
**Biologische Aspekte der nicht-enzymatischen
Stickstoffmonoxid-Generierung durch UVA-induzierten
Nitritzerfall in humanen Hautfibroblasten**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Christian Opländer
aus Hilden

Berichter: Prof. Rainer Fischer
Priv. Doz. Christoph V. Suschek

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

1. Opländer C, Cortese MM, Korth HG, Mahotka C, Kirsch M, Wetzel W, Pallua N, Suschek CV

The impact of nitrite and anti-oxidants on UVA-induced cell death of human skin fibroblast.

Free Radical Biology and Medicine 2007 Sep 1;43 (5):818-29

2. Opländer, C, Wetzel W, Cortese MM, Pallua N, Suschek CV

Evidence for a physiological role of intracellularly occurring photolabile nitrogen oxides in human skin fibroblasts.

Free Radical Biology and Medicine 2008 May 1;44 (9):1752-61.

A Emily, mi esposa linda

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Stickstoffmonoxid	7
1.2 Enzymatische Stickstoffmonoxid-Generierung.....	7
1.3 Biologische Eigenschaften von Stickstoffmonoxid.....	9
1.4 Haut	11
1.5 Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Haut.....	13
1.6 UVA-Strahlung.....	15
1.7 Antioxidanzien und andere Schutzmechanismen der Haut.....	17
1.8 Nicht-enzymatische NO-Generierung.....	19
1.9 Fragestellung	21
2 Material/Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Geräte	23
2.1.3 UVA – Quellen.....	24
2.1.4 Kit-Systeme	24
2.1.5 Plastikware	25
2.1.6 Antikörper.....	25
2.1.7 NO-Donoren	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl/relativen Zellzahl	27
2.2.3 Depletierung von intrazellulärem Nitrit und intrazellulärer Nitrosoverbindungen	28
2.2.4 Induzierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)	28
2.2.5 Nachweis von Apoptose und Nekrose in humanen Hautfibroblasten	28
2.2.6 Nachweis von Lipidperoxidation	29
2.2.7 Detektion intrazellulären Stickstoffmonoxid-Generierung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie	30
2.2.8 Herstellung von Homogenisaten aus humanen Fibroblasten	31
2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
2.2.10 Quantifizierung von Nitrit und Nitrosoverbindungen mittels Chemolumineszenz-Detektion (CLD).....	32
2.2.11 Detektion von S-Nitrosoverbindungen durch immunzytochemische Färbung ...	33
2.2.12 Nachweis des GSH-induzierten oxidativen Stresses.....	34
2.2.13 Messung der ecNOS- und iNOS-Genexpression mittels PCR.....	34

2.2.14	Untersuchung der NO-Freisetzung aus UVA-induzierten Nitritzerfall mittels Faraday- Modulation-Spektroskopie (FAMOS).....	37
2.2.15	Nachweis von Trolox-Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)	38
2.3	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	NO-Generierung durch UVA-induzierten Nitritzerfall bei suprphysiologischen Nitritkonzentrationen	39
3.2	Einfluss einer suprphysiologischen Nitritkonzentration auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Fibroblasten.....	42
3.3	Einfluss einer erhöhten Nitritkonzentration auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten in Anwesenheit von Antioxidanzien.....	44
3.4	UVA-induzierte Lipidperoxidation in Anwesenheit von Nitrit und Antioxidanzien	48
3.5	UVA/Nitrit-induzierte Trolox-Radikalbildung	51
3.6	Intrazelluläre Superoxid-Radikal-Anion-Bildung in humanen Hautfibroblasten nach UVA-Bestrahlung	52
3.7	UVA-induzierte intrazelluläre NO-Generierung in humanen Hautfibroblasten	53
3.8	Aktivität der eNOS und iNOS in humanen Hautfibroblasten	56
3.9	Analyse der Konzentrationen an intrazellulären NO-Derivaten in humane Hautfibroblasten	58
3.10	UVA-induzierte, intrazelluläre NO-Generierung bei unterschiedlichen intrazellulären Nitrit und RNO-Konzentrationen	61
3.11	Einfluss der intrazellulärer Konzentration von NO-Derivate auf UVA-induzierten Zelltod und Lipidperoxidation.....	63
3.12	Einfluss von Stickstoffmonoxid und Vitamin C auf UVA-induzierten Zelltod und Lipidperoxidation	67
4	Diskussion.....	70
4.1	Charakterisierung des UVA-induzierten Nitritzerfalles bei suprphysiologischen Nitritkonzentrationen	71
4.2	Wirkung suprphysiologischer Nitritkonzentrationen auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten	73
4.3	Physiologische Rolle natürlich vorkommender intrazellulärer NO-Derivate in humanen Hautfibroblasten.	79
5	Zusammenfassung	86
6	Abstract	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Abkürzungsverzeichnis.....	98

9	Curriculum vitae	101
10	Danksagung.....	102
11	Erklärung.....	103

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO•) ist ein anorganisches Gas, welches in wässrigen Lösungen bis zu einer Konzentration von 2 mM löslich ist. NO• wird in biologischen Systemen nicht als Gas betrachtet, da die Konzentrationen unter physiologischen und unter pathophysiologischen Bedingungen den mikromolaren Bereich nicht überschreiten. Aufgrund seiner kleinen Größe und seiner lipophilen Eigenschaften kann NO• leicht durch biologische Membranen diffundieren [1]. Als Radikal ist die Reaktivität von NO• aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von einigen Sekunden gering [2, 3]. NO• reagiert *in vitro* und auch *in vivo* mit Sauerstoff über die höheren Stickoxide wie N₂O₃ und N₂O₄ bis zu den stabilen Endprodukten Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) [4].

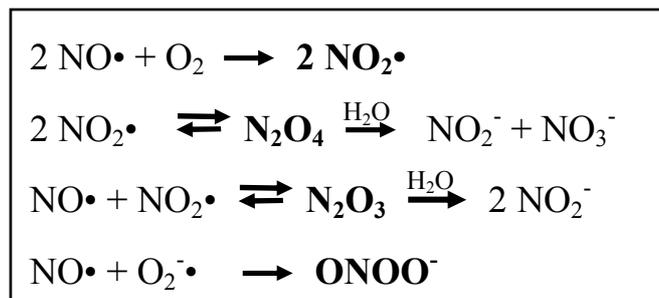


Abbildung 1 Reaktionsprodukte von Stickstoffmonoxid (NO) mit Sauerstoff (O₂);

Stabile Endprodukte Nitrit-Anion (NO₂⁻) und Nitrat-Anion (NO₃⁻).

