

**Biologische Relevanz der nicht-enzymatischen
Stickstoffmonoxid-Generierung in der
menschlichen Haut**

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

vorgelegt von
Adnana-Nicoleta Paunel-Görgülü
aus Jassy

Düsseldorf 2006

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Christoph V. Suschek

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2006

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

1. Paunel A.N., Dejam A., Thelen S., Kirsch M., Horstjann M., Gharini P., Mürtz M., Kelm M., de Groot H., Kolb-Bachofen V., Suschek C.V. (2005)

Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 1;38(5): 606-15

2. Suschek C.V., Paunel A., Kolb-Bachofen V. (2005)

Non enzymatic nitric oxide formation during UVA or UVB-irradiation: experimental setups and ways to measure. *Methods Enzymol.* 396

3. Paunel-Görgülü A., Dejam A., Thelen S., Kirsch M., Horstjann M., Gharini P., Mürtz M., Kelm M., de Groot H., Kolb-Bachofen V., Suschek C. V. (2005) (Abstract)

UVA induces immediate and enzyme-independent nitric oxide formation in healthy human skin leading to NO-specific signalling. *Eur J Cell Biol.* 84: 37-38 Suppl. 55

4. Paunel A., Dejam A., Thelen S., Kirsch M., Horstjann M., Gharini P., Muertz M., Kelm M., de Groot H., Kolb-Bachofen V., Suschek C. (2005) (Abstract)

UVA induces immediate and enzyme-independent nitric oxide formation in healthy human skin leading to NO-specific signalling. *J Invest Dermatol* 125 (1): A3-A3 918

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Meinem Sohn Deniz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Enzymatische NO-Synthese	1
1.2	Reaktivität des NO-Radikals	4
1.3	Molekulare Zielmoleküle des NO-Radikals	5
1.4	Nicht-enzymatische NO-Bildung	8
1.5	UV-Strahlung	10
1.6	Struktur und Funktion der humanen Haut	13
1.7	Funktion von NO in der humanen Haut	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Kits	19
2.1.3	Lösungen und Puffer	20
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	21
2.1.5	Antikörper	22
2.1.6	Zytokine	23
2.1.7	NO-Donoren	23
2.1.8	Oligonukleotide	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Primärkultur von Keratinozyten	24
2.2.2	Zytokinaktivierung	24
2.2.3	UVA-Bestrahlung	25
2.2.4	Einfrieren von Zellen	25
2.2.5	Auftauen von Zellen	25
2.2.6	Hauthomogenisierung	25
2.2.7	Zell-Lyse	26
2.2.8	Erstellung von Wachstumskurven	26
2.2.9	Biotin switch Methode	26
2.2.10	SDS-PAGE	28
2.2.11	Western Blot	29
2.2.12	Immunhistochemie	30
2.2.13	Immunzytochemie	30

2.2.14	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
2.2.15	Quantitativer Nachweis von SH-Gruppen in Proteinen	31
2.2.16	RT-PCR	32
2.2.17	Real-Time PCR	33
2.2.18	Faraday-Modulationsspektroskopie (FAMOS)	36
2.2.19	Chemilumineszenzdetektion (CLD)	36
2.2.19.1	Quantifizierung von Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiole und N-Nitrosamine	37
2.2.19.2	UVA-induzierte NO-Freisetzung aus humaner Haut und Hauthomogenaten	38
2.2.20	Statistische Analysen	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Untersuchungen zur UVA-induzierten NO-Generierung und Charakterisierung von Stickoxiden in der humanen Haut	40
3.1.1	NOS-unabhängige NO-Generierung nach UVA-Bestrahlung der humanen Haut	40
3.1.2	Quantitative Bestimmung von Nitrit, Nitrat, RSNO-, RNNO-Verbindungen und Thiolgruppen in der menschlichen Haut	42
3.1.3	Beitrag der NO-Metabolite an der UVA-induzierten NO-Bildung in Hauthomogenaten	44
3.1.4	Bedeutung von Thiolen für die UVA-induzierte Nitritphotolyse <i>in vitro</i>	46
3.1.5	Detektion S-nitrosierter Proteine in der menschlichen Haut	48
3.1.6	UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosoverbindungen in der menschlichen Haut	50
3.1.7	Quantitative Bestimmung von Nitrit und Nitrosoverbindungen in Keratinozyten nach Behandlung mit Th1-Zytokinen	56
3.1.8	UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosoverbindungen in Keratinozyten	58
3.2	Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der UVA-induzierten und enzymunabhängigen NO-Generierung	62
3.2.1	cGMP-Nachweis der biologischen Wirkung	62
3.2.2	Nicht-enzymatisch gebildetes NO moduliert das Zellwachstum von Keratinozyten	63
3.2.3	Nicht-enzymatisch gebildetes NO moduliert die Expression proinflammatorischer Zytokine in Keratinozyten	75

4	Diskussion	78
4.1	UVA-induzierte NO-Bildung und Charakterisierung der Stickoxide in der menschlichen Haut	78
4.2	Biologische Aktivität des enzymunabhängig gebildeten NO	88
5	Zusammenfassung	97
6	Literatur	98
7	Abkürzungen	111
8	Danksagung	114
9	Lebenslauf	115

1 Einleitung

1.1 Enzymatische NO-Synthese

Stickstoffmonoxid ist ein gasförmiges freies Radikal, das als multifunktionales Signalmolekül in einer Vielzahl von Geweben agiert und *in vivo* enzymatisch durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) produziert werden kann. NOS katalysieren in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH die 5-Elektronen Oxidation von L-Arginin zu äquimolaren Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin. In einem ersten Reaktionsschritt wird L-Arginin unter Verbrauch eines Moleküls NADPH zu N^G-Hydroxy-L-Arginin (L-NHA) hydroxyliert, welches anschließend zu L-Citrullin und NO oxidiert wird (Feldman *et al.*, 1993). Dabei wird sowohl in NO als auch in L-Citrullin molekularer Sauerstoff eingebaut (Leone *et al.*, 1991).

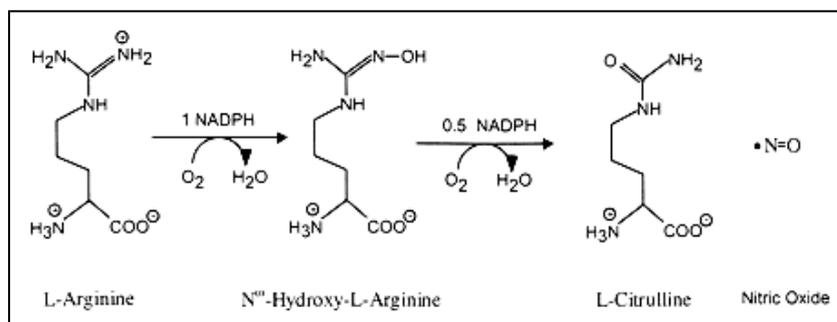


Abbildung 1-1: Biosynthese von NO durch NO-Synthasen. Die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO verläuft in zwei Reaktionen unter Verbrauch von NADPH und molekularem Sauerstoff (nach Stuehr, 2004)

Alle NOS-Isoformen enthalten konservierte Sequenzen für die Bindung der essentiellen Kofaktoren NADPH, Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) in der C-terminalen Reduktase-Domäne (Knowles *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1994) und zusätzliche Bindungsstellen für Protoporphyrin IX Häm, Tetrahydrobiopterin (BH₄) und L-Arginin in der Oxygenase-Domäne am N-Terminus. Calmodulin vermittelt dabei den Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und Oxygenase-Domäne der NOS (Abu-Soud & Stuehr, 1993). Das aktive NOS-Protein ist ein Homodimer mit einem

Molekulargewicht zwischen 250 und 300 kDa mit Kopf an Kopf angeordneten Untereinheiten und interagierenden Oxygenase-Domänen (Ghosh *et al.*, 1995). Zusätzlich zu den essentiellen Kofaktoren wird die Aktivität aller NOS-Enzyme durch assoziierte Proteine, die subzelluläre Lokalisation (Kone, 2000; Nedvetsky *et al.*, 2002) und durch endogene NOS-Inhibitoren, wie z. Bsp. das asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) (Boger *et al.*, 2003), reguliert.

Ein weiterer wichtiger Regulationspunkt stellt die Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin dar. *In vitro* Studien haben ergeben, dass der K_m -Wert für NOS im μM -Bereich ($\sim 5 \mu\text{M}$) liegt. Da die Konzentration von L-Arginin in Endothelzellen und anderen Zelltypen 50-250 μM betragen kann, sollte das NOS-Enzym unter physiologischen Bedingungen mit L-Arginin gesättigt sein (Arnal *et al.*, 1995). Allerdings konnte in *in vivo* sowie *in vitro* Studien gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Arginin-Konzentration dennoch zu einer verstärkten NO-Produktion führt. Diese als „L-Arginin-Paradox“ bezeichnete Beobachtung korreliert mit einer verstärkten Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und kann zum Teil durch endogene Inhibitoren der iNOS oder durch Konkurrenzreaktionen um das Substrat L-Arginin erklärt werden (Mori & Gotoh, 2000; Bruch-Gerharz *et al.*, 2003).

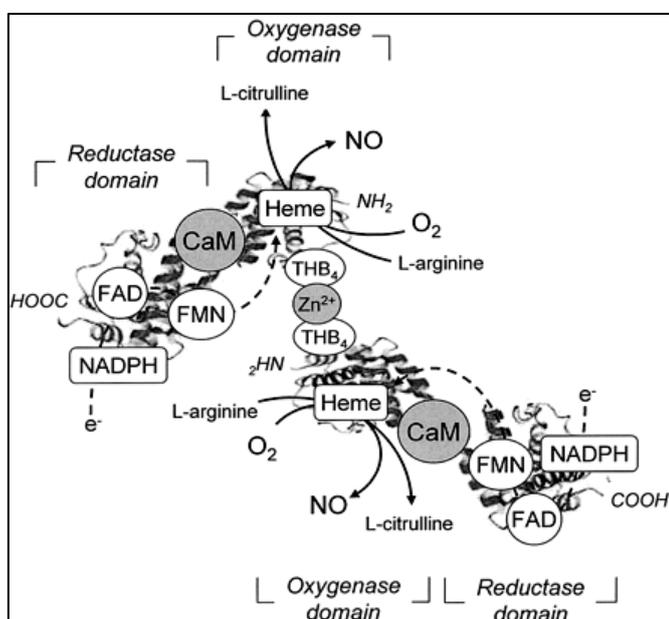


Abbildung 1-2: Molekulare Struktur des NO-Synthase-Homodimers. CaM, Calmodulin; THB4, Tetrahydrobiopterin; FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; NADPH, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat (nach Fogli *et al.*, 2004)

Die Enzymfamilie der NOS besteht aus drei Isoformen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden und sich in konstitutive NOS (cNOS) und induzierbare NOS (iNOS) unterteilen lassen (Knowles *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1994). Ursprünglich wurden diese Isoformen nach den Geweben benannt, aus denen sie erstmals aufgereinigt und kloniert wurden. Diese sind in der Zwischenzeit jedoch in vielen anderen Zelltypen gefunden und charakterisiert worden. So wird z. Bsp. die konstitutive, neuronale NOS (nNOS) konstitutiv in Neuronen, Muskelzellen (Nakane *et al.*, 1993), Epithelzellen (Asano *et al.*, 1994) und Keratinozyten (Baudouin & Tachon, 1996) exprimiert. Die konstitutive, endotheliale NOS (eNOS) wurde ursprünglich aus vaskulären Endothelzellen isoliert und konnte ferner auch im Myocardium (Balligand *et al.*, 1995), Skelettmuskel (Kobzik *et al.*, 1994), Epithelzellen (Shaul *et al.*, 1994) und Fibroblasten (Wang *et al.*, 1996) beschrieben werden. Die Aktivität beider Isoformen ist von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig. Die Aktivierung der cNOS führt zur Synthese niedriger NO-Konzentrationen (pmol) über einen Zeitraum von Sekunden bis Minuten, die pulsatil freigesetzt werden und z. Bsp. regulatorisch auf die Neurotransmission und auf das kardiovaskuläre System wirken (Ignarro *et al.*, 1995; Knowles *et al.*, 1994; Förstermann *et al.*, 1994). Im Gegensatz zur nNOS und eNOS wird die induzierbare Isoform (iNOS) üblicherweise nicht konstitutiv exprimiert, sondern kann durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine, bakterielle Endotoxine und UV-Strahlung in fast allen bekannten Zelltypen induziert werden (Nathan, 1992; Kröncke *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*, 1998). Das Enzym wurde ursprünglich aus mit LPS und Interferon- γ stimulierten murinen Makrophagen isoliert und ist auf Grund der hohen Affinität zum Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex weitgehend Ca^{2+} -unabhängig.

Da alle Isoformen vergleichbare spezifische Aktivitäten von etwa $1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Protein aufweisen (Feldman *et al.*, 1993), ist die höhere NO-Produktion der iNOS auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen. Folglich beruht die erhöhte Aktivität der iNOS auf die Ca^{2+} -Unabhängigkeit und auf die erhöhte Proteinhalbwertszeit dieser Isoform (Linscheid *et al.*, 1998).

1.2 Reaktivität des NO-Radikals

NO ist ein anorganisches farbloses Gas, das in wässriger Lösung bis zu einer Konzentration von 2 mM löslich ist. Da die physiologische bzw. pathophysiologische NO-Konzentration den μM -Bereich nicht überschreitet, liegt das NO-Molekül in biologischen Systemen in gelöster Form vor. Das NO-Molekül besitzt ein ungepaartes Elektron. Aus diesem Grund besitzt es paramagnetische Eigenschaften und eine hohe Reaktivität für verschiedene Moleküle und freie Radikale (Butler & Williams, 1993). Obwohl NO selbst ein Radikal ist, ist seine Reaktivität verglichen mit der Reaktivität anderer Radikale innerhalb biologischer Systeme relativ gering. Aufgrund seines kleinen Molekulargewichts und hydrophoben Eigenschaften, diffundiert es schnell und durchquert Zellmembranen. Unter physiologischen Bedingungen reagieren zwei Moleküle NO mit einem Molekül Sauerstoff in einer Reaktion dritten Grades zu den Oxidationsprodukten Nitrit und Nitrat. Die Halbwertszeit des NO-Moleküls wird im Allgemeinen durch seine Konzentration bestimmt. Dabei gilt, je höher die Konzentration, desto wahrscheinlicher ist die Reaktion mit Sauerstoff und die Erzeugung so genannter reaktiver Stickoxid-Intermediate (RNOI) wie $\text{NO}_2\cdot$, N_2O_3 und N_2O_4 , die ein weit breiteres Reaktionsspektrum aufweisen können als das NO-Molekül selbst. Folglich bestimmt primär allein die NO-Konzentration, ob NO als Signalmolekül fungiert oder nach Hochregulation der iNOS-Aktivität und Bildung hoher NO-Mengen RNOI entstehen, die ebenfalls Signalfunktionen ausüben können.

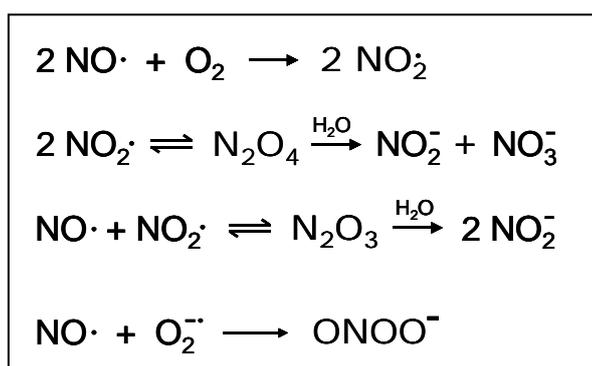


Abbildung 1-3: Reaktionsprodukte von NO mit Sauerstoff. Die zahlreichen Reaktionen hängen primär von der lokalen Konzentration von NO ab. Stabile Oxidationsprodukte sind Nitrit und Nitrat. NO kann auch mit Sauerstoffanionradikal zu Peroxynitrit reagieren. Instabile, hochreaktive Intermediate sind in dieser Abbildung fett gedruckt (nach Kröncke *et al.*, 2000)

1.3 Molekulare Zielmoleküle des NO-Radikals

1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki (Furchgott & Zawadzki, 1980), dass Endothelzellen, die mit Acetylcholin stimuliert wurden einen Botenstoff (second messenger) freisetzen, welcher die Agonistenwirkung weiter vermittelt. Aufgrund seiner Wirkung bekam das Molekül den ursprünglichen Namen „endothelium-derived relaxing factor“, bis es 1987 von Louis Ignarro als NO identifiziert wurde (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). 1998 wurde der Nobel Preis für Medizin an Robert F. Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad für ihre Arbeiten unter dem Titel „NO as a signaling molecule in the cardiovascular system“ verliehen.

NO ist ein autokriner und parakriner Regulator einer Vielzahl physiologischer Funktionen, wie Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, Zelltod, Neurotransmission, Immunmodulation, Modifikation des Zellwachstums und der Differenzierung und viele andere (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998; Kröncke *et al.* 2001; Moncada *et al.*, 1991). Das Molekül stellt jedoch aufgrund seines Radikalcharakters auch ein potentes zelluläres Toxin dar, das den Körper z. Bsp. vor eindringenden Pathogenen oder Tumorzellen schützt, jedoch auch mit dem selben Mechanismus körpereigene Zellen und Gewebe zerstören kann (Liew & Cox, 1991). Letzteres spielt eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr, Immunregulation sowie Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen (Kolb & Kolb-Bachofen, 1992; Anggard, 1994).

Die biologischen Effekte von NO können in zwei Kategorien unterteilt werden: direkte NO-Effekte und indirekte Effekte, die durch RNOI vermittelt werden (Wink & Mitchell, 1998). Direkte Effekte von NO sind schnelle Reaktionen, die bei kleinen NO-Konzentrationen (nM) ablaufen. Anders als Zytokine oder Hormone, bindet dabei das NO-Molekül nicht an einen spezifischen Rezeptor, sondern kann direkt mit Eisengruppen in Häm-haltigen Proteinen reagieren und dadurch die Enzymaktivität modulieren (Lowenstein & Snyder, 1992; Nathan & Xie, 1994). Das bekannteste Beispiel für eine NO-vermittelte Enzymaktivierung, ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Das durch cNOS synthetisierte NO bindet dabei an die Eisen(II)Häm-Gruppe des Enzyms, welches nach einleitender Konformationsänderung verstärkt zyklisches Guanosin 3'-5'-Monophosphat (cGMP) bildet. cGMP führt seinerseits zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) was mit einer Abnahme der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie einer Relaxation der glatten Muskulatur, Verminderung des Blutdrucks und einer verstärkten lokalen Durchblutung verbunden ist (Schmidt & Walter, 1994).

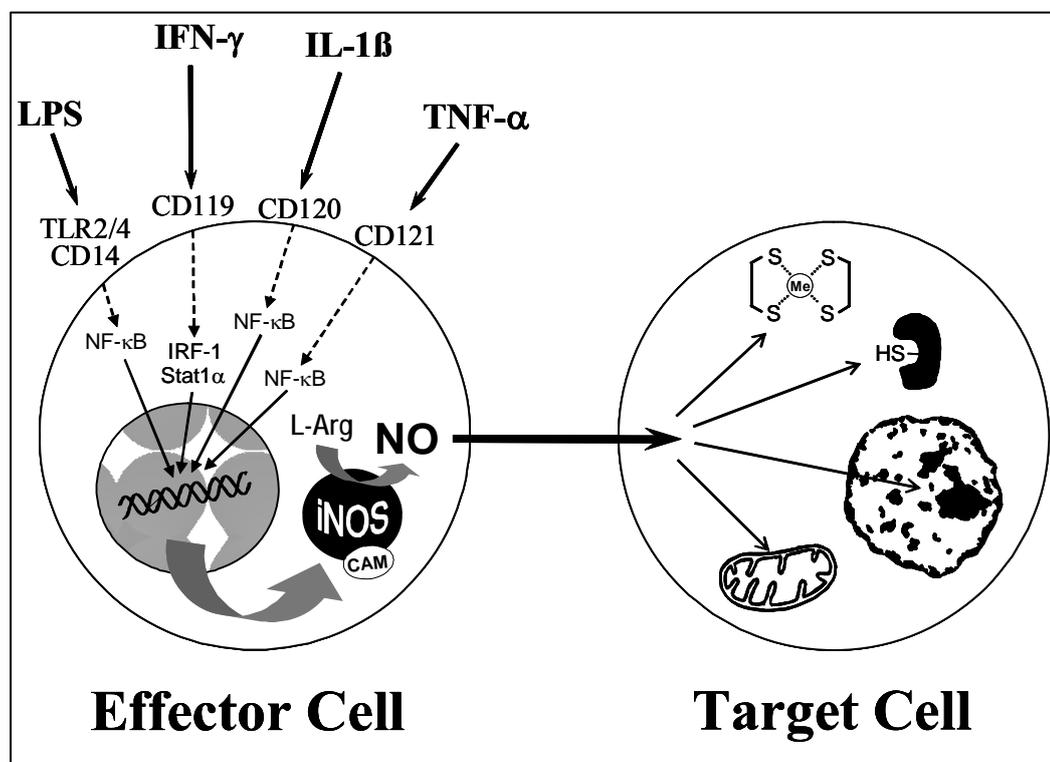


Abbildung 1-4: Signalwege der iNOS-Induktion und zelluläre Zielstrukturen von NO. Bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) und proinflammatorische Zytokine wie Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) binden an den entsprechenden Oberflächenrezeptoren und führen zur Aktivierung von Signalkaskaden, die ihrerseits die Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im Cytosol einleiten. Diese Transkriptionsfaktoren translozieren in den Kern, binden an die entsprechende Konsensussequenzen des Promotors bzw. Enhancer-Regionen des iNOS-Gens und führen zur Transkription und Expression des iNOS-Proteins. Das synthetisierte NO ist ein kleines lipophiles Molekül, das in benachbarte Zellen diffundieren kann. Bevorzugte molekulare Ziele von NO sind Häm-Gruppen und Metal-Schwefel Clustern sowie Thiolgruppen von Proteinen. Zellkern und Mitochondrien stellen die dominanten Zielstrukturen unter den Zellorganellen dar (nach Kröncke *et al.*, 2000).

Eine Bindung von NO an Häm-Gruppen kann auch zu einer Enzyminaktivierung führen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass NO an den katalytischen Zentren mitochondrialer Proteine, wie z. Bsp. der Cytochrom c Oxidase bindet und so die mitochondriale Elektronentransportkette unterbrechen kann. Somit kann NO den Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion einer Zelle regulieren (Stamler, 1994; Haddad *et al.*, 1996).

Bei hohen lokalen NO-Konzentrationen (μM), wie z. Bsp. nach iNOS-Aktivierung, kann die Bindung von NO an Eisen-Schwefel-Clustern metabolischer Enzyme ebenfalls zu einer Proteininaktivierung führen (Griffith & Stuehr, 1995) und folglich eine Hemmung wichtiger Signalwege auslösen. So wird z. Bsp. das Enzym Aconitase, welches eine kritische Rolle im Krebszyklus spielt und 4Fe-4S Cluster enthält, unter Bildung eines reversiblen Eisen-Nitrosylkomplexes durch NO inhibiert.

Eine weitere Art wie NO die Funktion von Proteinen moduliert ist die Nitrosierung. Der Nitrosierungsprozess erfolgt in der Regel nicht direkt durch NO sondern wird unter physiologischen Bedingungen primär durch N_2O_3 initiiert, welches ein Nitrosoniumion (NO^+) auf nukleophile Moleküle überträgt und zur Bildung von N-Nitrosaminen oder S-Nitrosothiolen führt (Williams, 1988). Hierbei handelt es sich um einen reversiblen Prozess, der eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt und die Funktion einer Vielzahl intrazellulärer Proteine reguliert (Stamler *et al.*, 2001). Als Beispiel für die S-Nitrosierung sind Zink-Schwefel-Cluster zu nennen, die wichtige Strukturelemente von Transkriptionsfaktoren darstellen. So resultiert die Nitrosierung von Cysteinresten in Zinkfinger-Motiven von Transkriptionsfaktoren in der Freisetzung von Zn^{2+} -Ionen und im damit verbundenen Verlust der DNA-Bindeaktivität (Kröncke *et al.*, 1994; Tabuchi *et al.*, 1994). Somit spielt NO eine wichtige Rolle bei der Regulation redoxsensitiver Gene. In biologischen Systemen wird die S-Nitrosierung gegenüber der C- oder N-Nitrosierung favorisiert. S-Nitrosoverbindungen können zudem als Speicher für NO betrachtet werden, da sie unter verschiedenen Einflüssen infolge eines Zerfalls, das NO-Molekül wieder freisetzen können (Kröncke *et al.*, 1997).

Hohe lokale NO-Konzentrationen können unmittelbar zum oxidativen sowie nitrosativen Stress und somit zur Zellschädigung führen. Peroxynitrit (ONOO^-), das stärkste zelluläre Oxidationsmittel, entsteht nach der Rekombination des Sauerstoffanionradikals mit NO und ist in der Lage die Funktionsweise einer Vielzahl von Molekülen durch Oxidation und Nitrierungsreaktionen zu modifizieren (Wink & Mitchell, 1998; Kröncke *et al.*, 1997). Deaminierung der durch N_2O_3 , $\text{NO}_2\cdot$ aber auch ONOO^- N-nitrosierten DNA-Basen führt zu DNA-Mutationen beziehungsweise Strangbrüchen sowie einer verstärkten p53-Expression (Messmer *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1992). Auf diese Weise lösen hohe NO-Konzentrationen in Thymozyten, Lymphozyten und Makrophagen einen apoptotischen Zelltod aus (Fehsel *et al.*, 1995).

Andererseits können NO-induzierte Nitrosierungsprozesse, wie z. Bsp. die Inhibierung der Caspasenaktivität durch S-Nitrosierung, antiapoptotisch wirken und somit die Zelle schützen (Dimmeler *et al.*, 1997). Dieses Beispiel für eine protektive Wirkung von NO soll hier nur exemplarisch genannt werden. Auf weitere NO-vermittelte Schutzmechanismen wird in einem späteren Kapitel näher eingegangen.

1.4 Nicht-enzymatische NO-Bildung

Erste Beweise für die Existenz von nicht-enzymatischer NO-Bildung lieferte Furchgott bereits im Jahre 1955. Er beobachtete in verschiedenen Experimenten eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur in Anwesenheit von Tageslicht (Furchgott, 1955). Dieses als Photorelaxation bekannte Phänomen ist assoziiert mit einer Zunahme der cGMP-Bildung (Karlsson *et al.*, 1984) und wird durch NOS-Inhibitoren wie L-NMMA nicht beeinflusst (Matsunaga & Furchgott, 1989). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass der Effekt der Photorelaxation zumindest teilweise auf den Zerfall eines lichtempfindlichen NO-Speichers innerhalb der Gefäßwand zurückzuführen ist (Matsunaga & Furchgott, 1989). Die Hypothese, dass NO für die Photorelaxation verantwortlich ist, konnte später in mehreren Arbeiten bestätigt werden. Venturini *et al.* (1993) konnten in ihren Experimenten nachweisen, dass eine Relaxation von Kaninchen-Aorten bei wiederholten Bestrahlungen mit polychromatischem Licht mit einem fortschreitenden Verlust der Photosensitivität verbunden ist. Offensichtlich bewirkt die Bestrahlung eine schrittweise Entleerung der vermuteten NO-Quellen. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Arbeit von Megson *et al.* (1995), die im Weiteren aber auch eine spontane Regeneration der Photosensitivität im Dunkeln zeigte. Es wurde daraufhin postuliert, dass die Wiederherstellung der vermuteten NO-Speicher vollständig von der endothelialen NOS-Aktivität abhängig ist. Dafür spricht, dass dieser Prozess sowohl durch L-NMMA, einen NOS-Inhibitor, als auch Entfernung des Endotheliums unterdrückt werden konnte. In anderen Studien hingegen wurde eine Photorelaxation in eNOS^{-/-} Mäusen beobachtet, was letztlich zu dem Schluss führte, dass NO von einer anderen NOS-Isoform erzeugt sowie aus einer nicht-enzymatischen Quelle stammen kann. Es wurde im Weiteren spekuliert, dass sowohl RSNO's aus dem Blut als auch enzymatisch generiertes NO zur

Regeneration der lichtempfindlichen NO-Speicher beitragen (Andrews *et al.*, 2002). Da der relaxierende Effekt durch Thiol-alkylierende Agenzien verhindert werden konnte, erscheint es als sehr wahrscheinlich, dass hier S-Nitrosothiole als photosensitive NO-Speicher dienen und zur Photorelaxation beitragen. Diese Aussage beruht darauf, dass diese Verbindungen ein UV-Absorptionsmaximum im Bereich zwischen 330-340 nm besitzen und bei dieser Wellenlänge unter NO-Erzeugung zerfallen (Wood *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Es gibt noch eine Vielzahl anderer Moleküle die durch UV photolytisch zu NO gespalten werden können, wie z. Bsp. N-Nitrosamine (RNNO), Nitrosylmyoglobin (MbNO), Eisen-Schwefel Nitrosylkomplexe mit Absorptionsmaxima bei 340-390 (Rao & Bhaskar, 1981), 420-422 (Kharitonov *et al.*, 1996), 360-370 (Bourassa *et al.*, 1997) und 310 nm (Lobysheva *et al.*, 1999).

Andere Arbeiten kommen zu dem Schluss, dass die genannte Photorelaxation auf dem UVA-induzierten Zerfall von intrazellulären (Kubaszewski *et al.*, 1994; Büyükafsar *et al.*, 1999) oder extrazellulären (Dave *et al.*, 1979; Wigilius *et al.*, 1990; Matsunaga & Furchgott, 1991) Nitrit beruht. Da die Photorelaxation durch Nitritlösungen verstärkt werden kann, deutet vieles darauf hin, dass unter bestimmten Umständen Nitrit eine NO-ähnliche Wirkung aufweist (Furchgott, 1991; Wigilius *et al.*, 1990). So konnte in der Arbeit von Suschek *et al.* erstmals in einem *in vitro*-System gezeigt werden, dass der Zerfall von Nitrit unter UVA-Strahlung (Absorptionsmaximum zwischen 354 und 366 nm) (Jankowsky *et al.*, 1999) zur Bildung von bioaktiven NO führt, welches eine identische Wirkung aufweist wie das NOS-generierte NO (Suschek *et al.*, 2003).

Ein weiterer physiologisch relevanter Mechanismus der nicht-enzymatischen NO-Generierung ist die pH-abhängige Reduktion von Nitrit (Lauer *et al.*, 2001; Benjamin *et al.*, 1994; Bjorne *et al.*, 2004; Cosby *et al.*, 2003; Zweier *et al.*, 1995). So zerfällt Nitrit unter sauren Bedingungen zu NO (Lauer *et al.*, 2001). Ferner gewinnt dieser letztgenannte pH-abhängige Mechanismus unter ischämischen, sauerstoffarmen Bedingungen an physiologischer Bedeutung (Benjamin *et al.*, 1994; Lundberg *et al.*, 1994). Aufgrund einer Ischämie-induzierten Azidose, zum Beispiel im Herzen von 7,4 auf 5,5, wird Nitrit zu NO reduziert (Ferrari *et al.*, 1996; Gabel *et al.*, 1997). Somit dient Nitrit in ischämischen Geweben als eine Quelle für NO, da die NOS-Aktivität aufgrund des Sauerstoff-Mangels gehemmt ist. Diese „saure Vasodilatation“ ist ein Bestandteil der Regulation der lokalen Durchblutung, der Gefäßdilatation während einer Hypoxie,

Ischämie oder während einer erhöhten metabolischen Aktivitäten und unterstützt die Regeneration der Energie- und Sauerstoffvorräte (Guyton & Hall, 1996).

1.5 UV-Strahlung

Die Sonne, die das Leben auf der Erde überhaupt erst ermöglicht, strahlt ein breites Spektrum elektromagnetischer Strahlung ab. Neben dem sichtbaren Licht enthält dieses Spektrum zu ca. 60% das langwellige Infrarotlicht und zu ca. 5% die kurzwellige ultraviolette (UV) Strahlung.

Die UV-Strahlung wird ihrerseits in Licht kurzer Wellenlänge UVC (<280 nm), UVB (280-320 nm) und der langen Wellenlänge UVA (320-400 nm) unterteilt. Unter physiologischen Bedingungen ist die humane Haut nur UVA beziehungsweise UVB Strahlung ausgesetzt, da das Ozon in der Stratosphäre Strahlung mit einer Wellenlänge <290 nm vollkommen absorbiert. Die Menge der UVA Strahlung, die die Erde erreicht, ist ungefähr 20 Mal größer als die von UVB. UVA dringt bis zu 1 mm tief in die Haut ein und erreicht so alle Zelltypen der Epidermis sowie der Dermis. Dasselbe gilt auch für die UVB-Strahlung, die jedoch nur ca. 0,5 mm tief eindringt (Abb. 1-5) (Grether-Beck *et al.*, 1997).

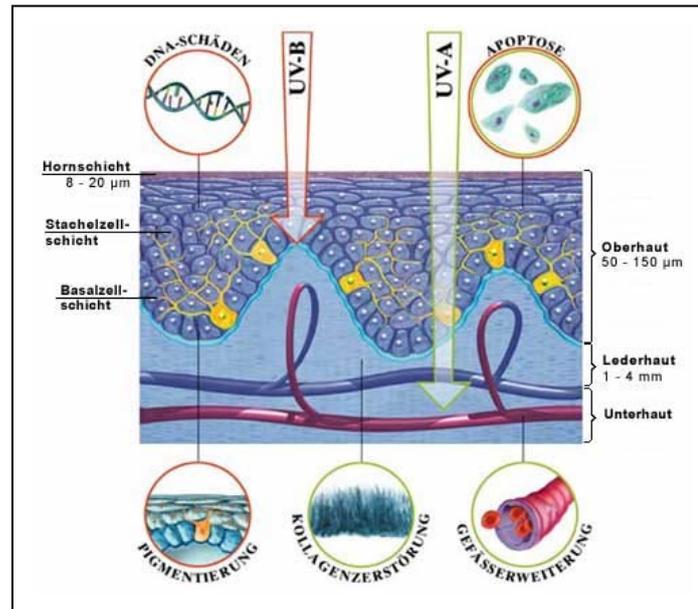


Abbildung 1-5: Wirkungen von UVA und UVB Strahlung auf die humane Haut. Zu den Sonnenstrahlen, die die Erde erreichen gehören neben dem sichtbaren Licht und Infrarotstrahlung die ultravioletten Strahlen UVA und UVB. UVB dringt bis zur Basalzellschicht der Epidermis ein (ca. 0,5 mm), die UVA Strahlen hingegen tiefer (ca. 1 mm) (aus: „Unsere Haut“ unter www.unserehaut.de).

UVA- und UVB-Strahlung induzieren im Hautgewebe die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und führen so zur Erhöhung des oxidativen Stresses. Auf Grund des Ozonabbaus in der Stratosphäre nimmt die UV-Strahlung auf der Erde ständig zu. Stärkere UV-Einstrahlung, sowohl UVA als auch UVB, bedeutet auch ein höheres Risiko für die Haut, die durch UV-induzierte ROS photooxidativ geschädigt wird. Der UV-induzierte oxidative Stress ist mit der Schädigung zellulärer Komponenten und der Änderung der Genexpression verbunden. Daraus können multiple pathophysiologische Effekte wie Photoalterung, Phototoxizität und Hautkrebs resultieren (Kraemer, 1997; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1992, 1993; Scharffetter-Kochanek, 1997).

In der menschlichen Haut induziert UVA-Licht die Bildung von Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Anion-Radikalen und die nachträgliche Anreicherung von Wasserstoffperoxid. Diese reaktiven Stoffe sind in der Lage die Struktur und Funktion von Proteinen, Lipiden, DNA und Kohlenhydraten zu modifizieren. Eine mögliche Folge kann die Entstehung von 8-Hydroxyguanin in der DNA sein, welches an Adenin binden und zu einer Transversion von GC nach TA führen kann (Guyton & Kensler,

1993; Le Page *et al.*, 1995). Singulett-Sauerstoff induziert DNA-Strangbrüche und Vernetzung der DNA-Proteine (Peak *et al.*, 1985, 1987). ROS können auch Schädigungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) verursachen (Shigenaga *et al.*, 1994; Richter, 1995), die im Vergleich zur Kern-DNA schwerwiegender ausfallen (Yakes & Van Houten, 1997). So wird die ROS-induzierte Mutationszunahme der mtDNA mit einer Zunahme bzw. Beschleunigung der Hautalterung und einer Zunahme des Krebsrisikos in Verbindung gebracht (Berneburg *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1995).

Im Prozess der Hautalterung und Bildung von Hauttumoren scheinen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle zu spielen. Matrix-Metalloproteinasen sind wichtige Modulatoren im Gewebe-Remodeling, inklusive Wundheilung, Wachstum und Entwicklung. Sie bauen Kollagen ab und können so die Tumorbildung erleichtern. Die Transkription der MMPs wird dabei durch den ROS-aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1 stimuliert, während die spezifischen Inhibitoren der MMPs (TIMPs) durch ROS inhibiert werden (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997; Fisher & Voorhees, 1998). Zu den UV-induzierten Effekten in der humanen Haut zählt auch die Schädigung von Langerhanszellen in der Epidermis und die damit verbundenen Änderungen der Antigen-Präsentation.

Diverse Enzyme und nicht-enzymatische Radikal-Fänger repräsentieren Komponenten des kutanen Schutzsystems gegen den oxidativen Stress. So katalysiert die Superoxid Dismutase (SOD) die Spaltung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid, das durch die Glutathionperoxidase und Catalase zu Wasser reduziert wird. Die wichtigsten Antioxidantien in der Haut sind das wasserlösliche Vitamin C, Glutathion und das lipophile Vitamin E, wobei die Epidermis als äußerste Hautschicht höhere Konzentrationen an Antioxidantien enthält als die Dermis (Fuchs & Packer, 1990; Shindo *et al.*, 1993, 1994).

1.6 Struktur und Funktion der humanen Haut

Die Haut, mit ihren ungefähr zwei Quadratmeter Fläche und 1 bis 4 mm Dicke, ist das größte Organ des Körpers und besteht aus einer Vielfalt von Zelltypen mit spezifischen Funktionen. Die Hauptfunktion der Haut ist der Schutz des Organismus vor äußeren Einflüssen. Die äußerste Hautschicht, die Epidermis, und die darunter liegende Dermis werden durch eine innere dünnere Schicht aus Fettgewebe, genannt Hypodermis versorgt.

