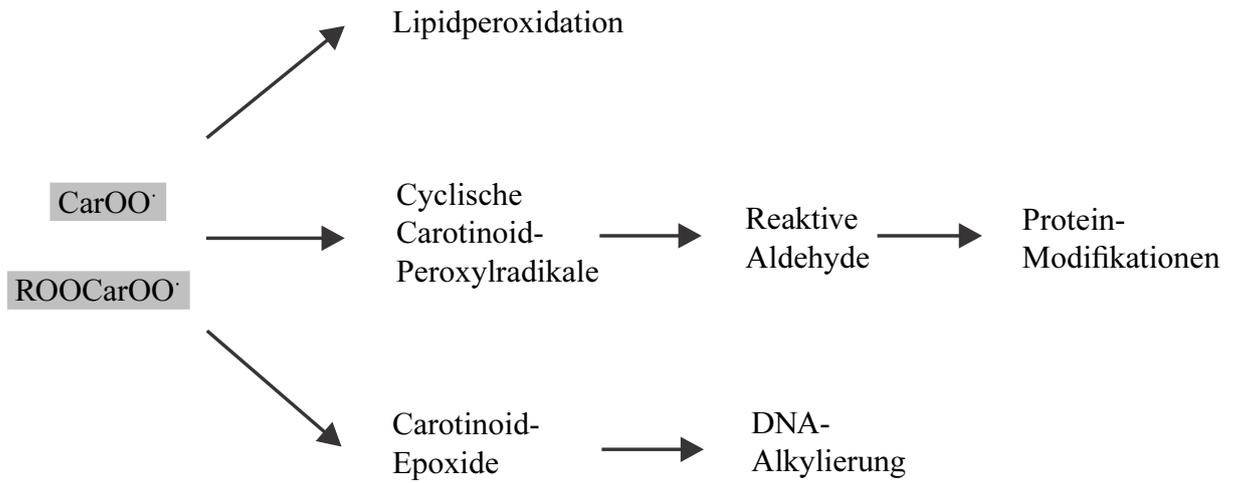


Abbildung 5.2: Prooxidative Reaktionswege von Carotinoiden

## 5.4 Zelluläre Aufnahme der Carotinoide

Um die Wirkung der Carotinoide auf Signalwege unter UV-Bestrahlung beurteilen zu können, wurde auch die zelluläre Aufnahme der Carotinoide sowie deren Stabilität unter UV-Bestrahlung bestimmt.

Die Carotinoide wurden zunächst in THF gelöst und anschließend in Zellkulturmedium weiter verdünnt. Die THF-Konzentration betrug hierbei in allen Inkubationslösungen konstant 0,1 %. Diese THF-Konzentration ist weder für hdF noch für HaCaT-Zellen toxisch. Durch Einbringen einer Carotinoid-Lösung in THF, entsteht beim Verdünnen im Medium eine Carotinoiddispersion, wobei THF als „drug-delivery vehicle“ wirkt [129]. Andere denkbare Vehikel für Carotinoide sind beispielsweise  $\beta$ -Cyclodextrin, Liposome, Niosome, LDL oder BSA, welches der Hauptbestandteil in FBS ist [130]. Die dispergierten Carotinoide können sich dann in die lipophile Zellmembran einlagern und anschließend durch Endozytose ins Zellinnere gelangen. Diese Aufnahme der Carotinoide wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an hdF, welche mit DHIR inkubiert wurden, bestätigt [24]. Der genaue Mechanismus des weiteren intrazellulären Transports ist bisher nicht bekannt, ein Transport über Vesikel ist jedoch denkbar [24, 131].

Beim Menschen erfolgt der Transport der Carotinoide nach Freisetzung aus der Lebensmittelmatrix in Mizellen [132]. Für die Aufnahme im Dünndarm werden die Carotinoide in Mizellen aus Nahrungslipiden und Gallensäuren eingeschlossen und durch die Membran der Dünndarmzellen entlang des Konzentrationsgefälles aufgenommen [57]. Dort werden die Carotinoide in Chylomikronen eingebaut und über die Lymphe in die Blutbahn sezerniert [57]. Über die Blutbahn gelangen die Carotinoide in die Leber, wo sie gelagert oder an Lipoproteine (VLDL, LDL, HDL) gebunden zu peripheren Zielgeweben transportiert werden [57].

### 5.4.1 Vergleich der Aufnahme der Carotinoide: HaCaT-Zellen und humanen dermalen Fibroblasten

Die in Abschnitt 4.2 dargestellten Ergebnisse zur zellulären Aufnahme der Carotinoide in HaCaT-Zellen werden in diesem Abschnitt mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Studien zur zellulären Aufnahme der Carotinoide in hdF verglichen. Die Studien zur zellulären Aufnahmen in hdF wurden im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführt [24] [133].

In Tabelle 5.1 ist die zelluläre Aufnahme der Carotinoide DHIR und Lutein in hdF und HaCaT-Zellen dargestellt. Beide Carotinoide gehören zu der Untergruppe der Xanthophylle, d.h. sie enthalten neben dem Kohlenstoffgrundgerüst zusätzlich Sauerstoffatome. Der Einbau von Sauerstoffatomen in das Kohlenstoffgrundgerüst führt zu veränderten Eigenschaften, wie einer veränderten Lipophilie im Vergleich zu Carotinen. Innerhalb der Gruppe der Xanthophylle ist die Lipophilie (Wasser-Oktanol-Verhältnis) vergleichbar, weshalb auch eine ähnliche zelluläre Aufnahme zu erwarten ist. Die zelluläre Aufnahme der beiden Carotinoide weicht in beiden Zelllinien im niedrigen

Konzentrationsbereich nur gering voneinander ab.

Ab einer Inkubationskonzentration von 5  $\mu\text{M}$  nimmt die Aufnahme von Lutein in HaCaT-Zellen deutlich ab.

	<b>DHIR</b>		<b>Lutein</b>	
	hdF	HaCaT	hdF	HaCaT
1,5 $\mu\text{M}$	34 $\pm$ 3	44 $\pm$ 14	35 $\pm$ 8	35 $\pm$ 3
5 $\mu\text{M}$	53 $\pm$ 2	59 $\pm$ 45	40 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2
10 $\mu\text{M}$	47 $\pm$ 3	43 $\pm$ 25	43 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1

Tabelle 5.1: **Vergleich der zellulären Aufnahme von Carotinoiden in hdF und HaCaT-Zellen** in % der eingesetzten Menge

In Darmzellen wurde gezeigt, dass bei niedrigen Konzentrationen an Carotinoiden ein Protein-vermittelter Transport überwiegt, während bei höheren Konzentrationen die passive Diffusion überwiegt [134]. Geht man davon aus, dass die Aufnahme der Carotinoide über passive Diffusion in Hautzellen bei höheren Konzentrationen ebenfalls überwiegt, ist eine mögliche Erklärung für die geringere Aufnahme von Lutein in HaCaT-Zellen bei höheren Inkubationskonzentrationen, eine Störung der passiven Diffusion von Lutein in HaCaT-Zellen.

Eine Beeinflussung der passiven Diffusion (Aufnahme) der Carotinoide durch die Carotinoidquelle ist denkbar. Für die Untersuchung in hdF wurden jeweils synthetisch hergestellte Carotinoide verwendet. Im Gegensatz dazu wurde für die Untersuchung in HaCaT-Zellen Lutein aus einer natürlichen Quelle eingesetzt. Die veränderte Aufnahme (passive Diffusion) von Lutein aus einer natürlichen Quelle könnte auf Unterschiede im Isomerenmuster zurückzuführen sein. Normalerweise überwiegt in Pflanzen die *all-trans*-Form der Carotinoide. Eine technische Verarbeitung (Extraktion) führt aber zu einer partiellen Isomerisierung der Carotinoide (Lutein) [135, 136].

### 5.4.2 Vergleich der Stabilitäten der Carotinoide unter UV-Exposition in HaCaT-Zellen und hdF

In Tabelle 5.2 ist der Gehalt von DHIR in hdF und HaCaT-Zellen nach UV-Bestrahlung abgebildet. Eine Substanz gilt hierbei als UV-stabil, wenn der Gehalt in den bestrahlten Zellen, dem Gehalt in unbestrahlten Zellen gleicht.

Vergleicht man die Stabilität von DHIR nach UVB-Exposition in den beiden Zelltypen miteinander, so ist zu erkennen, dass die Stabilitäten unter UVB-Exposition in etwa gleich sind. Im Gegensatz zur Stabilität unter UVB-Bestrahlung ist die Stabilität unter UVA-Bestrahlung in den beiden Zelllinien unterschiedlich. Die Stabilität von DHIR unter UVA-Bestrahlung ist in HaCaT-Zellen höher als in hdF. In Tabelle 5.2 ist zu erkennen, dass der UV-abhängige Abbau von DHIR unter UVA-Exposition (10 bis 27,5 J/cm<sup>2</sup>) generell höher ist als unter UVB-Exposition (0,5 bis 1,5 J/cm<sup>2</sup>). Dieser Unterschied wurde bereits in früheren Untersuchungen in hdF gezeigt [24].

Prinzipiell werden Carotinoide aber unter UVA- und UVB-Bestrahlung abgebaut [137]. Da der größte Anteil des UVB-Lichts von der Ozonschicht absorbiert wird, erreicht wesentlich mehr UVA-Licht die Erdoberfläche als UVB-Licht. Daher wurden auch die Zellen mit höheren UVA-Dosen bestrahlt. Geht man davon aus, dass der Abbau von Xanthophyllen durch UVA- und UVB-Bestrahlung bei gleicher Bestrahlungsdosis in etwa gleich ist [137], war eine höhere Stabilität der Substanzen unter UVB-Bestrahlung (0,5 bis 1,5 J/cm<sup>2</sup>) als unter UVA-Bestrahlung (10 bis 27,5 J/cm<sup>2</sup>) zu erwarten.

Bestrahlung	1,5 µM DHIR		5 µM DHIR		10 µM DHIR	
	hdF	HaCaT	hdF	HaCaT	hdF	HaCaT
0,5 J/cm <sup>2</sup> UVB	64 ± 4	69 ± 28	58 ± 8	57 ± 28	88 ± 13	57 ± 17
1,5 J/cm <sup>2</sup>	58 ± 1	67 ± 35	56 ± 9	65 ± 32	73 ± 10	65 ± 10
10 J/cm <sup>2</sup> UVA	26 ± 4	48 ± 15	39 ± 6	35 ± 14	62 ± 14	44 ± 28
20 J/cm <sup>2</sup>	19 ± 2	42 ± 26	30 ± 5	28 ± 13	73 ± 14	36 ± 32
27,5 J/cm <sup>2</sup>	16 ± 2	43 ± 18	26 ± 4	27 ± 15	48 ± 12	19 ± 12

Tabelle 5.2: **Stabilität von DHIR unter UV-Bestrahlung in hdF und HaCaT-Zellen**  
DHIR nach UV-Bestrahlung (% unbestrahlte Kontrolle)

In Tabelle 5.3 ist der Gehalt von Lutein in hdF und HaCaT-Zellen nach UV-Bestrahlung gezeigt. Vergleicht man die Stabilitäten von Lutein nach UV-Bestrahlung in beiden Zellsystemen miteinander so stellt man fest, dass Lutein in HaCaT-Zellen stabiler ist. Der UV-abhängige Abbau von Lutein in hdF ist genau wie für DHIR unter UVA-Bestrahlung höher als unter UVB-Bestrahlung. Die Stabilität von Lutein in HaCaT-Zellen ist unter UV-Bestrahlung bemerkenswert hoch. Die Lutein-Konzentration in bestrahlten HaCaT-Zellen sinkt nicht unter 93 % der Kontrolle in unbe-

strahlten Zellen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Stabilität von Lutein unter UV-Bestrahlung in den beiden Zellsystemen sind die unterschiedlichen Lutein-Quellen. Wie bereits erwähnt wurde für die Untersuchung in hdF synthetisches Lutein verwendet, während für die Untersuchung in HaCaT-Zellen Lutein einer natürlichen Quelle eingesetzt wurde. Es ist denkbar, dass die beiden Lutein-Quellen unterschiedliche Isomere enthalten, die unterschiedlich stabil sind.

Bestrahlung	1,5 $\mu$ M Lutein		5 $\mu$ M Lutein		10 $\mu$ M Lutein	
	hdF	HaCaT	hdF	HaCaT	hdF	HaCaT
0,5 J/cm <sup>2</sup> UVB	98 $\pm$ 0	105 $\pm$ 4	90 $\pm$ 13	93 $\pm$ 10	87 $\pm$ 5	100 $\pm$ 12
1,5 J/cm <sup>2</sup>	77 $\pm$ 12	111 $\pm$ 17	62 $\pm$ 5	96 $\pm$ 11	70 $\pm$ 10	99 $\pm$ 8
10 J/cm <sup>2</sup> UVA	43 $\pm$ 10	99 $\pm$ 13	37 $\pm$ 15	95 $\pm$ 16	42 $\pm$ 15	98 $\pm$ 8
20 J/cm <sup>2</sup>	25 $\pm$ 6	99 $\pm$ 9	19 $\pm$ 2	95 $\pm$ 14	25 $\pm$ 6	103 $\pm$ 4
27,5 J/cm <sup>2</sup>	15 $\pm$ 2	100 $\pm$ 11	12 $\pm$ 2	89 $\pm$ 12	17 $\pm$ 4	98 $\pm$ 6

Tabelle 5.3: **Stabilität von Lutein unter UV-Bestrahlung in hdF und HaCaT-Zellen**  
Lutein nach UV-Bestrahlung (% unbestrahlte Kontrolle)

## 5.5 Protektive Wirkungen gegen DNA-Schäden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Carotinoide DHIR, IR und Lutein auf protektive Wirkungen gegen UV-induzierte DNA-Schäden in hdF untersucht. Zu den untersuchten DNA-Schäden zählen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidative Modifikationen der DNA-Base Guanin und die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD). DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche wurden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays untersucht.