Die instabilen, hochreaktiven Zwischenprodukte Distickstofftrioxid (N₂O₃), Perooxynitrit-Anion (ONOO⁻), Distickstofftetroxid (N₂O₄) und Stickstoffdioxid (NO₂[•]) sind fett markiert (nach Kröncke *et al.*, 2000)

Dabei entstehen zum Teil hochreaktive und instabile Zwischenprodukte, die so genannten „reaktiven Stickoxidspezies“ (RNS), die mit einem weiteren Spektrum an Biomolekülen in der Zelle reagieren können als NO• alleine.

1.2 Enzymatische Stickstoffmonoxid-Generierung

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) sind für die Biosynthese von NO• in Zellen verantwortlich. Bis heute wurden drei verschiedene Isoformen der NOS identifiziert.

Ihre Gene sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert [5, 6]. Die drei Isoformen haben große strukturelle Ähnlichkeiten (51 - 57 % Homologie in der Aminosäuresequenz) und identische katalytische Mechanismen [40,41]. Sie katalysieren die 5-

Elektronen-Oxidation von L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu NO• und L-Citrullin in äquimolaren Mengen. Sie sind Monomere mit einer Bidomänen-Struktur, wobei sich in der N-terminalen Domäne (130 kD) die Oxygenase und in der C-terminalen Domäne (160 kD) die Reduktase befinden, verbunden durch eine Calmodulin-Erkennungsstelle. Die Reduktase-Domäne enthält die Bindungsstellen für die Katalyse notwendigen Ko-Faktoren NADPH, FAD und Flavinmononucleotid (FMN), währenddessen die Oxygenase-Domäne die Bindungsstellen für L-Arginin und für die weiteren notwendigen Ko-Faktoren Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Protoporphyrin IX Häm enthält.

Die NO-Synthese aus L-Arginin läuft in zwei getrennten Schritten ab. Im ersten Schritt reagiert L-Arginin zu N^ω-Hydroxy-L-Arginin, welches im zweiten Schritt zu NO• und L-Citrullin oxidiert wird. Am gesamten Prozess agieren FAD, FMN, Calmodulin und BH₄ als Ko-Faktoren [7-11].

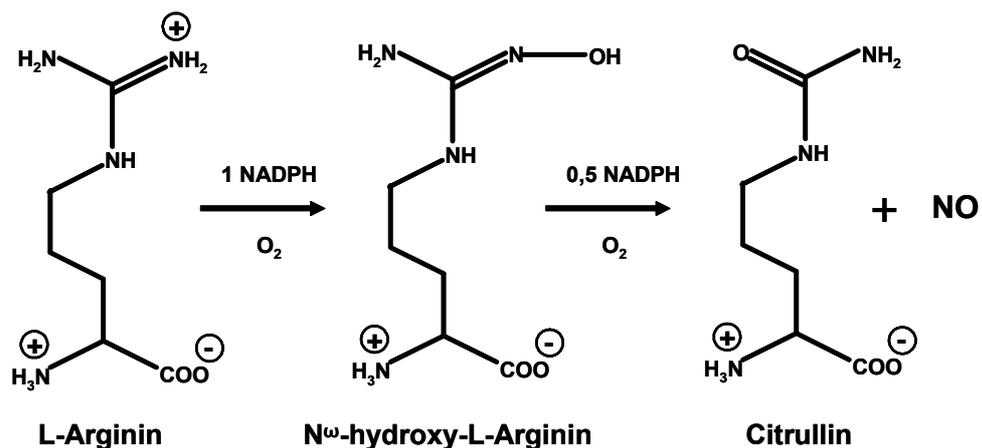


Abbildung 2 Die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) verläuft unter Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO• in zwei Reaktionen unter Verbrauch von NADPH und molekularem Sauerstoff durch NO-Synthasen (nach Stuehr, 2004)

Die Regulierung der NO-Produktion durch die NO-Synthasen erfolgt unterschiedlich. Zwei der NOS-Isoformen werden in Zellen konstitutiv exprimiert und zusammen cNOS genannt. Die erste dieser Isoformen wurde erstmalig in neuronalen Zellen nachgewiesen und wird deshalb nNOS oder NOS-1 genannt [11]. Die zweite wurde in Endothelzellen gefunden und deshalb mit eNOS oder NOS-3 betitelt. Diese cNOS-Enzyme wurden allerdings auch in anderen Zelltypen und Geweben als der hier genannten gefunden [5]. Die Regulierung der NO-Produktion der eNOS und nNOS wird hauptsächlich über die Enzymaktivität vermittelt, wobei die Änderungen der intrazellulären Ca²⁺ - Konzentrationen die zentrale Rolle spielen. Ein Anstieg stabilisiert die Calmodulin-Bindung an die

Bindungsstelle des Enzyms und initiiert so die NO-Synthese, die zur zeitlich begrenzten Freisetzung (Sekunden bis wenige Minuten) von NO• im pikomolaren Konzentrationsbereich führt [12].

Die dritte Isoform wird unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert, sondern wird in typischer Weise durch entzündliche oder immunogene Stimuli, wie proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β) oder bakterielle Bestandteile wie LPS induziert [13]. Sie wird deshalb induzierbare NOS (iNOS oder NOS-2) genannt.

Die iNOS wird in allen bisher untersuchten Zelltypen von Säugetieren nach proinflammatorischer Stimulierung exprimiert. Obwohl Calmodulin an die iNOS bindet und für die NO-Synthese notwendig ist, ändert sich die Enzymaktivität nicht durch Änderungen der Ca²⁺-Konzentration und ist somit Ca²⁺-unabhängig [14, 15]. *In vitro* bildet die iNOS nach Aktivierung hohe Mengen an NO• über einen Zeitraum von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen, solange die Zelle und das Protein funktionell intakt und ausreichende Mengen an Substrat (L-Arginin) und Ko-Faktoren vorhanden sind. Im Vergleich zur möglichen generierten NO-Konzentration im pikomolaren Bereich durch eNOS und nNOS kann die durch die iNOS erzeugte NO-Konzentration im mikromolaren Bereich liegen [16].