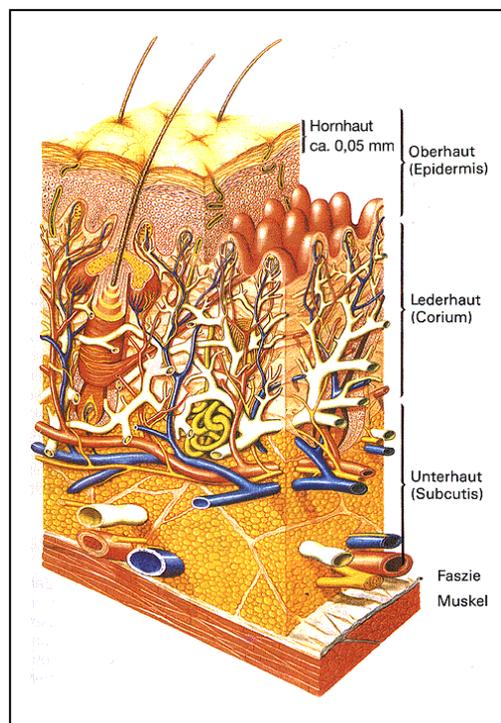


Abbildung 1-6: Aufbau der humanen Haut. Die Haut besteht aus drei Schichten, der Epidermis, Dermis und der Hypodermis (aus: www.rath.de)

Die Dicke der Epidermis ist sehr variabel und beträgt zwischen 0,03 mm und 1,5 mm. Sowohl Alter als auch das Geschlecht können die genannten Werte beeinflussen. Die Oberhaut besitzt keine Blutgefäße und besteht zu >90% aus Keratinozyten, die einen protektiven Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen und Wasserverlust ausbilden, beziehungsweise der Haut ihre mechanische Stabilität verleihen. Keratinozyten machen einen programmierten Differenzierungsprozess durch, in dem proliferierende undifferenzierte Zellen von ausdifferenzierten sich nicht teilenden Zellen überschichtet

werden (Stenn, 1983). Die äußerste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, besteht aus verhornten, ausdifferenzierten Keratinozyten, den so genannten Korneozyten, die als Hauptprotein Keratin enthalten (Stenn, 1983; Holbrook & Wolff, 1987). Diese Zellen werden fortlaufend abgestoßen, so dass sich der Mensch alle 27 Tage „häutet“.

Das Stratum lucidum wird nur in dicker Haut beobachtet und trennt die äußerste Epidermisschicht vom Stratum granulosum. Letzteres besteht aus lebenden sich nicht mehr teilenden Zellen, die die Vorstufe des Keratins, das Keratohyalin, bilden. Direkt oberhalb der innersten Epidermisschicht, Stratum basale, befinden sich mitotisch aktive Zellen, die unterschiedliche Makromoleküle synthetisieren. Auf Grund zahlreicher Desmosomen weisen sie eine dornige Erscheinung auf und werden daher unter Stratum spinosum zusammengefasst (Holbrook & Wolff, 1987). Das Stratum basale wird aus einer Zellschicht undifferenzierter, sich teilender Keratinozyten ausgebildet, deren Proliferation durch zahlreiche Regulatoren und Dermisbestandteile beeinflusst wird (Eckert, 1989; Holbrook & Wolff, 1987; Senegal, 1976; Spearman, 1974; Doran, 1980). Neben den Keratinozyten enthält die Epidermis drei weitere Zelltypen, die Merkel-Zellen, die Melanozyten und Langerhans Zellen (Jimbow *et al.*, 1976; Wolff, 1973; Aubin, 2003). Melanozyten synthetisieren in Melanosomen das Pigment Melanin (Quevedo, 1980), welches bei UV-Einstrahlung eine wichtige Schutzfunktion erfüllt und das Eindringen der UV-Strahlung in tiefere Hautschichten verhindert. Die Langerhans Zellen sind dendritische Zellen der Epidermis, die der Antigenpräsentation dienen und nach Interaktion mit Lymphozyten eine Immunreaktion initiieren können.

Die Dermis umfasst den größten Teil der Haut und ist mit ihrer 1,5 bis 4 mm Dicke die dickste der drei Hautschichten. Sie ist in Stratum papillare und Stratum retikulare unterteilt und beinhaltet Drüsen, Haarfollikel, Nervenendigungen, Blut- und Lymphgefäße und als Strukturbestandteile Kollagen und Elastin. Die Fibroblasten stellen den Hauptzelltyp der Dermis dar und sind für die Synthese und die Modulation von Bindegewebsproteinen verantwortlich. In der Haut ausdifferenzierte Makrophagen präsentieren Antigene immunkompetenten Zellen und sezernieren Wachstumsfaktoren, das IL-1, Prostaglandine und Typ-2 Interferone (Holbrook & Wolff, 1987; Stingl & Wolff, 1987). In der Nähe von Blutgefäßen sind verstärkt Mastzellen vorhanden. Sie

reagieren auf Licht, Druck, Kälte und Vibration durch Sekretion von Faktoren die vasoaktiv oder für Neutrophile und Eosinophile chemotaktisch wirken (Soter, 1983).

Die Hypodermis grenzt direkt an das Stratum reticulare an und stellt eine Verbindung zwischen den äußeren Hautschichten und inneren Strukturen wie Knochen und Muskulatur dar. Sie dient als Energiereserve, isoliert und schützt die Körperorgane vor äußeren schädigenden Einflüssen.

1.7 Funktion von NO in der humanen Haut

NO spielt eine zentrale Rolle in der Hautphysiologie bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Im Hautgewebe sind alle Zelltypen in der Lage NO enzymatisch durch mindestens einer der drei bekannten NOS zu erzeugen.

Zu den wichtigsten äußeren Einflüssen, die auf die humane Haut einwirken, zählt die UV-Strahlung. UVB-Strahlung trägt zur Hautpigmentierung bei, wobei das durch die nNOS in Keratinozyten und Melanozyten gebildete NO eine essentielle Rolle in diesem Prozess einnimmt. Die Melaninsynthese ist auf die cGMP-abhängige Aktivierung der PKG und der Tyrosinase zurückzuführen (Romero-Graillet *et al.*, 1996). Ein weiterer Effekt der UVB-Strahlung ist die Erythembildung in der Haut, die in der Regel nach 8-24 Stunden sichtbar wird (Farr & Diffey, 1986; Cavallo & DeLeo, 1986; Andersen *et al.*, 1991) und durch Zugabe von NOS-Inhibitoren komplett aufgehoben werden kann (Warren *et al.*, 1993). In mehreren Versuchen konnte gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung von Endothelzellen und Keratinozyten zu einer Dosis-abhängigen, kurzfristigen Zunahme an NO und cGMP führt (Deliconstantinos *et al.*, 1992; Deliconstantinos *et al.*, 1995). Dadurch spielt NO eine wichtige Rolle in der Regulation der Hautdurchblutung durch cGMP-abhängige Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.

Die UVB-Strahlung bewirkt eine Steigerung der Expression und Aktivität der nNOS und eNOS (Kang-Rotondo *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2000) und induziert zusätzlich die iNOS-Expression, die nach 24 Stunden ein Maximum erreicht (Kuhn *et al.*, 1998). Somit scheint die NO-Bildung für die zeitlich verzögerte Hautrötung nach UV verantwortlich zu sein. Die induzierte NO-Synthese übt im Allgemeinen einen protektiven Effekt aus und hemmt z. Bsp. die UVA-induzierte Apoptose in

Endothelzellen (Suschek *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 1-7 zu erkennen, beruht der NO-vermittelte Schutz unter anderem auf dem Abbau von ROS und der Inhibition der Lipidperoxidation. Die Lipidperoxidation wird primär durch Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff initiiert und resultiert z. Bsp. im Verlust der Membranintegrität und Aktivierung von Phospholipasen. Durch Rekombination von NO mit Lipidradikalen kommt es zum Abbruch der Radikalkettenreaktion (Wink *et al.*, 1995; Kröncke *et al.*, 2000). Simultan findet eine NO-vermittelte Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und Inhibition des proapoptotischen Proteins Bax statt (Suschek *et al.*, 1999; Suschek *et al.*, 2001). Folglich blockiert NO einleitende Schritte Richtung UV-induzierter Zellschädigung durch Inhibition der Apoptose (Suschek *et al.*, 2001).

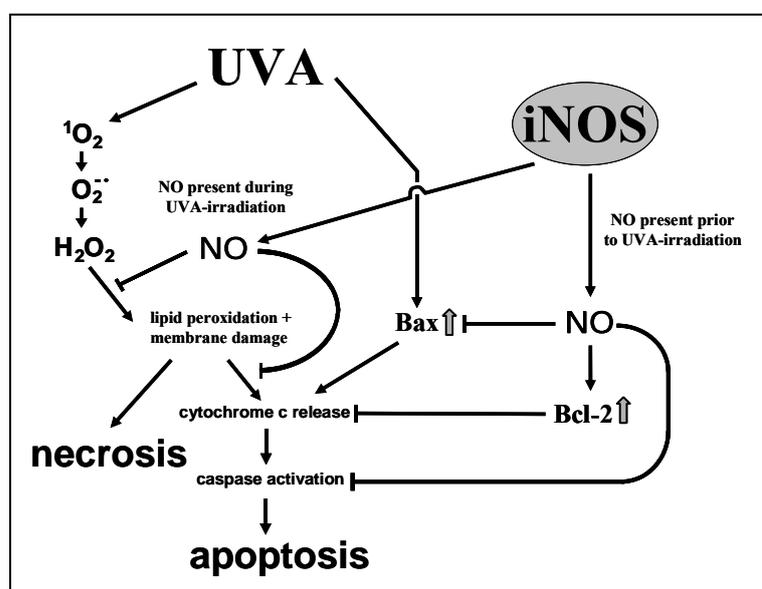


Abbildung 1-7: NO schützt Zellen vor UVA-induziertem Zelltod. UVA-induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoff Intermediate (ROI) führt zur Lipidperoxidation, was die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und somit Apoptose bzw. Nekrose zur Folge hat. Ferner induziert UVA-Bestrahlung die Expression des proapoptotischen Proteins Bax, das zur Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgender Apoptose führt. Hohe NO-Mengen nach iNOS-Induktion schützen vor UVA-induzierte Nekrose durch Inhibition der Lipidperoxidation und wirken protektiv gegen Apoptose durch verstärkte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und Inhibition der Bax-Expression (Kröncke *et al.*, 2001)

Des Weiteren ist bekannt, dass NO eine regulatorische Funktion auf das Immunsystem ausübt (Xie & Nathan, 1994; Kröncke *et al.*, 1997). Die iNOS-Expression in Keratinozyten und Langerhans Zellen der Haut beeinflusst mehrere immunologische

Reaktionen und bewirkt die Unterdrückung der Th1-Antwort, wie an iNOS-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Wei *et al.*, 1995).

Neben der Regulation des Blutflusses spielt endotheliales NO eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Plättchenaggregation und Modulation der Leukozytenadhäsion (Khan *et al.*, 1996). Die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird durch die NOS-Aktivität beeinflusst, wobei die Inhibition der NOS die Emigration von Leukozyten und Entzündungsprozesse begünstigt (Kolb-Bachofen *et al.*, 2000).

Mehrere Arbeitsgruppen beobachteten eine Verbesserung der Wundheilung nach Zugabe von L-Arginin beziehungsweise NO-Donoren und erkannten so die entscheidende Rolle von NO bei der Wundheilung (Schwentker *et al.*, 2002; Efron *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2002). Die iNOS-Expression wird besonders in den basalen Keratinozyten der Wunde hoch reguliert und durch Zytokine positiv beeinflusst (Frank *et al.*, 1998; Schaffer *et al.*, 1997). Das gebildete NO spielt durch Stimulation der Keratinozyten- und Fibroblastenproliferation eine Schlüsselfunktion bei der Reepithelisierung (Benrath *et al.*, 1995; Stallmeyer *et al.*, 1999). Die Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung zählt zu den wichtigsten Funktionen von NO. Die Wirkung von NO ist hierbei konzentrationsabhängig, wobei niedrige NO-Konzentrationen zu einer Verstärkung der Keratinozytenproliferation führen, während höhere Konzentrationen das Wachstum arretieren und die Differenzierung induzieren (Krischel *et al.*, 1998). Zusätzlich verstärkt NO die Kollagensynthese und führt dadurch zu einer Beschleunigung der Wundheilung (Schaffer *et al.*, 1997).

Es ist seit längerem bekannt, dass NO auch in bzw. auf der Haut eine antimikrobielle Wirkung gegen diverse Mikroorganismen wie Protozoen, Viren, Bakterien und Pilze aufweist (Blank *et al.*, 1996; Croen, 1993; Weller *et al.*, 1996; Weller *et al.*, 2001). 1996 wurde demonstriert, dass symbiotische Bakterien auf der Hautoberfläche das Nitrat aus dem Schweiß in Nitrit umwandeln. Aufgrund des sauren pH-Wertes der Haut wird letzteres zu NO reduziert. Das so konstitutiv an der Hautoberfläche enzymunabhängig gebildete NO erfüllt somit eine wichtige Schutzfunktion gegen das Eindringen von Pathogenen und reguliert das Wachstum symbiotischer Mikroorganismen (Weller *et al.*, 1996).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Enzymatisch gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) spielt in der Haut eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hauthomöostase und wirkt protektiv gegen UVA-induzierten Zelltod. Da bereits bekannt ist, dass sowohl Oxidationsprodukte des NO's als auch S- und N-Nitrosoverbindungen photoaktive Eigenschaften besitzen, könnten diese Verbindungen potentielle Quellen für NO während der täglichen UVA-Exposition repräsentieren und somit in wichtigen physiologischen Signalwegen involviert sein. Ziel dieser Arbeit war es, die aufgeführten NO-Metabolite in der humanen Haut zu quantifizieren und deren Bedeutung für die UVA-induzierte enzymunabhängige NO-Bildung zu erforschen. Des Weiteren sollte die biologische Wirkung des enzymunabhängig generierten NO umfassend untersucht und seine Rolle für die Hautphysiologie und –pathophysiologie bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Albumin aus Rinderserum (Biomol, Hamburg, Deutschland); L-Ascorbat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Biotin-HPDP (N-(6-(Biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid) (Perbio, Bonn, Deutschland); cPTIO [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid.Natriumsalz]: (Alexis, Grünberg, Deutschland); Complete, Mini (Roche, Mannheim, Deutschland); Diethylentriaminpentaacetat: DTPA (Sigma, Deisenhofen); N, N- Dimethylformamid (Sigma, Deisenhofen); Dimethylsulfoxid: DMSO (Sigma, Deisenhofen); Dodecylsulfat-Na-Salz: SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland); Ethylendinitrilo-tetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat: EDTA (Sigma, Deisenhofen); N-Ethylmaleimid: NEM (Sigma, Deisenhofen); Glutaraldehyd (Sigma, Deisenhofen); Hematoxylin (Sigma, Deisenhofen); Hepes Buffer Solution (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland); Hybond™-ECL™-Membran und Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland); (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure: Trolox (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland); ImmunoPure® Streptavidin, Meeretichperoxidase gekoppelt (Perbio, Bonn); L-N-(-Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid: L-NIO (Alexis, Grünberg, Deutschland); 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen); Methylmethanthiosulfonat: MMTS (Perbio, Bonn); Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland); Natriumnitrit (Merck, Darmstadt); Neocuproin (Sigma, Deisenhofen); Quecksilberchlorid (Sigma, Deisenhofen); Ponceau S (Serva, Heidelberg, Deutschland); RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland); Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe); Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Roth, Karlsruhe); Triton X-100 (Serva, Heidelberg); Trypanblau (Gibco, Eggerstein, Deutschland); Viralex Trypsin (0,25 %) (PAA Laboratories, Cölbe); Polyoxyethylensorbitan Monolaurat: Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)

2.1.2 Kits

- Bio-Rad D_c Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland)
- cGMP ELISA Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
- DAKO® Liquid DAB + Substrate-Chromogen System (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- DNA-free™ (Ambion, Austin, USA)
- Glutathion Assay Kit (Biozol Diagnostica, München, Deutschland)
- Omniskript Reverse Transkriptase Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

- QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio, Bonn, Deutschland)
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems)
- Universal DAKO LSAB®2 System, Peroxidase (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Biotin-HPDP Stammlösung:	50 mM gelöst in N, N-Dimethylformamid (-20°C)
Blockpuffer:	9 Volumen HEN-Puffer 1 Volumen 25 % SDS 20 mM MMTS (2 M Stocklösung)
Blockpuffer (Immunhistochemie):	5 % BSA 0,1 mM DTPA 0,3 % Triton X-100 in PBS (pH 7,2)
Blockpuffer 1 (Biotin switch):	0,5 % Triton X-100 in PBS (pH 7,2)
Blockpuffer 2 (Western Blot):	2 % BSA 5 % Magermilchpulver 0,1 % Tween 20 in PBS (pH 7,2)
DTNB Stammlösung (30 mM):	29,7 mg DTNB gelöst in 25 ml Methanol (Aliquots bei -20°C)
HEN-Puffer:	250 mM Hepes Buffer Solution (pH 7,7) 1 mM EDTA 0,1 mM Neocuproine
HENS-Puffer:	HEN-Puffer 1 % SDS
“Labelling“-Lösung:	Biotin-HPDP Stammlösung auf 4 mM mit DMSO verdünnt (kurz vor Gebrauch ansetzen!)
Lyse-Lösung (nicht reduzierend):	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 300 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1 mM Neocuproine 1 % Triton X-100

MMTS Stammlösung:	2 M gelöst in N, N-Dimethylformamide
NEM-Puffer:	5 mM N-Ethylmaleimide (NEM) 2,5 mM EDTA Proteaseninhibitor-Cocktail (Complete) in PBS (pH 7,2)

NuPAGE[®] Antioxidant, NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4 ×), NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10 ×), NuPAGE[™] 7% Tris-Acetate Gel, NuPAGE[®] Transfer Buffer (20 ×) und NOVEX[®] Tris-Acetate SDS Running Buffer (20 ×) alle von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

PBS (20 ×):	160,06 g NaCl 4,02 g KCl 28,48 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 4,08 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l dH ₂ O, pH 7,2
PBS (1 ×) + 0,02 % EDTA:	50 ml PBS (20 ×) 200 mg EDTA ad 1 l dH ₂ O, pH 7,2
RIPA-Puffer:	5 ml PBS (20 ×) 1 % NP 40 0,5 % Sodium deoxycholate 0,1 % SDS ad 100 ml dH ₂ O
Waschpuffer (Immunhistochemie):	0,1 mM DTPA 0,3 % Triton X-100 in PBS (pH 7,2)
Waschpuffer 1 (Biotin switch):	0,1 % Triton X-100 in PBS (pH 7,2)
Waschpuffer 2 (Western Blot):	0,5 % Magermilchpulver 0,1 % Tween 20 in PBS (pH 7,2)

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

- Basal MCDB 153 Medium (1 ×) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
w 1,176 g/l NaHCO₃
w/o L-Glutamine
- Einfriermedium: RPMI 1640 (1 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) +
20 % DMSO
- Ethanolamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

- FCS
- GlutaMAX™ (100 ×)
- Hepes Puffer (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Humanes EGF, Hydrocortison und Insulin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Keratinocyte-SFM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) supplementiert mit Rinder Hypophyse-Extrakt (50 µg/ml), rEGF (5 ng/ml), Penicillin/Streptomycin (1 ×), 90 nM CaCl₂, ohne Nitrit und Nitrat
- MCDB 153 Medium (1 ×) (Biochrom, Berlin, Karlsruhe)
w/o L-Glutamin
mit NaHCO₃
supplementiert mit Ethanolamin (6,108 mg/l), Insulin (5,0 mg/l), Hydrocortison (0,5 mg/l), Phosphoethanolamin (14,1 mg/l), EGF (2,5 µg/500ml), Penicillin/Streptomycin (1 ×), ohne Nitrit und Nitrat
- MEM Non Essential Amino Acids (100 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (100 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Phosphoethanolamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- RPMI 1640 (1 ×) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
ohne L-Glutamine
- Natriumpyruvat (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- Supplemente für Keratinocyte-SFM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland):
Rinder Hypophyse-Extrakt (25 mg); rekombinantes epidermales Wachstumsfaktor (rEGF) (2,5 µg)

2.1.5 Antikörper

- DakoCytomation N-Universal Negativkontrolle Kanninchen (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Kanninchen Antiserum, Anti-S-Nitroso-Cystein, polyklonal (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Kanninchen Antiserum, Anti-S-Nitrosocystein, polyklonal (Calbiochem, Deutschland)
- Maus Anti-Involucrin (Clone SY5), monoklonal (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Maus Anti-Human Ki-67 Antigen (Clone Ki-67), monoklonal (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Maus Anti-β-Actin (Clone AC-15), monoklonal (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Maus-IgG1 Negativkontrolle (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.6 Zytokine

- rekombinantes humanes IL-1 β , humanes Tumornekrosefaktor (TNF)- α und humanes Interferon (IFN)- γ (Strathmann Biotec, Hannover, Deutschland)

2.1.7 NO-Donoren

Als exogene NO-Donoren wurden (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniomethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolat (DETA/NO) und (Z)-1-{N-methyl-N-[6-(N-methylammoniohexyl)amino]}diazon-1-ium-1,2-diolat (MAMA/NO) verwendet, die jeweils zwei Moleküle NO pro Trägermolekül freisetzen können. Die Halbwertszeit bei 37°C und einem pH von 7,4 beträgt für DETA/NO ca. 8 Stunden und für MAMA/NO lediglich 2 min. Für die Herstellung einer 50 mM DETA/NO Lösung wurden unmittelbar vor Gebrauch 0,82 mg DETA/NO in 97 μ l PBS auf Eis gelöst und mit 3 μ l 1 M HCl Lösung versetzt. Alternativ wurden 1,03 mg MAMA/NO in 100 μ l PBS auf Eis gelöst. Anschließend erfolgte die Verdünnung mit Medium auf eine Endkonzentration von 500 μ M für DETA/NO bzw. 5 mM für MAMA/NO verdünnt.

Die verwendeten NO-Donoren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Oligonukleotide

Die Primer und Proben für die Real time PCR wurden mit der Primer Express[®] Software v2.0 bestimmt.

Tabelle 2-1: Sequenz der in der Real-Time PCR verwendeten Oligonukleotide.

Primer	Sequenz	Methode
Ki 67-F Ki 67-R	5'-CGG ACT TTG GGT GCG ACT T-3' 5'-GTC GAC CCC GCT CCT TTT-3'	SYBR
Involucrin-F Involucrin-R	5'-CCAGAGGCCCTCAGATCGT-3' 5'-CACCTAGCGGACCCGAAA-3'	SYBR
Loricrin-F Loricrin-R	5'-TTGCAAATCCTTCATGTCTTAACC-3' 5'-AAAGAGGCTAAACAGCAGAAGCTAGATG-3'	SYBR
18 S-F 18 S-R	5'-CATGGTGACCACGGGTGAC-3' 5'-TTCCTTGATGTGGTAGCCG-3'	SYBR
COX-2-F COX-2-R COX-2-probe	5'-GCTCAAACATGATGTTTGCATTC-3' 5'-GCTGGCCCTCGCTTATGA-3' NED-TGCCCAGCACTTCACGCATCAGTT-MGB	TaqMan
IL-8-F IL-8-R IL-8-probe	5'- CACCGGAAGGAACCATCTCA-3' 5'- AAATCAGGAAGGCTGCCAAGA-3' NED-ACATGACTTCCAAGCTGGCCGT-MGB	TaqMan

TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems):

- Assay ID: Hs00174128_m1 (human TNF- α)
- Assay ID: Hs00174097_m1 (human IL-1 β)
- Assay ID: Hs00174131_m1 (human IL-6)

Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VIC/TAMRA Probe, Primer Limited) (Applied Biosystems)

2.2 Methoden

2.2.1 Primärkultur von Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten wurden aus frischer Haut von Mamma-Reduktionsplastiken (Florence Nightingale Krankenhaus Kaiserswerth, Abteilung für Plastische Chirurgie, Düsseldorf), gewonnen. Die Haut wurde unmittelbar nach der Entnahme in PBS überführt und innerhalb von 15 min auf Eis ins Labor transportiert. Nach Reinigung und Befreiung von Fettgewebe wurde die Haut in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnitten und mit der Epidermis nach oben in einer Kulturschale mit 10 ml 1 %iger Dispase grade II-Lösung (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Deutschland) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss konnten die Epidermisstücke leicht von der Dermis mit Hilfe einer Pinzette abgezogen und in 10 ml PBS + 0,02 % EDTA + 4 ml 0,25 % Trypsin überführt werden. Die Epidermisstücke wurden für 10 min bei 37°C inkubiert und alle 3 min auf einem Vortex-Gerät gerührt. Die Suspension wurde im Folgenden mechanisch durch ein Zellsieb gerieben und mit 8 ml RPMI Vollmedium + 10 % FCS in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gemischt. Durch das FCS wird die Trypsinaktivität inhibiert. Anschließend folgten ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 800 rpm und zwei Waschschrte mit jeweils 20 ml KC-Medium. Nach Bestimmung der Zellzahl und dem Anteil der toten Zellen mittels der Trypanblaufärbung, wurden $2-4 \times 10^6$ lebende Keratinozyten auf 10 cm Kulturplatten ausgesät. Als Nährmedium wurde eine 1+1 Mischung zweier konventioneller KC-Medien (Keratinocyte-SFM, Gibco und MCDB 153 Medium (1 \times), Biochrom) mit allen Supplementen, verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % und nachfolgender Passagierung. Weitere Subkultivierung der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 %. Alle Kulturen wurden in regelmäßigen Zeitabständen auf Mycoplasmen-Kontaminationen getestet.

2.2.2 Zytokinaktivierung

Zur Untersuchung der Zytokinwirkung auf Kurzzeitorgankulturen wurde eine Mischung aus den Th1-Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ in einer Konzentration von jeweils 1000 U/ml verwendet. Die Gewebestücke wurden im Folgenden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3 UVA-Bestrahlung

Für die Untersuchung der Genexpression und S-Nitrosothiole wurden primäre Keratinozyten, Hauthomogenate sowie Hautproben mit 10-70 J UVA/cm² in PBS bestrahlt. Als UVA Quelle diente eine Sellas-4000 Lampe (Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland), die ein Spektrum von 340-410 nm emittiert (84 mW/cm² in einem Abstand von 25 cm). Die Bestimmung der UVA-Intensität erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen mittels eines UVA-Detektors.

2.2.4 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden in der Regel in flüssigen Stickstoff eingefroren oder alternativ bei -80°C gelagert. Bei -80°C sind diese jedoch nur ca. 6-12 Monate haltbar und sollten daher alle 6-9 Monate in Kultur genommen werden. Die Zellen können im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase neu eingefroren werden. Dabei beträgt die optimale Einfrierdichte für Zellen mindestens $2-4 \times 10^7$ /ml. Nach Trypsinierung der Zellen und anschließender Zentrifugation, wurde das Pellet in reinem FCS resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:1 mit Einfriermedium (4°C) gemischt. Die Einfrierliquots wurden in Kryoröhrchen gesammelt und für mindestens 24 Stunden schonend, in einer Einfrierdose (5100 Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene® Labware) auf -80°C heruntergekühlt. Für den restlichen Zeitraum erfolgte die Lagerung der Zellen bei -80°C in Pappschachteln.

2.2.5 Auftauen von Zellen

Da Dimethylsulfoxid (DMSO) vor allem in Kombination mit Hepes toxisch wirkt, wurden die Zellen so kurz wie möglich mit dem Einfriermedium in Kontakt belassen. Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, anschließend die Zellen in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt und für 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Die Suspension wurde auf 10 cm Gewebekulturschalen (Greiner, Solingen) ausgesät.

2.2.6 Hauthomogenisierung

Humane Hautproben von Mammareduktionen (Florence Nightingale Krankenhaus Kaiserswerth, Abteilung für Plastische Chirurgie, Düsseldorf) wurden in 1 cm² große Quadrate geschnitten und unmittelbar in Tissue-Tek (Reichert-Jung, Wien, Österreich) eingebettet. Anschließend wurden parallel zur Epidermis und bis zu einer Tiefe von 2 mm 20 µm dünne Schnitte in einem Kryostat 2800 Frigocut-E (Reichert-Jung, Wien, Österreich) angefertigt. Nach Abwiegen des Materials wurde dieses mit 3 Volumen (w/vol) NEM-Puffer verdünnt und homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 3000 rpm und die Verdünnung der gesammelten Überstände auf eine Konzentration von 10 mg Protein/ml. Die Lagerung erfolgte bei -20°C für maximal zwei Wochen.

2.2.7 Zell-Lyse

Für die Isolation S-nitrosierter Proteine wurde Zellpellet in Lyse-Lösung + Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Complete Mini, Roche Mannheim, Deutschland) resuspendiert und unter gelegentlichem vortexen für 30 min und länger auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter wiederholtem Einfrieren in flüssiges Stickstoff und Auftauen der Suspension dreimal mit Ultraschall homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10 000 rpm wurde die Proteinkonzentration in den gesammelten Überständen unter Anwendung des Bio-Rad D_c Protein Assay Kits (Bio-Rad, München, Deutschland) und Beachtung der Herstellerangaben ermittelt.

Die Isolation von Proteinen aus primären Keratinozyten unter reduzierenden Bedingungen erfolgte durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer + Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Complete Mini, Roche Mannheim, Deutschland) pro 10 cm Gewebekulturschale und Ablösen der adhärenen Zellen mit einem Cell Lifter (Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande). Die Zellsuspension wurde im Anschluss mehrmals beschallt und die Zelltrümmer für 10 min bei 10 000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8 Erstellung von Wachstumskurven

Die alamarBlue® (Biosource, Solingen, Deutschland) Methode ermöglicht die quantitative Bestimmung der Proliferationsrate verschiedener humaner Zelllinien, Bakterien und Pilze bei minimaler Toxizität. AlamarBlue, besser bekannt als Resazurin, wird nach direkter Zugabe ins Kulturmedium von den Zellen aufgenommen und zu Resorufin reduziert. Dabei ist die Anzahl der lebenden Zellen proportional zur Menge der reduzierten Form. Die chemische Reduktion von Resazurin bewirkt einen optisch sichtbaren Farbumschlag von der oxidierten blauen Form (nicht fluoreszierend) zur reduzierten roten Form (fluoreszierend), die photometrisch erfasst werden kann. Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden jeweils $1,5 \times 10^3$ primäre Keratinozyten auf 6-Well-Platten ausgesät und nach definierten Zeitpunkten in Anwesenheit von 10 % alamarBlue für 2,5 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Im Anschluss wurden Zellüberstände entnommen und die Fluoreszenz in einem FLUOstar OPTIMA Gerät (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) gemessen. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 544 nm, die Emission bei 590 nm.

2.2.9 Biotin switch Methode

Die Detektion S-nitrosierter Proteine erfolgte durch das Biotin switch Methode nach Jaffrey *et al.* (Jaffrey *et al.*, 2001). Diese Methode beruht auf der Umwandlung nitrosierter Cysteinreste in stabile biotinylierte Cysteine. Die Reaktion läuft in drei Schritten ab: In einem ersten Schritt werden die freien Thiole durch Inkubation mit Methylmethanthiosulfonat (MMTS) thiomethyliert und dadurch blockiert. Läuft dieser Blockierungsschritt unvollständig ab und werden nicht alle freien Thiole durch MMTS alkyliert, können diese nicht-nitrosierten Cysteine ein falsch positives Signal erzeugen. Dieses Problem kann durch Zugabe von SDS, welches die Proteine denaturiert und

dadurch den Zugang von MMTS an verdeckte Thiole erleichtert, umgangen werden. Um eine maximale MMTS-Blockierung zu gewährleisten darf ferner die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben $0,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ nicht übersteigen. Die Spaltung der S-Nitrosothiole erfolgt im Weiteren mit Ascorbat und ergibt reduzierte Thiole, die in einem dritten und letzten Schritt durch Biotin-HPDP biotinyliert werden (Abbildung 2-1). Da MMTS mit Biotin-HPDP um die freien Thiole konkurrieren kann, ist es wichtig vor dem Biotinylierungsschritt das MMTS durch Acetonfällung vollständig zu entfernen. Markierte Proteine können im Anschluss leicht mit Hilfe von gegen Biotin gerichtete Antikörper oder durch das Biotin-bindende Protein Streptavidin detektiert werden.

Es ist jedoch zu beachten, dass endogen biotinylierte Proteine einen signifikanten Hintergrund ergeben können. Daher ist es essentiell während des Biotinylierungsprozesses eine Negativkontrolle mitzuführen, in der das Biotin-HPDP durch ein DMSO-Vehikel substituiert wird. Die Banden in einer thioalkylierten Probe die mit DMSO behandelt wurde repräsentieren ausschließlich endogen biotinylierte Proteine und lassen sich durch Vergleich mit den biotinylierten Proben von nitrosierten Cysteinen unterscheiden.

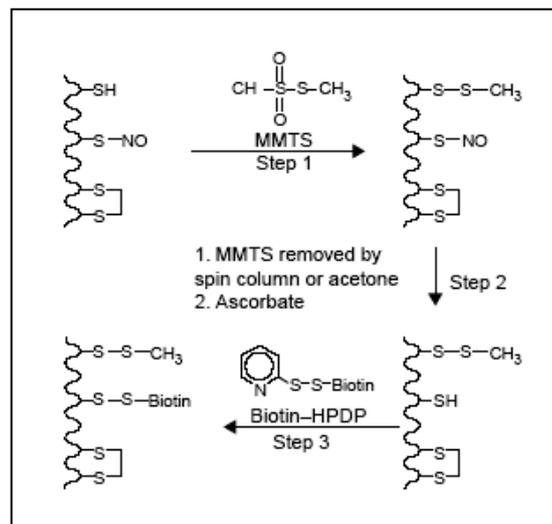


Abbildung 2-1: Detektion S-nitrosierter Proteine. In einem ersten Schritt werden freie Thiole durch Thiomethylierung mit MMTS inaktiviert. Diese Modifikation kann durch Reaktion mit 2-Mercaptoethanol wieder aufgehoben werden. Das MMTS kann im Schritt 2 durch Acetonfällung entfernt werden. In Schritt 3 werden Nitrosothiole selektiv durch Ascorbat reduziert und dadurch für die Reaktion mit Biotin-HPDP zugänglich gemacht (nach Jaffrey *et al.*, 2001)

Für die Biotinylierung von S-Nitrosothiolen wurden jeweils 300 µg Hauthomogenate bzw. Zell-Lysate mit HEN-Puffer auf 0,6 µg/µl verdünnt. Nach Zugabe von 4 Volumen Blockpuffer, welches MMTS enthält, wurden die Proben für 30 min bei 50°C im Dunkeln inkubiert und gleichzeitig mehrmals gevortext. Nach Ablauf der Reaktion erfolgte eine Proteinfällung mit zwei Volumen Aceton (-20°C) für 60 min bei -20°C, wodurch das überschüssige MMTS entfernt wurde. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt im JA20 Rotor für 25 min bei 13500 rpm und 4°C (Beckman, Model J2-21). Die Pellets wurden kurz getrocknet und in 0,1 ml HENS Puffer/mg Protein resuspendiert. Nach Zugabe von 1/3 „Labelling“-Lösung (kurz vor Gebrauch ansetzen!) und 1/50 Volumen 50 mM Natrium-Ascorbat wurden die Proben für 1 Stunde bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bio-Rad D_c Protein Assay Kit.

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (siehe 1.2.10) und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (siehe 1.2.11) wurden unspezifische Bindungsstellen mit PBS/0,5 % Tween 20 für 2 Stunden bei RT oder alternativ über Nacht bei 4°C abgedeckt. Im Anschluss folgte die Inkubation mit 2 µg/ml an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltes Streptavidin in PBS/0,5 % Tween 20 für 1 Stunde bei RT. Nach 6 × 5 Minuten waschen mit PBS/0,1 % Tween 20 wurden die S-biotinylierten Proteine mittels SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio, Bonn, Deutschland) detektiert. Die Exposition erfolgte auf ECL[™]-Filmen (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland), die anschließend in einer AGFA Röntgenfilmentwicklungsmaschine „Agfa Curix 60“ entwickelt wurden.

2.2.10 SDS-PAGE

Die S-biotinylierten Proben wurden mit 4 × NuPAGE LDS Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und jeweils 20 µg Protein auf ein 7 %iges Tris-Acetat Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde NOVEX[®] Tris-Acetat SDS Laufpuffer (20 ×) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Für die Vorbereitung von reduzierten Proteinproben wurden diese mit 4 × NuPAGE LDS Probenpuffer und NuPAGE[®] Sample Reducing Agent (10 ×) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromspannung von 150 V für 1 Stunde in einer Novex Xcell II Mini Cell Kammer (Novex, San Diego, USA). Bei der Auftrennung reduzierter Proben wurden 50 ml 1 × Running Buffer in der oberen Pufferkammer mit 125 µl NuPAGE[®] Antioxidant (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, wodurch eine Proteinreoxidation im Laufe der Elektrophorese verhindert wird.

2.2.11 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nylonmembran übertragen und für die anschließende Immundetektion immobilisiert. Der Transfer erfolgte bei konstanten 30 V für 1 Stunde in einer Novex Xcell II Mini Cell (Novex, San Diego, USA). Als Puffer diente NuPAGE® Transferpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % Methanol.

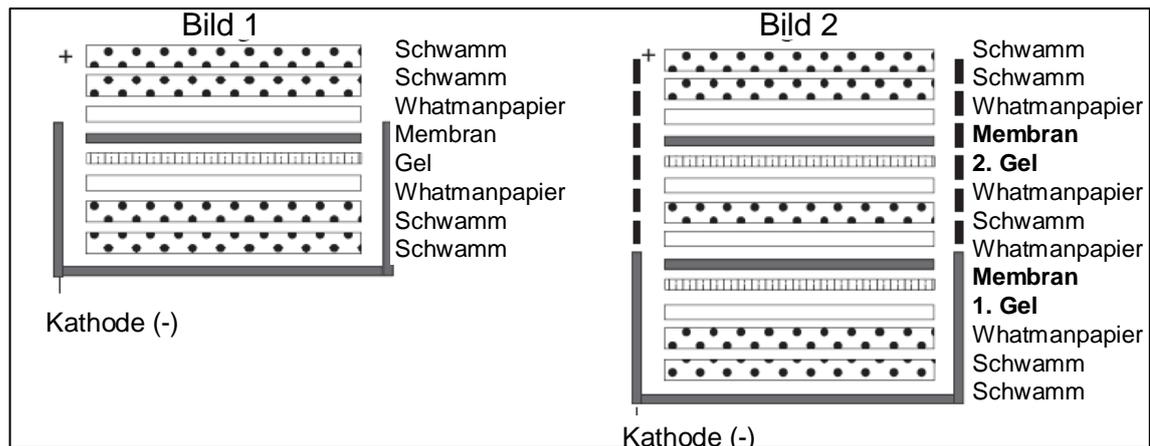


Abbildung 2-2: Aufbau des Transfers. Die Kathode wird mit den in Transferpuffer durchtränkten Schäumen bedeckt, gefolgt von Whatmanpapier, dem Gel und der Nitrocellulosemembran. Je nachdem ob nur ein Gel (Figure 1) oder zwei Gele (Figure 2) geblotet werden, bilden eine Schicht Whatmanpapier und die Schwämme den Anschluss oder ein zweiter Geltransfer wird aufgebaut (modifiziert nach Invitrogen).

Die Überprüfung des Transfers erfolgte durch Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung, die sich im Anschluss mit destilliertem Wasser auswaschen lässt.