Im ersten Versuchsteil wurden DNA-Strangbrüche durch Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid induziert. Wasserstoffperoxid kann, wie bereits erwähnt, in Anwesenheit von Fe<sup>2+</sup> oder anderen Übergangsmetallionen in der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale bilden, welche die DNA oxidativ schädigen können. Eine Schädigung der DNA durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid konnte gezeigt werden. Ferner konnte die DNA-Schädigung durch Behandlung der Zellen mit den aromatischen Carotinoiden statistisch signifikant verringert werden. Eine Behandlung der Zellen mit Lutein hatte keinen Einfluss auf die DNA-Schädigung.

DHIR zeigte bereits bei früheren Versuchen eine ausgeprägte antioxidative Wirkung. Das antioxidative Potential von DHIR wurde mit Hilfe des Cumol-Hydroperoxid-Inhibitionsassays bestimmt. Die Oxidation von Cumol wird hierbei mit dem Radikalstarter 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN) initiiert und die Cumolhydroperoxidbildung mit einer HPLC-DAD Methode

bestimmt [138]. Unter der Inhibitionszeit versteht man die Zeitspanne für die die Cumolhydroperoxidbildung unterdrückt wird. Je höher die Inhibitionszeit ist, desto höher ist die antioxidative Wirkung der untersuchten Substanz. Die Inhibitionszeit von DHIR lag bei 107 min, während die Inhibitionszeit von Lutein nur bei 20 min lag [138]. Es war somit zu erwarten, dass DHIR auch die Schädigung der DNA durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid durch Abfangen von Hydroxylradikalen hemmt. In vorangegangenen *in-vitro* Studien wurde bereits die UVA-abhängige ROS-Bildung mit Hilfe des Farbstoffs 2'-7'-Dichlorofluoresceindiacetat untersucht. Mit diesem Versuch können zwar keine kurzlebigen ROS wie Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale erfasst werden, die Ergebnisse zeigen aber die allgemeinen antioxidativen Eigenschaften der untersuchten Substanzen. Die Behandlung der Zellen mit den aromatischen Carotinoiden DHIR und IR führte zu einer statistisch signifikant verringerten ROS-Bildung in hdf. Eine Behandlung mit Lutein hatte keinen Effekt [24, 108, 133]. Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch die Untersuchung der DNA-Schädigung durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Es wurde eine statistisch signifikante Schutzwirkung der aromatischen Carotinoide gegen die Bildung von DNA-Schäden nachgewiesen. Eine Behandlung mit Lutein hatte keinen Effekt.

Carotinoide sind aufgrund ihrer Polyen-Struktur in der Lage Radikale abzufangen. DHIR trägt je eine Hydroxylgruppe an den aromatischen Ringen. In Abfangreaktion mit Hydroxylradikalen kann das Molekül zwei Wasserstoffatome abgeben. Dabei entsteht unter Erhalt eines konjugierten  $\pi$ -Systems (chinoide Form, siehe Abbildung 5.3) die oxidierte Form des DHIRs (3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\phi$ ,  $\phi$ -carotin-3,3'-dion). Die Verbindung kann weiterhin als Singulett-sauerstofflöcher agieren, während Lutein und IR durch das Abfangen von Radikalen inaktiv werden.

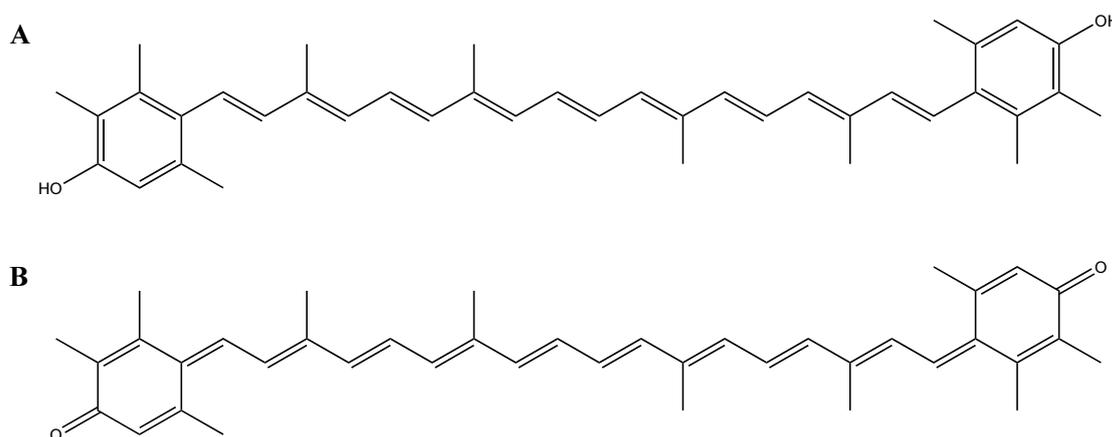


Abbildung 5.3: Strukturformeln: **A** DHIR **B** 3,4-Dihydro-4,3'-retro- $\phi$ ,  $\phi$ -carotin-3,3'-dion

Eine Behandlung der hdf mit den Carotinoiden (DHIR, IR, Lutein) führte zu einer statistisch signifikant niedrigeren Bildung von oxidativ modifizierten DNA-Basen (8-Oxoguanin, FapyG) nach UVA-Exposition. Die Oxidation von Guanin erfolgt entweder über eine Einelektronenoxidation (siehe Abbildung 1.12) oder direkt über Hydroxylradikale (siehe Abbildung 1.11). Aufgrund der *in-vitro* nachgewiesenen hohen antioxidativen Kapazität von DHIR im Vergleich zu Lutein [24, 108, 133], war auch für die Untersuchung möglicher protektiver Effekte gegen oxida-

tive DNA-Basenmodifikationen eine höhere Schutzwirkung von DHIR im Vergleich zu Lutein zu erwarten. Mit Hilfe des modifizierten Comet-Assays wurde aber kein Unterschied in der Wirksamkeit der Substanzen gegen die Bildung von oxidativen DNA-Basenmodifikationen (8-Oxoguanin, FapyG) nachgewiesen.

Zu den aromatischen Carotinoide existieren in der Literatur bisher keine weiteren Daten zur Schutzwirkung vor oxidativen Basenmodifikationen. Für Lutein wurde in einer Humanstudie bei der Untersuchung des 8-Oxoguanin-Gehalts im Urin von Probanden, eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Aufnahme von Lutein aus der Nahrung (unkontrolliert) und 8-Oxoguanin-Gehalt im Urin gemessen [139]. Es handelt sich bei dieser Studie aber um keine randomisierte, Placebo-kontrollierte Humanstudie. Die Lutein-Konzentration wurde nur anhand eines Ernährungsfragebogens bestimmt. Es ist also auch möglich, dass dieser Effekt auf andere Substanzen zurückzuführen ist.

Die UV-induzierte Bildung von CPDs wurde in hdf unmittelbar nach Bestrahlung und 24 h nach Bestrahlung bestimmt. Direkt nach Bestrahlung wurden statistisch signifikante protektive Effekte für die Behandlung der Zellen mit DHIR und IR gezeigt. Lutein als nicht-aromatisches Carotinoid zeigte keinen Einfluss auf die CPD-Bildung [140].

Die Bildung von CPDs erfolgt über eine photochemische [2+2]-Cycloaddition nach Absorption von Licht durch die DNA-Basen im UVB- und UVC-Bereich. Man geht davon aus, dass der Schutzeffekt der aromatischen Carotinoide hauptsächlich auf eine Absorption des UVB-Lichts („Sunscreen“-Effekt) durch die Carotinoide zurückzuführen ist. Absorption der UVB-Strahlung durch die aromatischen Carotinoide vermindert die photochemische Bildung der CPDs in der DNA. In vorangegangenen Studien wurde bereits ein protektiver Effekt von DHIR gegen die UV-abhängige CPD-Bildung gezeigt [108, 138].

Um festzustellen, ob die aromatischen Carotinoide neben der UVB-Absorption auch einen Einfluss auf die Nukleotidexzisionsreparatur ausüben, wurde der Einfluss der Carotinoide auf die CPD-Bildung auch nach 24 h Postinkubation untersucht. Nach Douki et al. hat die Reparatur der CPDs 24 h nach Bestrahlung bereits eingesetzt, es sind aber immernoch etwa 80 % der ursprünglichen CPDs vorhanden [141, 142]. In Übereinstimmung mit diesen Daten stellt man beim Vergleich der CPD-Level nach 0 h und 24 h auch in dieser Arbeit fest, dass nach 24 h noch mindestens 80 % der CPDs vorhanden sind. Eine Reparatur der entstandenen CPDs hat demnach 24 h nach Bestrahlung bereits eingesetzt, der Großteil der entstandenen CPDs ist aber noch vorhanden [140]. Vergleicht man die Effekte der Substanzen direkt nach Bestrahlung und 24 h nach Bestrahlung miteinander, so stellt man fest, dass der protektive Effekt der aromatischen Carotinoide nach 24 h nicht mehr so deutlich ist. Eine statistische Signifikanz konnte nur noch für DHIR bei höheren UVB-Dosen nachgewiesen werden. Die Schutzwirkung der Substanzen ist somit unmittelbar nach Bestrahlung am größten. Dieser frühe Effekt ist nur durch eine UVB-Absorption der Substanzen erklärbar. Nach 24 h ist die Schutzwirkung der Substanzen deutlich geringer, was ebenfalls dafür spricht, dass es sich bei der schützenden Wirkung hauptsächlich um einen „Sunscreen“-Effekt handelt. Über den Einfluss der Carotinoide auf die Reparaturmechanismen ist wenig bekannt, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass der Schutzeffekt der aromatischen Carotinoide zu einem geringen Teil

auch auf eine Wirkung der Carotinoide auf die Reparaturmechanismen des Organismus zurückzuführen ist.

Neben protektiven Wirkungen von DHIR vor DNA-Schäden, wurde in vorangegangenen Studien auch die schützende Wirkung gegen Proteinschäden und Lipidschäden gezeigt [24, 108, 138]. Als Marker für Proteinschäden wurde die UVA-induzierte Zinkfreisetzung untersucht. Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt Zink zum größten Teil gebunden, z.B. in Zinkfingerproteinen vor. Zink ist in solchen Proteinen über die Thiol-Gruppen zweier Cysteine und über zwei Histidine gebunden. Die Thiolgruppen sind sehr anfällig gegenüber der Oxidation durch ROS [143]. Wenn die Thiol-Gruppen oxidiert werden, bildet sich eine Disulfidbrücke aus und das gebundene Zink wird freigesetzt. Freies Zink wurde mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffs Zinquin detektiert.

Malondialdehyd (MDA) ist ein Marker für UV-induzierte Lipidschäden und kann nach Derivatisierung mit Thiobarbitursäure quantitativ per HPLC analysiert werden kann [144]. Eine Behandlung der hdf mit DHIR konnte die MDA-Bildung statistisch signifikant verringern, ähnliche Effekte wurden in Modellsystemen (Liposomen) beobachtet [24, 138]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das aromatische Carotinoid DHIR gegen alle untersuchten UV-induzierten Schäden protektive Wirkungen zeigt. Es besitzt durch seine UV-absorbierenden Eigenschaften und seine Wirkung als bifunktionaler Radikalfänger photoprotektive Eigenschaften gegen direkte und indirekten UV-Schäden. DHIR erfüllt somit *in-vitro* alle Voraussetzungen für eine photoprotektive Substanz.

## 5.6 UV-induzierte Entzündungsreaktion

Nachdem gezeigt wurde, dass DHIR photoprotektive Eigenschaften besitzt, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht, ob DHIR die Entzündungsreaktion moduliert. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden vier physiologisch relevante Entzündungsparameter näher untersucht:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , IL-6, IL-10 und IL-12.

Ein wichtiger Signalweg in der Entzündungsreaktion ist der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Signalweg, mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  [71]. Wie bereits in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, liegt  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  unter physiologischen Bedingungen gebunden an  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine inaktiv im Cytosol vor. Nach Aktivierung der  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine und Freisetzung von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , kann  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern translozieren und die Transkription bestimmter Zielgene initiieren. Es wurde untersucht, ob DHIR die Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Zellkern moduliert.

Die Bestimmung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation wurde mit zwei verschiedenen Methoden zu drei Zeitpunkten (1 h, 6 h und 24 h) durchgeführt. Die beiden Methoden ergaben zu allen Zeitpunkten vergleichbare Ergebnisse. Eine UVB-abhängige  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation wurde 6 h nach Bestrahlung gezeigt, die dann 24 h nach Bestrahlung bereits wieder deutlich zurückgegangen war (siehe Abbildung 4.41). Ähnliche Ergebnisse zur UVB-induzierten  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation in HaCaT-Zellen wurden auch von anderen Gruppen beschrieben. Hur et al. zeigten eine  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation in den Kern 4 h nach einer Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB [145]. Nach Liu et al. ist

das Maximum der Translokation von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  in den Kern 3 bis 6 h nach Bestrahlung mit UVB-Licht erreicht ( $20 \text{ mJ/cm}^2$ ) [146].

Die Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden DHIR und Lutein führte zu keiner Modulation der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation in HaCaT-Zellen. Ähnliche Befunde wurden in Caco-2 Zellen mit den Carotinoiden Lycopin und  $\beta$ -Carotin erhoben, beide Carotinoide hatten keinen Effekt auf die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation [147].