Die iNOS-Expression kann durch verschiedene Faktoren blockiert werden. Dazu zählen Corticosteroide und IL-4 [17, 18].

1.3 Biologische Eigenschaften von Stickstoffmonoxid

Aufgrund seiner Eigenschaften ist NO• ein biologisches Signal- und Effektormolekül, welches physiologische und pathophysiologische Eigenschaften besitzt. Es hat als wirksames zelluläres Toxin eine Funktion in der unspezifischen Immunantwort, wobei es so den Organismus vor eindringenden pathogenen Keimen [19] und Tumorzellen schützen kann [20]. NO• ist aber auch an der Zerstörung von körpereigenen Zellen und Geweben beteiligt [21] und spielt in vielen Autoimmunkrankheiten sowie anderen immunvermittelten Erkrankungen eine entscheidende Rolle [22].

Dabei kann NO• mit Nukleinsäuren reagieren und führt in sensitiven Zellen zu NO-bedingten DNA-Desaminierungen und Strangbrüchen [23]. Hohe NO-Konzentrationen können durch die Schädigung der DNA, Störung des Energiestoffwechsels, der Kalzium-Homöostase und der mitochondrialen Funktion zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen [24, 25].

Die durch die iNOS produzierten höheren NO-Konzentrationen werden deshalb oft mit zellulären Dysfunktionen sowie Gewebeerstörungen in Verbindung gebracht und führen zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion [26, 27]. In der unspezifischen Immunantwort induziert die Exposition von Körperzellen mit LPS, bakterieller DNA oder intakten Bakterien die iNOS. Die folgende Generierung von NO• und die resultierenden RNS, besonders das reaktive Peroxynitrit (ONNO⁻) dienen als zytotoxische Moleküle gegen invasierende Mikroben [28].

Darüber hinaus führen NO• und die verschiedenen Intermediate und Reaktionsprodukte, die bei der Reaktion von NO• mit Sauerstoff entstehen, zu Proteinmodifikationen durch S-Nitrosylierung der Thiolgruppe der Aminosäure L-Cystein sowie zur Zerstörung von Metall-Schwefel-Clustern in verschiedenen zytosolischen und membranständigen Proteinen wie Ionen-Kanälen, Signal-Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Enzymen. Das hat wiederum die Modifikation von Enzymaktivitäten [29] oder eine indirekte NO-vermittelte Veränderung der Expression verschiedener Gene zur Folge [30]. So können bei der reversiblen Reaktion von NO• bzw. RNS mit Cysteinresten komplexierte Metallionen aus den katalytischen Zentren von Enzymen verdrängt werden. Diese Nitrosylierung kann, wie bei der NADH-Ubichinon-Oxydoreduktase und Succinat-Ubichinon-Reduktase der mitochondrialen Elektronentransportkette gezeigt worden ist, durch die Freisetzung von Fe²⁺ aus den Häm-Gruppen eine verminderte Enzymaktivität bewirken [31].

Auch in Zinkfinger-Motiven konnte durch die Behandlung von NO• unter aeroben Bedingungen, eine intrazelluläre Freisetzung von Zn²⁺-Ionen unter Zerstörung der Zn²⁺-Schwefel-Clustern der Cysteinresten und/oder N-Imidazol-Stickstoffe des Histidin durch S-Nitrosylierung gezeigt werden [32]. Daraus resultiert eine verminderte Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren, da diese Zinkfinger-Strukturen für die optimale Ausrichtung von Aminosäureresten bei der RNA- und DNA-Bindung wichtig sind. Die NO- bzw. RNS-vermittelte Zerstörung ist zumeist reversibel und verfügt so über ein regulatorisches Potential der Genexpression [33].

Allgemein ist die spezifische biologische Wirkung von NO• abhängig von den beteiligten Zellen und Zellsystemen sowie der Wirkungsdauer und der lokalen Konzentration, die durch die verschiedenen Isoformen der NO-Synthasen bzw. durch nicht-enzymatische NO-Bildung vermittelt werden.

So führt z.B. das von der eNOS gebildete NO• zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen *in vivo* und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus

[12, 34], während das von der nNOS gebildete NO• im zentralen und peripheren Nervensystem wichtige Funktionen als Neurotransmitter übernimmt [10].

Neben den toxischen und regulierenden Eigenschaften von NO• geben neuere Daten zunehmend Hinweise darauf, dass hohe NO-Konzentrationen auch einen potenten Schutz vor Zellschäden, verursacht durch verschiedene Stimuli, vermitteln und damit den apoptotischen oder nekrotischen Zelltod verhindern können. So kann NO• als Antioxidanz fungieren und vor ROS-induzierter Lipidperoxidation in der Zelle schützen [35, 36].

1.4 Haut

Beim Menschen beträgt die Fläche der Haut bis zu 2 m² und ist, mit einer Dicke von 1 bis 8 mm und einem Gewicht von durchschnittlich 20 kg, das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie schützt den Organismus vor äußeren Einflüssen wie Hitze, Kälte und Schadstoffen sowie gegen Austrocknung. Anatomisch unterteilt sich die Haut in Epidermis, Dermis und Hypodermis (siehe Abbildung 3) wobei die Epidermis (Oberhaut) mit einer Dicke von 0,03 -1,5 mm die äußerste Hautschicht bildet. Sie besteht zu mehr als 90 % aus Keratinozyten, verleiht der Haut ihre mechanische Stabilität und bildet einen Schutz gegen das Eindringen von pathogenen Keimen sowie gegen Wasserverlust.

Keratinozyten machen in der Epidermis einen programmierten Differenzierungsprozess durch. In der innersten Epidermisschicht, dem Stratum basale, befinden sich undifferenzierte, mitotisch aktive Keratinozyten. Darüber befindet sich das Stratum granulosum, welches aus lebenden, aber sich nicht mehr teilenden Keratinozyten besteht. In ihnen wird die Keratinvorstufe Keratohyalin gebildet. Bei dicker Haut befindet sich das Stratum lucidum zwischen Stratum granulosum und der äußersten Schicht, dem Stratum corneum. Dieses wird aus verhornten ausdifferenzierten Keratinozyten, den Korneozyten, gebildet, die als Hauptprotein das Keratin enthalten [37, 38]. Diese Zellen werden kontinuierlich abgestoßen. Von der Teilung im Stratum basale über die Differenzierung bis hin zur Abstoßung vergehen beim Menschen durchschnittlich 27 Tage [39-41].