Die Detektion von Involucrin erfolgte nach Blocken der Membran mit Blockpuffer (PBS/0,1 % Tween 20 + 2 % BSA + 5 % Milchpulver) für 1-2 Stunden bei RT. Die Membran wurde mit einem monoklonalen Maus anti-Involucrin Antikörper (1:1000 Verdünnung mit Blockpuffer) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween 20 + 0,5 % Milchpulver für jeweils 10 min wurde die Membran mit einem goat anti-mouse HRPO Antikörper (1:2000) (Transduction Laboratories) für eine weitere Stunde bei RT geschüttelt und anschließend 6 × 5 min mit PBS/Tween 20 + 0,5 % Milchpulver gewaschen. Die Antigendetektion erfolgte mit dem SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio, Bonn, Deutschland).

2.2.12 Immunhistochemie

Gefrierschnitte von Hautgewebe wurden kurz luftgetrocknet und für 10 min mit Aceton fixiert. Nach kurzem waschen in PBS wurden Schnitte, die als negativ Kontrolle dienen, mit 1 % CuSO₄ bzw. 0,2 % HgCl₂ + 0,5 % Sulfanilamid/H⁺ + 2 % SDS über Nacht und im Dunkeln bei 25°C geschüttelt. Anschließend folgte ein Waschschriff mit Waschpuffer (0,1 mM DTPA + 0,3 % Triton X-100 in PBS). Für die Stabilisierung der Nitrosothiole ist es wichtig freie Thiolgruppen zu blockieren. Zu diesem Zweck wurden die fixierten Schnitte mit 10 mM NEM + 0,3 % Triton X-100 in PBS für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein kurzer Waschschriff und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockpuffer, bestehend aus 5 % BSA + 0,1 mM DTPA + 0,3 % Triton X-100, für 1 Stunde bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Hautschnitte mit einem polyklonalen Kaninchen anti S-Nitrosocystein Antiserum (1:100 Verdünnung mit Blockpuffer) (Sigma), alternativ mit einem polyklonalen Kaninchen anti S-Nitrosocystein Antiserum (1:100 Verdünnung) (Calbiochem), für 1 Stunde bei RT inkubiert. Zur Inhibierung der endogenen Peroxidaseaktivität folgte eine Behandlung mit 0,3 % Wasserstoffperoxid für 15 min. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min auf dem Schüttler wurden die Schnitte mit einem Brückenantikörper, einem biotinylierten Antikörper gegen Kaninchen und Mausimmunglobuline (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland), für 15 min überschichtet, anschließend 2 × 10 min gründlich gewaschen und mit Streptavidin-Peroxidase für weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem waschen für jeweils 10 min wurden die Nitrosothiole durch eine Peroxidase- vermittelte Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) und darauf folgende Braunfärbung der Präparate detektiert. Im Anschluss wurde eine Kernfärbung mit Hämotoxylin für 30 sec durchgeführt, die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylolersatz dehydriert und letztlich mit Roti®-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt. Für eine zusätzliche Negativkontrolle wurden Vergleichsschnitte mit einer Immunglobulinfraktion aus nicht-immunisierten Kaninchen (N-Universal Negativkontrolle Kaninchen, DakoCytomation GmbH), überschichtet. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Universalmikroskop Axioplan von Zeiss.

2.2.13 Immunzytochemie

Pro Kulturgefäß wurden 5×10^4 Keratinozyten auf 2-chamber-slides aus Glas ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz luftgetrocknet. Nach der Fixierung mit Aceton für 10 min folgte ein Waschschriff mit PBS und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Blockpuffer (5 % + BSA + 0,1 mM DTPA + 0,3 % Triton X-100 in PBS) für 1 Stunde bei RT in einer feuchten Kammer. Als Erstantikörper wurden ein polyklonaler anti S-Nitrosocystein Antikörper (1:100), alternativ ein monoklonaler anti Ki-67 Antikörper (1:50) (DakoCytomation GmbH) in Blockpuffer verdünnt eingesetzt. Für eine Negativkontrolle wurden die Proben mit einem monoklonalen IgG1 Antikörper gegen die Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* (DakoCytomation GmbH) überschichtet, der auf dieselbe Konzentration wie der Erstantikörper verdünnt wurde. Nach einer Inkubation für 60 min bei RT und Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit

0,3% Wasserstoffperoxide für 15 min wurden die Objektträger dreimal mit Waschpuffer (0,1 mM DTPA + 0,3 % Triton X-100 in PBS) gewaschen und im Weiteren nach Herstellerangaben des Universal DAKO LSAB2-Kits (DakoCytomation GmbH) verfahren. Die Detektion erfolgte mit dem DAB-Reagenz (DakoCytomation GmbH). Nach einer Gegenfärbung mit Hämotoxylin und Entwässerung über einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben mit Roti®-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt.

2.2.14 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit Hilfe des ELISA können verschiedenste biomolekulare oder auch niedermolekulare Verbindungen wie z. Bsp. Zytokine in Serum, Plasma, Urin und Zellüberstände nachgewiesen werden. Die klassische ELISA Technik (Sandwich ELISA) verwendet zwei Antikörper, die beide hoch spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass die beiden Antikörper an leicht unterschiedlicher Stelle an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern. Der erste Antikörper (coating Antikörper) wird an eine spezielle 96-Well Mikrotiterplatte gebunden. Nach einer Inkubationsphase mit der Probe wird der zweite Antikörper (detection Antikörper) zugegeben, der an HRP (Meerrettichperoxidase) oder AP (Alkalische Phosphatase) gekoppelt sein kann. Ist der Detektionsantikörper jedoch an Biotin gekoppelt, so folgt ein weiterer Inkubationsschritt mit Streptavidin-HRP. Die anschließende Detektion erfolgt durch Zugabe des TMB (Tetramethylbenzidin) Substrates wobei die Farbentwicklung proportional zur Konzentration des gebundenen Antigens ist. Um die Konzentration des Antigens in der Probe quantitativ zu bestimmen wird neben der unbekannt Probe auch die Farbintensität in mehreren Standardproben mit bekannter Konzentration bestimmt und man erhält eine Standardkurve. Die Zugabe von 1 N Schwefelsäure löst ein Farbumschlag von gelb nach blau aus und führt zum Abbruch der Reaktion. Die Farbintensität wird photometrisch bei 450 nm bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung von cGMP in den Überständen von RFL-6 Kulturen erfolgte mittels cGMP-spezifischem ELISA nach Herstellerangaben R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland).

2.2.15 Quantitativer Nachweis von SH-Gruppen in Proteinen

Freie SH-Gruppen in Proteinen können mit Hilfe von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), welches auch als Ellman-Reagenz bezeichnet wird, quantitativ bestimmt werden. Bei dieser Reaktion reagiert das nachzuweisende Thiol mit dem Reagenz zu einem gemischten Disulfid. Gleichzeitig wird im stöchiometrischen Verhältnis 5-Thio-2-nitrobenzoat (NTB) freigesetzt (Abbildung 2-3). Diese Verbindung ist intensiv gelb gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum bei 412 nm.

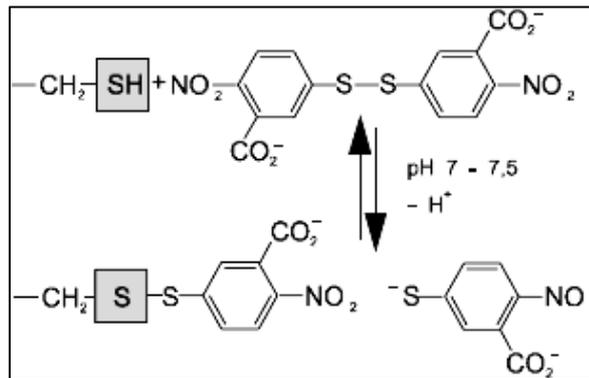


Abbildung 2-3: Nachweis von Thiolgruppen durch Ellman-Reagenz (DTNB). Bei der Umsetzung von reduzierten Thiolgruppen mit DTNB entsteht ein gemischtes Disulfid und NTP, welches photometrisch bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung der gesamten Thiolgruppen wurden 20 μl Probe (oder Standard) mit 75 μl Verdünnungspuffer (30 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, pH 8,2), 25 μl 30 mM DTNB Stocklösung und 400 μl Methanol gemischt und anschließend für 5 min bei RT und 3000 g zentrifugiert. Die Absorptionsbestimmung erfolgte photometrisch bei 412 nm.

Nicht Protein-gebundene Thiole lassen sich nach Fällung der Proteine in den jeweiligen Überständen quantifizieren. Nach Zugabe von 1 Volumen 20 % Trichloressigsäure (TCA) und Inkubation bei -20°C für 1 Stunde, wurden die Proben für 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Überstände gesammelt. Jeweils 50 μl Überstand wurden mit 200 μl Tris-HCl, pH 8,9 und 20 μl 30 mM DTNB Stocklösung vereinigt und die Absorption bei 412 nm bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer GSH Eichgeraden. Die Konzentration der Protein-gebundenen Thiolgruppen lässt sich aus der Differenz der Gesamthiole und freien Thiole errechnen.

2.2.16 RT-PCR

Die Isolierung der RNA aus primären Keratinozyten wurde nach Anleitung des Qiagen RNA Isolierung Kit's RNeasy (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte dann photometrisch bei 260 nm (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

Die reverse Transkription findet unter Einsatz von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen statt und dient zum Umschreiben der RNA in die so genannte komplementäre DNA (cDNA). Die Ominiscript Reverse Transcriptase ermöglicht eine effiziente und sensitive reverse Transkription von 50 ng – 2 μg RNA. Das Enzym vereinigt die Aktivitäten einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer Hybrid-abhängigen Exoribonuklease (RNase H) und einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase, wobei *in vitro* nur die ersten beiden Aktivitäten genutzt werden.

Für die reverse Transkription wurden 0,5 μg oder 1 μg Gesamt-RNA, 1 \times RT-Puffer, 0,5 mM dNTP-Mix, 20 pmol Oligo-dT Primer, 10 U RNase Inhibitor und 1 U

Omniscript Reverse Transcriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 37°C in einem Blockcycler (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) inkubiert.

2.2.17 Real-Time PCR

Real-Time PCR stellt eine avancierte traditionelle PCR dar, die die Detektion der PCR-Produkte während der exponentiellen Amplifikationsphase erlaubt. Die Messung der Reaktionskinetik während der frühen Phase der PCR repräsentiert somit einen entscheidenden Vorteil gegenüber der einfachen PCR, welche eine Quantifizierung der DNA lediglich am Endpunkt der Reaktion erlaubt („Endpunkt-Analyse“). Die Detektion der akkumulierten PCR-Produkte während einer Real-Time PCR erfolgt primär unter anderem durch Einsatz von TaqMan Proben (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996) und SYBR Green I (Yin *et al.*, 2000; Schmittgen *et al.*, 2000). TaqMan Proben sind Oligonukleotide mit einem Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Wird der Fluorophor am 5'-Ende mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Das emittierte Signal besitzt eine für das 3'-Molekül charakteristische Wellenlänge und erscheint in Form von Licht oder im Falle eines „black hole quencher“ (BHQ; Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) als Wärme. Während der Amplifikation hybridisiert die Probe spezifisch mit der komplementären Sequenz. Die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase spaltet die Probe in der Elongationsphase und erlaubt nach Trennung des Reporters vom Quencher eine Zunahme der Fluoreszenz, die in jedem Zyklus gemessen wird. Diese Werte werden hierbei um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz korrigiert, gegen die jeweilige Zyklusnummer aufgetragen und zumeist als sigmoidale Kurve dargestellt. Innerhalb des linearen Abschnitts dieser Kurve ist der Anstieg der Fluoreszenzwerte dem Zuwachs an spezifischem PCR-Produkt proportional. Dadurch liefert das TaqMan PCR System beste quantitative Ergebnisse. Verbesserte TaqMan Proben mit einem minor groove binding (MGB)-Rest am 3'-Ende an (Applied Biosystems), der den Schmelzpunkt der Probe erhöht, ermöglichen die Synthese signifikant kürzerer, Allel-spezifischer Proben und erweitern dadurch die Einsatzmöglichkeiten der Real-Time PCR (Kutyavin *et al.*, 2000).

SYBR Green I ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der nach Bindung an dsDNA fluoresziert und mit jedem Primerpaar und für jedes Gen verwendet werden kann. Bei der Verwendung von SYBR-Green I fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates, da auch Primer-Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Dieser ist zunächst nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Die Schmelztemperatur eines Amplikons hängt weitgehend von seiner Größe und Nukleotidzusammensetzung ab. Bei der Analyse werden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Da kleinere Fragmente wie z. Bsp. Primer-

Dimere einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen, ist es möglich zwischen dem Fluoreszenzsignal des erwünschten Produkts und den Signalen unspezifischer PCR-Produkte zu unterscheiden. SYBR Green I stellt eine schnelle und zuverlässige Methode dar (Bustin, 2000), die sich in vielen Anwendungen wie die Zytokin-Quantifizierung erfolgreich bewährt hat.

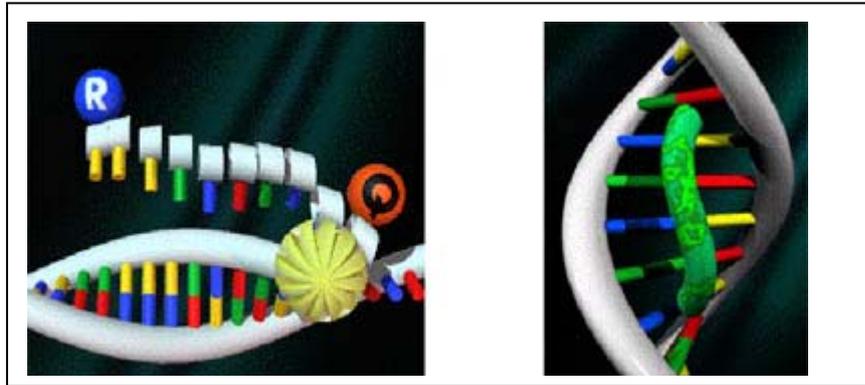


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung einer TaqMan™ Probe (links) und SYBR Green I (rechts). Die TaqMan Probe enthält einen Reporterfarbstoff (R) am 5'-Ende und einen Quencher (Q) am 3'-Ende. Solange die Probe intakt ist, reduziert der Quencher aufgrund der räumlichen Nähe zum Reporterfarbstoff die emittierte Fluoreszenz mittels FRET. Wird die Probe nach Bindung an die Komplementärsequenz durch die 5' Nucleaseaktivität der Taq DNA Polymerase gespalten, so kommt es zu einer räumlichen Auftrennung beider Farbstoffe und einer Zunahme des Fluoreszenzsignals. SYBR Green I ist ein hoch-spezifischer Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Die DNA-Bindung resultiert in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität, die proportional zur PCR-Produktmenge ist.

Das ABI Prism 7700 Sequence Detection System (SDS) von Applied Biosystems war der erste kommerziell erhältliche Thermocycler für Real-Time PCR. Das Gerät erlaubt nach Fluoreszenzinduktion durch Laserlicht die quantitative Bestimmung von DNA Sequenzen in biologischen Proben vorzugsweise in Mikrotiterplatten (Reaktionsvolumen 20-50 µl).

Bei der Durchführung der Real-Time PCR wurde für die Amplifikation von Ki-67 und Involucrin das QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Für jede zu untersuchende Sequenz wurden 12,5 µl SYBR Green Master Mix (2×) mit 300 nM Gen-spezifische Primer und 2 ng-100ng cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammengebracht. Alternativ wurden für die Amplifikation der 18 S cDNA jeweils 100 nm Primer eingesetzt. Die Auftragung der Proben erfolgte als Triplets, wobei ein Leerwert (NTC), in welchem die cDNA durch RNase-DNase-freies Wasser substituiert wurde, als Negativkontrolle der Reaktion diente. Die gewählten PCR-Bedingungen im Real-Time-System (ABI Prism 7900 Sequence Detection System, Applied Biosystems) sind der Tabelle 2-2 zu entnehmen.

Tabelle 2-2: Ablauf der Real-Time PCR unter Verwendung von SYBR Green I. Schritt 2 wurde 40 mal wiederholt. Die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgte während der Elongationsphase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	15 sec	Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
2	94°C 60°C 72°C	15 sec 30 sec 30 sec	Denaturierung Annealing Elongation
3	95°C 60°C 95°C	15 sec 15 sec 15 sec	Erstellen einer Schmelzkurve

Die Vervielfältigung der IL-6, IL-8, COX-2, TNF- α und IL-1 β cDNA wurde mit Gen-spezifischen TaqMan Proben durchgeführt, wobei für die Gene IL-6, TNF- α und IL-1 β die kommerziell zu erwerben TaqMan Gene Expression Assays von Applied Biosystems verwendet wurden. Diese enthalten einen FAM Reporterfarbstoff am 5'-Ende der TaqMan® MGB Probe mit einem nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende und spezifische Primer in Form eines 20 \times Mixes. Dabei beträgt die Konzentration jedes Primers 18 μ M und die der Probe 5 μ M (20 \times). Die Primer und Proben für die Gene IL-8 und COX-2 wurden mit Hilfe der Primer Express® Software designt und als 20 \times Mix mit einer Primer- und Probekonzentration von jeweils 4 μ M (20 \times) präpariert. Für die Real-Time PCR wurden 2 ng-100 ng cDNA mit 12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (2 \times) und 1,25 μ l Primer-Probe-Mix (20 \times) amplifiziert. Das Gesamtvolumen pro Reaktion betrug 25 μ l. Die PCR-Bedingungen entsprechen den Empfehlungen von Applied Biosystems und sind im Folgenden in Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-3: Ablauf der Real-Time PCR unter Verwendung von TaqMan Proben. Schritt 2 wurde 40 mal wiederholt, die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgte in der Elongationsphase.

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	10 min	Aktivierung der HotStar Taq DNA Polymerase
2	95°C 60°C	15 sec 60 sec	Denaturierung Annealing und Elongation

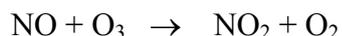
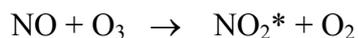
Die relative Expression der untersuchten Gene wurde mit Hilfe der *Q-Gen* Software (Muller *et al.*, 2002) bestimmt. Diese auf Microsoft® Excel®-basierte Software ermöglicht Planung, Durchführung und Auswertung der Real-Time PCR Experimente und gewährt sowohl die mathematische Analyse als auch die graphische Darstellung der Daten.

2.2.18 Faraday-Modulationsspektroskopie (FAMOS)

Die Faraday-Modulationsspektroskopie (FAMOS) ist eine sensitive Nachweismethode für Radikale und Ionen. Sie beruht auf dem Faraday-Effekt, d. h. auf der Fähigkeit eines Stoffes die Ebene vom linear polarisierten Licht zu drehen wenn ein äußeres Magnetfeld anliegt. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 25 ppb NO bei einer Zeitauflösung von 300 ms. Unter Verwendung eines Quanten-Kaskaden-Lasers (QCL) welches linear polarisiertes Licht ausstrahlt ($\lambda=5,2 \mu\text{m}$) wurde die NO-Freisetzung aus unbestrahlten bzw. UVA-bestrahlten Nitritlösungen (5 mM) in An- oder Abwesenheit von GSH quantitativ bestimmt.

2.2.19 Chemilumineszenzdetektion (CLD)

Die Konzentration von Nitrit und anderen Nitrosoverbindungen wurde nach einem Messprinzip bestimmt, das Chemilumineszenzdetektion (CLD) genannt wird. Nach Reduktion mit einer Jodid/Trijodid-enthaltenden Reaktionslösung geht das entstandene NO in die Gasphase über. Im Analysator erzeugtes Ozon wird im Anschluss dem angesaugten NO-enthaltenden Probengas (Helium) zugesetzt wobei folgende Reaktionen ablaufen:



Bei 20 % der Reaktionen entsteht NO_2 in einem elektronisch angeregten Zustand (NO_2^*). Beim Übergang der Elektronen in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht im Wellenbereich von 600-3000 nm mit einem Emissionsmaximum bei ca. 1200 nm, emittiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt mit Hilfe eines Photomultipliers, welches schwache Lichtsignale verstärkt und in einem nachweisbaren elektrischen Impuls umwandelt. Die verwendete Reaktionslösung aus 45 mM Kaliumjodid (KJ) und 10 mM Jod in Eisessig wurde vor Messbeginn frisch hergestellt. Eine effiziente Umwandlung von Nitrit zu NO verläuft bei 60°C optimal. Um Spuren von Säure und Jodid vor dem Transfer in den Detektor (CLD 88AM sp, Eco Physics, München, Deutschland) zu entfernen, wurde der Ausgang des Gasstroms durch eine 1 M Lösung Natriumhydroxid (4°C) geleitet. Bei großem Ozonüberschuss ist die Chemilumineszenz proportional zum NO-Stoffmengenanteil im Probengas. Dabei korreliert die Menge des NO mit der Fläche der Peaks und nicht mit deren Höhe, die weitgehend von der Geschwindigkeit der Probeninjektion, Mischung und Reduktionseffizienz abhängt. Die Konzentration lässt sich anhand einer Eichreihe bestimmen, die einen Konzentrationsbereich von 0-1 μM Nitrit abdeckt. Diese Methode erlaubt im Allgemeinen die Quantifizierung von Nitrit und Nitrosoverbindungen im Femtomol-Bereich.

2.2.19.1 Quantifizierung von Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiole und N-Nitrosamine

Für die Quantifizierung der NO Metabolite in Hauthomogenaten und Keratinozytenlysaten wurden die Proben vor der CLD Analyse in vier Aliquoten aufgeteilt und im Dunkeln auf Eis aufbewahrt (Suschek *et al.*, 2005). Dadurch wird eine photolytische bzw. thermolytische Spaltung umgangen. Die unbehandelte Probe dient zur Detektion von Nitrit und Nitrosoverbindungen. Für die Entfernung von Nitrit aus der Lösung wurde die zweite Probe mit 0,5 % Sulfanilamid in 1 N HCl (Sulfanilamid/H⁺) vorbehandelt und für 15 min bei RT inkubiert. Unter diesen Bedingungen entsteht ein stabiles Diazoniumion, das nicht zu NO reduziert wird und somit die selektive Bestimmung nitrosierter Verbindungen in der biologischen Probe erlaubt.

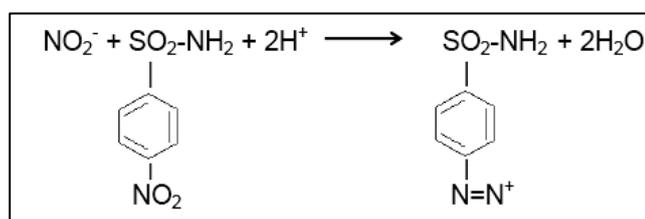


Abbildung 2-5: Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid. Sulfanilamid bildet mit Nitrit in saurer Lösung ein stabiles Diazoniumsalz.

Die Vorinkubation mit 0,2 % Quecksilberchlorid (HgCl₂) und Sulfanilamid/H⁺ für ca. 20 min führt zur Spaltung der S-NO Bindung und ermöglicht die Konzentrationsbestimmung der S-Nitrosothiole. Diese lässt sich aus der Differenz des Signals in Gegenwart von Sulfanilamid/H⁺ (Nitrit + Nitrosoverbindungen) und des Signals in Gegenwart von HgCl₂/Sulfanilamid/H⁺ ableiten. Der Quecksilber-stabile Anteil, d. h. der Peak nach Vorbehandlung mit HgCl₂/Sulfanilamid/H⁺, repräsentiert in der Regel Nitrosamine, Metal-Nitrosyl-Komplexe oder Häm-NO Bindungen.

Ferner lässt sich die Nitratkonzentration in den Hauthomogenaten durch Reduktion des Nitrats zu Nitrit mit Vanadiumchlorid (VCl₃) bestimmen, gefolgt von einer Griess Reaktion und Substrahierung der mittels CLD ermittelten Nitritwerte. Nach Deprotonierung der Proben mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) wurden diese für 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Als Standard für die Messung wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Konzentrationsbereich von 1,6 bis 200 μM Nitrat verwendet. Nach Zugabe von 100 μl Probe bzw. Standard und 100 μl VCl₃ (400 mg VCl₃ in 50 ml 1M HCl) wurden schnell 50 μl Griess I Lösung (5 % Sulfanilamid in 1 N HCl) und 50 μl Griess II Lösung (0,1 % N-Naphthylethylendiamin in Wasser) zugesetzt. Da die Reduktion von Nitrat zu Nitrit in saurer Lösung erfolgt, müssen die Griess Reagenzien schon während der Reaktion vorhanden sein um ein Entweichen von NO in die Gasphase und somit Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Nach einer Inkubation von 60-90 min wurde die Absorption bei 540 nm bestimmt.

2.2.19.2 UVA-induzierte NO-Freisetzung aus humaner Haut und Haut-homogenaten

Die Bestimmung der UVA-induzierten (HPA 400 W Cleo lamp; Phillips, Hamburg, Deutschland; emittiertes UVA-Spektrum 320-420 nm mit einem Maximum zwischen 340 und 380 nm) NO Bildung erfolgte in einer mit Quarzglas bedeckten Kammer, wobei das Gas für die Detektion kontinuierlich abgeleitet wurde (Suschek *et al.*, 2005). Um UVA-unabhängige Effekte, wie z. Bsp. Temperatur auf die NO Freisetzung auszuschließen, wurde ein UV Filter verwendet, der ausschließlich Licht der Wellenlänge >420 nm durchlässt.

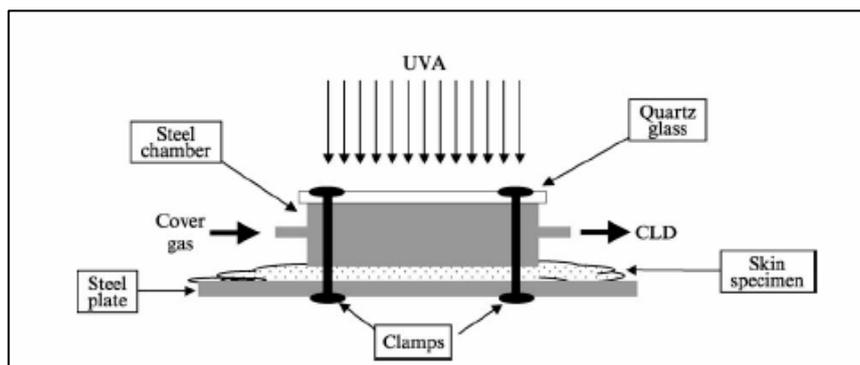


Abbildung 2-6: UVA-induzierte NO Freisetzung aus humaner Haut. Für die Detektion von NO wurde eine mit UVA-durchlässigem Quarzglas bedeckte Kammer verwendet. Das Trägergas leitet dabei das NO zur CLD Detektionseinheit (Suschek *et al.*, 2005)

Für die Ermittlung der einzelnen NO Metabolite, die zur UVA-induzierten NO Entstehung beitragen, wurden die Überstände der Hauthomogenate in drei Aliquoten (je 15 ml) aufgeteilt, die wie folgt behandelt wurden:

1. Unbehandeltes Aliquot, welches die Dekomposition aller photolabiler Verbindungen repräsentiert.
2. Zur Entfernung von Nitrit wurde das Aliquot mit 0,5 % Sulfanilamid/H⁺ für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert.
3. Um den Anteil von Nitrat und aller Quecksilber-stabilen Verbindungen zu bestimmen wurde die Probe mit 0,2 % Quecksilberchlorid (Spaltung der S-Nitrosothiole) und 0,5 % Sulfanilamid/H⁺ (Entfernung von Nitrit) für ca. 20 min vorbehandelt und anschließend mit UVA bestrahlt.

Die Alkylierung der freien Thiolgruppen erfolgte durch Zugabe von 10 mM N-Ethylmaleimid (NEM).

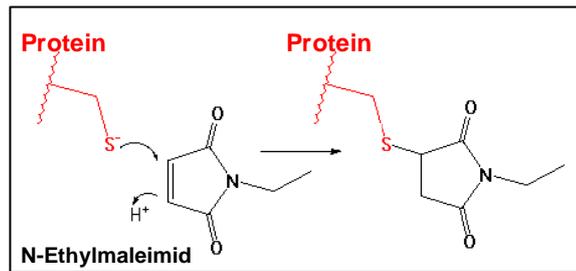


Abbildung 2-7: Alkylierung reduzierter Thiolgruppen mit N-Ethylmaleimid.

2.2.20 Statistische Analysen

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde wenn nicht anders angegeben ANOVA (Tukey Methode) verwendet. Alternativ wurde der Student's t-Test (unabhängige Proben) angewandt. $P < 0,05$ gilt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur UVA-induzierten NO-Generierung und Charakterisierung von Stickoxiden in der humanen Haut

3.1.1 NOS-unabhängige NO-Generierung nach UVA-Bestrahlung der humanen Haut

Zur Ermittlung der UVA-induzierten NO-Bildung in der Haut wurden Proben von der morphologisch intakten menschlichen Haut (Mammareduktionsplastiken) unter Verwendung einer 400 W Quecksilberdampfampe mit UVA bestrahlt und gleichzeitig die Menge des entweichenden NO mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD) bestimmt. Dabei kann man eine kontinuierliche NO-Freisetzung aus der Haut beobachten, die nach ca. 20 min entsprechend einer UVA-Dosis von ungefähr 40 J/cm^2 ein Maximum erreicht (Abbildung 3-1).

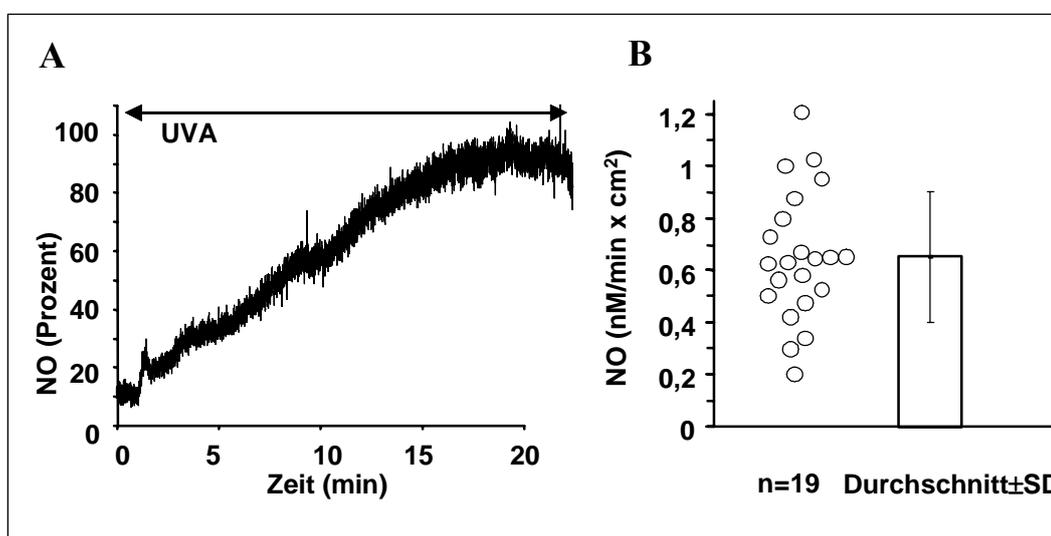


Abbildung 3-1: UVA-Bestrahlung humaner Haut führt zur NO-Freisetzung. (A) UVA-Bestrahlung (40 J/cm^2) von Haut (16 cm^2) führt zur NO-Freisetzung mit einem Maximum nach ca. 20 min. Dargestellt ist eine repräsentative Kurve aus fünf unabhängigen Experimenten. (B) Die durchschnittliche NO-Freisetzung während der UVA-Bestrahlung (40 J/cm^2) beträgt $0,65 \pm 0,25 \text{ nM NO/min} \times \text{cm}^2$ Haut mit einer Variationsbreite von 0,2-1,2 bei 19 individuellen Hautproben.

Die Konzentration des generierten NO nach 20 min weist eine individuelle, Donor-abhängige Variation von 0,2 bis 1,2 nM und beträgt durchschnittlich $0,65 \pm 0,25$ nM NO/min \times cm² Haut.

Analoge Ergebnisse konnten nach Bestrahlungen mit Hauthomogenaten beobachtet werden (nicht gezeigt).

Um einen möglichen Einfluss einer NOS-Aktivität zu untersuchen wurden Hauthomogenate in Anwesenheit der NOS-Inhibitoren L-NIO (0,5 mM) und L-NMA (1 mM) bestrahlt (Abbildung 3-2). In diesem Fall konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Probe festgestellt werden, wodurch gleichzeitig die Involvierung von NOS in diesem Prozess ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz hierzu führte die Zugabe des NO-Scavengermoleküls cPTIO (100 μ M/ml) ebenso wie eine vollständige Eliminierung der RSNO-Verbindungen durch Reduktion mit HgCl₂ und nachfolgende Diazotierung von Nitrit mittels Sulfanilamid/H⁺ (+red/sulf) zu einer vollständigen Blockierung der NO-Freisetzung.

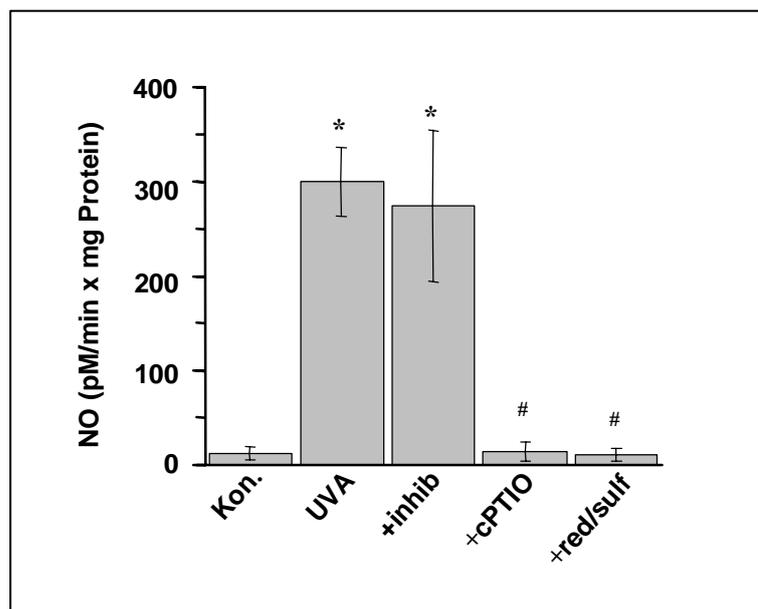


Abbildung 3-2: UVA-induzierte und NOS-unabhängige NO-Freisetzung aus Hauthomogenaten. Die NO-Freisetzung aus UVA-bestrahlten Hauthomogenaten (n=18) wird durch Zugabe von NOS-Inhibitoren (+inhib, 0,5 mM L-NIO + 1 mM NMA) nicht beeinflusst. Andererseits führt sowohl die Eliminierung von RSNO und Nitrit durch Reduktion mit HgCl₂ und anschließende Diazotierung von Nitrit (+red/sulf) als auch die Zugabe von cPTIO (100 μ M/ml) zu einer vollständigen Blockierung der NO-Bildung. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 18 Messungen \pm Standardabweichung. *p<0,001 verglichen mit der Kontrolle. #p<0,001 verglichen mit der UVA-bestrahlten Probe (UVA).

3.1.2 Quantitative Bestimmung von Nitrit, Nitrat, RSNO-, RNNO-Verbindungen und Thiolgruppen in der menschlichen Haut

Die Bestimmung von Nitrit, Nitrat, RSNO- und RNNO-Verbindungen erfolgte in Homogenaten der menschlichen Haut nach Reduktion mit einer Jod/Jodid Lösung in Eisessig und Detektion des so freigesetzten NO mittels CLD. Folgende Konzentrationen ließen sich nach der Messung errechnen: $5,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$ Nitrit, $2,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ Nitrosothiole, $1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ Nitrosamine und $82,4 \pm 33,6 \mu\text{M}$ Nitrat (Abbildung 3-3).

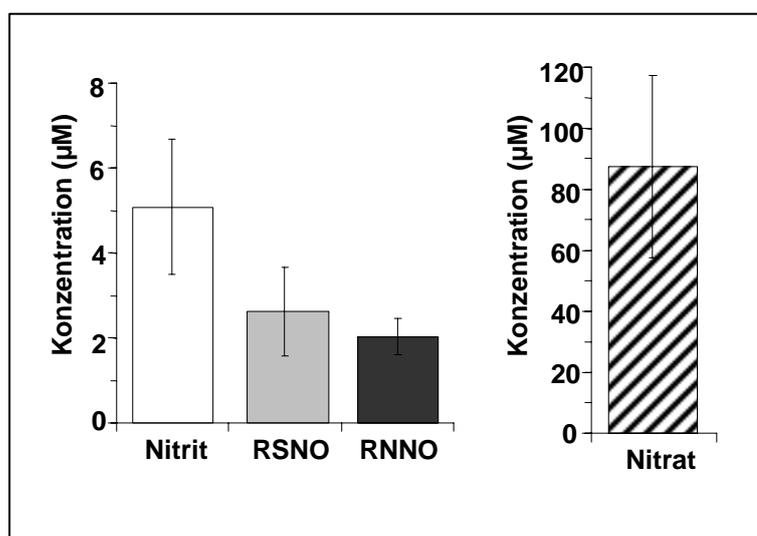


Abbildung 3-3: Quantifizierung der Stickoxide in humanen Hauthomogenaten. Das nach reduktiver Denitrosierung freigesetzte NO wurde mittels CLD detektiert. Dargestellt sind die Konzentrationen von Nitrit, S-Nitrosothiole (RSNO), N-Nitrosamine (RNNO) und Nitrat. n=22

Unter Verwendung von Ellman-Reagenz wurden in Hauthomogenaten zusätzlich $1360 \pm 337 \mu\text{M}$ Protein-gebundene Thiole, $238 \pm 92 \mu\text{M}$ freie, d. h. nicht Protein-gebundene, kleinmolekulare Thiole davon $143 \pm 40 \mu\text{M}$ GSH gemessen (Abbildung 3-4). Somit sind mehr als die Hälfte der nicht Protein-gebundenen Thiolgruppen im GSH.

Wie in Abbildung 3-5 zu sehen, korreliert die Menge des aus Hauthomogenaten freigesetzten NO (siehe auch Abbildung 3-2) sowohl mit der Nitrit- und RSNO-Konzentration als auch mit der Konzentration an Thiolgruppen der jeweiligen Hautprobe. Im Gegensatz hierzu konnte kein Zusammenhang zwischen der

freigesetzten NO-Konzentration und der Menge an Nitrat und RNNO-Verbindungen beobachtet werden (nicht gezeigt).