In murinen Zellen dagegen wurde eine Modulation der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation nachgewiesen. Nach Lipopolysaccharid-Stimulation wurde in murinen dendritischen Zellen mit einer vergleichbaren Konzentration an Lycopin eine Unterdrückung der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation in den Zellkern gezeigt [148]. Ein ähnlicher Befund wurde auch in murinen Makrophagen-Zelllinien für Lutein festgestellt. Es wurde gezeigt, dass Lutein in diesen Zellen die Lipopolysaccharid-stimulierte  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Translokation inhibiert und somit die Expression inflammatorischer Gene unterdrückt [149]. Die Befunde aus murinen Zellversuchen konnten mit der vorliegenden Studie in humanen Keratinozyten nicht bestätigt werden.

Interleukin-6 ist ein multifunktionales proinflammatorisches Zytokin, welches u.a. die Produktion von Akut-Phase Proteinen in der Leber induziert und von humanen Keratinozyten nach UV-Exposition gebildet wird [150]. Es kann von einer Reihe von Zellen gebildet werden, die Zielzellen hingegen sind limitiert auf solche die einen IL-6 Rezeptor besitzen [75].

Die Expression von IL-6 wurde wie die  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation auch zu drei Zeitpunkten bestimmt (1 h, 6 h und 24 h). Ähnlich wie bei der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Translokation wurde 6 h nach Bestrahlung ein UVB-abhängiger Anstieg der IL-6 Expression in HaCaT-Zellen beobachtet. Ein UVB-abhängiger Anstieg der IL-6 Expression bereits 1 h nach Bestrahlung war nicht zu erwarten, da IL-6 zu den Proteinen gehört, deren Expression u.a. über den Transkriptionsfaktor  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  geregelt ist. Die Befunde sind in Übereinstimmung mit Studien von Monfrecola et al., die nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UVB einen deutlichen Anstieg der mRNA Expression von IL-6 nach 6 h beschreiben [151]. Nach 12 bzw. 24 h ist die Expression von IL-6 bereits wieder gesunken [151]. Der optimale Wellenlängenbereich für die Induktion der IL-6 Expression wird von Petit-Frère et al. im UVB-/UVC-Bereich angegeben. Dieser Wellenlängenbereich entspricht ebenfalls dem optimalen Bereich für die Bildung von CPDs, weshalb bereits die Autoren einen Zusammenhang zwischen DNA-Schäden (CPDs) und der Expression von IL-6 postulierte [152]. Eine Beeinflussung der IL-6 Expression durch Carotinoide, wie Fucoxanthin wurde von Kim et al. beschrieben [153]. Die Untersuchung der IL-6 Expression nach Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden war wichtig, um eine Modulation der Entzündungsreaktion durch die Carotinoide auszuschließen. Eine Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden (DHIR, Lutein) führte in unbestrahlten Zellen zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der IL-6 Expression, es wurde somit keine Modulation durch die Carotinoide festgestellt.

Das Ziel der Entzündungsreaktion ist es die Störung und die entstandenen Zellschäden zu beseitigen [154]. Ohne die Entzündung ist z.B. keine Wundheilung möglich. Umgekehrt kann eine übersteigerte Entzündungsreaktion selbst zu Zellschäden führen, es ist daher wichtig dass die Entzündungsreaktion limitiert wird [67].

Ein Zytokin, welches für die Einschränkung der Entzündungsreaktion von Bedeutung ist, ist Interleukin-10. IL-10 unterdrückt u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  und damit die Induktion der IL-6 Expression [80]. Neben anti-inflammatorischen Eigenschaften hat IL-10 auch immunsuppressive Eigenschaften [155]. Idealerweise sollte IL-10 nicht durch die hier untersuchten Carotinoide beeinflusst werden.

In HaCaT-Zellen konnte kein UV-induzierter Anstieg der IL-10 Konzentration gezeigt werden.

In der Literatur gibt es kontroverse Befunde zum IL-10 Anstieg in humanen Keratinozyten nach Bestrahlung [156]. Während einige Studien eine UVB-Dosis-abhängige Zunahme der IL-10 Konzentration in humanen Keratinozyten beschreiben [105], zeigen andere Studien, dass humane Keratinozyten und HaCat-Zellen IL-10 im Gegensatz zu murinen Keratinozyten nicht exprimieren [157]. Eine weitere Studie belegt, dass humane Keratinozyten IL-10 bis zu 48 h nach Bestrahlung nicht exprimieren [156, 158].

Eine Veränderung der IL-10 Konzentration im Zellkulturmedium von HaCaT-Zellen durch eine Behandlung der Zellen mit den Carotinoiden (DHIR, Lutein) wurde nicht nachgewiesen. Diese Untersuchung ist wichtig, da bei Inkubation mit Lycopin eine statistisch signifikante dosisabhängige Abnahme der IL-10 Konzentration in mononukleären Zellen gezeigt wurde [159]. Wie bereits erwähnt, stellt IL-10 ein wichtiges Zytokin zur Limitierung der Entzündungsreaktion dar. Eine grundsätzliche Unterdrückung der IL-10 Expression durch Substanzen, würde dazu führen, dass die negative Rückkopplung (Limitierung) der Entzündungsreaktion nicht mehr einwandfrei funktioniert.

Interleukin-12 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, welches u.a. das Wachstum und die Funktion von T-Helferzellen reguliert und immunstimulierend wirkt [107]. In den HaCaT-Zellen wurde mit steigender UVB-Dosis (0 bis  $50 \text{ mJ/cm}^2$ ) eine Abnahme der IL-12 Konzentration im Zellkulturmedium ermittelt. Die Bestrahlung mit  $30 \text{ mJ/cm}^2$  und  $50 \text{ mJ/cm}^2$  UVB führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme der IL-12 Konzentration. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung von UV-Licht [67] war abhängig von der UV-Bestrahlung eine Abnahme der IL-12 Konzentration zu erwarten.

Weiter wurde gezeigt, dass IL-12 die UV-abhängige Apoptose-Reaktion unterdrückt [83]. Vergleicht man die Ergebnisse zur Abnahme der IL-12 Konzentration mit den Toxizitätsuntersuchungen stellt man fest, dass bei UVB-Dosen ab  $30 \text{ mJ/cm}^2$  eine statistisch signifikante Abnahme der Zellviabilität zu beobachten ist (siehe Abschnitt 4.1.2). Mit steigender Toxizität der UVB-Strahlung sinkt somit die IL-12 Konzentration in den HaCaT-Zellen. Eine Unterdrückung der Apoptose-Reaktion an dieser Stelle würde u.U. zu manifestierten irreparablen DNA-Schäden führen. Da IL-12 die Apoptose-Reaktion unterdrückt und gleichzeitig die DNA-Reparatur fördert, wird diskutiert, ob eine Behandlung mit IL-12 zu einer reduzierten Hautkrebsinzidenz führt [160, 161]. Ein solche Behandlung ist aber bedenklich, da der genaue Reaktionsmechanismus von IL-12 nicht bekannt ist und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Überexpression von IL-12 negative Auswirkungen (Induktion von Autoimmunerkrankungen) zur Folge hat [161].

Eine Beeinflussung der IL-12 Konzentration durch die Carotinoide (DHIR, Lutein) wurde in HaCaT-Zellen nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass keine Modulation der physiologisch relevanten Entzündungsparameter durch die Carotinoide nachgewiesen wurde. DHIR zeigte somit protektive Wirkungen gegen alle untersuchten DNA-Schäden und gegen UV-induzierte Protein- und Lipidschäden [24, 108, 138] ohne die physiologisch relevanten Entzündungsparameter zu beeinflussen. DHIR besitzt nach den bisher *in-vitro* durchgeführten Versuchen alle Eigenschaften einer photoprotektiven Substanz.

## 6 Zusammenfassung

Ohne die terrestrische Sonnenstrahlung wäre ein Leben auf der Erde nicht möglich. Die Sonne bestimmt mit ihrer Strahlung das Klima der Erde und liefert die notwendige Energie zur Photosynthese der Pflanzen. UV-Licht ist ein wesentlicher Bestandteil des Sonnenspektrums, und zeigt neben positiven Wirkungen auf biologische Systeme auch schädigende Eigenschaften. Bei übermäßiger Exposition der Haut gegenüber UV-Licht kann es zu akuten (Sonnenbrand „Erythema solare“) und chronischen Schäden (vorzeitige Hautalterung, Hautkrebs) kommen. Es ist daher wichtig, die Haut ab einer gewissen Exposition vor der schädigenden Wirkung von UV-Licht zu schützen (Photoprotektion). Neben topisch aufgetragenen Sonnenschutzmitteln wird auch das Prinzip des endogenen Sonnenschutzes z.B. durch Carotinoide verfolgt. Durch die Aufnahme der Carotinoide mit der Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln werden die Hauteigenschaften moduliert, Carotinoide können endogen vor UV-abhängigen Schäden und somit vor Sonnenbrand schützen.

Carotinoide sind natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe und aufgrund ihrer konjugierten Polyenstruktur wirksame Antioxidantien. Dihydroxyisorenieratin (DHIR) und Isorenieratin (IR) sind aromatische Carotinoide, die von dem Bakterium *Brevibacterium linens* gebildet werden. Das Bakterium wird u.a. in der Käseherstellung verwendet und verleiht Tilsiter, Romadour, Limburger und Münster seine charakteristische Färbung und durch die Produktion von Methanthiol sein charakteristisches Aroma.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die aromatischen Carotinoide auf photoprotektive Wirkungen insbesondere gegen DNA-Schäden in humanen dermalen Fibroblasten untersucht. Das strukturell ähnliche nicht-aromatische Carotinoid Lutein diente als Vergleichssubstanz. Zu den untersuchten DNA-Läsionen zählen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidative Modifikationen der DNA-Base Guanin und die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs). Eine Behandlung der Zellen mit den aromatischen Carotinoiden konnte die Bildung von Strangbrüchen statistisch signifikant verringern. Auch die Bildung der oxidativen Basenmodifikationen der DNA-Base Guanin, 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-Oxoguanin) und 2,6-Diamin-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyG) wurde durch eine Behandlung der Zellen mit den aromatischen Carotinoiden statistisch signifikant verringert.

Die UV-induzierte CPD-Bildung wurde in humanen dermalen Fibroblasten unmittelbar und 24 h nach Bestrahlung untersucht. Direkt nach Bestrahlung wurden statistisch signifikante protektive Effekte bei Behandlung der Zellen mit DHIR und IR gezeigt. Nach 24 h waren noch mindestens 80 % der entstandenen CPDs vorhanden, eine Reparatur hatte demnach nach 24 h bereits eingesetzt, der Großteil der CPDs war aber noch vorhanden. Der protektive Effekt der Substan-

zen gegen die CPD-Bildung war nach 24 h deutlich niedriger. Die Bildung der CPDs erfolgt über eine photochemische [2+2]-Cycloaddition nach Absorption von Licht durch die DNA-Basen von Licht im UVB- und UVC-Bereich. Vermutlich ist der Schutzeffekt der aromatischen Carotinoide hauptsächlich auf eine Absorption des UVB-Lichts zurückzuführen, wobei ein Einfluss der Carotinoide auf die Reparaturmechanismen nicht auszuschließen ist.

Der zweite Teil dieser Arbeit ist auf die Untersuchung der UV-induzierten Entzündungsreaktion in Hautzellen fokussiert. Das aromatische Carotinoid DHIR soll photoprotektiv wirken ohne die Entzündungsreaktion ganz oder teilweise zu unterdrücken. Zur Untersuchung ob DHIR die Entzündungsreaktion moduliert, wurden vier physiologisch relevante Entzündungsparameter näher untersucht:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , IL-6, IL-10 und IL-12.

Der  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  Signalweg ist ein zentraler Signalweg bei der Entzündungsreaktion. Nach Freisetzung von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , kann das Molekül in den Zellkern translozieren und die Transkription bestimmter Zielgene initiieren. Interleukin-6 ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, dessen Expression u.a. von  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  reguliert wird. IL-10 gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen und reguliert die Bildung proinflammatorischer Zytokine durch die Unterdrückung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ . IL-12 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, es verstärkt u.a. die Nukleotidexzisionsreparatur und unterdrückt die UV-abhängige Apoptose.

Keiner der untersuchten physiologisch relevanten Entzündungsparameter wurde durch die Behandlung der Zellen mit DHIR beeinflusst.

Es wurde gezeigt, dass DHIR einen protektiven Effekt gegen die Bildung von DNA-Strangbrüchen, oxidativen Basenmodifikationen der DNA-Base Guanin und gegen die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren besitzt ohne die ausgewählten physiologisch relevanten Entzündungsparameter zu beeinflussen. DHIR besitzt nach den *in-vitro* Untersuchungen die Charakteristika einer photoprotektiven Substanz.

## 7 Summary

Life on earth depends on radiation from the sun which determines the climate on our planet and provides the energy for photosynthesis. UV radiation is a major part of the solar spectrum with either beneficial or adverse effects on biological systems.

Overexposure of the skin to ultraviolet light can lead to acute (sunburn, „Erythema solare“) and chronic damage (premature skin aging, skin cancer). Thus, it is important that the skin is well protected from the damaging properties of ultraviolet light (photoprotection). In addition to topically applied sunscreens, an endogenous protection by carotenoids is possible. The intake of carotenoids with the diet or supplements can positively influence skin properties, carotenoids may endogenously protect against UV-related damage and thus against sunburn.

Carotenoids are naturally occurring plant compounds and due to their conjugated polyene system effective antioxidants. Dihydroxyisorenieratene (DHIR) and Isorenieratene (IR) are aromatic carotenoids, which are produced by *Brevibacterium linens*. The bacterium is used in the cheese production and is responsible for the characteristic colour and due to the production of methanethiol, for the characteristic aroma of Tilsit, Romadour, Limburger and Muenster.