Neben den Keratinozyten enthält die Epidermis noch Merkel-Zellen, Melanozyten und Langerhans Zellen [42-44]. Melanozyten synthetisieren in Melanosomen das Pigment Melanin, welches das Eindringen der UV-Strahlung in tiefere Hautschichten verhindert

[45]. Die Langerhans Zellen sind dendritische Zellen der Epidermis, die der Antigenpräsentation dienen [43].

Die Dermis (Lederhaut) umfasst den größten Teil der Haut und hat eine Dicke von 1,5 bis 6 mm. Sie ist in Stratum papillare und Stratum reticulare unterteilt und beinhaltet Drüsen, Haarfollikel, Nervenendigungen, Blut- und Lymphgefäße und als Strukturbestandteile Kollagen und Elastin. Sie sind in der Dermis netzartig zum stützenden Bindegewebe der Haut verwoben und verantwortlich für die Elastizität, Geschmeidigkeit und Dehnbarkeit der Haut [37]. In der Dermis sind sowohl Blut-, Lymphgefäße und Nerven-

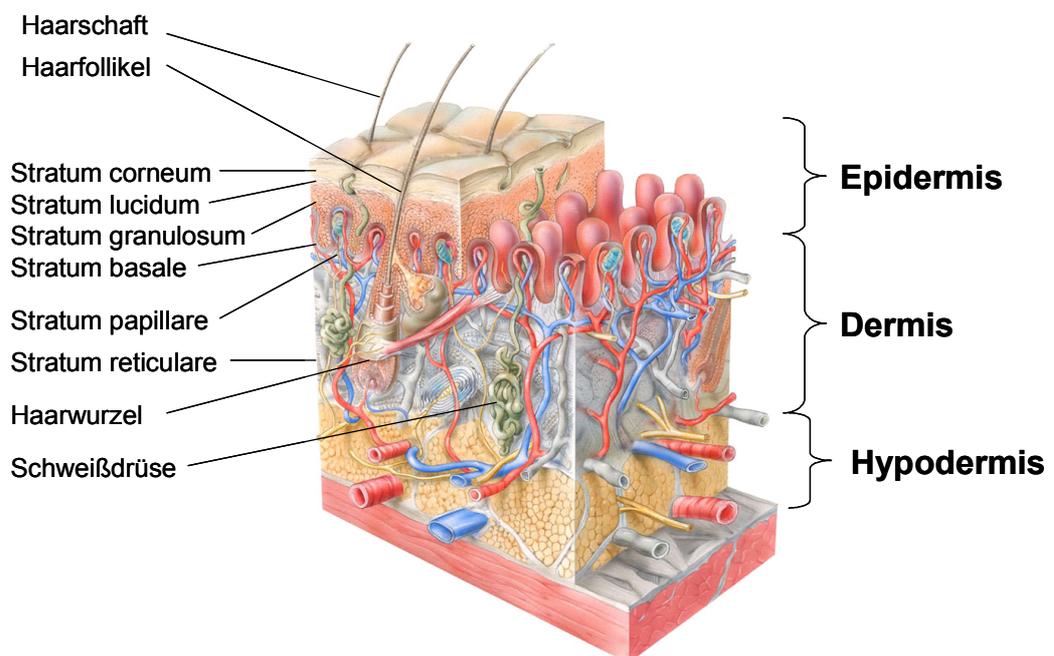


Abbildung 3 Querschnitt der Haut (Skin Care Forum Ausgabe 27, www.scf-online.com, Cognis, Deutschland GmbH & Co. KG, modifiziert]

fasern, als auch Bindegewebszellen und Zellen des Immunsystems eingebettet. Die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes kann sowohl mechanisch wie auch in ihrer synthetischen Zusammensetzung auf umweltbedingte Reize reagieren und kann somit als eine hochdynamische Struktur betrachtet werden [46]

Die Fibroblasten stellen den Hauptzelltyp der Dermis dar und sind für die Synthese und die Modulation von Bindegewebsproteinen verantwortlich [37]. Sie synthetisieren für die extrazelluläre Matrix der Dermis die Strukturproteine Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin und andere Grundsubstanzen, wie z.B. Proteoglykane. Mittels spezifischen Proteasen, die aufgrund ihrer Abhängigkeit von Metall-Ionen auch als Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bezeichnet werden, sind sie auch für den regulierten Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich [47]. Für eine regulierte Produktion, Organisation

und Degradation der extrazellulären Matrix kommunizieren die Fibroblasten untereinander als auch mit anderen Zelltypen der Haut (z.B. mit Keratinozyten aus der Epidermis) und mit der extrazellulären Matrix selbst in wechselwirkender Art und Weise. Dafür produzieren Fibroblasten nicht nur unlösliche Bestandteile der sie umgebenden Matrix, sondern auch lösliche Faktoren, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte beeinflussen können. Fokale Adhäsionspunkte an der Zellmembran der Fibroblasten bewirken eine Kommunikation zwischen dem Zytoskelett der Zellen, den transmembranen Proteinen sowie den Integrinen und Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Thrombospondin, Laminin oder Kollagen [48]. In der Wundheilung nehmen Fibroblasten wegen ihrer Fähigkeit zur Synthese von Kollagen Typ 1 und 3, der Sekretion des KGF (Keratinocytes growth factor) zur Reepithelialisierung durch Keratinozyten und der Umdifferenzierung zu Myofibroblasten eine Schlüsselrolle ein [49].

Die Hypodermis (Unterhaut) grenzt direkt an das Stratum reticulare an und stellt eine Verbindung zwischen den äußeren Hautschichten und inneren Strukturen wie Knochen und Muskulatur dar. Sie dient als Energiereserve, isoliert und schützt die Körperorgane vor äußeren schädigenden Einflüssen [37].

