

**Modulation der oxidativen Stressreaktion in dermalen Fibroblasten.
Ein Vergleich von Normalhaut zur atopischen Haut**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Claudia Mundt

aus Bremen

Hamburg 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1997 bis März 2000 unter der Leitung von Professor Dr. G. Gercken am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Biochemie, an der Universität Hamburg in Kooperation mit der Beiersdorf AG Hamburg, Abt. „Forschung Haut/Gesicht“ angefertigt.

1. Gutachter:	Prof. Dr. Gercken
2. Gutachter:	Prof. Dr. Bredehorst
letzte mündliche Prüfung:	08.12.2000

Inhaltsverzeichnis

	Seiten
Inhaltsverzeichnis	I - VII
Abkürzungen.....	VIII – XI
1. Einleitung	1
1.1. Die Haut.....	1
1.2. Atopische Dermatitis.....	3
1.3. Oxidativer Stress in der Haut	4
1.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies – Radikale und Nicht-Radikale.....	7
1.3.2. Das Antioxidanssystem der Haut - Verteidigung gegen oxidativen Stress	8
1.3.2.1. Nicht-enzymatische, hydrophile Antioxidantien	8
1.3.2.2. Nicht-enzymatische, lipophile Antioxidantien	9
1.3.2.3. Enzymatische Antioxidantien	10
1.3.3. Reaktive sauerstoffspezies-vermittelte Regulation zellphysiolo- gischer Vorgänge	11
1.3.3.1. MAP-Kinase-Kaskaden	11
1.4 Ziel der Arbeit	14

2.	Material.....	15
2.1.	Laborgeräte.....	15
2.1.1.	Großgeräte	15
2.1.2.	Kleingeräte	16
2.1.3.	Meßgeräte	16
2.1.4.	UV-Bestrahlungsgeräte	17
2.2.	Geräte und Material für spezielle Arbeiten und Methoden	17
2.2.1.	Geräte und Material für Zellkulturarbeiten	17
2.2.2.	Geräte und Material für histologische Arbeiten	19
2.2.3.	Geräte und Material für gelelektrophoretische Arbeiten	19
2.2.4.	Material für Tyrosinkinase- und Phosphotyrosinphosphatase- bestimmungen.....	20
2.2.5.	Material für ATP-Bestimmungen	20
2.3.	Chemikalien	21
2.3.1.	Standard-Chemikalien und -Puffer	21
2.3.2.	Chemikalien und Puffer für Zellkulturarbeiten	21
2.3.3.	Chemikalien und Puffer für histologische Arbeiten.....	22
2.3.4.	Chemikalien und Puffer für zelluläre Extrakte	22
2.3.5.	Chemikalien und Puffer für gelelektrophoretische Arbeiten	23
2.3.6.	Chemikalien und Puffer für Tyrosinkinase- und Phosphotyrosin- phosphatasebestimmungen	23
2.3.7.	Chemikalien und Puffer für p38 MAP Kinase Assay	24
2.3.8.	Chemikalien und Puffer für ATP-Bestimmungen.....	24
2.4.	Verwendete Antikörper	25
2.4.1.	Antikörperverdünnungen	25
2.5.	Puffer und Lösungen.....	26

3.	Methoden	30
3.1.	Sicherheit und Entsorgung.....	30
3.2.	<i>In vitro</i> Versuche	30
3.2.1.	Herkunft der verwendeten Zellen	30
3.2.2.	Zellkultur.....	31
3.2.3.	Isolierung dermalen Zellen aus Hautbiopsien	31
3.2.4.	Kultivierung und Subkultivierung dermalen Fibroblasten	32
3.2.5.	Zellzahlen bei der Aussaat	32
3.2.6.	Einfrieren der Zellen	33
3.2.7.	Auftauen eingefrorener Zellen.....	33
3.3.	<i>In vitro</i> Experimente zur Überprüfung zellulärer Funktionen	33
3.3.1.	Experimente zum ungestressten Grundstatus	33
3.3.1.1.	Bestimmung der Grundstati.....	34
3.3.2.	Stressexperimente	34
3.3.2.1.	Stressexperimente mit H ₂ O ₂	35
3.3.2.2.	Stressexperimente mit UVA-Licht	35
3.3.2.2.1.	Bestimmung der UVA-Dosis.....	35
3.3.2.3.	Experimente mit Anisomycin	35
3.3.3.	<i>In vitro</i> Inkubation mit Antioxidantien.....	36
3.4.	<i>In vitro</i> Untersuchung verschiedener Parameter der Zellphysiologie nach oxidativem Stress.....	36
3.4.1.	Bestimmung des zellulären Gesamtthiolstatus.....	36
3.4.2.	Bestimmung des zytoplasmatischen Peroxidstatus	37
3.4.3.	Bestimmung des Esterasefunktionsstatus	37
3.4.4.	Bestimmung des Phosphotyrosingehalts	38
3.4.5.	Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials	38
3.4.6.	Bestimmung der relativen Zellzahl	39
3.4.7.	Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes.....	40

3.5.	Herstellung zytoplasmatischer Extrakte.....	40
3.5.1.	Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen	41
3.5.1.1.	Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen für Phosphotyrosinphosphataseaktivitätsbestimmungen.....	41
3.5.1.2.	Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen für Tyrosinkinaseaktivitätsbestimmungen	42
3.5.2.	Phosphotyrosinphosphataseaktivitätsbestimmung.....	42
3.5.3.	Tyrosinkinaseaktivitätsbestimmung.....	43
3.5.4.	p38 MAP-Kinase-Aktivitätsbestimmung	44
3.6.	Western-Blot-Analyse.....	45
3.6.1.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	45
3.6.2.	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE	45
3.6.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.6.4.	Proteintransfer auf Trägermembranen (Western-Blotting)	47
3.6.5.	Gelfärbung	47
3.6.6.	Immunologische Detektion von Proteinen.....	48
3.6.6.1.	Detektion von Phosphotyrosinproteinen.....	48
3.6.6.2.	Detektion von aktivierter ERK 1/2-Kinase	49
3.6.6.3.	Detektion von aktivierter JNK/SAP-, JNK/SAP- und ERK1/2-Kinase	49
3.6.6.4.	Detektion von ATF-2	50
3.6.7.	„Enhanced Chemiluminescence“-Detektion	50
3.6.7.1.	„Enhanced Chemiluminescence“-Detektion der gebundenen Antikörper.....	50
3.6.8.	Strippen der Membran.....	51
3.7.	Statistische Auswertungen.....	51
3.8.	Fotodokumentation der Ergebnisse.....	51

4.	Ergebnisse	52
4.1.	Ergebnisse zum ungestressten Grundzustand.....	52
4.1.1.	Relative Zellzahl von Fibroblasten.....	52
4.1.2.	Gehalt an löslichen Peroxiden in Fibroblasten	53
4.1.3.	Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten	54
4.1.4.	Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten	56
4.1.5.	ATP-Gehalt in Fibroblasten	57
4.1.6.	Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten	58
4.1.7.	Tyrosinkinase-Aktivität in Fibroblasten.....	60
4.1.8.	Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten.....	61
4.1.9.	MAP-Kinase-Kaskaden in Fibroblasten.....	62
4.1.9.1.	JNK in Fibroblasten	62
4.1.9.2.	p38 in Fibroblasten.....	63
4.1.9.3.	ERK1/2 in Fibroblasten	64
4.2.	Ergebnisse nach H₂O₂-Inkubation.....	65
4.2.1.	Relative Zellzahl von Fibroblasten nach H ₂ O ₂ -Inkubation	65
4.2.2.	Esterasefunktionsstatus in Fibroblasten nach H ₂ O ₂ -Inkubation	66
4.2.3.	Gehalt an löslichen Peroxiden in Fibroblasten nach H ₂ O ₂ -Inkubation	67
4.2.4.	Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten nach H ₂ O ₂ - Inkubation.....	68
4.2.5.	Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach H ₂ O ₂ -Inkubation	69
4.2.6.	Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten nach H ₂ O ₂ -Inkubation	70

4.3.	Ergebnisse nach UVA-Bestrahlung.....	71
4.3.1.	Relative Zellzahl von Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung	71
4.3.2.	Esterasefunktionsstatus in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	72
4.3.3.	Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	73
4.3.4.	Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	74
4.3.4.1.	Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach UVA- Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Coenzym Q10, O-Acetyl-Carnitin oder Alpha-Glucosylrutin	75
4.3.5.	ATP-Gehalt in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	80
4.3.6.	Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	81
4.3.7.	Tyrosinkinaseaktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung ..	84
4.3.8.	Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	85
4.3.8.1.	Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Coenzym Q10, O-Acetyl-Carnitin oder Alpha-Glucosylrutin	86
4.3.9.	MAP-Kinase-Kaskaden in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	87
4.3.9.1.	JNK in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	88
4.3.9.2.	p38 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung	89
4.3.9.3.	ERK1/2 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung.....	91
4.3.9.3.1.	Aktivierung von ERK1/2 durch Anisomycin	92
4.3.9.3.2.	Aktivierung von ERK1/2 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Alpha-Glucosylrutin	94

5.	Diskussion	96
5.1.	Wahl der oxidativen Stressoren	96
5.2.	Oxidativer Stress in humanen Hautzellen	97
5.2.1.	Deregulation pro- und antioxidativer Prozesse bei Patienten mit atopischer Dermatitis.....	97
5.2.2.	Mitochondrien als Quelle und Ziel der oxidativen Stressbelastung.....	98
5.2.2.1.	Coenzym Q10, O-Acetylcarnitin und Alpha-Glucosylrutin als Stabilisatoren des mitochondrialen Membranpotentials	101
5.2.3.	Veränderte Signaltransduktion bei atopischer Dermatitis – Folge einer veränderten oxidativen Stressantwort?	103
5.2.3.1.	Aktivierung von MAP-Kinasen	106
5.3.	Eine abschließende Betrachtung	110
6.	Zusammenfassung	111
7.	Summary	113
8.	Literatur	115

Anhang

I.	Curriculum vitae
II.	Publikationen
III.	Vorträge
IV.	Danksagung

Abkürzungen

-	ohne
%	Prozent
*	signifikant
**	hochsignifikant
+	mit
°C	Grad Celsius
µg	Mikro gramm
µl	Mikro liter
¹ O ₂	Singulett-sauerstoff
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
ABTS[®]	Substrat-Puffer
AD	Spender mit atopischer Dermatitis
AGR	Alpha-Glucosylrutin
AM	Acetoxymethyl-Ester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclo Adenosinmonophosphat
cm	Centimeter
cm²	Quadratcentimeter
CoQ10	Coenzym Q10
d. h.	das heißt
DCF	Dichlorofluorescein
DCHF-DA	Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiotreitol

ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immuno(ab)sorbent assay
Em	Emission
ERK1/2	Extracellular regulated kinase 1/2
et al.	Et alii
etc.	et cetera (und andere)
EthD-1	EthidiumhomoDimer-1
EtOH	Ethanol
Ex	Exitation
FADH₂	Flavin-adenin-dinucleotid (reduziert)
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRB-2	growth receptor-bound protein-2
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
H⁺	Proton
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	in Zellkultur (im Reagenzglas)
<i>in vivo</i>	am Lebenden
J	Joule
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide
JNK	c-JUN NH₂-terminal kinase
kD	kiloDaltons
M	Molar
mA	milliAmpere
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAPKK	MAPK-kinase

MAPKKK	MAPKK-kinase
mBrB	monoBromobimane
mg	milligramm
Min.	Minute(n)
ml	milliliter
mM	millimolar
MMP	Mitochondrienmembranpotential
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonucleic acid
mV	millivolt
MW	Molecular weight
N	normalhäutige Spender
n	Stichprobenumfang
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NF-κB	nuclear factor kappa B
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Nucleotide Releasing Substance
O₂⁻	Superoxidradikalanion
O-AC	O-Acetyl-Carnitin
OD	Optische Dichte
OH[·]	Hydroxylradikal
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
pH-Wert	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration (pro Hydrogeni)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PTK	Phosphotyrosinkinase
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert

ROS	reactive o xxygen s pecies (reaktive Sauerstoffspezies)
Rt	R aum t emperatur
s	S ekunde
SAPK	s tress- a ctivated p rotein k inase
SDS	S odium d odecyl s ulfat
SH-2	s rc h omology- 2
SH-Gruppen	S chwefelwasserstoff- G ruppen
SOD	S uper o xiddismutase
TBE	T ris- B orat- E DTA
TCF	t ernary c omplex f actor
TEMED	N,N,N',N' T etramethylethyldiamin
TEWL	transepidermaler W asserverlust
Thr	T hreonin
Tris/Cl⁻	T ris-Hydroxy-Aminomethan (pH mit HCl eingestellt)
Tyr	T yrosin
U	U nit(s)
u. a.	unter a nderem
ü.N.	über N acht
UpM	U mdrehungen p ro M inute
UV	U ltraviolett e s L icht
V	V olt
v/v	v olume per v olume
vgl.	v ergleiche
w/o	w ithout (ohne bivalente Ionen)
w/v	w eight per v olume
z. B.	zum B eispiel

1. Einleitung

1.1. Die Haut

Die Haut stellt die äußere Abgrenzung der Körperoberfläche zur Umgebung dar und schützt das Körperinnere vor chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Noxen. Ferner spielt die Haut bei immunologischen Prozessen, sowie der Regulation des Temperatur-, Elektrolyt- und Wasserhaushaltes eine wichtige Rolle. Das Glutathionredoxsystem und das Zytochrom-P450-System tragen in der Haut zur Entgiftung und zur Abwehr von prooxidativen Prozessen bei.

Die Haut (Abb. 1.1.) gliedert sich in Kutis (Epidermis und Dermis), Tela subcutanea (Subkutis, Unterhaut) und Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, Drüsen) (Junqueira & Carneiro, 1991). Die Epidermis (Oberhaut) besteht, als äußerste, unmittelbar der Umwelt zugewandter Hautschicht aus einem mehrschichtigen, keratinisierten Plattenepithel, das eine Dicke von 0,04 bis 1,5 mm aufweist. Das Vorkommen dieser Schichten basiert auf den verschiedenen Differenzierungsstadien epidermaler Zellen mit ektodermalem Ursprung, den Keratinozyten. Die Keratinozyten verleihen der Epidermis auch ihre typische Morphologie. Von apikal nach basal lassen sich fünf unterschiedliche Schichten der Epidermis unterscheiden: stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum und stratum basale. Wie fast alle Epithelien ist die Epidermis nicht vaskularisiert und wird durch das von ihr bedeckte Bindegewebe (Dermis) mit Nährstoffen versorgt. Die bindegewebige Dermis, die je nach Hautareal bis zu 3 mm dick ist, verleiht der Haut hohe Zerreißfestigkeit und bestimmt während der Entwicklung die Beschaffenheit der apikal angrenzenden Epidermis. Daneben beherbergt sie die meisten Sinneszellen, umschließt die Hautanhangsgebilde, ist zudem stark innerviert und über ein ausgedehntes Gefäßnetz sehr gut vaskularisiert. Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten: stratum papillare und stratum reticulare.

Beide Schichten weisen einen hohen Gehalt an wasserbindenden Glykosaminoglykanen auf, unterscheiden sich aber im Fettanteil. In der Dermis finden sich ortsständige (Fibroblasten, Fibrozyten) und freie Bindegewebszellen (Leukozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen). Fibroblasten und deren ruhende Form, Fibrozyten, dienen sowohl der Faserbildung (Kollagene, retikuläre und elastische Fasern) und der Synthese von Grundsubstanzen (Glykosaminoglykane) als auch des Faserabbaus (Kollagenasen). Freie Bindegewebszellen stehen dagegen vorrangig im Dienst der Immunantwort. Das dünnere stratum papillare besteht aus lockerem Bindegewebe und erleichtert durch die Verzahnung mit der Epidermis deren Nährstoffversorgung. Das stratum reticulare zeichnet sich durch kräftige Faserbündeln vom Kollagen Typ I und durch ein Netzwerk elastischer Fasern aus. Dies gewährleistet einerseits hohe Zugfestigkeit der Haut, andererseits werden darüber die elastischen Eigenschaften vermittelt. Die Subcutis besteht aus einer von lockerem Bindegewebe durchzogenen Fettschicht (Depot- und Baufett). Bei den Hautanhangsgebilden (Haare, Fingernägel, Drüsen) handelt es sich um direkte oder indirekte Ausdifferenzierungen der Epidermis, die ektodermalen Ursprungs sind.

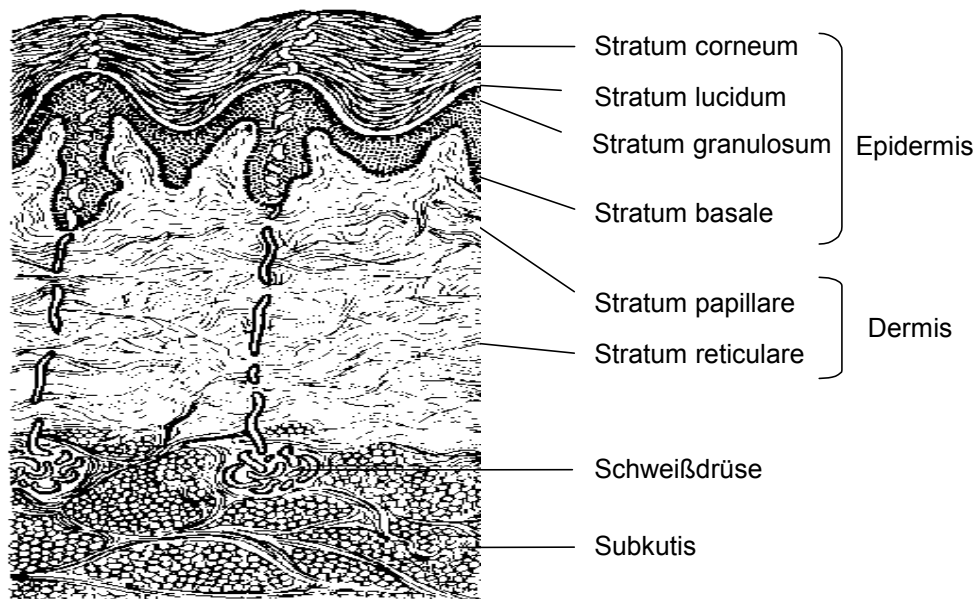


Abb. 1.1. Aufbau der Haut (Junqueira & Carneiro, 1991, modifiziert).

1.2. Atopische Dermatitis

Bei der Atopie handelt es sich um eine Erkrankung, bei der die atopische Dermatitis, das Asthma bronchiale, sowie die allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) bei den einzelnen Individuen in unterschiedlicher Ausprägung auftritt. Während im Kindesalter die atopische Dermatitis im Vordergrund steht (ca. 3-4 % aller Kinder leiden an Manifestation einer atopischen Dermatitis), tritt bei Erwachsenen der Rhinokonjunktivitis verstärkt auf. Neben den drei angeführten Erscheinungsformen, die die Atopie ausmachen, kann man häufig auch eine Nahrungsmittelunverträglichkeit feststellen, die sich dann meist in einer Verschlechterung der atopischen Dermatitis widerspiegelt (Ring, 1991).

Zu den klassischen Stigmata der Atopie gehören eine trockene, juckende Haut sowie das Auftreten eines weißen Dermographismus, einer infra-orbitalen Lidfalte und Hyperlinearität an den Flexorensseiten von Händen und Füßen. Ferner findet man bei Patienten mit atopischer Dermatitis häufig Gesichtsblassheit, dunkle Orbitalbereiche sowie das Hertoghe-Syndrom, d. h. das Ausfallen der seitlichen Partien der Augenbrauen (Przybilla, 1991). Viele Patienten (ca. 40 %) leiden zusätzlich unter den Symptomen von Augenkrankheiten wie dem Katarakt (Garrity et al., 1984). Weiterhin handelt es sich bei der atopischen Dermatitis um eine erbliche Dispositionskrankheit. Sobald ein von Umweltfaktoren abhängiger und individuell variabler Schwellenwert überschritten wird, schlägt die Disposition in Krankheit um. Ca. zwei Drittel der Erkrankten stammen aus einer mit Atopien belasteten Familie.

Als minimale Diagnosekriterien für atopische Dermatitis gelten folgende Punkte: Auftreten der Erkrankung bereits im frühen Kindesalter (jünger als 2 Jahre), ein akut erkennbares Ekzem an den Ellen- und Kniebeugen, generell trockene Haut, das Auftreten von juckenden Hauterscheinungen sowie ein anamnetisches Auftreten von Asthma und/oder Heuschnupfen. Erhöhte IgE-Spiegel, positive Prick- oder Radioallergensorbent-Tests sind keine zwingende Kriterien für eine Diagnose (Williams et al., 1994). Da das Krankheitsbild der atopischen Dermatitis insbesondere durch einen extrem

trockenen und empfindlichen Hautzustand charakterisiert ist, wird es als Model für den Hauttyp „empfindliche Haut“ verwendet.

Die trockene Haut des Atopikers spiegelt sich in einem erhöhten trans-epidermalen Wasserverlust (TEWL) wieder, der wiederum ein Beleg für eine gestörte epidermale Barriere ist (Werner, 1986, Keyhani, 1994). Neben dem erhöhten TEWL findet man bei der atopischen Dermatitis sowohl in läsionaler wie auch nicht-läsionaler Haut eine drastische Verminderung von Harnstoff, der eine wichtige Funktion in der epidermalen Wasserretention wahrnimmt (Wellner et al., 1992).

In den letzten Jahren fanden intensive Untersuchungen zur Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (siehe Abschnitt 1.3.) bei Erkrankungen der Haut statt. Verschiedene Krankheiten wie z. B. atopische Dermatitis, Psoriasis und Vitiligo werden unter anderem durch ROS induziert (Niwa, 1999, Passi et al., 1998). Zusätzlich spielen ROS eine Rolle bei der Entwicklung von Katarakten, einer häufig auftretenden Krankheitserscheinung bei der atopischen Dermatitis (Hutnik & Nichols, 1999). Außerdem konnten Stäb und Mitarbeiter zeigen, daß bei Patienten mit atopischer Dermatitis ein erhöhter Gehalt an intrazellulären Peroxiden vorliegt (Stäb et al., 1995).

1.3. Oxidativer Stress in der Haut

In physiologischen Systemen herrscht ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Vorgängen. Eine Imbalance zugunsten der prooxidativen Seite wird als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1986). Solchen oxidativen Stressbelastungen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist die Haut ständig durch exogene und endogene Faktoren ausgesetzt. Exogen hervorgerufen wird oxidativer Stress durch chemische (H_2O_2 , Umweltnoxen) und physikalische Noxen (z. B. UV-Licht), während er endogen physiologisch im Zellstoffwechsel, z. B. in den Mitochondrien, und pathophysiologisch bei Entzündungsreaktionen gebildet wird (Scharffetter-Kochanek et al., 1997).

Mitochondrien sind die wichtigste endogene Quelle für die Bildung von ROS (Siems et al., 1998). Das Prinzip der biologischen Oxidation in der mitochondrialen Atmungskette besteht darin, den an die reduzierten Coenzyme ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) gebundenen Wasserstoff mit Sauerstoff zu $2 \text{H}_2\text{O}$ umzusetzen und die dabei freiwerdende Energie zur ATP-Erzeugung zu nutzen (Abb. 1.2.). Dabei werden vier Reduktionsäquivalente (H^+ oder Elektronen) auf molekularen Sauerstoff übertragen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es auch abweichend davon zu Ein-, Zwei-, oder Drei-Elektronen-Reduktionen von molekularem Sauerstoff und dadurch zur Bildung von Superoxidradikalanionen, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen als reaktive Sauerstoffspezies. Entscheidend für die mitochondriale ATP-Bildung ist die protonenmotorische Kraft, d. h. das Mitochondrienmembranpotential. Dabei kann eine pH-Wertänderung um den Faktor 1 eine Änderung im Membranpotential von ungefähr 60 mV bewirken und somit entscheidenden Einfluß auf Energieausbeute und ATP-Bildung haben. Eine erhöhte Radikalbelastung führt, neben der Lipidperoxidation mitochondrialer Membranproteine, auch zu einer erhöhten Mutationsrate in der mitochondrialen DNA, die längerfristige Schäden in der Atmungskette nach sich ziehen kann.

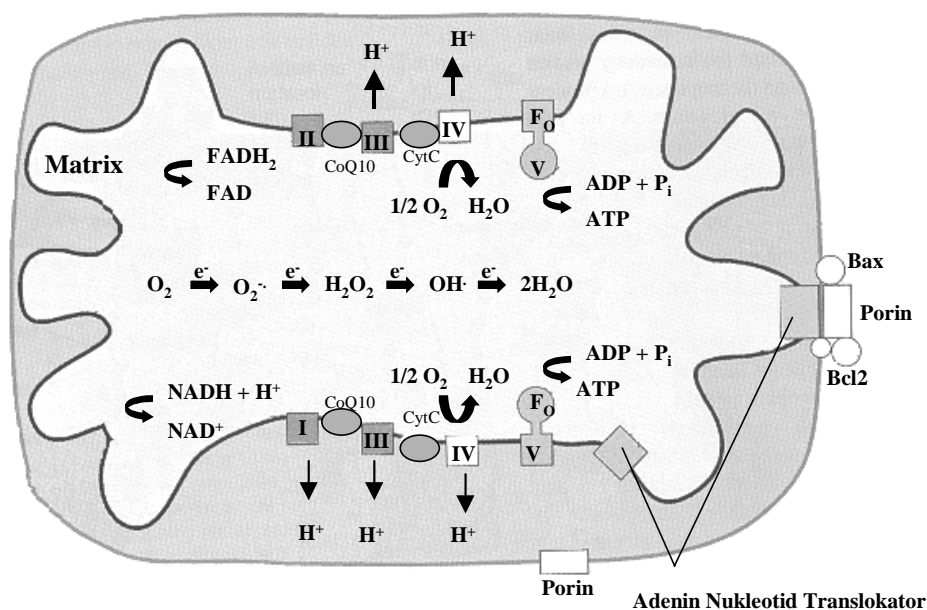


Abb. 1.2. Schematische Darstellung eines Mitochondriums mit exemplarischer Enzymtopologie der mitochondrialen Atmungskette (Wallace, 1999, modifiziert).

Durch exogene Umwelteinflüsse wird ebenfalls oxidativer Stress gebildet. So werden viele photobiologische Effekte und Schädigungen durch ultraviolette Strahlen, d. h. durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt und beeinflusst. Dabei kann ein Photosensibilisator (Riboflavine, Porphyrine, Tryptophan etc.) über Energietransfer durch UV-Licht zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Singulett-Sauerstoff, Superoxidradikalanion) beitragen. UV-Licht hat entsprechend seiner Wellenlänge unterschiedliche Energien und dringt mehr oder minder tief in die Haut ein (Abb. 1.3.).

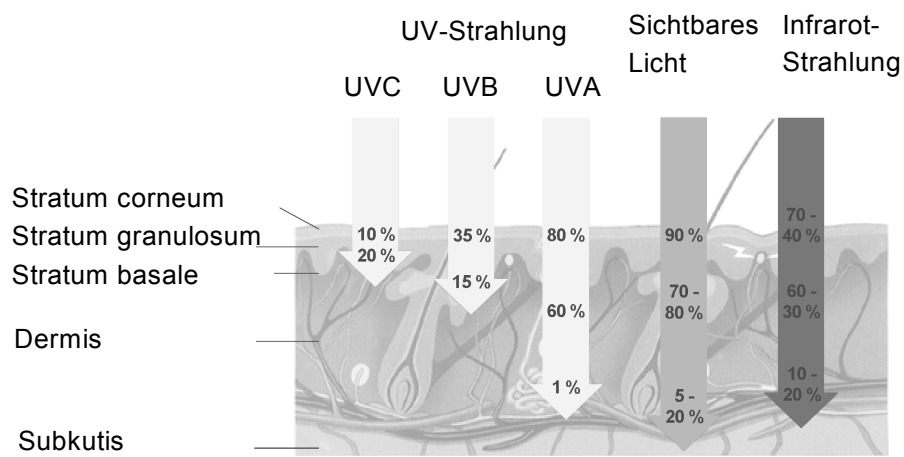


Abb. 1.3. Eindringtiefen des Lichtes in die Haut (Informationsprospekt Eucerin®, Beiersdorf AG, Hamburg, modifiziert).

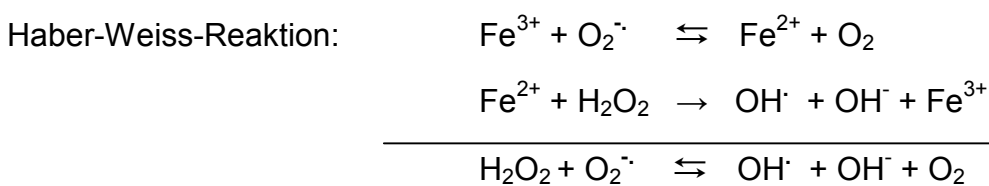
Oxidativer Stress spielt bei einer Reihe von Erkrankungen und Symptomen als ursprünglicher – oder häufiger noch – als begleitender pathogenetischer Faktor eine Rolle (Boh, 1996). Es ist schwierig Krankheiten zu finden, bei denen ROS nicht wichtig sind. Auf alle Fälle sind sie jedoch bei allen Entzündungsprozessen involviert (Hogg, 1998).

1.3.1. Reaktive Sauerstoffspezies – Radikale und Nicht-Radikale

Oxidativer Stress manifestiert sich in Form sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ umfaßt sowohl radikalische als auch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen, die insgesamt aufgrund ihrer Aggressivität von großer Bedeutung für biologische Systeme sind. Die einzelnen ROS entstehen aus unterschiedlichen Quellen, können aber jeweils an der Entstehung anderer reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein (Sies, 1986). Im folgenden sind die wichtigsten ROS, nach abnehmender Reaktivität geordnet ($\text{OH}\cdot$ > $^1\text{O}_2$ > H_2O_2 > $\text{O}_2^{\cdot-}$), dargestellt:

Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$)

Das sehr kurzlebige Hydroxylradikal stellt den Drei-Elektronen-reduktionszustand von Sauerstoff dar und ist die aggressivste reaktive Sauerstoffspezies. In der Haut kann das Hydroxylradikal unter Katalyse von ungebundenen Übergangsmetallen, meist Eisen- oder Kupferionen, in der Fenton- oder der Haber-Weiss-Reaktion entstehen (Haber & Weiss, 1934):



Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Singulett-Sauerstoff kann entweder photochemisch durch Lichtanregung eines Sensibilisators oder durch chemische Anregung entstehen. Da Singulett-Sauerstoff erhebliche Strecken in der Membran diffundieren kann, kommt ihm wahrscheinlich besondere biologische Bedeutung bei der Lipid-peroxidation zu.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wasserstoffperoxid entsteht durch Zwei-Elektronenreduktion von Sauerstoff. Außerdem kann Wasserstoffperoxid durch Dismutation aus Superoxidradikalanionen, auf enzymatischem Wege (Uratoxidase, Monoaminoxidase), als Nebenprodukt der Atmungskette oder durch photochemische Reaktionen gebildet werden. Insgesamt ist Wasserstoffperoxid nur schwach reaktiv, kann aber, besonders über die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion, hochreaktive Hydroxylradikale als Sekundärmetaboliten bilden.

Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$)

Das Superoxidradikalanion ist eine nicht besonders reaktive Sauerstoffspezies, die aufgrund ihrer Ladung kaum durch Membranen permeieren kann. Das Superoxidradikalanion entsteht enzymatisch in geringen Mengen als Nebenprodukt der mitochondrialen Zellatmung, in flavinabhängigen Oxidationsreaktionen oder NADPH-abhängigen Sauerstoffreduktionen durch Leukozyten und Makrophagen. Nicht-enzymatisch erfolgt die Bildung durch Autoxidation von Catecholaminen, Thiolen und Übergangsmetallen.

1.3.2. Das Antioxidanssystem der Haut - Verteidigung gegen oxidativen Stress

Oxidationsprodukte im Organismus müssen beseitigt werden, um langfristige Folgeschäden durch oxidative Stressbelastungen zu vermeiden. Im Verlauf der Evolution haben sich eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer antioxidativer Schutzmechanismen entwickelt, die in der Epidermis insgesamt in höherer Konzentration vorkommen als in der Dermis (Vessey, 1993). Diese antioxidativen Reaktionswege sind zum Teil über Energiestoffwechselwege eng miteinander verbunden. Reduktionsäquivalente, die für die kommunizierenden, meist redoxmodulierten Abwehrmechanismen erforderlich sind, werden in Form von NADPH aus dem Energiestoffwechsel bereitgestellt. Untersuchungen konnten zeigen, daß bei Atopikern, die eine schlechtere Supplementierung mit Antioxidantien erhalten, eine Verschlimmerung des Krankheitsbildes auftritt (Greene, 1999).

1.3.2.1. Nicht-enzymatische, hydrophile Antioxidantien

Reduziertes Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH), als Substrat der Glutathion-Peroxidase, ist maßgeblich an der antioxidativen Kapazität der Haut beteiligt. GSH ist eines der wichtigsten löslichen intrazellulären Thiole, dabei ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Regeneration von GSH mittels Glutathion-Reduktase von entscheidender Bedeutung. Der Gesamtthiolstatus ist im Zusammenhang mit der Untersuchung von oxidativen Ereignissen von unmittelbarer Relevanz. Er kann sowohl Auskunft über den Redox- als auch indirekt über den Glutathionstatus einer Zelle geben.

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist neben Glutathion das wichtigste intrazelluläre wasserlösliche Antioxidans, das Vitamin E in der Membran regenerieren kann und selbst über NADH- und GSH-abhängige Dehydroascorbat-Reduktasen regeneriert wird (Müller, 1988; Vessey, 1993).

1.3.2.2. Nicht-enzymatische, lipophile Antioxidantien

Vitamin E (α -Tocopherol) ist das wichtigste lipidlösliche, membran-gebundene Antioxidans, dessen antioxidative Wirkung über spezifische physikochemische Wechselwirkungen mit mehrfach ungesättigten Phospholipiden vermittelt ist. Vitamin E wird in der Membran über Vitamin C regeneriert.

Coenzym Q (Ubichinon und Ubichinol) mit 10 Isopreneinheiten (= Coenzym Q10) spielt eine wichtige Rolle als lipidlösliches Redoxmolekül in der mitochondrialen Atmungskette. Dabei kommt der reduzierten Ubichinolform eine dem Vitamin E vergleichbare Funktion im Schutz vor Lipidperoxidation zu (Vessey, 1993).

Als Antioxidantien in der menschlichen Haut kommen β -Carotin (Provitamin A) und Bilirubin, dem Endprodukt des Hämstoffwechsels, nur geringe Bedeutung zu.

1.3.2.3. Enzymatische Antioxidantien

Oxidativer Stress wird von den enzymatischen Antioxidanssystemen im Vergleich zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien effektiver abgefangen (Vessey, 1993). Im folgenden wird eine Auswahl der enzymatischen Antioxidanssystemen vorgestellt.

Superoxiddismutasen (SOD) sind Metalloproteine (zytosolische Cu-, Zn-SOD, mitochondriale Mn-SOD), die Dismutation von Superoxidradikalanionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird über Katalasen und hauptsächlich zytoplasmatische Mechanismen metabolisiert.



Wasserstoffperoxid abbauende Katalasen sind in Peroxisomen lokalisiert und machen die Hälfte des Proteinanteils dieser Organellen aus. Wegen der Beschränkung auf die Peroxisomen, in Verbindung mit einer geringen Affinität für Wasserstoffperoxid, wird extraperoxisomales H_2O_2 hauptsächlich über zytoplasmatische Reaktionen (Glutathion-System) entsorgt. Daneben gibt es noch weitere Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid als Substrat (Cytochrom c, NADPH-Peroxidase, u.a. Hämproteine mit Peroxidase-Wirkung), die durch ihre spezifische, intrazelluläre Verteilung charakterisiert sind.



Das enzymatische Glutathion-System umfaßt die Enzyme Glutathion-Peroxidase, -Reduktase und -Transferase, die über NADPH-abhängige Reaktionen maßgeblich an den antioxidativen Eigenschaften und der Regeneration von reduziertem GSH beteiligt sind.

1.3.3. Reaktive sauerstoffspezies-vermittelte Regulation zellphysiologischer Vorgänge

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in die Steuerung von zellulären Prozessen eingreifen. ROS regulieren als integrale Bestandteile entsprechender Signaltransduktionskaskaden über redoxmodulierte Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen und Tumorsuppressoren zahlreiche immunologische, proliferative und apoptotische Ereignisse (Hunter, 1995; Sun & Oberley, 1996; Suzuki et al., 1997). Letztendlich kann sich der zelluläre Redoxstatus über mehrere Mechanismen auf eine veränderte Genexpression auswirken (Maccarrone et al., 1997):

- Änderungen in der zellulären Ionenverteilung,
- Beeinflussung des Zytoskeletts und der nukleären Matrix,
- Direkte oder signaltransduktorische Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren,
- Interaktion mit Chromatin-kontrollierenden Proteinen.

1.3.3.1. MAP-Kinase-Kaskaden

Proteinphosphorylierungen spielen bei der Regulation von Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle. Proteinphosphorylierungen werden durch Proteinkinasen und Proteindephosphorylierungen werden durch Proteinphosphatasen an den Aminosäuren Tyrosin, Threonin oder Serin katalysiert (Hunter, 1995). Bei Signaltransduktionen werden extrazelluläre Signale in den Zellkern übermittelt, die in einer veränderte Proteinexpression resultieren.