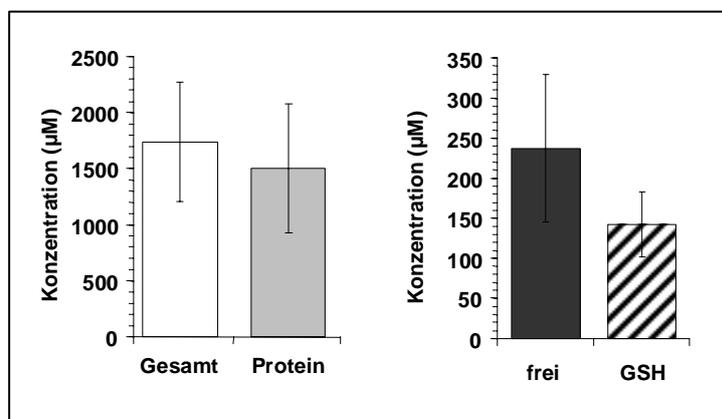


Abbildung 3-4: Bestimmung von Thiolgruppen in Hauthomogenaten. Mittels Ellman-Reagenz wurde in Hauthomogenaten die Konzentration von Gesamtthiolen (Gesamt), von Protein-gebundenen (Protein) und nicht Protein-gebundene Thiolgruppen (frei) bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil an GSH ermittelt. (n=15)

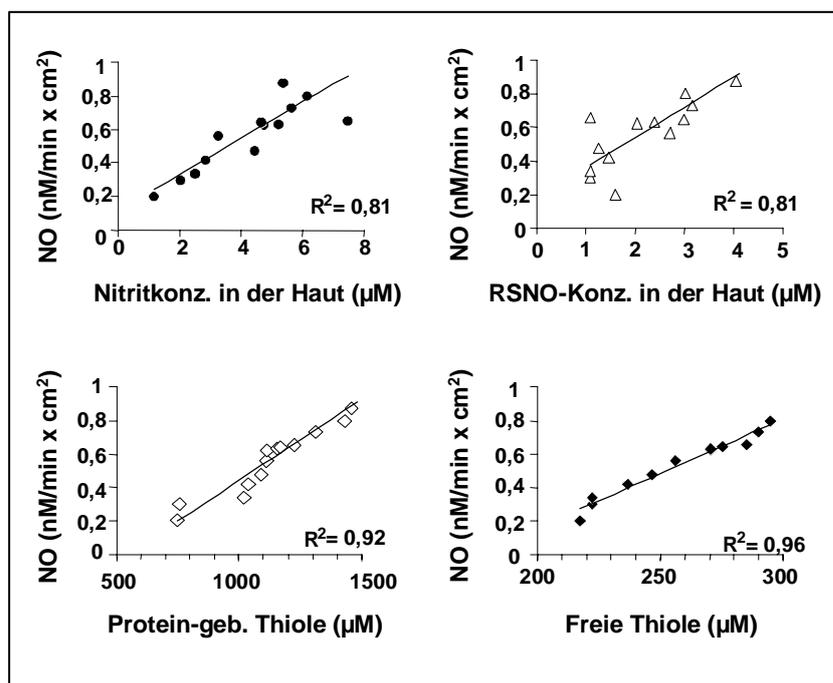


Abbildung 3-5: Korrelation zwischen der UVA-induzierten NO-Freisetzung aus Hauthomogenaten und der Nitrit-, RSNO- und Thiol-Konzentration der jeweiligen Hautprobe. n=15

3.1.3 Beitrag der NO-Metabolite an der UVA-induzierten NO-Bildung in Hauthomogenaten

Um zu überprüfen welchen Beitrag die in Abbildung 3-3 quantifizierten NO-Derivate an der UVA-induzierten NO-Entstehung leisten, wurden diese unter der Verwendung von 0,5 % Sulfanilamid/H⁺ (Sulf/HCl), 0,2 % Quecksilberchlorid (Hg²⁺) und 10 mM N-Ethylmaleimid (NEM) aus Überständen von Hauthomogenaten differentiell entfernt, die so behandelten Proben mit UVA bestrahlt und die freigesetzte NO-Menge mittels CLD detektiert. In Hauthomogenaten die nach Zugabe von Sulfanilamid, NEM und Quecksilberchlorid kein Nitrit, keine reduzierten Thiolgruppen und keine S-Nitrosothiole (RSNO) enthielten, konnte kein NO detektiert werden (Abbildung 3-6 A). Werden Proben bestrahlt die nur mit Sulfanilamid und NEM vorbehandelt wurden, so führt der Zerfall der RSNO-Verbindungen zur NO-Entstehung und Bildung eines kleinen Peaks, der jedoch schnell wieder die Ursprungskonzentration erreicht (Abbildung 3-6 B). Die Bestrahlung von Homogenaten, die nur Nitrit enthalten resultiert in der Bildung eines niedrigen Plateaus, das auf der UVA-induzierten Nitritphotodekomposition beruht. Die Zugabe von Sulfanilamid bewirkt die Entfernung von Nitrit aus dem System und dadurch eine Aufhebung des NO-Signals (Abbildung 3-6 C). Bestrahlt man im Weiteren Hauthomogenate in denen die freien Thiole durch NEM alkyliert wurden, so misst man wie erwartet als Folge des RSNO-Zerfalls das frühe Signal, welches auf den Nitritspiegel abfällt und durch Sulfanilamid vollständig blockiert wird (Abbildung 3-6 D). Überraschenderweise zeigt sich in unbehandelten Proben eine starke Zunahme der NO-Konzentration, die schließlich ein Maximum erreicht das ca. 3 mal höher liegt als das RSNO-Signal (Abbildung 3-6 E). Vergleicht man dieses Bild mit den Werten in Abbildung 3-6 D, so ist die verstärkte NO-Freisetzung offensichtlich auf die in der Probe enthaltenden reduzierten Thiolgruppen zurückzuführen. Werden diese nämlich durch NEM blockiert, beobachtet man einen steilen Abfall des Signals und das bekannte Nitrit-Signal tritt zum Vorschein. Des Weiteren führt die Entfernung von Nitrit zum Zeitpunkt der maximalen NO-Freisetzung zu einer vollständigen Blockade der UVA-induzierten NO-Entstehung, was darauf hindeutet, dass die UVA-induzierte NO-Freisetzung neben dem Zerfall von RSNO-Verbindungen ausschließlich auf der Photodekomposition von Nitrit beruht (Abbildung 3-6 F).

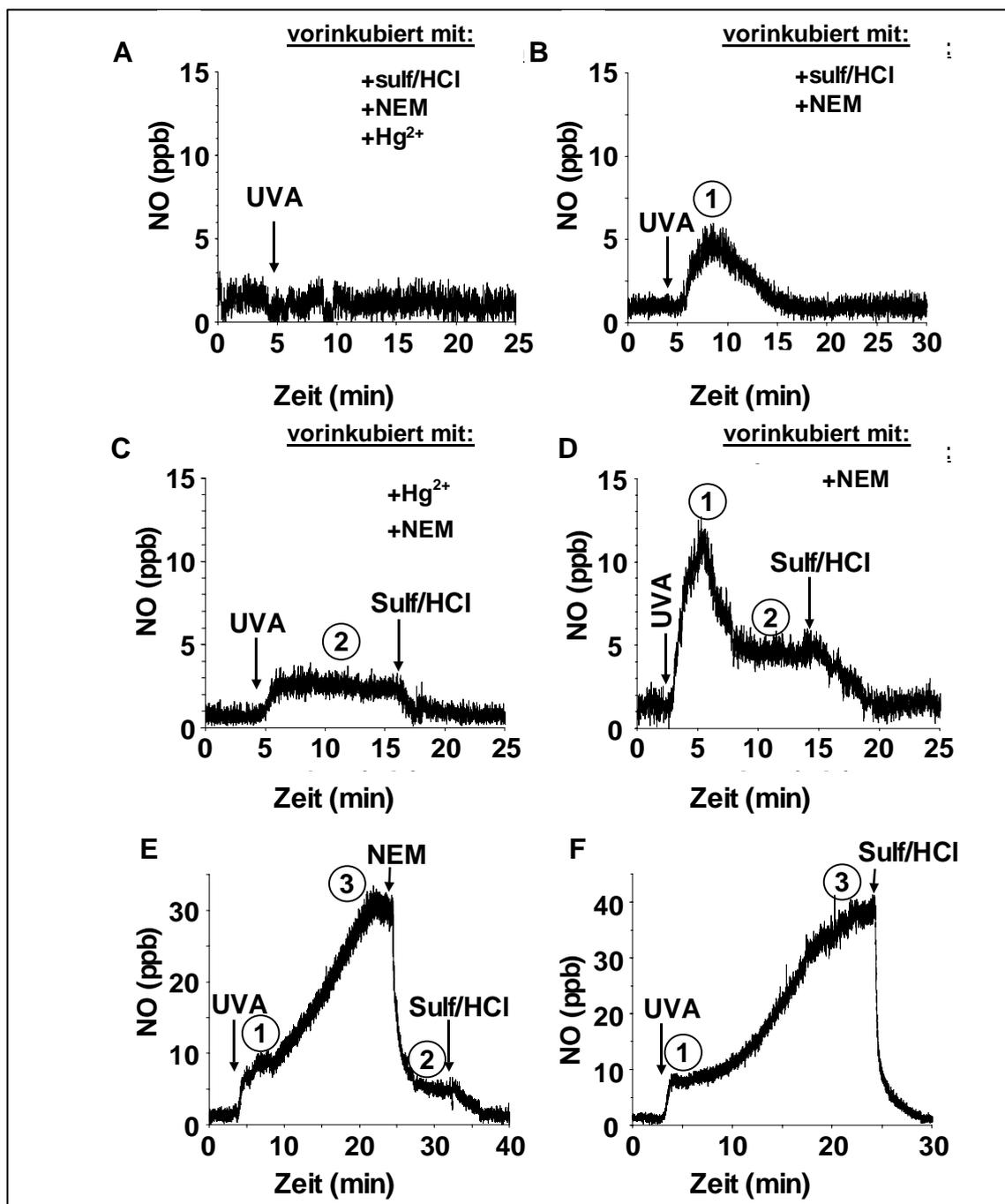


Abbildung 3-6: Beitrag von Nitrit, Nitrat und nitrosierten Verbindungen an der UVA-induzierten NO-Bildung. (A) NO-Signal in Proben ohne Nitrit, RSNO und reduzierte Thiolgruppen. (B) NO-Signal nach RSNO-Zerfall (1) in Proben die kein Nitrit und keine Thiole enthalten. (C) NO-Signal nach Nitritzerfall (2) in Proben ohne RSNO und Thiole. Die Zugabe von Sulfanilamid führt zur Abnahme des Signals auf die Basallinie. (D) NO-Signal in Proben die keine reduzierte Thiole enthalten. (E) und (F) NO-Signal in Proben, die nicht vorbehandelt wurden. $n=3$

3.1.4 Bedeutung von Thiolen für die UVA-induzierte Nitritphotolyse *in vitro*

Für die Überprüfung der Rolle von reduzierten Thiolen in der UVA-induzierten Nitritdekomposition wurden Nitritlösungen in An- bzw. Abwesenheit von GSH mit UVA bestrahlt und das entstandene NO mittels Faraday-Modulationsspektroskopie (FAMOS) quantitativ bestimmt. Die Bestrahlung einer 5 mM Nitritlösung führt zu einer sofortigen und konstanten NO-Freisetzung von durchschnittlich $0,96 \pm 0,11$ ppm. Dieser Wert entspricht einer Zerfallsrate von 428 ± 49 pmol/s (Abbildung 3-7 A). Die Behandlung der Nitritlösung mit UVA in Anwesenheit von GSH führt zu einer von der GSH-Konzentration abhängigen NO-Freisetzung, die bei 1 mM GSH ca. 30-fach höher ist als mit Nitrit alleine. Analog zu den Versuchen mit Hauthomogenaten (Abbildung 3-6) führt die Alkylierung der Thiolgruppen durch NEM (5 mM) zur Abnahme des NO-Signals auf den Wert des Nitritzerfalls. Diese Freisetzung kann durch Sulfanilamid vollständig blockiert werden (Abbildung 3-7 C).

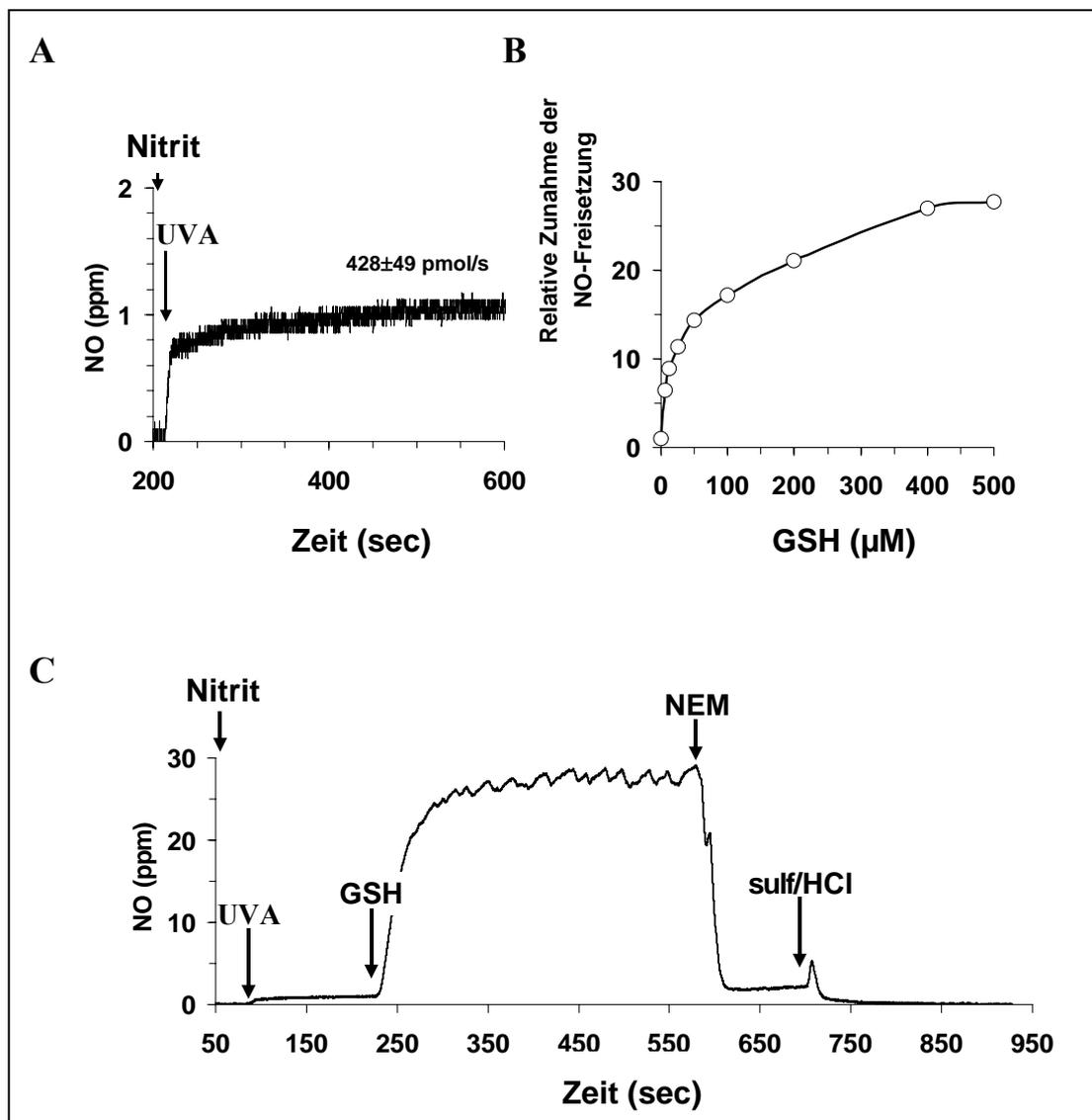


Abbildung 3-7: UVA-induzierte Nitritphotolyse *in vitro*. (A) Photolyse einer 5 mM Nitritlösung. (B) GSH führt zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der NO-Freisetzung als Folge des UVA-induzierten Nitritzerfalls. (C) Alkylierung von GSH durch NEM reduziert sichtbar das durch GSH verstärkte NO-Signal. Die Entfernung von Nitrit durch Sulfanilamid (sulf/HCl) führt zur vollständigen Blockierung der NO-Freisetzung. n=5

3.1.5 Detektion S-nitrosierter Proteine in der menschlichen Haut

Um die Verteilung von S-Nitrosoverbindungen in der humanen Haut zu untersuchen, wurden Hautschnitte mit einem Kaninchen anti S-Nitrosocystein Antiserum angefärbt.

Die Effizienz des polyklonalen anti S-Nitrosocystein Antikörpers wurde in Vorversuchen überprüft. Für die Erzeugung einer Negativkontrolle wurden S-Nitrosothiole in fixierten Hautschnitten mit 0,2 % HgCl_2 , alternativ mit 1 % CuSO_4 , reduziert. Im Anschluss wurden verfahrensmäßig die reduzierten Thiolgruppen mit 10 mM NEM alkyliert und S-nitrosierte Proteine immunhistochemisch angefärbt. Abbildung 3-8 zeigt, dass die Reduktion mit Kupfer eine höhere Effizienz im Vergleich zur Reduktion mit Quecksilber aufweist. Ferner gilt die Spezifität des anti S-Nitrosocystein Antikörpers als erwiesen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten polyklonalen anti-Nitrosocystein Antikörpern (Calbiochem, Sigma) festgestellt werden.

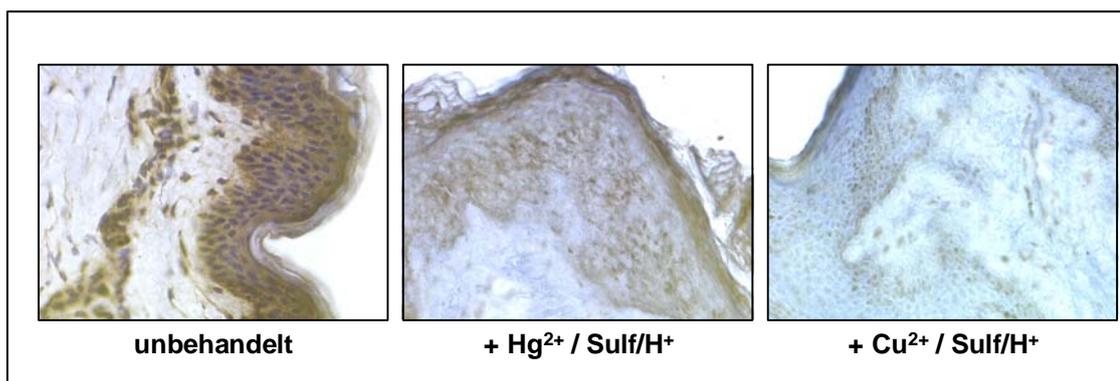


Abbildung 3-8: Reduktion der Nitrosothiolen durch Quecksilber und Kupfer. Fixierte Schnitte von Mammahaut wurden mit Quecksilberchlorid (Hg^{2+}) und Kupfersulfat (Cu^{2+}) über Nacht behandelt. Dadurch werden die S-Nitrosothiole zu Thiolen reduziert. Bei dieser Reaktion entsteht ferner NO welches in Gegenwart von Sauerstoff zu Nitrit oxidiert wird. Das akkumulierte Nitrit wird unter sauren Bedingungen durch Sulfanilamid (Sulf/ H^+) diazotiert. Die Schnitte wurden im Anschluss mit einem anti S-Nitrosocystein Antiserum immunhistochemisch angefärbt. Vergrößerung: 400 \times

Die immunhistochemischen Untersuchungen konnten belegen, dass S-nitrosierte Verbindungen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis vorzufinden sind. Am auffälligsten ist deren Auftreten im Stratum corneum, in den Keratinozyten, in Haarfollikeln und in Endothelzellen innerhalb der Dermisregion (Abbildung 3-9).

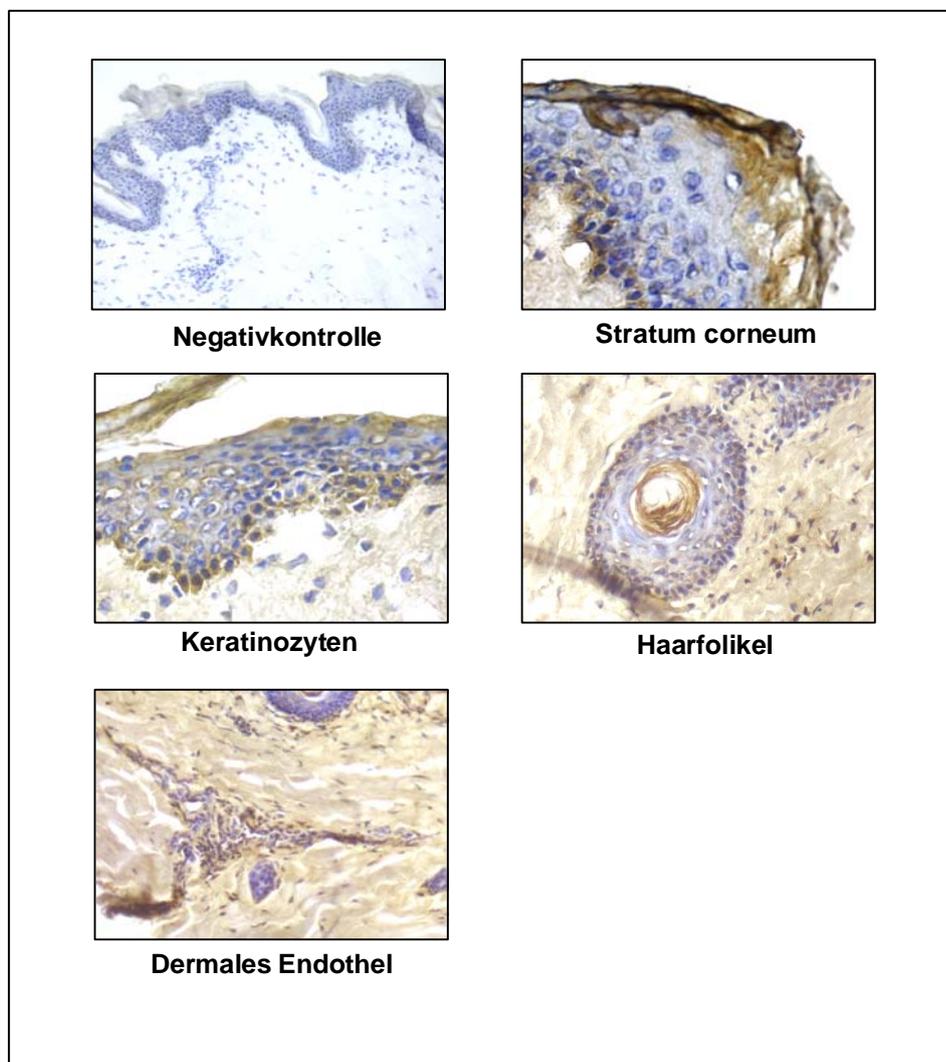


Abbildung 3-9: Verteilung der S-Nitrosothiole in der humanen Haut. Hautschnitte aus unbehandelter Haut wurden mit einem anti S-Nitrosocystein Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Als Negativkontrolle wurde eine Immunglobulinfraktion aus nicht immunisierten Kanninchen verwendet (Negativkontrolle). S-nitrosierte Proteine konnten in der Hornschicht (Stratum corneum), in den Keratinozyten, Haarfollikeln, in der Dermisregion und in Endothelzellen (Dermales Endothel) nachgewiesen werden. Vergrößerung: 100× und 400×

3.1.6 UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosoverbindungen in der menschlichen Haut

Die RSNO-Konzentration in Kurzzeitorgankulturen wurde mittels CLD bestimmt (Abbildung 3-10 A). Die Messung in Homogenaten von unbestrahlten Kurzzeitorgankulturen hat gezeigt, dass unbehandelte Haut (Kontrolle) $2,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$ S-nitrosierte Proteine enthält. Die Vorinkubation für 24 h mit 1 mM NaNO_2 (+Nitrit) resultiert in einem schwachen Anstieg auf $4,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$, wogegen die Inkubation mit NaNO_3 (Nitrat) zu keiner Veränderung in der RSNO-Konzentration führt im Vergleich zur Kontrolle. Nach UVA-Bestrahlung der Haut kommt es zu einem signifikanten Anstieg der RSNO-Menge in der unbehandelten Haut ($5,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$) (Abbildung 3-10 A, Kontrolle) und nahezu einer der RSNO-Konzentration auf $10,9 \pm 2,0 \mu\text{M}$ in der mit Nitrit behandelten Probe. Die Negativkontrolle mit Nitrat (1 mM) zeigt hingegen keinen Effekt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Bildung der S-nitrosierten Verbindungen nach UVA-Bestrahlung auf der Photodekomposition von Nitrit beruht, jedoch nicht auf dem Zerfall von Nitrat.

Werden mittels der Biotin switch Methode die S-nitrosierten Proteine aus Hauthomogenaten in einem ersten Schritt S-biotinyliert und im Anschluss durch Streptavidin-HRP detektiert, so kann man auch auf diesem Wege zeigen, dass UVA-Bestrahlung (40 J/cm^2) der normalen Haut zu einer Erhöhung der S-Nitrosoverbindungen führt (Abbildung 3-10 B).

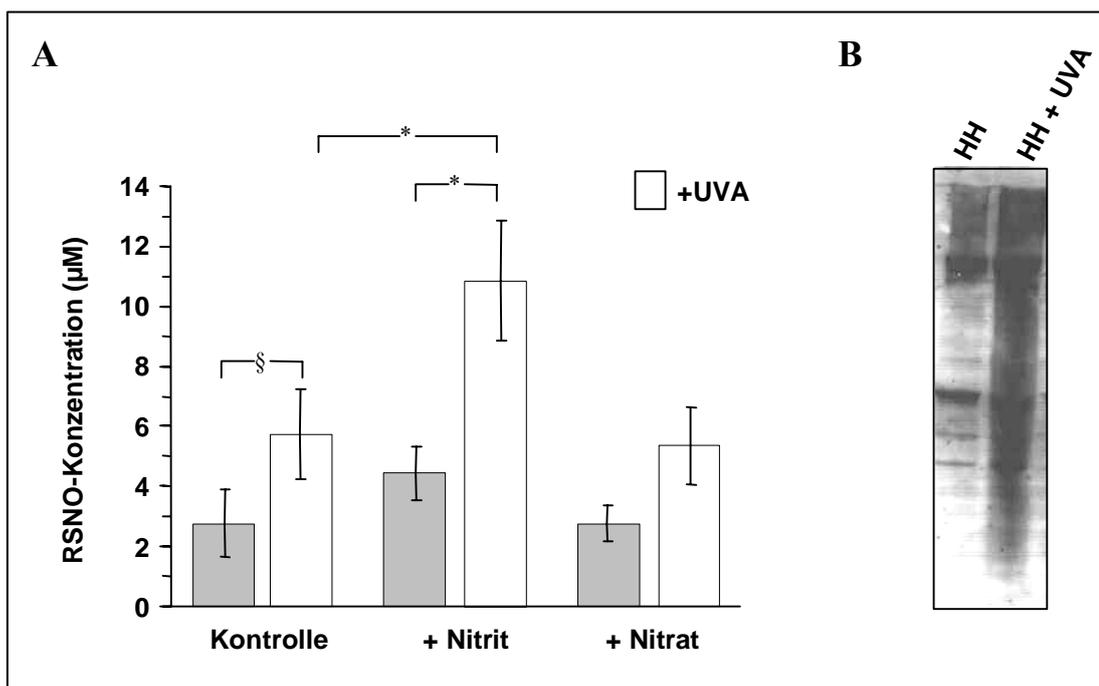


Abbildung 3-10: UVA-Bestrahlung der menschlichen Haut induziert die Bildung von S-Nitrosothiolen. (A) UVA-Bestrahlung (15 J/cm^2) von un behandelter Haut führt zu einer signifikanten Erhöhung der RSNO-Konzentration von $2,8 \pm 1,1$ auf $5,7 \pm 1,5 \text{ } \mu\text{M}$. Die Inkubation der Haut mit 1 mM NaNO_2 (+ Nitrit) für 24 h resultiert in einem schwachen Anstieg der RSNO-Konzentration ($4,4 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{M}$) in der unbestrahlten Probe und einer zusätzlichen signifikanten Erhöhung der RSNO-Konzentration ($10,9 \pm 2,0 \text{ } \mu\text{M}$) nach UVA. Wird Nitrit durch 1 mM Nitrat (+Nitrat) ersetzt, so beobachtet man keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. $\text{\$}p < 0,05$, $\text{*}p < 0,001$. (B) Nitrosierte Proteine lassen sich in Hauthomogenaten (HH) durch die Biotin switch Methode nachweisen. UVA-Bestrahlung (40 J/cm^2) der Hauthomogenate (HH + UVA) führt zu einer sichtbaren Zunahme der RSNO-Konzentration.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung des polyklonalen anti S-Nitrosocystein Antikörpers bekräftigen die bisherigen Ergebnisse. Die unbehandelte Haut enthält Nitrosothiole überwiegend im Zytoplasma epidermaler Zellen als auch in der Dermis (Abbildung 3-11 B). Nach UVA-Bestrahlung (70 J/cm^2) nimmt die Konzentration der Nitrosothiole, wie anhand der Braunfärbung zu erkennen, sichtbar und stark zu (Abbildung 3-11 C). Analoge Versuche in Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NIO ($0,5 \text{ mM}$, 3 Stunden vorinkubiert) zeigen ein unverändertes Farbmuster (Abbildung 3-11 D) gegenüber der UVA-bestrahlten Haut (Abbildung 3-11 C). In Anwesenheit des NO-Scavengers cPTIO ($50 \text{ } \mu\text{M/ml}$, 3 Stunden vorinkubiert) beobachtet man nach UVA-Bestrahlung vergleichbare RSNO-Mengen wie in der

unbehandelten Haut (Abbildung 3-11 E). Des Weiteren führt die Behandlung der Haut mit einem Th1-Zytokinmix (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , je 1000 U/ml) über Nacht zu einer signifikanten Zunahme der RSNO (Abbildung 3-11 F), die jedoch durch die Vorinkubation mit L-NIO gehemmt wird (Abbildung 3-11 G).

Da die RSNO-Menge nach Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NIO und UVA-Bestrahlung vergleichbar der Menge nach UVA-Bestrahlung allein ist, kann eine NOS-Aktivität ausgeschlossen werden. Folglich müssen andere molekulare Verbindungen, wie zum Beispiel Nitrit, bei der UVA-induzierten Bildung von Nitrosothiolen eine Rolle spielen und als potentielle NO-Quellen angesehen werden.

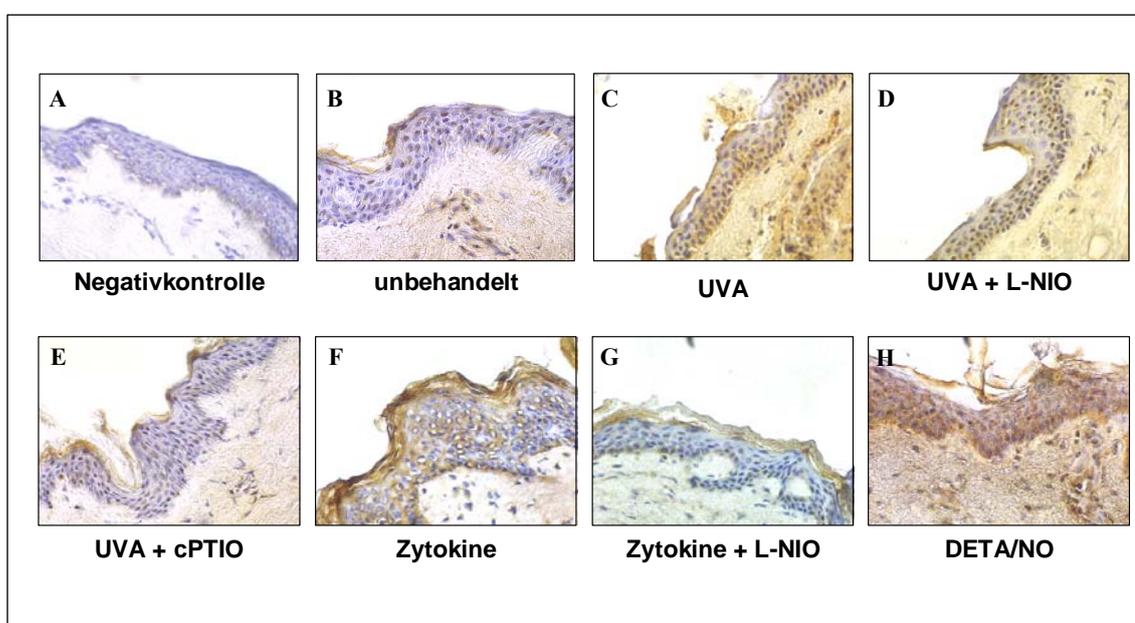


Abbildung 3-11: Immunhistochemische Analyse der S-Nitrosocysteingenerierung. Gewebeschnitte von Mammahaut wurden mit einem anti S-Nitrosocystein Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Immunglobulinfraktion aus nicht-immunisierten Kanninchen (A). UVA-Bestrahlung (70 J/cm²) führt im Vergleich zur unbehandelten Haut (B) zu einer Verstärkung der RSNO-Bildung in der gesamten Haut (C), die in Gegenwart des NOS-Inhibitors L-NIO (D) nicht erniedrigt wird. Die Zugabe des NO-Scavengers cPTIO vor UVA-Bestrahlung resultiert in einer signifikanten Abnahme der UVA-induzierten RSNO-Bildung (E) im Vergleich zur bestrahlten Haut (C). Sowohl die endogene NO-Generierung nach Zytokinstimulation (F) als auch die exogene NO-Zugabe durch DETA/NO (H) führen zu einer starken Zunahme der RSNO-Bildung. Vergrößerung: 400 \times . n=3

UVA-Strahlung dringt bis ca. 1 mm tief in die Haut ein und erreicht daher nur den oberen Teil der Dermisregion einschließlich der Epidermis. Wenn die RSNO-Bildung tatsächlich auf den Nitritzerfall in der Dermis beruht, müsste folglich ein Gradient entlang dieser Schicht zu beobachten sein. Um diese Aussage zu überprüfen wurden Hautproben mit UVA bestrahlt (70 J/cm^2) und immunhistochemisch angefärbt. In Abbildung 3-12 B, D ist zu erkennen dass sich der Grad der RSNO-Bildung mit der Eindringtiefe ins Hautgewebe verringert. Zum Vergleich, in der unbestrahlten Kontrolle ist eine gleichmässige Verteilung der S-nitrosierten Proteinen innerhalb der Dermis zu sehen (Abbildung 3-12 A, C).

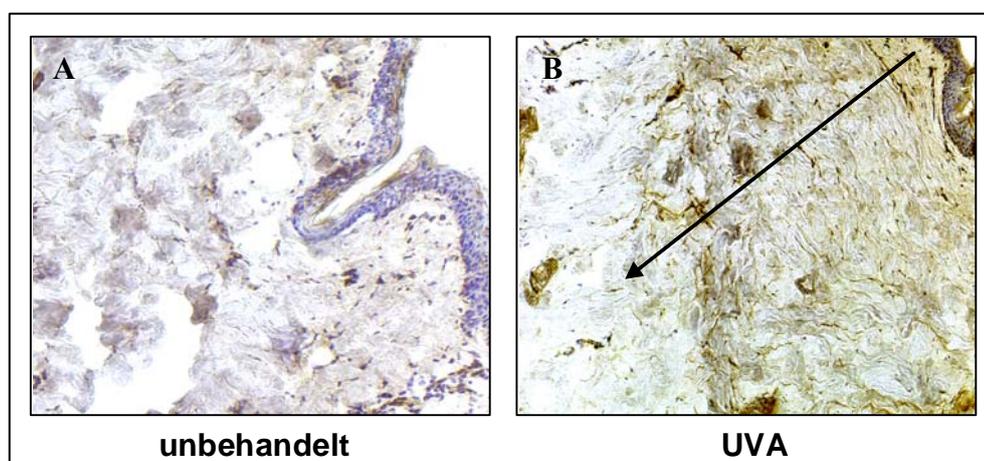


Abbildung 3-12: Immunhistochemische Analyse der UVA-induzierten RSNO Bildung. (A) Verteilung der S-Nitrosothiole in unbehandelter Haut. (B) Infolge der UVA-Bestrahlung (70 J/cm^2) bildet sich ein RSNO-Gradient aus (nimmt in Pfeilrichtung ab). Direkt unterhalb der Epidermis ist die Darstellung der S-Nitrosoverbindungen am höchsten und nimmt in den tieferen Hautschichten sichtbar ab. Vergrößerung: $100\times$. $n=3$

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die menschliche Haut erhebliche Mengen an nitrosierten Verbindungen enthält, die möglicherweise unter anderem für die Aufrechterhaltung der Hauthomöostase von Bedeutung sind. Daher sollten in den folgenden Experimenten der Mechanismus der S-Nitrosierung und die molekularen Quellen für diesen Prozess näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde humane Haut homogenisiert und in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM Nitrit mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlt. Mit Hilfe der Biotin switch Methode konnten die Ergebnisse aus der Immunhistochemie bestätigt werden. Abbildung 3-13 A zeigt, dass nur durch die Zugabe von Nitrit kein signifikanter Unterschied in der RSNO-Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Hautprobe erkennbar ist. Die UVA-Bestrahlung (30 J/cm^2) der Proben resultiert in einer signifikanten Zunahme der S-Nitrosothiole, die in

Anwesenheit von 10 mM Nitrit wesentlich stärker ausfällt. Dieses lässt sich am leichtesten anhand der HSA-Bande erkennen, die in den unbehandelten Hauthomogenaten (HH) viel schwächer ist als nach Zugabe von Nitrit und UVA-Bestrahlung (+NO₂⁻+UVA). Als Negativkontrolle für diese Bestimmung dient eine Probe, die statt mit Biotin-HPDP mit einem DMSO-Vehikel behandelt wurde (Abbildung 3-13 B). Die sichtbaren Proteinbanden repräsentieren endogen biotinylierte Proteine in der Haut und sind daher von den Proteinbanden in den biotinylierten Proben (z. Bsp. HH) zu unterscheiden. Als Positivkontrolle wurde eine Probe verwendet die mit einem kurzlebigen NO-Donor (5 mM MAMA/NO) inkubiert wurde (Abbildung 3-13 B). Diese Kontrolle wurden in allen Experimenten mitgeführt (nicht gezeigt).