1.5 Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Haut

In der Physiologie und Pathophysiologie der Haut spielt das Stickstoffmonoxidradikal ($\text{NO}\bullet$) als Botenstoff und Regulator eine wichtige Rolle. $\text{NO}\bullet$ kann in der menschlichen Haut von allen Zelltypen durch NO-Synthasen (NOS) gebildet werden [50, 51]. $\text{NO}\bullet$ ist in der Haut bei allergischen Reaktionen, bei der unspezifischen Immunabwehr, bei der Antigenpräsentation, bei der UV-induzierten Erythem- und Ödembildung sowie der Steuerung der Melanogenese beteiligt [52]. Auch in der Haut können hohe Konzentrationen $\text{NO}\bullet$ zytotoxisch wirken und seine Präsenz im Verlauf von Entzündungsprozessen bzw. Autoimmunerkrankungen korreliert signifikant mit dem Grad der Gewebeerstörung [53, 54].

UVA-Strahlung führt u. a. in Keratinozyten und vaskulärem Endothel der Haut zur Expression der iNOS [55, 56]. Dies kann man als entzündliche Reaktion auf den UVA-Reiz verstehen und so das freigesetzte $\text{NO}\bullet$ als zytotoxische Wirkungskomponente sehen, welches zu UV-induzierten Hautschäden beitragen kann. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der iNOS sowie exogen appliziertes $\text{NO}\bullet$ Endothelzellen vor UVA-induzierter Apoptose schützen können. Diese protektive Wirkung des $\text{NO}\bullet$

korreliert eng mit dem NO-vermittelten Anstieg der mRNA und Proteinexpression von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein und geht mit einer Hemmung der UVA-induzierten Expression des pro-apoptotischen Bax-Proteins einher [57].

Auch eine iNOS-Induktion durch UVB-Strahlung konnte in HaCat (immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie), Keratinozyten und Endothelzellen der menschlichen Haut beschrieben werden [55, 56, 58].

Stickstoffmonoxid kontrolliert die Transkription zahlreicher Gene und ist so ein wichtiger Regulator der Genexpression. Dazu gehören protektive Stress-Schutz-Gene, die für Heat-Shock-Proteine, Chaperone und Hämooxygenase-1 kodieren. Auch wird die Transkription von Genen kontrolliert, die für regulatorische Mediatoren von Entzündungsreaktionen (z.B. IL-4), reparatorische Enzyme (z.B. Matrix-Metalloproteinasen) oder Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF kodieren. Diese genexpressionsregulierenden Eigenschaften auf Wachstumsfaktoren, Zytokine und Enzyme des Kollagenstoffwechsels sowie sein Einfluss auf die Regulation der Zellmotilität von Fibroblasten, Keratinozyten, Monozyten und Makrophagen machen NO• zu einem Schlüsselmolekül in der Steuerung der Wundheilung bzw. Geweberegeneration [51]. Dieses wird besonders deutlich bei iNOS-defizienten Mäusen, bei denen die Wundheilungsprozesse signifikant verzögert sind [59].

In den ersten 72 h der Wundheilung wirkt das von der aktivierten iNOS produzierte NO• in hohen Konzentrationen vasodilatatorisch und antimikrobiell. Die iNOS-Expression wird besonders in den basalen Keratinozyten der Wunde hoch reguliert und durch Zytokine positiv beeinflusst. Das gebildete NO• spielt durch Stimulation der Keratinozyten- und Fibroblastenproliferation eine Schlüsselfunktion bei der Reepithelialisierung und ist für die Angiogenese essentiell [60, 61]. Zusätzlich verstärkt NO• die Kollagensynthese und führt dadurch zu einer Beschleunigung der Wundheilung. So konnte die Applikation von NO-Donoren den von den Fibroblasten produzierten Kollagengehalt der Wunde deutlich erhöhen [49, 62].

Durch eine Erhöhung der endogenen, enzymatischen NO-Produktion bzw. durch den Einsatz spontan NO-freisetzender NO-Donoren konnte die Wundheilung signifikant verbessert bzw. beschleunigt werden. So führte die topische Applikation von saurer, nitrithaltiger Creme als NO-Donor-System in der die Wundheilung bei Mäusen mit diabetischem Hintergrund zu einer signifikanten Verbesserung. Auch S-Nitrosierte Thiole haben in der topischen Anwendung auf der menschlichen Haut Einzug gehalten und

werden dort als antibakterielle sowie die Reepithelialisierung-fördernde Substanzen verwendet [63].

Alle diese Befunde unterstreichen die Schlüsselfunktion von enzymatischen, aber auch nicht-enzymatisch gebildeten NO• in der Wundheilung, der Homöostase und des Zellschutzes der Haut [51, 64, 65].

1.6 UVA-Strahlung

Die auf der Erde auftreffende Sonnenstrahlung lässt sich in drei Wellenlängenbereiche aufteilen. Das sichtbare Licht (400 - 700 nm), das Infrarotlicht (700 - 400 nm) und die UV-Strahlung (200 - 400 nm). Die UV-Strahlung lässt sich weiter in UVA₁- (340 - 400 nm), UVA₂- (320 - 340 nm), UVB- (280 - 320 nm) und UVC- (200 – 280 nm) Strahlung unterteilen. Etwa 95 % der Energie der auf die Erdoberfläche treffenden UV-Strahlung stammt von der UVA-Strahlung. Die UVC-Strahlung wird in der Stratosphäre bei intakter Ozonschicht absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht [66].

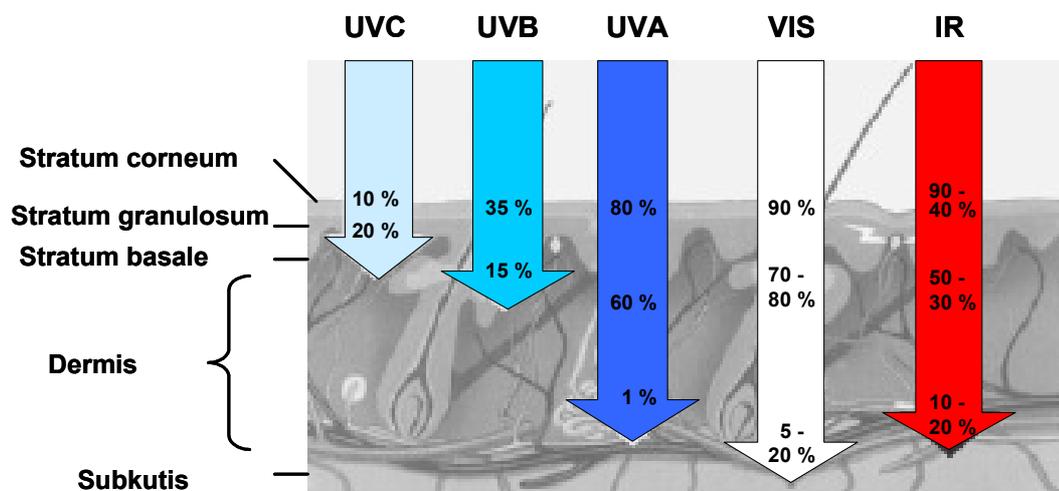


Abbildung 4 Eindringtiefe des Lichtes in die Haut (Beiersdorf AG, Hamburg, modifiziert).