MAP-Kinase-Kaskaden gehören zu den bekanntesten Signaltransduktionswegen bei denen Proteinphosphorylierungen eine wichtige Rolle spielen. Die MAP-Kinasen werden durch Tyrosin/Threonin-Phosphorylierungen (Anderson, 1990) einer dualspezifischen Kinase aktiviert, die auch MAPK-Kinase oder MEK genannt wird. MEK wiederum wird durch Serinphosphorylierung einer Kinase aktiviert, die MAPKK-Kinase (MAPKKK) genannt wird. In Säugetieren sind zur Zeit drei verschiedene MAP-Kinase-

Kaskaden, ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase 1/2), JNK/SAPK (c-JUN NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase) und p38 bekannt (Marshall, 1995, Cobb & Goldsmith, 1995). Letztendlich führt die Aktivierung der MAP-Kinasen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (activator protein-1) (Klotz et al., 1999).

Die drei MAP-Kinase-Wege sind bereits intensiv untersucht: ERK1/2 antwortet auf mitogene Signale und Wachstumsfaktoren (growth factors); JNK/SAP und p38 werden durch entzündliche Zytokine und Umweltstressoren aktiviert (Whitmarsh & Davis, 1996, Minden & Karin, 1997). Aktivierte MAP-Kinasen phosphorylieren und aktivieren Transkriptionsfaktoren: ERK1/2 und p38 aktivieren Transkriptionsfaktoren wie TCFs (ternary complex factors), während JNK/SAP c-Jun aktiviert. JNK/SAP und p38 können auch ATF-2 phosphorylieren, was wiederum zu einer Aktivierung von c-Jun und c-Fos führt und letztendlich die AP-1 abhängige Transkription induziert (Whitmarsh & Davis, 1996, Minden & Karin, 1997). UVC-Licht führt zu einer starken Induktion von AP-1, und aktiviert ebenfalls die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK/SAP und p38 (Radler-Pohl et al., 1993, Dérijard et al., 1994, Raingeaud et al., 1995). UVB-Licht aktiviert JNK (Rosette & Karin, 1996, Assefa et al., 1997) und kann ebenfalls einen leichten Einfluß auf die Aktivierung von ERK1/2 ausüben (Assefa et al., 1997). UVA-Licht aktiviert JNK und p38, führt aber zu keiner Aktivierung von ERK1/2 (Klotz et al., 1999).

Von den drei beschriebenen MAP-Kinase-Kaskaden ist die Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung von ERK1/2 führt am besten verstanden (Abb. 1.4.). Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein gekoppelte Siebenhelix-Rezeptoren aktivieren diesen Weg. Nach der Autophosphorylierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase, der meistens eine Rezeptordimerisierung vorangeht, lagert sich an die Phosphorylierungsstelle ein GRB2-Protein (growth receptor-bound protein-2) über eine SH-2-Domäne (src homology-2) an. Über eine SH-3-Domäne wird SOS an GRB2 angelagert. Durch diesen ternären Komplex wird RAS aktiviert, das daraufhin ein GDP-Molekül gegen ein GTP-Molekül austauscht. GTP-gebundenes RAS-Protein lagert sich an den N-Terminus von RAF,

einer MAPKK-Kinasen, an. Bis hierhin vollziehen sich die Aktivierungsschritte an der Innenseite der Zellmembran. RAF selber phosphoryliert nun die zyttoplasmatische MEK1/2 MAPK-Kinase, die daraufhin ERK1/2 aktiviert. Ein Teil von ERK1/2 transloziert daraufhin in den Zellkern und phosphoryliert, wie bereits oben beschrieben, Transkriptionsfaktoren wie TCF.

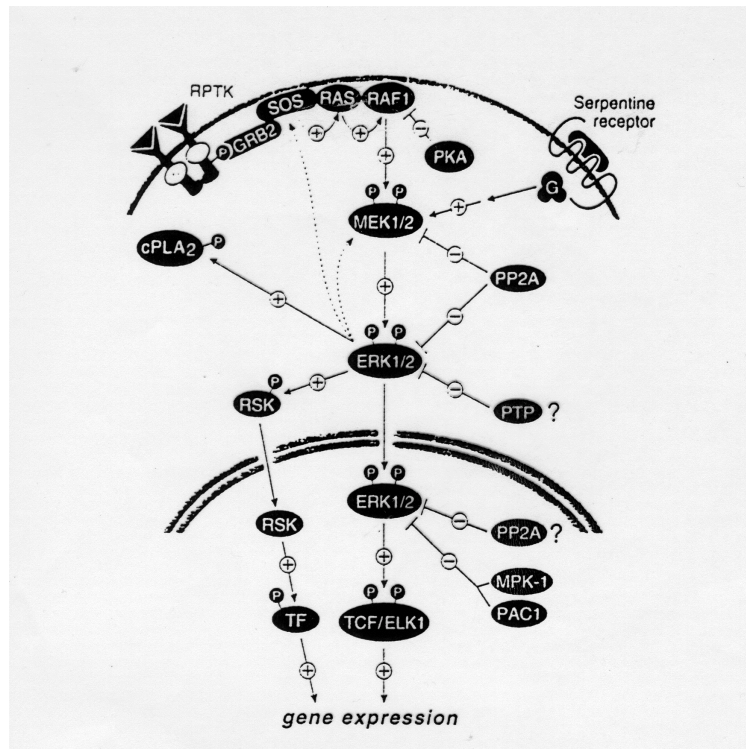


Abb. 1.4. Die ERK1/2 MAP-Kinase-Kaskade (Hunter, 1995). Eine schematische Darstellung der Kinasen und Phosphatasen, die an der Regulation der ERK1/2 MAP-Kinase-Kaskade beteiligt sind (cPLA2 = cytosolic phospholipase A2, ERK1/2 = extracellular-signal regulated kinase 1/2, G = G protein, GRB2 = growth receptor-bound protein-2, PKA = protein kinase A, PP2A = protein phosphatase 2A, PTP = protein tyrosine phosphatase, RPTK = receptor protein-tyrosine kinase, TF = transcription factor).

Daß Signaltransduktionskaskaden durch krankhafte Hautzustände beeinflussbar sind, ist bereits für Fibroblasten von Spendern mit Psoriasis beschrieben. Hier zeigten sich zum ersten Mal erhöhte Aktivitäten bei der ERK1/2-Kinase (Dimon-Gadal et al., 1998).

1.4. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von oxidativem Stress auf Spender mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu normalhäutigen Spendern analysiert werden. Dies soll anhand *in vitro* kultivierter dermaler Fibroblasten verschiedener Spender untersucht werden. Ziel der Experimente ist zunächst eine Bewertung der oxidativen Stressbelastung im Grundstatus bei beiden Spenderkollektiven durchzuführen. In Folgeversuchen sollen Veränderungen durch exogenen oxidativen Stress (UVA-Licht, H₂O₂) oder auch durch den Einfluß modulierender Agenzien (Coenzym Q10, O-Acetylcarnitin, Alpha-Glucosylrutin) in Abhängigkeit vom Spenderkollektiv untersucht werden. Dabei liegen die Schwerpunkte auf der Analyse des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) zur Charakterisierung der Mitochondrienfunktion, und des Peroxid- und Gesamtthiolgehaltes zur Bewertung des zellulären Redoxstatus mittels verschiedener Fluorophore in Mikrotiterplattenmaßstab. Weiterhin soll der Phosphorylierungsstatus von tyrosinhaltigen Proteinen mittels Western-Blot-Untersuchungen analysiert werden. Enzym-Aktivitätsbestimmungen sollen Aufschluß über die Tyrosinkinase- bzw. Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität als Komponenten der redoxsensitiven Signaltransduktion geben. Ferner soll untersucht werden, welchen Einfluß oxidativer Stress speziell auf die Aktivierung der drei MAP-Kinase-Kaskaden bei den verschiedenen Spenderkollektiven hat. Sowohl für die ERK1/2-Kinase als auch für JNK/SAP-Kinase stehen Antikörper zur Verfügung, die die aktivierten Kinasen spezifisch erkennen. Zur Untersuchung von der p38-Kinase sollen Immunpräzipitations-Versuche durchgeführt werden.

2. Material

2.1. Laborgeräte

2.1.1. Großgeräte

Kühlgeräte

-70 °C: HC9-20V-T-A	Heraeus, Karlsruhe
-80 °C: GFL Typ 6485	GFL, Burgwedel
-20 °C:	handelsübliche Geräte
+4 °C:	handelsübliche Geräte

Autoklaven

Certoclav	Kelomat, Taun, Österreich
FVS3	TecNoMara, Schweiz
GVA 570	Fritz Gössner, Hamburg

Vakuumpzentrifuge

Speed Vac Plus SC110A	Savant, Farmingdale, N.Y.
-----------------------	---------------------------

Kühlfalle und Vakuumpzentrifuge

Universal Vacuumssystem Plus with Vapor Net	Savant, Farmingdale, N.Y.
---	---------------------------

Trockenschrank

T6200	Heraeus, Hannover
-------	-------------------

Eismaschine

ZBE 30 – 10	Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen
-------------	---------------------------------

Schüttler

Vibrax VXR	Janke & Kunkel, Staufen
Vibrofix VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
WT 12	Biometra, Göttingen

Zentrifugen

5415C

Eppendorf, Hamburg

Ultraschallgerät

Sonorex RK 100 Transistor

Bandelin Electronic KG, Berlin

Wasserbad

C1 + P5

Haake, Karlsruhe

2.1.2. KleingeräteMikropipetten

Research-Pipetten verschiedene Größen (1-1000 µl) Eppendorf, Hamburg

Mehrkanalpipetten (8-Kanal)

Digital Multichannel (5-50 µl); (50-300 µl)

Labsystems, Helsinki

Pipettierhilfe

Pipetus-Akku

Hirschmann, Eberstadt

Heizblock

Dri-Block DB 2A

Techne, Princeton, N.J.

Heizplatte

HP-Thermoplate

Desaga, Heidelberg

Magnetrührer

MR 3001

Heidolph, Kelheim

2.1.3. MeßgeräteAnalysenwaage

KB BA 100

Sartorius, Göttingen

Laborwaagen

3713 MP

Sartorius, Göttingen

PM 480 Delta Range

Mettler, Gießen

pH-Meter

763 Multi-Calimatic

Knick, Berlin

UV-Dosimeter

IL1700

International Light, Newsburyport

Photometer

UV/Vis Spectrometer Lambda 40

Perkin Elmer, Überlingen

Mikrotiterplattenphotometer

Spectra Max 250

Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Mikrotiterplattenfluorimeter

Cytofluor II

PerSeptive Biosystems, Freiburg

Chemilumineszenzgerät

LB 96 P Microplate Luminometer

EG&G Berthold, Bad Wildbad

Fluoreszenzmeßgerät

Perkin Elmer LS 50

EG&G Berthold, Bad Wildbad

2.1.4. UV-BestrahlungsgeräteUVA-Quelle

Dermalight 2020

Dr. Hönle, Planegg

2.2. Geräte und Material für spezielle Arbeiten und Methoden**2.2.1. Geräte und Material für Zellkulturarbeiten**ZellkulturverbrauchsmaterialZellkultur-Flaschen (75 cm²)

Nunc, Wiesbaden

6-Loch-Platten

Greiner, Nürtingen

96-Loch-Platten

Greiner, Nürtingen

96-Loch-Multiscreen-HA

Millipore, Molsheim

6 cm-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
10 cm-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Midisart 2000-Sterilfilter	Sartorius, Göttingen

Sterile Werkbänke

Gelaire BSB 4A	Flow Laboratories, Meckenheim
Herasafe Heraeus HSP15	Heraeus, Karlsruhe

Inkubatoren

B5060 EK-CO2	Heraeus, Karlsruhe
BB6060 CU-O2	Heraeus, Karlsruhe
BBD 6220	Heraeus, Karlsruhe

Zählkammer

Neubauer	Schreck, Hofheim
----------	------------------

Mikroskope

Axiovert 135	Zeiss, Hamburg
Wilovert S	Hund, Wetzlar

Erntegerät

Titertek Cell Harvester	Flow Laboratories, Meckenheim
Zell-Scraper	Renner, Dannstadt

Zentrifugen

Sorvall RT 6000 B	Du Pont, Bad Homburg
-------------------	----------------------

Wasserbad

GFL 1002	GFL, Burgwedel
----------	----------------

Absauggeräte

Miniport SMT	Servox, Köln
--------------	--------------

Vakuumsystem für Mikrotiterplatten

Multiscreen Vakuumfiltrationssystem	Millipore, Eschborn
-------------------------------------	---------------------

Sterile Einmalware

Verbrauchsmaterial	Greiner, Nürtingen
--------------------	--------------------

Präparierbestecke

Mikro-Pinzette W. Link, Hamburg

Mikro-Schere W. Link, Hamburg

Einfriergefäß

Cryo 1 °C Freezing Container Nalgene, Rochester, USA

2.2.2. Geräte und Material für histologische ArbeitenMikroskop

Axiovert 135 Zeiss, Hamburg

CCD-Kamera mit Bildspeicher

MC3215 II PM AVT Horn, Aalen

MPU-F100P time base corrector Sony, Japan

Foto-Kamera

Nikon F3 Nikon, Düsseldorf

Filmmaterial

Ektachrome 320 T Kodak, Stuttgart

Deckgläser

Deckgläser für die Mikroskopie (24x50 mm; 24x24 mm) Omnilab, Hamburg

Objektträger

Menzel-Objektträger mit Mattrand (76x26 mm) Omnilab, Hamburg

2.2.3. Geräte und Material für gelelektrophoretische ArbeitenNetzgerät

EPS 600 Pharmacia, Freiburg

Gelkammern

Mini-Protean[®] II Bio-Rad, München

Elektroblotkammer

Mini Trans-Blot[®] Cell Bio-Rad, München

Nitrocellulose-Membran

Trans-Blot[®] Transfer Medium (0,2 µm) Bio-Rad, München

Filterpapier

Filterpapier GB 002 Schleicher & Schüll, Dassel

Klarsichtfolien

Photogene Development Folders Life Technologies, Eggenstein

Expositionskassette

8 x 10 in Sigma, München

Filmmaterial

Biomax MR Kodak, Stuttgart

Gelbildquantifizierung

Gelprint 1200i MWG, Ebersberg

ONE-Dscan[™]-Software Scanalytics, Billerica

2.2.4. Material für Tyrosinkinase- und Phosphotyrosin-phosphatasebestimmungen

Beschichtete Mikrotiter-Platten

Avidin-beschichtete ELISA-8-Loch-Streifen Boehringer, Mannheim

2.2.5. Material für ATP-Bestimmungen

Chemilumineszenz-Mikrotiter-Platten

Mikrolumate-Plates (weiß) EG&G Berthold, Bad Wildbad

2.3. Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem oder äquivalent entionisiertem Wasser angesetzt, sofern sie nicht fertig bezogen wurden. Chemikalien waren vom höchstmöglichen Reinheitsgrad (p.A.-Qualität) oder Zellkulturgetestet.

2.3.1. Standard-Chemikalien und -Puffer

Albumin, bovines	Sigma, München
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
KCl	Sigma, München
KH ₂ PO ₄	Sigma, München
KOH	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	Sigma, München
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, München
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan	Merck, Darmstadt

2.3.2. Chemikalien und Puffer für Zellkulturarbeiten

Alpha-Glucosylrutin	ToyoSugar, Tokio
Anisomycin	Sigma, München
DMEM für Fibroblastenkulturen	Life Technologies, Eggenstein
FKS (fötales Kälberserum)	Life Technologies, Eggenstein
Dulbeccos PBS w/o (1 x)	Life Technologies, Eggenstein
Freezing Medium	Life Technologies, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	Life Technologies, Eggenstein

Trypsin-EDTA-Lösung (1 x)	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin (2,5 %)	Boehringer Mannheim
Dispase II (2,4 U/ml)	Boehringer Mannheim
Calcein-AM	Molecular Probes, Oregon
Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	Molecular Probes, Oregon
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumhomodimer-1	Molecular Probes, Oregon
JC-1	Molecular Probes, Oregon
monoBromobimane	Molecular Probes, Oregon
O-Acetyl-L-Carnitin (O-AC)	Sigma, München
Trypan-Blau-Lösung	Serva, Heidelberg
Ubichinon (Coenzym Q10, CoQ10)	Kaneka, Japan
Wasserstoffperoxid, 30 %	Aldrich, Steinheim

2.3.3. Chemikalien und Puffer für histologische Arbeiten

Aceton	Merck, Darmstadt
Glycerin-Gelatine (Eindeckmedium)	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma, München

2.3.4. Chemikalien und Puffer für zelluläre Extrakte

Aprotinin	Sigma, München
Dithiotreitol	Sigma, München
Leupeptin	Sigma, München
Natriumvanadat	Sigma, München
Nonidet P40	Sigma, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, München
Triton X-100	Merck, Darmstadt

2.3.5. Chemikalien und Puffer für gelelektrophoretische Arbeiten

Acrylamid, (40 %ige Lösung)	Sigma, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, München
Biorad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, München
Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt
Entwickler GBX	Kodak, Stuttgart
ExtrAvidin-POD	Sigma, München
Fixierer GBX	Kodak, Stuttgart
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker (6,5-165 kD), biotinyliert	New England Biolabs, USA
Kaleidoscope Molekulargewichtsmarker Broad Range	Bio-Rad, München
N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, München
Phototope-HRP Western Blot Detection Kit	New England Biolabs, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.3.6. Chemikalien und Puffer für Tyrosinkinase- und Phosphotyrosinphosphatasebestimmungen

ABTS [®] -Puffer	Boehringer Mannheim
ABTS [®] -Tabletten	Boehringer Mannheim
anti-Phosphotyrosin-POD, monoklonal	Boehringer Mannheim
ATP (Adenosintriphosphat)	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Sigma, München
Natriumvanadat	Boehringer Mannheim
Piceatannol	Boehringer Mannheim
<u>Phosphoryliertes Peptid (Gastrin):</u>	
PPS2: Biotin-EGPWLEEEEEAY(PO ₄)GW MDF-NH ₂	Boehringer Mannheim

Unphosphoryliertes Peptid (Gastrin):

PKS2: Biotin-EGPWLEEEEEAYGWMDf-NH₂ Boehringer Mannheim

2.3.7. Chemikalien und Puffer für p38 MAP Kinase Assay

Anti-Phospho-ATF-2 (Thr71), monoklonal	Boehringer Mannheim
anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), monoklonal, immobilisiert	Boehringer Mannheim
ATF-2 Fusionsprotein	Boehringer Mannheim
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, München
Kinase-Puffer	Boehringer Mannheim
Zell-Lysis-Puffer	Boehringer Mannheim

2.3.8. Chemikalien und Puffer für ATP-Bestimmungen

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, München
D-Luziferin	Molecular Probes, Oregon
Luziferase	Molecular Probes, Oregon
NRS [®]	Celsis Lumac, Landgraaf, Niederlande

2.4. Verwendete Antikörper

anti-aktivierte ERK1/2-Kinase, monoklonal, Maus IgG	Sigma, München
anti-ERK1, polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien
anti-JNK1-Antikörper, polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien
anti-pJNK-Antikörper, monoklonal, Maus IgG	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien
anti-Phosphotyrosin, FITC-konjugiert, Klon: PT-66	Sigma, München
anti-Phosphotyrosin, Maus IgG, Klon: PT-66	Sigma, München
Kaninchen anti-Maus IgG, POD-konjugiert, polyklonal	Sigma, München
Ziege anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert, polyklonal	Sigma, München

2.4.1. Antikörperverdünnungen

primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-aktivierte ERK1/2-IgG, monoklonal	1:1000
Anti-ERK1-IgG, polyklonal	1:1000
Anti-JNK-IgG, polyklonal	1:1000
Anti-Phospho-ATF-2 (Thr71), monoklonal	1:1000
Anti-Phosphotyrosin-IgG, monoklonal	1:1000
Anti-pJNK-IgG, monoklonal	1:1000

Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>
Kaninchen anti-Maus IgG, POD-konjugiert, polyklonal	1:2000
Streptavidin, POD-konjugiert,	1:2000
Ziege anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert, polyklonal	1:2000

2.5. Puffer und Lösungen

DMEM

für primäre Fibroblastenkulturen

10 % (v/v) FKS
50 µg/ml Streptomycin
50 U/ml Penicillin
in 1 x DMEM (fertig bezogen)

Dulbecco's PBS w/o (1 x)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
8,1 mM Na_2HPO_4
(Herstellerangaben, fertig bezogen)

PBS/Tween

0,1 % (v/v) Tween 20
99,9 % (v/v) PBS w/o

Puffer für SDS-PAGE

Auftragspuffer (3 x)

190 mM Tris/ Cl^- pH 6,8
9 % (w/v) SDS
40 % (v/v) Glycerin
0,09 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrophorese-Puffer (10 x)

250 mM Tris/ Cl^- pH 8,8
1,9 M Glycin
1 % (w/v) SDS

Entfärbelösung

30 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
60 % (v/v) Wasser

Färbelösung

45 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
45 % (v/v) Wasser
0,25 % (w/v) Coomassie
Brilliant Blue G-250

(Lösung wurde filtriert)

<u>Sammelgel (5 %)</u>	5 % (w/v) Acrylamid 0,125 % (w/v) Bisacrylamid 130 mM Tris/Cl ⁻ pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,08 % (w/v) APS* 0,15 % (v/v) TEMED*
------------------------	--

*zum Starten der Polymerisationsreaktion

<u>Trenngel (10 %)</u>	10 % (w/v) Acrylamid 0,125 % (w/v) Bisacrylamid 375 mM Tris/Cl ⁻ pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,08 % (w/v) APS* 0,15 % (v/v) TEMED*
------------------------	---

*zum Starten der Polymerisationsreaktion

Puffer für Western-Blot

<u>Kammerpuffer</u>	1,0 l SLAB 4 0,4 l Methanol 0,6 l A. bidest
<u>Luminolreagenz</u>	3 ml Substanz A 30 µl Substanz B

(nach Herstellerangaben frisch angesetzt)

<u>SLAB 4, pH 8,0 (für 5 l A. bidest.)</u>	30,0 g Tris 143,6 g Glyzin 5,0 g SDS
--	--

Puffer für zytoplasmatische ExtrakteLysis-Puffer⁺ (in A. bidest.) fürKinase-Assay und Western-Blots

0,5 % (v/v) Triton-X-100

50 mM Tris/Cl⁻ pH 7.5

150 mM NaCl

1 mM Na₃VO₄

5 mM EDTA

1 mM PMSF[#]

10 µg/ml Leupeptin

⁺frisch angesetzt

10 µg/ml Aprotinin

[#]frisch zugegeben

eisgekühlt

Stopp-Puffer (in PBS w/o) fürKinase-Assay und Western-Blots

0,4 mM EDTA

0,4 mM Na₃VO₄

150 mM NaCl

eisgekühlt

Lysis-Puffer⁺ (in A. bidest.) fürPhosphatase-Assay

0,5 % (v/v) Triton-X-100

50 mM Tris/Cl⁻ pH 7.5

150 mM NaCl

5 mM EDTA

1 mM PMSF[#]

10 µg/ml Leupeptin

⁺frisch angesetzt

10 µg/ml Aprotinin

[#]frisch zugegeben

eisgekühlt

Stopp-Puffer (in PBS w/o) fürPhosphatase-Assay

0,4 mM EDTA

150 mM NaCl

eisgekühlt

POD-Substratlösung5 ml ABTS[®]-Lösung5 mg ABTS[®]-Tablette

Reaktionspuffer für enzymatische AssaysKinase-Assay

Reaktionspuffer (in A. bidest.) 25 mM Tris pH 7,5
5 mM β -Mercaptoethanol
2 mM DTT
0,1mM Na_3VO_4
10 mM MgCl_2

Substrat (in Reaktionspuffer) 3 μM Peptid PPS2

ATP-Lösung 5 mM ATP
(frisch angesetzt)

Inhibitor (in PBS w/o) 3 mM Piceatannol

Phosphatase-Assay

Reaktionspuffer (in A. bidest) 20 mM Tris/ Cl^- pH 7,2
0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
1 mg/ml BSA
(frisch angesetzt)

Substrat (in Reaktionspuffer) 3 μM Peptid PPS2

Inhibitor (in PBS w/o) 400 μM Na_3VO_4

p38 MAP Kinase

Reaktionspuffer (in Kinase-Puffer) 200 μM ATP
2 μg ATF-2 Fusionsprotein

Stripping-Lösung 62,5 mM Tris/ Cl^- pH 6,8
2 % (w/v) SDS
100 mM 2-Mercaptoethanol

3. Methoden

3.1. Sicherheit und Entsorgung

Die Arbeit mit humanen Zellen war auf Zellkultur-Laboratorien beschränkt. Biologisch kontaminiertes Material wurde durch Autoklavieren oder Desinfektion unschädlich gemacht und der vorgeschriebenen Entsorgung zugeführt. Alle Chemikalien wurden entsprechend ihrer R- und S-Sätze gehandhabt. Die Entsorgung erfolgte ebenfalls diesen Bestimmungen entsprechend.

3.2. *In vitro* Versuche

Alle nachfolgend beschriebenen Methoden, bei denen auf Zellmaterial zurückgegriffen werden mußten, erfolgten mit *in vitro* kultivierten primären Fibroblasten.

3.2.1. Herkunft der verwendeten Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden mit selbstangelegten Primärkulturen dermaler Fibroblasten von Spendern mit gesunder Haut und von Spendern mit atopischer Dermatitis durchgeführt (siehe 3.2.3.). Die Hautbiopsien wurden durch das Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg, Krankenhaus Wilhelmsburg und Universitätsklinikum Kiel zur Verfügung gestellt.

3.2.2. Zellkultur

In den durchgeführten Experimenten wurden ausschließlich primäre Fibroblastenkulturen erster bis maximal vierter Passage verwendet. Eingefroren gelagerte Zellen (-196 °C) wurden nach dem Auftauen einmal passagiert. Alle Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre, unter Begasung mit 7 % CO₂ und 93 % Luft bei 37 °C kultiviert. Dem Fibroblastenmedium (DMEM) zugesetztes FKS wurde durch halbstündiges Erhitzen bei 56 °C inaktiviert. Die Zellzahlbestimmung mit Prüfung des prozentualen Anteils an toten Zellen erfolgte über Trypanblau-Färbung mittels Neubauer-Zählkammer. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeitsgänge bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Mediumwechsel erfolgte bei primären Fibroblasten grundsätzlich zweimal wöchentlich, ansonsten nach Bedarf. Für sämtliche Zellkulturarbeiten wurde ausschließlich sterile Einmalware verwendet.

3.2.3. Isolierung dermaler Zellen aus Hautbiopsien

Hautbiopsien (siehe 3.2.1.) wurden mit einem sterilen Präparierbesteck in einer mit PBS w/o beschickten Petrischale von der Subkutis mit Fettanteilen gesäubert. Anschließend wurde die Epidermis mit den verbleibenden dermalen Anteilen in Quadrate von ungefähr 2 mm Kantenlänge geschnitten. Zur Kultivierung erfolgten die nachfolgend beschriebenen Inkubationsschritte ausschließlich in sterilen 6-Loch-Platten. Zunächst wurden die Hautstücke 5-10 s in 70 % Ethanol getaucht, in PBS w/o gewaschen und in 6,5 ml Dispase-Lösung (2,0 U/ml) transferiert, in der sie dann bei 37 °C 2 h inkubierten. Dispase als spezifische Kollagenase für Kollagen Typ IV und Fibronektin beeinträchtigt die Zellvitalität nicht (Stenn et al., 1989). Im Anschluß an diese Inkubation ließ sich die Epidermis mit einer Pinzette vorsichtig von der Dermis ablösen. Die Dermisstücke wurden für die Kultivierung dermaler Fibroblasten (siehe 3.2.4.) verwendet.

3.2.4. Kultivierung und Subkultivierung dermalen Fibroblasten

Die nach Isolierung der Epidermis durch Dispaseverdau anfallenden Dermisstücke (siehe 3.2.3.) wurden zu je 3-5 Stück pro Kavität in 6-Loch-Kulturplatten gebracht und mit 4 ml DMEM überschichtet. Nach etwa vier Wochen waren aus den Dermisstücken genügend Fibroblasten sternförmig ausgewachsen und diese konnten passagiert werden. Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS w/o gewaschen und durch 5-10 min Trypsin/EDTA-Inkubation bei 37 °C und anschließendem Triturieren vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Der Trypsin-Verdau ließ sich mit DMEM stoppen. Danach wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Röhrchen überführt, die Kavität der Trypsin-Inkubation nochmals mit 2 ml DMEM gespült und diese Zellen mit den übrigen vereint. Es schloß sich eine Zentrifugation bei 1500 UpM und 4 °C für 10 min an, bevor das Zellsediment in DMEM resuspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und nochmals wie zuvor zentrifugiert wurde. Die Dermisfibroblasten wurden für die Kultur in definierter Zelldichte (siehe 3.2.5.) in 75 cm²-Flaschen mit 15 ml DMEM weiterkultiviert, 14 Tage später erneut geerntet, bevor sie, in mit DMEM beschickte Plastikkulturgefäße, ausgesät oder zur Bestimmung der Grundstati (siehe 3.3.1.1.) oder als Einzelzellsuspension für ATP-Untersuchungen (siehe 3.4.7.) verwendet wurden. Nach Erreichen der Konfluenz erfolgten die Experimente.

3.2.5. Zellzahlen bei der Aussaat

<u>Zellkulturgefäß</u>	<u>Fibroblasten/Kavität</u>
6-Loch-Platte	Partikel
75 cm ² Flasche	500.000 Zellen
10 cm-Petrischale	250.000 Zellen
6 cm-Petrischale	100.000 Zellen
96-Loch-Platte	5.000 Zellen

3.2.6. Einfrieren der Zellen

Je nach Versuchslage konnten die Fibroblasten nach der ersten Passage eingefroren und für maximal 12 Monate in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert werden. Dazu wurden die Zellen aus 75 cm^2 -Kulturflaschen geerntet (siehe 3.2.4.) und anstelle des spezifischen Mediums (DMEM), in 1 ml Einfriermedium (Freezing Medium) pro $1 \cdot 10^6$ Zellen aufgenommen. Daran schloß sich das Einfrieren der Zellen in einem Einfriergefäß an. So wurde eine Abkühlrate der Zellsuspension von 1 °C/min erreicht. Nachdem die Zellen auf -80 °C abgekühlt waren, wurden sie in einen Stickstofftank überführt.

3.2.7. Auftauen eingefrorener Zellen

Die, wie unter 3.2.6. beschrieben, eingefrorenen Zellen wurden nach Erwärmen bei 37 °C in Medium aufgenommen und mehrmals zentrifugiert (siehe 3.2.4.). Anschließend wurde das Zellsediment in 15 ml DMEM resuspendiert und in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche bis zur Konfluenz weiterkultiviert.

3.3. *In vitro* Experimente zur Überprüfung zellulärer Funktionen

3.3.1. Experimente zum ungestressten Grundstatus

Der Grundstatus der unter 3.4.1., 3.4.2. und 3.4.5. beschriebenen Parameter wurde in unbehandelten dermalen Fibroblasten gesunder Spender und Spender mit atopischer Dermatitis bestimmt. Dabei wurden Zellen geringer Passagezahl beider Spenderkollektive in unabhängigen Parallelversuchen gegeneinander untersucht.

3.3.1.1. Bestimmung der Grundstati

Die Bestimmung der Grundstati verschiedener zellulärer Parameter erfolgte über 96-Loch-Platten mit einem Filter (0,45 µm Porendurchmesser) als Plattenboden. Die Zellen wurden mittels 5-10 min Trypsin/EDTA-Inkubation bei 37 °C und anschließendem Triturieren vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Der Trypsin-Verdau ließ sich mit DMEM stoppen. Danach wurde die Zellsuspension in ein 10 ml Röhrchen überführt, die Kavität der Trypsin-Inkubation nochmals mit 2 ml DMEM gespült und diese Zellen mit den übrigen vereint. Es schloß sich eine Zentrifugation bei 1500 UpM und 4 °C für 10 min an, bevor das Zellsediment in 1 ml PBS w/o resuspendiert wurde. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die Zellsuspension (5×10^4 /Kavität) mit dem entsprechenden Fluorophor inkubiert (siehe 3.4.1., 3.4.2. und 3.4.5.). Über den Membranboden der 96-Loch-Platte konnte die Fluorophor-Lösung abgesaugt werden, während die Zellen auf der Membran zurückblieben. Diese wurden dann im Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor II von der Plattenoberseite unter Hintergrundkorrektur mit den entsprechenden Wellenlängen vermessen.

3.3.2. Stressexperimente

Für Stressexperimente mit UVA-Licht bzw. H₂O₂ und Versuche mit Anisomycin wurden ausschließlich konfluent gewachsene Fibroblastenkulturen von gesunden Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis verwendet. Jeweils ein bis zwei Tage vor dem eigentlichen Experiment wurde das Medium gewechselt. Analog zu den in der Literatur beschriebenen Versuchsanordnungen wurden die Zellen aus Gründen der Vergleichbarkeit jeweils im zellspezifischen Medium gestresst (Abe et al., 1994; Bladier et al., 1997; Chen & Ames, 1994; Devary et al., 1992; Sullivan et al., 1994). Dies verhindert die Induktion zellulärer Prozesse durch zeitweise Inkubation mit PBS w/o, die zu einer Erhöhung des Glutathionspiegels führen (Niggli & Applegate, 1997) und dadurch mögliche Reaktionen auf den gesetzten oxidativen Stress verdecken kann.

3.3.2.1. Stressexperimente mit H₂O₂

Für die Stressexperimente mit H₂O₂ wurde vierfach konzentrierte Wasserstoffperoxidlösung in PBS w/o mit einer Volumeneinheit zu konfluent gewachsenen Zellen mit drei Volumeneinheiten Kulturmedium zugegeben. Die unbehandelte Kontrolle erhielt ein vergleichbares Volumen an PBS w/o. Die Stressinduktion erfolgte für verschiedene Stressorkonzentrationen und 15 min bei 37 °C.

3.3.2.2. Stressexperimente mit UVA-Licht

Konfluent gewachsene Fibroblasten und Keratinozyten wurden in 96-Loch-Platten, 6-Loch-Platten, Petrischalen oder Mikroreaktionsgefäßen ohne Deckel unter Ventilator Kühlung bestrahlt. Die jeweilige Kontrolle blieb unbestrahlt.

3.3.2.2.1. Bestimmung der UVA-Dosis

Die Berechnung der Bestrahlungsdauer für die jeweilige UVA-Dosis erfolgte unter Verwendung des UV-Dosimeters IL-1700.

3.3.2.3. Experimente mit Anisomycin

Analog zu den Versuchen mit H₂O₂ (siehe 3.3.2.1.) wurden konfluent gewachsene Zellen mit Anisomycin (10µg/ml, 30 min) bei 37 °C im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrolle inkubiert.

3.3.3. *In vitro* Inkubation mit Antioxidantien

Die *in vitro* Inkubation der Kulturen mit sterilfiltrierten Antioxidantien (150 μ M CoQ10 in 0,08 % EtOH in PBS; 150 μ M O-AC in PBS; 150 μ M AGR in PBS) erfolgte bei 37 °C ausnahmslos an zu 90 % konfluent gewachsenen Zellen über 24 h in den vollständig supplementierten Medien. Vor dem eigentlichen Experiment wurden die Zellen zweifach mit PBS w/o gewaschen und anschließend den jeweiligen Stressversuchen unterzogen.

3.4. *In vitro* Untersuchung verschiedener Parameter der Zellphysiologie nach oxidativem Stress

Zur Untersuchung der Modulation zellphysiologischer Parameter als zelluläre Reaktion auf die Behandlung der Zellen wurden die unter 3.4.1. bis 3.4.7. beschriebenen Experimente in 96-Loch-Platten durchgeführt. Das ermöglichte einerseits die Überprüfung eines möglichst breiten Konzentrationsbereichs der eingesetzten Substanzen, andererseits erlaubte es auch die statistische Auswertung der Ergebnisse über Mehrfachbestimmungen für jeden untersuchten Ansatz. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur (Rt).

3.4.1. Bestimmung des zellulären Gesamtthiolstatus

Der zelluläre Gesamtthiolstatus als ein Parameter des nicht-enzymatischen Antioxidanssystems wurde mit **monoBromoBimane (mBrB)** bestimmt. Monobromobimane als membrangängiges Reagenz ist schwach fluoreszierend, wird aber nach spontaner Reaktion mit freien Thiolen wie Glutathion zu einem starken Fluorophor umgesetzt. Die Exzitationswellenlänge des Thiol-mBrB-Reaktionsproduktes liegt bei 390 nm, die Fluoreszenzemission bei 460 nm (Cotgreave et al., 1988; Durand & Olive, 1983). Nach Beendigung des gesetzten Stresses wurden die Zellen zweifach mit PBS w/o gewaschen und im Anschluß 20 min im Dunkelraum

mit 60 μM mBrB in PBS w/o (75 μl je Kavität) inkubiert. Die Fluoreszenzwerte wurden durch Messung von der Plattenbodenseite im Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor II ermittelt, wobei die Hintergrundfluoreszenz für jeden Ansatz parallel bestimmt wurde.

3.4.2. Bestimmung des zytoplasmatischen Peroxidstatus

Die Bestimmung des Gehaltes an löslichen zytoplasmatischen Peroxiden erfolgte mittels **Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCHF-DA)** als Nachweisreagenz. DCHF-DA ist als Essigsäureester membranpermeabel und wird intrazellulär in Dichlorodihydrofluorescein (DCF) gespalten, das durch lösliche Peroxide selektiv zum Fluorophor oxidiert wird (Rosenkranz et al., 1992; Suzuki et al., 1997). Angeregt wird das Fluorophor bei 485 nm, die Fluoreszenzemission erfolgt bei 530 nm. Vor der eigentlichen Fluorophor-Inkubation wurden die Zellen zweifach mit PBS w/o gewaschen und anschließend 30 min in Dunkelheit mit einer 15 $\mu\text{g/ml}$ DCHF-DA-Lösung in PBS w/o (75 μl je Kavität) versetzt. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz. Quantifiziert wurde die Fluoreszenz durch Messung von der Plattenbodenseite im Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor II.