In the first part of this work, the aromatic carotenoids were examined for particular photoprotective effects against DNA damage in human dermal fibroblasts. The structurally related non-aromatic carotenoid lutein was used as reference compound. DNA lesions examined included DNA single and double strand breaks, oxidative modifications of the DNA base guanine and the formation of cyclobutanpyrimidin dimers (CPD). Treatment of the cells with the aromatic carotenoids decreased the formation of strand breaks significantly. Formation of oxidative base modifications of the DNA base guanine, 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoguanine) and 2,6-diamine-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG) was significantly decreased after treatment of the cells with the aromatic carotenoids.

The UV-induced CPD formation in human dermal fibroblasts was examined immediately and 24 h after irradiation. Directly after irradiation significant protective effects were shown when the cells were treated with DHIR and IR. After 24 h at least 80 % of the generated CPDs were still present, thus a repair had already started after 24 h but most of the CPDs were still present. The protective effect of the compounds on the CPD-formation was lower after 24 h. Formation of CPDs via a photochemical [2+2]-cycloaddition reaction is based on the absorption of light in the UVB and UVC range by the DNA bases. Probably, the protective effect is mainly due to absorption of UVB light by the aromatic carotenoids, however an influence of the carotenoids on the repair mechanisms cannot be excluded.

The second part of this work is focused on the investigation of UV-induced inflammatory response in skin cells. To investigate whether DHIR influences the inflammatory response, four physiologically relevant inflammatory markers were examined:  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , IL-6, IL-10 und IL-12.

The  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  signaling pathway is an important pathway in inflammatory response. After release  $\text{Nf}\kappa\text{B}$  can translocate into the nucleus and initiate transcription of specific target genes. Interleukin-6 is a proinflammatory cytokine and its expression is regulated by  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ . IL-10 belongs to the anti-inflammatory cytokines and regulates the production of proinflammatory cytokines by suppressing the activation of the transcription factor  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ . IL-12 is an immunomodulatory cytokine, which reinforces the nucleotide excision repair and suppresses the UV-dependant apoptosis.

None of the investigated physiologically relevant inflammatory parameters were affected by the treatment of the cells with DHIR.

It has thus been shown that DHIR exhibits protective effects against the formation of DNA strand breaks, oxidative base modifications of the DNA base guanine and against the formation of cyclobutanpyrimidin dimers without affecting the selected physiologically relevant inflammatory parameters. According to the *in-vitro* studies DHIR meets all the requirements of a photoprotective agent.

## 8 Anhang

### Reinheitsbestimmung des Thymindimerstandards

Die Reinheit des Standards wurde mit folgenden Methoden überprüft: HPLC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 264 nm (siehe Abbildung 8.1), Massenspektrum,  $^1\text{H}$ -NMR (siehe Abbildung 8.2 und 8.4) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (siehe Abbildung 8.3 und 8.5).

- Massenspektrum (EI, Pt: 40 °C) m/z: 126(100), 85(3), 70(3)

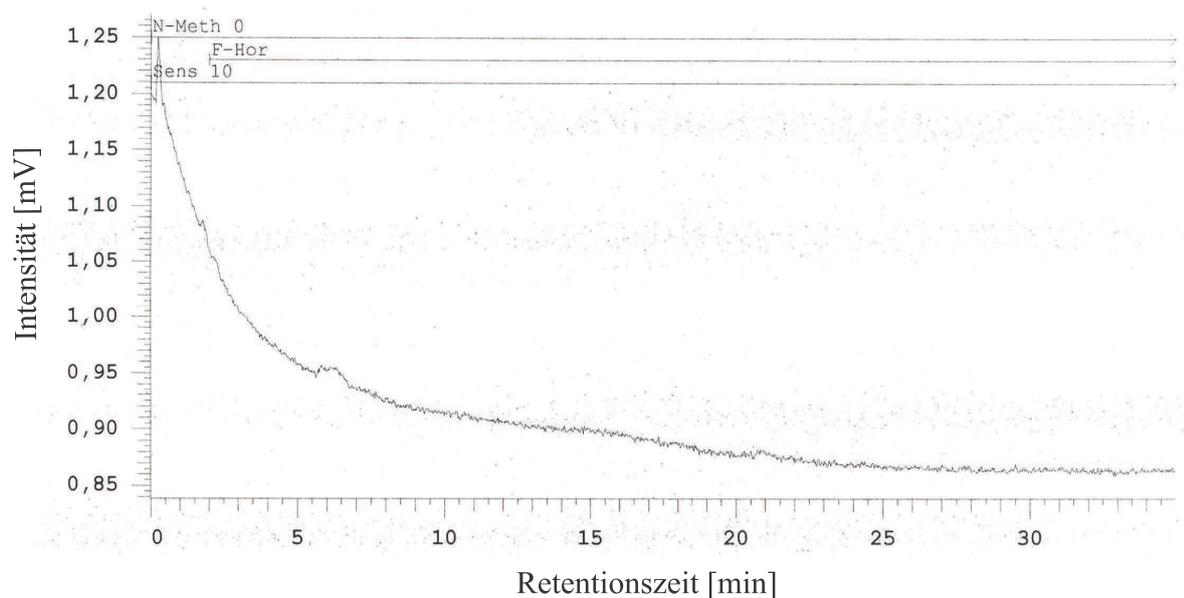


Abbildung 8.1: HPLC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 264 nm

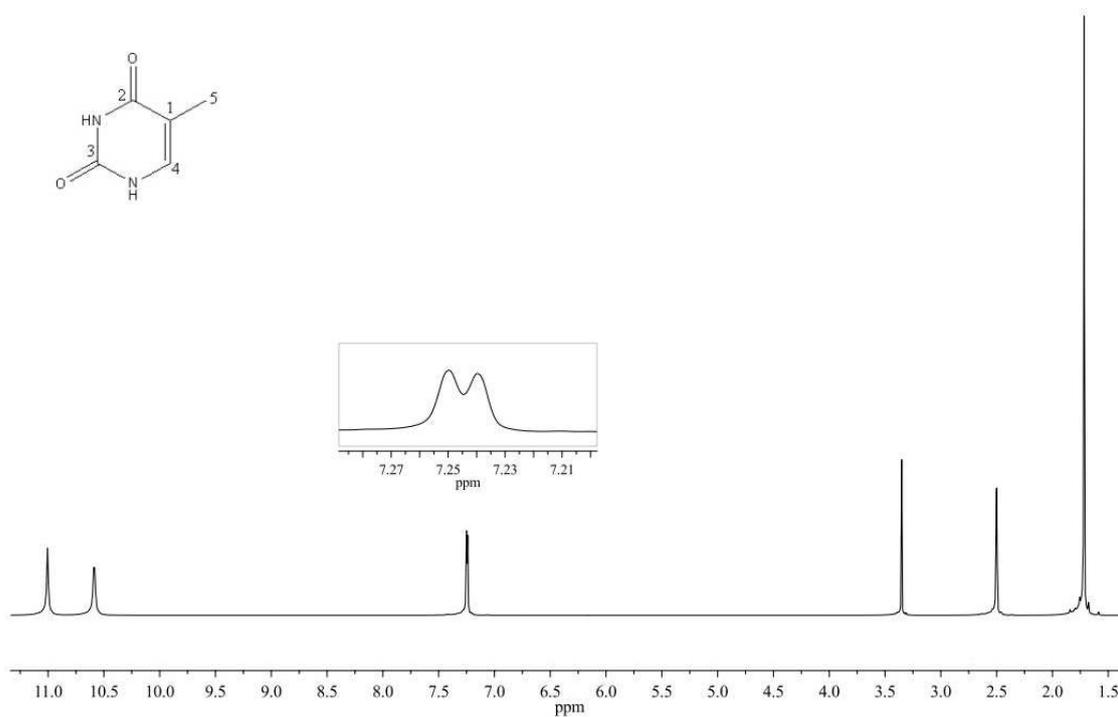


Abbildung 8.2: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 1,72$  (s, 3H, 5-H), 7,25 (d, 1H, 4-H), 10,59 (s, 1H, -CH-NH-CO-), 11,00 (s, 1H, -CO-NH-CO-) ppm.

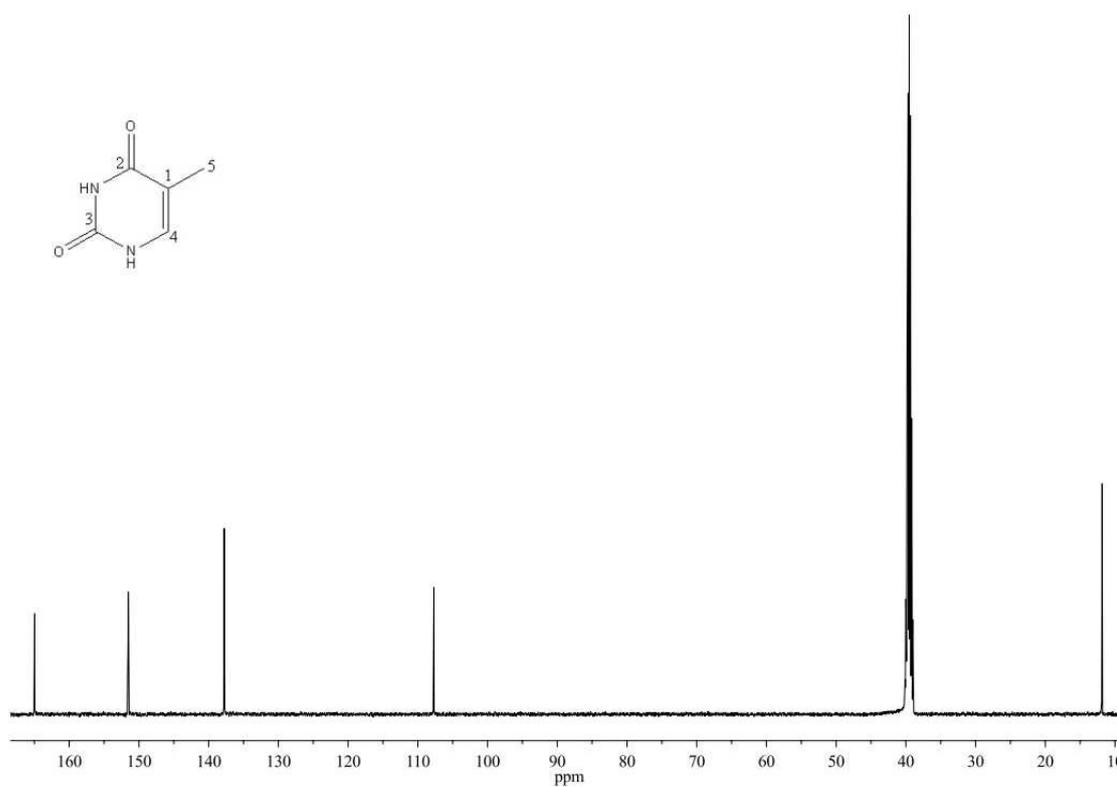


Abbildung 8.3: <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta = 11,84$  (5-C), 107,70 (1-C), 137,77 (4-C), 151,54 (3-C), 164,97 (2-C) ppm.

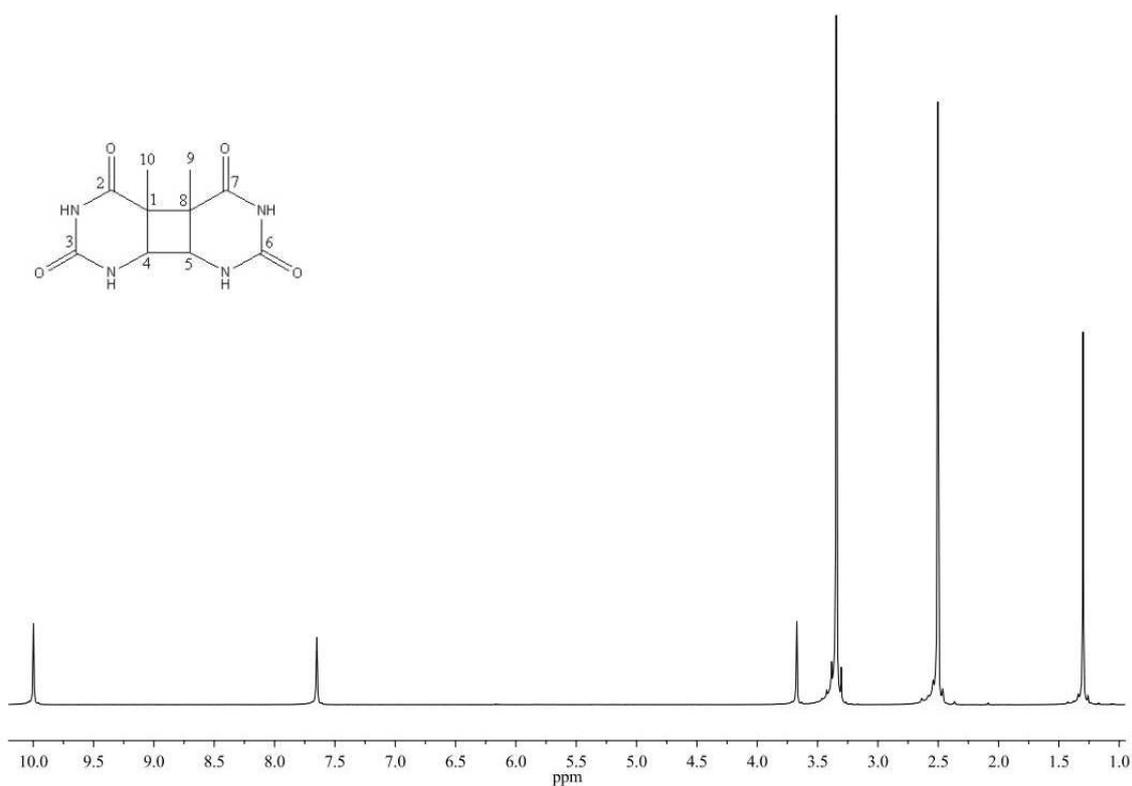


Abbildung 8.4:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,30$  (s, 6H, 9-H, 10-H), 3,67 (s, 2H, 4-H, 5-H), 7,65 (s, 2H, -CH-NH-CO-), 10,00 (s, 2H, -CO-NH-CO-) ppm.