UVA- und UVB-Strahlung sind Umweltfaktoren, die auf die menschliche Haut wirken. Die kurzwellige UVB-Strahlung wird aufgrund stärkerer Interaktion mit Proteinen und DNA mehr von der Haut absorbiert als die UVA-Strahlung. So kann UVA-Strahlung die Dermis durchstrahlen, während UVB-Strahlung nur die Basalmembran der Epidermis [67] sowie z. T. auch die mikrovaskulären Blutgefäße der Dermis erreicht (siehe Abbildung 4).

Bei übermäßiger UV-Exposition kommt es zu akuten und chronischen Schädigungen der Haut. UVB-Strahlung führt zu Sonnenbrand, der sich 4 - 6 Stunden nach Exposition zeigt und ein Zeichen eines komplexen Entzündungsgeschehens ist [68]. UVB-Strahlung verursacht durch die Absorption von Photonen überwiegend eine direkte DNA-Schädigung wie z. B. Photodimerisation des Thymin [69-71]. Diese DNA-Schädigung kann je nach Abhängigkeit des Schweregrades der Schädigung durch ein zelluläres Reparatursystem behoben werden [72, 73]. Die UVA-vermittelten Effekte auf die DNA erfolgen durch die Sensibilisierung bzw. Aktivierung von endogenen Chromophoren, welche das UVA-Licht absorbieren und die Energie in biochemische Signale umwandeln und so als Sekundärmoleküle fungieren. Zu diesen zählen Porphyrine, reduzierte Nicotinamid-Coenzyme, Flavine, Pterine und Kynureinsäuren [74]. Diese Chromophore induzieren eine Schädigung der Zellmembran und bestimmte Arten an DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüche und Protein-DNA "crosslinks" [70, 71, 75, 76].

Normalerweise herrscht in physiologischen Systemen ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Vorgängen. Mitochondrien sind die wichtigsten endogenen Quellen für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) [77], die während der Zellatmung als Beiprodukt gebildet werden. Eine Entgleisung des Gleichgewichts in Richtung der prooxidativen Seite wird als oxidativer Stress bezeichnet [78]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies schädigen die Zellmembranen durch Peroxidation von Membranlipiden [79, 80]. Durch die Wechselwirkung von UV mit endogen Photosensibilisatoren oder endogenen Chromophoren wie Riboflavine, Porphyrine, Tryptophan etc., kann der Energietransfer durch die UVA-Bestrahlung zur vermehrten Bildung von reaktiven Molekülen beitragen [81]. Dabei entstehen vermehrt intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies (ROS), so dass übermäßige UVA-Bestrahlung der Haut zu oxidativem Stress in den exponierten Zellen führt [15, 55, 82-84].

Diese oxidativen Prozesse werden aktuell für chronische Veränderungen der Haut verantwortlich gemacht und stehen im Zusammenhang mit dem Prozess der vorzeitigen Hautalterung, der durch eine Abnahme des Kollagengehalts der Haut und einer verminderten Kollagenneusynthese und einem verstärkten Kollagenabbau gekennzeichnet ist. Diese Vorgänge sind direkt mit der Anzahl, Vitalität und Aktivität von Fibroblasten verknüpft. Die Haut verliert ihre Zug- und Dehnungsfestigkeit und erscheint dünner und älter [85]. Zusätzlich ist in lichtgealterter Haut die Wundheilung signifikant verlangsamt [86].

Die chronische UV-Exposition wird auch in Verbindung mit der Entstehung von Hauttumoren gebracht. In den letzten Jahren wurde weltweit eine steigende Inzidenz der Melanombildung beobachtet und das Risiko der Epitheliome korreliert direkt mit der UV-Exposition bzw. mit der durchschnittlichen, jährlichen UV-Strahlenbelastung [87-89]. Ferner begünstigt eine verminderte Qualität der extrazellulären Matrix der Haut das Eindringen von Melanomzellen in die Blutbahn und führt zu einer erleichterten Metastasierung.

Zusätzlich zur natürlichen UV-Strahlung wird die menschliche Haut zu kosmetischen und therapeutischen Zwecken künstlicher UVA-Strahlung hoher Intensität [90, 91] ausgesetzt. Neben der Hautbräunung in Solarien kommt die UVA-Phototherapie u. a. bei der medizinischen Behandlung der atopischen Dermatitis [91, 92], des Lupus erythematoses [3, 93], der Urticaria pigmentosa [94], der Panklerotischen Morphaea [95] und der lokalisierten Sklerodermie [94] zum Zuge.

1.7 Antioxidanzien und andere Schutzmechanismen der Haut

Die Haut hat verschiedene Selbstschutzmechanismen gegen UV-Strahlen entwickelt. So führen die Verdickung der Hornhaut und die bei der Bräunung gebildeten Melaninpigmente zu einer erhöhten Absorption, die ein Eindringen der UV-Strahlen in voller Intensität in die unteren Hautschichten verhindert. Die durch UV-Strahlung gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies können enzymatisch durch Superoxiddismutasen, verschiedene Peroxidasen und Katalasen unschädlich gemacht werden [96]. Antioxidanzien wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Glutathion (GSH) und α -Tocopherol (Vitamin E) können einzeln oder besser in Kombination, die durch die photooxidativen Reaktionen gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies, effektiv abfangen [97].