3.4.3. Bestimmung des Esterasefunktionsstatus

Analog der unter 3.4.2. beschriebenen Bestimmung des Gehaltes an löslichen Peroxiden erfolgte die Bestimmung des Esterasefunktionsstatus als Vitalitätsmarker mit Hilfe einer 2 μM Calcein-AM-Lösung in PBS w/o. Calcein-**AM** ist als **Acetoxymethyl-Ester** ein membrangängiges, nicht fluoreszierendes Reagenz, das von funktionsfähigen, intrazellulären Esterasen zum Fluorophor umgesetzt wird. Die Anregungswellenlänge von Calcein liegt bei 485 nm, die Emission wird bei 530 nm gemessen (Papadopoulos et al., 1994). Die Fluoreszenzwerte wurden durch Messung von der Plattenbodenseite im Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor II ermittelt, wobei die Hintergrundfluoreszenz für jeden Ansatz parallel bestimmt wurde.

3.4.4. Bestimmung des Phosphotyrosingehalts

Der Nachweis der phosphorylierten Tyrosinreste erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Nach Beendigung des Stressversuches wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst zweifach mit PBS w/o gewaschen. Daran schloß sich eine 10-minütige Fixierung mit einem Methanol-Aceton-Gemisch (1:1) bei -20 °C an, der drei Waschschriffe in PBS w/o folgten. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen inkubierten die Proben 60 min in 2 % BSA in PBS w/o. Es folgte die Inkubation des FITC-konjugierten anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (Verdünnung 1:1000; 75 µl/Kavität) für 60 min. Anschließend wurden drei Waschschriffe (250 µl/Kavität) mit PBS w/o durchgeführt, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Quantifizierung erfolgte im Fluoreszenzmeßgerät Cytofluor II von der Plattenbodenseite, wobei parallel die Hintergrundfluoreszenz bestimmt wurde.

3.4.5. Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde das Fluorophor 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbo-cyaniniodid (JC-1) verwendet. JC-1, das in die Mitochondrien permeiert, verändert nach jeweils vorliegendem Membranpotential des Mitochondriums seine Fluoreszenzemissionswellenlänge von grüner Farbe in seiner monomeren Form bei niedrigem Potential (Emission 530 nm) zu rot-orange bei seiner J-Aggregat-bildenden Form und vorliegendem hohem Potential (Emission 590 nm). Die Exzitationswellenlänge liegt in beiden Fällen bei 485 nm (Cossarizza et al., 1993; Reers et al., 1991; Salvioli et al., 1997).

Nach Beendigung des oxidativen Stresses wurden die Zellen zweifach mit PBS w/o gewaschen und im Anschluß exakt 10 min mit 75 µl pro Kavität JC-1 (10 µg/ml Medium) in supplementiertem DMEM im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte zweimaliges Waschen mit eiskühlem PBS w/o (250 µl), bevor die Zellen dann ebenfalls in eiskaltem PBS w/o (250 µl) von der Plattenbodenseite im Fluoreszenzmessgerät Cytofluor II vermessen wurden. Die Hintergrundfluoreszenz wurde für jeden Ansatz parallel bestimmt. Eine Umrechnung der mit JC-1 quantifizierten Fluoreszenzdaten in absolute Potentialwerte in Millivolt mittels Nernst-Gleichung konnte nicht erfolgen, da weder intra- noch extramitochondriale Ionenkonzentrationen für die jeweilig vorliegenden Zellen ermittelt werden konnten. Daher wurde der relative Wert des Mitochondrienmembranpotentials als Quotient der erhaltenen hintergrundkorrigierten Fluoreszenzdaten (Ex 485 nm, Em 590 nm/ Ex 485 nm, Em 530 nm) berechnet.

3.4.6. Bestimmung der relativen Zellzahl

Zur Normierung der unter 3.4.1. bis 3.4.4. erhaltenen Fluoreszenzwerte und zur Überprüfung, ob die Behandlung zu Zellverlusten geführt hat, wurde die relative Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Methanol-Aceton-fixierten Zellen (siehe 3.4.4.) nach der Antikörper-Fluoreszenz-messung 30 min mit 45 µl je Kavität einer 4 µM **Ethidiumhomo-Dimer-1**-Lösung (EthD-1) in PBS w/o inkubiert. EthD-1 kann als interkallierender DNA-Farbstoff als Maß für die vorhandenen Zellen genutzt werden. Die Anregung erfolgte bei 530 nm, die Emission wurde bei 645 nm mit Hilfe des Fluoreszenzmeßgerätes Cytofluor II von der Plattenbodenseite gemessen. Da die unter 3.4.1. - 3.4.4. beschriebenen Experimente Vitalfunktionen unfixierter Zellen überprüfen, erfolgte die EthD-1-Bestimmung grundsätzlich an parallel-fixierten Zellen des jeweiligen Versuchsansatzes. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz für jeden untersuchten Ansatz (Papadopoulos et al., 1994).

3.4.7. Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde als Luziferin-Luziferase-Reaktion bestimmt (Beckers et al., 1986; De Rautlin de la Roy et al., 1991). Dazu wurden die Zellen der Suspension ausgezählt (siehe 3.2.4.) und zweimal nacheinander jeweils 10 s bei 10000 UpM zentrifugiert und mit PBS w/o gewaschen. An den letzten Waschschrift schloß sich eine erneute Zentrifugation an, um die Zellen dann in 200 µl PBS aufnehmen zu können. Daraus wurden zwei Fraktionen mit je 100 µl in eine Chemilumineszenz-Mikrotiter-Platte vorgelegt, denen entweder 10 µl **NRS**[®] (Nukleotide Releasing Substance) zur Bestimmung der Summe aus intrazellulärem plus extrazellulärem ATP, oder 10 µl A. bidest. zur Quantifizierung ausschließlich des extrazellulären ATPs zupipettiert wurden. Aus der Differenz der erhaltenen Werte konnte dann, über die parallele Messung einer ATP-Konzentrationsreihe (110 µl) im Bereich von $1 \cdot 10^{-4}$ bis $1 \cdot 10^{-9}$ M ATP, der intrazelluläre ATP-Gehalt pro Zelle berechnet werden. Die Messung der Chemilumineszenzsignale erfolgte im Meßgerät LB 96P mit verzögerter Substratinjektion unter Hintergrundkorrektur. Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

3.5. Herstellung zytoplasmatischer Extrakte

Zur Untersuchung einzelner zytoplasmatischer Komponenten der Signaltransduktion erfolgte die Aufbereitung zellulärer Extrakte, bei denen der Kern durch Zentrifugation entfernt wurde. Dazu wurden ausschließlich in 6 cm-Petrischalen konfluent gewachsene Zellen verwendet. Die Zellen waren entweder zur Ermittlung des Grundstatus unbehandelt oder je nach Versuchsanordnung behandelt (siehe 3.3.2.). Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte bei 4 °C oder auf Eis.

3.5.1. Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen

Konfluent gewachsene Zellen (siehe 3.5.) wurden zweimal mit PBS w/o gewaschen und anschließend mit 4 ml Stoppuffer inkubiert. Da die zytoplasmatischen Extrakte der Untersuchung phosphorylierter Tyrosinreste als Endprodukte des Zusammenspiels von Phosphotyrosinkinasen (PTK) und -phosphatasen (PTP) dienen, enthielt der Stoppuffer als wesentliche Komponenten Natriumvanadat, um endogene Phosphotyrosinphosphatasen zu hemmen, und EDTA, um die Kinaseaktivität durch Komplexierung der essentiellen Mg^{2+} -Ionen zu unterbinden (Ploegh, 1995). Die Zellen wurden nach 5 min Einwirkzeit in 1,5 ml Stoppuffer mit einem Zellschaber bei Raumtemperatur geerntet und in Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 s bei 14000 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Zellsediment auf Eis gebracht. Das Zellsediment wurde in 25-40 μ l eiskaltem Lysispuffer vorsichtig resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, 15 s geschüttelt und abschließend für 5 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die zytoplasmatischen Extrakte bei -80 °C gelagert (Nakamura et al., 1993).

3.5.1.1. Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen für Phosphotyrosinphosphataseaktivitätsbestimmungen

Im Unterschied zur Herstellung der zytoplasmatischen Proteinextrakte aus Primärkulturen (siehe 3.5.1.) wurden die zytoplasmatischen Extrakte für die Phosphotyrosinphosphataseaktivitätsbestimmungen unter Ausschluß des PTP-Inhibitors Natriumvanadat im Puffer isoliert. Der gewonnene proteinhaltige Überstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung maximal 2-3 Wochen bei -80 °C gelagert.

3.5.1.2. Zytoplasmatische Extrakte aus Primärkulturen für Tyrosinkinaseaktivitätsbestimmungen

Die Herstellung der zytoplasmatischen Proteinextrakte für die Tyrosinkinaseaktivitätsbestimmungen aus Primärkulturen wurden analog zu der in 3.5.1. beschriebenen Methode durchgeführt.

3.5.2. Phosphotyrosinphosphataseaktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der relativen Aktivität an Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) wurden die gemäß 3.5.1.1. isolierten zytoplasmatischen Extrakte verwendet. Das Prinzip des funktionellen Assays zur Überprüfung der PTP-Aktivität beruht auf der Dephosphorylierungsaktivität aller zytosolischen Phosphotyrosinphosphatasen eines definierten Volumens an Zellextrakt. Synthetische phosphorylierte Peptidsubstrate, die an ihrem aminoterminalen Ende biotinyliert vorliegen, werden in einer Phosphatasereaktion dephosphoryliert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Natriumvanadat als Inhibitor bindet unphosphoryliertes und phosphoryliertes Substrat an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiter-Platte. Nur das phosphorylierte Substrat kann nach mehrmaligen Waschen des Reaktionsansatzes in einem ELISA detektiert werden.

Das Gesamtprotein (5 µg) der jeweiligen zytoplasmatischen Extrakte aus einer 6 cm-Petrischale wurden mit A. bidest. auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Diesem Reaktionsansatz wurden 20 µl Substrat und 20 µl Reaktionspuffer zupipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C auf einem beheizbaren Schüttler und die PTP-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 20 µl 400 µM Natriumvanadatlösung terminiert. Zur Quantifizierung wurde dieser Reaktionsansatz in Streptavidin-beschichtete ELISA-Platten pipettiert und 20 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit 300 µl PBS w/o je Kavität. Daran schloß sich die Inkubation für 60 min mit 75 µl POD-konjugierten anti-Phosphotyrosin-Antikörper (1:100 in 0,2 % BSA in PBS w/o) für jede Kavität bei 37 °C an.

Anschließend wurde wie zuvor gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit 100 µl je Kavität mit POD-Substratlösung (ABTS[®]) für 10 min bei Raumtemperatur. Im Mikroplattenphotometer Spectra Max 250 wurde die relative Aktivität als Änderung der OD_{405 nm} in Bezug zur vollständig phosphorylierten, eingesetzten Peptidprobe als Minimalwert (= 0 %) und der Leerwertkontrolle als Maximalwert (= 100 %), unter Hintergrundkorrektur bestimmt.

3.5.3. Tyrosinkinaseaktivitätsbestimmung

Die relative Aktivität an Phosphotyrosinkinasen (PTK) wurde an den wie in 3.5.1.2. beschrieben isolierten zytoplasmatischen Proteinextrakten (5 µg) bestimmt. Das Prinzip dieses funktionellen Assays zur Überprüfung der PTK-Aktivität beruht, vergleichbar zu der Überprüfung der PTP-Aktivität (siehe 3.5.2.), auf der Phosphorylierungsaktivität aller zytosolischen Tyrosinkinasen eines definierten Volumens an Zellextrakt. Synthetische Peptidsubstrate, die an ihrem aminoterminalen Ende biotinyliert vorliegen, werden in einer Kinasereaktion phosphoryliert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Piceatannol als Inhibitor bindet, wie unter 3.5.2. beschrieben, unphosphoryliertes und phosphoryliertes Substrat an eine Streptavidinbeschichtete Mikrotiter-Platte und kann nach mehrmaligen Waschen in einem ELISA quantifiziert werden.

Zunächst wurden 5 µg Gesamtprotein der jeweiligen zytoplasmatischen Extrakte aus einer 6 cm Petrischale mit *A. bidest.* auf ein Volumen von 40 µl gebracht. Dazu wurden 20 µl Substrat, 20 µl Reaktionspuffer und 20 µl einer 5 mM-ATP-Lösung zupipettiert. Dieser Ansatz inkubierte 30 min bei 37 °C auf einem beheizbaren Schüttler. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 25 µl Piceatannol als Inhibitor gestoppt. Die weitere Vorgehensweise war identisch mit der Bestimmung der PTP-Aktivität (siehe 3.5.2.). Die relative Aktivität wurde auch hier im Mikroplattenphotometer Spectra Max 250 unter Hintergrundkorrektur als Änderung der OD_{405 nm} in Bezug auf die voll phosphorylierte, eingesetzte Peptidprobe, die in diesem Fall als Maximalwert (= 100 %) und die Leerwertkontrolle als Minimalwert (= 0 %) dienten, bestimmt.

3.5.4. p38 MAP-Kinase-Aktivitätsbestimmung

Das Prinzip des funktionellen Assays zur Überprüfung der p38 MAP-Kinase-Aktivität beruht auf der Phosphorylierungsaktivität dieser spezifischen Kinase. Durch eine Immunpräzipitation wird nur die aktivierte p38 MAP-Kinase aus einer definierten Menge Zellysat isoliert. In Gegenwart von ATP wird der Immunpräzipitationskomplex mit einem spezifischen Substrat inkubiert. Das *in vitro* phosphorylierte Substrat kann anschließend durch eine indirekte Immundetektion visualisiert werden.

Zunächst wurden 200 µg Gesamtprotein der jeweiligen zytoplasmatischen Extrakte aus einer 6 cm Petrischale mit 20 µl des immobilisierten anti-Phospho-p38 MAPK-(Thr180/Tyr182)-Antikörper ü. N. bei 4 °C unter leichtem Schütteln immunpräzipitiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min 14000 UpM. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Immunpräzipitationskomplex auf Eis gebracht. Der Komplex wurde zweimal mit 500 µl ZellLysis-Puffer gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit 500 µl Kinase-Puffer. Für die eigentliche Kinasereaktion wurde der Immunpräzipitationskomplex mit 50 µl Reaktionspuffer der das Substrat ATF-2 enthielt für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Termination der Reaktion wurde durch die Hinzugabe von SDS-Probenpuffer erreicht. Die Proben wurden dann 5 min bei 95 °C inkubiert, gevortext und 2 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Je 30 µl der Proben wurden mittels einer SDS-PAGE analysiert (siehe 3.6.3.) und nach einem Western-Blot detektiert (siehe 3.6.6.4.).

3.6. Western-Blot-Analyse

In Western-Blot-Analysen (Towbin et al., 1979) werden heterogene Proteingemische nach einer Auftrennung im elektrischen Feld auf eine Trägermatrix mit hoher Proteinaffinität transferiert. Als Abdruck des ursprünglichen Gels können die auf der Trägermembran immobilisierten Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen und quantifiziert werden .

3.6.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Blau G-250 in saurer Lösung (Absorptionsmaximum 465 nm) durch Bindung von Protein (Absorptionsmaximum 595 nm). Diese Änderung kann photometrisch bestimmt werden.

In je 1,5 ml des fertig bezogenen Biorad-Reagenz (1:5 mit A. bidest. verdünnt) wurden 2 µl der zu quantifizierenden Probe und in parallelen Ansätzen 1-12 µg BSA-Proteinstandard pipettiert. Nach 30 min erfolgte die Messung der Extinktionen im Photometer Lambda 40 bei 595 nm in Doppelbestimmungen gegen den Leerwert. Den Meßwerten ließen sich anhand der erstellten BSA-Eichkurve unter Berücksichtigung der Verdünnung die entsprechenden Proteinkonzentrationen zuordnen.

3.6.2. Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Die Proben mit definierter Konzentration an Protein wurden im Verhältnis 3:1 mit dreifachkonzentriertem Auftragspuffer (siehe 3.6.3.) gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente ein biotinyliertes Marker-Proteingemisch, das im Verhältnis 1:10 mit einfachkonzentriertem Auftragspuffer versetzt wurde und anschließend identisch denaturiert wurde.

3.6.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip dieser von Laemmli (1970) beschriebenen Methode besteht in der Trennung von Proteinen durch den Molekularsieb-Effekt der polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und N,N'-Bisacrylamid. Im Auftragspuffer erfolgt sowohl eine Denaturierung der Proteine als auch eine Zerstörung ihrer Disulfidbrücken, so daß die Proteine aufgefaltet und in reduziertem Zustand gehalten werden. Durch die sich gegenseitig abstoßenden negativen Ladungen der SDS-Anionen, die mit ihrer hydrophoben Region an ungefähr jeden zweiten Aminosäurerest binden, werden die Proteine einerseits linearisiert, andererseits wird ihre Eigenladung kompensiert. Sie werden auf eine Gelmatrix aufgetragen und ein elektrisches Feld wird angelegt. Kleine Proteine weisen die größte elektrophoretische Mobilität auf und wandern daher am schnellsten durch die Gelmatrix in Richtung der Anode.

Zunächst wurde das Trenngel bis ungefähr 1,5 cm unterhalb des oberen Randes der Glasplatte gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Dies garantierte die Bildung einer geradlinigen Gelgrenze und unterband zusätzlich den Kontakt zu Luftsauerstoff. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde der Alkohol entfernt und vorsichtig mit A. bidest gespült. Anschließend wurde das Sammelgel bis zur Glasplattenkante aufpipettiert und der Probenkamm in das nicht-polymersierte Sammelgel eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Probenkamm entfernt und die Probenaschen mit Laufpuffer gespült. Die vorbereiteten Proben (siehe 3.6.2.) wanderten nach Beladung der Probenaschen bei einer angelegten Spannung von 80 V in das Gel ein (ungefähr 15 min). Die eigentliche Elektrophorese lief unter einer Spannung von 180 V so lange, bis die Bromphenolblau-Bande ungefähr 0,5 cm vor dem Gelende angelangt war (Laemmli, 1970). Die fertigen Gele konnten im Anschluß daran geblottet werden (siehe 3.6.4.).

3.6.4. Proteintransfer auf Trägermembranen (Western-Blotting)

Verschiedene Nachweismethoden für Proteine können nicht angewandt werden, solange die Proteine in der Gelmatrix relativ unzugänglich sind. Daher ist es notwendig, die im analytischen Gelsystem aufgetrennten Proteine (siehe 3.6.3.) im Western-Blotting auf eine geeignete Trägermatrix zu transferieren. Im elektrischen Feld läßt die negative Ladung der SDS-beladenen Proteine diese zur Anode wandern.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele der Elektrophoresekammer entnommen und 5 min in Kammerpuffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei auf eine mit Kammerpuffer getränkte Nitrozellulosemembran zwischen je ein Whatman 3 MM Papier gelegt. Von beiden Seiten wurde ein Schwammtuch aufgelegt und diese Sandwich-Anordnung in einen Kunststoffrahmen gespannt. Der Rahmen wurde in eine Elektroblotkammer so eingehängt, daß die Membran zwischen Gel und Anode lag. Die Elektroblotkammer wurde mit Kammerpuffer aufgefüllt und die Proteine für 60 min unter Eiskühlung bei 100 V Spannung auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran bei 4 °C ü.N. abgesättigt (siehe 3.6.6.).

3.6.5. Gelfärbung

Zur Überprüfung der Proteinauftrennung und des Proteintransfers in den relevanten Bereichen des SDS-Gels wurde in Einzelfällen das Gel nach dem Blot mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Dazu inkubierte das Gel unter Schwenken ü.N. bei Raumtemperatur in der Färbelösung. Die Entfärbung erfolgte im Entfärbebad unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung, bis das Gel die gewünschte Farbintensität der verbleibenden Proteinbanden aufwies.

3.6.6. Immunologische Detektion von Proteinen

Die immunochemische Detektion des nachzuweisenden, auf der Nitrocellulose-Membran immobilisierten Proteins erfolgte über indirekte Antikörpermarkierung.

3.6.6.1. Detektion von Phosphotyrosinproteinen

Nach dem Proteintransfer (siehe 3.6.4.) wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit 2 % BSA (w/v) in PBS w/o auf dem Schwenktisch inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blocken und so unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen, bevor sie dann ü. N. bei 4 °C in einer 0,2 %igen Lösung von BSA (w/v) in PBS w/o, die einen Anti-phosphotyrosin-Antikörper (1:1000) enthielt, inkubierte. Es folgten drei mindestens fünfminütige Waschstschritte mit PBS/Tween. Unmittelbar danach wurde der analog zum primären Antikörper angesetzte sekundäre POD-konjugierte anti-mouse-Antikörper in der Verdünnung von 1:2000, unter Zusatz des zur Detektion des biotinylierten Molekulargewichtsmarkers notwendigen POD-konjugierten Streptavidins (Verdünnung 1:2000), für weitere 60 min auf die Membran gegeben. Es schlossen sich wiederum 3 Waschgänge zu je mindestens 5 min in PBS/Tween an. Danach wurde die Membran in PBS w/o 10 min äquilibriert und mit der ECL-Lösung inkubiert (siehe 3.6.7.).

3.6.6.2. Detektion von aktivierter ERK 1/2-Kinase

Die Membran wurde nach dem Blotten 1 h mit einer 1%igen Boehringer-Lösung in PBS/Tween geblockt. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen, bevor sie dann ü. N. bei 4 °C in einer 0,5 %igen Boehringer-Lösung in PBS/Tween, die einen aktivierten Anti-ERK1/2-Antikörper (Verdünnung 1:1000) enthielt, inkubierte. Es folgten drei mindestens fünfminütige Waschschriffe mit PBS/Tween. Danach wurde der analog zum primären Antikörper angesetzte sekundäre POD-konjugierte anti-mouse-Antikörper in der Verdünnung von 1:2000, unter Zusatz des zur Detektion des biotinylierten Molekulargewichtsmarkers notwendigen POD-konjugierten Streptavidins (Verdünnung 1:2000), für weitere 60 min auf die Membran gegeben. Schließlich wurde die Membran wieder dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen und mit der ECL-Lösung inkubiert (siehe 3.6.7.).

3.6.6.3. Detektion von aktivierter JNK/SAP-, JNK/SAP- und ERK1/2-Kinase

Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h mit einer 5%igen Magermilch-lösung in PBS/Tween geblockt. Dann wurde die Blocklösung durch eine frische 5 %ige Magermilchlösung ersetzt, die zusätzlich den entsprechenden primären Antikörper (Verdünnung 1:1000) enthielt. Die Membran wurde anschließend ü. N. bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei mindestens fünfminütige Waschschriffe mit PBS/Tween. Danach wurde der analog zum primären Antikörper angesetzte entsprechende sekundäre POD-konjugierte Antikörper in der Verdünnung von 1:2000, unter Zusatz des zur Detektion des biotinylierten Molekulargewichtsmarkers notwendigen POD-konjugierten Streptavidins (Verdünnung 1:2000), für weitere 60 min auf die Membran gegeben. Schließlich wurde die Membran wieder dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen und mit der ECL-Lösung versetzt (siehe 3.6.7.).

3.6.6.4. Detektion von ATF-2

Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h mit einer 5 %igen Magermilch-lösung in PBS/Tween geblockt. Es folgten drei mindestens fünfminütige Waschschrirte mit PBS/Tween. Dann wurde die Membran ü. N. bei 4 °C in einer 5 %igen Lösung von BSA (w/v) in PBS w/o, die den Anti-Phospho-ATF-2-Antikörper (1:1000) enthielt, inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Danach wurde sekundäre POD-konjugierte Antikörper in der Verdünnung von 1:2000, unter Zusatz des zur Detektion des biotinylierten Molekulargewichtsmarkers notwendigen POD-konjugierten Streptavidins (Verdünnung 1:2000) in 5 % BSA (w/v) in PBS w/o, für weitere 60 min auf die Membran gegeben. Schließlich wurde die Membran wieder dreimal 5 min mit PBS/Tween gewaschen und mit der ECL-Lösung versetzt (siehe 3.6.7.).

3.6.7. „Enhanced Chemiluminescence“-Detektion

Als Detektionssystem wurden ausschließlich POD-gekoppelte sekundäre Antikörper verwandt. Bei der eigentlichen Detektion wurde Luminol im „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Verfahren als Substrat der Peroxidase unter Freisetzung von Photonen umgesetzt. Das chemilumineszente Signal trat in den Bereichen der zu detektierenden Proteine auf der Membran auf und konnte in distinkten Banden über einen Röntgenfilm als Schwärzung nachgewiesen werden. Dabei besteht eine proportionale Beziehung zwischen Bandenintensität und Menge des nachzuweisenden Proteins.

3.6.7.1. „Enhanced Chemiluminescence“-Detektion der gebundenen Antikörper

Zur Detektion verblieb 3 ml Luminolreagenz für 1 min auf der Blotmembran, bevor es dann entfernt wurde. Die so behandelte Membran wurde mit der proteinbindenden Seite nach oben zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und

die emittierte Chemilumineszenz im Dunkelraum durch 10 s – 15 min Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte manuell mit kommerziell erhältlichen Photochemikalien. Die Membran wurde zum Schluß in PBS/Tween kurz gewaschen, in Frischhaltefolie gewickelt und bei 4 °C für weitere Experimente aufbewahrt.

3.6.8. Strippen der Membran

Zur erneuten Inkubation der Membran mit Antikörpern mußten die gebundenen Antikörper zuvor entfernt werden. Dazu wurde die Membran zweimal 15 min bei ca. 60 °C mit 15 ml Stripping-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur mehrmals mit PBS/Tween gewaschen und erneut wie unter 3.6.6. beschrieben mit dem Blockschrift begonnen.

3.7. Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen wurden nach Absprache mit der Statistikabteilung der Beiersdorf AG mittels Students oder gepaartem T-Test vorgenommen. Dabei erfolgte die Definition der ermittelten Wahrscheinlichkeitswerte (p) wie folgt:

$p \leq 0,05$ = signifikanter Unterschied, symbolisiert durch (*)

$p \leq 0,01$ = hochsignifikanter Unterschied, symbolisiert durch (**).

Statistisch nicht relevante Unterschiede sind nicht im p-Wert angegeben.

3.8. Fotodokumentation der Ergebnisse

Zur Fotodokumentation der lichtmikroskopischen Ergebnisse diente ein Fotomikroskop unter Verwendung des unter 2.2.2. angegebenen Filmmaterials.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse zum ungestressten Grundzustand

Die folgenden Abschnitte des Ergebnisteiles befassen sich ausschließlich mit Untersuchungen zum ungestressten Grundzustand von Fibroblasten normalhäutiger Spender (N) im Vergleich zu Fibroblasten von Patienten mit atopischer Dermatitis (AD). Die Kenntnis der beschriebenen zellulären Funktionen und Parameter im unbehandelten Grundzustand ermöglicht eine Beurteilung der Befunde nachfolgend beschriebener Stressexperimente (siehe 4.2. und 4.3.), da in Abhängigkeit vom Spenderkollektiv bestehende Unterschiede in der Bewertung berücksichtigt werden können.

4.1.1. Relative Zellzahl von Fibroblasten

In Abbildung 4.1. ist die Kernfärbung dermaler Fibroblasten mit Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1) exemplarisch dargestellt (siehe 3.4.6.). Erkennbar ist die starke Rotfluoreszenz von EthD-1, die selektiv in den Zellkernen nachzuweisen ist und als Maß für die relative Zellzahl verwendet werden kann.



Abb. 4.1. EthD-1-Fluoreszenz (Ex 530 nm/Em 645 nm) dermaler Fibroblasten als Maß für die relative Zellzahl. Vergrößerung 400x.

Die Meßwerte der EthD-1-Fluoreszenz konfluent gewachsener Fibroblasten liegen zum Zeitpunkt aller Experimente in gleichem Wertebereich von ca. 3000 Fluoreszenz-Einheiten. Es ist dementsprechend davon auszugehen, daß bei den überprüften Zellen im Konfluenzstadium annähernd identische Zellzahlen vorliegen.

4.1.2. Gehalt an löslichen Peroxiden in Fibroblasten

Die zur Bestimmung löslicher Peroxide verwendete DCF-Fluoreszenzaktivität (siehe 3.4.2.) ist in Abbildung 4.2. exemplarisch dokumentiert. Wie man erkennen kann, sind die löslichen Peroxide homogen in der Zelle verteilt.



Abb. 4.2. DCF-Fluoreszenz (Ex 485 nm/Em 530 nm) dermalen Fibroblasten zur Quantifizierung löslicher Peroxide. Vergrößerung 200x.

Das Ergebnis weiterführender Untersuchungen zum Gehalt an löslichen DCF-reaktiven Peroxiden in Fibroblasten verschiedener Spenderkollektive ist in Abbildung 4.3. in erweitertem Stichprobenumfang veranschaulicht. Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis weisen einen signifikant erhöhten Peroxidgehalt im Grundstatus auf.

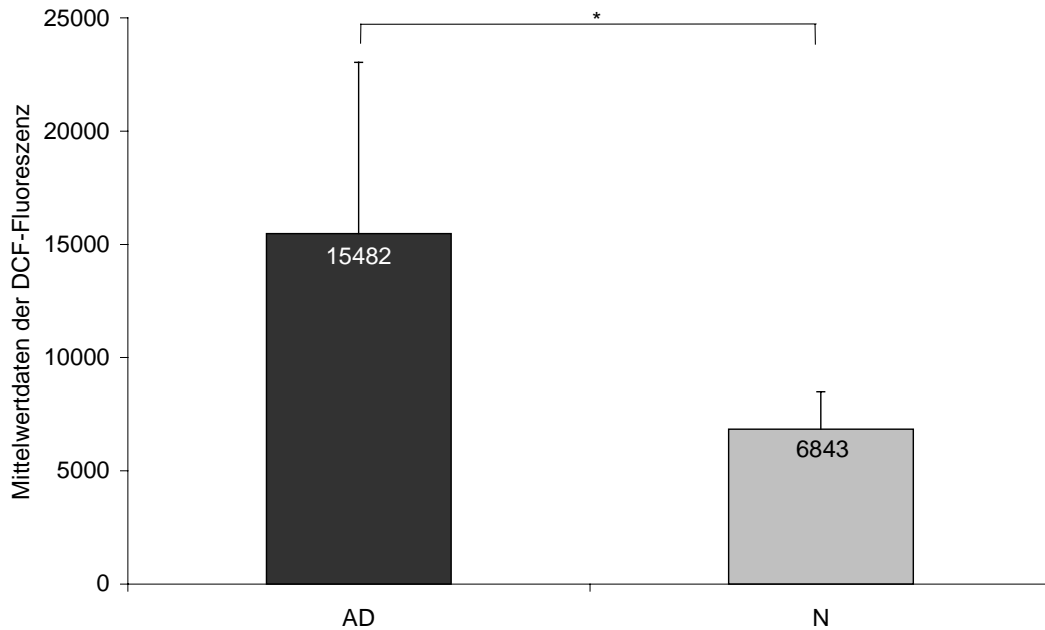


Abb. 4.3. DCF-Fluoreszenz (Ex 485 nm/Em 530 nm) von jeweils 5×10^4 Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ($n = 6$) und normalhäutigen Spendern ($n = 5$). Die Fluoreszenzwerte wurden im Cytofluor II in 3 Ansätzen für jede Probe bestimmt (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied).

4.1.3. Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten

Folgeuntersuchungen mit dem Fluorophor monoBromoBimane (mBrB) dienten zur Bestimmung des Gehaltes an freien Thiolen (siehe 3.4.1.). Abbildung 4.4. zeigt exemplarisch die Fluoreszenzfärbung dermalen Fibroblasten nach Inkubation mit dem erwähnten Reagenz. Auffällig ist dabei die homogene Verteilung der Fluoreszenzen in den verschiedenen Zellen und Zellclustern.



Abb. 4.4. mBrB-Fluoreszenz (Ex 390 nm/Em 460 nm) dermaler Fibroblasten zur Quantifizierung freier Thiole. Vergrößerung 400x.

Daran schlossen sich Versuchsreihen zur Quantifizierung des Gehaltes an freien Thiolen in Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft an (Abb. 4.5.). Die Zellen von Spendern mit atopischer Dermatitis weisen einen leicht erhöhten nicht-enzymatischen Antioxidansspiegel im Vergleich zu normalhäutigen Spendern auf, der allerdings ohne statistische Relevanz ist.

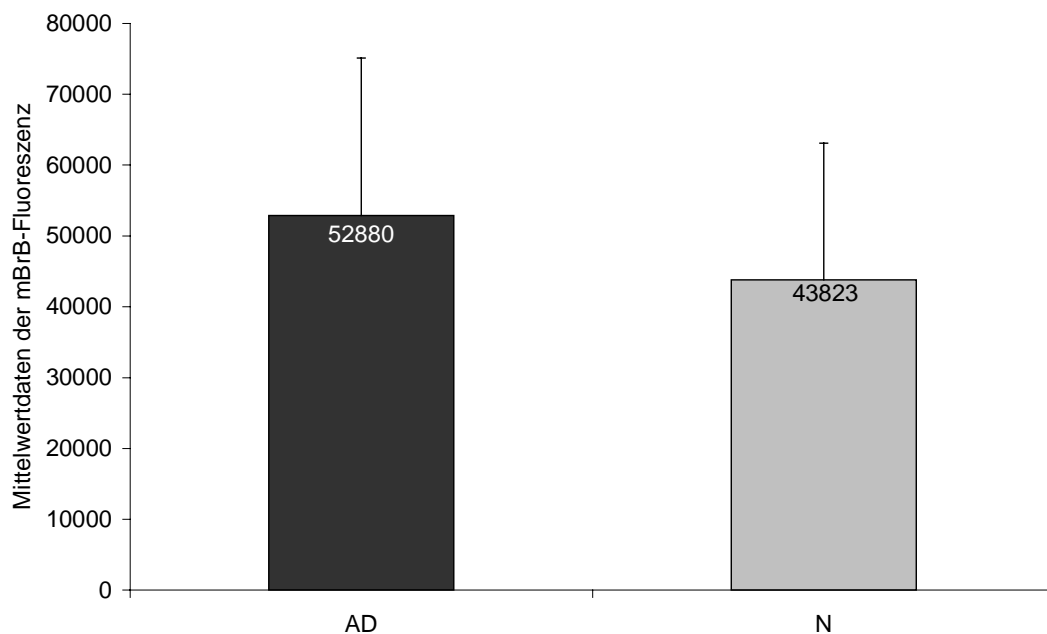
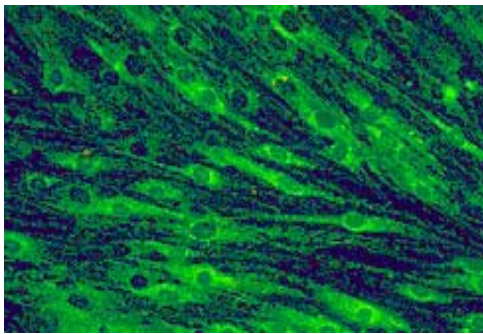


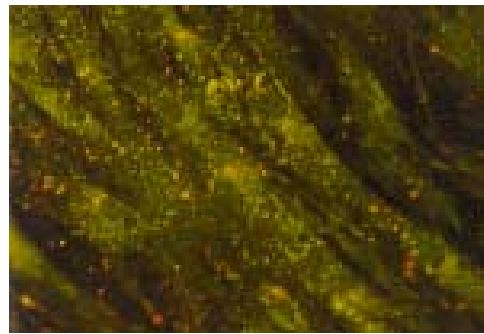
Abb. 4.5. mBrB-Fluoreszenz (Ex 390 nm/Em 460 nm) von jeweils 5×10^4 Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ($n = 6$) und normalhäutigen Spendern ($n = 5$). Die Fluoreszenzwerte wurden im Cytofluor II in 3 Ansätzen für jede Probe bestimmt (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang).

4.1.4. Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten

Die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) erfolgte mittels des Farbstoffes JC-1 an konfluent gewachsenen Zellen (siehe 3.4.5.). Dabei ist die heterogene Verteilung der Fluoreszenz in Subpopulationen mit ausschließlich grüner Fluoreszenz (Abb. 4.6.a) und Zellgruppen mit kolokalisierter Rot-Grün-Fluoreszenz (Abb. 4.6.b) deutlich zu erkennen. Desweiteren fällt die distinkte Begrenzung zum Zellkern auf, der keinerlei Fluoreszenzfärbung zeigt.



a)



b)

Abb. 4.6. JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) konfluent gewachsener Fibroblasten mit grüner (Abb. 4.6.a) und kolokalisierter Rot-Grün-Fluoreszenz (Abb. 4.6.b) normalhäutiger Spender zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials. Vergrößerungen 400x.

In folgenden Anschlußversuchen sollte der Quotient der JC-1-Fluoreszenz dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis ermittelt werden (siehe Abb. 4.7.). Bei der Statusaufnahme des MMPs zeigte sich in beiden Spenderkollektiven der gleiche Grundgehalt im MMP.