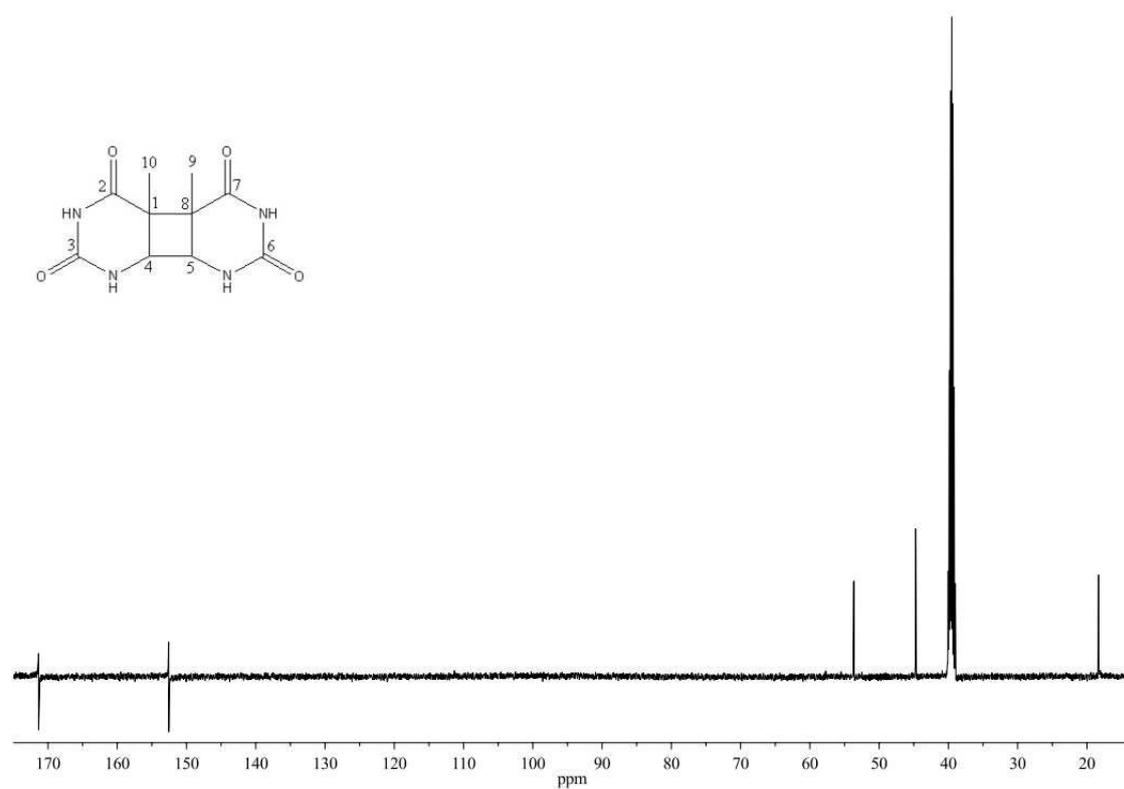


Abbildung 8.5:  $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 18,32$  (9-C, 10-C), 44,74 (1-C, 8-C), 53,64 (4-C, 5-C), 152,57 (3-C, 6-C), 171,36 (2-C, 7-C) ppm.

## Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVC-Bestrahlung in hdF

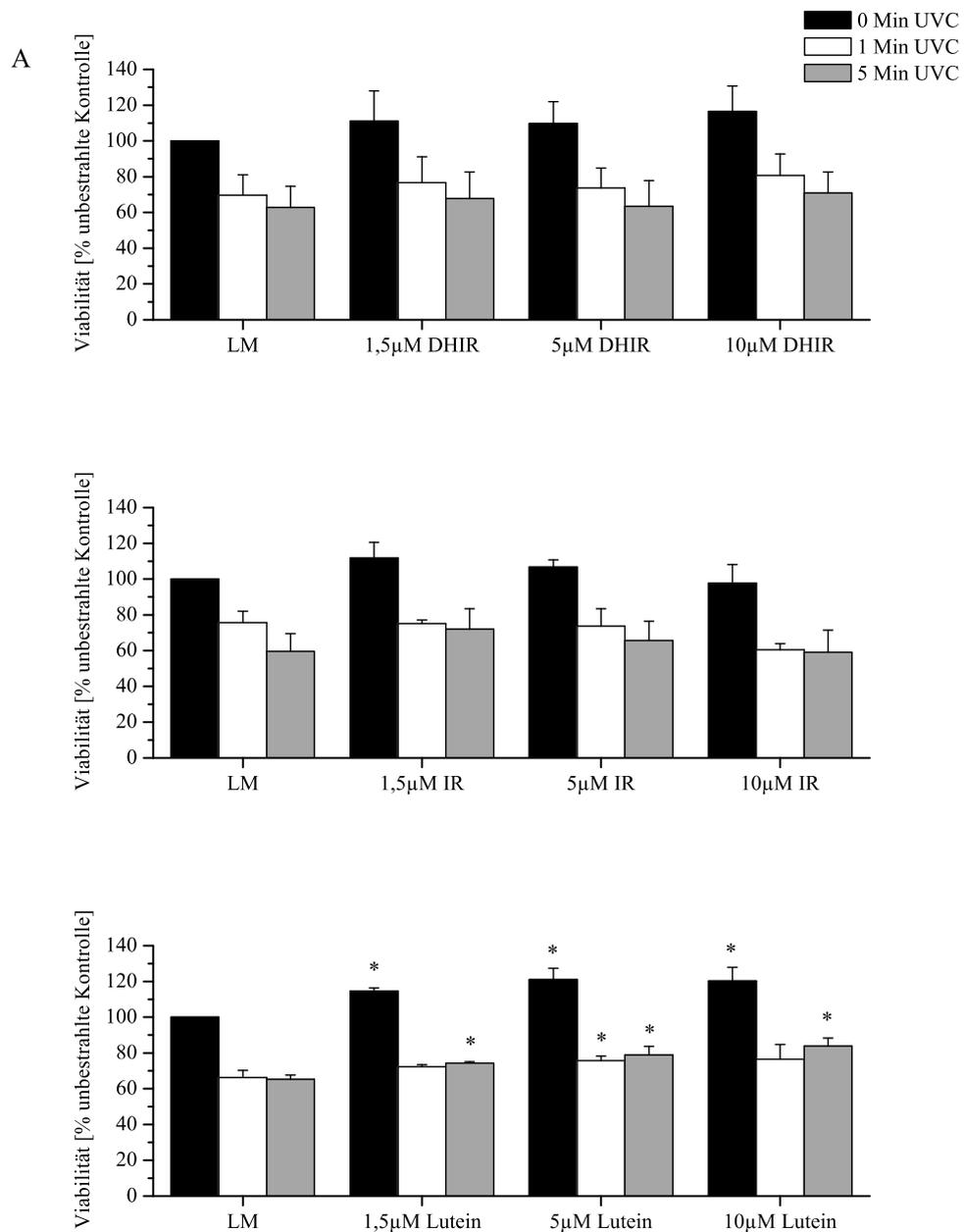


Abbildung 8.6: Zytotoxische Wirkung der Carotinoide und UVC-Bestrahlung in hdF.

**A** DHIR **B** IR **C** Lutein

unbestrahlte Kontrolle (0,1 % THF) = 100 %; n = 3; \*p ≤ 0,05 bezogen auf jeweilige Kontrollzellen

## Morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit Carotinoiden

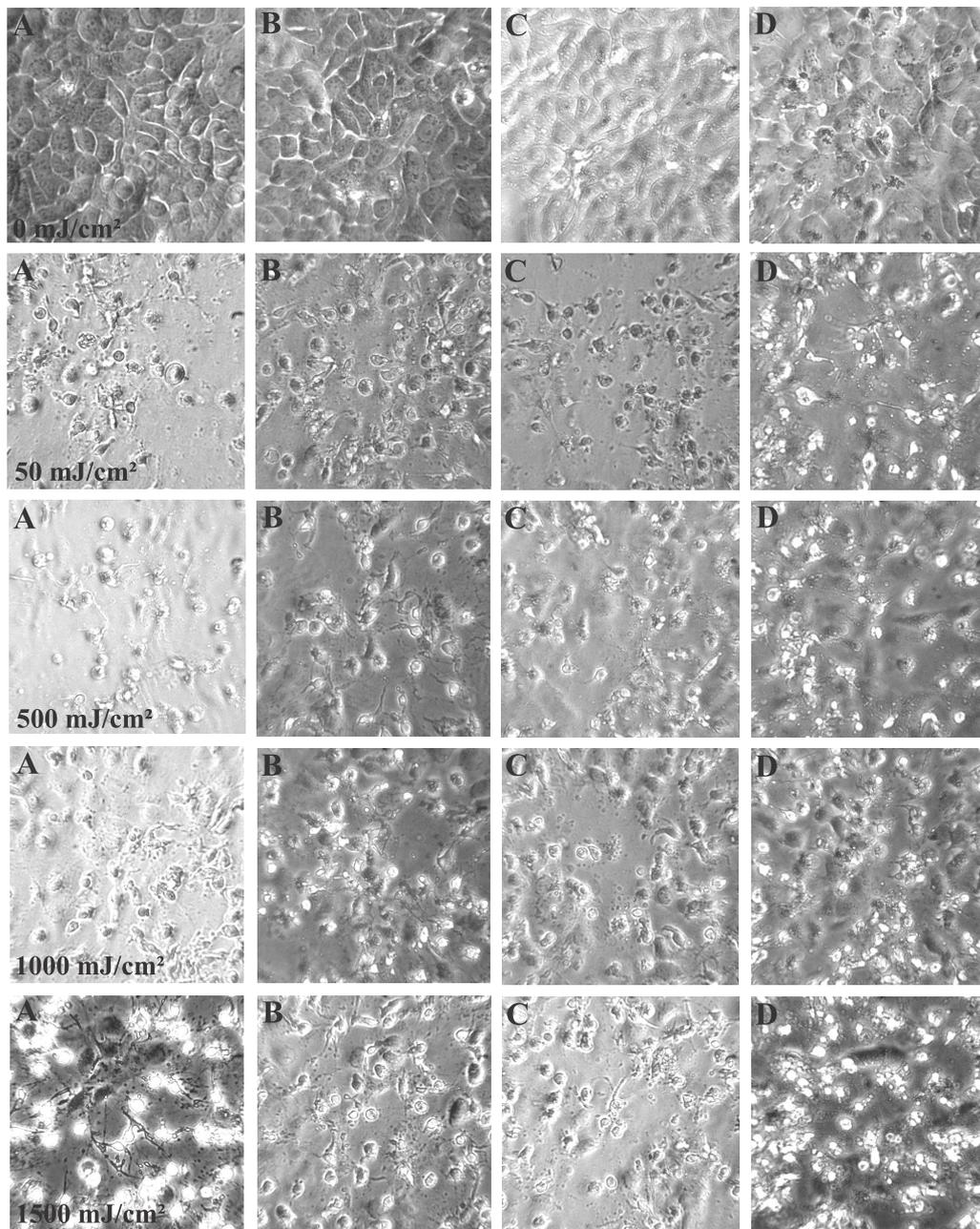


Abbildung 8.7: Morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit DHR.