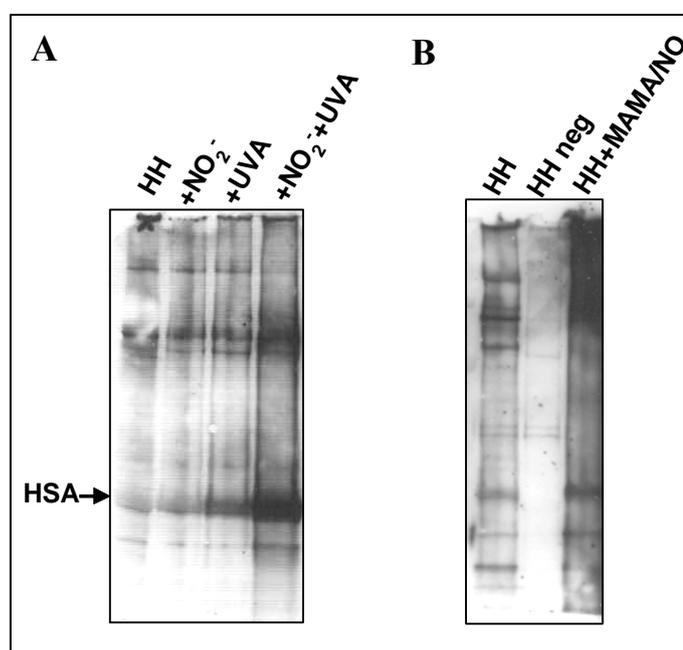


Abbildung 3-13: UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosothiolen in Hauthomogenaten. (A) S-nitrosierte Proteine aus Hauthomogenaten wurden nach Reduktion mit Ascorbat S-biotinyliert und anschließend mit Streptavidin-HRP detektiert. Unbehandelte Hauthomogenate (HH) weisen ein breites Spektrum an Nitrosothiolen auf. Die Zugabe von 10 mM Nitrit (+NO₂⁻) führt zu keiner offensichtlicher Veränderung der RSNO-Bildung im Vergleich zur Kontrolle (HH). Werden die Homogenate jedoch mit 30 J UVA bestrahlt (+UVA) so kommt es zu einem Anstieg des RSNO-Menge, die bei gleichzeitiger Inkubation mit 10 mM Nitrit (+NO₂⁻+UVA) weiter gesteigert wird. Dargestellt ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Als Negativkontrolle (HHneg) für die Biotin switch Methode dient eine Probe, die mit einem DMSO-Vehikel behandelt wurde und daher ausschließlich endogen biotinylierte Proteine enthält. Die Inkubation mit 5 mM MAMA/NO (HH+MAMA/NO) resultiert in einer Zunahme der S-Nitrosokonzentration (Positivkontrolle).

Da am HSA-Protein bereits kleine Schwankungen in der S-Nitrosokonzentration leicht sichtbar werden, wurde in weiteren Experimenten BSA als Modellprotein für die S-Nitrosierung gewählt. In Abbildung 3-14 ist die Nitrosierung von BSA in Abhängigkeit der Nitritkonzentration dargestellt. Die Ergebnisse belegen, dass bei gleichen BSA-Konzentrationen die S-Nitrosierung mit steigender Nitritkonzentration zunimmt.

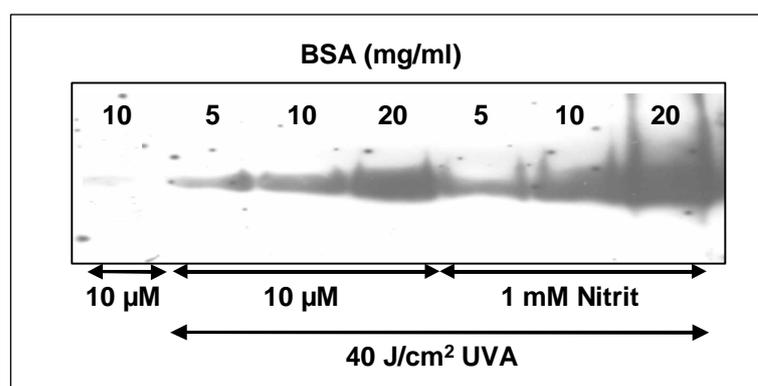


Abbildung 3-14: UVA-induzierte S-Nitrosierung von BSA. BSA wurde in Gegenwart von 10 µM bzw. 1 mM Nitrit mit 40 J UVA bestrahlt und anschließend S-biotinyliert. Als Negativkontrolle diente unbestrahltes, in einer 10 µM Nitrit-Lösung gelöstes BSA. Dargestellt sind unterschiedliche Konzentrationen an BSA, welches mit Streptavidin-HRP detektiert wurde. Die S-Nitrosierung nimmt mit steigender Nitritkonzentration zu. n=3

Um zusätzlich die S-Nitrosierungskapazität des Hautgewebes zu untersuchen, wurden Hauthomogenate in einem 1:1 bzw. 1:2 Proteinkonzentrationsverhältnis mit BSA versetzt (1HH:1BSA, 1HH:2BSA) und die Nitrosierung mittels der Biotin switch Methode bestimmt. Wie in Abbildung 3-15 zu erkennen beobachtet man nach der Bestrahlung der Proben mit 60 J/cm² UVA in beiden Fällen eine Zunahme der S-Nitrosierung. Dies führt zu dem Schluss, dass die Haut über weitere Kapazitäten zur RSNO-Bildung verfügt.

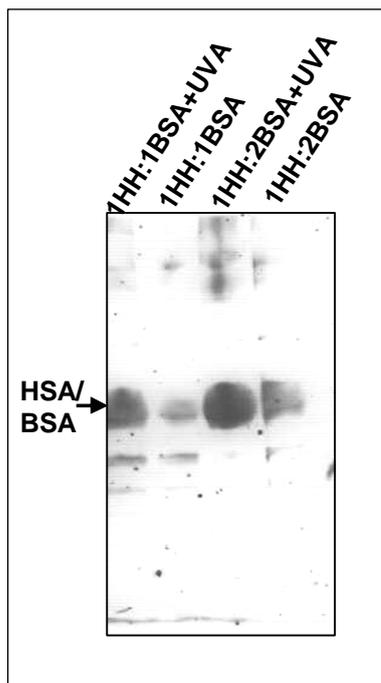


Abbildung 3-15: S-Nitrosierung von BSA nach UVA-induzierter Photolyse von NO-Metaboliten. BSA und Hauthomogenate wurden in einem Proteinkonzentrationsverhältnis von 1:1 bzw. 1:2 miteinander gemischt und mit 60 J UVA bestrahlt. Im Anschluss wurden S-nitrosierte Proteine in S-biotinylierte Proteine transformiert und mit Streptavidin-HRP sichtbar gemacht. UVA-Bestrahlung einer 1:1 Mischung (1HH:1BSA+UVA) bzw. einer 1:2 Mischung (1HH:2BSA+UVA) von Hauthomogenate und BSA führt zu einer signifikanten Zunahme an S-nitrosiertem BSA im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (1HH:1BSA und 1HH:2BSA).

3.1.7 Quantitative Bestimmung von Nitrit und Nitrosoverbindungen in Keratinozyten nach Behandlung mit Th1-Zytokinen

Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Keratinozyten relativ hohe Mengen an S-Nitrosothiolen enthalten (Abbildung 3-9). Um diese quantitativ in Keratinozyten-Lysaten zu bestimmen wurde die CLD-Methode gewählt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die über einen Zeitraum von einer Woche unter reduzierenden Bedingungen kultiviert wurden (NMA/GSH/Asc). Auf diese Weise sollte die intrazelluläre RSNO-Konzentration in den Zellen auf ein Minimum reduziert werden. Das zugesetzte Ascorbat (300 μM) diente zur Reduktion bestehender S-Nitrosothiole und zur Inhibierung der RSNO- und RNNO-Neubildung. GSH (1 mM) ist das wichtigste Antioxidants in Zellen und begünstigt den Zerfall von S-nitrosierten Proteinen. Um weiter eine RSNO-Neubildung durch die enzymatische NO-Synthese zu

verhindern, wurden die Zellen zusätzlich mit 1 mM L-NMA, einem NOS-Inhibitor, behandelt. Durch die Induktion der iNOS nach Stimulation der Keratinozyten mit proinflammatorischen Th1-Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , je 1000 U/ml) für 24 h sollte eine Steigerung der S-Nitrosierung erzielt werden (Abbildung 3-16).

In unbehandelten Keratinozyten-Lysaten (Kontrolle) konnten $1,4 \pm 0,4$ nmol Nitrit pro mg Protein gemessen werden, wogegen die Nitritkonzentration in den aktivierten Zellen $2,1 \pm 1,2$ nmol/mg betrug. Die Nitritkonzentration in den depletierten Zellen (NMA/GSH/Asc) von $2,1 \pm 0,8$ nmol Nitrit/mg Protein weist keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Die Messung der RXNO-Konzentration, d. h. der Konzentration der S- und N-nitrosierten Proteine, zeigte einen Anstieg von $0,04 \pm 0,03$ nmol pro mg Protein in der Kontrolle auf $0,1 \pm 0,01$ nmol/mg Protein nach iNOS-Aktivierung (Th1). Zum Vergleich betrug die RXNO-Konzentration in den reduzierten Proben $0,008 \pm 0,005$ nmol/mg.

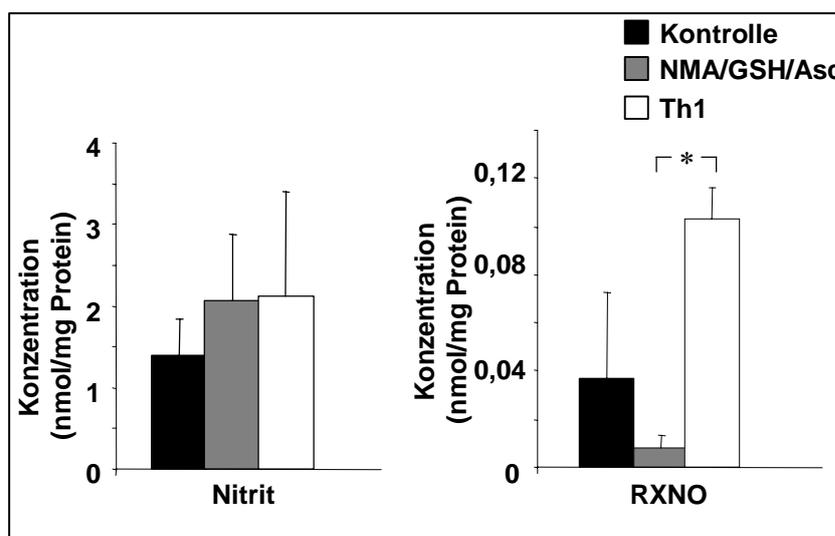


Abbildung 3-16: Quantifizierung der Stickoxide in primären Keratinozyten. Das entstandene NO wurde mittels CLD detektiert. Dargestellt sind die Konzentrationen von Nitrit und nitrosierten Verbindungen (RXNO) in unbehandelten Keratinozyten (Kontrolle), in Zellen die in Anwesenheit von 1 mM NMA + 1 mM GSH + 300 μ M Ascorbat (NMA/GSH/Asc) kultiviert wurden und in mit Th1-Zytokinen aktivierten Keratinozyten (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , je 1000 Units). n=5. *p<0,05

3.1.8 UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosoverbindungen in Keratinozyten

Analog zu den Experimenten mit Hauthomogenaten (Abbildung 3-13) wurde die S-Nitrosierung in Keratinozyten unter Anwendung der Biotin switch Methode näher charakterisiert. Anders als in der Haut zeigt sich in den Keratinozyten eine Steigerung der RSNO-Konzentration allein nach Inkubation mit 10 mM Nitrit (Abbildung 3-17 A). Im Weiteren bewirkt UVA-Bestrahlung (40 J/cm^2) eine Abnahme der RSNO-Menge und dieser Effekt wird durch Nitritzugabe nur unvollständig aufgehoben.

In analogen immunocytochemischen Untersuchungen konnten diese Unterschiede quantitativ und qualitativ nicht beobachtet und werden.

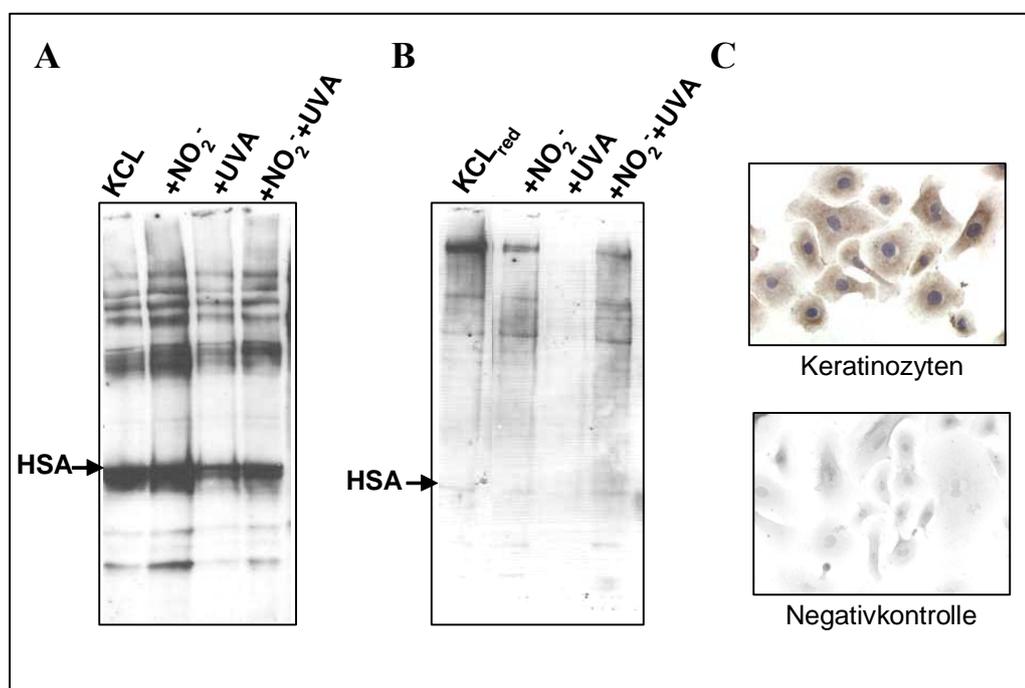


Abbildung 3-17: UVA-induzierte Bildung von S-Nitrosothiolen in primären Keratinozyten. (A)

Primäre Keratinozyten wurden in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM Nitrit mit 40 J UVA bestrahlt und anschließend lysiert. S-nitrosierte Proteine wurden mit Ascorbat reduziert und nach anschließender S-Biotinylierung mit Streptavidin-HRP nachgewiesen. Mit Nitrit inkubierte Keratinozyten ($+NO_2^-$) weisen eine signifikante Zunahme an RSNO auf verglichen mit den Kontrollzellen (KCL). UVA Bestrahlung ($+UVA$) resultiert in einer photolytischen Spaltung der RSNO Bindungen die auch in Anwesenheit von Nitrit ($+NO_2^-+UVA$) nicht vollständig wiederhergestellt werden. (B) Primäre Keratinozyten wurden über eine Woche unter reduzierenden Bedingungen und in Anwesenheit eines NOS-Inhibitors kultiviert (KCLred, 1 mM NMA + 300 μ M Ascorbat + 1 mM GSH) und im Folgenden wie beschrieben behandelt (A). Die Menge der Nitrosoverbindungen ist im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Keratinozyten (A) deutlich reduziert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Immunzytochemische Anfärbung der S-Nitrosothiolen in Keratinozyten. Vergrößerung: 400 \times

Um die RSNO-Bildung *de novo* zu untersuchen wurden Keratinozyten in Anwesenheit von 300 μM Ascorbat, 1 mM GSH und 1 mM NMA über eine Woche kultiviert und in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Nitrit mit UVA bestrahlt. Der Abbildung 3-17 B kann man entnehmen, dass die Menge der S-Nitrosoverbindungen im Vergleich zu den Kontroll-Lysaten (Abbildung 3-17 A) signifikant reduziert ist. In der Nitritprobe ist keine auffällige Änderung der S-Nitrosokonzentration erkennbar. Vergleichbar mit den unbehandelten Lysaten in Abbildung 3-17 A, kommt es nach UVA-Bestrahlung mit 40 J UVA zu einer Konzentrationsabnahme der S-Nitrosoverbindungen, die in Anwesenheit von Nitrit wieder aufgehoben wird (Abbildung 3-17 B).

Der hier beobachtete Nitriteffekt konnte im Rahmen weiterer Untersuchungen unter Verwendung der CLD bestätigt werden. So führt die Inkubation von Keratinozyten mit 5 mM Nitrit (NO_2^-) über eine Woche neben einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Nitritkonzentration von $1,8 \pm 0,03$ nmol (Kon.) auf $18,9 \pm 6,07$ nmol/mg Protein (NO_2^-) auch zu einer Steigerung der RXNO- Konzentration auf das 7fache ($0,07 \pm 0,01$ nmol/mg in NO_2^-) im Vergleich zu den unbehandelten Proben ($0,01 \pm 0,003$ nmol/mg in Kon.) (Abbildung 3-18).

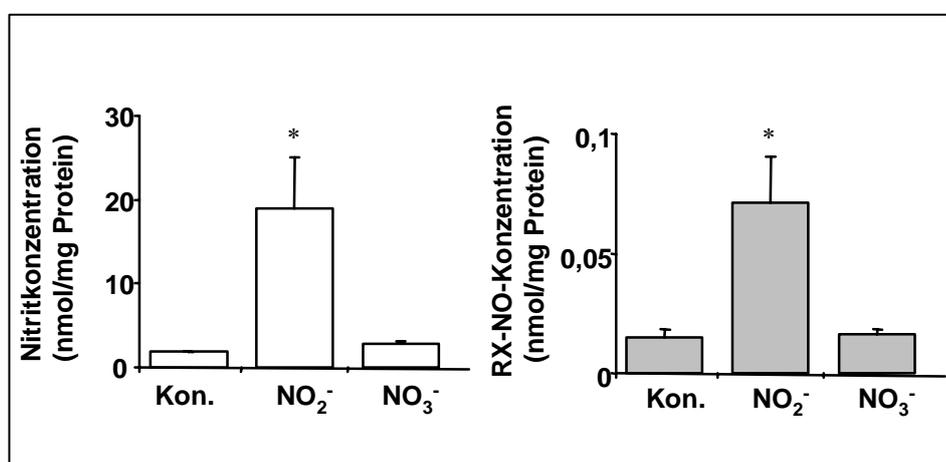


Abbildung 3-18: Quantifizierung von Nitrit und nitrosierten Verbindungen (RXNO) in Keratinozyten-Lysaten. Keratinozyten wurden über eine Woche in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO_2^-) oder 5 mM Nitrat (NO_3^-) kultiviert und anschließend die intrazellulären Nitrit- und RXNO-Konzentrationen mittels CLD bestimmt. $n=3$. * $p<0,05$ verglichen mit der Kontrolle (Kon.)

Interessanterweise hat Nitrat ähnlich wie in der Haut (Abbildung 3-10) keine Bedeutung für die Nitrosierung in Keratinozyten. Zellen in denen Nitrit durch 5 mM Nitrat (NO_3^-) substituiert wurde enthielten demnach durchschnittlich $2,77 \pm 0,38$ nmol Nitrit bzw. $0,01 \pm 0,002$ nmol RX-NO/mg Protein und somit vergleichbare Konzentrationen wie in der Kontrolle (Abbildung 3-18).

Um den Einfluss von UVA-Strahlung auf die Nitrosierung in Keratinozyten zu untersuchen und zusätzlich die Frage nach vorhandenen Parallelen zum Nitrosierungsmechanismus in der Haut zu klären, wurden primäre Keratinozyten über Nacht mit 5 mM Nitrit oder 5 mM Nitrat inkubiert und anschließend mit 30 J UVA bestrahlt (Abbildung 3-19). Die Messung der Nitritkonzentration ergab eine Zunahme von $1,03 \pm 0,41$ auf $7,47 \pm 2,84$ nmol/mg Protein nach Inkubation mit Nitrit und eine signifikante Erhöhung auf $5,7 \pm 0,4$ nmol/mg nach UVA-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle ($1,24 \pm 0,65$ nmol/mg) (Abbildung 3-19 A). Des Weiteren zeichnet sich eine 12fache Konzentrationserhöhung der RXNO-Konzentration durch die Vorbehandlung mit Nitrit aus (von $0,01 \pm 0,0007$ nmol/mg auf $0,12 \pm 0,01$ nmol/mg), die ähnlich wie in Abbildung 3-17 A nach UVA auf ca. die Hälfte abnimmt ($0,05 \pm 0,008$ nmol/mg) (Abbildung 3-19 B). Die Bestimmung der Nitrit- und RXNO-Konzentration in den Zellen die in Anwesenheit von Nitrat kultiviert wurden ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

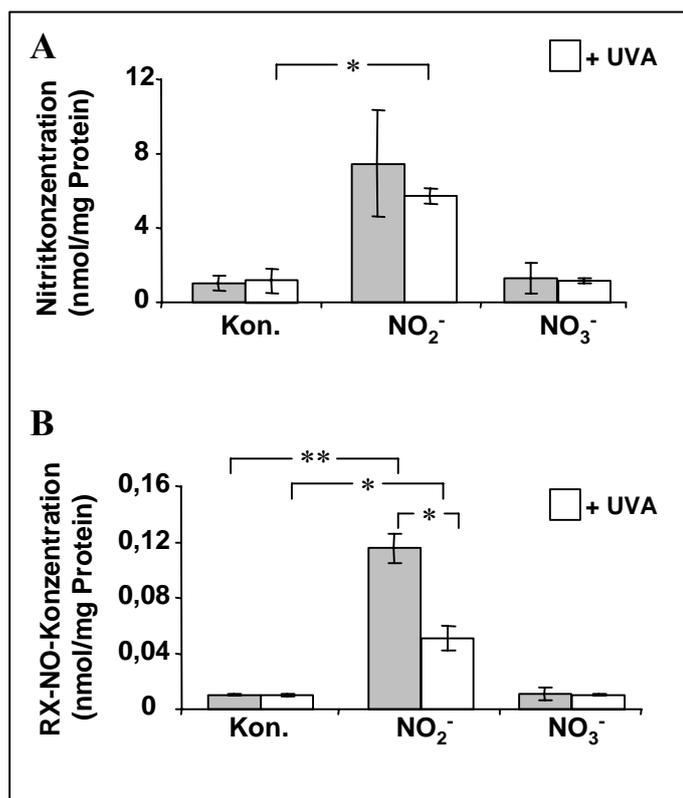


Abbildung 3-19: Quantifizierung von Nitrit und RXNO-Verbindungen nach UVA-Bestrahlung von Keratinozyten. (A) Die Inkubation mit 5 mM Nitrit (+ NO₂⁻) über Nacht resultiert in einem Anstieg der Nitritkonzentration von $1,03 \pm 0,41$ auf $7,47 \pm 2,84$ nmol/mg Protein in der unbestrahlten Probe und einer signifikanten Erhöhung von $1,24 \pm 0,65$ auf $5,7 \pm 0,4$ nmol/mg nach UVA Bestrahlung (30 J/cm^2). Wird Nitrit durch 5 mM Nitrat (+ NO₃⁻) ersetzt, so beobachtet man keinen Effekt im Vergleich zur Kontrolle. (B) Die Zugabe von Nitrit führt zu einer 12fachen Steigerung der RXNO-Konzentration von $0,01 \pm 0,0007$ nmol/mg auf $0,12 \pm 0,01$ nmol/mg in den unbestrahlten Zellen und einer signifikanten Erhöhung auf $0,05 \pm 0,008$ nmol/mg nach UVA verglichen mit der Kontrolle ($0,01 \pm 0,001$ nmol/mg). In der Negativkontrolle (NO₃⁻) konnte kein messbarer Unterschied zu den unbehandelten Zellen (Kon.) ermittelt werden. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ (t-Test).

3.2 Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der UVA-induzierten und enzymunabhängigen NO-Generierung

3.2.1 cGMP-Nachweis der biologischen Wirkung

Für die Untersuchung der biologischen Relevanz der UVA-induzierten bzw. nicht-enzymatischen NO-Bildung wurden RFL-6 Reporter-Zellen in Gegenwart von Isobutylmethylxanthin (0,6 mM) und Superoxiddismutase (SOD) (5 U/ml) mit Hauthomogenaten (2 mg Protein/ml) überschichtet und mit 10 J/cm² UVA bestrahlt. Die SOD wandelt Superoxid in Wasserstoffperoxid um und verhindert dadurch die Rekombination des Radikals mit NO. Im Weiteren verhindert das zugesetzte Isobutylmethylxanthin den intrazellulären Abbau von cGMP durch Inhibition der Phosphodiesterase. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen lysiert und der cGMP-Gehalt in den Überständen mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 3-20 wird gezeigt, dass die Inkubation der RFL-6 Kontrollzellen mit Hauthomogenaten im Dunkeln zu einem schwachen Anstieg der cGMP-Konzentration führt (von $0,5 \pm 0,2$ nM/mg auf $1,5 \pm 0,6$ nM/mg Protein), wogegen die UVA-Bestrahlung der Proben (HH+UVA) zu einer Erhöhung auf das ca. 8fache führt verglichen mit den unbehandelten Zellen (Kon.) ($7,7 \pm 0,8$ nM/mg Protein). Diese hohe Konzentration bleibt auch nach Vorbehandlung der Zellen mit NOS-Inhibitoren (0,5 mM L-NIO + 1 mM L-NMA) erhalten, wird jedoch in Anwesenheit von cPTIO (40 µM/ml) auf den Ursprungslevel reduziert. Werden die Hauthomogenate oder die RFL-6 Zellen einzeln mit UVA bestrahlt, kann keine signifikante Änderung des cGMP-Levels gemessen werden.

Daraus kann man erschließen, dass die NOS-Enzyme nicht an der UVA-induzierten NO-Bildung beteiligt sind.

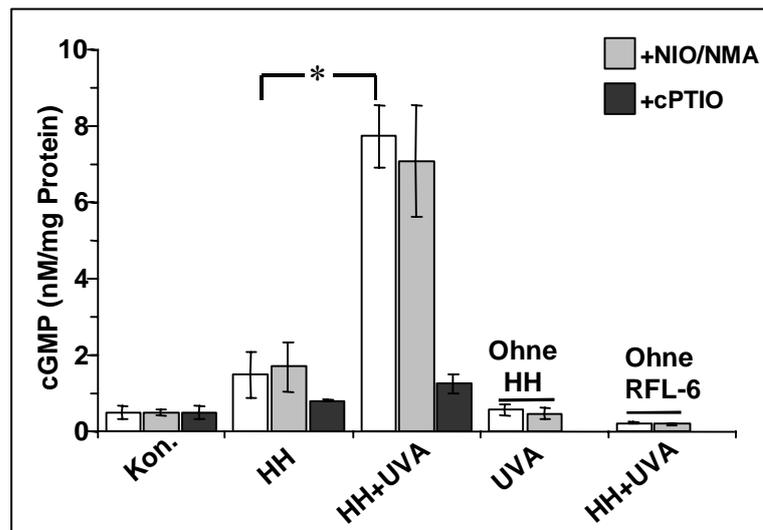


Abbildung 3-20: Nicht-enzymatisch gebildetes NO ist biologisch aktiv. 3×10^5 RFL-6 Zellen wurden für 1 Stunde mit Überständen von Hauthomogenaten (HH) inkubiert. UVA-Bestrahlung der RFL-6 Zellen in Anwesenheit von Hauthomogenaten (HH+UVA) führt zu einem starken und signifikanten Anstieg der cGMP-Synthese (weiße Balken), die durch den NO-Scavenger cPTIO unterdrückt werden kann ($40 \mu\text{M}$, schwarze Balken), jedoch nicht durch NOS-Inhibitoren ($0,5 \text{ mM}$ L-NIO+ 1 mM L-NMA, graue Balken). Zur Kontrolle wurden RFL-6 Zellen (UVA ohne HH) bzw. Hauthomogenate (HH+UVA ohne RFL-6) einzeln bestrahlt. $n=5$. $*p<0,001$

3.2.2 Nicht-enzymatisch gebildetes NO moduliert das Zellwachstum von Keratinozyten

Es ist bekannt, dass enzymatisch gebildetes NO durch Modulation der Genexpression das Zellwachstum von Keratinozyten und Fibroblasten beeinflussen kann. So fördern kleine NO-Konzentrationen das Zellwachstum von Keratinozyten während höhere Konzentrationen die Proliferation arretieren und die Zelldifferenzierung fördern (Krischel *et al.*, 1998). Daher sollte in weiteren *in vitro* Untersuchungen mit humanen Keratinozyten die biologische Funktion des nicht-enzymatisch aus Nitrit entstandenes NO auf Zellwachstum und Differenzierung aufgeklärt werden. Als Marker für das Zellwachstum wurde die Gen- und Proteinexpression von Ki-67 verwendet. Ki-67 ist ein nukleäres Protein (345 kDa und 395 kDa) dessen Funktion bislang noch nicht vollständig geklärt ist. Da es ausschließlich von proliferierenden Zellen in der G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase jedoch nicht in der G_0 -Phase exprimiert wird, ist es als Proliferationsmarker allgemein akzeptiert. Als Marker für die Zelldifferenzierung diente ebenfalls die Gen- und Proteinexpression von Involucrin, ein zytoplasmatisches Protein

(120 kDa) der epidermalen verhornten Hülle (Stratum corneum). Es wird *in vivo* nur von Zellen exprimiert, die sich nicht mehr teilen und ist allgemein als Marker für die terminale Keratinozytendifferenzierung anerkannt.

Die Untersuchungen mit quantitativer RT-PCR ergaben, dass verglichen mit der Kontrolle, die Behandlung mit Nitrit (NO_2^- ; 5 mM) zu einer signifikanten Abnahme der Ki-67- und Involucrin-Expressionsrate führt (Abbildung 3-21 A). Ferner wird die Ki-67 mRNA-Expression durch repetitive UVA-Bestrahlung (dreimal alle 24 h mit nicht toxischen UVA-Dosen (5 J/cm^2)) sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Nitrit signifikant gehemmt, wogegen die Involucrin mRNA-Expression nach diesen Behandlungen unverändert bleibt bzw. in zusätzlicher Anwesenheit von Nitrit signifikant steigt. Interessanterweise nimmt nach den genannten Behandlungen das Verhältnis der Involucrin- zur Ki-67-Expression signifikant zu. So beobachtet man nach der Inkubation mit Nitrit einen signifikanten Anstieg des Involucrin/Ki-67-Verhältnisses um das 1,3-fache, nach UVA-Bestrahlung um das 2-fache und nach Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit einen Anstieg um das ca. 5-fache (Abbildung 3-21 A).

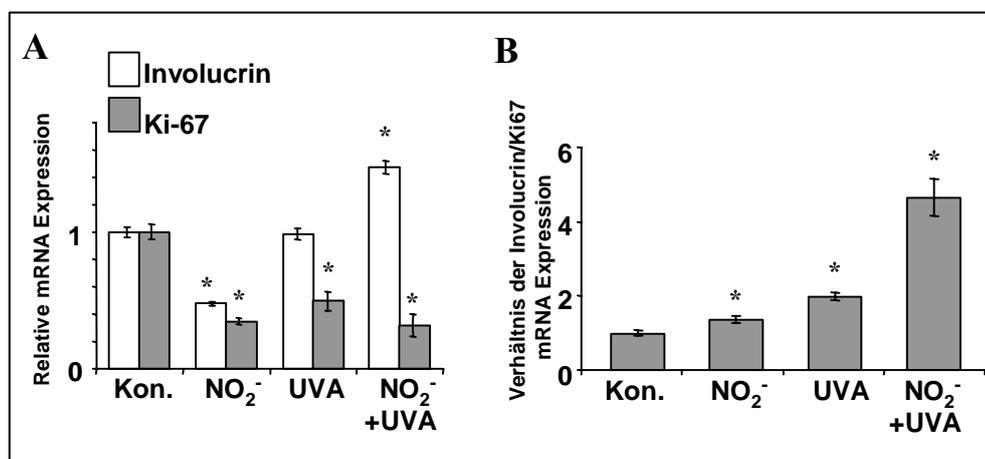


Abbildung 3-21: UVA und NO modulieren die Ki-67- und Involucrin-mRNA-Expression von humanen Keratinozyten. (A) Keratinozyten wurden in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 5 mM Nitrit für 72 Stunden inkubiert und in Intervallen von 24 h dreimal mit UVA (5 J/cm^2) bestrahlt. Anschließend wurde mittels der Real-Time PCR die Expression von Ki-67 und Involucrin bestimmt. Sowohl Nitrit, UVA als auch Nitrit + UVA führen zur Hemmung der Ki-67 mRNA-Expression. Ferner wird die Involucrin-Genexpression durch Nitrit gesenkt, durch UVA nicht beeinflusst und nach Nitrit + UVA signifikant gesteigert. * $p < 0,01$ verglichen mit der Kontrolle (Kon.). $n=3$ (B) Das Verhältnis der Involucrin- und Ki-67 mRNA-Expression nimmt nach UVA-Bestrahlung und in Anwesenheit von Nitrit signifikant zu. * $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle (Kon.) (t-Test)

UVA-Bestrahlung führt neben der nicht-enzymatischen NO-Bildung aus Nitrit auch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z. Bsp. dem Sauerstoffanionradikal oder den Hydroxylradikal. Die erstgenannte Spezies kann durch Rekombination mit dem NO-Radikal zu reaktiven Stickoxiden weiterreagieren. Intrazelluläre Antioxidantien wie GSH, Ascorbat und Vitamin E bilden einen Schutz vor oxidativen Stress indem sie freie Radikale auffangen, deren Entstehung verhindern bzw. den Abbau fördern. Wie in Abbildung 3-7 gezeigt ist GSH in der Lage die Wirkung von Nitrit zu verstärken. Somit können Antioxidantien durch die Reaktion mit Sauerstoffradikalen eine Rekombination mit NO verhindern und auf diese Weise das ROS/NO-Gleichgewicht in Richtung NO verschieben. Diese verstärkte NO-Bildung kann sich seinerseits auf das Wachstum und die Differenzierung von Keratinozyten auswirken.

Primäre Keratinozyten wurden in Anwesenheit von je 1 mM GSH, Trolox (Vitamin E Analogon) oder Ascorbat in An- oder Abwesenheit von 5 mM Nitrit inkubiert und nach 24 h mit 10 J UVA bestrahlt. Anschließend wurden die Auswirkungen dieser Behandlungen auf die Genexpression des Wachstumsmarkers Ki-67 bzw. des Differenzierungsmarkers Involucrin analysiert. Abbildung 3-23 fasst die Ergebnisse der Real-Time PCR-Analysen zusammen. Es fällt auf, dass die Ki-67 Expression als Folge der gezeigten Interventionen im Allgemeinen signifikant herunterreguliert wird. Am auffälligsten ist dabei die Suppression durch das Vitamin E-Derivat Trolox. Im Gegensatz dazu wird die Involucrin-Expression in bestrahlten sowie in unbestrahlten Kulturen insbesondere in Anwesenheit von Nitrit und /oder GSH induziert. Die stärkste Steigerung der Involucrin-Expression konnten jedoch in den mit Trolox behandelten Kulturen beobachtet werden. Unter der Annahme, dass ein hohes Verhältnis von Involucrin zu Ki-67 einen Parameter der Zelldifferenzierung und ein niedriges Verhältnis die Zellteilung favorisiert, führen Ascorbat und Trolox einzeln und in Kombination mit Nitrit zu einer Verschiebung des Zellstatus Richtung Zelldifferenzierung. UVA-Bestrahlung verstärkt diese Effekte, so steigt z. Bsp. in den mit Nitrit und Trolox behandelten Proben das Involucrin-Ki-67-Expressionsverhältnis auf das über 300-fache an.

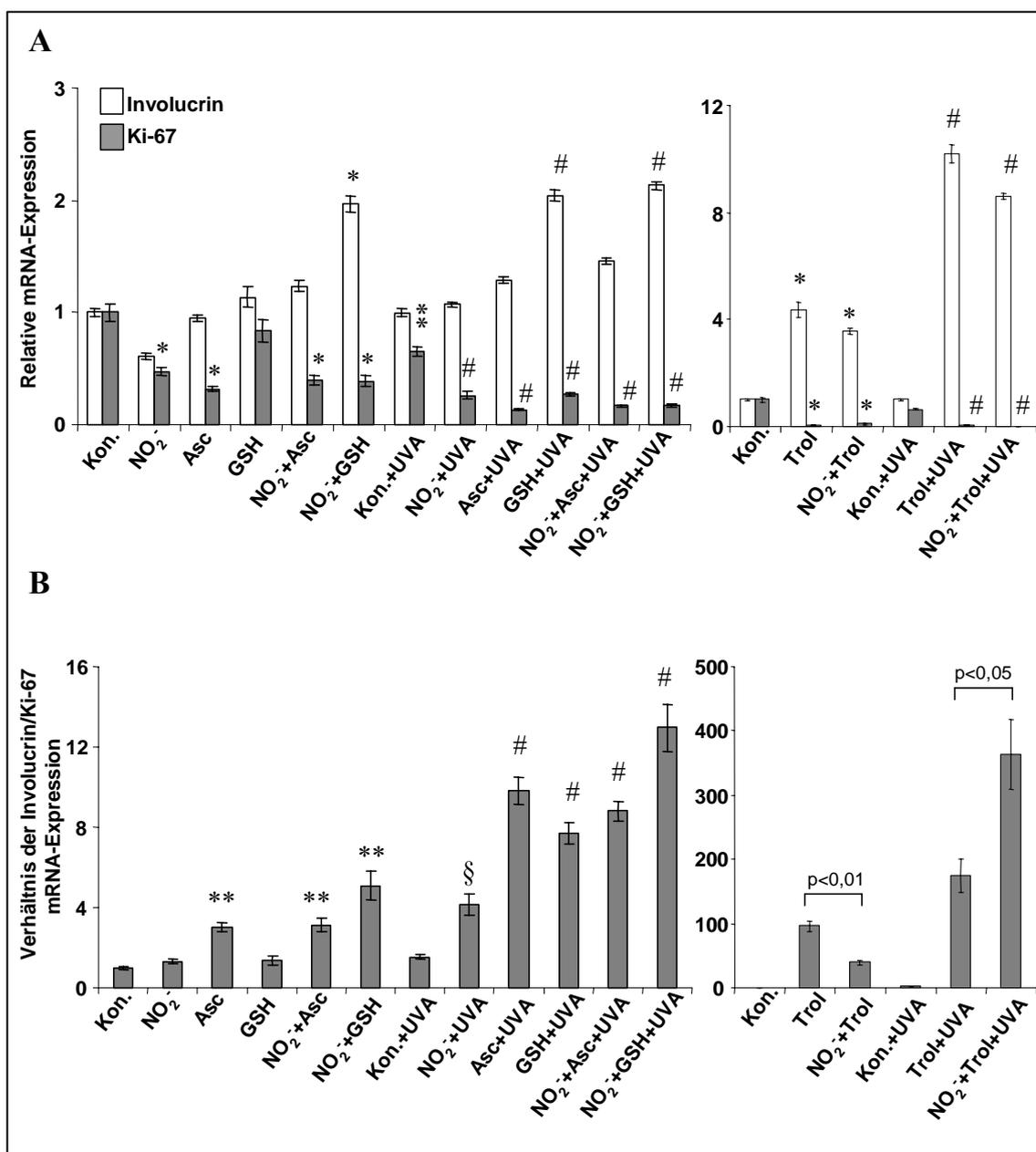


Abbildung 3-22: Einfluss von Nitrit und Antioxidantien auf das Zellwachstum. (A) 1×10^5 Keratinozyten wurden in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO₂), 1 mM Ascorbat (Asc), 1mM Trolox (Trol) und/oder 1 mM Glutathion (GSH) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss daran mit 10 J/cm² UVA bestrahlt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde die relative Genexpression von Involucrin und Ki-67 mittels Real-Time PCR bestimmt. n=3. (B) Verhältnis der Involucrin- und Ki-67-mRNA-Expression (t-Test) *p<0,001 und **p<0,01 verglichen mit der Kontrolle (Kon.), #p<0,001 und §p<0,01 verglichen mit der UVA bestrahlten Kontrolle (Kon.+UVA).