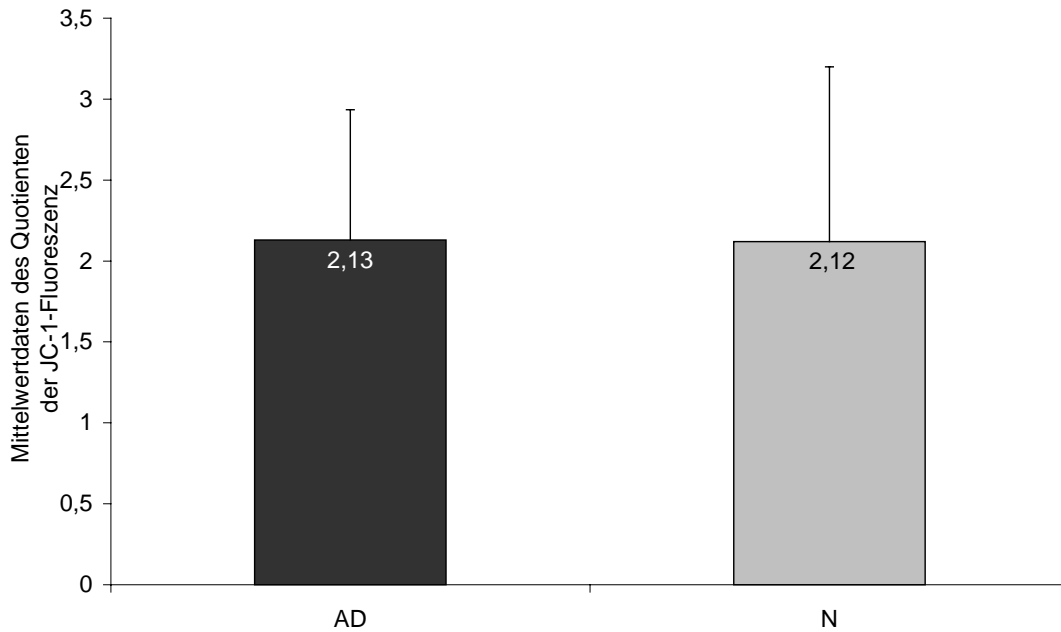


Abb. 4.7. Quotient der JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) von konfluent gewachsenen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 13) und normalhäutigen Spendern (n = 21). Die Fluoreszenzwerte wurden im Cytofluor II in 3 Ansätzen für jede Probe bestimmt (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang).

4.1.5. ATP-Gehalt in Fibroblasten

In Anschlußversuchen zur Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an ATP wurden Fibroblasten normalhäutiger Spender und von Spendern mit atopischer Dermatitis, gemäß Abschnitt 3.4.7., im Luziferin-Luziferase-Assay überprüft. Dabei ergibt sich ein intrazellulärer Gehalt an ATP, der in dermalen Fibroblasten normalhäutiger Spender ca. $3,6 \cdot 10^{-11}$ mol ATP/Zelle erreicht, während die Spender mit atopischer Dermatitis einen intrazellulären Gehalt von ca. $2,7 \cdot 10^{-11}$ mol ATP/Zelle besitzen. Dieser Unterschied ist allerdings nicht von statistischer Relevanz (siehe Abb. 4.8.).

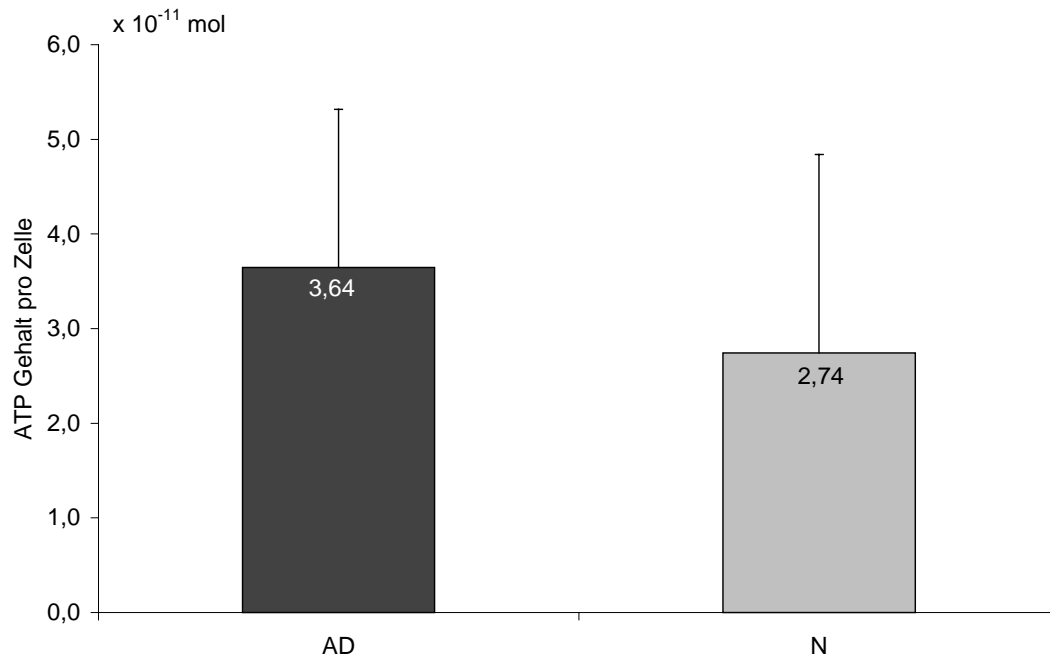
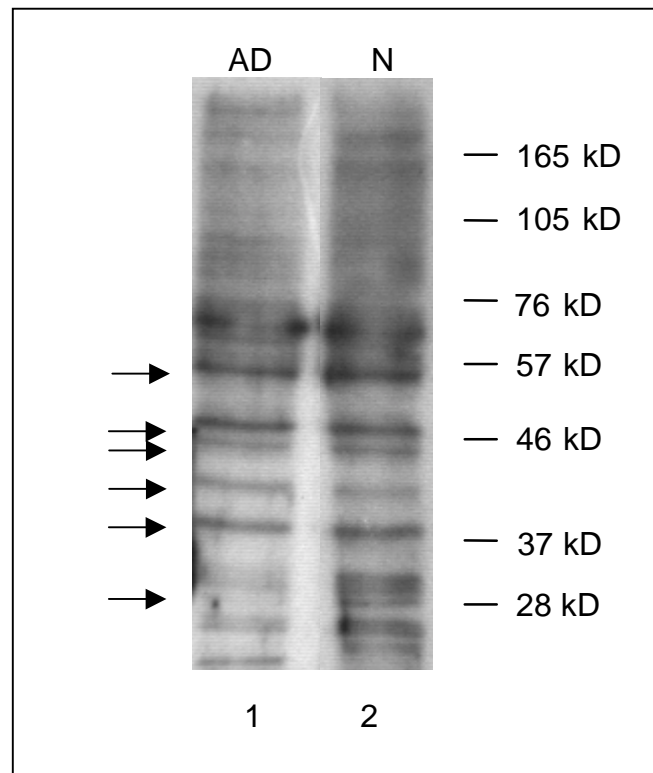


Abb. 4.8. Intrazellulärer ATP-Gehalt konfluent gewachsener Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ($n = 7$) und normalhäutigen Spendern ($n = 15$). Der ATP-Gehalt wurde als Zellsuspension im Luziferin-Luziferase-Assay in einem Ansatz für jede Probe bestimmt (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang).

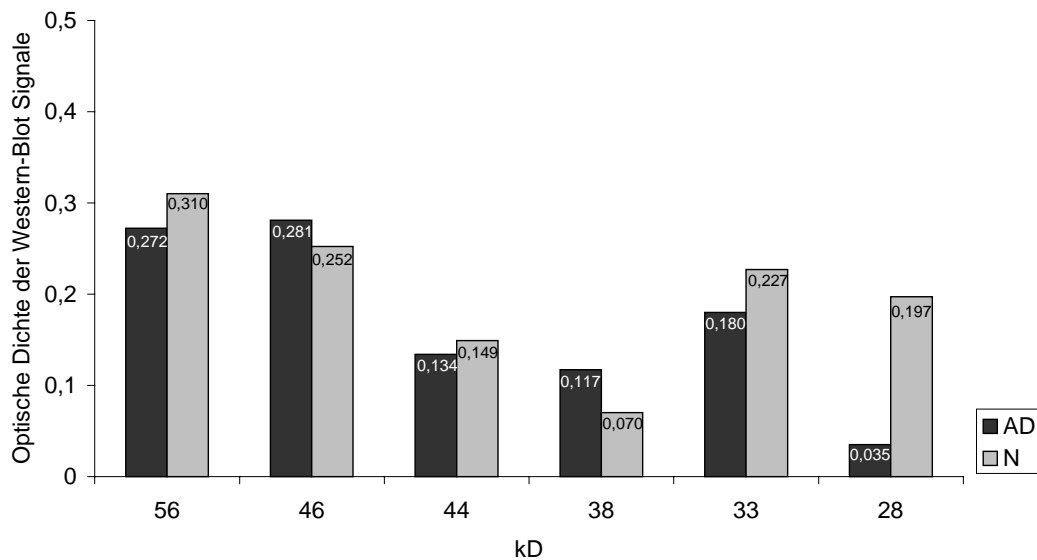
4.1.6. Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten

In Western-Blot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß beide Spenderkollektive einen ähnlichen Grundgehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen aufweisen. Unterschiede scheinen eher individueller Natur zu sein, als daß sie auf Kollektivunterschiede zurückzuführen sind.

Abbildung 4.9. veranschaulicht exemplarisch den Gehalt dieser post-translational modifizierten Proteine in Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis (siehe 3.6.6.1.). Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Banden (\rightarrow) durch das Softwareprogramm ONE-DscanTM zeigte eine annähernd wertgleiche Verteilung der Bandenintensitäten in den untersuchten Proben.



a)



b)

Abb. 4.9.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders. Die phosphorylierten Tyrosine wurden mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) bestimmt. Detektiert wurde mittels ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm.

Abb. 4.9.b zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.9.a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-Dscan™-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, kD = Kilodalton).

4.1.7. Tyrosinkinase-Aktivität in Fibroblasten

Die Ergebnisse zur relativen Aktivität der Tyrosinkinasen (siehe 3.5.3.) in dermalen Fibroblasten normalhäutiger Spender und Spendern mit atopischer Dermatitis im direkten Vergleich zueinander sind in Abbildung 4.10. dargestellt. Im unbehandelten Zustand ergibt sich eine signifikant erhöhte konstitutive Kinase-Aktivität in Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis gegenüber der Aktivität in Zytosolextrakten von Fibroblasten normalhäutiger Spender. Dabei liegen die gemessenen Aktivitätswerte beider Spenderkollektive mit 75 % bei Spendern mit atopischer Dermatitis und 56 % bei Fibroblasten von normalhäutigen Spendern deutlich unter dem voll phosphorylierten eingesetzten Peptid, das als maximale Substratkontrolle (= 100 %) diente.

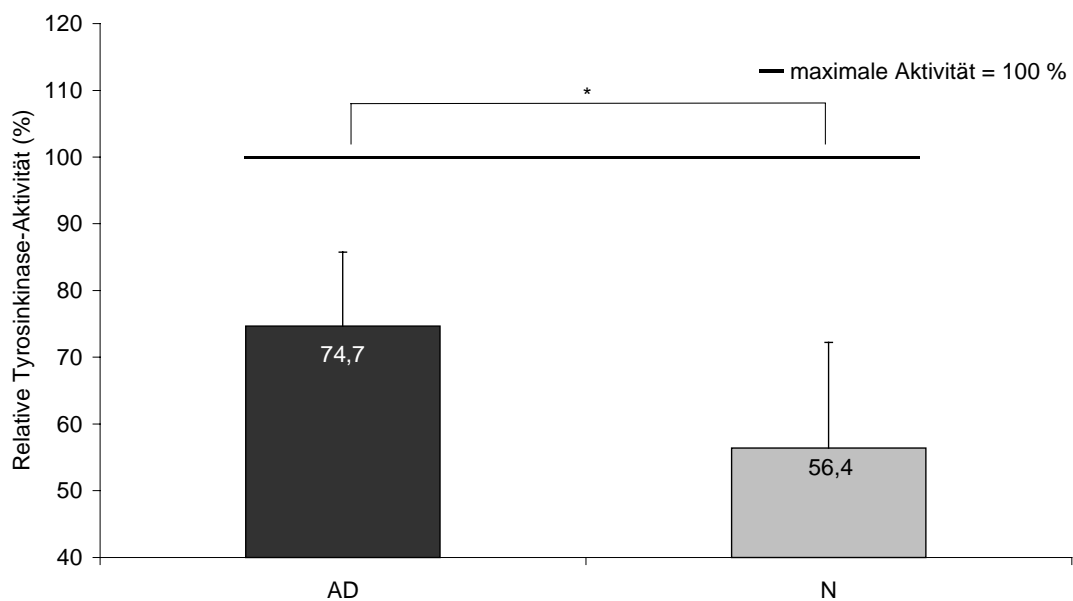


Abb. 4.10. Relative Aktivität der Tyrosinkinasen von 5 µg Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 8) und normalhäutigen Spendern (n = 6). Die relativen Aktivitäten wurden photometrisch über eine Farbreaktion im Verhältnis zur phosphorylierten Substratkontrolle als maximale und Leerwertkontrolle als minimale Aktivitätswerte bestimmt. Die dargestellten Werte sind hintergrundkorrigiert (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied).

4.1.8. Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten

Analoge Versuchsreihen zur Bestimmung der konstitutiven Aktivität von Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) in dermalen Fibroblasten normalhäutiger Spender und Spender mit atopischer Dermatitis erfolgten gemäß Abschnitt 3.5.2. und sind in Abbildung 4.11. veranschaulicht. Im unbehandelten Grundzustand zeigt sich, daß die Zytosolextrakte dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis eine fast 20 % erhöhte PTP-Aktivität gegenüber der Aktivität in Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern aufweisen. Die Spender mit atopischer Dermatitis liegen mit einer PTP-Aktivität von 91 % nur leicht unter der maximal erreichbaren Phosphatase-Aktivität (= 100 %).

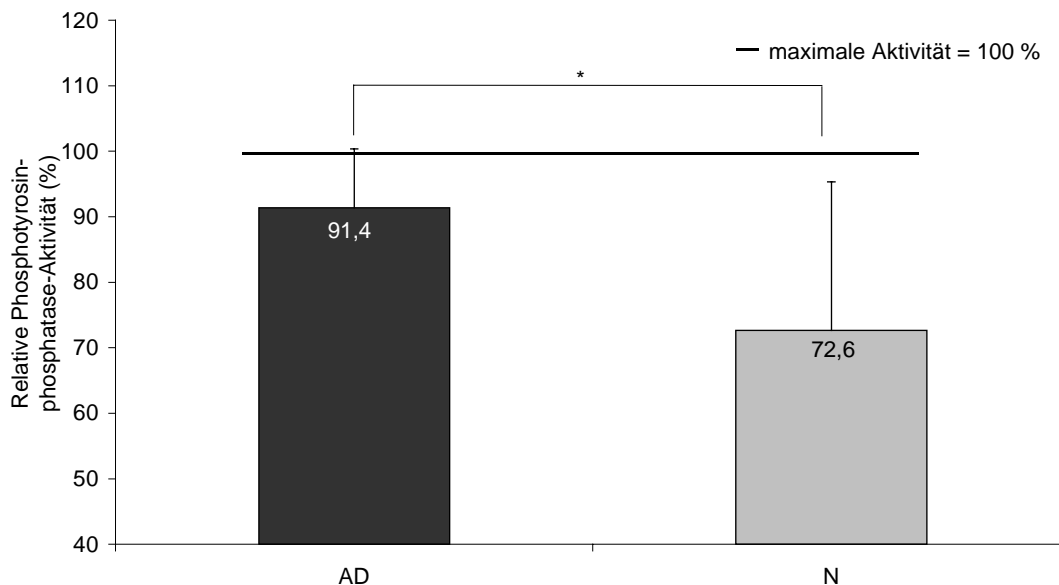


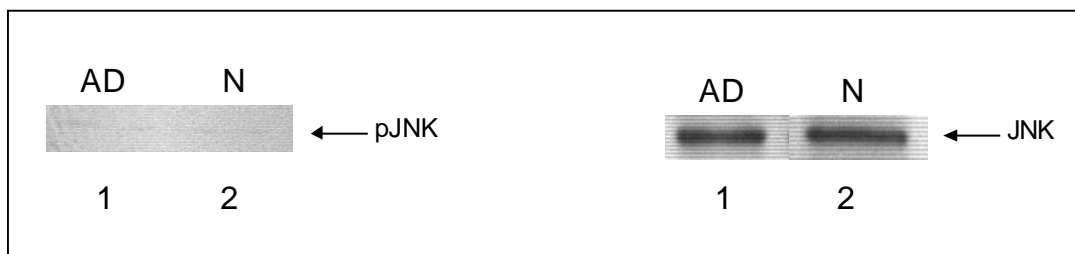
Abb. 4.11. Relative Aktivität der Phosphotyrosinphosphatasen von 5 µg Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 11) und normalhäutigen Spendern (n = 18). Die relativen Aktivitäten wurden photometrisch über eine Farbreaktion im Verhältnis zur phosphorylierten Substratkontrolle als maximale und Leerwertkontrolle als minimale Aktivitätswerte bestimmt. Die dargestellten Werte sind hintergrundkorrigiert (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied).

4.1.9. MAP-Kinase-Kaskaden in Fibroblasten

In Folgeversuchen wurden verschiedene spezifische Kinasen in Zytosolextrakten aus dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern bzw. Spendern mit atopischer Dermatitis untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die MAP-Kinase-Kaskaden gelegt, die zu ihrer vollständigen Aktivierung an Threonin und Tyrosin phosphoryliert vorliegen müssen.

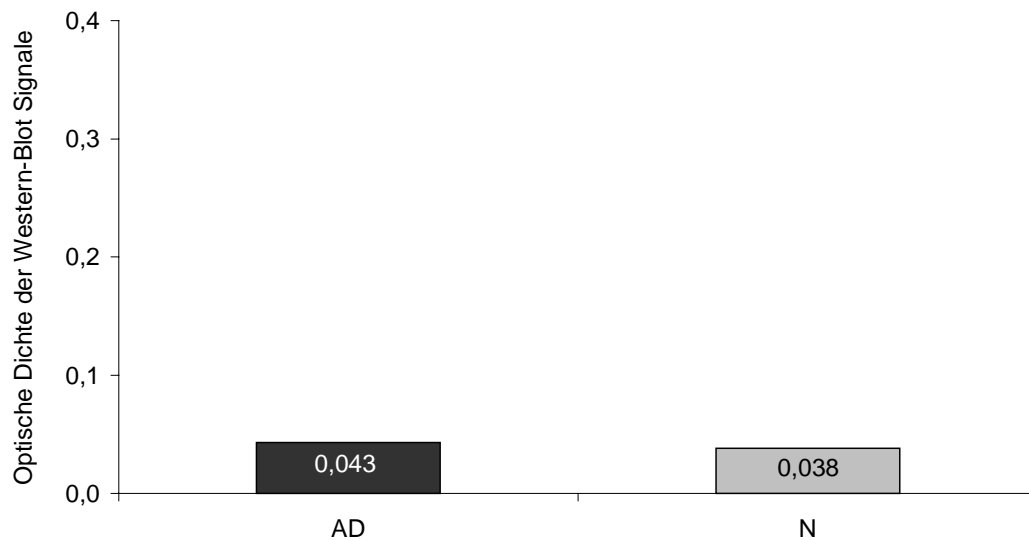
4.1.9.1. JNK in Fibroblasten

In Western-Blots wurden Zytosolextrakte von dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis auf ihren Grundgehalt an aktivierter JNK (pJNK) untersucht (siehe 3.6.6.3.). In diesem Zusammenhang veranschaulicht Abbildung 4.12. exemplarisch sowohl den Gehalt an pJNK als auch zusätzlich den Gehalt an JNK. Der Grundgehalt an JNK und auch pJNK ist bei beiden Spenderkollektiven nahezu identisch.



a)

b)



c)

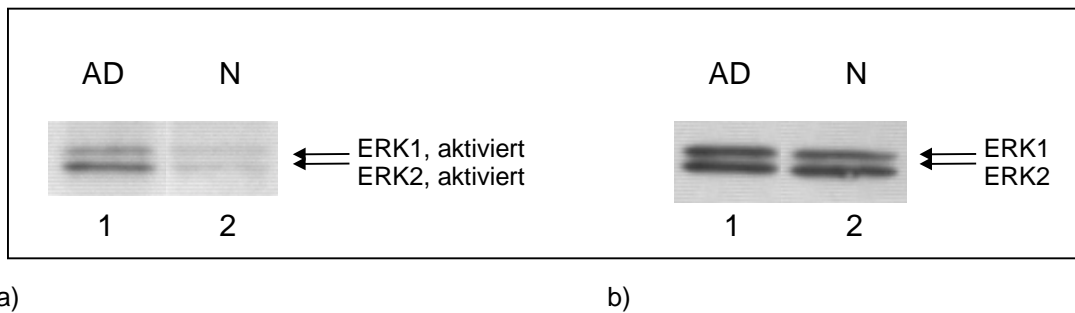
Abb. 4.12.a Exemplarischer Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders. Aktivierte pJNK wurde mit einem monoklonalen aktivierten anti-pJNK-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.12.b** zeigt den Western-Blot aus Abb. 4.12.a, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an JNK durch einen polyklonalen anti-JNK-Antikörper (1:1000) in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.12.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.12.a Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender).

4.1.9.2. p38 in Fibroblasten

Zytoplasmatische Extrakte dermaler Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und von Spendern mit atopischer Dermatitis wurden mit einem Antikörper, der gegen die aktivierte p38 Kinase gerichtet ist, immunpräzipitiert (siehe 3.5.4.). In einer nachfolgenden Kinasereaktion wurde ein spezifisches Substrat (ATF-2) durch die immunpräzipitierte p38 Kinase *in vitro* phosphoryliert und in einem Western-Blot der Gehalt an phosphoryliertem ATF-2 visualisiert. Im ungestressten Grundzustand war nur sehr wenig phosphoryliertes Substrat zu detektieren, d. h. daß die p38 Kinase nur leicht aktiviert vorlag. Zwischen den beiden Spenderkollektiven war kein Unterschied zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

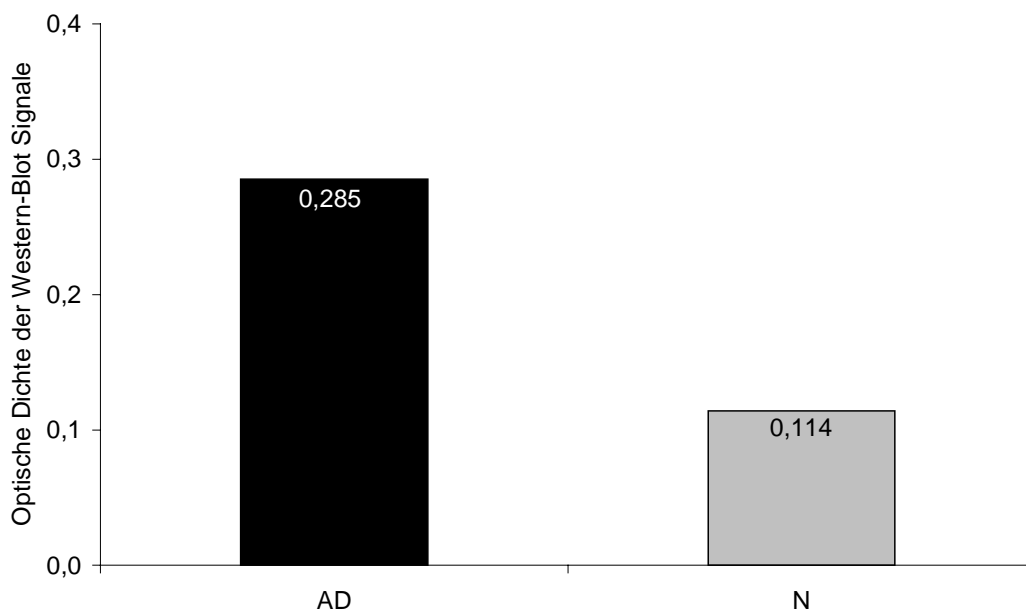
4.1.9.3. ERK1/2 in Fibroblasten

Eine weitere spezifische Kinase, die im Grundgehalt hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht wurde, war die ERK1/2-Kinase. Zytosolextrakte dermalen Fibroblasten von Spendern mit Normalhaut und Spendern mit atopischer Dermatitis wurden in Western-Blot-Untersuchungen auf ihre ERK1/2-Expression und ihre ERK1/2-Aktivierung miteinander verglichen (siehe 3.6.6.2.). In Abbildung 4.13. ist das Ergebnis veranschaulicht. Die ERK1/2-Kinase in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis weist im direkten Vergleich eine mehr als doppelt so starke Aktivierung (Abb 4.13.a) wie die der Fibroblasten von normalhäutigen Spendern auf.



a)

b)



c)

Abb. 4.13.a. Exemplarischer Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders. Aktivierte ERK1/2 wurde mit einem monoklonalen aktivierten anti-ERK1/2-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.13.b** zeigt den Western-Blot aus Abb. 4.13.a, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an ERK1/2 durch einen polyklonalen anti-ERK1-Antikörper (1:1000), in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.13.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.13.a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender).

4.2. Ergebnisse nach H₂O₂-Inkubation

Inhalt dieses Ergebnisteiles sind Experimente zur zellulären Antwort von Fibroblasten normalhäutiger Spender (N) im Vergleich zu Fibroblasten von Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) auf die Inkubation mit H₂O₂. Die Untersuchung der Zellfunktion auf diesen oxidativen Stressor erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Stressexperimente.

4.2.1. Relative Zellzahl von Fibroblasten nach H₂O₂-Inkubation

In Abbildung 4.14. ist das Ergebnis der Bestimmung der relativen Zellzahl mit dem Fluorophor EthD-1 dargestellt. Da die experimentelle Bestimmung verschiedener Zellparameter nur an lebenden Zellen, d.h. unfixierten Zellen durchgeführt werden kann, ist es hierbei nicht möglich eine Aussage über die absolute Zellzahl zu machen. Zunächst mußte ausgeschlossen werden, daß die oxidative Stressbelastung durch die H₂O₂-Inkubation nicht zu Zellverlusten führte. Fibroblasten im konfluenten Stadium wurden nach einer 15-minütigen Inkubation mit 0,1, 0,375 und 0,75 mM H₂O₂ und anschließend gemäß Abschnitt 3.4.6. behandelt.

Zwischen den beiden Vergleichskollektiven bestehen keine Unterschiede in der relativen Zellzahl und daher sind die Daten zusammen dargestellt. Die H₂O₂-Inkubation in den angegebenen Intensitäten führt nicht zu signifikanten Zellverlusten und kann daher vernachlässigt werden.

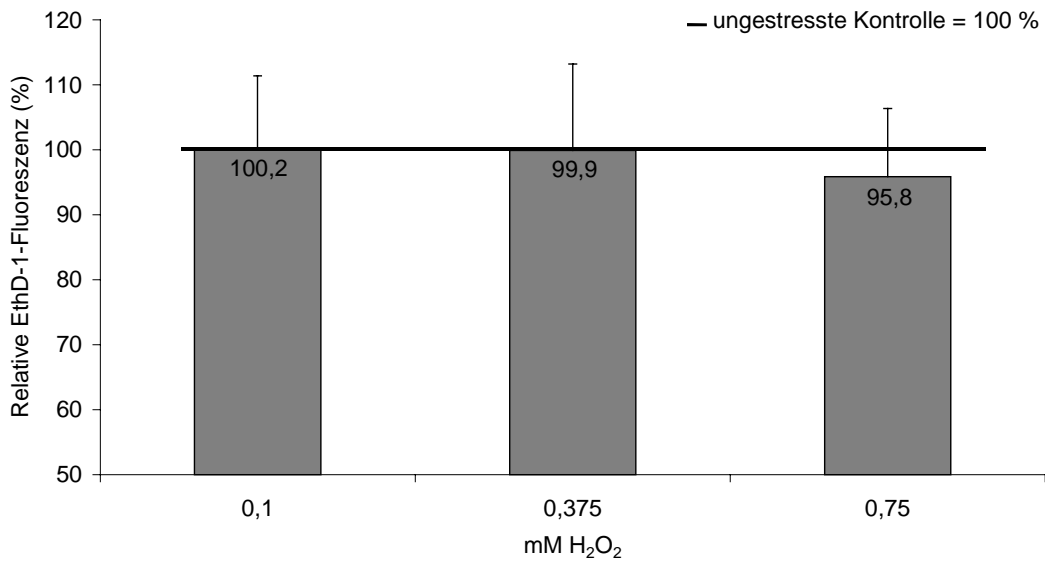


Abb. 4.14. Relative EthD-1-Fluoreszenz (Ex 530 nm/Em 645 nm) zur Bestimmung der Zellzahl in dermalen Fibroblasten ($n = 16$) nach 15-minütiger Inkubation mit H_2O_2 in den angegebenen Konzentrationen und nachfolgender Fixierung. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur für jeden Zeitpunkt mit PBS behandelten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in drei Bestimmungen für jeden Ansatz ($n =$ Stichprobenumfang).

4.2.2. Esterasefunktionsstatus in Fibroblasten nach H_2O_2 -Inkubation

Abbildung 4.15. zeigt die Calcein-Fluoreszenz funktioneller Esterasen als Maß für die Zellvitalität nach einer 15 minütigen Inkubation mit 0,1, 0,375 und 0,75 mM H_2O_2 (siehe Abschnitt 3.3.2.1.) in Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis. Die Esterasefunktion nimmt dosisabhängig ab. Beide Spenderkollektive reagieren in gleicher Weise auf den H_2O_2 -Stress. Eine Inkubation mit 0,1 mM H_2O_2 führt zu einer Abnahme der Fluoreszenzwerte um ca. 10 %. Nach einer 0,375 mM H_2O_2 -Inkubation erreichen die Fluoreszenzwerte noch ca. 85 %, während eine Inkubation mit 0,75 mM H_2O_2 die Fluoreszenzwerte auf ungefähr 83 % (bei den Spendern mit atopischer Dermatitis) bzw. 80 % (bei den normalhäutigen Spendern) absinken.

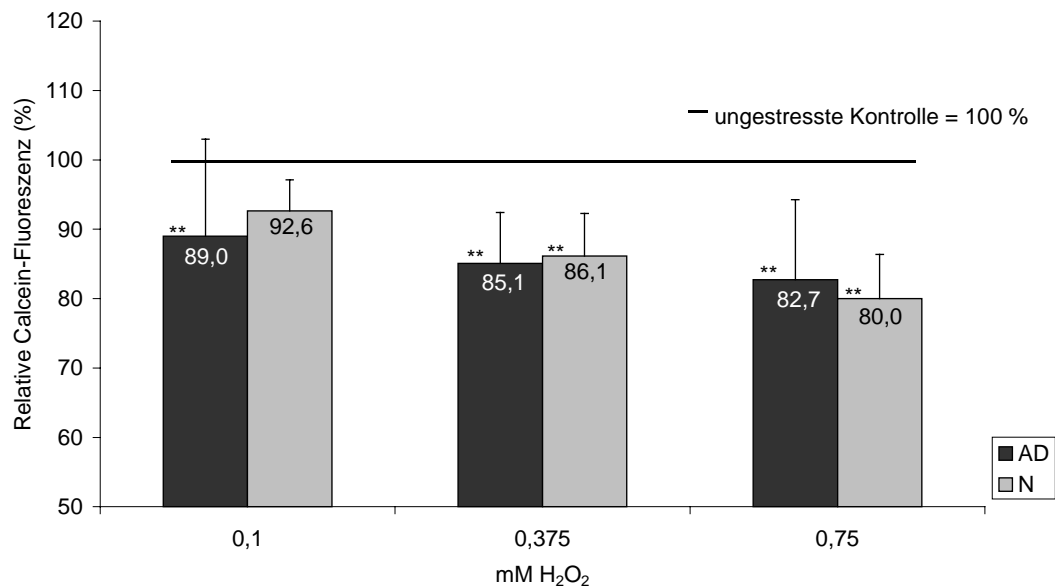


Abb. 4.15. Relative Calcein-Fluoreszenz (Ex 485 nm/Em 530 nm) zur Bestimmung der Zellvitalität in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 7) und normalhäutigen Spendern (n = 13) nach 15-minütiger Inkubation mit H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur für jeden Zeitpunkt mit PBS behandelten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in drei Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.2.3. Gehalt an löslichen Peroxiden in Fibroblasten nach H₂O₂-Inkubation

In Abbildung 4.16. ist die relative, prozentuale DCF-Fluoreszenz, ein Maß für den Gehalt an löslichen Peroxiden, als Reaktion auf den gesetzten H₂O₂-Stress in Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis dargestellt (siehe Abschnitt 3.4.2.). Während die Inkubationen mit 0,1 mM und 0,375 mM H₂O₂ bei beiden Vergleichskollektiven den Gehalt an löslichen Peroxiden nur marginal beeinflussen, führt eine 15-minütige Inkubation mit 0,75 mM H₂O₂ bei den Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis zu einer hochsignifikanten Erhöhung der löslichen Peroxide auf 182 %. Bei den Fibroblasten von normalhäutigen Spendern hat diese H₂O₂-Konzentration nur eine 10 %ige Erhöhung des Peroxidgehalts zur Folge.

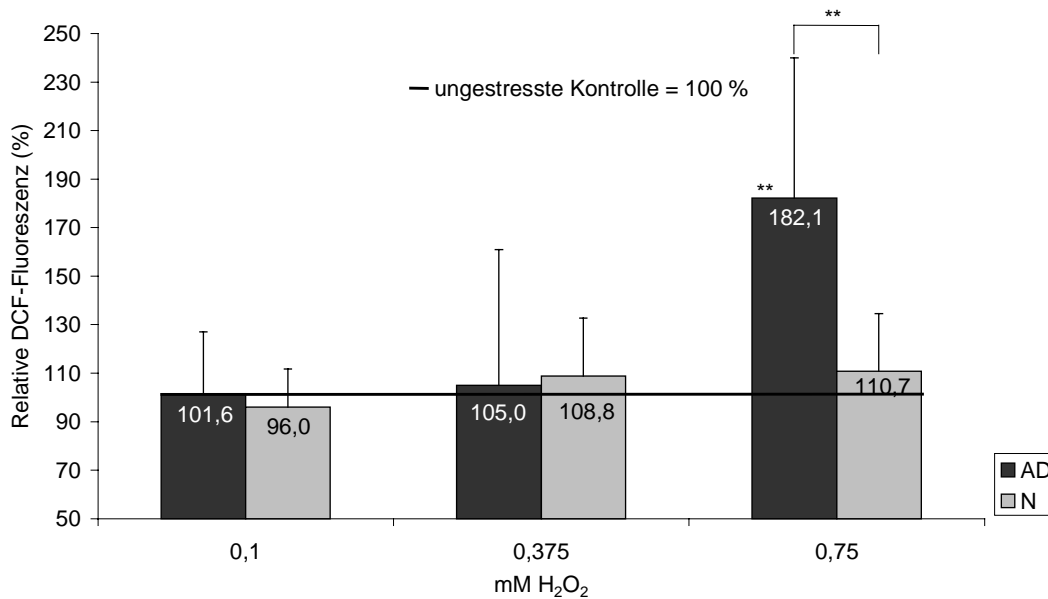


Abb. 4.16. Relative DCF-Fluoreszenz (Ex 485 nm/Em 530 nm) zur Bestimmung löslicher Peroxide in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 7) und normalhäutigen Spendern (n = 13) nach 15-minütiger Inkubation mit H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur für jeden Zeitpunkt mit PBS behandelten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in drei Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.2.4. Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten nach H₂O₂-Inkubation

Abbildung 4.17. zeigt die relative, prozentuale mBrB-Fluoreszenz, zur Bestimmung des Thiolgehalts als Reaktion auf den gesetzten H₂O₂-Stress in Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis (siehe 3.4.1.). Bei der Untersuchung dieses Parameters zeigt sich bei den normalhäutigen Spendern eine dosisabhängige Abnahme der Fluoreszenzeinheiten, die von 83 % (0,1 mM H₂O₂) über 82 % (0,375 mM H₂O₂) auf 73 % (0,75 mM H₂O₂) sinken. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis ist dagegen keine dosisabhängige Abnahme der mBrB-Fluoreszenzen zu erkennen. In diesem Fall sinken die Fluoreszenzwerte bei den drei eingesetzten H₂O₂-Konzentrationen auf 90 % ab.