Reduziertes Glutathion (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, und der Glutathionstatus ist im Zusammenhang mit der Untersuchung von oxidativen Ereignissen von unmittelbarer Relevanz. Vitamin C (Ascorbinsäure) ist neben Glutathion das wichtigste intrazelluläre, wasserlösliche Antioxidanz, das Vitamin E in der Membran regenerieren kann und selbst über NADH- und GSH-abhängige Dehydroascorbat-Reduktasen regeneriert wird. Vitamin E (α -Tocopherol) ist das wichtigste lipidlösliche, membrangebundene Antioxidanz, dessen protektive Wirkung über Wechselwirkungen mit mehrfach ungesättigten

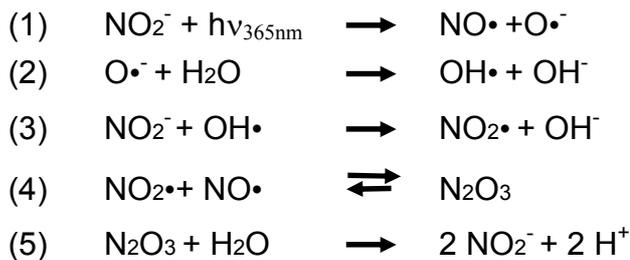
Phospholipiden vermittelt wird. So zeigen kutane Anwendungen von Vitamin E protektive Effekte gegenüber UV-Strahlung [98, 99], während in Humanstudien die orale Einnahme von Vitamin E in Kombination mit Carotinoiden die Bildung eines UV-induzierten Erythems verringern [100].

In den letzten Jahren konnte auch in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid in verschiedenen Zellmodellen antioxidativ wirkt und gegen oxidativen Stress protektive Wirkung entfalten kann. Durch eine direkte Reaktion mit $\text{NO}\cdot$ können Sauerstoff- und Hydroxylradikale neutralisiert werden. Ferner reagiert $\text{NO}\cdot$ mit Superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) zu Peroxynitrit (ONOO^-), wodurch die Haber-Weiss-Reaktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid und die Bildung von hoch reaktiven Hydroxylradikalen verhindert wird. Diese Radikale werden hauptsächlich für die Zellschädigung durch Lipidperoxidation und DNA-Strangbrüche verantwortlich gemacht [101].

Darüber hinaus kann $\text{NO}\cdot$ unter Reaktion mit Lipid-Peroxo-Radikalen die Radikalkettenreaktion terminieren und auf diese Art effektiv eine radikalabhängige Lipidperoxidation beenden [102].

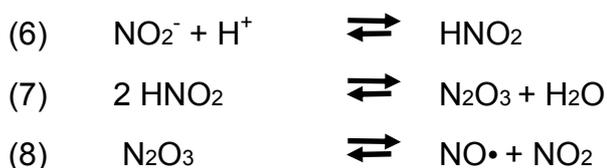
1.8 Nicht-enzymatische NO-Generierung

In wässrigen Lösungen kann NO• nicht-enzymatisch als Folge einer Photolyse, so wie auch durch einen pH-induzierten Zerfall von Nitritanionen, entstehen [103]. Dabei werden die in einer nitrithaltigen Lösung enthaltenen Nitritanionen (NO₂⁻) mittels elektromagnetischer Strahlung im UVA-Bereich (354-366 nm) gespalten, wodurch NO• generiert wird (Reaktionen 1-5).



Aus dem Mechanismus des UVA-induzierten Nitritzerfalls (Reaktionen 1-5) geht hervor, dass unter dem Einfluss von UVA-Licht Nitrit zum Stickstoffmonoxidradikal (NO•) und Sauerstoffradikalanion (O⁻) zerfällt, welches in Wasser die Bildung eines Hydroxylradikals (OH•) initiiert (Gleichungen 1 und 2). Das Hydroxylradikal reagiert mit Nitrit zum Nitrogendioxidradikal (NO₂•) (Gleichung 3). Dieses kann mit Stickstoffmonoxid zu Dinitrogentrioxid reagieren (Gleichung 4). Aus Gleichungen 1-4 wird zudem deutlich, dass das in Reaktion 1 gebildete NO• in der Reaktion der Gleichung 4 zum Teil wieder konsumiert wird, wodurch unter solchen Bedingungen die frei verfügbare NO-Menge reduziert wird.

Unter sauren Bedingungen befindet sich das Nitritanion in wässrigen Lösungen im Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure HNO₂. HNO₂ befindet sich im Gleichgewicht mit N₂O₃, welches spontan zu NO• and NO₂ zerfallen kann (Reaktionen 6-8).



Während der spontane Zerfall im physiologischen pH sehr gering ist, beobachtet man unter sauren Bedingungen eine erhöhte NO-Bildung als Folge von Reaktion 8.

Auch andere NO-Derivate wie S-nitrosierte Proteine wie z.B. S-Nitroso-Glutathion (GSNO), S-Nitroso-Albumin oder S-Nitroso-Hämoglobin, können spontan zerfallen und dabei NO• freisetzen.

Vielen dieser im Blut vorkommenden NO-Derivate schreibt man eine Beteiligung an der Regulierung des Blutdruckes zu, die aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit im Vergleich zu freiem NO, als zirkulierender NO-Speicher betrachtet werden [104]. Auch eine Photolyse von Nitrat wurde schon beschrieben [105] und könnte somit eine mögliche biologische Quelle für NO• darstellen.

GSNO ist sehr Licht und pH-empfindlich und wurde bereits als Therapeutikum der Haut am Menschen getestet [63].

Die Anwesenheit von Nitrit während UVA-Bestrahlung konnte Endothelialzellen der Ratte effektiv vor den toxischen Wirkungen von UVA-Strahlung schützen [106]. Dieser schützende Effekt beruhte auf der nicht-enzymatischen Bildung von NO• durch UVA-induzierten Nitritzerfall. Dieses gebildete NO• war in der Lage die Lipidperoxidation in den Zellen und somit einen apoptotischen Zelltod zu inhibieren. Damit konnte erstmals eine protektive Wirkung von Nitrit als NO-Donor in Zellen gegenüber UVA-induzierten Schäden gezeigt werden. Von besonderer Relevanz sind diese Ergebnisse und der potentielle Zerfall photolabiler NO-Derivate für die Physiologie der Haut, da sich dort im Vergleich zum Serum höhere Konzentrationen an Nitrit ($5,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$), Nitrosothiolen ($1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$), Nitrosaminen ($2,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$) und Nitrat ($82,4 \pm 33,6 \mu\text{M}$) finden lassen. So konnte man nach UVA-Bestrahlung eine beachtliche nicht-enzymatische NO-Freisetzung in und über der Haut nachweisen, die ein Vielfaches der enzymatischen NO-Bildung betragen kann [107].