Im Weiteren wurde überprüft in wie fern die eben beschriebenen Daten der Ki-67- und Involucrin-mRNA-Expression mit dem Wachstumsverhalten von Keratinozyten korrelieren. Zur Untersuchung des Wachstums wurden primäre Keratinozyten in Anwesenheit von 5 mM Nitrit, 1 mM Glutathion (GSH), 1 mM Ascorbat oder 1 mM Trolox über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und anschließend nach definierten Zeitpunkten die Zellzahl bestimmt. In Abbildung 3-22 kann man erkennen, dass alle Antioxidantien entweder einzeln oder in Kombination mit Nitrit zu einer signifikanten Verlangsamung des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrolle führen. Im Gegensatz dazu hat Nitrit allein keinen Effekt. Werden die Zellen einmalig mit 50 J UVA bestrahlt (Abbildung 3-22 B), so beobachtet man in den mit GSH, Ascorbat und Trolox behandelten Zellen eine starke Wachstumshemmung gegenüber der Kontrolle, wobei die gleichzeitige Inkubation mit Nitrit keinen weiteren Einfluss auszuüben scheint. Werden die Zellen jedoch nur mit Nitrit inkubiert, so kann nach 72 Stunden eine signifikante Zunahme der Wachstumsrate im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt scheint die intrazelluläre NO-Konzentration so gering zu sein, dass die Proliferation bevorzugt wird.

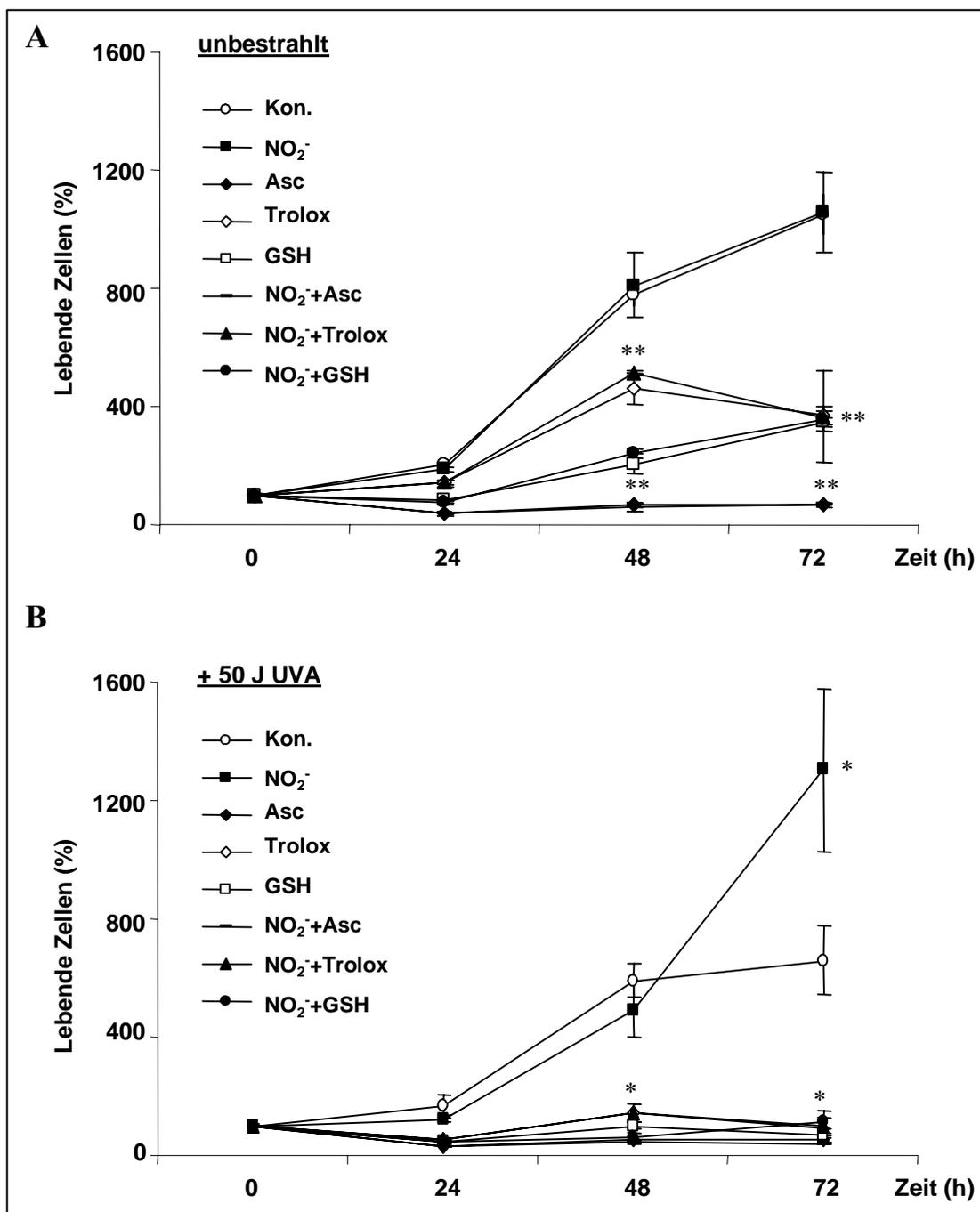


Abbildung 3-23: Einfluss von Nitrit, GSH, Ascorbat und Trolox auf das Zellwachstum. 1×10^4 Keratinozyten wurden in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO₂⁻), 1 mM Ascorbat, 1 mM Trolox (Trol) oder 1 mM Glutathion (GSH) für 24 Stunden inkubiert (A). Parallel dazu wurden Zellen zusätzlich mit 50 J/cm² UVA bestrahlt (B). Nach Zugabe von 10 % Alamar Blue und Inkubation für 2,5 h bei 37°C wurde die Fluoreszenz des reduzierten Alamar's nach definierten Zeitpunkten bei 540 nm bestimmt. Dabei korreliert die Fluoreszenz mit der Anzahl lebender Zellen. n=3. *p<0,05 und **p<0,001 verglichen mit der Kontrolle (Kon.).

Um den Einfluss von NO in den beschriebenen Experimenten zu erfassen, wurden Keratinozyten-Kulturen zusätzlich mit dem NO-Scavengermolekül cPTIO (100 μ M) behandelt (Abbildung 3-24). Dabei hat sich gezeigt, dass cPTIO in unbehandelten Keratinozyten eine starke Zunahme der Involucrin mRNA-Expression induziert. Diese korreliert zugleich mit einer signifikanten Hemmung der Ki-67-mRNA-Expression. Beide Befunde unterstützen die essentielle Rolle des endogen gebildeten NO in der Regulation von Zellwachstum und der Differenzierung.

Es ist zudem auffällig geworden, dass die oben erwähnte, durch Trolox induzierte Erhöhung der Involucrin-mRNA-Expression sowie die durch Trolox bzw. Ascorbat induzierte Erniedrigung der Ki-67-mRNA-Expression, in Anwesenheit von cPTIO nahezu vollständig aufgehoben werden kann (Abbildung 3-24). Das deutet darauf hin, dass die Wirkung von Ascorbat und Trolox NO-abhängig ist. Nach der Bildung des Quotienten der Involucrin- und Ki-67-mRNA-Expression in Anwesenheit des NO-Scavengers cPTIO beobachtet man insbesondere in den unbehandelten sowie in den mit Nitrit vorinkubierten Zellen eine starke Zunahme des Expressionsverhältnisses (Abbildung 3-25). Somit führt die Entfernung von NO in den Zellkulturen zu einem Wachstumsstopp und möglicherweise zu einer Zelldifferenzierung. Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde der Wachstumsanalyse und unterstreichen nochmals die besondere Rolle des aus Nitrit nicht-enzymatisch gebildeten NO als essentiellen Faktor der Keratinozytendifferenzierung bzw. der Keratinozytenproliferation.

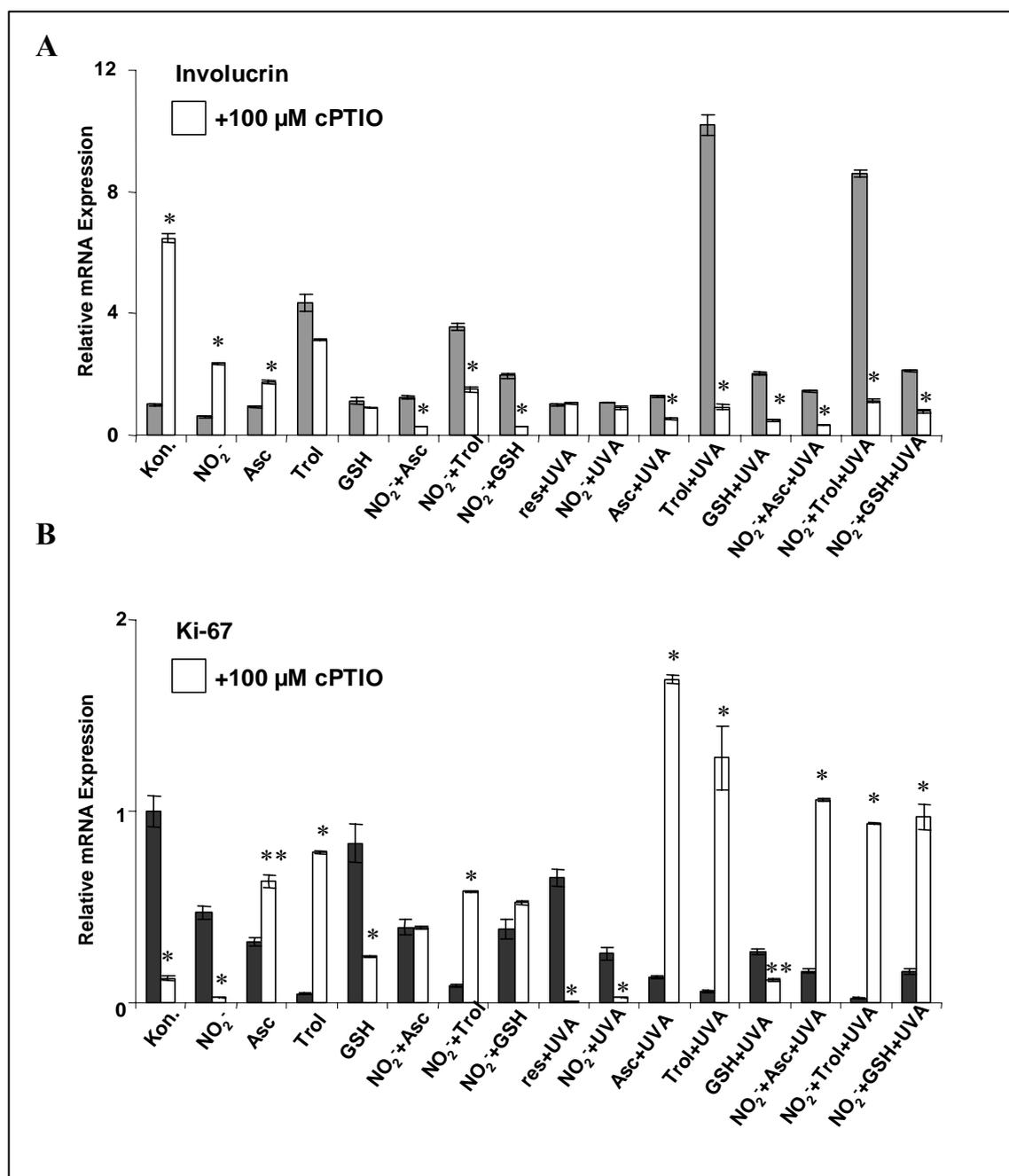


Abbildung 3-24: NO-abhängige Effekte auf Zellwachstum und -differenzierung. 1×10^5 Keratinozyten wurden in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO₂), 1 mM Ascorbat (Asc), 1mM Trolox (Trol), 1 mM Glutathion (GSH) und/oder 100 μM cPTIO für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss mit 10 J/cm² UVA bestrahlt. (A) Relative Genexpression von Involucrin. (B) Relative Genexpression von Ki-67. n=3. *p<0,001 und **p<0,01 verglichen mit der entsprechenden Probe ohne cPTIO.

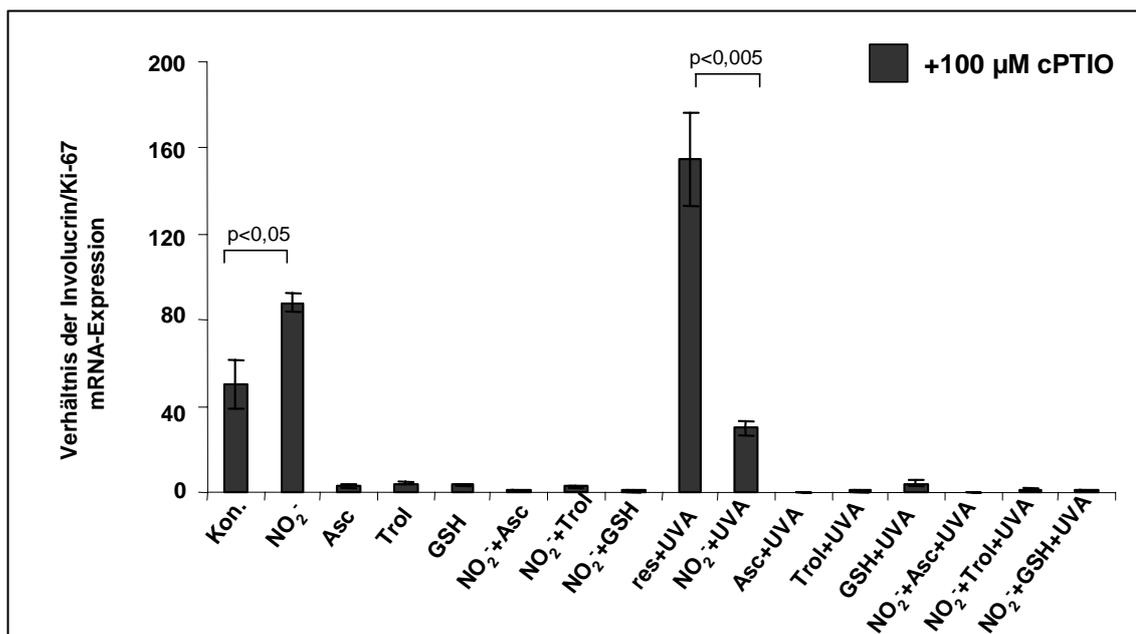


Abbildung 3-25: Verhältnis der Involucrin- und Ki-67-mRNA Expression in Anwesenheit von cPTIO.

Es ist bekannt, dass *in vivo* ein komplexes Zusammenspiel zwischen den einzelnen Antioxidantien erfolgt. Für die vorliegende Arbeit war es daher von Interesse zu erfahren, wie sich die Kombination aus Ascorbat und Trolox auf die Genexpression der Wachstums- und Differenzierungsmarker auswirkt. Man weißt zum Beispiel, dass Ascorbat das Tocopheroxyl-Radikal „recyclen“ kann und somit zur Regeneration von Tocopherol beiträgt (Young & Woodside, 2001). Aus Abbildung 3-26 A wird ersichtlich, dass UVA-Bestrahlung von Zellen, die mit Ascorbat und Trolox vorinkubiert wurden zu einer signifikanten Steigerung der Involucrin-Expression im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrolle führt. Interessanterweise führt die zusätzliche Behandlung mit 5 mM Nitrit zu einer ca. 20-fachen Zunahme von Involucrin verglichen mit der bestrahlten Kontrolle und einer ca. 3-fachen Steigerung im Vergleich zu den analog behandelten, unbestrahlten Zellen. Aus dem Verhältnis der Involucrin und Ki-67 Expression geht hervor, dass die Kombination aus Ascorbat und Trolox einen antiproliferativen Signalweg induziert, der in Anwesenheit von Nitrit zusätzlich verstärkt wird (Abbildung 3-28 B). Zusammenfassend führt die Kombination von Trolox, Ascorbat und Nitrit zu einer Erhöhung des Involucrin- und Ki-67-mRNA Verhältnisses und so möglicherweise zu einer verstärkten Differenzierung. Da das

Verhältnis dieser Genexpression durch Nitrit beeinflusst wird könnte der beobachtete Effekt mit einer Zunahme der NO-Konzentration zusammenhängen.

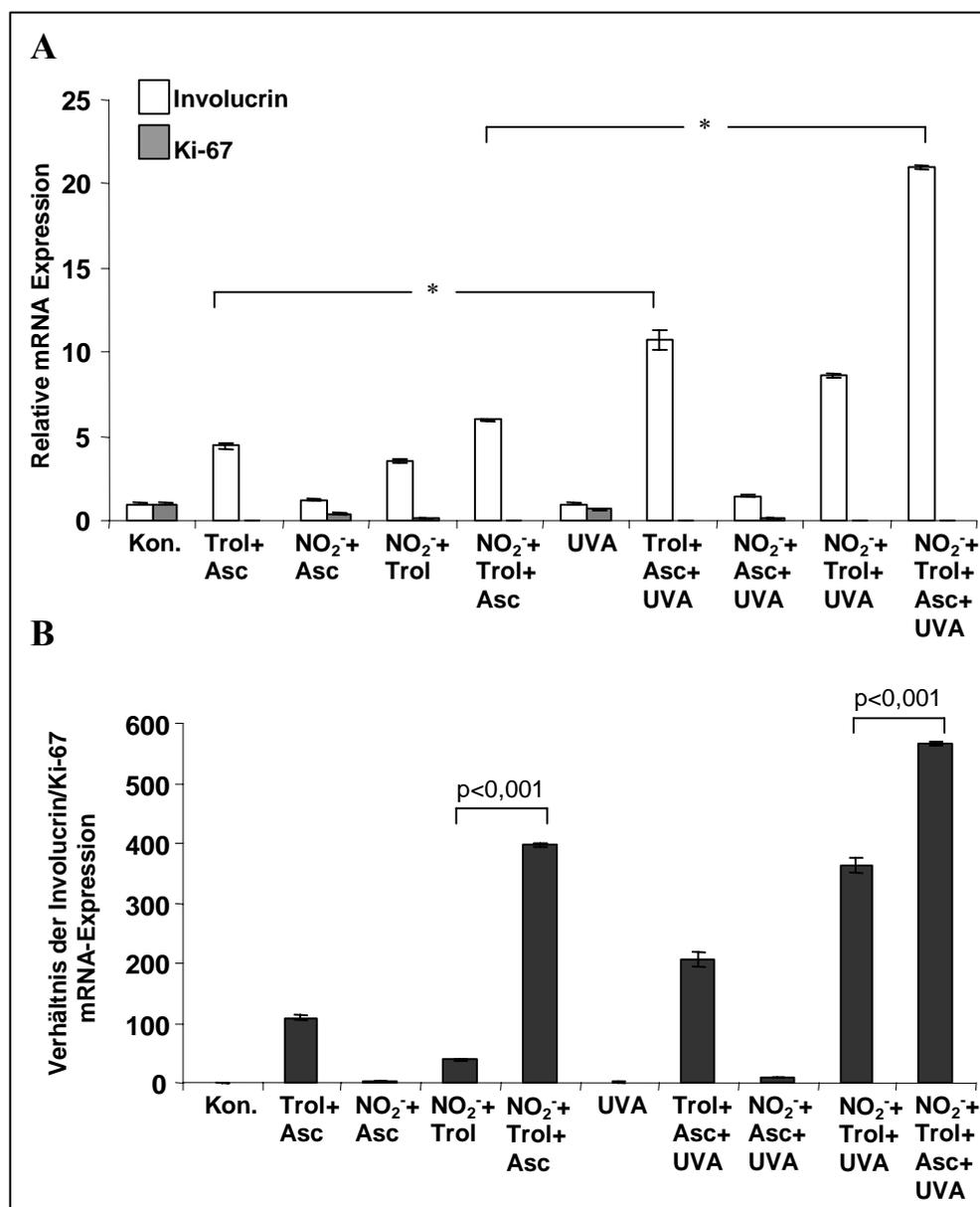


Abbildung 3-26: Einfluss von Antioxidantien und Nitrit auf das Zellwachstum. (A) Nitrit führt nach UVA-Bestrahlung (10 J/cm^2) und in Anwesenheit von Trolox + Ascorbat ($\text{NO}_2^- + \text{Trol} + \text{Asc} + \text{UVA}$) zu einer ca. 20-fachen Involucrin-Expression, die im Vergleich zu der unbestrahlten Probe ($\text{NO}_2^- + \text{Trol} + \text{Asc}$) auf das 3,6 fache erhöht ist. (B) Verhältnis der Involucrin- und Ki-67-mRNA-Expression. $n=3$. $*p<0,05$

Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollte das Expressionsmuster von Involucrin und Ki-67 auf Proteinebene analysiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Proteinexpression nicht parallel mit der mRNA-Expression verläuft.

So wird die Involucrin mRNA-Expression durch Trolox generell stark induziert wird, die Proteinkonzentration jedoch nimmt lediglich nach UVA-Bestrahlung und in Anwesenheit von Nitrit signifikant zu (Abbildung 3-27). Zusätzlich zeichnet sich eine Erhöhung nach Zugabe von Trolox und UVA ab.

Die immunzytochemische Detektion des nukleären Proteins Ki-67 ergab in Übereinstimmung mit den Wachstumskurven in Abbildung 3-22, dass Nitrit die Proliferation nicht beeinflusst (Abbildung 3-28), wie an der braunen Kernfärbung erkennbar. Andererseits wird die Ki-67 Menge sowohl durch Ascorbat- als auch Trolox-Behandlung sichtbar herabgesetzt, wobei Trolox erneut den stärksten Effekt ausübt. Analoge Färbungen nach Behandlung der Zellen mit 1 mM GSH zeigten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (nicht gezeigt). UVA-Bestrahlung der Zellen führt ferner zu einer zusätzlichen Abnahme der Ki-67-Proteinmenge nach Behandlung mit Antioxidantien und zusätzlich zu einer schwächeren Färbung in der Kontrolle.

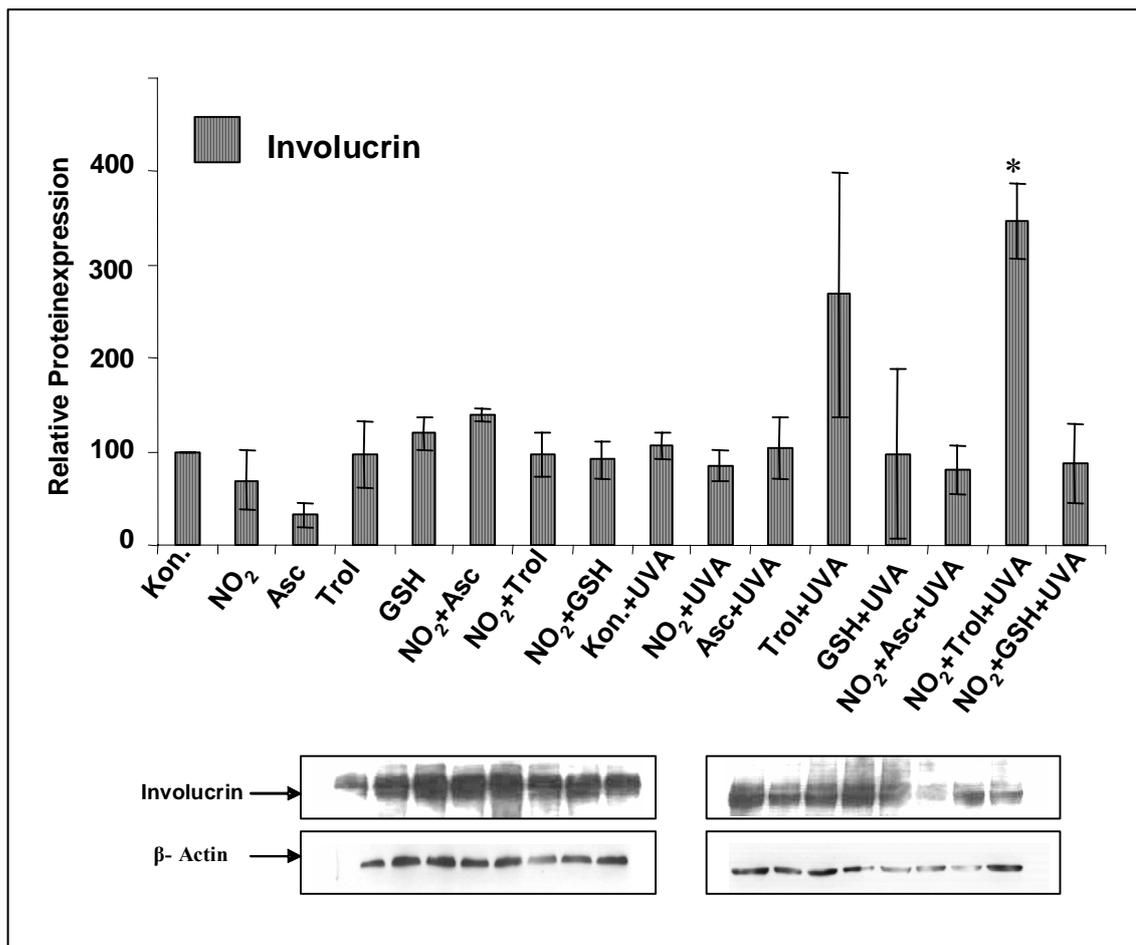


Abbildung 3-27: Relative Proteinexpression von Involucrin 1×10^5 Keratinozyten wurden in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO₂⁻), 1 mM Ascorbat (Asc), 1mM Trolox (Trolox) und 1 mM Glutathion (GSH) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss mit 10 J/cm² UVA bestrahlt. Es wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen. Aufgeführt ist ein exemplarischer Western blot gegen Involucrin und β-Actin aus drei unabhängigen Experimenten. *p<0,05. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm Kodak Digital Science-1D.

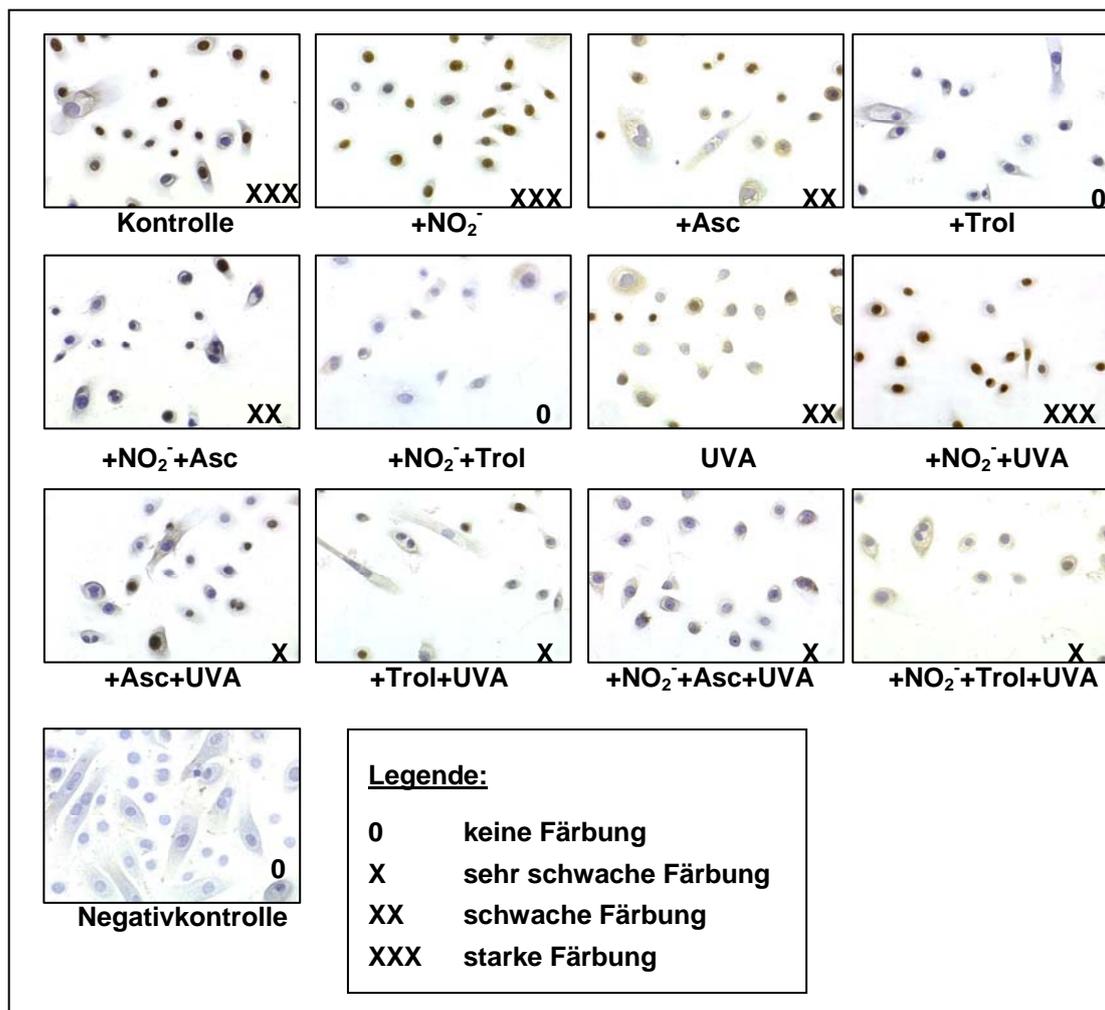


Abbildung 3-28: Immunzytochemische Anfärbung von Ki-67 in Keratinozyten. 5×10^4 Keratinozyten wurden in Anwesenheit von 5 mM Nitrit (NO_2^-), 1 mM Ascorbat (Asc), 1 mM Trolox (Trol) und 1 mM Glutathion (GSH) für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss mit 10 J/cm^2 UVA bestrahlt. Nach 24 h wurde Ki-67 mit einem monoklonalen anti Ki-67 Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Vergrößerung: 400 \times

3.2.3 Nicht-enzymatisch gebildetes NO moduliert die Expression proinflammatorischer Zytokine in Keratinozyten

Es ist bekannt, dass NO an der Modifikation immunologischer Regulationsmechanismen beteiligt ist. In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss von Nitrit allein oder in Kombination mit GSH bzw. Ascorbat auf die Expression proinflammatorischer Zytokine ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Kulturen von primären Keratinozyten mit 5 mM Nitrit, je 1 mM Ascorbat und GSH behandelt

und parallel mit 10 J/cm^2 UVA bestrahlt. Die Expressionsmuster von Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-8, IL-6 und Cyclooxygenase-2 (COX-2) wurden mittels Real-Time PCR bestimmt (Abbildung 3-29).

Das IL-1, welches von Keratinozyten konstitutiv gebildet wird, kann die Expression verschiedener Zytokine und Enzyme induzieren, wodurch z. Bsp. die Prostaglandin- und NO-Synthese signifikant erhöht wird. Gemeinsam mit IL-6 moduliert IL-1 die spezifische Immunantwort von B- und T-Zellen. Das IL-8 ist insbesondere für seine chemotaktische Wirkung bekannt und leitet die Ansammlung von Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen ein. Der TNF- α ist ähnlich wie IL-1 β ein früher Mediator der Entzündungsreaktion und trägt unter anderem durch Induktion der COX-2 zur verstärkten Prostaglandin-Produktion im entzündeten Gewebe bei.

Abbildung 3-29 zeigt, dass Ascorbat allein die Expression von IL-6 und TNF- α induzieren kann. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Nitrit führt zu einer signifikanten Zunahme der IL-8, IL-1 β , COX-2 und TNF- α -mRNA-Expression. Während Nitrit zur Erhöhung der IL-8 und COX-2 mRNA Menge führt scheint GSH allein keine Auswirkungen auf die Zytokinexpression zu haben. UVA-Bestrahlung der Zellen bewirkt eine verstärkte Expression der IL-8, COX-2 und TNF- α Gene und wird daher mit einer verstärkten Prostaglandinsynthese in Verbindung gebracht. Während Nitrit bzw. Ascorbat alleine lediglich die COX-2 Expression beeinflussen, führt die Kombination aus beiden zusätzlich zu Erhöhung des IL-6 mRNA-Levels. Interessanterweise beobachtet man nach UVA eine zusätzliche Induktion von IL-8 und IL-1 β durch Nitrit + GSH. IL-8 und IL-1 β scheinen in der Gesamtbetrachtung ähnlichen Regulationsmechanismen zu unterliegen da beide nach Behandlung der Zellen mit Nitrit und Ascorbat bzw. Nitrit + GSH und nachfolgende UVA-Bestrahlung verstärkt exprimiert werden. Da man zusätzlich sowohl im Falle von COX-2 als auch von IL-6 eine Zunahme der Genexpression nach Behandlung der Zellen mit Nitrit, GSH und UVA beobachten kann, scheint die Wirkung von Nitrit sowohl durch GSH als auch durch Ascorbat gesteigert werden zu können.

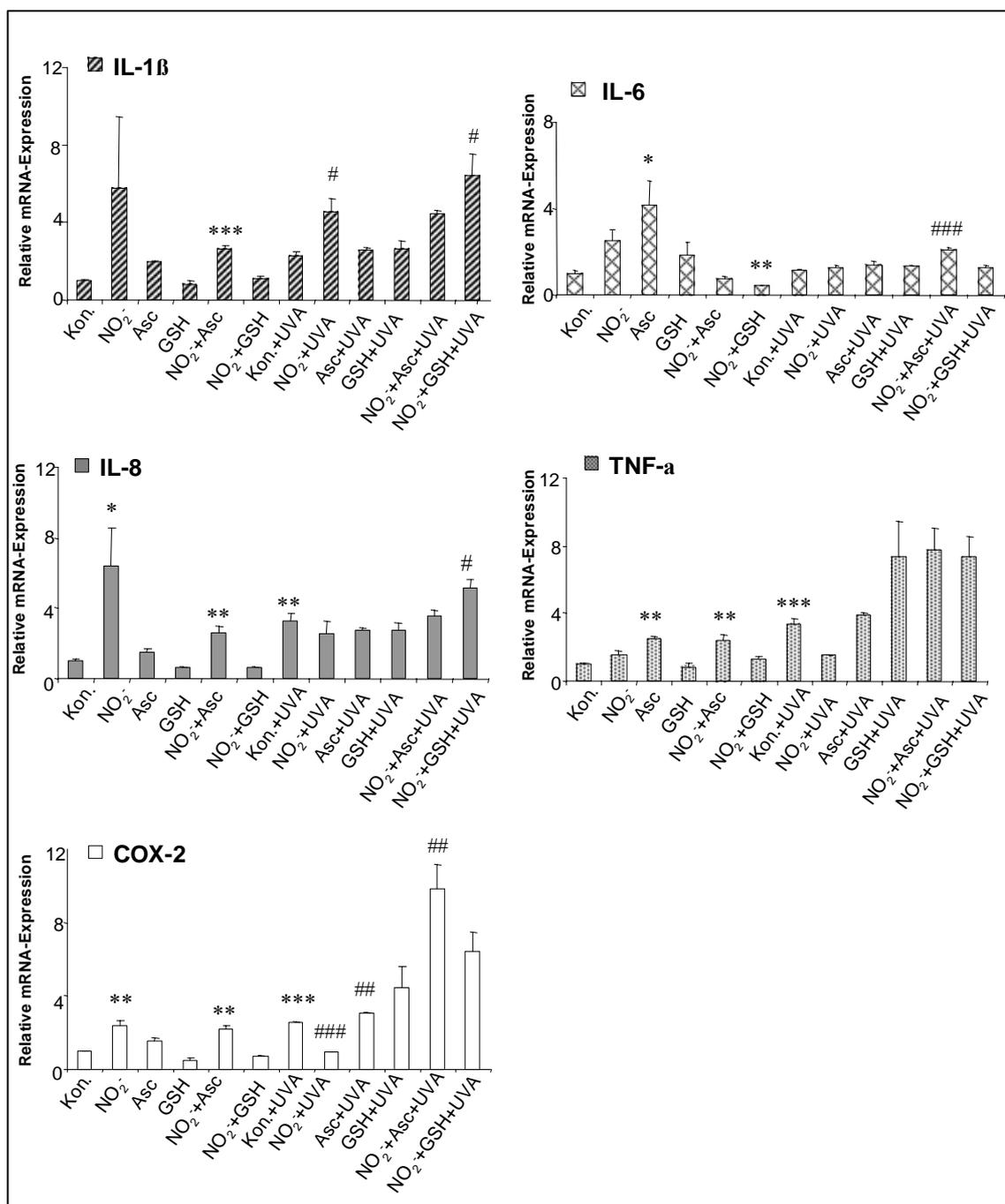


Abbildung 3-29: Modulation der Genexpression proinflammatorischer Mediatoren durch Nitrit, Antioxidantien und UVA. Inkubation von primären Keratinozyten mit 5 mM Nitrit (NO₂⁻) und 1 mM Ascorbat (Asc) bzw. 1 mM Glutathion (GSH) führt nach UVA-Bestrahlung (10 J/cm²) in den meisten Fällen zu einer signifikanten Induktion proinflammatorischer Zytokine. n=3. *p<0,05 und **p<0,01 und ***p<0,001 verglichen mit der Kontrolle (Kon.); #p<0,05 und ##p<0,01 und ###p<0,001 verglichen mit der UVA-bestrahlten Kontrolle (Kon.+UVA)

4 Diskussion

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Regulator zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge und wird von nahezu allen Zelltypen synthetisiert (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998; Kröncke *et al.* 2001). Seit über 10 Jahren ist bekannt, dass das NO-Molekül auch in der Haut eine unerlässliche Rolle spielt und von allen Zelltypen entweder durch die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen (eNOS, nNOS) oder durch die induzierbare NOS (iNOS) gebildet werden kann. NO ist beispielsweise bei allergischen Reaktionen, bei der unspezifischen Immunabwehr, bei der Antigenpräsentation, beim Haarwachstum, im Kollagenstoffwechsel sowie bei der Steuerung der Melanogenese beteiligt (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998). Ferner ist es in der Modulation der Hautdurchblutung, des Zellwachstums und Differenzierung (Krischel *et al.*, 1998) involviert. Zusätzlich ist NO ein effektiver Inhibitor der Lipidperoxidation und besitzt daher protektive Eigenschaften gegen UVA- und ROS-induzierten Zelltod. In Keratinozyten von gesunden als auch von psoriatischen Patienten bewirkt NO eine signifikante Abnahme der mRNA- und Proteinexpression von IP-10, RANTES und MCP-1 und führt zudem zur Aktivitätsblockade von NF- κ B und STAT-1, wodurch NO auch als ein negativer Regulator der kutanen Chemokinproduktion betrachtet wird (Giustizieri *et al.*, 2002).