A THF B 1,5 μM DHR C 5 μM DHR D 10 μM DHR

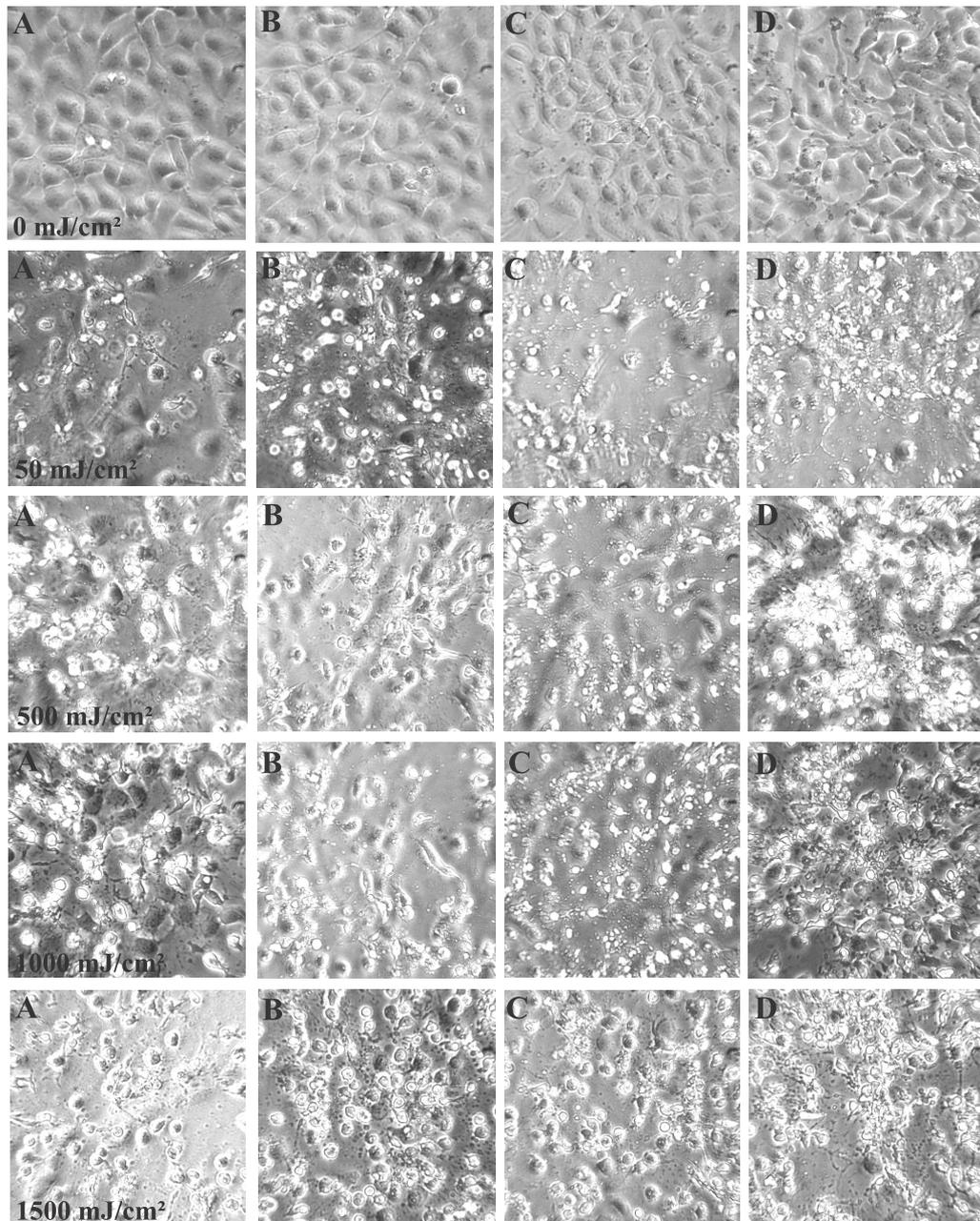


Abbildung 8.8: Morphologische Veränderung der HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Behandlung mit Lutein.

A THF B 1,5 μM Lutein C 5 μM Lutein D 10 μM Lutein

# Literaturverzeichnis

- [1] NABORS, M. W.: *Botanik*. 1. Aufl. München : Pearson Deutschland GmbH, 2007
- [2] ESSER, C. ; KRUTMANN, J.: UV radiation and skin pigmentation. Aryl hydrocarbon receptor - a „new kid on the block“. In: *Hautarzt* 61 (2010), Jul, Nr. 7, S. 561–566
- [3] JENKINS, M. ; HOLICK, M. F.: *Schützendes Sonnenlicht. Die heilsamen Kräfte der Sonne*. 1. Aufl. Stuttgart : Karl F. Haug Verlag, 2005
- [4] ELLSÄSSER, S.: *Körperpflegekunde und Kosmetik - Ein Lehrbuch für die PTA-Ausbildung und die Beratung in der Apothekenpraxis*. Berlin : Springer DE, 2008
- [5] KARLSON, P. ; DOENECKE, D. ; KOOLMAN, J. ; FUCHS, G. ; GEROK, W.: *Karlsons Biochemie und Pathologie*. 15. überarb. u. neugestalt. A. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005
- [6] WOLF, P.: [Sunscreens. Protection against skin cancers and photoaging]. In: *Hautarzt* 54 (2003), Sep, Nr. 9, S. 839–844
- [7] AL MAHROOS, M. ; YAAR, M. ; PHILLIPS, T. J. ; BHAWAN, J. ; GILCHREST, B. A.: Effect of sunscreen application on UV-induced thymine dimers. In: *Arch Dermatol* 138 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1480–1485
- [8] GODAR, D. E.: UV doses worldwide. In: *Photochem. Photobiol.* 81 (2005), Nr. 4, S. 736–749
- [9] GILCHREST, B. A. ; KRUTMANN, J.: *Skin Aging* -. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg : Springer, 2006
- [10] NARAYANAN, D. L. ; SALADI, R. N. ; FOX, J. L.: Ultraviolet radiation and skin cancer. In: *Int. J. Dermatol.* 49 (2010), Sep, Nr. 9, S. 978–986
- [11] MARKS, R.: An overview of skin cancers. Incidence and causation. In: *Cancer* 75 (1995), Jan, Nr. 2 Suppl, S. 607–612
- [12] KRUTMANN, J.: New developments in photoprotection of human skin. In: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 (2001), Nr. 6, S. 401–407

- [13] STAHL, W.: Carotinoide: endogener Sonnenschutz. In: *Biologische Medizin* (2003), Nr. 2, S. 75–77
- [14] HEINRICH, U. ; GARTNER, C. ; WIEBUSCH, M. ; EICHLER, O. ; SIES, H. ; TRONNIER, H. ; STAHL, W.: Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. In: *J. Nutr.* 133 (2003), Jan, Nr. 1, S. 98–101
- [15] AUST, O. ; STAHL, W. ; SIES, H. ; TRONNIER, H. ; HEINRICH, U.: Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and protects against UV-light-induced erythema. In: *Int J Vitam Nutr Res* 75 (2005), Jan, Nr. 1, S. 54–60
- [16] FRITSCH, P.: *Dermatologie und Venerologie für das Studium*. 1. Aufl. Berlin : Springer DE, 2009
- [17] MOLL, I.: *Dermatologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2010
- [18] KRUTMANN, J.: New developments in photoprotection of human skin. In: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 14 (2001), Nr. 6, S. 401–407
- [19] BRUCE, P. Y.: *Organische Chemie - Studieren kompakt*. 5. aktualisierte Auflage. München : Pearson Deutschland GmbH, 2011
- [20] RAVANAT, J. L. ; DOUKI, T. ; CADET, J.: UV damage to nucleic acid components. In: HÄDER, D. (Hrsg.) ; JORI, G. (Hrsg.): *Sun Protection in Man*. 2001, S. 207–230
- [21] DOUKI, T. ; ZALIZNIAK, T. ; CADET, J.: Far-UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. In: *Photochem. Photobiol.* 66 (1997), Aug, Nr. 2, S. 171–179
- [22] DOUKI, T. ; COURT, M. ; SAUVAIGO, S. ; ODIN, F. ; CADET, J.: Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), Apr, Nr. 16, S. 11678–11685
- [23] MOURET, S. ; BAUDOUIN, C. ; CHARVERON, M. ; FAVIER, A. ; CADET, J. ; DOUKI, T.: Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006), Sep, Nr. 37, S. 13765–13770
- [24] WAGENER, T.: *Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung von Carotinoiden in Modellsystemen und dermalen Fibroblasten*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2009
- [25] DROGE, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. In: *Physiol. Rev.* 82 (2002), Jan, Nr. 1, S. 47–95

- [26] KOHEN, R. ; NYSKA, A.: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. In: *Toxicol Pathol* 30 (2002), Nr. 6, S. 620–650
- [27] WIBERG, N. ; WIBERG, E. ; HOLLEMAN, A. F.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie* -. 33. Edition. Berlin : Walter de Gruyter, 1985
- [28] BRIVIBA, K. ; KLOTZ, L. O. ; SIES, H.: Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. In: *Biol. Chem.* 378 (1997), Nov, Nr. 11, S. 1259–1265
- [29] AFONSO, S. G. ; SALAMANCA, R. Enriquez d. ; BATLLE, A. M.: The photodynamic and non-photodynamic actions of porphyrins. In: *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999), Mar, Nr. 3, S. 255–266
- [30] MINAMI, H. ; SATO, K. ; MAEDA, T. ; TAGUCHI, H. ; YOSHIKAWA, K. ; KOSAKA, H. ; SHIGA, T. ; TSUJI, T.: Hypoxia potentiates ultraviolet A-induced riboflavin cytotoxicity. In: *J. Invest. Dermatol.* 113 (1999), Jul, Nr. 1, S. 77–81
- [31] GIACOMONI, P. U.: *Sun Protection in Man* -. Amsterdam : Elsevier, 2001
- [32] STEENKEN, S. ; JOVANOVIC, S. V.: How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. In: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), S. 617–618
- [33] CRESPO-HERNANDEZ, C. E. ; CLOSE, D. M. ; GORB, L. ; LESZCZYNSKI, J.: Determination of redox potentials for the Watson-Crick base pairs, DNA nucleosides, and relevant nucleoside analogues. In: *J. Phys. Chem. B* 111 (2007), S. 5386–5395
- [34] BÜSCH, F.: *Synthese und Untersuchungen eines  $\alpha$ -konfigurierten, oxidativen DNA-Schadens ( $\alpha$ -cFaPydG)*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2007
- [35] MALINS, D. C. ; OSTRANDER, G. K. ; HAIMANOT, R. ; WILLIAMS, P.: A novel DNA lesion in neoplastic livers of feral fish: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine. In: *Carcinogenesis* 11 (1990), Jun, Nr. 6, S. 1045–1047
- [36] WAGNER, A. ; JAHREIS, G.: Nachweis von DNA-Schäden mittels Analyse von oxidierten Nucleosiden und deren Anwendung als Biomarker. In: *Ernährungs-Umschau* 51 (2004), Nr. 5, S. 178–184
- [37] HALLIWELL, B.: Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolution and preliminary results from nutritional supplementation studies. In: *Free Radical Res* 29 (1998), S. 469–486

- [38] LOFT, S. ; VISTISEN, K. ; EWERTZ, M. ; TJJNNELAND, A. ; OVERVAD, K. ; POULSEN, H. E.: Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. In: *Carcinogenesis* 13 (1992), Dec, Nr. 12, S. 2241–2247
- [39] CHENG, X. ; KELSO, C. ; HORNAK, V. ; SANTOS, C. de I. ; GROLLMAN, A. P. ; SIMMERLING, C.: Dynamic behavior of DNA base pairs containing 8-oxoguanine. In: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005), Oct, Nr. 40, S. 13906–13918
- [40] KOUCHAKDJIAN, M. ; BODEPUDI, V. ; SHIBUTANI, S. ; EISENBERG, M. ; JOHNSON, F. ; GROLLMAN, A. P. ; PATEL, D. J.: NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).dA(anti) alignment at lesion site. In: *Biochemistry* 30 (1991), Feb, Nr. 5, S. 1403–1412
- [41] SHIBUTANI, S. ; TAKESHITA, M. ; GROLLMAN, A. P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. In: *Nature* 349 (1991), Jan, Nr. 6308, S. 431–434
- [42] KUCHINO, Y. ; MORI, F. ; KASAI, H. ; INOUE, H. ; IWAI, S. ; MIURA, K. ; OHTSUKA, E. ; NISHIMURA, S.: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. In: *Nature* 327 (1987), Nr. 6117, S. 77–79
- [43] KUCHINO, Y. ; MORI, F. ; KASAI, H. ; INOUE, H. ; IWAI, S. ; MIURA, K. ; OHTSUKA, E. ; NISHIMURA, S.: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. In: *Nature* 327 (1987), Nr. 6117, S. 77–79
- [44] WAGENER, C. ; MÜLLER, O.: *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3. komplett aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2009
- [45] ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WALTER, P. ; SCHÄFER, U. ; HÄCKER, B. ; HORSTMANN, C.: *Molekularbiologie der Zelle*. 5. vollständig überarbeitete Auflage. Weinheim : Wiley VCH Verlag GmbH, 2011
- [46] LAGORIO, S. ; TAGESSON, C. ; FORASTIERE, F. ; IAVARONE, I. ; AXELSON, O. ; CARERE, A.: Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. In: *Occup Environ Med* 51 (1994), Nov, Nr. 11, S. 739–743
- [47] FLOHR, C.: *Untersuchungen zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuklease 1 und das Xeroderma pigmentosum A protein*, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Diss., 2003
- [48] MANG, R. ; KRUTMANN, J.: Sonnenschutz im Urlaub. In: *Hautarzt* 6 (2003), S. 498–505

- [49] SETLOW, R. B.: The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 (1974), Sep, Nr. 9, S. 3363–3366
- [50] BRITTON, G.: Structure and properties of carotenoids in relation to function. In: *FASEB J.* 9 (1995), Dec, Nr. 15, S. 1551–1558
- [51] KASPER, H.: *Ernährungsmedizin und Diätetik*. 10. Aufl. München : Elsevier, Urban, 2004
- [52] STAHL, W. ; KRUTMANN, J.: [Systemic photoprotection through carotenoids]. In: *Hautarzt* 57 (2006), Apr, Nr. 4, S. 281–285
- [53] SIES, H. ; STAHL, W.: Nutritional protection against skin damage from sunlight. In: *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004), S. 173–200
- [54] STAHL, W. ; SIES, H.:  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 96 (2012), Nov, Nr. 5, S. 1179S–84S
- [55] STAHL, W. ; SIES, H.: Carotenoids and protection against solar UV radiation. In: *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15 (2002), Nr. 5, S. 291–296
- [56] BONNIE, T. Y. P. ; CHOO, Y. M.: Oxidation and thermal degradation of carotenoids. In: *Journal of Oil Palm Research* 2 (1999), Nr. 1, S. 62–78
- [57] WATZEL, B. ; BUB, A.: Carotinoide. In: *Ernährungsumschau* 48 (2001), S. 71–74
- [58] BRITTON, G. ; LIAAEN-JENSEN, S. ; PFANDER, H.: *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health* -. Berlin, Heidelberg : Springer, 2008. – ISBN 978-3-764-37501-0
- [59] STAHL, W.: Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin. In: *Dev Ophthalmol* 38 (2005), S. 70–88
- [60] ROBERTS, R. L. ; GREEN, J. ; LEWIS, B.: Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. In: *Clin. Dermatol.* 27 (2009), Nr. 2, S. 195–201
- [61] YAMAGUCHI, M.: On carotenoids of a sponge „Reniera japonica“. In: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 30 (1956), S. 111–114
- [62] NYBRAATEN, G. ; LIAAEN-JENSEN, S.: Characterization of phenolic carotenoids. In: *Acta Chem. Scand.* 25 (1971), Nr. 1, S. 370–372
- [63] ARCAMONE, F. ; CAMERINO, B. ; COTTA, E. ; FRANCESCHI, G. ; GREIN, A. ; PENCO, S. ; SPALLA, C.: New carotenoids from *Streptomyces mediolani* n. sp. In: *Experientia* 25 (1969), Mar, Nr. 3, S. 241–242
- [64] KOHL, W. ; ACHENBACH, H. ; REICHENBACH, H.: The pigments of *Brevibacterium linens*: Aromatic carotenoids. In: *Phytochemistry* 22 (1983), Nr. 1, S. 207 – 210