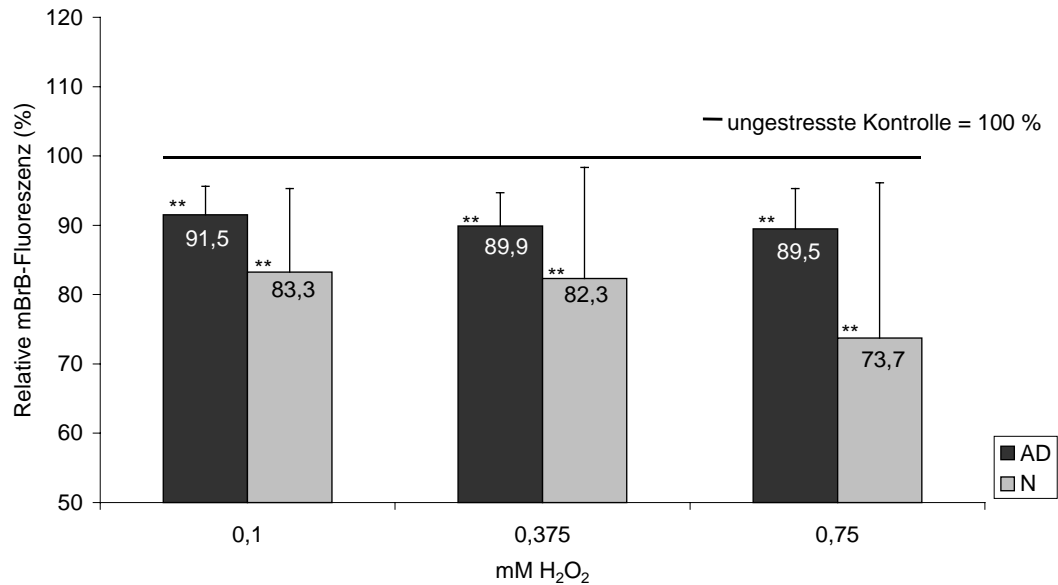


Abb. 4.17. Relative mBrB-Fluoreszenz (Ex 390 nm/Em 460 nm) zur Bestimmung des Gehaltes an freien Thiolen in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 7) und normalhäutigen Spendern (n = 13) nach 15-minütiger Inkubation mit H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur für jeden Zeitpunkt mit PBS behandelten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 %-Kontrolle gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in drei Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.2.5. Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach H₂O₂-Inkubation

Die Untersuchungen zur Beeinflussung des MMPs von Fibroblasten durch H₂O₂-Stress wurden mit dem Fluorophor JC-1 durchgeführt (siehe 3.4.5.). Hier zeigt sich, daß eine 15-minütige Inkubation mit 0,1, 0,375 und 0,75 mM H₂O₂ bei beiden Spenderkollektiven lediglich eine geringe Wirkung im Bereich von 5 % hat, die jedoch ohne statistische Bedeutung ist. Daher wird auf diese Daten nicht näher eingegangen.

4.2.6. Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten nach H₂O₂-Inkubation

Der Gehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen (siehe 3.4.4.) in Fibroblasten normalhäutiger Spender steigt unmittelbar nach Zugabe des Stressors an (siehe Abb. 4.18.). Bei den normalhäutigen Spendern zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme der Fluoreszenzeinheiten, die von 119 % (0,1 mM H₂O₂) über 114 % (0,375 mM H₂O₂) auf 117 % (0,75 mM H₂O₂) ansteigt. Während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis keine signifikante Erhöhung des Gehalts an phosphorylierten Tyrosinresten auftritt. Zwischen den beiden Kollektiven besteht nach einer 15-minütigen Inkubation mit 0,375 mM H₂O₂ ein signifikanter Unterschied.

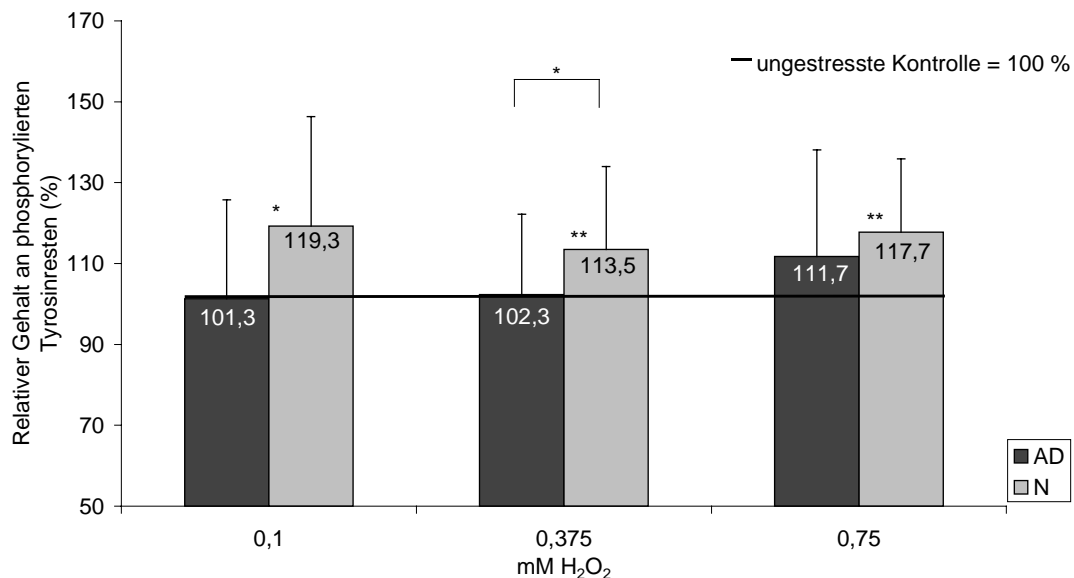


Abb. 4.18. Relative Fluoreszenz zur Bestimmung phosphorylierter Tyrosinreste in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 6) und normalhäutigen Spendern (n = 5) nach 15-minütiger Inkubation mit H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen. Die Phosphotyrosingehalte wurden mittels eines FITC-konjugierten, monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper ermittelt. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in drei Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.3. Ergebnisse nach UVA-Bestrahlung

In diesem Abschnitt des Ergebnisteiles werden Untersuchungen zur Reaktion von Fibroblasten normalhäutiger Spendern (N) im Vergleich zu Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (AD) unmittelbar nach UVA-Bestrahlung vorgestellt (siehe Abschnitt 3.3.2.2.).

4.3.1. Relative Zellzahl von Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

In Abbildung 4.19. ist das Ergebnis der Bestimmung der relativen Zellzahl mit dem Fluorophor EthD-1 dargestellt. Zunächst mußte ausgeschlossen werden, daß die oxidative Stressbelastung durch die UVA-Bestrahlung zu Zellverlusten führt. Fibroblasten im konfluenten Stadium wurden mit 5, 10, 20 J/cm² UVA-Licht bestrahlt und anschließend gemäß Abschnitt 3.4.6. behandelt. Da sich zwischen den beiden Vergleichskollektiven keine Unterschiede in der relativen Zellzahl zeigen, werden die beiden Gruppen zusammen betrachtet.

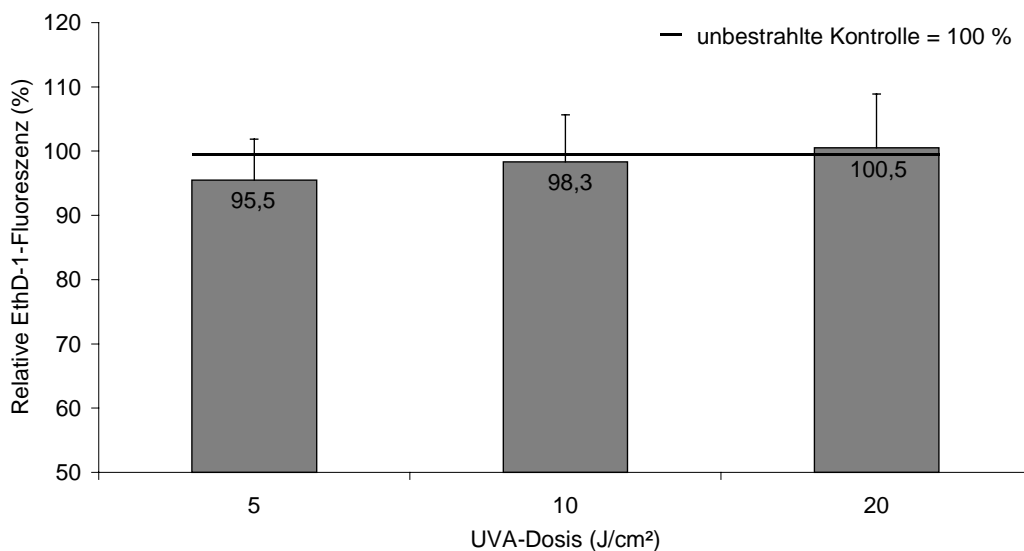


Abb. 4.19. Relative EthD-1-Fluoreszenz (Ex 530 nm/Em 645 nm) zur Bestimmung der relativen Zellzahl in dermalen Fibroblasten (n = 16) nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten und anschließender Fixierung. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (n = Stichprobenumfang).

4.3.2. Esterasefunktionsstatus in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Das Fluorophor Calcein, das die funktionelle Esteraseaktivität bestimmt, wurde gemäß Abschnitt 3.4.3. als Maß für die Vitalfunktion der Zelle verwendet. Dieser Parameter wurde zur Abschätzung des Einflusses von UVA-Strahlung in Intensitäten von 5, 10, 20 J/cm² auf die Zelle verwendet.

Abbildung 4.20. beschreibt die relative Calcein-Fluoreszenz von Fibroblasten normalhäutiger Spender im Vergleich zu Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis nach Bestrahlung in den angegebenen Dosen. Deutlich zu erkennen ist die dosisabhängige Verringerung bei beiden Spenderkollektiven. Bei normalhäutigen Spendern ist ein Abnahme von 87 % (5 J/cm²) über 83 % (10 J/cm²) auf 79 % (20 J/cm²) zu erkennen, während sich die UVA-Bestrahlung bei den Spendern mit atopischer Dermatitis stärker in der Esteraseaktivität niederschlägt. Sie zeigen eine Abnahme von 81 % (5 J/cm²) über 73 % (10 J/cm²) auf 61 % (20 J/cm²). Zwischen den beiden Spenderkollektiven besteht unmittelbar nach einer UVA-Bestrahlung mit der Intensität von 20 J/cm² ein signifikanter Unterschied. Die Wahrscheinlichkeiten unterscheiden sich für alle gezeigten Daten beider Spendergruppen hochsignifikant von der unbestrahlten Kontrolle.

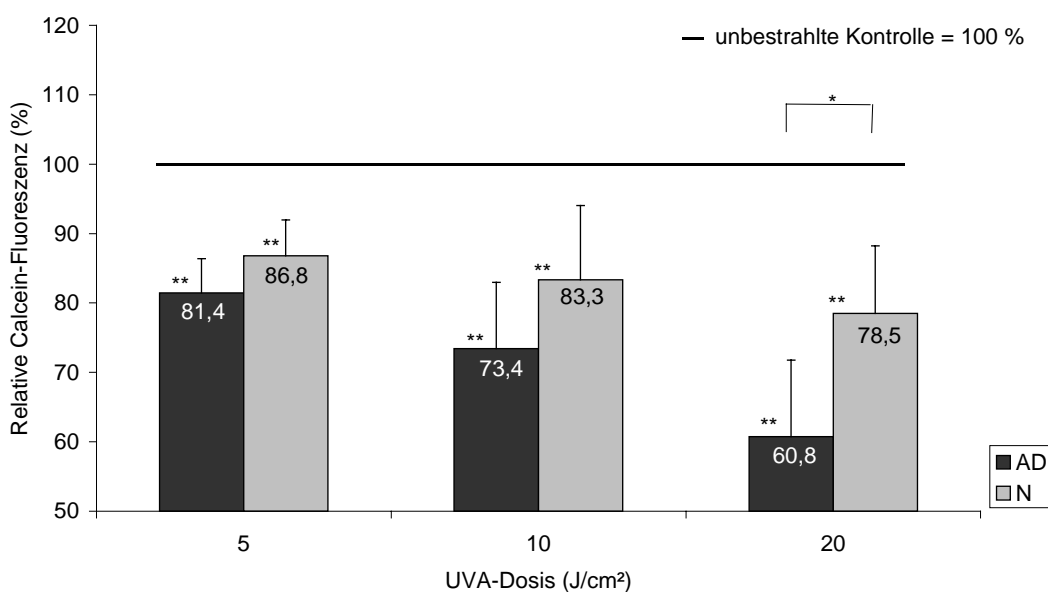


Abb. 4.20. Relative Calcein-Fluoreszenz (Ex 485 nm/Em 530 nm) zur Bestimmung der Zellvitalität in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 6) und normalhäutigen Spendern (n = 16) nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.3.3. Gehalt an freien Thiolen in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Abbildung 4.21. zeigt die relative, prozentuale mBrB-Fluoreszenz als Reaktion auf den gesetzten UVA-Stress in Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis (siehe 3.4.1.). Bei der Untersuchung dieses Parameters zeigt sich ebenfalls bei beiden untersuchten Spenderkollektiven eine dosisabhängige Abnahme der Fluoreszenzeinheiten. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis nimmt die Fluoreszenz von 83 % (5 J/cm^2) über 78 % (10 J/cm^2) auf 69 % (20 J/cm^2) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ab. Die Mittelwerte der untersuchten Fibroblasten von normalhäutigen Spendern entsprechen den dargestellten Befunden der Spender mit atopischer Dermatitis in ihrer Dosisabhängigkeit, erreichen im prozentualen Wert im Durchschnitt aber 6 – 9 % geringere Fluoreszenzen. Zwischen den beiden Spenderkollektiven besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. Allerdings unterscheiden sich alle dargestellten Werte hochsignifikant von der unbestrahlten Kontrolle.

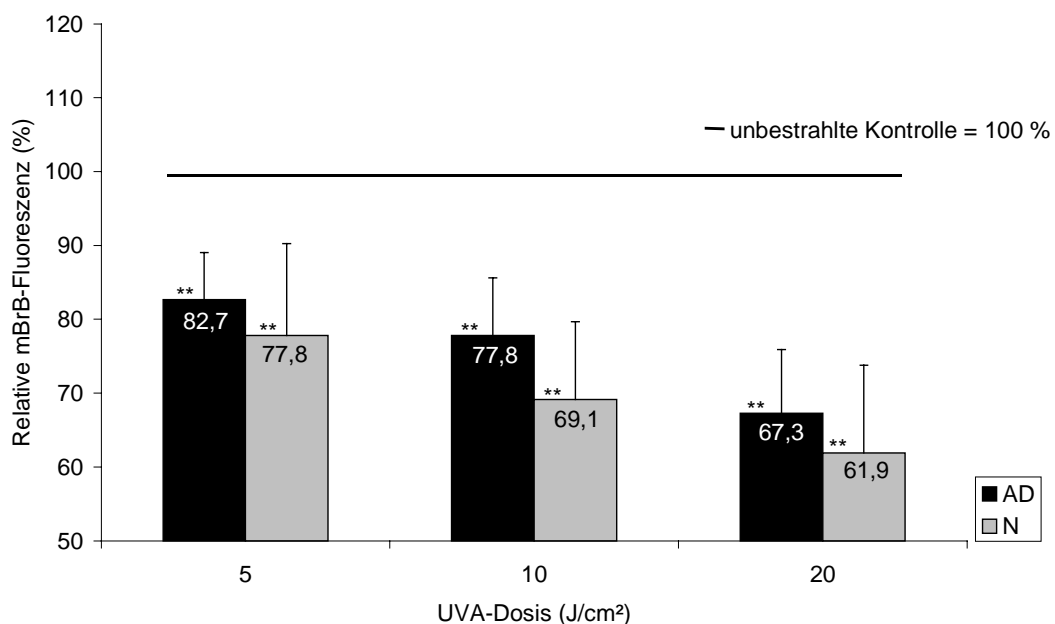


Abb. 4.21. Relative mBrB-Fluoreszenz (Ex 390 nm/Em 460 nm) zur Bestimmung des Gehaltes an freien Thiolen in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 8) und normalhäutigen Spendern (n = 16) nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.3.4. Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und von Spendern mit atopischer Dermatitis wurden unmittelbar nach Bestrahlung mit 5, 10, 20 J/cm² UVA-Licht mittels JC-1 zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMPs) überprüft (siehe 3.4.5.).

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in der Abbildung 4.22. graphisch dargestellt. Hier zeigt sich wie bei den Untersuchungen bezüglich der Vitalfunktion und auch des Gehalts an freien Thiolen (siehe 4.3.2. und 4.3.3.) bei beiden untersuchten Spenderkollektiven eine dosisabhängige Abnahme in den prozentualen Daten. Während die prozentualen Werte bei den normalhäutigen Spendern von 77 % (5 J/cm²) über 66 % (10 J/cm²) auf 57 % (20 J/cm²) abnehmen, liegen die Werte bei den Spendern mit atopischer Dermatitis zunächst nur leicht unter denen der normalhäutigen Spendern 75 % (5 J/cm²) fallen aber mit zunehmender Dosis stärker ab als das Normalkollektiv (46 %, 20 J/cm²). Bei der UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichskollektiven. Alle gezeigten Werte unterscheiden sich hochsignifikant von den jeweils unbestrahlten Kontrollen.

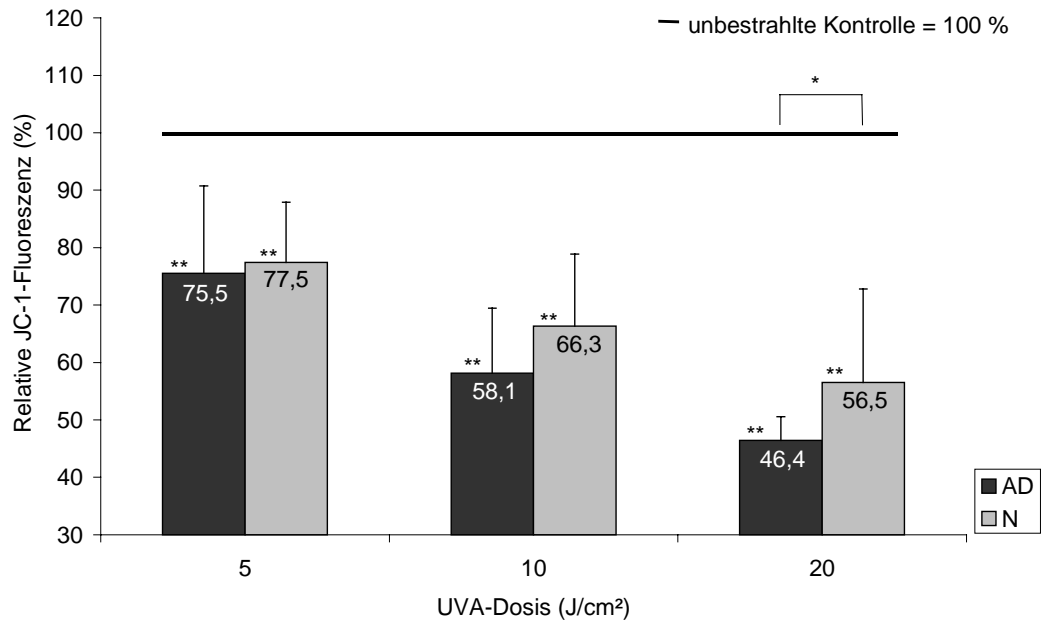
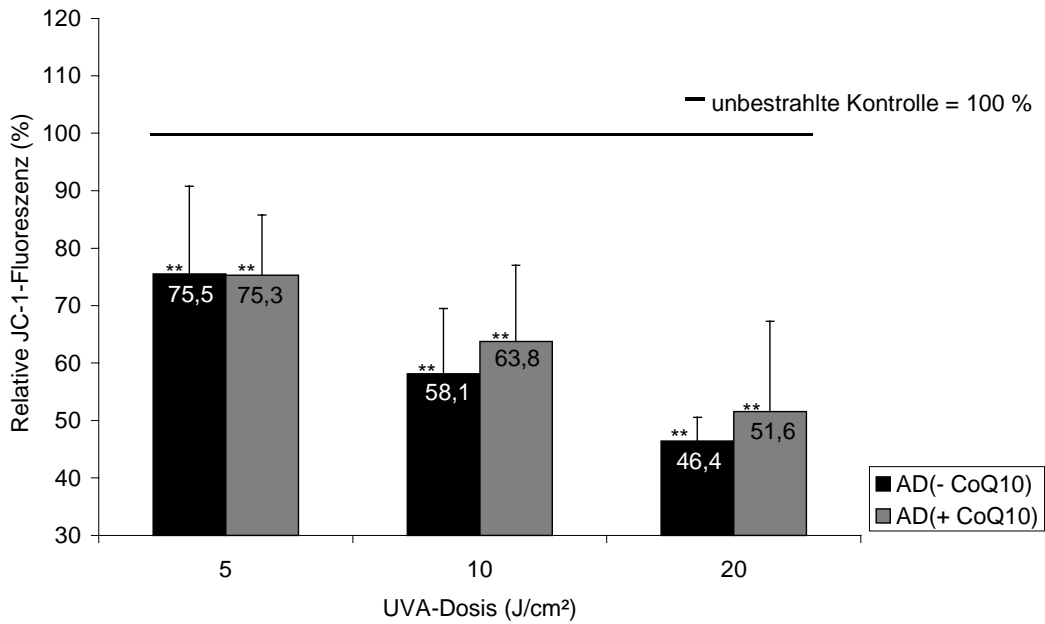


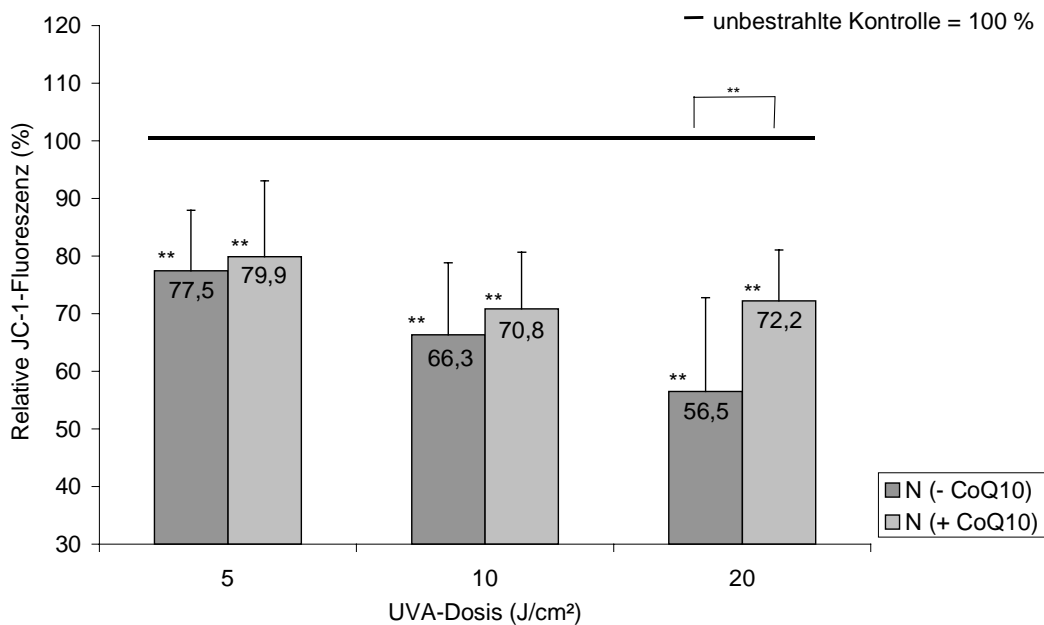
Abb. 4.22. Quotient der JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 8) und normalhäutigen Spendern (n = 16) nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.3.4.1. Mitochondrienmembranpotential in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Coenzym Q10, O-Acetyl-Carnitin oder Alpha-Glucosylrutin

Abbildung 4.23. zeigt den Effekt einer 24-stündigen Vorinkubation mit Coenzym Q10 (CoQ10) (siehe 3.3.3.) nach anschließender UVA-Bestrahlung auf den Quotienten der JC-1-Fluoreszenz als Maß für das MMP in Fibroblasten normalhäutiger Spender bzw. in Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis. Eine Vorinkubation mit CoQ10 kann bei den Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis das Absinken des MMPs nicht verhindern. Bei den Fibroblasten von normalhäutigen Spendern führt die Vorinkubation mit CoQ10 nach anschließender UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² zu einer hochsignifikanten Erhöhung des MMPs.



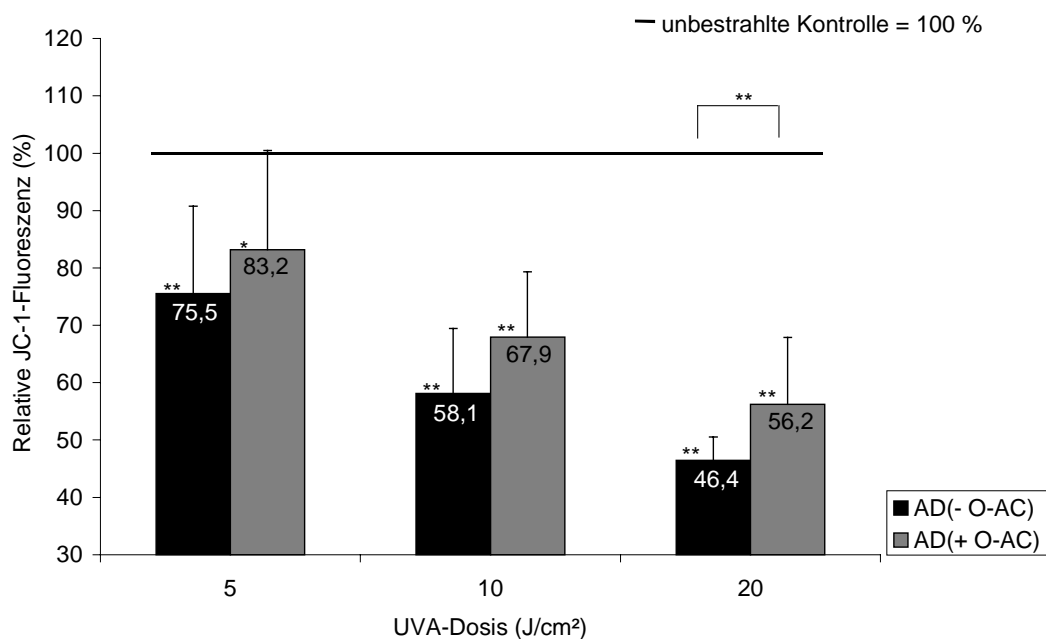
a)



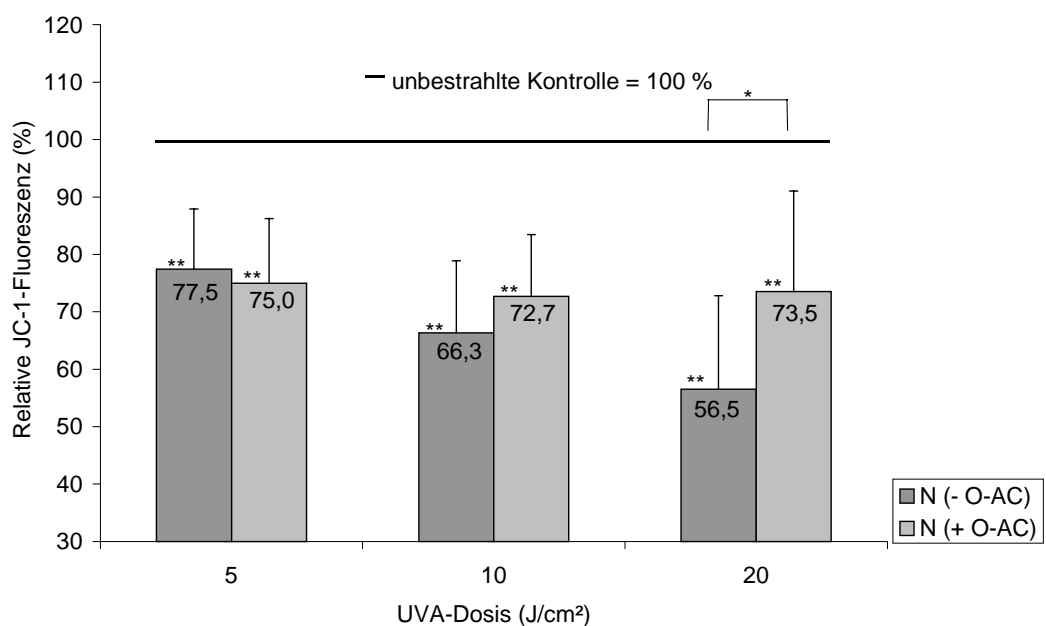
b)

Abb. 4.23. Quotient der JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten und nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten nach vorheriger 24-Stunden-Inkubation mit CoQ10 (150µM in 0,08% Ethanol in PBS). In **Abb. 4.23.a** sind Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 8) und in **Abb. 4.23.b** sind Fibroblasten von normalhäutigen Spendern (n = 13) dargestellt. Die Fluoreszenzwerte relativ zur unbestrahlten, unbehandelten oder unbestrahlten und entsprechend vorinkubierten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied, - CoQ10 = nicht mit CoQ10 vorinkubierte Fibroblasten, + CoQ10 = mit CoQ10 vorinkubierte Fibroblasten).

Unter identischen Versuchsbedingungen wurde der Effekt einer 24-stündigen Vorinkubation mit O-Acetyl-Carnitin (O-AC) (150 μ M in PBS) untersucht (siehe Abb. 4.24.). Bei beiden Spenderkollektiven hat eine Vorinkubation mit O-AC eine Erhöhung des MMPs zur Folge. Nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² und vorheriger O-AC Inkubation wird der Fluoreszenzwert des MMPs von Fibroblasten mit atopischer Dermatitis hochsignifikant 10 % erhöht. Bei Fibroblasten von normalhäutigen Spendern kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Fluoreszenzwertes von 56 % auf 73 %.



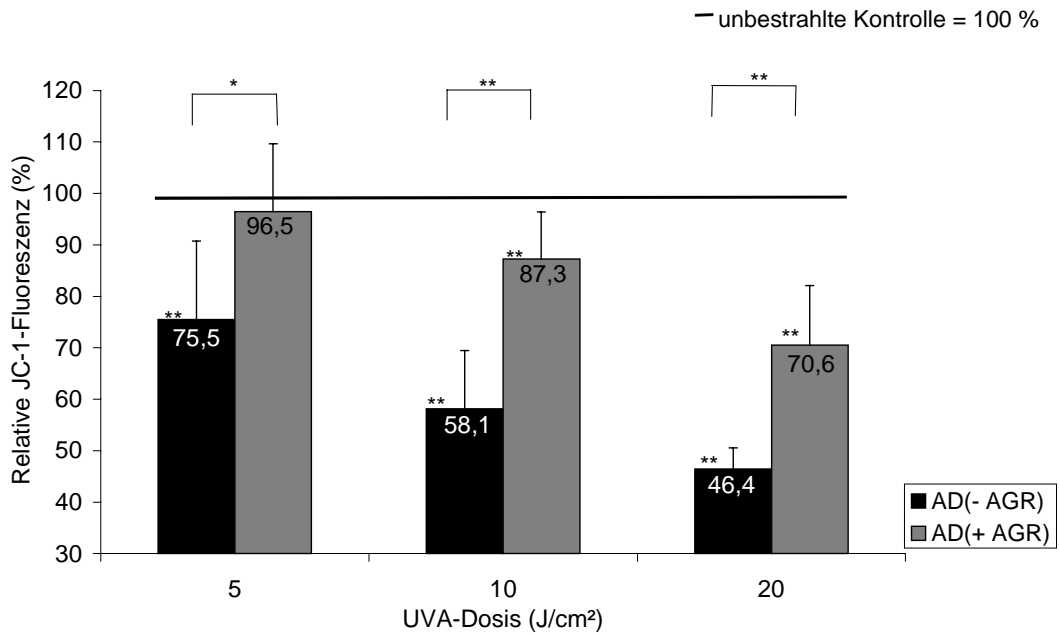
a)



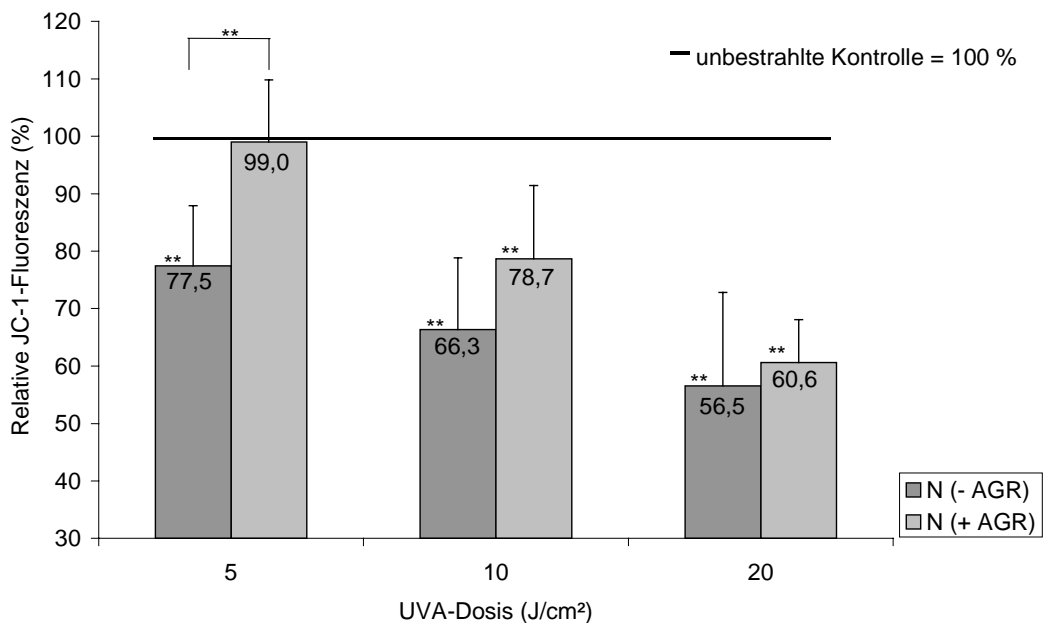
b)

Abb. 4.24. Quotient der JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten und nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten nach vorheriger 24-Stunden-Inkubation mit O-AC (150µM in PBS). In **Abb. 4.24.a** sind Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 8) und in **Abb. 4.24.b** sind Fibroblasten von normalhäutigen Spendern (n = 13) dargestellt. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur unbestrahlten, unbehandelten oder unbestrahlten und entsprechend vorinkubierten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied, - O-AC = nicht mit O-AC vorinkubierte Fibroblasten, + O-AC = mit O-AC vorinkubierte Fibroblasten).

Abbildung 4.25. verdeutlicht den Effekt einer 24-stündigen Vorinkubation mit AGR und anschließender UVA-Bestrahlung in Fibroblasten der beiden Vergleichskollektive. Bei Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis führt eine Vorinkubation mit AGR und nachfolgender UVA-Bestrahlung zu einer signifikanten (5 J/cm²) bzw. hochsignifikanten (10 J/cm², 20 J/cm²) Erhöhung der Fluoreszenzdaten des MMPs. Nach einer UVA-Bestrahlung mit 5 J/cm² wird der Fluoreszenzwert von 76 % auf 96 %, nach 10 J/cm² von 58 % auf 87 % und nach 20 J/cm² von 46 % auf 71 % angehoben. Bei Fibroblasten von normalhäutigen Spendern kann eine Vorinkubation mit AGR lediglich bei einer nachfolgenden 5 J/cm² UVA-Bestrahlung ein Absinken des Fluoreszenzwertes des MMPs verhindern. In diesem Fall ist die Anhebung der Fluoreszenzwerte um ca. 22 % zur gleichbestrahlten, nicht-vorinkubierten Kontrolle statistisch hochsignifikant.



a)



b)

Abb. 4.25. Quotient der JC-1-Fluoreszenz (Ex 485 nm, Em 590 nm/Ex 485 nm, Em 530 nm) zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten und nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten nach vorheriger 24-Stunden-Inkubation mit AGR (150µM in PBS). In **Abb. 4.25.a** sind Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 6) und in **Abb. 4.25.b** sind Fibroblasten von normalhäutigen Spendern (n = 6) dargestellt. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur unbestrahlten, unbehandelten oder unbestrahlten und entsprechend vorinkubierten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied, - AGR = nicht mit AGR vorinkubierte Fibroblasten, + AGR = mit AGR vorinkubierte Fibroblasten).

4.3.5. ATP-Gehalt in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Zur Bestimmung des intrazellulären Gehaltes an ATP nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² wurden Fibroblasten normalhäutiger Spender und von Spendern mit atopischer Dermatitis, gemäß Abschnitt 3.4.7., im Luziferin-Luziferase-Assay überprüft. Während bei den normalhäutigen Spendern keine statistisch relevante Veränderung des ATP-Gehalts detektiert werden kann, zeigen die Spender mit atopischer Dermatitis eine statistisch signifikante Verringerung des ATP-Gehalts auf 68 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Zwischen den beiden Vergleichskollektiven besteht ein signifikanter Unterschied (Abb. 4.26.).

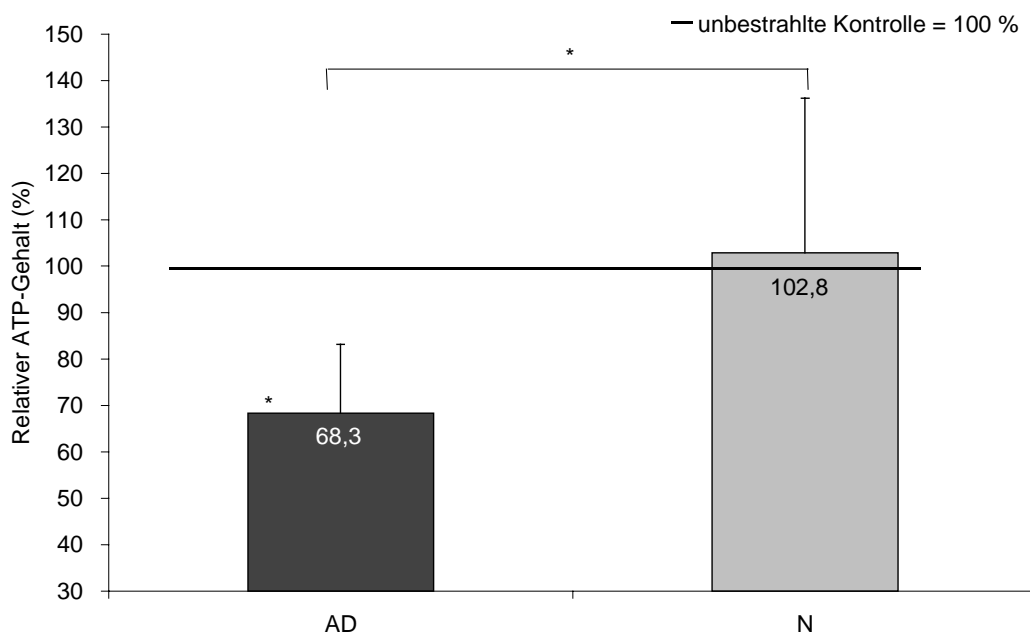


Abb. 4.26. Intrazellulärer ATP-Gehalt konfluent gewachsener Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 7) und normalhäutigen Spendern (n = 15) nach Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA-Licht. Der ATP-Gehalt wurde als Zellsuspension, im Luziferin-Luziferase-Assay in einem Ansatz für jede Probe relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle, deren ATP-Gehalt als 100 % gesetzt wurde, bestimmt (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied).