4.1 UVA-induzierte NO-Bildung und Charakterisierung der Stickoxide in der menschlichen Haut

Jeder Hautzelltyp ist in der Lage durch mindestens eine der drei bekannten NO-Synthasen NO zu erzeugen. Ein Teil des enzymatisch gebildeten NO verbleibt innerhalb des Hautgewebes und kann nach Bindung an reduzierte Thiole oder Amine zur Bildung von S-Nitrosothiolen bzw. N-Nitrosaminen führen. Zusätzlich können nach Reaktion von NO mit Sauerstoff Nitrit und Nitrat entstehen. Diese Informationen waren vor Beginn dieser Arbeit insofern von großer Bedeutung, als bekannt war, dass all diese

Verbindungen unter dem Einfluss von Licht zerfallen und NO freisetzen können (Feelisch & Stamler, 1996). Dieser Mechanismus könnte somit auch für die Hautphysiologie von großer Bedeutung sein. Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich daher die Frage wie viel von den erwähnten Reaktions- bzw. Oxidationsprodukten des NO in der Haut verbleiben, ob sie unter dem Einfluss von UVA-Strahlung tatsächlich zerfallen können und ob sie eine biologische Funktion haben.

Bei der Analyse der unterschiedlichen Metabolite des NO-Stoffwechsels konnte hier erstmals festgestellt werden, dass Nitrit, Nitrat, S-Nitrosothiole und N-Nitrosamine in sehr hohen Konzentrationen in der gesunden humanen Haut vorzufinden sind. So liegen die Konzentrationen von Nitrit ca. 25-fach, von Nitrat 6-fach und von S- und N-Nitrosoverbindungen 370- bzw. 40-fach höher als im Blutserum gesunder Probanden. Somit repräsentiert die menschliche Haut mit einem Volumen von 10-20 Liter einen immensen Speicher für NO-Derivate. Dabei macht Nitrat, das eine potentielle Quelle für Nitrit repräsentiert den größten Anteil der gemessenen NO-Metabolite aus. Weller *et al.* konnten zeigen, dass Nitrat auf der Hautoberfläche durch die bakterielle Nitrat-Reduktase zu Nitrit und im Weiteren zu NO reduziert werden kann. Diese nicht-enzymatische NO-Bildung spielt wahrscheinlich eine physiologische Rolle bei der Inhibition mikrobieller Hautinfektionen (Weller *et al.*, 1996).

Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch in der anatomisch intakten menschlichen Haut UVA-Strahlung zur Photolyse der oben genannten NO-Metabolite und dadurch zu einer enzymunabhängigen Freisetzung von bioaktiven NO führen kann. Bereits bei niedrigen, umweltrelevanten UVA-Dosen können NO-Mengen gemessen werden, die mit den Konzentrationen an enzymatisch gebildetem NO vergleichbar sind. Die Maximalwerte dieser nicht-enzymatischen NO-Freisetzung aus der menschlichen Haut wurden schließlich bei einer UVA-Dosis von 40 J/cm² beobachtet, was einer ca. 3-stündigen Sonnenexposition im mitteleuropäischen Sommer entspricht. Dieses Maximum der beobachteten NO-Freisetzung entspricht Konzentrationen, die eine iNOS-abhängige NO-Produktion von optimal aktivierten Keratinozyten *in vitro* um ein Vielfaches übersteigt (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003). Somit kann die UV-induzierte nicht-enzymatische NO-Entstehung analog zu der NO-Synthese an physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt sein.

Die iNOS erreicht erst 16-24 h nach erfolgter Aktivierung durch UV-Strahlung ihr Expressions- bzw. Aktivitätsmaximum. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die iNOS an der UVA-induzierten NO-Freisetzung beteiligt ist. Um dennoch den Einfluss von NO-Synthasen auszuschließen wurden Bestrahlungsversuche in Anwesenheit von NOS-Inhibitoren durchgeführt. In diesem Fall konnten vergleichbare NO-Mengen wie in den unbehandelten Proben detektiert werden. Folglich muss das nicht-enzymatisch gebildete NO aus den oben erwähnten Oxidations- bzw. Nitrosoverbindungen stammen.

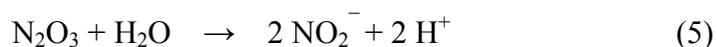
Als nächstes sollte geklärt werden, welche Metabolite an der UVA-induzierten, nicht-enzymatischen NO-Bildung beteiligt sind. Durch selektive Eliminierung einzelner NO-Derivate konnte zudem untersucht werden, in welchem Ausmaß die verschiedenen NO-Metabolite an der Gesamtproduktion beteiligt sind. Nach der selektiven Entfernung von S-nitrosierten Verbindungen und Nitrit wurde deutlich, dass sowohl Nitrat als auch Quecksilber-stabile Verbindungen, wie z. Bsp. RNNO, unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht gespalten werden und somit nicht zur UVA-induzierten NO-Freisetzung beitragen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer überein, die aufzeigen, dass RSNO die höchste Photoaktivität *in vitro* aufweisen, gefolgt von Nitrit, jedoch nicht Nitrat (Rodriguez *et al.*, 2002). Es gibt jedoch auch widersprüchliche Befunde, die zeigen, dass N-Nitrosamine und Nitrat eine hohe Photoaktivität haben und unter UVA-Einfluss unter NO-Freisetzung zerfallen können (Rodriguez *et al.*, 2002; Dejam *et al.*, 2003). Diese Diskrepanz rührt sehr wahrscheinlich von den Unterschieden in der Versuchsdurchführung, den verwendeten UV-Quellen und den verschiedenen untersuchten Geweben her. Allgemein belegen jedoch alle diese Arbeiten, dass alle oben erwähnten Produkte des NO-Metabolismus potentielle NO-Speicherformen repräsentieren. Ob und in welchem Ausmaß ein NO-Metabolit zerfällt, lässt sich jedoch nicht verallgemeinert vorhersagen. Dieses scheint wie bereits erwähnt, sowohl von den experimentellen Bedingungen als auch vom emittierten Spektrum der UV-Quellen abzuhängen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen unter Zuhilfenahme der sequentiellen Depletierung einzelner NO-Derivate zeigen ferner, dass S-Nitrosothiole unter dem Zufluss von UVA sehr schnell zerfallen und zu einer hohen jedoch sehr kurzen NO-Freisetzung beitragen. Im Gegensatz dazu trägt der photoinduzierte Zerfall von Nitrit zur vergleichsweise niedrigen, jedoch konstanten und langanhaltenden NO-Generierung

bei. Überraschenderweise konnte die UVA-induzierte NO-Generierung aus Nitrit in Anwesenheit reduzierter Thiole um ein Mehrfaches gesteigert werden. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch *in vitro* Experimente bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, dass die UVA-induzierte NO-Freisetzung aus Nitrit durch GSH bis zu ca. 30-fach verstärkt werden kann. Diese Beobachtung wird auch durch die gefundene Korrelation zwischen der Nitrit- bzw. Thiolkonzentration in der Haut und der Menge des freigesetzten NO während UVA-Einstrahlung gestützt. So wurde hier beobachtet, dass die durch UVA induzierte NO-Generierung einer Hautprobe positiv mit dem Gehalt der reduzierten Thiole korreliert. Da in der menschlichen Haut das Thiol-Nitrit-Verhältnis über 400 liegt, liegt es nahe anzunehmen, dass die NO-Freisetzung aus Nitrit immer maximal sein wird. Andererseits ist noch vollkommen unbekannt, ob hochmolekulare oder niedermolekulare Thiole unterschiedlich wirken oder dieselbe Kapazität zur Erhöhung der NO-Freisetzung während des UVA-induzierten NO-Zerfalls besitzen.

GSH, welches mit einer intrazellulären Konzentration von bis zu 10 mM das wichtigste intrazelluläre Antioxidant repräsentiert (Wu *et al.*, 2004), macht den größten Teil der freien, nicht Protein-gebundenen Thiolen aus. So ist es wahrscheinlich, dass GSH eine langanhaltende und hohe NO-Bildung während UV-Einstrahlung gewährt.

Wie die Thiole die NO-Freisetzung aus Nitrit verstärken könnten, soll anhand des unten dargestellten Mechanismus der Nitritphotolyse erläutert werden. UVA-Bestrahlung einer Nitritlösung führt neben der Bildung von NO auch zur Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI), wie dem Sauerstoffanionradikal und dem Hydroxylradikal bzw. reaktiver Stickoxid-Intermediate (RNOI).



Wie deutlich zu erkennen ist, wird in Reaktion (4) das gebildete NO durch die Bindung an das NO₂-Radikal konsumiert. Andererseits können reduzierte Thiole oder antioxidative Verbindungen die beim UV-induzierten Nitrit-Zerfall gebildeten freien Radikale abfangen und auf diese Weise die NO₂-Menge herabsetzen. Ferner kann das NO₂-Radikal auch durch Thiolationen zu Nitrit (6) reduziert werden. Auf diese Weise wird der Verbrauch von NO verhindert und die NO-Konzentration, die während der Nitritphotolyse freigesetzt wird erhöht.



Die dabei gebildeten Thiyl-Radikale rekombinieren aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit NO unter Bildung neuer S-nitrosierter Verbindungen (7).



Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von S-Nitrosothiolen ist die Nitrosierung durch N₂O₃ (8).



Da die RSNO selbst stark photoaktiv sind führt deren UVA-induzierten Zerfall zur Freisetzung von NO (9).



Bisher konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass photolabile Verbindungen im kutanen Gewebe durch UVA-Bestrahlung unter Freisetzung von NO zerfallen. Mit der angewandten CLD-Methode kann jedoch nur NO detektiert werden, welches während der UVA-Bestrahlung aus der Haut freigesetzt wird. Als nächstes sollte untersucht werden, ob UVA auch zu einer intrazellulären nicht-enzymatischen Bildung von NO führt und wenn ja, ob dieses NO möglicherweise biologisch wirksam ist. Die intrazelluläre NO-Entstehung lässt sich anhand der Verteilung S-nitrosierter Verbindungen in der Haut bestimmen, die u. a. immunhistochemisch nachgewiesen werden können. In unbehandelter menschlicher Haut finden wir die RSNO-Verbindungen verstärkt in der Epidermis, insbesondere in der Basalschicht. Daher kann man vermuten, dass die NOS-abhängige endogene NO-Produktion für die Bildung S-nitrosierter Verbindungen von Bedeutung ist. NO wird in den Keratinozyten unter physiologischen Bedingungen durch die nNOS und in hohen

Konzentrationen nach Induktion mit proinflammatorischen Stimuli wie Th1-Zytokine durch die iNOS synthetisiert (Bruch-Gerharz *et al.*, 2003). Für die Entstehung von RSNO als Folge der endogenen NO-Synthese spricht, dass Th1-Zytokine zu einer erhöhten NO-Produktion und verstärkten Bildung von S-Nitrosothiolen in Keratinozyten führen. Wird die NOS durch den Inhibitor L-NIO gehemmt, so beobachtet man eine Reduktion der RSNO-Menge. Zusätzlich führt die exogene NO-Zugabe zu einer Erhöhung der S-nitrosierten Proteine. Somit kann die RSNO-Menge innerhalb einer Zelle durch endogen gebildetes bzw. exogenes NO moduliert werden. S-nitrosierte Proteine lassen sich ferner im Stratum corneum, in der Dermis, Haarfollikeln und Endothelzellen detektieren.

Zum Nachweis von S-Nitrosothiolen kann neben der immunhistochemischen Detektion und der CLD-Methode ein indirekter Weg gewählt werden. Anhand der von Jaffrey *et al.* veröffentlichte Biotin switch Methode (Jaffrey *et al.*, 2001) ist es hier ebenfalls gelungen eine Erhöhung S-nitrosierter Verbindungen nach UVA-Bestrahlung von Hautomogenaten zu demonstrieren. Weitere immunhistochemische Befunde mit Kurzzeitorgankulturen untermauern die Annahme eines NOS-unabhängigen Mechanismus der NO-Entstehung *in vivo*. Wie erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt UVA-Bestrahlung der normalen menschlichen Haut zu einer signifikanten Steigerung der S-Nitrosierung von Proteinen in der Epidermis und Dermis, vergleichbar mit den Mengen nach maximaler iNOS-Aktivierung durch Th1-Zytokine bzw. nach exogener Zugabe eines NO-Donors. Daher erscheint es als plausibel, dass die Bildung der RSNO-Verbindungen auf die intrakutane Entstehung von NO beruht, möglicherweise als Folge der UVA-induzierten Nitrit-Photodekomposition.

Diese Beobachtungen stellen aber ein Paradoxon zu den Untersuchungen dar in denen gezeigt wurde, dass UVA-Einstrahlung die Photolyse der RSNO in der Haut bewirkt. Die UVA-induzierte Bildung S-nitrosierter Verbindungen setzt jedoch eine erhöhte Bildung bzw. Präsenz von bioreaktivem NO in diesen Geweben voraus. Da die UVA-induzierte S-Nitrosierung NOS-unabhängig ist, stellt sie die Folge einer NO-Freisetzung aus Nitrit oder anderen Nitrosoverbindungen in Zellen und/oder Interzellulärräumen der Hautabschnitte dar.

Die beobachtete UVA-induzierte Photodekomposition und gleichzeitige Neubildung von S-Nitrosothiolen in der Haut kann mit der geringen Permeabilität der Epidermis bzw. der großen Diffusionsstrecke für NO im Hautgewebe erklärt werden. So bewirkt UVA zum einen den Zerfall der RSNO-Verbindungen verbunden mit einer lokalen NO-Konzentrationserhöhung. Auf der anderen Seite führt die UVA-induzierte Nitritphotolyse ebenfalls zur NO-Bildung. Nach UV-Bestrahlung kann das akkumulierte NO an reduzierte Thiolgruppen binden und so in Form von nitrosierten Verbindungen „gespeichert“ werden. Daraus ergibt sich eine erhöhte RSNO-Menge nach UVA, die durch exogene Zugabe von Nitrit weiter gesteigert werden kann. Ableitend befinden sich Dekomposition und Neubildung von S-nitrosierten Proteinen innerhalb der menschlichen Haut in einem empfindlichen Gleichgewicht, welches unter anderem durch Sonneneinstrahlung verändert werden kann.

Diese aufgestellte Hypothese wurde unter Verwendung von Hauthomogenaten bewiesen. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Zugabe von Nitrit alleine zu keiner wesentlichen Zunahme der Nitrosothiol-Bildung führt. Im Gegensatz dazu kommt es nach Bestrahlung mit UVA zu einer Zunahme der RSNO-Menge, als Folge der nicht-enzymatischen NO-Bildung aus den NO-Oxidationsprodukten. In Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung kommt es zu einer noch stärkeren, signifikanten Erhöhung der RSNO-Menge als nach UVA allein. Man kann daher annehmen, dass das aus Nitrit stammende NO für die beobachtete Erhöhung verantwortlich ist. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass Bestrahlung von intakter Haut, die über 24 Stunden mit Nitrit inkubiert wurde, zu einer Verdopplung der RSNO-Konzentration führte, wogegen Nitrat keinen signifikanten Effekt aufwies.

Da die UVA-induzierte S-Nitrosierung in der Haut durch Nitrit gesteigert werden konnte, war es wichtig herauszufinden ob dieser Prozess direkt durch Nitrit vermittelt wird oder ob eventuell auch andere Faktoren aus der Haut für die RSNO-Bildung von essentieller Bedeutung sind. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro*-Modell etabliert, in dem bovines Serumalbumin (BSA) als Testsubstanz für die Aufklärung der Rolle von Nitrit für die S-Nitrosierung von Proteinen verwendet wurde. BSA stellt ein wichtiges Trägermolekül für NO dar. Es ist in der Lage NO in seinem hydrophoben Kern zu konzentrieren und in Anwesenheit von Sauerstoff die Nitrosierung seines Cysteinrestes zu katalysieren (Rafikova *et al.*, 2002). Mit dem erwähnten BSA-Modell konnte

erstmalig bestätigt werden, dass schon Nitrit alleine ein konzentrationsabhängiges Potential zur S-Nitrosierung besitzt, und dass das durch UVA-Einfluss aus dem Nitrit freigesetzte NO oder NO-Äquivalent wie z.B. das NO⁺ ein effektives Nitrosierungsagens darstellt. Mit diesem Modell konnte gleichzeitig bewiesen werden, dass die Präsenz von Nitrit in einem Gewebe eine hinreichende Bedingung darstellt in der Initiation von S-Nitrosierungsprozessen von Proteinen.

UVA-Strahlung kann bis zu 1 mm tief in die Haut eindringen und so alle Hautzelltypen erreichen. Der Einfluss von UVA ist jedoch in den oberen Hautschichten am stärksten. Wenn UVA zur Photolyse von Nitrit führt und das entstandene NO wie gezeigt an reduzierte Thiolgruppen bindet, dann müsste nach UVA-Bestrahlung der Haut die Menge der neu gebildeten RSNO-Verbindungen in den obersten Hautschichten am größten sein. In diesem Zusammenhang konnte nach Anfärben von bestrahlter Haut mit einem anti S-Nitrosocystein Antikörper ein RSNO-Gradient beobachtet werden, der in den tieferen Lagen der Dermisregion schwächer wurde. Diese Korrelation zwischen der Intensität der Nitritphotolyse und der Eindringtiefe der UVA-Strahlung könnte auch eine Rolle für die biologische Wirkung des nicht-enzymatisch gebildeten NO auf die Hautphysiologie spielen, die es im Weiteren zu untersuchen gilt.

Zu diesem Zweck wurden Zellkulturen von primären Keratinozyten verwendet. Die Keratinozyten stellen zelluläre Bestandteile der Epidermis dar und sind in der intakten Haut intensiven äußeren Einflüssen, wie UV-Strahlung ausgesetzt. In analogen Versuchen zur Haut sollten in Keratinozyten die NO-Metabolite quantifiziert werden und im Weiteren die Bildung der RSNO-Verbindungen als auch die biologische Wirkung des UVA-induzierten nicht-enzymatisch gebildeten NO untersucht werden.

Nach differentieller Analyse der NO-Metaboliten in Keratinozytenlysaten ergab die Quantifizierung von Nitrit einen Wert der ca. 50 mal höher liegt verglichen mit den gemessenen Konzentrationen an nitrosierten Verbindungen. Dagegen beträgt das Verhältnis von Nitrit und RSNO-Verbindungen in der Haut höchstens 2.

Werden Keratinozyten in Anwesenheit von den Antioxidantien GSH und Ascorbat, d. h. unter reduktiven Bedingungen kultiviert, so wird die Nitrosierung inhibiert und der Abbau von vorhandenen nitrosierten Verbindungen gefördert. So ist bereits in zahlreichen Publikationen gezeigt worden, dass Ascorbat die Bildung von Nitrosaminen

inhibiert und gleichzeitig die Spaltung bestehender S-Nitrosothiole begünstigt (Kashiba-Iwatsuki *et al.*, 1997). Wird gleichzeitig die enzymatische NO-Bildung durch NOS-Inhibitoren gehemmt, zeichnet sich eine Abnahme der RXNO-Menge in den Keratinozyten aus im Vergleich zu den unbehandelten, unter Standardbedingungen kultivierten Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es nach iNOS-Aktivierung zu einer signifikanten Zunahme der RXNO-Konzentration um Faktor 12 verglichen mit den reduzierten Proben. Somit ist endogen synthetisiertes NO an der Bildung der RSNO beteiligt. Andererseits bleibt die Nitritkonzentration sowohl nach Inhibition der NOS und Zugabe von GSH und Ascorbat als auch nach iNOS-Aktivierung mit Th1-Zytokinen nahezu unverändert. Anders als die Mengen an nitrosierten Proteinen ist die Nitritkonzentration konstant und wird durch Änderungen der intrazellulären NO-Konzentration wie z. Bsp. nach iNOS-Aktivierung nicht wesentlich beeinflusst. Die Tatsache, dass die Konzentration der nitrosierten Verbindungen durch Antioxidantien modulierbar ist beweist umso mehr, dass der Prozess der Nitrosierung mit dem intrazellulären Redoxstatus eng verbunden und in der Lage ist redox-sensitive regulatorische Funktionen auszuüben.

In *in vitro* Experimenten wurde der Einfluss von Nitrit und UV-Strahlung auf die S-Nitrosierung in Keratinozyten untersucht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Nitrat ähnlich wie in der Haut und im Gegensatz zu Nitrit keine Rolle für die S-Nitrosierung spielt. Im Gegensatz zu den in der Haut erzielten Ergebnissen, wurde in den Keratinozyten interessanterweise bezüglich der S-Nitrosierung eine kontroverse Beobachtung gemacht. Zum einen beobachtet man eine deutliche bis zu einer 7-fachen Steigerung der Nitrosierung in Gegenwart von Nitrit allein. Schlussfolgernd stellt UVA keine Notwendigkeit für den S-Nitrosierungsprozess dar und weitere einleitende Mechanismen könnten in diesem Prozess involviert sein. Nachtragend und in Übereinstimmung mit vor kurzem veröffentlichten Daten (Bryan *et al.*, 2005) belegen diese Ergebnisse auch, dass Nitrit alleine ein ausreichender Faktor ist um das Ausmaß der Nitrosierung zu beeinflussen und somit auch eine potentielle Rolle bei der Modulation intrazellulärer Signaltransduktionswege spielt. Dieser von Bryan *et al.* postulierte Mechanismus der S-Nitrosierung durch Nitrit unter physiologischen Bedingungen und bei neutralem pH ist jedoch bisher nicht aufgeklärt worden. Eine weitere Möglichkeit für die Nitrosierung durch Nitrit ist auch dessen Reduktion in

sauren Zellkompartimenten wie z. Bsp. in den späten Endosomen unter Bildung von N_2O_3 bzw. NO^+ . Die Bindung des Nitrosoniumions an Thiolgruppen resultiert in der Entstehung S-nitrosierter Proteine. Dieser pH-abhängige, nicht-enzymatische Mechanismus der NO-Produktion ist bereits im Jahre 1996 durch Feelisch und Stamler detailliert beschrieben worden (Feelisch & Stamler, 1996).

Die Bedeutung von UVA für die S-Nitrosierung in Keratinozyten wurde dann in weiteren Experimenten untersucht. Obwohl in der Haut gezeigt wurde, dass UVA eine signifikante Erhöhung der RSNO-Menge in den mit Nitrit inkubierten Proben bewirkt, beobachtet man in den Keratinozyten genau das Gegenteil. UVA-Bestrahlung bewirkt in diesem Fall eine Abnahme der RXNO-Konzentration. Wird jedoch während der Bestrahlung Nitrit zugegeben, so nimmt die Menge der S-Nitrosoverbindungen wieder sichtbar zu. Der Grund für den UV-induzierten Abbau der nitrosierten Verbindungen könnte in der kurzen Diffusionstrecke in den Zellkulturen liegen. Das bedeutet, dass das während der UVA-Bestrahlung gebildete NO nach seiner Entstehung schnell die Zelle verlässt und für eine Nitrosierungsreaktion nicht mehr verfügbar ist. Somit bleibt die intrazelluläre NO-Konzentration trotz der Photolyse von NO-Metaboliten gering.

Zusätzlich könnte die Kultivierung von Keratinozyten unter reduktiven Bedingungen und die damit verbundene erhöhte Konzentration der intrazellulären Reduktionsäquivalente den Abbau der RSNO begünstigen. So kann es durchaus sein, dass UVA zur Bildung neuer RSNO-Verbindungen in den Zellen führt, diese jedoch durch das zugesetzte Ascorbat schnell wieder reduziert werden. Bei der Detektion S-nitrosierter Proteine mittels der Biotin switch Methode hat sich die HSA-Bande als die dominanteste erwiesen. Dies war überraschend, da erst vor kurzem bekannt worden ist, dass humane Keratinozyten überhaupt HSA exprimieren (Hasse *et al.*, 2005).

Unbestritten ist, dass Nitrit durch intrazelluläre Reduktion oder einen anderen nicht bekannten Mechanismus zu einer signifikanten Erhöhung der RSNO-Konzentration in Keratinozyten führt als Folge der NO-Entstehung. Die UVA-Bestrahlung im Anschluss bewirkt den Zerfall dieser photolabilen Verbindungen und die Freisetzung von NO. Innerhalb der Haut könnten neben den oben erwähnten hohen NO-Diffusionsstrecken auch interzelluläre Wechselwirkungen eine Rolle für die Bildung S-nitrosierter Proteine spielen. Vermutlich wird innerhalb des Gewebes, das zusätzlich in Verbindung mit dem

Blutkreislauf steht, eine größere Menge an Nitrit akkumuliert und auch die Anzahl freier Thiole, die das NO binden ist im Vergleich zu den Keratinozyten erhöht.

4.2 Biologische Aktivität des enzymunabhängig gebildeten NO

Da das in der menschlichen Haut durch NO-Synthasen gebildete NO, sowohl in der kutanen Physiologie als auch Pathophysiologie eine besondere Rolle spielt, sollte in der vorliegenden Arbeit auch die Frage nach der biologischen Relevanz der UVA-induzierten, nicht-enzymatischen NO-Generierung besondere Beachtung finden. Die physiologisch sinnvollste Vorgehensweise dabei ist, zu klären, ob das nicht-enzymatisch gebildete NO nach Reaktion mit dem für NO spezifischen „Rezeptor“, der löslichen Guanylatzyklase (sGC), eine NO-typische biologische Antwort induziert. Tatsächlich konnte mit der vorliegenden Arbeit unter der Verwendung von RFL-6 Reporterzellen erstmals bewiesen werden, dass der UV-induzierte Zerfall von photolabilen NO-Derivaten in der menschlichen Haut zu einer sGC-abhängigen Generierung von cGMP führt, was nach Stand des heutigen Wissens einen direkten Beweis für die Bildung von bioaktiven NO darstellt. Diese Untersuchungen zeigen zudem, dass diese besondere Art der NO-Produktion tatsächlich enzymunabhängig verläuft, da ein hochkonzentrierter NOS-Inhibitor-Cocktail keinen Einfluss auf die Höhe der UVA-induzierten NO-Produktion hatte, was die Beteiligung von NOS-Aktivitäten direkt ausschließt.

Um die besondere Rolle der nicht-enzymatischen NO-Generierung auf die menschliche Hautphysiologie oder Pathophysiologie zu demonstrieren, wurde zusätzlich noch der Effekt des UVA-induzierten Nitritzerfalls auf die Regulation des Wachstums und Differenzierung menschlicher Hautkeratinozyten sowie auf die Regulation der Expression immunologisch relevanter Mediatoren menschlicher Keratinozyten untersucht.

Es ist bekannt, dass Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten stark von der lokalen NO-Konzentration abhängig sind. Das Wachstum von Keratinozyten wurde anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 und Differenzierungsmarkers Involucrin untersucht. Beide sind als solche anerkannt und fest etabliert (Caldwell *et al.*, 1997).

Bereits zu Beginn der Versuchsreihen war es überraschend festzustellen, dass in den nur mit Nitrit bestückten Kontrollkulturen, d.h. ohne einen zusätzlichen Einfluss von UVA eine biologische Wirkung induziert wurde. So konnte beobachtet werden, dass Nitrit die Expression beider Gene signifikant hemmt. Dies war die erste Beobachtung einer biologischen Wirkung eines vermeintlich stabilen Metaboliten des NO-Stoffwechsels, die zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit auch durch eine andere Gruppe bestätigt wurde (Bryan *et al.*, 2005). In der zitierten Arbeit konnten die Autoren zeigen, dass Nitrit unter scheinbar nicht reduzierenden physiologischen Bedingungen eine biologische Wirkung auf die Genexpression bzw. Gefäßphysiologie entfalten kann. Der wahrscheinlichste und am besten untersuchte Mechanismus der genannten Nitritwirkung ist die intrazelluläre Reduktion von Nitrit zu NO. In der Regel erfolgt eine solche Reduktion unter sauren Bedingungen und bei geringem Sauerstoffgehalt in sauren Kompartimenten von Zellen und kann durch zelleigene Enzyme wie z. Bsp. die Xanthinoxidase katalysiert werden (Zhang *et al.*, 1998; Zweier *et al.*, 1995), sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht das Nitrit selbst, sondern das daraus generierte NO die eigentliche biologische Wirkung induziert. Wenn jedoch Nitrit, NO oder auch eine andere noch unbekannte Komponente sowohl den Marker der Proliferation als auch den der Differenzierung herunterreguliert, dann wäre es doch zu erwarten, dass das Wachstumsverhalten von Keratinozyten ebenfalls beeinflusst wird. Aus anderen biologischen Systemen ist bekannt, dass nicht die einzelnen Expressionswerte biologischer Antagonisten die Regulation der relevanten Zellparameter bestimmen, sondern das resultierende Verhältnis der Expression dieser Gegenspieler. So konnte z.B. im Modell des programmierten Zelltodes, der Apoptose gezeigt werden, dass insbesondere das Verhältnis der Expression des antiapoptisch wirkenden Proteins Bcl-2 zur Expression des proapoptisch wirksamen Proteins Bax den Prozess des Zelltodes reguliert. Je nachdem, welches Gen in seiner Expression überwiegt, werden schützende Mechanismen bzw. Apoptose-induzierende Parameter begünstigt. Analog zu diesem System sollte hier untersucht werden, ob anhand des Verhältnisses der Expression von Involucrin und Ki-67 proliferations- bzw. differenzierungsfördernde Mechanismen beurteilt werden können. Im Fall der allein nur mit Nitrit behandelten Zellkulturen konnte festgestellt werden, dass obwohl die Involucrin und Ki-67 Expressionraten durch Nitrit erniedrigt werden, das Verhältnis der

beiden Expressionsraten zueinander und das tatsächliche Wachstum der Zellen durch Nitrit unbeeinflusst bleiben, sodass Nitrit alleine keinen Einfluss auf die Zellproliferation und –differenzierung von Keratinozyten ausübt.

Sehr auffällig ist jedoch der Befund, dass sowohl in unbehandelten als auch in den mit Nitrit behandelten Zellen eine zusätzliche Behandlung mit dem NO-Scavenger cPTIO eine hoch signifikante Suppression der Ki-67-mRNA Expression herbeiführt. Dieses Ergebnis unterstützt nochmals die früheren Befunde, dass für das Zellwachstum eine basale intrazelluläre NO-Präsenz absolut notwendig ist (Krischel *et al.*, 1998). Wird dieses NO aus der Zelle entfernt, z.B. durch den Einsatz von cPTIO, so scheint dieser Eingriff zu einer Arretierung der Zellteilung zu führen. Ob parallel dazu auch die Zelldifferenzierung eingeleitet wird, ist noch unbekannt und muss in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden.

cPTIO wird allgemein als ein „spezifischer“ Scavenger des NO betrachtet und in diesem Zusammenhang auch in zahlreichen Systemen verwendet (Akaike *et al.*, 1993). In einer vor wenigen Jahren erschienen Arbeit wird aber auch beschrieben, dass cPTIO unter Bedingungen der Wasserchemie als Folge der Reaktion mit NO die Entstehung von Nitrit und N_2O_3 fördert, wobei als Zwischenprodukt das sehr toxische, da extrem reaktive Zellgift NO_2 generiert werden kann (Goldstein *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass das NO_2 -Radikal mit zellulären Komponenten und biologischen Strukturen reagieren kann und auf diese Weise auch biologische Wirkungen entfalten kann (Kirsch *et al.*, 2002). Ob und in welchem Maß NO_2 -Radikale auch hier eine Rolle spielen muss deshalb in Zukunft noch erarbeitet werden.

Bestrahlung von Keratinozyten mit nicht-toxischen UVA-Dosen führt zu einer Abnahme der Ki-67-Protein Expressionsrate und im Vergleich zu unbestrahlten Kulturen zu einer erniedrigten Zellteilungsrate. Werden die Zellen mit Nitrit vorinkubiert, so wird die UVA-induzierte Ki-67-Gensuppression verstärkt und das Verhältnis von Involucrin zu Ki-67 steigt deutlich um einen Faktor von ca. 4 an. Offensichtlich beruht dieser Effekt auf der UVA-vermittelten Nitritphotolyse und der daraus resultierenden NO-Bildung. Bei der Analyse des Wachstumsverhaltens humaner Keratinozytenkulturen wurde nicht wie erwartet eine Abnahme der Zellzahl, sondern vielmehr eine eindeutige Zunahme beobachtet. Wie bereits erwähnt, wird die

Expression von Involucrin oder Ki-67 zur Beurteilung der Differenzierung bzw. Proliferation von humanen Keratinozyten allgemein verwendet (Caldwell *et al.*, 1997). Eine Zunahme der Ki-67-Expression wird somit gleichgesetzt mit einer erhöhten Proliferationsrate, wohingegen eine Erhöhung der Involucrin-Expression eindeutig auf die Einleitung von Differenzierungsprozessen hindeutet. Nach der Behandlung von Keratinozyten mit Nitrit und UVA werden jedoch widersprüchliche Ergebnisse beobachtet. Weder die relativen Expressionsdaten der erwähnten Genexpressionen, noch die Verschiebungen des Involucrin/Ki-67-Verhältnisses bis zu einem Faktor von ca. 2-4 korrelieren eindeutig mit der quantitativen Bestimmung der Zellteilung. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass die durch Nitrit und UVA induzierte Erhöhung der Proliferationsrate auf eine Wirkung des aus Nitrit freigesetzten NO beruht. Diese Annahme wird einerseits durch die Experimente mit cPTIO unterstützt, die eindeutig eine NO-Abhängigkeit zeigen. Da cPTIO zu einer Erhöhung des relativen Expressionsprofils von Involucrin/Ki-67 auf das bis zu 160-Fache führt, kann von einer starken Proliferationshemmung ausgegangen werden. Andererseits konnte besonders durch die Arbeitsgruppe um Prof. Pfeilschifter gezeigt werden, dass in iNOS knock-out Tieren, also unter dem Einfluss einer unterdrückten NO-Synthese das Wachstum von Keratinozyten im Wundgeschehen nahezu vollständig gehemmt ist (Frank *et al.*, 2002). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass das aus Nitrit freigesetzte NO UVA-induzierte ROS abfängt und dadurch eine UV-abhängige Zellschädigung verhindert wird.

Wie im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben, kann die NO-Freisetzung aus Nitrit und somit die intrazelluläre NO-Konzentration durch Antioxidantien zusätzlich verstärkt werden. UVA-Bestrahlung hat nicht nur die NO-Bildung aus NO-Metaboliten sondern auch die Entstehung reaktiver Spezies zur Folge. Die Antioxidantien könnten aufgrund ihres Radikalscavenger-Charakters in diesem Mechanismus eingreifen und die Sauerstoffradikale abfangen. Dadurch kann die Bildung von $\text{NO}_2\cdot$ und somit dessen Rekombination mit NO verhindert werden. In diesem Fall würde man erwarten, dass sich die erhöhte NO-Konzentration auch auf Genexpression auswirkt. Die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden haben gezeigt, dass sowohl GSH, Ascorbat als auch Trolox alleine und in Kombination mit Nitrit das Wachstum von Keratinozyten beeinflussen. Vermutlich bewirken die Antioxidantien alleine eine Reduktion nitrosierter Verbindungen und infolge der NO-

Freisetzung eine signifikante Abnahme der Wachstumsrate. In Kombination mit Nitrit und UVA kommt es aufgrund der starken NO-Freisetzung zu einer Unterdrückung der Zellproliferation, die sich durch ein extrem hohes Involucrin-Ki-67-Verhältnis auszeichnet. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass das Vitamin E Derivat Trolox den größten antiproliferativen Effekt aufweist und die Keratinozytendifferenzierung fördert. Dieser Effekt wird nach Bestrahlung mit einer nicht-toxischen UVA-Dosis gesteigert. Die Analyse auf Proteinebene hat weiter gezeigt, dass die Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression gering ist. So wird die Involucrinmenge nur durch Trolox und Nitrit signifikant gesteigert, während die Ki-67 Proteinmenge durch Nitrit nicht verändert wird. Die Wirkung von Ascorbat wird sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Zellen nicht weiter durch Nitrit moduliert. Ascorbat alleine führt zur signifikanten Zunahme der Involucrin mRNA-Expression und somit zu einer Steigerung des Expressionsverhältnisses, ein Vorgang der unter anderem wahrscheinlich auf die Reduktion intrazellulärer Nitrosothiolen und gleichzeitige NO-Bildung beruht. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Catani *et al.* setzen sowohl Ascorbat als auch Trolox die Ki-67 Expression herab was sich in einer erniedrigten Proteinmenge widerspiegelt (Catani *et al.*, 2005). Interessanterweise führt die Kombination aus Trolox und Ascorbat zur stärksten NO-Freisetzung aus Nitrit während UVA-Einstrahlung, was sich durch ein hohes Involucrin-Ki-67-Verhältnis auszeichnet. Auch die Kombination aus GSH und Nitrit bewirkt eine Zunahme dieses Verhältnisses im Vergleich zum Verhältnis in den GSH Proben. Dies stimmt auch mit den *in vitro* Versuchen überein in denen gezeigt wurde, dass GSH konzentrationsabhängig die Nitritphotolyse um ein Vielfaches verstärkt. Offensichtlich verläuft die UVA-induzierte NO-Freisetzung aus Nitrit durch das niedermolekulare GSH viel effizienter.

In der Gesamtbetrachtung bewirkt UVA-Bestrahlung und die damit verbundene Photolyse von NO-Metaboliten eine Erhöhung des Involucrin-Ki-67-Expressionsverhältnisses, die sowohl mit einer erniedrigten intrazellulären Ki-67 Proteinmenge als auch mit einem verschlechterten Zellwachstum korreliert.

Weitere Untersuchungen sollten zeigen ob die beobachteten Effekte von GSH, Ascorbat und Trolox NO-abhängig verlaufen oder ob durch die Antioxidantien NO-unabhängige Signalwege induziert werden. Da in Anwesenheit des NO-Scavengers cPTIO der

Trolox- und Ascorbat-Effekt aufgehoben wurden, kann im Weiteren von einer teilweise NO-vermittelten Reaktion ausgegangen werden.

Über nicht-antioxidative Effekte der Antioxidantien, insbesondere Trolox, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Zwar wurde in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben, dass α -Tocopherol durch Inhibierung der PKC-Aktivität zum Zellwachstumsarrest von z. Bsp. glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Neutrophile führt, jedoch wurde gleichzeitig ein ähnlicher Trolox-Effekt ausgeschlossen (Ricciarelli *et al.*, 2001).