- [65] FERCHICHI, M. ; HEMME, D. ; NARDI, M. ; PAMBOUKDJIAN, N.: Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. In: *J. Gen. Microbiol.* 131 (1985), Apr, Nr. 4, S. 715–723
- [66] ROESSNER, A. ; PFEIFER, U. ; MÜLLER-HERMELINK, H. K.: *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie.* 11. Aufl. München : Elsevier, Urban, 2008
- [67] GANTEN, D. ; RUCKPAUL, K.: *Immunsystem und Infektiologie.* 1. Aufl. Berlin : Springer DE, 1999
- [68] TOEWS, G. B. ; BERGSTRESSER, P. R. ; STREILEIN, J. W.: Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. In: *J. Immunol.* 124 (1980), Jan, Nr. 1, S. 445–453
- [69] KRIPKE, M. L.: Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974), Nov, Nr. 5, S. 1333–1336
- [70] KRIPKE, M. L. ; FISHER, M. S.: Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 57 (1976), Jul, Nr. 1, S. 211–215
- [71] COOPER, S. J. ; BOWDEN, G. T.: Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. In: *Curr Cancer Drug Targets* 7 (2007), Jun, Nr. 4, S. 325–334
- [72] BONIZZI, G. ; KARIN, M.: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. In: *Trends Immunol.* 25 (2004), Jun, Nr. 6, S. 280–288
- [73] FRITSCH, P.: *Dermatologie Venerologie - Grundlagen. Klinik. Atlas.* 2. Aufl. Berlin : Springer DE, 2003
- [74] DINARELLO, C. A.: Proinflammatory cytokines. In: *Chest* 118 (2000), Aug, Nr. 2, S. 503–508
- [75] O'REILLY, S. ; CIECHOMSKA, M. ; CANT, R. ; HUGLE, T. ; LAAR, J. M.: Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 23 (2012), Jun, Nr. 3, S. 99–107
- [76] TERANISHI, T. ; HIRANO, T. ; ARIMA, N. ; ONOUE, K.: Human helper T cell factor(s) (ThF). II. Induction of IgG production in B lymphoblastoid cell lines and identification of T cell-replacing factor- (TRF) like factor(s). In: *J. Immunol.* 128 (1982), Apr, Nr. 4, S. 1903–1908
- [77] MURAGUCHI, A. ; KISHIMOTO, T. ; MIKI, Y. ; KURITANI, T. ; KAIEDA, T. ; YOSHIKAWA, K. ; YAMAMURA, Y.: T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. In: *J. Immunol.* 127 (1981), Aug, Nr. 2, S. 412–416

- [78] JAWA, R. S. ; ANILLO, S. ; HUNTOON, K. ; BAUMANN, H. ; KULAYLAT, M.: Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science. In: *J Intensive Care Med* 26 (2011), Nr. 1, S. 3–12
- [79] BLACK, S. ; KUSHNER, I. ; SAMOLS, D.: C-reactive Protein. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), Nov, Nr. 47, S. 48487–48490
- [80] WANG, P. ; WU, P. ; SIEGEL, M. I. ; EGAN, R. W. ; BILLAH, M. M.: Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), Apr, Nr. 16, S. 9558–9563
- [81] D'ANDREA, A. ; RENGARAJU, M. ; VALIANTE, N. M. ; CHEHIMI, J. ; KUBIN, M. ; ASTE, M. ; CHAN, S. H. ; KOBAYASHI, M. ; YOUNG, D. ; NICKBARG, E.: Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. In: *J. Exp. Med.* 176 (1992), Nov, Nr. 5, S. 1387–1398
- [82] NO AUTHORS LISTED: *IL-12: Cell Protection from UVB*. <http://www.rndsistemas.com>: R & D Systems, Spring 2003
- [83] SCHWARZ, A. ; STANDER, S. ; BERNEBURG, M. ; BOHM, M. ; KULMS, D. ; STEEG, H. van ; GROSSE-HEITMEYER, K. ; KRUTMANN, J. ; SCHWARZ, T.: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. In: *Nat. Cell Biol.* 4 (2002), Jan, Nr. 1, S. 26–31
- [84] LINDL, T. ; GSTRANTHALER, G.: *Zell- und Gewebekultur - Von den Grundlagen zur Laborbank*. 6. Aufl. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2008. – ISBN 978–3–827–41776–3
- [85] BOUKAMP, P. ; PETRUSSEVSKA, R. T. ; BREITKREUTZ, D. ; HORNING, J. ; MARKHAM, A. ; FUSENIG, N. E.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *J. Cell Biol.* 106 (1988), Mar, Nr. 3, S. 761–771
- [86] SKEHAN, P. ; STORENG, R. ; SCUDIERO, D. ; MONKS, A. ; MCMAHON, J. ; VISTICA, D. ; WARREN, J. T. ; BOKESCH, H. ; KENNEY, S. ; BOYD, M. R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990), Jul, S. 1107–1112
- [87] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72 (1976), May, S. 248–254
- [88] LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N. J. ; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.* 193 (1951), Nov, Nr. 1, S. 265–275

- [89] SINGH, N. P. ; MCCOY, M. T. ; TICE, R. R. ; SCHNEIDER, E. L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. In: *Exp. Cell Res.* 175 (1988), Mar, Nr. 1, S. 184–191
- [90] OLIVE, P. L.: Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. In: *Radiat. Res.* 117 (1989), Jan, Nr. 1, S. 79–92
- [91] COOK, P. R. ; BRAZELL, I. A. ; JOST, E.: Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. In: *J. Cell. Sci.* 22 (1976), Nov, Nr. 2, S. 303–324
- [92] SHAPOSHNIKOV, S. ; FRENGEN, E. ; COLLINS, A. R.: Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization—a review. In: *Mutagenesis* 24 (2009), Sep, Nr. 5, S. 383–389
- [93] TICE, R. R. ; AGURELL, E. ; ANDERSON, D. ; BURLINSON, B. ; HARTMANN, A. ; KOBAYASHI, H. ; MIYAMAE, Y. ; ROJAS, E. ; RYU, J. C. ; SASAKI, Y. F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000), Nr. 3, S. 206–221
- [94] BEUKERS, R. ; BERENDS, W.: Isolation and identification of the irradiation product of thymine. In: *Biochim. Biophys. Acta* 41 (1960), Jul, S. 550–551
- [95] WULFF, D. L. ; FRAENKEL, G.: On the nature of thymine photoproduct. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 51 (1961), Nr. 2, S. 332 – 339
- [96] ZHANG, L. ; HU, Y.: Determination of laser-induced thymine-thymine dimer in DNA by LC. In: *J Pharm Biomed Anal* 29 (2002), Jun, Nr. 1-2, S. 95–102
- [97] LIUZZI, M. ; WEINFELD, M. ; PATERSON, M. C.: Enzymatic analysis of isomeric trithymidylates containing ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers. I. Nuclease P1-mediated hydrolysis of the intradimer phosphodiester linkage. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Apr, Nr. 11, S. 6355–6363
- [98] COONS, A.H. ; CREECH, H.J. ; JONES, R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. In: *Proceedings of the society for experimental biology and medicine. Society for experimental biology and medicine (New York, NY)* Bd. 47 Royal Society of Medicine, 1941, S. 200–202
- [99] SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol.* 98 (1975), Nov, Nr. 3, S. 503–517
- [100] BRATKE, K. ; LUTTMANN, W. ; KÜPPER, M. ; MYRTEK, D.: *Der Experimentator: Immunologie (German Edition)*. Spektrum Akademischer Verlag, 2008

- [101] BURNETTE, W. N.: Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Anal. Biochem.* 112 (1981), Apr, Nr. 2, S. 195–203
- [102] SCHÖNFELD, B. S.: *Effekte von pflanzlichen Antiphlogistika auf UV-induzierte Erytheme bei gesunden Probanden*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Diss., 2007
- [103] FISCHER, C. P.: Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? In: *Exerc Immunol Rev* 12 (2006), S. 6–33
- [104] LUTTMANN, W. ; BRATKE, K. ; KÜPPER, M. ; MYRTEK, D.: *Der Experimentator - Immunologie*. 3. Aufl. Heidelberg : Elsevier Spektrum Akad. Verlag, 2009
- [105] ENK, C. D. ; SREDNI, D. ; BLAUVELT, A. ; KATZ, S. I.: Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. In: *J. Immunol.* 154 (1995), May, Nr. 9, S. 4851–4856
- [106] GRUTZ, G.: New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. In: *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005), Jan, Nr. 1, S. 3–15
- [107] KATIYAR, S. K.: Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects. In: *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 3 (2003), Sep, Nr. 3, S. 234–242
- [108] LUTTER, K.: *Untersuchungen zur photoprotektiven Wirkung von 3,3'-Dihydroxyisorenieratin und Vitamin E Derivaten*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2009
- [109] WONG, W. C. ; WU, J. Y. ; BENZIE, I. F.: Photoprotective potential of Cordyceps polysaccharides against ultraviolet B radiation-induced DNA damage to human skin cells. In: *Br. J. Dermatol.* 164 (2011), May, Nr. 5, S. 980–986
- [110] AN, I. S. ; AN, S. ; PARK, S. ; LEE, S. N. ; BAE, S.: Involvement of microRNAs in epigallocatechin gallate-mediated UVB protection in human dermal fibroblasts. In: *Oncol. Rep.* 29 (2013), Jan, Nr. 1, S. 253–259
- [111] ALONSO-LEBRERO, J. L. ; DOMINGUEZ-JIMENEZ, C. ; TEJEDOR, R. ; BRIEVA, A. ; PIVEL, J. P.: Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. In: *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 70 (2003), Apr, Nr. 1, S. 31–37
- [112] HOUGHTON, P. ; FANG, R. ; TECHATANAWAT, I. ; STEVENTON, G. ; HYLANDS, P. J. ; LEE, C. C.: The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. In: *Methods* 42 (2007), Aug, Nr. 4, S. 377–387

- [113] VOIGT, W.: Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In: *Methods Mol. Med.* 110 (2005), S. 39–48
- [114] FREDERICK, J. E. ; LUBIN, D.: Possible long-term changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the ground. In: *Photochem. Photobiol.* 47 (1988), Apr, Nr. 4, S. 571–578
- [115] COURDAVAULT, S. ; BAUDOUIN, C. ; CHARVERON, M. ; FAVIER, A. ; CADET, J. ; DOUKI, T.: Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. In: *Mutat. Res.* 556 (2004), Nov, Nr. 1-2, S. 135–142
- [116] HAZANE, F. ; SAUVAIGO, S. ; DOUKI, T. ; FAVIER, A. ; BEANI, J. C.: Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. In: *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 82 (2006), Mar, Nr. 3, S. 214–223
- [117] BALL, J. C.: A comparison of the UV-B irradiance of low-intensity, full-spectrum lamps with natural sunlight. In: *Bulletin of the Chicago Herpetological Society* 30 (1995), S. 69–71
- [118] COURDAVAULT, S. ; BAUDOUIN, C. ; SAUVAIGO, S. ; MOURET, S. ; CANDEIAS, S. ; CHARVERON, M. ; FAVIER, A. ; CADET, J. ; DOUKI, T.: Unrepaired cyclobutane pyrimidine dimers do not prevent proliferation of UV-B-irradiated cultured human fibroblasts. In: *Photochem. Photobiol.* 79 (2004), Feb, Nr. 2, S. 145–151
- [119] HWANG, Y. P. ; KIM, H. G. ; CHOI, J. H. ; HAN, E. H. ; KWON, K. I. ; LEE, Y. C. ; CHOI, J. M. ; CHUNG, Y. C. ; JEONG, T. C. ; JEONG, H. G.: Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF- $\kappa$ B/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. In: *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011), Dec, Nr. 12, S. 3374–3382
- [120] AOKI-YOSHIDA, A. ; AOKI, R. ; TAKAYAMA, Y.: Protective effect of pyruvate against UVB-induced damage in HaCaT human keratinocytes. In: *J. Biosci. Bioeng.* (2012), Dec
- [121] PERDE-SCHREPLER, M. ; CHERECHES, G. ; BRIE, I. ; TATOMIR, C. ; POSTESCU, I. D. ; SORAN, L. ; FILIP, A.: Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. In: *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 118 (2013), Jan, S. 16–21
- [122] CHEN, C. P. ; HUNG, C. F. ; LEE, S. C. ; LO, H. M. ; WU, P. H. ; WU, W. B.: Lycopene binding compromised PDGF-AA/-AB signaling and migration in smooth muscle cells and fibroblasts: prediction of the possible lycopene binding site within PDGF. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 381 (2010), May, Nr. 5, S. 401–414
- [123] DAUBRAWA, F. ; SIES, H. ; STAHL, W.: Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts. In: *J. Nutr.* 135 (2005), Nov, Nr. 11, S. 2507–2511