4.3.6. Phosphorylierte Tyrosinreste in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Durch UVA-Bestrahlung kommt es bei beiden Spenderkollektiven zu einem Anstieg der phosphorylierten Tyrosinreste. Bei den Spendern mit normaler Haut führt eine UVA-Bestrahlung zu einer Erhöhung der Fluoreszenzwerte auf ungefähr 130 %, während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis eine Erhöhung auf ungefähr 120 % zu verzeichnen ist. Zwischen den beiden Vergleichskollektiven bestehen keine signifikanten Unterschiede. Eine Bestrahlung mit 5 J/cm² hat keine signifikante Steigerung der Fluoreszenzwerte zur Folge.

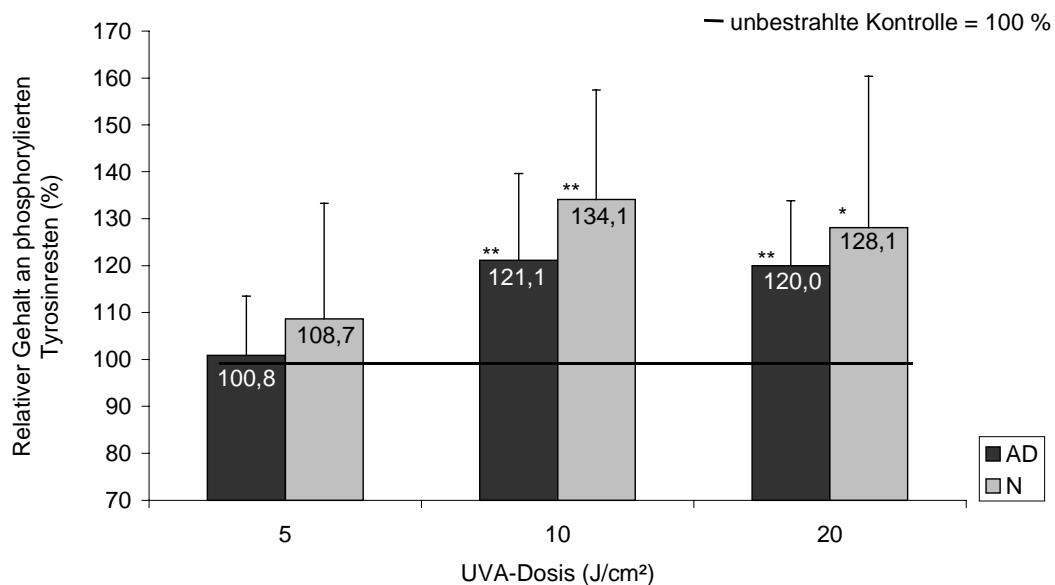
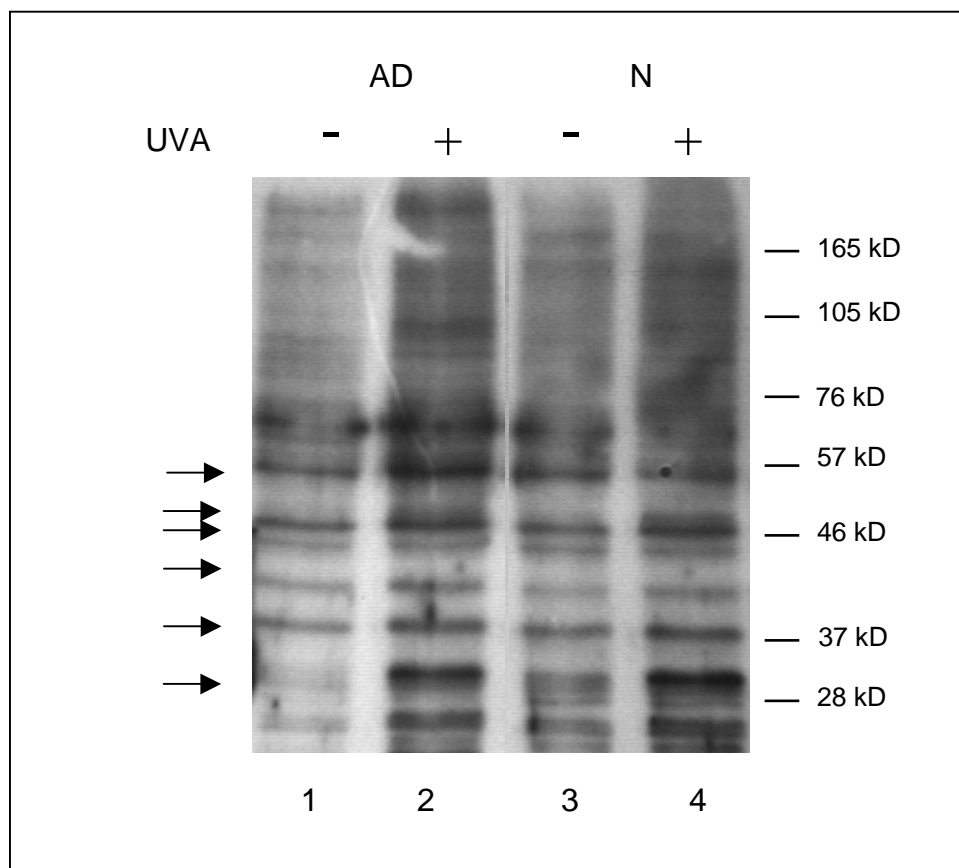
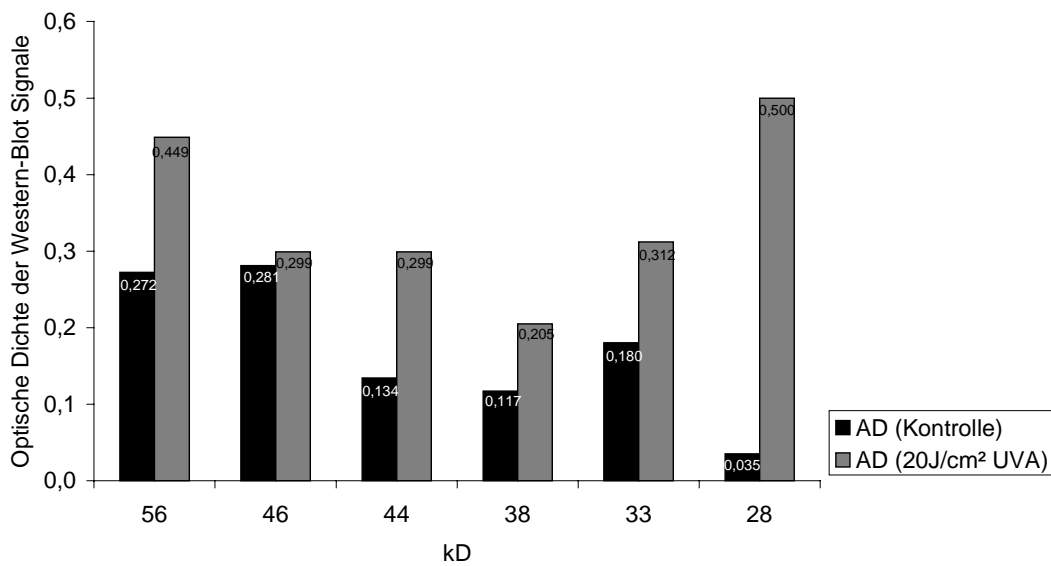


Abb. 4.27. Relative Fluoreszenz zur Bestimmung phosphorylierter Tyrosinreste in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (n = 6) und normalhäutigen Spendern (n = 5) nach Bestrahlung mit UVA-Licht in den angegebenen Intensitäten. Die Phosphotyrosingehalte wurden mittels eines FITC-konjugierten, monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper ermittelt. Die Fluoreszenzwerte wurden relativ zur jeweils unbestrahlten Kontrolle bestimmt, deren Fluoreszenzwert als 100 % gesetzt wurde. Gemessen wurde im Cytofluor II unter Hintergrundkorrektur in 16 Bestimmungen für jeden Ansatz (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

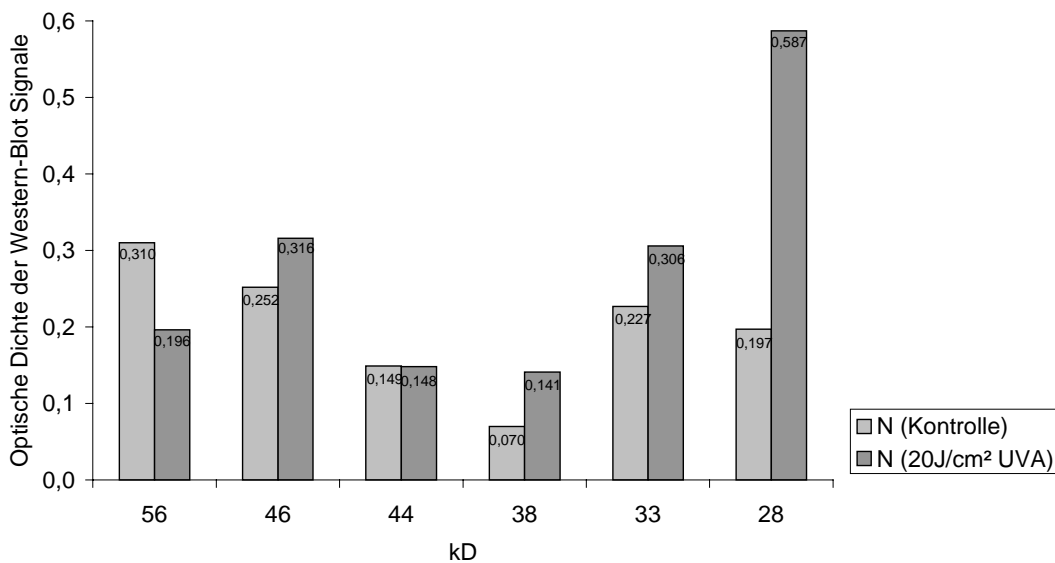
Anschließende Western-Blot-Untersuchungen bei beiden Spenderkollektiven ergänzen diese Ergebnisreihe hinsichtlich der Überprüfung des Gehaltes an phosphorylierten Tyrosinresten (siehe 3.6.6.1.) unmittelbar nach UVA-Bestrahlung. Abbildung 4.28.a veranschaulicht exemplarisch den Gehalt der phosphotyrosinpositiven Proteine in Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis (Spur 1, 2) bzw. normaler Haut (Spur 3, 4). Die durch Pfeilmarkierungen (\rightarrow) gekennzeichneten, detektierten Chemilumineszenzsignale wurden mittels digitaler Bildanalyse aufgenommen und sowohl in ihrer Intensität als auch im Molekulargewicht über das Softwareprogramm ONE-DscanTM ausgewertet (Abb. 4.28.b und Abb. 4.28.c). Dabei zeigen sich bei beiden Spenderkollektiven verstärkte Bandensignale der detektierten phosphorylierten Tyrosinreste, besonders im Molekulargewichtsbereich von ca. 30 kD bis ca. 60 kD.



a)



b)



c)

Abb. 4.28.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines normalhäutigen Spenders nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm². Phosphorylierten Tyrosine wurden mit einem monoklonalen anti-Phosphotyrosin-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.28.b** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse des Spenders mit atopischer Dermatitis aus Abb. 4.28.a. **Abb. 4.28.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse des normalhäutigen Spenders aus Abb. 4.28.a. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, - = ohne UVA-Bestrahlung, + = mit UVA-Bestrahlung, kD = Kilodalton)

4.3.7. Tyrosinkinaseaktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

In weiteren Experimenten sollte die relative Aktivität von Tyrosinkinasen (siehe 3.5.3.) in 20 J/cm^2 -UVA-bestrahlten Zytosolextrakten von Fibroblasten normalhäutiger Spender und Spendern mit atopischer Dermatitis gegenüber ihrer unbestrahlten Kontrolle untersucht werden (siehe Abb. 4.29.). Bei den normalhäutigen Spendern kann die Kinaseaktivität der Zellen durch Bestrahlung nur leicht, statistisch allerdings nicht relevant, induziert werden. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis kommt es zu einer leichten Inhibierung der Kinaseaktivität, die aber ebenfalls nicht von statistischer Relevanz ist.

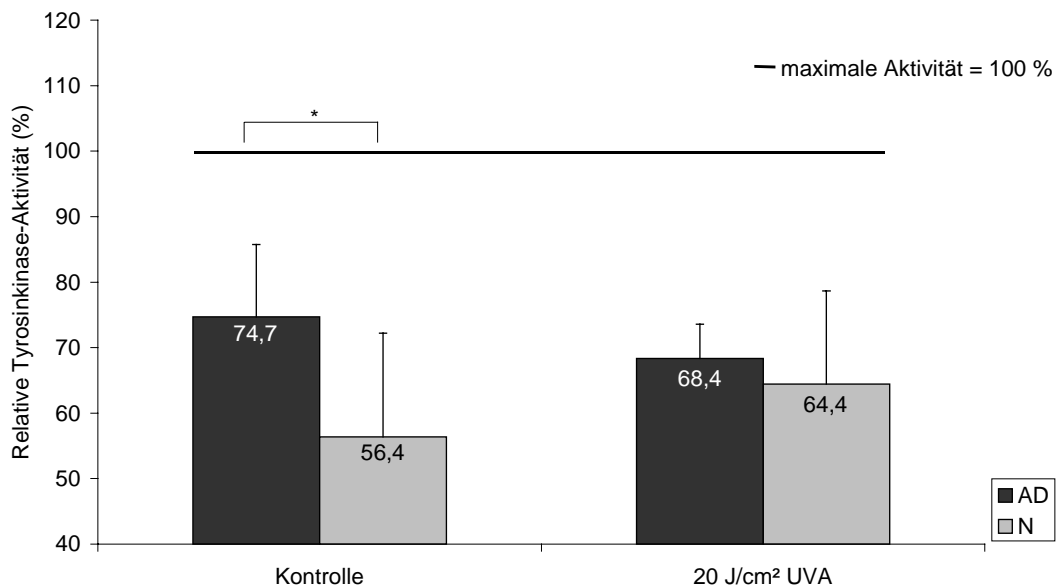


Abb. 4.29. Relative Aktivität der Tyrosinkinasen von $5 \mu\text{g}$ Zytosolextrakten dermaler Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ($n = 6$) und normalhäutigen Spendern ($n = 5$) nach Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVA-Licht. Die relativen Aktivitäten wurden photometrisch über eine Farbreaktion im Verhältnis zur phosphorylierten Substratkontrolle als maximale und Leerwertkontrolle als minimale Aktivitätswerte bestimmt. Die dargestellten Werte sind hintergrundkorrigiert (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied).

4.3.8. Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

In Abbildung 4.30. ist die relative Aktivität der Phosphotyrosinphosphatasen in Zytosolextrakten von Fibroblasten normalhäutiger Spender und Spendern mit atopischer Dermatitis nach UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm^2 dargestellt (siehe 3.5.2.). Hier zeigt sich eine hochsignifikante Inhibition der Phosphatase-Aktivität in Zellen beider Vergleichskollektive im Vergleich zur jeweils unbestrahlten Kontrolle.

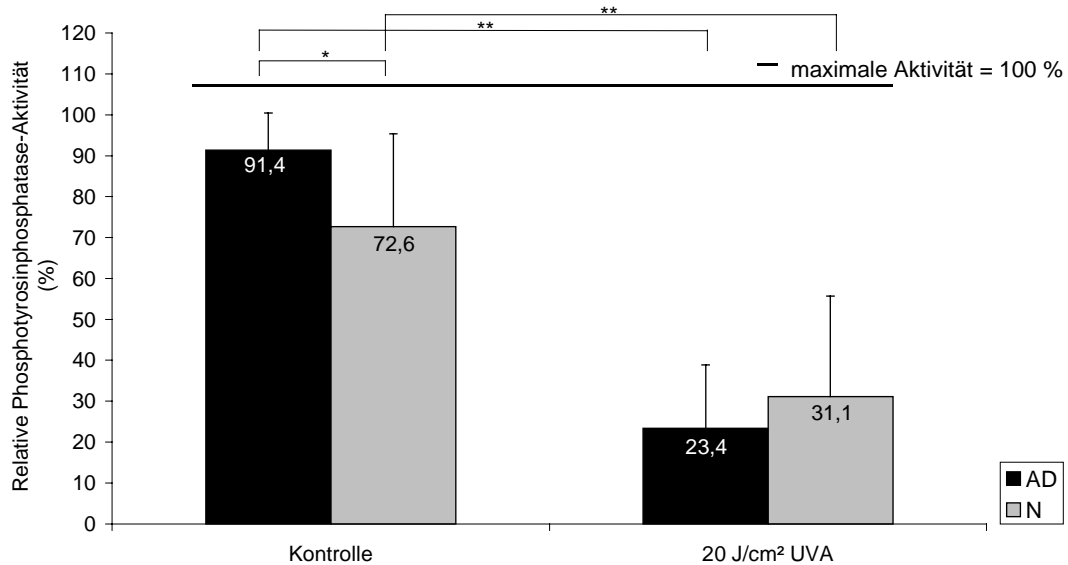
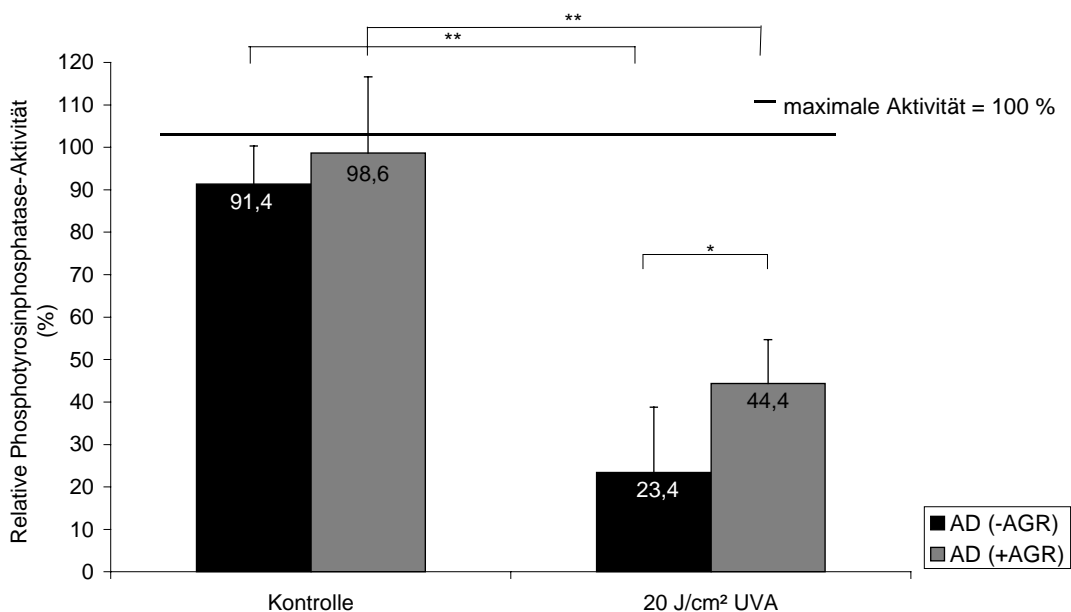


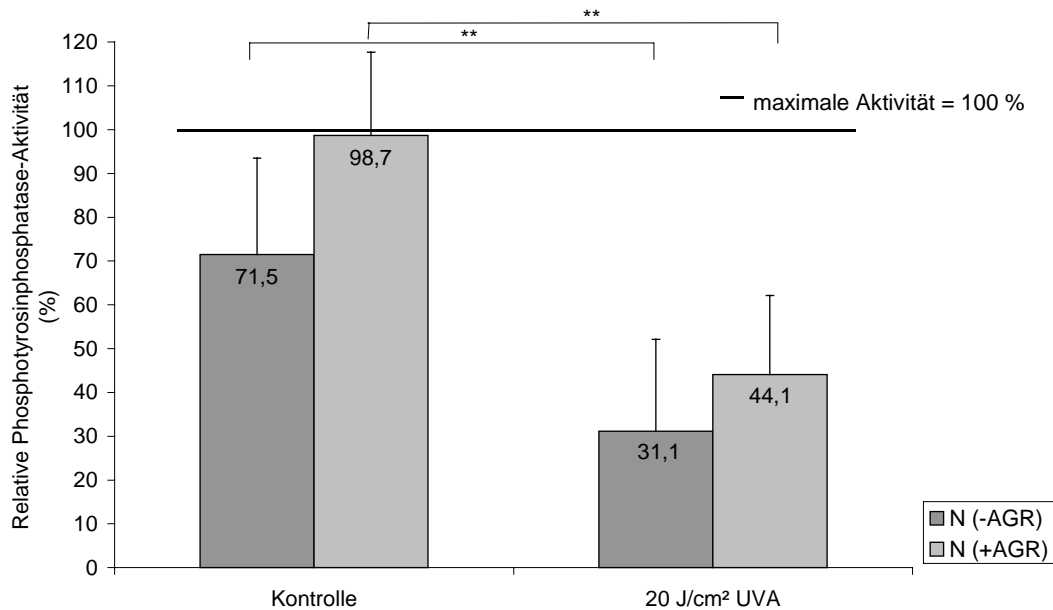
Abb. 4.30. Relative Aktivität der Phosphotyrosinphosphatasen von $5 \mu\text{g}$ Zytosolextrakten dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ($n = 11$) und normalhäutigen Spendern ($n = 18$) nach Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVA-Licht. Die relativen Aktivitäten wurden photometrisch über eine Farbreaktion im Verhältnis zur phosphorylierten Substratkontrolle als minimale und Leerwertkontrolle als maximale Aktivitätswerte bestimmt. Die dargestellten Werte sind hintergrundkorrigiert (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied).

4.3.8.1. Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Coenzym Q10, O-Acetyl-Carnitin oder Alpha-Glucosylrutin

Gemäß Abschnitt 3.5.2. wurde die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität (PTP-Aktivität) in Fibroblasten normalhäutiger Spender bzw. in Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis nach verschiedenen Antioxidansvorinkubationen und einer anschließenden 20 J/cm² UVA-Bestrahlung untersucht. Bei beiden Kollektiven führt sowohl die Vorinkubation mit CoQ10 als auch mit O-AC nach anschließender UVA-Bestrahlung zu nicht statistisch relevanten Veränderungen der PTP-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Abbildung 4.31. zeigt den Effekt einer 24-stündigen Vorinkubation mit AGR (siehe 3.3.3.) nach anschließender UVA-Bestrahlung auf die PTP-Aktivität in Fibroblasten normalhäutiger Spender bzw. in Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis. Bei den Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis führte die Vorinkubation mit AGR und eine anschließende UVA-Bestrahlung zu einer signifikanten Erhöhung der PTP-Aktivität von 23 % auf 44 %. Bei den normalhäutigen Spendern kommt es zu einer nicht signifikanten Erhöhung der PTP-Aktivität von 31 % auf 44 %.



a)



b)

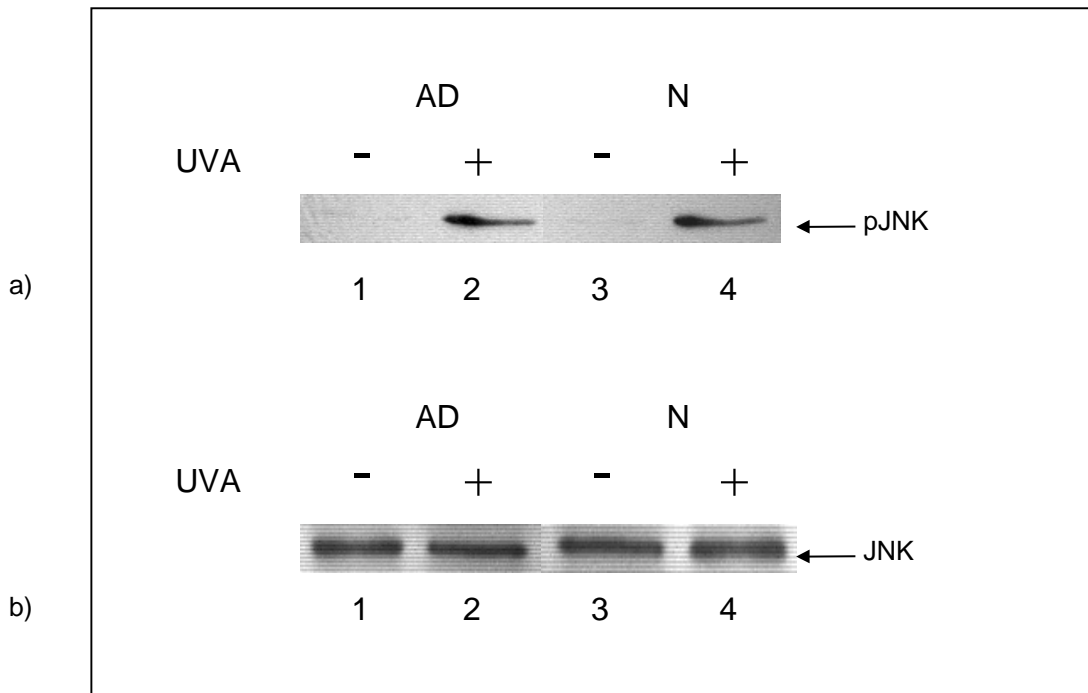
Abb. 4.31. Relative Aktivität der Phosphotyrosinophosphatasen von 5 µg Zytosolextrakten dermaler Fibroblasten nach Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA-Licht und nach Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA-Licht nach vorheriger 24-Stunden-Inkubation mit AGR (150 µM in PBS). In Abb. 4.31.a sind Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis [n (-AGR) = 8, n (+AGR) = 5] und in Abb. 4.31.b sind Fibroblasten von normalhäutigen Spendern [n (-AGR) = 8, n (+AGR) = 6] dargestellt. Die relativen Aktivitäten wurden photometrisch über eine Farbreaktion im Verhältnis zur phosphorylierten Substratkontrolle als minimale und Leerwertkontrolle als maximale Aktivitätswerte bestimmt. Die dargestellten Werte sind hintergrundkorrigiert (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, n = Stichprobenumfang, * = signifikanter Unterschied, ** = hochsignifikanter Unterschied, - AGR = nicht mit AGR vorinkubierte Fibroblasten, + AGR = mit AGR vorinkubierte Fibroblasten).

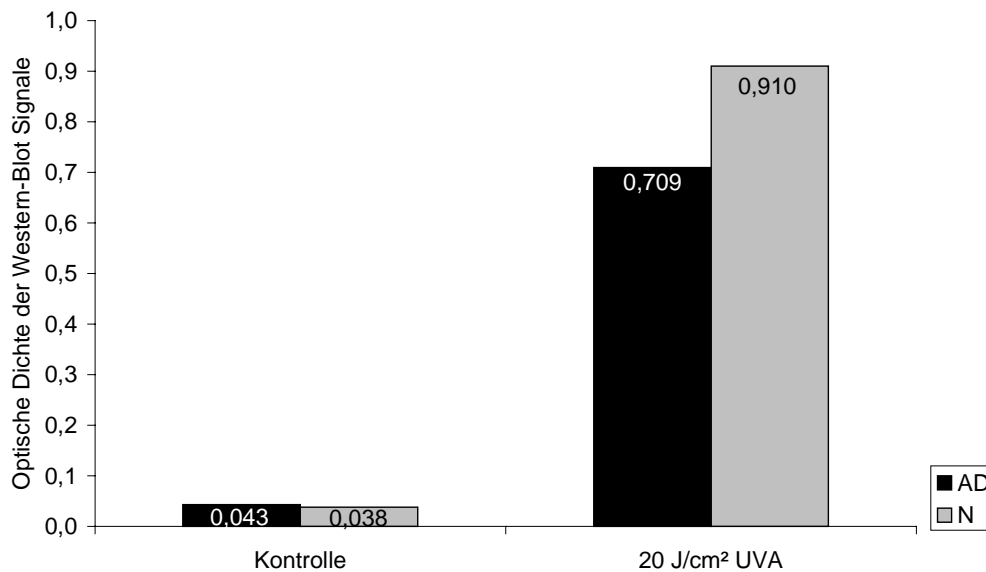
4.3.9. MAP-Kinase-Kaskaden in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Die MAP-Kinase-Kaskaden, deren Aktivierung im Grundzustand bereits in Abschnitt 4.1.9. beschrieben wurde, wurden nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² betrachtet.

4.3.9.1. JNK in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

In Western-Blots wurden dermale Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit von JNK (pJNK) durch eine UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm^2 untersucht (siehe 3.6.6.3.). Abbildung 4.32.a veranschaulicht exemplarisch den Gehalt an pJNK und zusätzlich den Gehalt an exprimierter JNK. Die UVA-Bestrahlung führt bei beiden Spenderkollektiven zu einer Erhöhung des Gehalts an pJNK (Spur 2, 4), während sich die Expression von JNK (siehe Abb. 4.32.b) nicht verändert. In der Reaktion auf die UVA-Bestrahlung ist zwischen den beiden Kollektiven kein Unterschied zu verzeichnen.





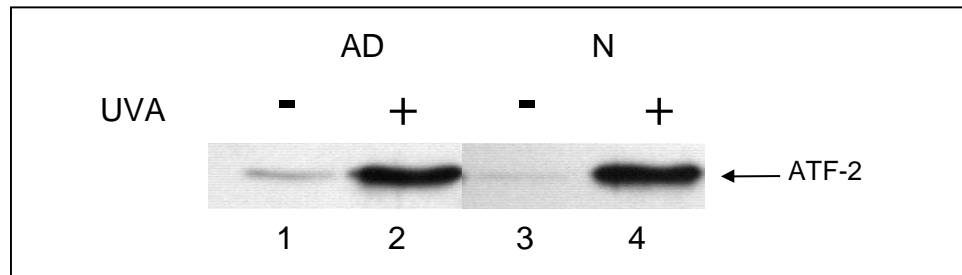
c)

Abb. 4.32.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm². Aktivierte pJNK wurde mit einem monoklonalen aktivierten Anti-pJNK-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.32.b** zeigt den Western-Blot aus **Abb. 4.32.a**, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an JNK durch einen polyklonalen anti-JNK-Antikörper (1:1000), in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.32.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus **Abb. 4.32.a**. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, - = ohne UVA-Bestrahlung, + = mit UVA-Bestrahlung).

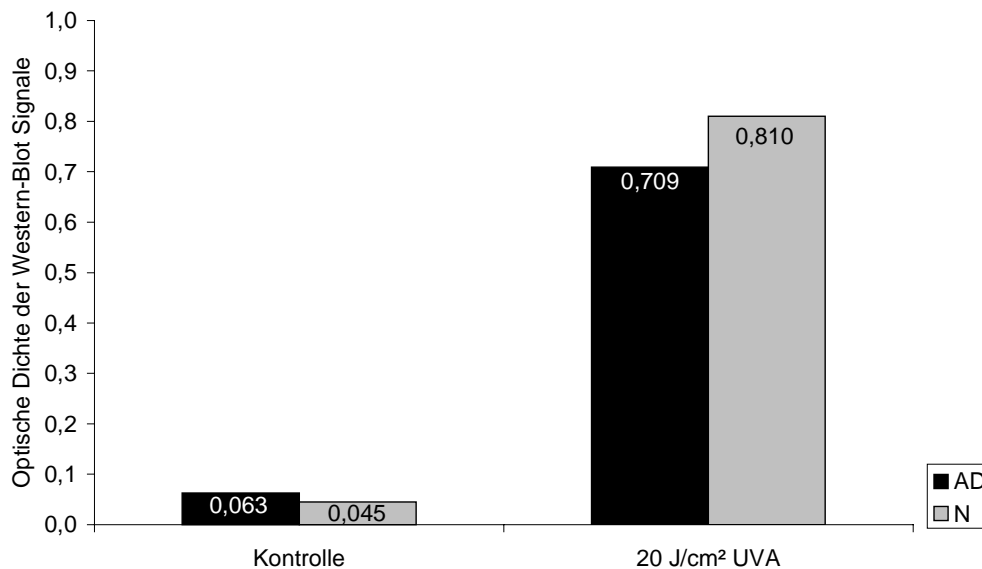
4.3.9.2. p38 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Zytoplasmatische Extrakte dermaler Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und von Spendern mit atopischer Dermatitis wurden mit 20 J/cm² UVA-Licht bestrahlt und mit einem Antikörper, der gegen die aktivierte p38 Kinase gerichtet ist, immunpräzipitiert (siehe 3.5.4.). In einer nachfolgenden Kinasereaktion wurde ein spezifisches Substrat (ATF-2) durch die aktivierte, immunpräzipitierte p38 Kinase *in vitro* phosphoryliert und in einem Western-Blot der Gehalt an phosphoryliertem ATF-2 visualisiert (**Abb. 4.33.**). Die Bestrahlung mit UVA-Licht führt sowohl bei den normalhäutigen Spender als auch bei den Spendern mit atopischer Dermatitis zu

einer deutlichen Aktivierung von p38. Es ist allerdings kein Unterschied zwischen den beiden Kollektiven zu erkennen.



a)

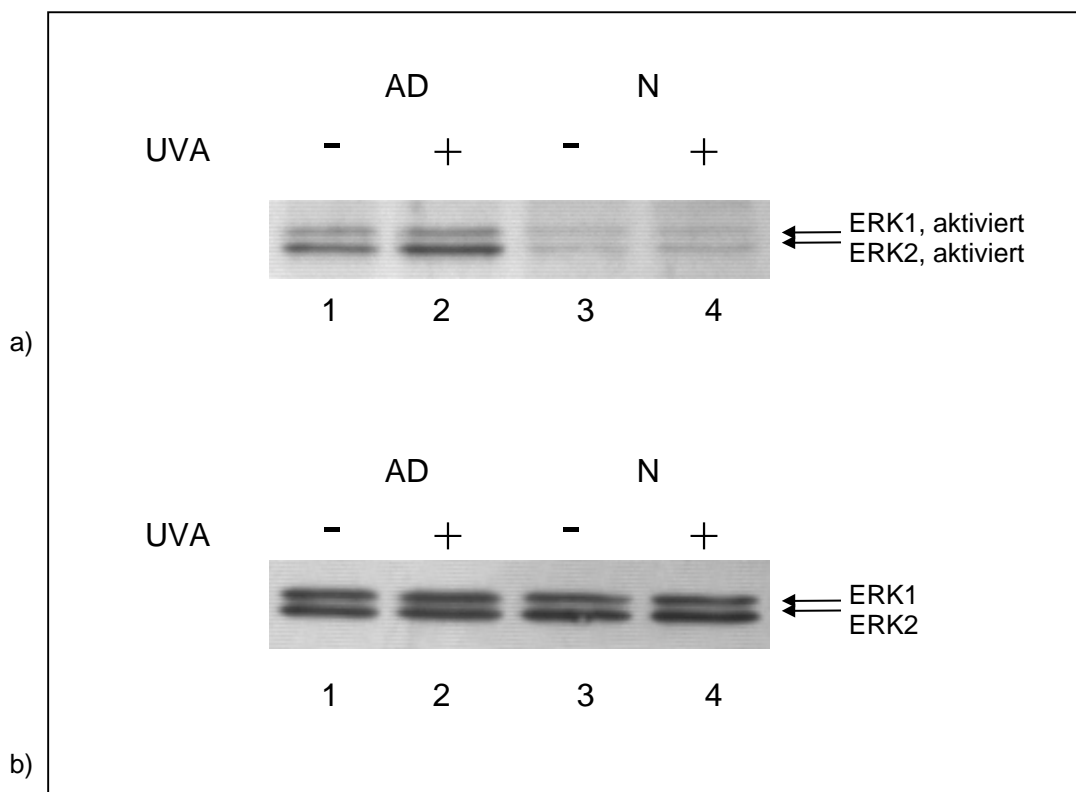


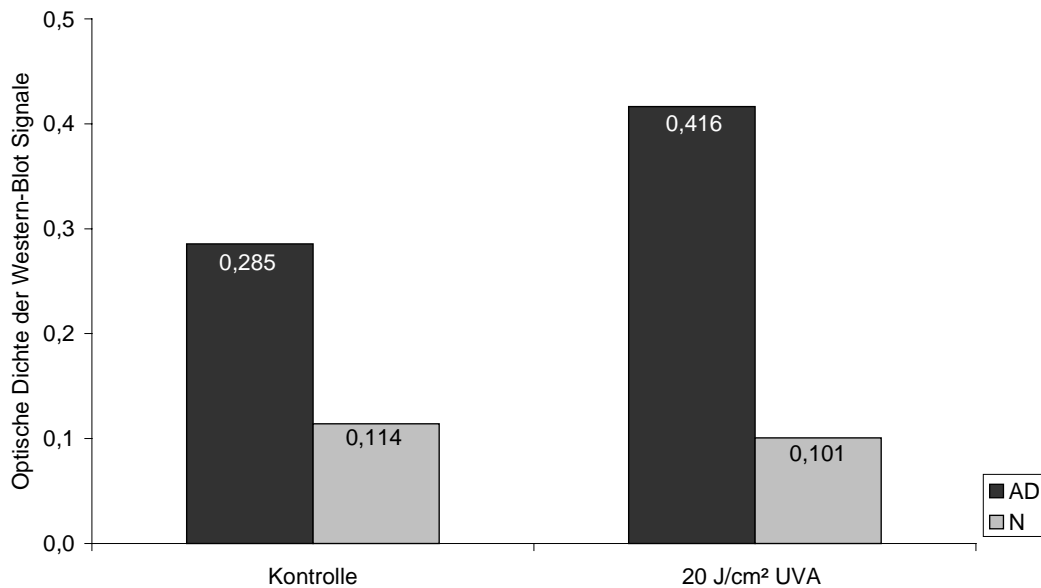
b)

Abb. 4.33.a Western-Blot des phosphorylierten Substrats ATF-2, daß durch die immunpräzipitierte, aktivierte p38 Kinase von 200 µg Gesamtprotein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² erzeugt wurde. Aktiviertes ATF-2 wurde mit einem monoklonalen Anti-Phospho-ATF-2 (Thr71) (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. Die Signale wurden mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.33.b** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.33.a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, - = ohne UVA-Bestrahlung, + = mit UVA-Bestrahlung).