Zusätzlich muss an dieser Stelle berücksichtigt werden, dass Änderungen in der Genexpression durch Antioxidantien auch auf der Modulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sind. Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) und Aktivatorprotein-1 (AP-1) gehören zu den Transkriptionsfaktoren für deren Regulation eine Abhängigkeit vom intrazellulären Redoxstatus bereits gezeigt werden konnte (Catani *et al.*, 2005). NF- κ B-Aktivierung führt zur Synthese einer Vielzahl von Genprodukten, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Akutphaseproteine und Zelladhäsionsproteine. Da frühere Publikationen eine primäre Rolle freier Thiole für die DNA-Bindeaffinität von NF- κ B belegen, könnte das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen reduzierten und oxidierten Glutathion eine regulatorische Funktion ausüben (Moran *et al.*, 2001). Im Weiteren deutet die Arbeit von Aw auf eine wichtige Rolle von GSH für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation in Lymphozyten und Darmendothelzellen hin (Aw, 2003). Ähnlich wie andere Antioxidantien, ist Ascorbat in der Lage durch Modulation der AP-1 Aktivität die Keratinozytendifferenzierung positiv zu beeinflussen (Catani *et al.*, 2005). Zahlreiche Gene wie Involucrin, Loricrin und Transglutaminasen, die während des Differenzierungsprozesses spezifisch induziert werden unterliegen der Kontrolle durch AP-1. Der antiproliferative Effekt von Ascorbat scheint durch eine PKC-abhängige Aktivierung der AP-1 DNA-Bindeaktivität zu erfolgen (Catani *et al.*, 2005). Obwohl in Anwesenheit von Ascorbat keine Hochregulation der Involucrinexpression auf mRNA- oder Proteinebene bestimmt wurde, war zum einen die Ki-67 Expression signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle und das Verhältnis Involucrin zu Ki-67 erhöht.

Neben der Regulation bestimmter Transkriptionsfaktoren durch Antioxidantien können auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere Wasserstoffperoxid, sowie reaktive Stickoxide (RNS), die vermehrt durch UV-Strahlung gebildet werden, redox-sensitive Transkriptionsfaktoren in deren Aktivität beeinflussen (Moran *et al.*, 2001).

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das enzymunabhängig aus Nitrit und RSNO-Verbindungen gebildete NO ähnliche Funktionen wie das durch NOS synthetisierte NO erfüllt, wurde in einem weiteren Schritt durch Erstellung von Zytokinexpressionsprofilen der regulatorische Einfluss auf die zelluläre Entzündungsantwort untersucht. Die Expression von Zytokinen ist in der Regel die Antwort auf Zellstress, der z. Bsp. durch UV-Strahlung, Hitzestock oder Entzündung ausgelöst wird (Charles & Dinarello, 2000). Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK's) führt zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und Genexpression. Die Expression proinflammatorischer Gene stellt einen essentiellen Schritt für die Entzündungsreaktion dar und führt zur verstärkten Bildung von Prostaglandin und NO, chemotaktische Anlockung von Neutrophilen und Expression von Adhäsionsmolekülen, die das Anhaften von Leukozyten an das Endothel und somit die Einwanderung ins Gewebe gewährleisten (Charles & Dinarello, 2000). Nach UVA-Bestrahlung konnte in den mit Nitrit und GSH behandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-1 β , IL-8 bestimmt werden, wogegen die IL-6- und COX-2-Expression durch Nitrit und Ascorbat signifikant gesteigert wurde. Interessanterweise induziert Ascorbat allein die IL-6 und TNF- α -Expression, mit Nitrit jedoch zusätzlich IL-8, IL-1 β und COX-2. Unter Berücksichtigung all dieser Daten kann man daraus folgern, dass das aus Nitrit durch Ascorbat oder GSH verstärkt freigesetzte NO die Expression proinflammatorischer Zytokine positiv beeinflusst, wobei NO einer von mehreren Stimuli, wie z. Bsp. ROS, repräsentiert, deren Bildung in der Synthese proinflammatorischer Zytokine mündet. Diese Beobachtungen könnten von besonderer Bedeutung für die Regulation von Entzündungs- und Wundheilungsprozessen in der Haut sein, wo NO eine essentielle Rolle einnimmt (Frank *et al.*, 2002). Die erzielten Ergebnisse stammen aus Experimenten mit Keratinozytenkulturen und lassen sich daher nicht auf die Vorgänge in der Haut übertragen. Innerhalb von Geweben findet sich ein komplexes Zusammenspiel zwischen den einzelnen Zelltypen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Daher werden in

Zukunft weitere Untersuchungen zur Klärung der UV-induzierten Signalwege *in vivo* beitragen müssen. Das unten dargestellte Schema fasst die Ergebnisse zusammen und repräsentiert ein Modell über die biologische Aktivität des nichtenzymatisch gebildeten NO während UVA-Exposition der menschlichen Haut (Abbildung 4-1).

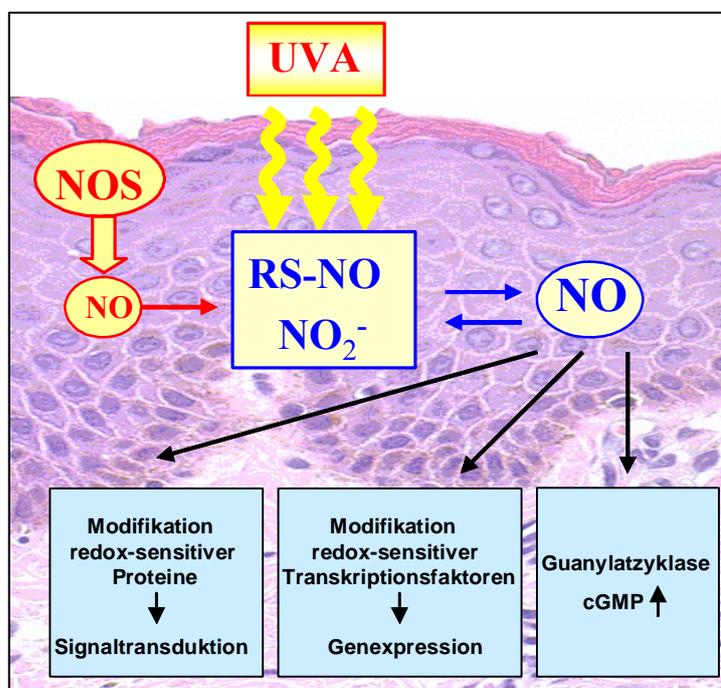


Abbildung 4-1: cGMP-abhängige und -unabhängige Effekte des nicht enzymatisch gebildeten NO.

Ein Teil des enzymatisch gebildeten NO wird zu Nitrit oxidiert oder in Form von S-Nitrosothiolen gespeichert. Diese Verbindungen sind photoaktiv und setzen nach UVA-Einstrahlung NO wieder frei. Das NOS-unabhängig entstandene NO ist biologisch aktiv und stimuliert nach Aktivierung der Guanylatzyklase die cGMP-Produktion. Zusätzlich führt die Modulation redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, und redox-sensitiver Proteine zur Änderung von Genexpressionsmustern und intrazellulären Signalwegen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuer Mechanismus der enzymunabhängigen NO-Bildung in der menschlichen Haut beschrieben, welches natürlich vorkommende NO-Donormoleküle bzw. NO-Speicher nutzt und so die Zeitlücke zwischen UV-Einstrahlung und iNOS-Aktivierung schließt. Da in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass Nitrit Endothelzellen vor ROS-induzierten Zelltod schützt, repräsentiert die entdeckte sofortige NO-Entstehung nach

UVA einen grundlegenden physiologischen Signalweg der Haut, mitverantwortlich für den Schutz vor UV-induzierten Zelltod (Suschek *et al.*, 2003). Hier konnte auch gezeigt werden, dass das enzymunabhängig, aus Nitrit und S-Nitrosothiolen gebildete NO könnte durch Modulation des Zellwachstums, der Gefäßdilatation und Expression proinflammatorischer Zytokine sowohl in physiologischen als auch in pathophysiologischen Prozessen involviert ist.

5 Zusammenfassung

Enzymatisch gebildetes NO ist ein essentieller Regulator wichtiger physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge einschließlich Modulation des Zellwachstums, der Genexpression, Enzymaktivität, Wundheilung und inflammatorischen Zellantwort. Durch den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies und Inhibition der Lipidperoxidation spielt NO eine protektive Rolle gegen UV-induzierte Zellschädigung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass UVA-Bestrahlung der menschlichen Haut zu einer enzymunabhängigen NO-Freisetzung führt, die mit maximaler iNOS-Aktivität vergleichbar ist. Untersuchungen haben bewiesen, dass die NO-Entstehung auf die Photolyse photolabiler Verbindungen wie S-Nitrosothiole und Nitrit in der Haut beruht, die in weit höheren Konzentrationen vorzufinden sind als im Plasma. Die Aufklärung des Mechanismus der UV-induzierten Nitritdekomposition wies auf eine wichtige Rolle reduzierter Thiole hin, die eine wesentliche Verstärkung der NO-Freisetzung bewirken. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass UVA auch zur Entstehung neuer S-Nitrosothiole beiträgt, so dass sich *in vivo* die Entstehung und der Zerfall von RSNO's in einem empfindlichen Gleichgewicht befinden. Für das enzymunabhängig gebildete NO konnte eine biologische Aktivität nachgewiesen werden, die mit einer Steigerung des cGMP Levels einhergeht. Analysen mit Keratinozytenkulturen zeigen, dass Nitrit insbesondere nach repetitiver Bestrahlung mit nicht-toxischen UVA Dosen zu einer signifikanten Steigerung der Zelldifferenzierung führt. Ferner bewirken Antioxidantien durch Erhöhung der NO Halbwertszeit eine verstärkte Hemmung der Ki-67 Expression nach UVA, die mit einem verlangsamten Wachstum und eine signifikant gesteigerte Expression des Differenzierungsmarkers Involucrin korreliert. Die Untersuchung der Expressionsprofile proinflammatorischer Zytokine spricht für eine Regulation der Entzündungsreaktion durch Nitrit und Antioxidantien. Die gefundenen Effekte auf die Zytokinexpression treten insbesondere nach UVA Bestrahlung auf und dürfen als eine Folge der NO Bildung und Modulation redoxempfindlicher Signaltransduktionswege betrachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine enzymunabhängige, UVA-induzierte NO Bildung in der menschlichen Haut gezeigt werden, deren Ursprung in der Photodekomposition von NO-Speichermolekülen liegt. Durch Regulation der Gefäßdilatation via cGMP, Zellwachstum und Zytokinexpression kann das nicht enzymatisch generierte NO sowohl in physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen involviert sein.

6 Literatur

1. Abu-Soud, H.M., Stuehr J. (1993). "Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 10769-10772
2. Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S, Maeda H (1993). "Antagonistic action of imidazolineoxyl n-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction." *Biochemistry* **32**:827-832
3. Andersen, P. H., K. Abrams, et al. (1991). "A time-correlation study of ultraviolet B-induced erythema measured by reflectance spectroscopy and laser Doppler flowmetry." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **8**(3): 123-8.
4. Andrews, K. L., C. R. Triggle, et al. (2002). "NO and the vasculature: where does it come from and what does it do?" *Heart Fail Rev* **7**(4): 423-45.
5. Anggard, E. (1994). "Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine." *Lancet* **343**(8907): 1199-206.
6. Arnal, J. F., T. Munzel, et al. (1995). "Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability." *J Clin Invest* **95**(6): 2565-72.
7. Asano K., Chee C., Gaston B. et al. (1994) "Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 10089-10093
8. Aubin, F. (2003). "Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression." *Eur J Dermatol* **13**(6):515-23
9. Aw, T. Y. (2003). "Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation." *News Physiol Sci* **18**: 201-4
10. Balligant, J.L., Kobzik, L., Han X. et al. (1995) "Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric-oxide synthase in cardiac myocytes." *J. Biol. Chem.* **270**: 14582-14586
11. Baudouin, J. E. and P. Tachon (1996). "Constitutive nitric oxide synthase is present in normal human keratinocytes." *J Invest Dermatol* **106**(3): 428-31.
12. Benrath, J., M. Zimmermann, et al. (1995). "Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation." *Neurosci Lett* **200**(1): 17-20.
13. Benjamin, N., F. O'Driscoll, et al. (1994). "Stomach NO synthesis." *Nature* **368**(6471): 502.

14. Berneburg, M, Gattermann, N, Stege, H, Grewe, M, Vogelsang, K, Ruzicka, T, Krutmann, J. (1997). "Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system." *Photochem Photobiol* **66**:271-275
15. Bjorne, H. H., J. Petersson, et al. (2004). "Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness." *J Clin Invest* **113**(1): 106-14.
16. Blank, C., C. Bogdan, et al. (1996). "Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase." *Eur J Immunol* **26**(4): 792-6.
17. Boger, R.H., Vallance, P., Cooke, J.P. (2003) "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase." *Artheroscler. Suppl.* **4**: 1-3
18. Bourassa, J., DeGraff, W., Kudo, S., Wink, D. A., Mitchell, J. B. and Ford, P. C. (1997). *J Am Chem Soc* **119**: 2853-2860
19. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, et al. (1998). "Nitric oxide in human skin: current status and future prospects." *J Invest Dermatol* **110**(1): 1-7.
20. Bruch-Gerharz, D., O. Schnorr, et al. (2003). "Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation." *Am J Pathol* **162**(1): 203-11.
21. Bryan, N.S., B.O. Fernandez, et al. (2005). "Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues." *Nature Chemical Biology* **1**, 290-297
22. Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* **25**(2): 169-93.
23. Butler, A.R., Williams, D.H.L. (1993) "The physiological role of nitric oxide." *J. Chem. Soc. Rev.* **22**: 233-241
24. Buyukafsar, K., E. Demrel-Yilmaz, et al. (1999). "Depletion and restoration of the putative photosensitive materials store yielding nitric oxide in the isolated mouse gastric fundus." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(2): 768-73.
25. Caldwell, CJ, Hobbs, C, McKee, PH (1997). "The relationship of Ki67 and involucrin expression in proliferative, pre-neoplastic and neoplastic skin." *Clin Exp Dermatol* **22**(1): 11-6
26. Catani, M. V., I. Savini, et al. (2005). "Biological role of vitamin C in keratinocytes." *Nutr Rev* **63**(3): 81-90.
27. Cavallo, J. and V. A. DeLeo (1986). "Sunburn." *Dermatol Clin* **4**(2): 181-7.
28. Charles, A. and Dinarello, M.D. (2000). "Proinflammatory cytokines." *CHEST* **118**:503-508
29. Cosby, K., K. S. Partovi, et al. (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." *Nat Med* **9**(12): 1498-505.

30. Croen, K. D. (1993). "Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication." *J Clin Invest* **91**(6): 2446-52.
31. Dave, K. C., M. N. Jindal, et al. (1979). "Characterization of ultraviolet light-induced relaxation of the isolated duodenum of the rat." *Br J Pharmacol* **66**(2): 197-201.
32. Dejam, A., P. Kleinbongard, et al. (2003). "Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis." *Free Radic Biol Med* **35**(12): 1551-9.
33. Deliconstantinos, G., V. Villiotou, et al. (1992). "Ultraviolet-irradiated human endothelial cells elaborate nitric oxide that may evoke vasodilatory response." *J Cardiovasc Pharmacol* **20** Suppl 12: S63-5.
34. Deliconstantinos, G., V. Villiotou, et al. (1995). "Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production." *Br J Pharmacol* **114**(6): 1257-65.
35. Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (1997). "Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases." *J Exp Med* **185**(4): 601-7.
36. Doran, T. I., A. Vidrich, et al. (1980). "Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells." *Cell* **22**(1 Pt 1): 17-25.
37. Eckert, R. L. (1989). "Structure, function, and differentiation of the keratinocyte." *Physiol Rev* **69**(4): 1316-46.
38. Efron, D. T., D. Most, et al. (2000). "Role of nitric oxide in wound healing." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**(3): 197-204.
39. Espey, M. G., D. D. Thomas, et al. (2002). "Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11127-32.
40. Farr, P. M. and B. L. Diffey (1986). "The vascular response of human skin to ultraviolet radiation." *Photochem Photobiol* **44**(4): 501-7.
41. Feelisch, M and Stamler, JS. Donors of nitrogen oxides. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, edited by Feelisch M and Stamler JS. Chichester, UK: Wiley, 1996, p. 71-115.
42. Fehsel, K., K. D. Kroncke, et al. (1995). "Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes." *J Immunol* **155**(6): 2858-65.
43. Feldman, P.L., Griffith, O.W., Stuehr, D.J. (1993) "The surprising life of nitric oxide." *Chem. Eng. News* **20**: 26-38

44. Ferrari, R., A. Cargnoni, et al. (1996). "Metabolic adaptation during a sequence of no-flow and low-flow ischemia. A possible trigger for hibernation." *Circulation* **94**(10): 2587-96.
45. Forstermann, U., E. I. Closs, et al. (1994). "Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions." *Hypertension* **23**(6 Pt 2): 1121-31.
46. Fisher, G. J., S. C. Datta, et al. (1998). "Retinoic acid receptor-gamma in human epidermis preferentially traps all-trans retinoic acid as its ligand rather than 9-cis retinoic acid." *J Invest Dermatol* **110**(3): 297-300.
47. Fogli, S., P. Nieri, et al. (2004). "The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage." *Faseb J* **18**(6): 664-75
48. Frank, S., M. Madlener, et al. (1998). "Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair." *J Invest Dermatol* **111**(6): 1058-64.
49. Frank, S., H. Kampfner, et al. (2002). "Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator." *Kidney Int* **61**(3): 882-8.
50. Fuchs, J. and L. Packer (1990). "Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **7**(2): 90-2.
51. Furchgott, R. F. (1955). "The pharmacology of vascular smooth muscle." *Pharmacol Rev* **7**(2): 183-265.
52. Furchgott, R. F. (1991). "Endothelium-dependent relaxation, endothelium-derived relaxing factor and photorelaxation of blood vessels." *Semin Perinatol* **15**(1): 11-5.
53. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzski (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-6
54. Gabel, S. A., H. R. Cross, et al. (1997). "Decreased intracellular pH is not due to increased H⁺ extrusion in preconditioned rat hearts." *Am J Physiol* **273**(5 Pt 2): H2257-62.
55. Ghosh, D. K. and D. J. Stuehr (1995). "Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction." *Biochemistry* **34**(3): 801-7.
56. Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* **6**(10): 995-1001.

57. Giustizieri, M. L., C. Albanesi, et al. (2002). "Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo." *Am J Pathol* **161**(4): 1409-18.
58. Goldstein, S., A. Russo, et al. (2003). "Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with *NO, *NO₂, and O₂-*." *J Biol Chem* **278**(51): 50949-55.
59. Grether-Beck, S., Buettner, R. and Krutmann, J. (1997). "Ultraviolet A Radiation-Induced Expression of Human Genes: Molecular and Photobiological Mechanisms." *Biol. Chem.* **378**: 1231-1236
60. Griffith, O. W. and D. J. Stuehr (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." *Annu Rev Physiol* **57**: 707-36.
61. Guyton, A. C. and Hall, J. E. (1996). Textbook of Medical Physiology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
62. Haddad, I. Y., S. Zhu, et al. (1996). "Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide." *Am J Physiol* **270**(6 Pt 1): L898-906.
63. Hasse, S., S. Kothari, et al. (2005). "In vivo and in vitro evidence for autocrine DCoH/HNF-1alpha transcription of albumin in the human epidermis." *Exp Dermatol* **14**(3): 182-7.
64. Heid, C. A., J. Stevens, et al. (1996). "Real time quantitative PCR." *Genome Res* **6**(10): 986-94.
65. Holbrook, K.A., Wolff, K. (1987) "The structure and development of skin", in *Dermatology in General Medicine*, Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K., Freedberg I.M., Austen K.F., Eds., McGraw-Hill, New York, 93
66. Ignarro, L. J., R. E. Byrns, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." *Circ Res* **61**(6): 866-79.
67. Jaffrey, S. R., H. Erdjument-Bromage, et al. (2001). "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide." *Nat Cell Biol* **3**(2): 193-7.
68. Jankowski, J. J., Kieber, D. J. and Mopper, K. (1999). "Development and intercalibration of ultraviolet solar actinometers." *Photochem Photobiol* **70**: 319-328.
69. Jimbow, K., W. C. Quevedo, Jr., et al. (1976). "Some aspects of melanin biology: 1950-1975." *J Invest Dermatol* **67**(1): 72-89.
70. Kang-Rotondo, C. H., S. Major, et al. (1996). "Upregulation of nitric oxide synthase in cultured human keratinocytes after ultraviolet B and bradykinin." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **12**(2): 57-65.
71. Karlsson, J. O., K. L. Axelsson, et al. (1984). "Effects of ultraviolet radiation on the tension and the cyclic GMP level of bovine mesenteric arteries." *Life Sci* **34**(16): 1555-63.

72. Kashiba-Iwatsuki, M., K. Kitoh, et al. (1997). "Ascorbic acid and reducing agents regulate the fates and functions of S-nitrosothiols." *J Biochem (Tokyo)* **122**(6): 1208-14.
73. Khan, B. V., D. G. Harrison, et al. (1996). "Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(17): 9114-9.
74. Kharitonov, V. G., Bonaventura, J. and Sharma, V. S. (1996). In *Methods in Nitric Oxide Research*, eds. Feelish, M. and Stamler, J. S., pp 39-45, (Wiley, Chichester, U.K.)
75. Kirsch, M, Korth, HG, Sustmann, R, de Groot, H (2002). "The biochemistry of nitrogen dioxide." *Biol Chem* **383**(3-4):389-99
76. Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." *Biochem J* **298** (Pt 2): 249-58.
77. Kobzik, L., Reid, M.B., Brecht, D.S., Stamler, J.S. (1994) "Nitric oxide in skeletal muscle." *Nature (London)* **372**: 546-548
78. Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen (1992). "Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity." *Immunol Today* **13**(5): 157-60
79. Kolb-Bachofen, V., Kroncke, K.-D., Fehsel, K., Suschek, C. (2000) "Role of inducible nitric oxide synthase in autoimmune or other immune-mediated diseases." In Ignarro LJ (ed), pp 811-821, Academic Press, New York
80. Kone B.C. (2000) "Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases." *Acta Physiol. Scand.* **168**: 27-31
81. Kraemer, K. H. (1997). "Sunlight and skin cancer: another link revealed." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 11-4.
82. Krischel, V., Bruch-Gerharz, D., Suschek, C., Kroncke, K.D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V. (1998). "Biphasic effect of exogenous nitric oxide (NO) on proliferation and differentiation in skin-derived keratinocytes but not fibroblasts." *J Invest Dermatol* **111**: 286-291
83. Kröncke, K. D., K. Fehsel, et al. (1994). "Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9." *Biochem Biophys Res Commun* **200**(2): 1105-10.
84. Kröncke, K.-D., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V. (2000) "Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity." *Antioxidants & Redox Signalling* **2**, Number 3
85. Kröncke, K.-D., Fehsel, K., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen V. (2001) "Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival." *International Immunopharmacology* **1**: 1407-1420

86. Kröncke, K. D., K. Fehsel, et al. (1995). "Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(6): 327-43.
87. Kröncke, K. D., K. Fehsel, et al. (1997). "Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?" *Nitric Oxide* **1**(2): 107-20.
88. Kubaszewski, E., A. Peters, et al. (1994). "Light-activated release of nitric oxide from vascular smooth muscle of normotensive and hypertensive rats." *Biochem Biophys Res Commun* **200**(1): 213-8.
89. Kuhn, A., K. Fehsel, et al. (1998). "Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus." *J Invest Dermatol* **111**(1): 149-53.
90. Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, et al. (2000). "3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures." *Nucleic Acids Res* **28**(2): 655-61.
91. Lauer, T., M. Preik, et al. (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12814-9.
92. Le Page, F., A. Margot, et al. (1995). "Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells." *Carcinogenesis* **16**(11): 2779-84.
93. Leone, A. M., R. M. Palmer, et al. (1991). "Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline." *J Biol Chem* **266**(35): 23790-5.
94. Liew, F. Y. and F. E. Cox (1991). "Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide." *Immunol Today* **12**(3): A17-21.
95. Linscheid, P, Schaffner, A and Schoedon, G. (1998). "Modulation of inducible nitric oxide synthase mRNA stability by tetrahydrobiopterin in vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1):137-41
96. Lobysheva, II, V. A. Serezhenkov, et al. (1999). "Interaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro." *Biochemistry (Mosc)* **64**(2): 153-8.
97. Lowenstein, C. J. and S. H. Snyder (1992). "Nitric oxide, a novel biologic messenger." *Cell* **70**(5): 705-7.
98. Lundberg, J. O., E. Weitzberg, et al. (1994). "Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air." *Gut* **35**(11): 1543-6.
99. Matsunaga, K. and R. F. Furchgott (1989). "Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta." *J Pharmacol Exp Ther* **248**(2): 687-95.

100. Matsunaga, K. and R. F. Furchgott (1991). "Responses of rabbit aorta to nitric oxide and superoxide generated by ultraviolet irradiation of solutions containing inorganic nitrite." *J Pharmacol Exp Ther* **259**(3): 1140-6.
101. Megson, IL, Flitney, FW, Bates, J, Webster, R (1995). "Repriming of vascular smooth muscle photorelaxation is dependent upon endothelium-derived nitric oxide." *Endothelium* **3**:39-46
102. Megson, I. L., S. A. Holmes, et al. (2000). "Selective modifiers of glutathione biosynthesis and 'repriming' of vascular smooth muscle photorelaxation." *Br J Pharmacol* **130**(7): 1575-80.
103. Messmer, U. K., M. Ankarcrone, et al. (1994). "p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis." *FEBS Lett* **355**(1): 23-6.
104. Millar, T. M., C. R. Stevens, et al. (1998). "Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions." *FEBS Lett* **427**(2): 225-8.
105. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991) "Nitric oxide – physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**: 109-142
106. Moran, L. K., J. M. Gutteridge, et al. (2001). "Thiols in cellular redox signalling and control." *Curr Med Chem* **8**(7): 763-72
107. Mori, M., Gotoh, T. (2000) "Relationship between arginase activity and nitric oxide production." In: L.J. Ignarro (Ed.) Nitric oxide: Biology and Pathobiology, Academic Press, San Diego, pp. 199-208
108. Nakane, M., Schmidt, H.H.H.W., Pollok, J.S. et al. (1993) "Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle." *FEBS Lett.* **316**: 175-180
109. Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." *Faseb J* **6**(12): 3051-64.
110. Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." *Cell* **78**(6): 915-8.
111. Nedvetsky, P.I., Sessa, W.C., Schmidt, H.H. (2002) "There's NO binding like NOS binding: protein-protein interactions in NO/cGMP signaling." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16510-16512
112. Nguyen, T., D. Brunson, et al. (1992). "DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 3030-4.
113. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122): 524-6.

-
114. Peak, M. J., J. G. Peak, et al. (1985). "Different (direct and indirect) mechanisms for the induction of DNA-protein crosslinks in human cells by far- and near-ultraviolet radiations (290 and 405 nm)." *Photochem Photobiol* **42**(2): 141-6.
115. Peak, M. J., J. G. Peak, et al. (1987). "Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms." *Photochem Photobiol* **45**(3): 381-7.
116. Quevedo, W. C., Jr. and R. D. Fleischmann (1980). "Developmental biology of mammalian melanocytes." *J Invest Dermatol* **75**(1): 116-20.
117. Rafikova, O., Rafikov, R., Nudler, E. (2002). "Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: The mechanism and implication in vascular control." *Proc Natl Acad Sci USA*. **99** (9): 5913-8
118. Rao, C. N. R. and Bhaskar, K. R. (1981). In *The Chemistry of Nitro and Nitroso Groups*, ed. Feuer, H., pp 153-154, (Krieger, Huntington, NY)
119. Ricciarelli, R., J. M. Zingg, et al. (2001). "Vitamin E: protective role of a Janus molecule." *Faseb J* **15**(13): 2314-25
120. Richter, C. (1995). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing." *Int J Biochem Cell Biol* **27**(7): 647-53.
121. Rodriguez, J., R. E. Maloney, et al. (2003). "Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 336-41.
122. Romero-Graillet, C., E. Aberdam, et al. (1996). "Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes." *J Biol Chem* **271**(45): 28052-6.
123. Sasaki, M., J. Yamaoka, et al. (2000). "The effect of ultraviolet B irradiation on nitric oxide synthase expression in murine keratinocytes." *Exp Dermatol* **9**(6): 417-22.
124. Schaffer, M. R., U. Tantry, et al. (1997). "Nitric oxide metabolism in wounds." *J Surg Res* **71**(1): 25-31.
125. Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, et al. (1993). "Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts." *FEBS Lett* **331**(3): 304-6.
126. Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, et al. (1997). "UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging." *Biol Chem* **378**(11): 1247-57.
127. Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Herrmann, G., Lehmann, P., Goerz, G., Mauch, C., Plewig, G. (1992) "Mechanisms of cutaneous photoaging." In: *The Environmental Threat of the Skin*. G. Plewig and R. Marks, eds. (London: Martin Dunitz Publishers), pp. 72-82

128. Scharffetter-Kochanek, K. (1997) "Photodamage of the skin; prevention and therapy." In: *Antioxidants in Disease – Mechanisms and Therapeutic Strategies, Advances in Pharmacology*, H. Sies, ed., (San Diego, USA: Academic Press), pp. 639-655
129. Schmidt, H. H. and U. Walter (1994). "NO at work." *Cell* **78**(6): 919-25.
130. Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, et al. (2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods." *Anal Biochem* **285**(2): 194-204.
131. Schwentker, A., Y. Vodovotz, et al. (2002). "Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?" *Nitric Oxide* **7**(1): 1-10
132. Senegal, P. (1976) "Morphogenesis of skin", Cambridge University Press, London?" *Nitric Oxide* **7**(1): 1-10.
133. Shaul, P.W., North, A.J., Wu, L.C. et al. (1994) "Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchial epithelium." *J. Clin. Invest.* **94**: 2231-2236
134. Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10771-8.
135. Shindo, Y., E. Witt, et al. (1993). "Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light." *J Invest Dermatol* **100**(3): 260-5.
136. Shindo, Y., E. Witt, et al. (1994). "Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin." *J Invest Dermatol* **102**(1): 122-4.
137. Soter, N. A. (1983). "Mast cells in cutaneous inflammatory disorders." *J Invest Dermatol* **80** Suppl: 22s-25s.
138. Spearman, R. I. (1974). "Alteration of keratinization in mouse ear epidermis in recombinant grafts with tail dermis." *Acta Anat (Basel)* **89**(2): 195-202.
139. St Croix, CM, Wasserloos, KJ, Dineley, KE, Reynolds, IJ, Levitan, ES, Pitt, BR (2002). "Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**:L185-L192.
140. Stallmeyer, B., H. Kampfer, et al. (1999). "The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization." *J Invest Dermatol* **113**(6): 1090-8.
141. Stamler, J. S. (1994). "Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide." *Cell* **78**(6): 931-6.
142. Stamler, J. S., S. Lamas, et al. (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." *Cell* **106**(6): 675-83.

-
143. Stenn, K.S. (1983) "The skin, in *Histology, Cell and Tissue Biology*", Weiss, L., Ed., Elsevier Biomedical, New York, 569
144. Stingl, G., Wolff, K. (1987) "Langerhans cells and their relation to other dendritic cells and mononuclear phagocytes", in *Dermatology in General Medicine*, Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K., Freedberg I.M., Austen K.F., Eds., McGraw-Hill, New York, 410
145. Stuehr, D. J. (2004). "Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway." *J Nutr* 134(10 Suppl): 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.
146. Suschek, C., Schuy, V., Bruch-Gerhartz, D., Kröncke, K.D., Kruttmann, J., Kolb-Bachofen, V. (1998) "Nitric oxide protects endothelial cells from UVA-induced apoptosis by the increase in Bcl-2 expression and scavenging of reactive oxygen intermediates." *Arch Dermatol Res* **290**: 34
147. Suschek, C. V., V. Krischel, et al. (1999). "Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation." *J Biol Chem* **274**(10): 6130-7.
148. Suschek, C. V., K. Briviba, et al. (2001). "Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis." *Cell Death Differ* **8**(5): 515-27.
149. Suschek, C. V., P. Schroeder, et al. (2003). "The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis." *Faseb J* **17**(15): 2342-4.
150. Suschek, C. V., Paunel, A., Kolb-Bachofen V. (2005). "Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure." *Methods in Enzymology*, Vol. 396
151. Tabuchi, A., K. Sano, et al. (1994). "Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1." *FEBS Lett* **351**(1): 123-7.
152. Venturini, C. M., R. M. Palmer, et al. (1993). "Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide." *J Pharmacol Exp Ther* **266**(3): 1497-500.
153. Wang, R., A. Ghahary, et al. (1996). "Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms." *J Invest Dermatol* **106**(3): 419-27.
154. Warren, J. B., R. K. Loi, et al. (1993). "Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo." *Br J Pharmacol* **109**(3): 802-6.
155. Weiss, G., H. Wachter, et al. (1995). "Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism." *Immunol Today* **16**(10): 495-500.
156. Weller, R., S. Pattullo, et al. (1996). "Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate." *J Invest Dermatol* **107**(3): 327-31.

-
157. Weller, R., R. J. Price, et al. (2001). "Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens." *J Appl Microbiol* **90**(4): 648-52.
158. Weller, R. (2003). "Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology." *Clin Exp Dermatol* **28**(5): 511-4.
159. Wigilius, I. M., K. L. Axelsson, et al. (1990). "Effects of sodium nitrite on ultraviolet light-induced relaxation and ultraviolet light-dependent activation of guanylate cyclase in bovine mesenteric arteries." *Biochem Biophys Res Commun* **169**(1): 129-35.
160. Williams D.L.H. (1988) " Nitrosation" (Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press)
161. Wink, D. A., J. A. Cook, et al. (1995). "Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species." *Toxicol Lett* **82-83**: 221-6.
162. Wink, D. A. and J. B. Mitchell (1998). "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide." *Free Radic Biol Med* **25**(4-5): 434-56.
163. Wolff, K. (1973). "Melanocyte-keratinocyte interactions in vivo: the fate of melanosomes." *Yale J Biol Med* **46**(5): 384-96.
164. Wood, P. D., Mutus, B. and Redmond, R. W. (1996). *Photochem Photobiol* **64**: 518-524
165. Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *J Nutr* **134**(3): 489-92.
166. Xie, Q. and C. Nathan (1994). "The high-output nitric oxide pathway: role and regulation." *J Leukoc Biol* **56**(5): 576-82.
167. Yakes, F. M. and B. Van Houten (1997). "Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 514-9.
168. Yang, J. H., H. C. Lee, et al. (1995). "Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin." *Arch Dermatol Res* **287**(7): 641-8.
169. Yin, J. L., N. A. Shackel, et al. (2001). "Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I." *Immunol Cell Biol* **79**(3): 213-21.
170. Zhang, Y. Y., A. M. Xu, et al. (1996). "Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity." *J Biol Chem* **271**(24): 14271-9.

171. Zhang, Z., Naughton, D., Winyard, P.G., Benjamin, N., Blake, D.R. and Symons, M.C. (1998). "Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity." *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 767-772
172. Zweier, J. L., P. Wang, et al. (1995). "Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues." *Nat Med* **1**(8): 804-9.
173. Zweier, J. L., A. Samouilov, et al. (1999). "Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 250-62.

7 Abkürzungen

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Biotin-HPDP	(N-(6-(Biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CLD	Chemilumineszenzdetektion
COX	Cyclooxygenase
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniomethyl)amino]diazene-1,2-diolat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpenta-Essigsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fötale Kälberserum
FMN	Flavinadeninmononukleotid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion
HEN	Hepes-gepufferte Salzlösung
HgCl ₂	Quecksilberchlorid
HH	Hauthomogenate
HRP	horseradish peroxidase
HSA	humanes Serumalbumin
IFN	Interferon
IL	Interleukin

KC	Keratinocyten
KCL	Keratinocyten-Lysate
MAMA/NO	(Z)-1- <i>{N-methyl-N-[6-(N-methyl-ammoniohexyl)amino]}</i> diazen-1-ium-1,2-diolat
MGB	minor groove binding
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMTS	Methylmethanthiosulfonat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
L-NIO	L-N-(-Iminoethyl)-ornithindihydrochlorid
L-NMA	L-N _G -Methyl-L-Arginin
NO	Stickstoffmonoxid
NO ⁺	Nitrosoniumkation
NO ⁻	Nitroxylanion
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
cNOS	konstitutive NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NTC	non template control
ONOO ⁻	Peroxinitritanion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RFL	rat lung fibroblastoma cells
RNOI	reaktive Stickoxid Intermediate
RNNO	N-Nitrosamine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	S-Nitrosothiole

cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXNO	nitrosierte Verbindungen
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
Th	T-Helfer-Lymphozyten
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UV	ultraviolette Strahlung

8 Danksagung

Herrn PD Dr. Christoph Suschek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die überaus lustige Zeit in den vergangenen drei Jahren. Ein herzliches Dankeschön auch für die kritische Betrachtung der Ergebnisse und moralische Unterstützung. Frau Prof. Dr. Kolb-Bachofen danke ich für die intensive Betreuung und die wertvollen Hilfestellungen im Laboralltag.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich danke ich für die Übernahme der Betreuung in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU.

Ein besonderer Dank an Frau Marija Lenzen, die gute Seele der gesamten Gruppe, die mir oft genug in hektischen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr und Frau Christa Wilkens-Roth danke ich natürlich auch für den Klatsch und Tratsch im Kaffeeraum und die Tipps zur Babypflege.

Danke auch an:

Frau Miriam Cortese für die hervorragende Zusammenarbeit und die intensiven Diskussionsrunden.

Herrn Jörg Liebmann für die angenehme Atmosphäre im Labor und dafür, dass er uns Mädels die ganze Zeit „erträgt“.

Frau Daniela Kremer für erheiternde Stunden an der CLD.

Frau Sabine Koch und Nicole Fitzner für kleine Tipps im Labor.

Ein besonderer Dank an dieser Stelle auch an Paris aus dem kardiologischen Labor für die Einführung in die CLD.

Vom ganzen Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, insbesondere bei meinem Vater, für die Unterstützung, ohne die diese Arbeit und die Kindererziehung nicht möglich gewesen wären. Meinem Ehemann Orhan danke ich für seine Geduld und die guten Ratschläge während der gesamten Studienzeit und Doktorarbeit. Danke auch an meinem süßen Sohn Deniz dafür, dass es ihn gibt und er mir täglich durch seine liebevolle Art Kraft und Freude schenkt.

Bedanken möchte ich mich auch an das gesamte OP-Team (besonders Schwester Gerdi) und den Patienten des Florence-Nightingale-Krankenhauses in Kaiserswerth, die mir die Haut für die Erstellung dieser Arbeit bereitwillig zur Verfügung gestellt haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Adnana-Nicoleta Paunel-Görgülü
Adresse: Ruprechtstr. 29
46049 Oberhausen
Geburtsdatum: 01.12.1977
Geburtsort: Jassy (Rumänien)
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984-1988: Grundschule in Jassy
1988-1990: Lyzeum in Jassy
1990-1997: Elsa-Brändström-Gymnasium in Oberhausen

Hochschulbildung

10/1997-11/2002 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
03/2002-11/2002 Diplomarbeit in der Abteilung für molekulare
Parasitologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf:
Charakterisierung von *imap*-Genen aus Maus und Mensch
Abschluss: Diplom-Biologin
12/2002-01/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Forschungsgruppe
Immunbiologie im Institut für molekulare Medizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

ab 02/2006

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe
Neuroanatomie im Institut für Anatomie am
Universitätsklinikum Essen