- [124] DAUBRAWA, F. U.: *Effekte von Astaxanthin und Canthaxanthin auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2005
- [125] OBERMULLER-JEVIC, U. C. ; FRAN CZ, P. I. ; FRANK, J. ; FLACCUS, A. ; , H. K.: Enhancement of the UVA induction of haem oxygenase-1 expression by beta-carotene in human skin fibroblasts. In: *FEBS Lett.* 460 (1999), Oct, Nr. 2, S. 212–216
- [126] EICHLER, O.: *Photoprotektion der Haut durch Carotinoide*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diss., 2000
- [127] GRIMSRUD, P. A. ; XIE, H. ; GRIFFIN, T. J. ; BERNLOHR, D. A.: Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. In: *J. Biol. Chem.* 283 (2008), Aug, Nr. 32, S. 21837–21841
- [128] BRUHN, H. D. ; FÖLSCH, U. R. ; KNEBA, M. ; LÖFFLER, H.: *Onkologische Therapie*. 1. Auflage. Stuttgart : Schattauer Verlag, 2004
- [129] BERTRAM, J. S. ; PUNG, A. ; CHURLEY, M. ; KAPPOCK, T. J. ; WILKINS, L. R. ; COONEY, R. V.: Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. In: *Carcinogenesis* 12 (1991), Apr, Nr. 4, S. 671–678
- [130] GOURANTON, E. ; YAZIDI, C. E. ; CARDINAULT, N. ; AMIOT, M. J. ; BOREL, P. ; LANDRIER, J. F.: Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes. In: *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008), Dec, Nr. 12, S. 3832–3836
- [131] GUGGER, E. T. ; ERDMAN, J. W.: Intracellular beta-carotene transport in bovine liver and intestine is not mediated by cytosolic proteins. In: *J. Nutr.* 126 (1996), May, Nr. 5, S. 1470–1474
- [132] CANENE-ADAMS, K. ; ERDMAN, J. W.: Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability. In: BRITTON, G. (Hrsg.) ; PFANDER, H. (Hrsg.) ; LIAAEN-JENSEN, S. (Hrsg.): *Carotenoids* Bd. 5. 2009, S. 115–148
- [133] LUTTER, K. ; DE SPIRT, S. ; KOCK, S. ; KRONCKE, K. D. ; MARTIN, H. D. ; WAGENER, T. ; STAHL, W.: 3,3'-Dihydroxyisorenieratene prevents UV-induced formation of reactive oxygen species and the release of protein-bound zinc ions in human skin fibroblasts. In: *Mol Nutr Food Res* 54 (2010), Feb, Nr. 2, S. 285–291
- [134] BOREL, P.: Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. In: *Mol Nutr Food Res* 56 (2012), Feb, Nr. 2, S. 228–240
- [135] ZECHMEISTER, L. ; TUZSON, P.: Isomerization of carotenoids. In: *Biochem. J.* 32 (1938), Aug, Nr. 8, S. 1305–1311
- [136] ZECHMEISTER, L.: Cis-trans Isomerization and Stereochemistry of Carotenoids and Diphenyl-polyenes. In: *Chemical Reviews* 34 (1944), Nr. 2, S. 267–344

- [137] CVETKOVIC, D. ; MARKOVIC, D.: Stability of carotenoids towards UV-irradiation in hexane solution. In: *Journal of the serbian chemical society* 73 (2008), Nr. 1, S. 15–27
- [138] MARTIN, H. D. ; KOCK, S. ; SCHERRERS, R. ; LUTTER, K. ; WAGENER, T. ; HUNSDORFER, C. ; FRIXEL, S. ; SCHAPER, K. ; ERNST, H. ; SCHRADER, W. ; GORNER, H. ; STAHL, W.: 3,3'-Dihydroxyisorenieratene, a natural carotenoid with superior antioxidant and photoprotective properties. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009), Nr. 2, S. 400–403
- [139] HUANG, H. Y. ; HELZLSOUER, K. J. ; APPEL, L. J.: The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9 (2000), Jul, Nr. 7, S. 647–652
- [140] WAGENER, S. ; VÖLKER, T. ; DE SPIRT, S. ; ERNST, H. ; STAHL, W.: 3,3'-Dihydroxyisorenieratene and isorenieratene prevent UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts. In: *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012), Aug, Nr. 3, S. 457–463
- [141] MOURET, S. ; CHARVERON, M. ; FAVIER, A. ; CADET, J. ; DOUKI, T.: Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin. In: *DNA Repair (Amst.)* 7 (2008), May, Nr. 5, S. 704–712
- [142] DOUKI, T. ; PERDIZ, D. ; GROF, P. ; KULUNCSICS, Z. ; MOUSTACCHI, E. ; CADET, J. ; SAGE, E.: Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. In: *Photochem. Photobiol.* 70 (1999), Aug, Nr. 2, S. 184–190
- [143] WILCOX, D. E. ; SCHENK, A. D. ; FELDMAN, B. M. ; XU, Y.: Oxidation of zinc-binding cysteine residues in transcription factor proteins. In: *Antioxid. Redox Signal.* 3 (2001), Aug, Nr. 4, S. 549–564
- [144] VALKO, M. ; LEIBFRITZ, D. ; MONCOL, J. ; CRONIN, M. T. ; MAZUR, M. ; TELSER, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007), Nr. 1, S. 44–84
- [145] HUR, S. ; LEE, Y. S. ; YOO, H. ; YANG, J. H. ; KIM, T. Y.: Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kappaB nuclear localization. In: *J. Dermatol. Sci.* 59 (2010), Sep, Nr. 3, S. 163–169
- [146] LIU, X. ; ZHANG, Z. ; LI, P. ; ZHU, L. ; WANG, Y. ; WANG, C.: Polypeptide from *Chlamys farreri* modulates UVB-induced activation of NF-kappaB signaling pathway and protection HaCaT cells from apoptosis. In: *Regul. Pept.* 153 (2009), Feb, Nr. 1-3, S. 49–55
- [147] KAULMANN, A. ; SERCHI, T. ; RENAUT, J. ; HOFFMANN, L. ; BOHN, T.: Carotenoid exposure of Caco-2 intestinal epithelial cells did not affect selected inflammatory markers but altered their proteomic response. In: *Br. J. Nutr.* 108 (2012), Sep, Nr. 6, S. 963–973

- [148] KIM, G. Y. ; KIM, J. H. ; AHN, S. C. ; LEE, H. J. ; MOON, D. O. ; LEE, C. M. ; PARK, Y. M.: Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. In: *Immunology* 113 (2004), Oct, Nr. 2, S. 203–211
- [149] KIM, J. H. ; NA, H. J. ; KIM, C. K. ; KIM, J. Y. ; HA, K. S. ; LEE, H. ; CHUNG, H. T. ; KWON, H. J. ; KWON, Y. G. ; KIM, Y. M.: The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. In: *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008), Sep, Nr. 6, S. 885–896
- [150] URBANSKI, A. ; SCHWARZ, T. ; NEUNER, P. ; KRUTMANN, J. ; KIRNBAUER, R. ; KOCK, A. ; LUGER, T. A.: Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. In: *J. Invest. Dermatol.* 94 (1990), Jun, Nr. 6, S. 808–811
- [151] MONFRECOLA, G. ; GAUDIELLO, F. ; CIRILLO, T. ; FABBROCINI, G. ; BALATO, A. ; LEMBO, S.: Nicotinamide downregulates gene expression of interleukin-6, interleukin-10, monocyte chemoattractant protein-1, and tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression in HaCaT keratinocytes after ultraviolet B irradiation. In: *Clin. Exp. Dermatol.* 38 (2013), Mar, Nr. 2, S. 185–188
- [152] PETIT-FRÈRE, C. ; CLINGEN, P. H. ; GREWE, M. ; KRUTMANN, J. ; ROZA, L. ; ARLETT, C. F. ; GREEN, M. H.: Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. In: *J. Invest. Dermatol.* 111 (1998), Sep, Nr. 3, S. 354–359
- [153] KIM, K. N. ; HEO, S. J. ; YOON, W. J. ; KANG, S. M. ; AHN, G. ; YI, T. H. ; JEON, Y. J.: Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. In: *Eur. J. Pharmacol.* 649 (2010), Dec, Nr. 1-3, S. 369–375
- [154] HEINZELLER, T.: *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2001
- [155] SHREEDHAR, V. ; GIESE, T. ; SUNG, V. W. ; ULLRICH, S. E.: A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. In: *J. Immunol.* 160 (1998), Apr, Nr. 8, S. 3783–3789
- [156] BOONSTRA, A. ; SAVELKOUL, H. F.: The role of cytokines in ultraviolet-B induced immunosuppression. In: *Eur. Cytokine Netw.* 8 (1997), Jun, Nr. 2, S. 117–123
- [157] TEUNISSEN, M. B. ; KOOMEN, C. W. ; JANSSEN, J. ; WAAL MALEFYT, R. de ; SCHMITT, E. ; WIJNGAARD, R. M. d. ; DAS, P. K. ; BOS, J. D.: In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A431 and HaCaT fail

- to express IL-10 mRNA and protein. In: *Clin. Exp. Immunol.* 107 (1997), Jan, Nr. 1, S. 213–223
- [158] KANG, K. ; HAMMERBERG, C. ; MEUNIER, L. ; COOPER, K. D.: CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. In: *J. Immunol.* 153 (1994), Dec, Nr. 11, S. 5256–5264
- [159] BESSLER, H. ; SALMAN, H. ; BERGMAN, M. ; ALCALAY, Y. ; DJALDETTI, M.: In vitro effect of lycopene on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. In: *Immunol. Invest.* 37 (2008), Nr. 3, S. 183–190
- [160] SCHWARZ, A. ; MAEDA, A. ; KERNEBECK, K. ; STEEG, H. van ; BEISSERT, S. ; SCHWARZ, T.: Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. In: *J. Exp. Med.* 201 (2005), Jan, Nr. 2, S. 173–179
- [161] SCHWARZ, T.: Untersuchung molekularer und zellulärer Entstehungsmechanismen UV-induzierter Hautkrebsen Teilprojekt 2; Molekularbiologische Prozesse bei UV-induzierten Hautkrebsen. In: *BMU - Schriftenreihe Reaktorsicherheit und Strahlenschutz* 686 (2006)

# Abkürzungsverzeichnis

---

## Abkürzungen

---

8-Oxoguanin	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Cycloaddition
CER	Cytoplasmic Extraction Reagent
CPD	Cyclobutanpyrimidindimere
DHIR	Dihydroxyisorenieratin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FapyG	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FBS	fötale Kälberserum
FD	Farbdichte
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
HaCaT	Human adult low Calcium High Temperature Keratinocytes
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hdF	humane dermale Fibroblasten
hOGG1	humane 8-Oxoguanin DNA Glykosylase-1
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase
i.S.d.	im Sinne der
I $\kappa$ B	inhibitory- $\kappa$ B
IKK	inhibitory- $\kappa$ B Kinasen
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12

---

---

**Verwendete Abkürzungen**

---

IL-6	Interleukin-6
Immunostaining	Immunzytochemische Färbung
IR	Isorenieratin
LDL	Low-Density Lipoprotein
MDA	Malondialdehyd
NER	Nuclear Extraction Reagent
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
R	Rest
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRB	Sulforhodamine B
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Thymindimere
TUNEL	terminal dUTP nick end-labeling
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

---

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Vergabe des interessanten Themas, die mir gewährten Freiheiten bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung und für die Möglichkeit die Arbeit an seinem Institut durchführen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, wie auch die vermittelten Kenntnisse und Erfahrungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas J.J. Müller möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats, die freundliche Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Frau Dr. Silke De Spirt danke ich für die Einführung in das Arbeiten mit Zellkulturen, für den kollegialen Umgang in der Arbeitsgruppe und die aufmunternden Worte in Zeiten des Zweifels.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen und Ehemaligen für das tolle Arbeitsklima, die stete Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Peter Graf und Heide Krahl möchte ich mich insbesondere für die technische Unterstützung bei HPLC-Problemen und bei Tanja Portugall, Gisela Pansegrau, Andrea Borchardt und Claudia Wyrich für die Hilfe bei Zellkulturproblemen bedanken.

Mein Dank geht ebenfalls an die Arbeitsgruppen Brenneisen und Steinbrenner/Sies, insbesondere Dr. Maren Sack und Sylwia Kluza, für anregende Diskussionen, gute Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stahl: Dr. Daniela Maydt, Peter Graf, Tanja Portugall, Gisela Pansegrau, Heide Krahl, Dr. Elisabet Fernandez-Garcia und Carina Wehrend für die freundliche Aufnahme ins Team, deren Unterstützung, den Zusammenhalt und das stets offene Ohr bedanken. Danke für die tolle gemeinsame Zeit, beruflicher und privater Natur.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Marlies Scholtes für die Unterstützung in allen organisatorischen Angelegenheiten und Thomas Becher für die Hilfe bei EDV-Problemen bedanken.

Meinen Freunden und meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Großeltern, möchte ich für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Unterstützung vor allem in den letzten Monaten danken.

Aus tiefstem Herzen möchte ich meinem Freund Christian Michael für seine bedingungslose Unterstützung, sein Verständnis und seine Liebe danken. Danke, dass du immer für mich da bist!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen wunderbaren Eltern ohne deren Unterstützung und Vertrauen ich nie so weit gekommen wäre. Danke!

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Düsseldorf, den 2. Mai 2013

---

Sarah Wagener