4.3.9.3. ERK1/2 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Die letzte spezifische Kinase, die hinsichtlich ihrer Aktivierung durch eine UVA-Bestrahlung mit $20\text{J}/\text{cm}^2$ untersucht wurde, war die ERK1/2-Kinase. Zytosolextrakte dermalen Fibroblasten von Spendern mit Normalhaut und Spendern mit atopischer Dermatitis wurden in Western-Blot-Untersuchungen auf ihre ERK1/2 Expression und ihre ERK1/2 Aktivierung miteinander verglichen (siehe 3.6.6.2.). In Abbildung 4.34. ist das Ergebnis veranschaulicht. Die ERK1/2-Kinase kann lediglich in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis durch eine UVA-Bestrahlung aktiviert werden (Spur 2). Bei den dermalen Fibroblasten der normalhäutigen Spender führt die Behandlung zu keiner Aktivierung der ERK1/2-Kinase (Spur 3).





c)

Abb. 4.34.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm². Aktivierte ERK1/2 wurde mit einem monoklonalen aktivierten anti-ERK1/2-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.34.b** zeigt den Western-Blot aus Abb. 4.34.a, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an ERK1/2 durch einen polyklonalen anti-ERK1-Antikörper (1:1000), in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.34.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.34.a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutiger Spender, - = ohne UVA-Bestrahlung, + = mit UVA-Bestrahlung).

4.3.9.3.1. Aktivierung von ERK1/2 durch Anisomycin

Zytosolextrakte von dermalen Fibroblasten normalhäutiger Spender wurden 30 min mit 10 µg/ml Anisomycin inkubiert, einem literaturbekannten Aktivator der ERK1/2-Kinase. Abbildung 4.35. zeigt die Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 4.35., Spur 2).

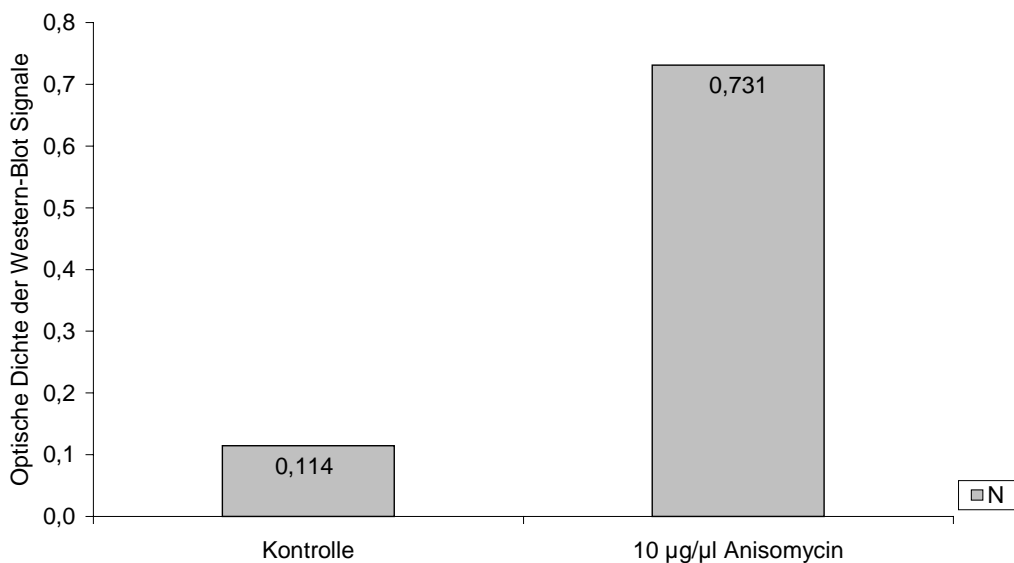
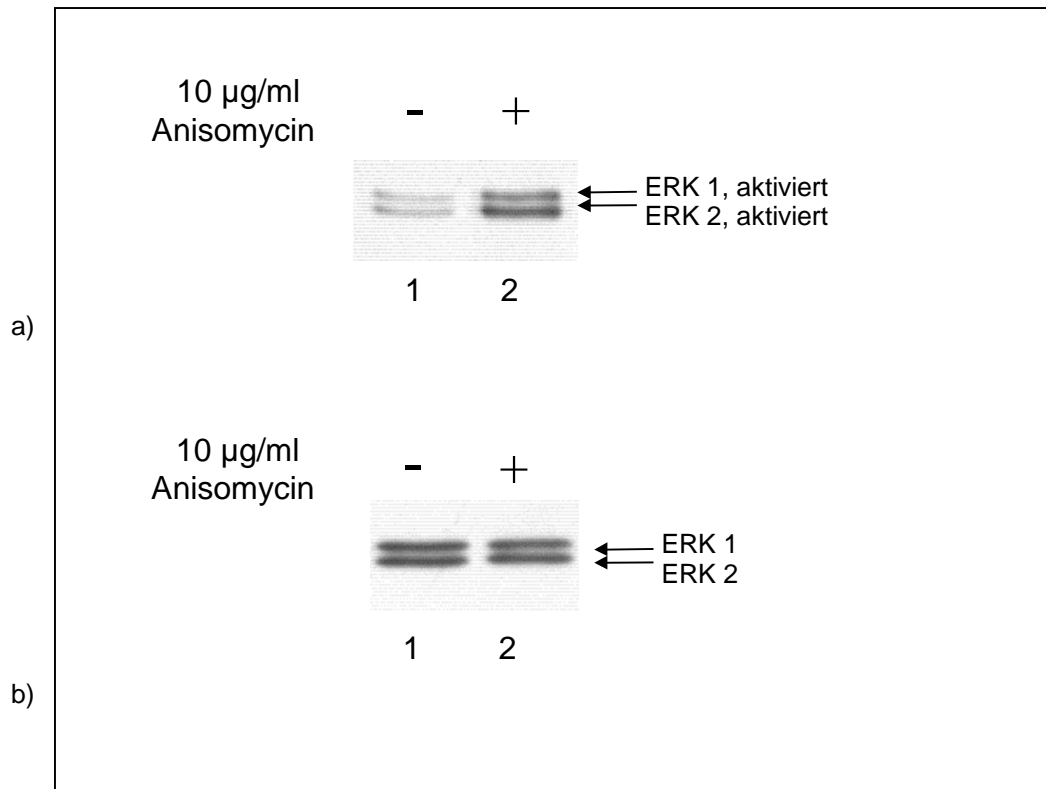
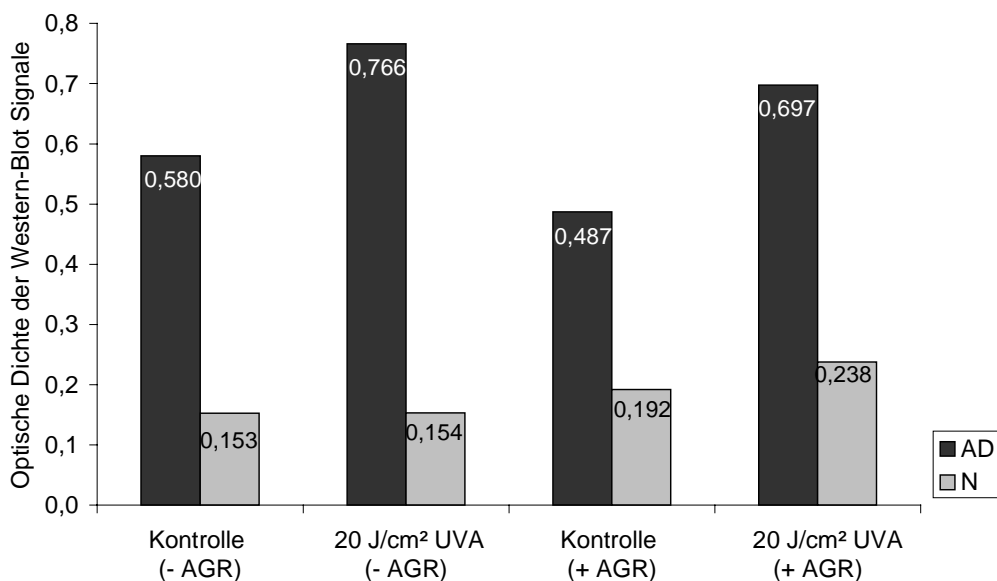
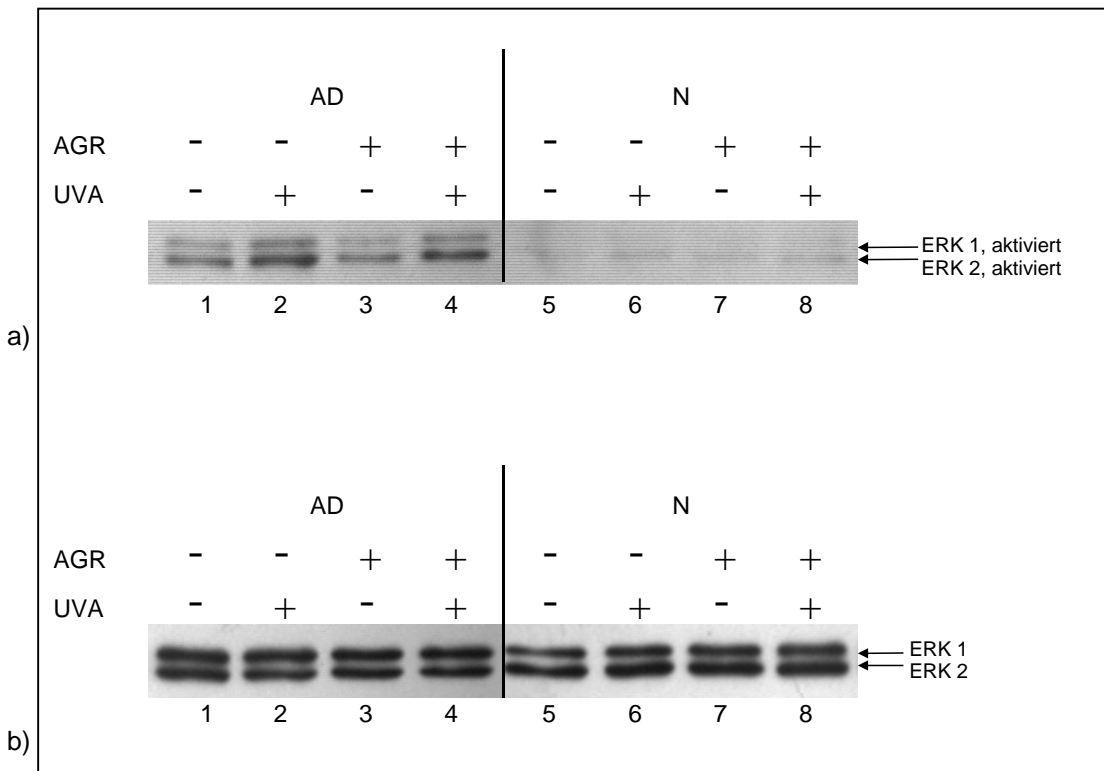


Abb. 4.35.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines gesunden Spenders nach einer 30 minütigen Inkubation mit 10 µg/ml Anisomycin. Aktivierte ERK1/2 wurde mit einem monoklonalen aktivierten anti-ERK1/2-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.35.b** zeigt den Western-Blot aus Abb. 4.35.a, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an ERK1/2 durch einen polyklonalen anti-ERK1-Antikörper (1:1000), in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.35.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.35.a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-Dscan™-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, + = mit Anisomycin Inkubation).

4.3.9.3.2. Aktivierung von ERK1/2 in Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung und vorangegangener Inkubation mit Alpha-Glucosylrutin

In Abbildung 4.36. ist der Effekt einer Vorinkubation mit Alpha-Glucosylrutin (AGR) auf die Aktivierung von ERK1/2 in Fibroblasten von normalhäutigen Spendern im Vergleich zu Spendern mit atopischer Dermatitis dargestellt. Zytosolextrakte dermalen Fibroblasten beider Spenderkollektive wurden in Western-Blot-Untersuchungen auf ihre ERK1/2 Expression und ihre ERK1/2 Aktivierung gegeneinander verglichen (siehe 3.6.6.2.). Bei den normalhäutigen Spendern zeigen sich keine Effekte, weder durch die UVA-Bestrahlung, noch durch die AGR-Vorinkubation. Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis läßt sich eine Modulation von ERK1/2 durch eine AGR-Vorinkubation beobachten. Eine Vorinkubation mit AGR führt, sowohl im unbestrahlten (Abb. 4.36.a, Spur 3), als auch im bestrahlten Zustand (Abb. 4.36.a, Spur 4), bei den Fibroblasten zu einer schwächeren Aktivierung von ERK1/2 im Vergleich zu den nicht-vorinkubierten Fibroblasten (Abb. 4.36.a ,Spur 1, 2).



c)

Abb. 4.36.a Western-Blot von 7,5 µg Protein aus zytoplasmatischen Extrakten unbehandelter dermaler Fibroblasten eines Spenders mit atopischer Dermatitis und eines gesunden Spenders nach einer UVA-Bestrahlung mit 20 J/cm² und vorheriger Inkubation mit Alpha-Glucosylrutin. Aktivierte ERK1/2 wurde mit einem monoklonalen aktivierten anti-ERK1/2-Antikörper (1:1000) und einem POD-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) nachgewiesen. **Abb. 4.36.b** zeigt den Western-Blot aus Abb. 4.36.a, nachdem die Nitrozellulosemembran gemäß Abschnitt 3.6.8. behandelt wurde, und der Gesamtgehalt an ERK1/2 durch einen polyklonalen anti-ERK1-Antikörper (1:1000), in den dermalen Zellen ermittelt wurde. In beiden Fällen wurde mittels ECL-Technik auf einem Röntgenfilm detektiert. **Abb. 4.36.c** zeigt die Werte der quantifizierten Bandenintensitäten der Western-Blot-Analyse aus Abb. 4.37a. Die Quantifizierung erfolgte mittels Gelprint 1200i Auswertprogramm und ONE-DscanTM-Software (AD = Spender mit atopischer Dermatitis, N = normalhäutige Spender, - = ohne, + = mit).

5. Diskussion

5.1. Wahl der oxidativen Stressoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche oxidative Stressoren zur Induktion einer oxidativen Stressreaktion eingesetzt. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (0,1, 0,375 und 0,75 mM) benutzt. Auch wenn H_2O_2 membranpermeabel ist und über die Fentonreaktion (siehe 1.3.1.) *in vitro* und *in vivo* hochreaktive ROS erzeugen kann (Scharffetter-Kochanek et al., 1997), ist es in den hier verwendeten Konzentrationen lediglich als kurzer Stressimpuls anzusehen. Es ist bekannt, daß geringe Konzentrationen des oxidativen Stressors H_2O_2 Wachstumsblockaden in humanen Fibroblasten induzieren, während höhere Konzentrationen an H_2O_2 proapoptotische Vorgänge auslösen (Bladier et al., 1997; Chen & Ames, 1994; Chen et al., 1998).

In Übereinstimmung mit den Literaturbefunden führt die Inkubation mit Wasserstoffperoxid, in Abhängigkeit von der Dosis, zu Beeinträchtigungen der zellulären Esteraseaktivität als Maß für die Vitalfunktion (Abb. 4.15.). Dabei ist zwischen den Spendern mit atopischer Dermatitis und den normalhäutigen Spendern kein Unterschied in der Reaktion auf den oxidativen Stress zu verzeichnen. Grundsätzlich muß dabei offen bleiben, inwieweit bei diesen Effekten Wasserstoffperoxid selbst oder im Verbund mit induzierten Sekundärmetaboliten als agierende Substanz wirkt (Lee et al., 1996).

UV-Licht als oxidativer Stressor mit primär ROS-vermitteltem Wirkmechanismus ist als ständige physikalische Noxe von besonderem Interesse bei dermatologischen Untersuchungen. Dabei beeinflussen Intensitäten von 5, 10 bis 20 J/cm^2 UVA-Licht Fibroblasten dosisabhängig und auch kollektivabhängig in ihrer Vitalfunktion (Abb. 4.20.), ohne letztlich letal zu sein (Niggli & Applegate, 1997). Strahlungsintensitäten von mindestens 20 J/cm^2 UVA-Licht, die im Rahmen dieser Arbeit in vergleichenden *in vitro*

Experimenten zur Untersuchung mitochondrialer Effekte, sowie der Tyrosinphosphorylierung eingesetzt wurden, sind zur Induktion genregulativer Mechanismen notwendig (Keyse & Tyrrell, 1989; Petersen et al., 1995; Scharfetter-Kochanek et al., 1997).

5.2. Oxidativer Stress in humanen Hautzellen

5.2.1. Deregulation pro- und antioxidativer Prozesse bei Patienten mit atopischer Dermatitis

In primären Dermisfibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis ist das Verhältnis von Peroxidgehalt zu Gesamtthiolstatus im Vergleich zu Zellen normalhäutiger Spender bereits im ungestressten Grundzustand offensichtlich fehlreguliert (Abb. 4.3. und 4.5.). Einem erhöhten intrazellulären Peroxidgehalt steht kein erhöhter Thiolspiegel als Parameter des nicht-enzymatischen Antioxidanssystems der Haut gegenüber. Da diese Unterschiede unter Kulturbedingungen bestimmt wurden, kann man davon ausgehen, daß es sich hierbei um intrinsische Eigenschaften der Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis handelt. Gerade die zelluläre Redoxhomöostase, die maßgeblich durch die ubiquitär vorhandenen Peroxide und Thiolverbindungen bestimmt wird, ist äußerst störanfällig.

Untersuchungen mit 0,1, 0,375 und 0,75 mM H₂O₂ zeigten, daß die Redoxhomöostase empfindlich gestört werden kann. So reagieren Dermisfibroblasten von Patienten mit atopischer Dermatitis stärker als die Spender mit normaler Haut auf eine 0,75 mM H₂O₂-Zugabe. Erstere zeigten eine hochsignifikante Erhöhung des Peroxidgehalts (Abb 4.16.), die bei den normalhäutigen Spendern nicht beobachtet wurde. Der Thiolgehalt wurde bei beiden Vergleichskollektiven durch die H₂O₂-Zugabe hochsignifikant verringert (Abb 4.17.). Vermutlich wird bei den normalhäutigen Spendern der vorhandene Thiol-Pool zum Abfangen der freien Radikale verbraucht, während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis die endogene Antioxidanzkapazität nicht ausreicht, oder nicht dazu in der Lage ist die freien Radikale abzufangen.

UVA-Bestrahlungen sind ebenfalls in der Lage, den Gesamtthiolstatus bei beiden Spenderkollektiven zu reduzieren. Oxidative Stressoren wie zum Beispiel H_2O_2 und UVA-Licht sind je nach Art und Dosis entscheidend in der Verminderung der antioxidativen Kapazität und Förderung eines prooxidativen Zustandes involviert (Sies, 1991). Eine Depletion des endogenen Glutathions infolge oxidativer Stressbelastung ist in der Literatur auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Niggli & Applegate, 1997; Connor & Wheeler, 1987). Beide Spenderkollektive zeigten bei einer Bestrahlung mit UVA-Licht eine sehr ähnliche Reaktion auf die oxidative Stressbelastung, während eine Inkubation mit H_2O_2 auf eine erhöhte Stressanfälligkeit der dermalen Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis hindeutete. Der Vergleich der beiden oxidativen Stressoren machte deutlich, daß unterschiedliche Reaktionen bei den beiden Spenderkollektiven hervorgerufen wurden, die eventuell auf die Natur der, durch den jeweiligen Stressor hervorgerufen, induzierten ROS zurückzuführen waren.

5.2.2. Mitochondrien als Quelle und Ziel der oxidativen Stressbelastung

Die Atmungskette der Mitochondrienmembran stellt ein permanentes „Leck“ von Superoxidradikalen (Siems et al., 1998) dar. Das Superoxid-„Leck“ der mitochondrialen Atmungskette macht circa 2 % des Gesamtsauerstoffverbrauchs aus. Im Gesamtorganismus entspräche das einer täglichen Bildung von 360 bis 400 mMol Superoxidradikale (Gutteridge et al., 1984). Das war Grund genug, die Rolle der Mitochondrien bei der Freisetzung von ROS im Zusammenhang zur atopischen Dermatitis genauer zu untersuchen.

Zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials wurde das lipophile Kation JC-1 verwendet, daß dem sonst häufig verwendeten Reagenz Rhodamin 123 überlegen ist. Cossarizza et al. (1993) konnten zeigen, daß letzteres ein ungeeignetes Reagenz darstellt, weil für Rhodamin 123 unterschiedliche Bindungsstellen in den Mitochondrien existieren, die je nach Höhe des MMPs entweder frei zugänglich oder unzugänglich sind, und es somit zu Detektionsproblemen kommen kann.

Die dermalen Fibroblasten der normalhäutigen Spender und der Spender mit atopischer Dermatitis besaßen das gleiche mitochondriale Membranpotential (Abb. 4.7.). Die erhöhte oxidative Stressbelastung beeinflusste das MMP nicht. Weiterführende Untersuchungen konnten zusätzlich zeigen, daß bei beiden Spenderkollektiven der gleiche zelluläre ATP-Gehalt (Abb. 4.8.) vorliegt, die Energieversorgung der dermalen Zellen von Spendern mit atopischer Dermatitis kann im ungestressten Zustand als normal betrachtet werden.

Der Effekt von exogen zugeführten ROS für das Mitochondrienmembranpotential wurde bei den beiden Spenderkollektiven untersucht. Die Experimente zeigten, daß die eingesetzten Konzentrationen an Wasserstoffperoxid das MMP lediglich geringfügig beeinflussen können (Abschnitt 4.2.5.). Die nur schwache Beeinträchtigung des Membranpotentials ist als Folge einer kompensatorischen Antioxidanzkapazität zu sehen. Das in diesen Konzentration nur schwach reaktive H_2O_2 könnte lediglich von geringer Reichweite sein und über das zytosolische und mitochondriale Antioxidanzsystem (mitochondriales Glutathion) abgefangen werden (Sastre et al., 1996). Damit wäre eine Beeinflussung mitochondrialer Strukturen nur nach Überschreiten zellulärer Abwehrkapazitäten zu erwarten.

Die Kenntnis, daß UVA-Licht in einer Intensität von 20 J/cm^2 den Gesamtthiolgehalt auf ca. 60 % (Abb. 4.21.), $0,75 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ diesen auf ca. 70 % (Abb. 4.17.) des ungestressten Ausgangswertes (= 100 %) absenken kann, ließ vermuten, daß gemäß obiger Diskussion auch das MMP durch 20 J/cm^2 UVA-Strahlung stärker beeinflusst wird als durch die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen. UVA-Licht beeinflusste das Mitochondrienmembranpotential der beiden Spenderkollektive sehr stark, was sich auch in der Literatur bestätigt findet (Godar, 1999). Nach einer Bestrahlung mit 20 J/cm^2 UVA-Licht wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Spenderkollektiven festgestellt, wobei die Spender mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu den normalhäutigen Spendern ein signifikant verringertes MMP zeigten (Abb. 4.22.). In weiterführenden Untersuchungen konnte zusätzlich gezeigt werden, daß bei den beiden Spenderkollektiven unterschiedliche zelluläre ATP-Gehalte nach einer UVA-Bestrahlung (Abb. 4.26.) vorliegen. Während bei den Dermisfibroblasten von normalhäutigen Spendern der zelluläre ATP-Gehalt durch die UVA-Bestrahlung nicht beeinflusst wurde, sank der zelluläre ATP-Gehalt bei den Fibroblasten der Spender mit atopischer Dermatitis signifikant ab. Diese Daten weisen darauf hin, daß die Dermisfibroblasten der Spender mit atopischer Dermatitis oxidativen Stress nicht so effektiv abfangen können wie die normalhäutigen Spender und daß die Mitochondrien ferner eine wichtige Rolle bei einem erhöhten Aufkommen an exogen erzeugten ROS spielen, sobald ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird. Ein erhöhter Gehalt an ROS (induziert durch UVA-Licht), führt zu einer massiven Schädigung der Zelle, es wird nicht nur das MMP, sondern in nächster Konsequenz auch die Erzeugung von ATP bei Patienten mit atopischer Dermatitis verringert. Ob die Mitochondrien Quelle oder Ziel der ROS darstellen, konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt werden.

5.2.2.1. Coenzym Q10, O-Acetylcarnitin und Alpha-Glucosylrutin als Stabilisatoren des mitochondrialen Membranpotentials

Die Effekte durch Vorinkubation mit verschiedenen Wirkstoffen auf eine Stabilisierung des Mitochondrienmembranpotentials wurden ebenfalls untersucht. Hierbei wurden sowohl lipophile, als auch hydrophile Substanzen getestet.

Auffallend war bei diesen Untersuchungen, daß bei den Fibroblasten von normalhäutigen Spendern die lipophilen Wirkstoffe Coenzym Q10 (CoQ10) und O-Acetylcarnitin (O-AC) eine hochsignifikante Protektion des Mitochondrienmembranpotentials bewirken können (Abb. 4.23.b. und Abb. 4.24.b.). In Kenntnis der Tatsache, daß der Gehalt an CoQ10 nach UVA-Bestrahlung abnimmt (Podda et al., 1998) und Cardiolipin strukturell leicht zu oxidieren ist (Shigenaga et al., 1994), erklären sich die positive Wirkungen von CoQ10 und dem, im mittleren und hohen UV-Dosisbereich, wirksamen O-AC auf das MMP nach Bestrahlung auch im Sinne einer anaplerotischen Reaktion. In diesem Zusammenhang wurde für CoQ10 in *in vitro* Untersuchungen an Fibroblasten ein deutlich protektiver Effekt gegenüber MMP-absenkenden UVA-Bestrahlungen gefunden. Diese Befunde finden sich in der Literatur bestätigt. Lenaz et al. (1998) konnten in Hepatozyten von Ratten sowohl einen protektiven Effekt von CoQ10 für das MMP als auch seine antioxidative Kapazität nachweisen.

Die Wirkung der lipophilen Wirkstoffe war nicht in diesem Maße bei den Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis zu beobachten. Eine Vorinkubation mit CoQ10 führte zu keiner signifikanten Stabilisierung des MMPs, und eine Vorinkubation mit O-AC konnte lediglich bei einer Bestrahlung von 20 J/cm² das MMP der Dermisfibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis stabilisieren (Abb. 4.23.a. und Abb. 4.24.a.). Bei diesem Spenderkollektiv bewirkte eine Vorinkubation mit dem hydrophilen Wirkstoff Alpha-Glucosylrutin (AGR) eine sehr gute Stabilisierung des MMPs (Abb. 4.25.a.) Bei den Fibroblasten von normalhäutigen Spendern war nur bei der geringsten verwendeten UVA-Dosis ein protektiver Effekt für das MMP zu beobachten (Abb. 4.25.b.).

Diese Resultate lassen vermuten, daß die freien Radikale, die durch die Wirkstoffe bei den beiden Dermisfibroblasten-Kollektiven abgefangen werden, nicht den gleichen Entstehungsort haben. CoQ10 und O-AC lassen wegen ihres lipophilen Charakters eine Wirkung in den Mitochondrien vermuten. Hier konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die potentialstabilisierenden Effekte von CoQ10 (Adachi et al., 1993; Lenaz, 1998) letztlich diesen mitochondrialen Wirkungsweisen oder eher seinen antioxidativen Eigenschaften zuzuschreiben sind. Ersteres wird von Adachi et al. (1993), die eine Protektion durch CoQ10 vor mtDNA-Deletionen, ausgelöst durch Doxorubicin, zeigen, nahegelegt. Letzteres wird von Frei et al. (1990) favorisiert, die Autoren fanden, daß CoQ10 in der Lage ist, ROS, die in liposomalen Membranen gebildet werden, abzufangen.

O-AC verbleibt nach seiner Deacetylierung in der Mitochondrienmembran und stabilisiert dort Cardiolipin in dessen wichtiger Funktion für mitochondriale Proteinkomplexe (Shigenaga et al., 1994). Es kann angenommen werden, daß der in der Literatur beschriebene Beitrag von O-AC hinsichtlich der Erhöhung des intrazellulären ATP-Gehaltes, neben einer erleichterten Bereitstellung von Acetyl-CoA für die mitochondriale β -Fettsäureoxidation, auch über diese Cardiolipin-vermittelte Komponente läuft (Shigenaga et al., 1994; Monti et al., 1992). AGR scheint seine antioxidative Kapazität aufgrund seines hydrophilen Charakters eher im Zytoplasma der Zellen auszuüben. Man kann also annehmen, daß bei den Dermisfibroblasten der normalhäutigen Spender die freien Radikale in erster Linie aus den Mitochondrien stammen, während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis die oxidative Stressbelastung eher zytoplasmatischer Natur ist.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß die zusätzliche ROS-Belastung zu einer starken Erhöhung des oxidativen Stresses im Zytoplasma der atopischen Zellen führt und eine Vorinkubation mit AGR einen indirekten Schutz für das mitochondriale Membranpotential darstellt. Die Mitochondrien wären somit in erster Linie Ziel und *nicht* Quelle der erhöhten oxidativen Stressbelastung.

Die Supplementierung mit CoQ10 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So finden sich Hinweise dafür, daß CoQ10 auch prooxidative Ereignisse fördern kann. Ob dies vorrangig Konzentrationseffekten zuzuschreiben ist (Frei et al., 1990), muß an dieser Stelle offen bleiben, denn in den hier vorgestellten 24-Stunden-Inkubationen konnte keine prooxidative Wirkung von CoQ10 festgestellt werden. Ebenso läßt sich nach neuen Literaturbefunden kein Nebeneffekt der Supplementierung mit CoQ10 feststellen (Bliznakov & Wilkins, 1998). Ganz im Gegenteil wird CoQ10 explizit als nicht prooxidativ herausgestellt (Lenaz, 1998).

Diese protektiven Eigenschaften von CoQ10, die nach oben geführter Argumentation auch primär mitochondrialer Art sein können, wurden von der Arbeitsgruppe von Stäb und Mitarbeitern auch schon *in vivo* nachgewiesen (Stäb et al., 2000).

5.2.3. Veränderte Signaltransduktion bei atopischer Dermatitis – Folge einer veränderten oxidativen Stressantwort?

Eine ROS vermittelte Signaltransduktion wird in ersten zellulären Reaktionen über die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen reguliert (Bender et al., 1997). Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis konnten im Vergleich zu normalhäutigen Spendern im Grundstatus allerdings keine Unterschiede im Gehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen (Abb. 4.9.) detektiert werden. Der Einfluß des erhöhten Gehalts an ROS auf die redoxregulierten Signaltransduktionskaskaden spiegelte sich bei den Spendern mit atopischer Dermatitis in Enzymaktivitäts-Untersuchungen wider. Bei den Dermisfibroblasten der Spender mit atopischer Dermatitis lagen im Vergleich zu den normalhäutigen Spendern sowohl eine erhöhte Kinase- als auch erhöhte Phosphatase-Aktivität vor. In der Literatur sind für krankhafte Hautzustände, am Beispiel von Spendern mit Psoriasis, ebenfalls erhöhte Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten beschrieben worden (Gentleman et al., 1984).

An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, daß die Überprüfung der Kinase- und Phosphataseaktivitäten als zellfreier *in vitro* Reaktionsassay erfolgte. Eine Regulation dieser Enzyme entsprechend ihrer Lokalisation in der Zelle wurde in diesem Assay nicht berücksichtigt.

Oxidativer Stress ist erwiesenermaßen an der redoxsensitiven Aktivierung von Vorgängen beteiligt, die zumindest teilweise im Dienst der Wiederherstellung der zellulären Homöostase stehen (Bender et al., 1997). Unter physiologischen Gesichtspunkten ist es von Vorteil, daß Zellen in der Lage sind, kurzfristige unmittelbare Eingriffe in ihr Redoxgleichgewicht mit den Folgen für ihr ROS-vermitteltes Signaltransduktionsnetz aktiv zu kompensieren oder zu tolerieren. Da die Tyrosinphosphorylierung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren als unmittelbare Stressreaktion innerhalb dieser Signalwege in der Literatur beschrieben ist, konzentrierten sich die Anschlußuntersuchungen oxidativer Stressmodulationen der Signaltransduktion primär auf die Beeinflussung der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen (Bender et al., 1997).

Eine Inkubation mit H_2O_2 beeinflusste die Tyrosinphosphorylierung in Dermisfibroblasten der normalhäutigen Spender stärker als bei Spendern mit atopischer Dermatitis (Abb. 4.18.). Auch wenn darauf hingewiesen werden muß, daß bei der Bestimmung des Phosphotyrosingehalts hohe Werteschwankungen aufgetreten sind. Vor dem Hintergrund, daß das Ziel dieser Arbeit eine Beeinflussung dermalen Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis durch oxidativen Stress war, H_2O_2 aber lediglich als *in vitro* Stress-Modell angesehen werden kann, wurden in Folgeexperimenten die Untersuchungen mit UVA-Licht intensiviert und auf eine genauere Betrachtung der oxidativen Stressantwort, induziert durch H_2O_2 , verzichtet.

Eine Bestrahlung mit UVA-Licht zeigte bei den Untersuchungen zum Phosphotyrosingehalt deutlichere Effekte bei den Dermisfibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis und Spendern mit normalhäutigen Spendern im Vergleich zu einer Inkubation mit H₂O₂. Dosen von 10 J/cm² bzw. 20 J/cm² UVA-Licht führte bei ersteren zu einer Erhöhung des Phosphotyrosingehalts auf ca. 120 % und bei letzteren zu einer Erhöhung des Phosphotyrosingehalts auf ca. 130 %.

In der Literatur werden dem Bandenmuster der hier gezeigten Western-Blots hauptsächlich Kinasen als Proteine zugeordnet. Dennoch scheint es bei diesen transienten, potentiell ROS-vermittelten Reaktionen aufgrund positiv- und negativregulatorischer phosphotyrosinpositiver Proteine dieser signaltransduktorischer Komponenten u. a. vom jeweiligen Zellsystem abzuhängen, welchen qualitativen Einfluß die dosis- und stressorbedingte Störung des Redoxgleichgewichtes auf die Aktivität von Tyrosinkinase- und -phosphatasen und damit auf die Tyrosinphosphorylierung hat (Monteiro & Stern, 1996; Zheng et al., 1992). Die in Übereinstimmung mit Literaturbefunden, zu beobachtende Verstärkung im breiten Bandenmuster phosphotyrosinpositiver Proteine infolge des oxidativen Stresses (Devary et al., 1992; Englaro et al., 1998) könnte auch als Reaktion im Sinne einer kompensierenden Schutzfunktion gesehen werden. In dieser Hinsicht sind verstärkte Phosphorylierungen zur Aktivierung von Heat-Shock-Proteinen, zur Umstrukturierung des Zytoskeletts oder als Schutz vor Ubiquitinylierung und somit vor proteolytischer Degradation beschrieben (Carbajal & Schaeffer Jr., 1998; Shang et al., 1997; Toussaint et al., 1995). Festzuhalten bleibt, daß dauerhafte und kurzzeitige ROS-Erhöhen offensichtlich in Abhängigkeit von Art, Dosis und Dauer des Stressors zu qualitativen und quantitativen Unterschieden der Signaltransduktion und somit der Genexpression führen können (Hill & Treisman, 1995). Beispielsweise ist es bekannt, daß eine transiente Aktivierung von ERK1/2 wichtig ist für die Zellproliferation, während dauerhafte Stimulation von ERK1/2 zu Differenzierung oder Wachstumsblockaden führen kann (Marshall, 1995).

Weiterführende Untersuchungen zur Aktivität der Tyrosinkinasen und Phosphotyrosinphosphatasen zeigten, daß eine oxidative Stressbelastung in Form einer UVA-Bestrahlung (20 J/cm²) gravierende Effekte auf die Enzymaktivitäten hat. Die Phosphotyrosinphosphataseaktivität wurde bei beiden Spenderkollektiven dramatisch inhibiert (Abb. 4.30.), während bei der Tyrosinkinaseaktivität keine signifikante Beeinflussung zu beobachten war (Abb. 4.29.). Durch die deutliche Inhibierung der Phosphataseaktivitäten, vermittelt durch die oxidative Stressbelastung, kann der erhöhte Gehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen erklärt werden (Krejsa & Schieven, 1998). Anzunehmen ist, daß SH-Gruppen im katalytischen Zentrum dieser Phosphatasen unmittelbar durch ROS oxidiert werden, wodurch die Enzymaktivität blockiert ist (Knebel et al., 1996). Vor diesem Hintergrund ist auch die Protektion der Phosphataseaktivitäten nach UVA-Bestrahlung durch das Antioxidans Alpha-Glucosylrutin (Abb. 4.31.) zu erklären. Andererseits waren die Wirkstoffe CoQ10 und O-AC wenig erfolgreich die Inhibition der Phosphatase-Aktivität durch UVA-Licht zu verhindern (Abschnitt 4.3.8.1.). Diese Resultate geben einen weiteren Hinweis, daß die beiden lipophilen Wirkstoffe ihre Effekte mitochondrial vermitteln (siehe 5.2.2.1.). Im Verständnis der Zellmembran als Sensor für oxidativen Stress könnten hier als direkte Reaktion auf den gesetzten Stress überwiegend Rezeptor-vermittelte Tyrosinphosphataseaktivitäten involviert sein (Fisher & Voorhees, 1998; Bender et al., 1997). Die Wiederherstellung zellulärer Phosphataseaktivität mit Nachlassen des oxidativen Einflusses ist in der Literatur von Monteiro und Stern beschrieben (Monteiro & Stern, 1996).

5.2.3.1. Aktivierung von MAP-Kinasen

Die Analyse zur Aktivierung von MAP-Kinasen wurde an Zytosolextrakten von Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis im ungestressten Grundzustand und nach einer Bestrahlung mit UVA-Licht durchgeführt.

JNK und p38 lagen bei beiden Vergleichskollektiven im gleichen Maß aktiviert vor (Abb. 4.12. und Abschnitt 4.1.9.2.). ERK1/2 wiederum war bei Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis wesentlich stärker aktiviert als bei normalhäutigen Spendern (Abb. 4.13.). Hier konnte nicht eindeutig geklärt werden, welchen Einfluß die stärkere Aktivierung von ERK1/2 bei den Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis auf die Zellphysiologie hat. Die Fehlregulation von Differenzierungsprozessen und die Hyperproliferation der epidermalen Keratinozyten könnte durch die erhöhte Aktivierung der MAPK in den dermalen Zellen beeinflusst werden. Patienten mit Psoriasis weisen ebenfalls eine erhöhte Aktivierung der MAPK in dermalen Zellen auf, die einen Einfluß auf epidermale Hautzustände haben (Dimon-Gadal et al., 1998).

Die erhöhte ERK1/2-Aktivierung hängt möglicherweise mit einer deregulierten cAMP-Konzentration bei Spendern mit atopischer Dermatitis zusammen. Cook und McCormick konnten zeigen, daß cAMP eine Rolle bei der Inaktivierung von MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen spielt (Cook und McCormick, 1993). Weiterhin zeigten Grewe et al. (1982) eine deutlich erhöhte cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität in peripheren Blutlymphozyten von Spendern mit atopischer Dermatitis. Es kann also spekuliert werden, daß eine erhöhte cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität und eine verringerten cAMP-Konzentration eine erhöhte ERK1/2-Aktivität zur Folge hat.

Die Untersuchungen zur Aktivierung der MAP-Kinasen nach einer Bestrahlung mit UVA-Licht zeigen, daß Zytosolextrakte dermalen Fibroblasten von normalhäutigen Spendern und Spendern mit atopischer Dermatitis zu einer Aktivierung von JNK und p38 (Abb. 4.32. und Abb. 4.33.) führten. Diese Daten werden von Klotz et al. (1999) bestätigt. Sie demonstrieren, daß JNK und p38 von Fibroblasten von gesunden Spendern durch UVA-Licht und auch durch Singulett-Sauerstoff aktiviert werden können, während ERK1/2 durch diese Behandlung bei denselben Spendern nicht beeinflusst werden kann. Die Befunde zur Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 4.34.) entsprechen ebenfalls den Resultaten, die in der vorliegenden Arbeit für dermale Zellen von normalhäutigen Spendern

erhoben wurden. Die ERK1/2 Kinase der dermalen Zellen von normalhäutigen Spendern war durch Anisomycin aktivierbar (Abb. 4.35.), so daß ein generelles Aktivierungsproblem dieser Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Dieses Aktivierungsmuster ist für MAP-Kinasen einzigartig und unterscheidet sich von anderen Aktivierungsmustern, die durch ROS vermittelt werden, wie z. B. Wasserstoffperoxid (Guyton et al., 1996a, Guyton et al., 1996b), Superoxidanion (Bass and Berk, 1995), Stickstoffmonoxid (NO) und verwandte Spezies (Lander et al., 1996) oder ROS, die durch UVB (Radler-Pohl et al., 1993) oder UVC (Assefa et al., 1997) generiert werden.

Bei den Spendern mit atopischer Dermatitis konnte die einmalige Beobachtung gemacht werden, daß eine Bestrahlung mit UVA-Licht im Gegensatz zu den normalhäutigen Spendern eine zusätzliche Aktivierung von ERK1/2 zur Folge hat (Abb. 4.34.). In früheren Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Aktivierung von JNK in Fibroblasten mittels UVA-Licht durch Singulett-Sauerstoff vermittelt wird (Klotz et al., 1997). Singulett-Sauerstoff ist auch bei der Aktivierung von p38 durch UVA-Licht von großer Bedeutung (Klotz et al., 1999). In Betrachtung der bekannten Literaturergebnisse ist es wahrscheinlich, daß die MAP-Kinase ERK1/2 bei Spendern mit atopischer Dermatitis, aber nicht die von normalhäutigen Spendern durch einen erhöhten Gehalt an Singulett-Sauerstoff aktiviert werden kann.

Es ist weiterhin in den vorliegenden Untersuchungen gelungen, eine Modulation der Aktivierung von ERK1/2 mittels einer Vorinkubation von AGR bei Patienten mit atopischer Dermatitis zu erreichen. Während die Vorinkubation mit AGR auf die Zellen der normalhäutigen Spender nur einen marginalen Effekt hat, zeigt sich bei den dermalen Fibroblasten der Patienten mit atopischer Dermatitis eine deutliche Verringerung der ERK1/2-Aktivität. Dieser Effekt untermauert sowohl die Annahme, daß AGR seine Effekte zytosolisch vermittelt (siehe Abschnitt 5.3.2.1.) als auch seine Protektion der Komponenten redoxregulierter Signaltransduktionskaskaden.

Die Wirkung von AGR hat für die ERK1/2-Aktivität von Patienten mit atopischer Dermatitis eine Annäherung an das Aktivierungsniveau von ERK1/2 normalhäutiger Spender zur Folge.

Eine Reihe von Genen wie z. B. HO-1 (heme-oxygenase-1 gene), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 gene) und verschiedene Cytokine werden durch die Bestrahlung mit UVA-Licht in Fibroblasten induziert (Grether-Beck et al., 1997). Hinsichtlich eines möglichen Aktivierungs-Mechanismus, kann durch die oben genannten Daten gefolgert werden, daß die durch UVA-Bestrahlung aktivierte Genexpression nicht nur über AP-2 (Grether-Beck et al., 1996) oder NF- κ B (Vile et al., 1995) erfolgt. Für Fibroblasten von normalhäutigen Spendern finden nach UVA-Bestrahlung auch verstärkte Genexpressionen durch aktivierte p38 und JNK, wahrscheinlich vermittelt durch Singulett-Sauerstoff, statt. Nach der Aktivierung dieser MAP-Kinasen werden Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und ATF-2 und TCFs (siehe Abschnitt 1.3.3.1.) wie Elk-1 (Whitmarsh et al., 1996, Minden and Karin, 1997) stimuliert, resultierend in einer Aktivierung der c-fos- und c-jun-Transkription, um AP-1 Proteine (Fos und Jun) zu bilden.

Bei Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis kann es durch die Aktivierung von ERK1/2 ebenfalls zu einer Aktivierung von TCF und AP-1 kommen. Aktivierung von JNK und ERK1/2 haben allerdings gegensätzliche Effekte auf das Zellwachstum und Differenzierungsprozesse (Xia et al., 1995). Sehr wahrscheinlich scheint es, daß selbst eine geringe Störung in der Regulation der redoxregulierten Signaltransduktionskaskaden bei einer oxidativen Stressantwort, Konsequenzen in der Genexpression nach sich ziehen, die dann zu Beeinträchtigungen im Zellstoffwechsel (z. B. Differenzierungs- oder Proliferationsprozesse) bei den Spendern mit atopischer Dermatitis wie führen können.

5.3. Eine abschließende Betrachtung

Es konnte eindeutig belegt werden, daß bereits im ungestressten Kontrollzustand bei den Spendern mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Stressbelastung vorliegt. Von dieser offensichtlichen Fehlregulation sind sogar Elemente aus Signaltransduktionskaskaden wie die MAP-Kinase ERK1/2 betroffen. Eine oxidative Stressbelastung in Form einer UVA-Be-strahlung oder Inkubation mit Wasserstoffperoxid führte sowohl bei den Spendern mit atopischer Dermatitis als auch bei den normalhäutigen Spendern zu einer Stressantwort, die sich in den in dieser Arbeit unter-suchten Parametern widerspiegelte, wobei die dermalen Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis nahezu bei allen Parametern stärker auf die oxidative Stressbelastung reagierten. Sowohl beim MMP (siehe Abschnitt 4.3.4.), beim ATP-Gehalt (siehe Abschnitt 4.3.5.), bei der Phos-photyrosinphosphatase-Aktivität (siehe Abschnitt 4.3.8.) und der Aktivität von ERK1/2 (siehe Abschnitt 4.3.9.3.) war dieses Phänomen zu beobachten.

Bei Betrachtung aller erhobenen Daten ist davon auszugehen, daß oxidativer Stress eine nicht unerhebliche Rolle bei der Manifestation der atopischen Dermatitis spielt. Die Ursache der erhöhten oxidativen Stressbelastung könnte entweder die schlechter ausgebildete Barriere oder die immunologische Imbalance sein, die sich in einem Mißverhältnis von T_{H1} - zu T_{H2} -Zellen und einem oftmals auftretenden erhöhten IgE-Spiegel zeigt. Als Therapieunterstützung scheint es vor diesem Hintergrund sinnvoll zu sein, die Fehlregulation der Redoxhomöostase bei Patienten mit atopischer Dermatitis z. B. durch die topische Applikation von Antioxidantien wie AGR zu vermindern.

Wahrscheinlich lassen sich die hier erhobenen *in vitro* Befunde ebenfalls *in vivo* bestätigen. Die Daten von Greene (1999), die zeigen konnte, daß eine mangelhafte Supplementierung mit Antioxidantien bei Patienten mit atopischer Dermatitis zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führt, deuten auf diesen Sachverhalt hin.

6. Zusammenfassung

Reaktive sauerstoffspezies (ROS)-vermittelte Reaktionen (oxidativer Stress) spielen eine Rolle bei pathophysiologischen Hautkrankheiten, wobei der Einfluß der ROS auf zellbiochemische Vorgänge von Patienten mit atopischer Dermatitis noch weitestgehend ungeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von oxidativem Stress in dermalen Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu normalhäutigen Spendern mit zellbiologischer und biochemischer Methodik analysiert.

Primäre Dermisfibroblasten der beiden Spenderkollektive zeigten im ungestressten Grundzustand bereits gravierende Unterschiede im Status der zellulären Redoxhomöostase. Die dermalen Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis wiesen einen erhöhten zellulären Peroxidgehalt und ein verringertes Mitochondrienmembranpotential (MMP) auf, daß allerdings keinen Einfluß auf den intrazellulären ATP-Spiegel hatte. Untersuchungen zum Einfluß dieser Befunde auf redoxregulierte Signaltransduktionskaskaden ließen erkennen, daß sowohl die Tyrosinkinase- als auch die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivitäten der Spender mit atopischer Haut im Vergleich zu den normalhäutigen Spender stärker aktiviert vorlagen. Im Gesamtgehalt an phosphotyrosinpositiven Proteinen bei beiden Spenderkollektiven war kein Unterschied zu erkennen. Bei der Untersuchung der MAP-Kinasen zeigte sich allerdings bei den dermalen Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis eine deutlich stärkere Aktivierung von ERK1/2.

Darüber hinaus wurde ermittelt, welche Reaktionen in den dermalen Zellen der beiden Spenderkollektive durch UVA-Licht (5, 10, 20 J/cm²) bzw. H₂O₂-Stress (0,1, 0,375, 0,75 mM) ausgelöst werden. H₂O₂-Stress reduzierte bei beiden Kollektiven den Gehalt an freien Thiolen und die Zellvitalität, ferner führte der oxidative Stress zu einer Erhöhung des Gehalts an intrazellulären Peroxiden bei den Zellen der Spender mit atopischer Dermatitis, aber das MMP blieb unbeeinflusst.

Bestrahlungsversuche mit UVA-Licht zeigten ebenfalls bei beiden Spenderkollektiven eine Beeinflussung der zellulären Redoxhomöostase. UVA-Licht (5, 10, 20 J/cm²) reduzierte die Zellvitalität, das MMP und den Gesamtthiolstatus. Im Hinblick auf die Veränderungen der Zellvitalität und des MMPs wurde eine dosisabhängige, höhere Empfindlichkeit gegenüber UVA-Licht in Fibroblasten von Spendern mit atopischer Dermatitis gefunden. UVA-Bestrahlung hatte lediglich auf den intrazellulären ATP-Gehalt bei Spendern mit atopischer Dermatitis einen absenkenden Einfluß. Außerdem wurde in Experimenten mit UVA-Bestrahlung nachgewiesen, daß Vorinkubationen mit Coenzym Q10 (CoQ10) und O-Acetyl-Carnitin (O-AC) protektiv im Sinne einer MMP-Erhöhung bei normalhäutigen Spendern waren, während bei den Spendern mit atopischer Dermatitis durch eine Vorinkubation mit Alpha-Glucosylrutin (AGR) dieser Effekt erreicht wurde. Die Wirkung von UVA-Licht auf redoxregulierte Signaltransduktionskaskaden wurde ebenfalls intensiv analysiert. Die Enzymaktivitäten der Tyrosinkinase wurden durch den oxidativen Stress nur schwach beeinflusst, während die Phosphotyrosinphosphatasen sehr deutlich bei beiden Kollektiven inhibiert wurden. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, daß bei beiden Kollektiven oxidativer Stress in Form einer UVA-Bestrahlung zu einer Erhöhung des Gehalts an phosphotyrosinpositiven Proteinen führte. Die MAP-Kinasen JNK und p38 wurden durch eine Bestrahlung mit 20 J/cm² bei beiden Spenderkollektiven zusätzlich aktiviert. Die gleiche Bestrahlung hatte allerdings lediglich bei den Spendern mit atopischer Dermatitis eine zusätzliche Aktivierung von ERK1/2 zur Folge. Oxidativer Stress beeinflusste redoxsensitive, zellphysiologische Vorgänge in dermalen Hautzellen von Spendern mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu normalhäutigen Spendern stärker. Eine Vorinkubation mit AGR führte dazu, daß die Auswirkungen der UVA-Bestrahlung auf die Phosphotyrosinphosphatase-Aktivität und die zusätzliche Aktivierung der ERK1/2-Kinase bei den Spendern mit atopischer Dermatitis verringert wurden. Im Hinblick auf die Modulation dieser wahrscheinlich ROS-vermittelten Vorgänge können die Befunde der vorliegenden *in vitro* Untersuchungen an Fibroblasten neue Wege zur therapeutischen Anwendung auf dem Gebiet der atopischen Dermatitis eröffnen.

7. Summary

Reactive oxygen species (ROS)-mediated reactions (oxidative stress) play an important role in pathophysiology of the skin. However the influence of ROS on atopic dermatitis is poorly understood. In this PhD-thesis the influence of oxidative stress on dermal fibroblasts of patients with atopic dermatitis was analysed. The data were compared to volunteers with normal skin was analysed with cell-biological and biochemical methods.

There were significant differences in the cellular redox homeostasis of primary dermal fibroblasts of both donor groups. Dermal cells of volunteers with atopic dermatitis showed enhanced intracellular peroxide levels and decreased mitochondrial membranopotentials (MMP), however intracellular ATP levels were unchanged. Investigations on the influence of these results on redox-regulated signaltransduction cascades showed, that the tyrosine kinase activity as well as the activity of phosphotyrosinephosphatases were enhanced in patient with atopic dermatitis compared to volunteers with normal skin. The level of phosphotyrosine-positive proteins was identical in both donor groups. Investigations on the MAP kinases showed, that dermal cells of patients with atopic dermatitic skin had an enhanced ERK1/2 activity.

Furthermore it was determined, which reactions in dermal cells of both donor groups can be initiated on the one hand through UVA radiation (5, 10, 20 J/cm²) and on the other hand through H₂O₂ stress (0,1, 0,375, 0,75 mM). H₂O₂ stress reduced the level of thiols and the cell viability in both donor groups, moreover oxidative stress led to an enhanced level of intracellular peroxides in volunteers with atopic dermatitis, but had no effect on the MMP.

UVA irradiation showed in both donor groups an influence on the redox homeostasis. UVA light (5, 10, 20 J/cm²) reduced the cell viability, the MMP and the level of thiols. There was a higher dose-dependent sensitivity to UVA light regarding cell viability and MMP in the fibroblasts of patients with atopic dermatitis. UVA irradiation reduced ATP levels only in atopic dermatitis donors. Besides, it was shown in experiments with UVA irradiation, that preincubation with coenzyme Q10 (CoQ10) and O-acetylcarnitin (O-AC) affect the MMP in a protective way in volunteers with normal skin, while preincubation with alpha-glucosylrutin (AGR) had a protective effect on the MMP of patients with atopic dermatitis. Likewise the effect of UVA light on redox-regulated signaltransduction cascades was thoroughly analysed. The enzyme activities of tyrosine kinases were only slightly influenced by oxidative stress, while the phosphotyrosinephosphatases were strongly inhibited in both donor groups. In this context it was found, that oxidative stress in both donor groups led to increased levels of phosphotyrosine-positive proteins. In addition the MAP kinases JNK and p38 were activated in both donor groups by irradiation with 20 J/cm² UVA. The same irradiation only was able to activate ERK1/2 in patients with atopic dermatitis. Oxidative stress influenced, redoxsensible, cell-physiological processes in dermal skin cells of donors with atopic dermatitis compared to donors with normal skin. A preincubation with AGR decreased the effect of the UVA irradiation on the phosphotyrosinekinase activity and the activation of ERK1/2 kinase in patients with atopic dermatitis. With regard to the modulation of these likely ROS-mediated processes the results of the presented investigations on fibroblasts can show new therapeutically approaches in the atopic dermatitis.

8. Literatur

- Abe, M. K., Chao, T.-S. O., Solway, J., Rosner, M. R., Hershenson, M. B. (1994). Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**, 577-585.
- Adachi, K., Fujiura, Y., Mayumi, F., Nozuhara, A., Sugiu, Y., Sakanashi, T., Hidaka, T., Toshima, H. (1993). A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 945-951.
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K., Sturgill, T. W. (1990). Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **343**, 651-653.
- Assefa, Z., Garmyn, M., Bouillon, R., Merleved, W., Vandenheede, J. R. and Agostinis, P. (1997). Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 886-891.
- Baas, A. S. and Berk, B. C. (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **77**, 29-36.
- Beckers, B., Lang, H. R. M., Weber, W., Pránada, F., Schweizer, K. (1986). Application of intracellular ATP determination in lymphocytes for HLA-typing. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1**, 47-51.
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. (1997). UV-induced signal transduction. *Photochem. Photobiol.* **37**, 1-17.

- Bladier, C., Wolvetang, E. J., Hutchinson, P., de Haan, J. B., Kola, I. (1997). Response of a primary human fibroblasts cell line to H₂O₂: senescence like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ.* **8**, 589-598.
- Bliznakov, E. G., Wilkins, D. J. (1998). Biochemical and clinical consequences of inhibiting coenzyme Q10 biosynthesis by lipid-lowering HMG-CoA Reductase inhibitors (statins): a critical overview. *Adv. Ther.* **15**, 218-228.
- Boh, E. E. (1996) Role of Reactive Oxygen Species in Dermatologic Diseases. *Clin. Dermatol.* **14**, 343-352.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Carbajal, J. M., Schaeffer, C. R. Jr. (1998). H₂O₂ and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 461-466.
- Chen, Q., Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblasts F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4130-4134.
- Chen, Q. M., Bartholomew, J. C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D., Ames, B. N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G₁ arrest but not cell replication. *Biochem. J.* **332**, 43-50.
- Connor, M. J., Wheeler, L. A. (1987). Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* **46**, 239-245.

- Cobb M. H. and Goldsmith E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**, 14843-14846.
- Cook, S. J. and Mc Cormick, F. (1993). Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1072.
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5,6,6'-Tetrachloro 1,1,3,3, Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 40-45.
- Cotgreave, I. A., Weis, M., Berggren, M., Sardy, M. S., Moldéus, P. W. (1988). Determination of intracellular protein thiol distribution of hepatocytes using monobromobimane derivatisation of intact cells and isolated subcellular fractions. *J. Biochem. Biophys. Methods* **16**, 247-254.
- De Rautlin de la Roy, Y., Messedi, N., Grollier, G., Grignon, B. (1991). Kinetics of bactericidal activity of antibiotics measured by luciferin-luciferase assay. *J. Biolumin. Chemilumin.* **6**, 193-201.
- Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and ha-ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-1037.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T., Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases. *Cell* **71**, 1081-1091.
- Dimon-Gadal, S., Raynaud, F., Evain-Brion, D. and Keryer, G. (1998). MAP kinase abnormalities in hyperproliferative cultured fibroblasts from psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 872-879.

- Durand, R. E., Olive, P. L. (1983). Flow cytometry techniques for studying cellular thiols. *Radiat. Res.* **95**, 456-470.
- Englaro, W., Dérijard, B., Ortonne, J.-P., Ballotti, R. (1998). Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes. *Oncogene* **16**, 661-664.
- Fisher, G. J., Voorhees, J. J. (1998). Molecular mechanisms of photoaging and its protection by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induces AP-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 61-68.
- Frei, B., Kim, M. C., Ames, B. N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4879-4883.
- Garrity, J. A., Liesegang, T. J. (1984). Ocular complications of atopic dermatitis. *Can. J. Ophthalmol.* **19**, 21-24.
- Genova, M. L., Bovina, C., Formiggini, G., Ottani, V., Sassi, S., Marchetti, M. (1994). Uptake and distribution of exogenous CoQ in the mitochondrial fraction of perfused rat liver. *Mol. Aspects Med.* **15**, 47-55.
- Gentleman, S., Martensen T. M., Digiovanna J. J., Chader G. J. (1984). Protein tyrosine kinase and protein phosphotyrosine phosphatase in normal and psoriatic skin. *Biochim. Biophys. Acta* **798**, 53-59.
- Godar, D. E. (1999). UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 3-12.

- Greene, L. S. (1999). Asthma, oxidant stress, and diet. *Nutrition* **15**, 899-907.
- Grether-Beck, S., Buettner, R., Krutmann, J. (1997). Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.* **378**, 1231-1236.
- Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J. P., Briviba, K., Sies, H. and Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14586-14591.
- Grewe S. R., Chan S. C. and Hanifin J. M. (1982). Elevated leukocyte cyclic AMP-phosphodiesterase in atopic disease: A possible mechanism for cAMP-agonist hyporesponsiveness. *J. Allergy Clin. Immunol.* **70**, 452-457.
- Gutteridge, J. M. C. (1984). Copper-phenanthroline induced site specific oxygen radical damage to DNA. Detection of loosely bound trace copper in biological fluids. *Biochem. J.* **218**, 983-985.
- Guyton, K. Z., Gorospe, M., Kensler, T. W. and Holbrook, N. J. (1996b). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res.* **56**, 3480-3485.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N.J. (1996a). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **271**, 4138-4142.
- Haber, F. and Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron. *Proc. R. Soc. London A* **147**, 332-351.

- Hill, C. S., Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211.
- Hogg, N. (1998). Free Radicals in Disease. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16**, 241-248.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Hutnik, C. M. and Nichols, B. D. (1999). Cataracts in systemic diseases and syndromes. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **10**, 22-28.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. (1991). *Histologie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York **2**, 412-423.
- Keyhani, A. (1994). Ergebnisse der Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL). *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin*, 36-37.
- Keyse, S. M., Tyrrell, R. M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA irradiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **86**, 99-103.
- Klotz, L. O., Briviba, K. and Sies, H. (1997). Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* **408**, 289-291.
- Klotz, L. O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot C., Aubry J. A. and Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J. Biochem.* **260**, 917-922.

- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* **15**, 5314-5325.
- Krejsa, C. M. and Schieven, G. L. (1998). Impact of Oxidative Stress on Signal Transduction Control by Phosphotyrosine Phosphatases. *Environ. Health Perspect.* **106**, 1179-1184.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. T. and Tauras, J. M. (1996). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric-oxide-related species. *J. Biol. Chem.* **271**, 19705-19709.
- Lee, S. F., Huang, Y. T., Wu, W. S., Lin, J. K. (1996). Induction of c-Jun protooncogene expression by hydrogen peroxide through hydroxyl radical generation and p60^{src} tyrosine kinase activation. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 437-448.
- Lenaz, G., Cavazzoni, M., Genova, M. L., D'Aurelio, M., Pich, M. M., Pallotti, F., Formiggini, G., Marchetti, M., Castelli, G.P., Bovina, C. (1998). Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors* **8**, 195-204.
- Maccarrone, M., Catani, M. V., Iraci, S., Melino, G., Agrò, A. F. (1997). A survey of reactive oxygen species and their role in dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **8**, 185-202.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185.

- Minden, A. and Karin, M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim, Biophys. Acta* **1333**, F85-F104.
- Monteiro, H. P., Stern, A. (1996). Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 323-333.
- Monti, D., Troiano, L., Grassilli, E., Agnesini, C., Tropea, F., Barbieri, D., Capri, M., Christofalo, E. A., Salvioli, S., Ronchetti, I., Bellomo, G., Cossarizza, A., Franceschi, C. (1992). Cell proliferation and cell death in immunosenescence. *Ann. Acad. Sci. New York* **663**, 250-261.
- Müller, K. (1988). Aktive Sauerstoffspezies. *Pharm. Unserer Zeit* **3**, 71-80.
- Nakamura, K., Hori, T., Sato, N., Sugie, K., Kawakami, T., Yodoi, J. (1993). Redox regulation of a *src* family protein tyrosine kinase p56^{lck} in T cells. *Oncogene* **8**, 3133-3139.
- Niggli, H. J., Applegate, L. A. (1997). Glutathione response after UVA-irradiation in mitotic and postmitotic human skin fibroblasts and keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **65**, 680-684.
- Niwa, Y. (1999). Oxidative Injury and its defense system in vivo. *Rinsho Byori* **47**, 189-209.
- Papadopoulos, N. G., Dedoussis, G. V. Z., Spanakos, G., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., Papamichail, M. (1994). An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **177**, 101-111.
- Passi, S., Grandinetti, M., Maggio, F., Stancato, A. and De Luca, C. (1998). Epidermal oxidative stress in Vitiligo. *Pigment Cell Res.* **11**, 81-85.

- Petersen, M., Hamilton, T., Li, H.-L. (1995). Regulation and inhibition of collagenase expression by long-wavelength ultraviolet radiation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **62**, 444-448.
- Ploegh, H. L. (1995). Post-translational modification: phosphorylation and phosphatases. In: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., Wingfield, P. T. (eds.) *Current protocols in protein science*, John Wiley & Sons, Inc. USA, Chapter 13.
- Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L.-J., Packer, L. (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Rad. Biol. Med.* **24**, 55-65.
- Przybilla, B. (1991). Stigmata of the atopic constitution. In Ruzicka, T., Ring, J. and Przybilla, B. (Eds.) *Handbook of Atopic Ekzema*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 31-45.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H. P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. and Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J* **12**, 1005-1012.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. and Davis R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**, 7420-7426.
- Reers, M., Smith, T. W., Chen, L. B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochem.* **30**, 4480-4486.
- Ring, J. (1991). Atopy: conditions, disease, or syndrome? In Ruzicka, T., Ring, J. and Przybilla, B. (Eds.) *Handbook of Atopic Ekzema*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3-7.

- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W., Zlabinger, G. J. (1992). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Methods* **156**, 39-45.
- Rosette, C. and Karin, M. (1996). Ultraviolet light osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**, 1194-1197.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* **411**, 77-82.
- Sastre, J., Pallardó, F. V., Viña, J. (1996). Glutathione, oxidative stress and aging. *Age* **19**, 129-139.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blaudschun, R., Wenk, J. (1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* **378**, 1247-1257.
- Shang, F., Gong, X., Taylor, A. (1997). Activity of Ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. *Jour. Biol. Chem.* **272**, 23086-23093.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., Ames, B. N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10771-10778.
- Siems, W. G., Sommerburg, O., Mayer, H. und Grune, T. (1998). Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharm. Ztg.* **143**, 1515-1527.

- Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* **98**, 1061-1075.
- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* (New York: Academic Press).
- Stäb, F., Keyhani, A., Sauermann, G., Hoppe, U., Abeck, D., Lange, T., Ring, J. (1995). Oxidative stress – An important factor in the pathogenesis of atopic dermatitis (abstract). *53rd annual meeting of American Academy of Dermatology*, New Orleans.
- Stäb F., Wolber R., Blatt T., Keyhani R., Sauermann G. (2000). Topically applied antioxidants in skin protection. *Methods Enzymol.* **319**, 465-478.
- Stenn, K. S., Link, R. L., Moellmann, G., Madri, J., Kulinska, E. (1989). Dispase, a neutral protease from bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J. Invest. Dermatol.* **93**, 287-290.
- Sullivan, S. G., Chiu, D. T.-Y., Errasfa, M., Wang, J. M., Qi, J. S., Stern, A. (1994). Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Rad. Biol. Med.* **16**, 399-403.
- Sun, Y., Oberley, L. W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 335-348.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevamian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 269-285.
- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M., Remacle, J. (1995). Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp. Gerontol.* **30**, 1-22.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Valls, V., Castelluccio, C., Fato, R., Genova, M. L., Bovina, C., Sacz, G., Marchetti, M., Parenti, G., Castelli, G., Lenaz, G. (1994). Protective effect of exogenous coenzyme Q against damage by adriamycin in perfused rat liver. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**, 633- 642.
- Vessey, D. A. (1993). The cutaneous antioxidant system. In: Fuchs, J., Packer, L. (eds.) *Oxidative stress in dermatology*, Marcel Dekker Inc., New York Basel Hongkong, Chapter **6**, 81-103.
- Vile, G. F., Tanew-Iliitschew, A. and Tyrell, R. M. (1995). Activation of NF- κ B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* **62**, 463-468.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488.
- Wellner, K., Fiedler, G. und Wohlrab, W. (1992). Untersuchungen zum Harnstoffgehalt der Hornschicht bei Neurodermitis. *Z. Hautkr.* **67**, 648-650.
- Werner, Y. (1986) The water content of stratum corneum in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venerol.* **66**, 281-284.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, **74**, 589-607.
- Williams, H. C., Burney, P. G. J., Hay, R. J., Archer, C. B., Shipley, M. J., Hunter, J. J. A., Bingham, E. A. Finlay, A. Y., Pembroke, A. C., Graham-Brown, R. A. C., Atherton, D. A., Lewis-Jones, M. S., Holden,

C. A., Harper, J. T., Champion, R. H., Poyner, T. F., Launer, T. and David, T. J. (1994). The U. K. working party's diagnostic criteria for atopic dermatitis I: Derivation of a minimum set discriminators for atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **131**, 383-396.

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J., Greenberg M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-1331

Zheng, X. M., Wang, Y., Pallen, C. J. (1992). Cell transformation and activation of pp60^{c-src} by overexpression of a protein tyrosin phosphatase. *Nature* **359**, 336-339.

I. Curriculum vitae

Zur Person

Claudia Mundt, geboren am 08.04.1971 in Bremen

Schulischer Werdegang

08/77 – 06/81 Grundschule in Leeste
08/81 – 05/90 Kooperative Gesamtschule Weyhe
Abschluß allgemeine Hochschulreife
1989 Teilnahme am Wettbewerb „Jugend forscht“
2. Platz beim Landesentscheid Niedersachsen

Studium

10/91 – 09/93 Grundstudium Chemie-Diplom an der Universität Bremen
10/93 – 11/96 Hauptstudium Chemie-Diplom an der Philipps-Universität
Marburg. Diplomarbeit am „Institut für Molekularbiologie und
Tumorforschung“, AG Prof. Lührmann:
„Charakterisierung des [U4/U6.U5]tri-snRNP-
spezifischen 20 kD-Protein als neue humane
Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase“
20.11.96 Erfolgreicher Abschluß und Verleihung des akademischen
Grades der Diplom-Chemikerin,

Promotion

02/97 – 03/00 Promotionsstudium Chemie an der Universität Hamburg,
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie. Erstellung
einer externen Dissertation bei der Beiersdorf AG, Hamburg
Abteilung „Biologie der Haut“:
„Modulation der oxidativen Stressreaktion
in dermalen Fibroblasten. Ein Vergleich von
Normalhaut zur atopischen Haut“

Berufserfahrung

ab 03/00 Wissenschaftlerin bei der Beiersdorf AG, Hamburg Ab-
teilung „Forschung Wirkstoffe“

Praktikum

studienbegl. Praktikum der Toxikologie für Chemiker
02/95 – 04-95 Praktikum in der präklinischen Forschung, Abteilung
Zentrales Nervensystem bei F. Hoffmann-La Roche AG,
Basel, Schweiz Herstellung verschiedener Synthese-
sequenzen potentieller Wirkstoffe zur Behandlung neuro-
degenerativer Krankheiten

II. Publikationen

Publikationen und Abstracts

Blatt T, Mundt C, Maksiuk T, Wolber R, Keyhani R, Schreiner V, Hoppe U, Schachtschabel DO, Stäb F (1999) Modulation of oxidative stresses in human aging skin. *Z. Gerontol. Geriatr.* **32**, 83-88.

Blatt T, Whittle M, Mummert C, Mundt C, Wolber R, Schachtschabel DO, Stäb F (1999). Advanced Glycosylation Endproducts in human skin cells. *SFRR (Europe) Summer Meeting*, 2-6.7.1999, Dresden.

Blatt T, Whittle M, Wolber R, Mundt C, Schachtschabel DO, Stäb F (1997). Innovative approaches for topical treatment of aging skin. *7. Forschungsforum der Beiersdorf AG*, 29-30.10.1997, Hamburg.

Mundt C, Blatt T, Fölster-Holst R, Mummert C, Wittern KP, Gercken G, Stäb F Comparative studies on the oxidative stress responsiveness after UVA radiation of atopic skin versus healthy skin. Zur Veröffentlichung bei *Arch. Biochem. Biophys.* eingereicht.

Mundt C, Blatt T, Mummert C, Fölster-Holst R, Gercken G, Wittern KP, Stäb F (2000). Oxidative stress response in normal human skin versus noninvolved atopic dermatitic skin. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 842.

Mundt C, Blatt T, Wolber R, Gercken G, Fölster-Holst H, Schachtschabel DO, Stäb F (1999). Oxidative stress response in normal human skin versus noninvolved atopic dermatitic skin. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 572.

Teigelkamp S, Achsel T, Mundt C, Göthel SF, Cronshagen U, Lane WS, Marahiel M, Lührmann R (1998) The 20kD protein of human [U4/U6.U5]tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA* **4**, 127-141.

Teigelkamp S, Mundt C, Achsel T, Will CL, Lührmann R (1997) The human U5 snRNP-specific 100kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *RNA* **3**, 1313-1326.

III. Vorträge

Mundt C, Wolber R, Keyhani R, Batzer J, Helmcke-Bauckmann P, Clasen M, Oltrogge D, Pollet D, Abeck D, Sauermann G, Stäb F, Hoppe U (1997) New Aspects in the physiological role of urocanic acid in skin protection against exogenous noxes. 7. Forschungsforum der Beiersdorf AG, 29.-30. 10.97, Hamburg

Mundt C (1998) Oxidativer Stress in Normalhaut im Vergleich zur atopischen nicht ekzematösen Haut. AK experimentelle Dermatologie, 16.12.1998, Beiersdorf AG, Hamburg

Mundt C, Kolbe L, Bleck O (2000) Vergleichsuntersuchungen von normaler und atopischer Haut als potentiell Entzündungsmodell. Forschungsseminar, 08.06.2000, Beiersdorf AG, Hamburg

IV. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. G. Gercken für die Betreuung der vorliegenden Arbeit und die wissenschaftlichen Freiräume, die er mir gelassen hat.

Gedankt sei auch den Herrn Prof. Dr. U. Hoppe, Dr. K.-P. Wittern und Dr. G. Sauermann der Beiersdorf AG für die Unterstützung und die Möglichkeit, in Kooperation mit dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg, unter der Leitung von Prof. Dr. G. Gercken, diese Dissertation anzufertigen.

Dr. F. Stüb möchte ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Unterstützung danken.

Meinen Freunden Thoda und Mummi möchte ich für die konstruktiven Gespräche und unsere zahlreichen konspirativen Sitzungen danken – Euch kennengelernt zu haben war's allein schon wert. ...fühlt Euch gedrückt!

Reza, dem Retter in so mancher Not, einen lieben Dank.

Für die nette Atmosphäre bei BDF möchte ich meiner lieben Steffi, Marki, Sabrina und dem Rest der Abteilung danken.

Für Gummibären und Hilfe bei Formularen jeglicher Art ein dickes „Danke schön“ an Frau Opitz.

Tatti, Döki, Marki, Dorette, Placki und Biggi...Euch ein riesiges Danke, ohne Euch wäre es in Marburg nur halb so schön gewesen.

Murmel, Mäx, Céline und Kimba, weil ein Leben ohne Katzen nicht lohnt.....

Floh-Öli danke ich für Alles!

Meiner Familie möchte ich dafür danken, daß sie mir das ganze Studium und noch so vieles mehr ermöglicht haben.

...geht doch....!!

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere Quellen als die angegebenen nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation habe ich noch keiner anderen Universität vorgelegt, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Claudia Mundt

12. September 2000