1.9 Fragestellung

Stickstoffmonoxid (NO) spielt in vielen biologischen Abläufen eine wichtige Rolle. Nitrit und andere NO-Derivate konnten in verschiedenen Zellsystemen, z.B. Endothelzellen der Ratte, gegenüber Noxen wie UVA-Strahlung und Wasserstoffperoxid schützen. In der menschlichen Haut befinden sich beträchtliche Mengen an natürlich vorkommenden NO-Derivaten, wie Nitrit, Nitrat und Nitrosoverbindungen, die unter UV-Strahlung zerfallen und NO• freisetzen können. Humane Hautfibroblasten nehmen in der Hautphysiologie mit dem Auf- und Abbau der intrazellulären Matrix, Sezenerung von Botenstoffen und in der Wundheilung eine Schlüsselfunktion ein. Eine übermäßige UV-Exposition der Haut führt zu einer Dysfunktion der kutanen Fibroblasten, die mit vorzeitiger Hautalterung, Begünstigung von Melanomen und Wundheilungsstörungen in Verbindung gebracht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Verwendung von Nitrit als zellschützendes NO-Donorsystem gegen UVA-induzierte Schäden auch bei humanen Hautfibroblasten überprüft werden. Dabei sollte besonders der Einfluss von Antioxidanzien auf die UVA-induzierte NO-Generierung aus Nitrit betrachtet und eine mögliche Verwendung von Nitrit in Kombination mit Antioxidanzien zum Zellschutz untersucht werden. Insbesondere in Hinblick auf die lichtinduzierte Hautalterung wäre eine Beantwortung dieser Frage von Bedeutung, um eine mögliche topische Anwendung von Nitrit in der Dermatologie abzuklären.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Aufklärung der Herkunft und Funktion von natürlich vorkommenden NO-Derivaten in der Haut. Hier sollte besonders die Frage eines möglichen, UVA-induzierten Nitritzerfalles und der dadurch bedingten nicht-enzymatischen NO-Bildung auf zellulärer Ebene und deren Rolle im Rahmen des Zellschutzes gegenüber UVA-induzierte Schäden beantwortet werden.

2 Material/Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose (Sigma, Deisenhofen)
Ammonium Thiocyanat (Sigma, Deisenhofen)
Bovines Serum Albumin (PAA, Linz, Österreich)
Chloroform (Roth, Karlsruhe)
Diaminofluoreszein-2 Diacetat; DAF-2DA (Sigma, Deisenhofen)
Dispase grade II-Lösung (Boehringer, Mannheim)
DMSO (Serva, Heidelberg)
DNA-Längenstandard (Boehringer, Mannheim)
Eisensulfat (Sigma, Deisenhofen)
Eisessig (Roth, Karlsruhe)
Ethanol (Roth, Karlsruhe)
Eukitt (Sigma, Deisenhofen)
FCS (PAA, Linz, Österreich)
Glukose (Merck, Darmstadt)
Glutaraldehyd (Roth, Karlsruhe)
Glutathion; GSH (Sigma, Deisenhofen)
H₂O₂ (Sigma, Deisenhofen)
Helium (Linde, Pullach)
HEPES (PAA, Cölbe)
Höchstfarbstoff H33342 (Sigma, Deisenhofen)
IFN- γ (HBT, Leiden, Niederlande)
IL-1 β (HBT, Leiden, Niederlande)
Isopropanol (Roth, Karlsruhe)
Jod (Sigma, Deisenhofen)
Kalium-Chlorid; KCL (Sigma, Deisenhofen)
Kaliumjodid (Sigma, Deisenhofen)
Kalium-Nitrit; KaNO₂ (Sigma, Deisenhofen)
Kalzium-Chlorid ; CaCl₂ (Sigma, Deisenhofen)
Kollagenase (Biochrom, Berlin)
Kupfersulfat (Sigma, Deisenhofen)

Magermilchpulver (Sigma, Deisenhofen)
Magnesium-Chlorid; MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
Methanol (Roth, Karlsruhe)
MitoSOX red Reagenz. (Invitrogen, Karlsruhe)
mM N-ethyl-maleimide; NEM Puffer (Sigma, Deisenhofen)
Na-Ascorbat (Sigma, Deisenhofen)
NaOH (Roth, Karlsruhe)
Natrium-Ascorbat (Sigma, Deisenhofen)
Natrium-Chlorid; NaCl (Merck, Darmstadt)
Natrium-Nitrat; NaNO₃ (Sigma, Deisenhofen)
Natrium-Nitrit; NaNO₂ (Sigma, Deisenhofen)
Neutralrot 2-Amino-3-methyl-7-dimethyl-amino-phenazoniumchlorid (Sigma, Deisenhofen)
N^ε-monomethyl-L-Arginin; L- NMMA (Sigma, Deisenhofen)
N-iminoethyl-L-ornithin; L-NIO (Alexis, Grünberg)
Propidium Jodid (Sigma, Deisenhofen)
Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim)
RNase-freies Wasser (Qiagen, Hilden)
RPMI 1640 –Medium; Nitrit-, Nitrat- und L-Arginin-frei (Biochrom, Berlin)
Stickstoff (Linde, Pullach)
TNF- α (HBT, Leiden, Niederlande)
Trolox (Sigma, Deisenhofen)
Trypsin (PAA, Linz, Österreich)
Tween (Sigma, Deisenhofen)
Xylol (Roth, Karlsruhe)
 β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

2.1.2 Geräte

Brutschrank: *Heracell* (Heraeus, Osterode) (37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂)
Einfrierbox: Cryo 1° Freezing Container (Nalgene, USA)
ELISA-Reader: Titertek Plus MS212 (ICN, Meckenheim)
Gelkammern für DNA-Gelelektrophorese (Serva, Heidelberg)
PCR-Maschinen: GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer, Shelton, USA)
Mikroskop: DM-IL mit Kamerasystem Periplan (Leitz, Wetzlar)
Photosystem für DNA-Gele Polaroid

Pipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt)
Photometer für RNA-Messung (Pharmacia Biotech)
Sterilbank: LaminAir (Heraeus, Osterode)
Tischzentrifuge: Microzentrifuge (Denver Instruments, USA)
Thermoblock TB1 (Biometra, Göttingen)
UV-Transluminator (AGS, Heidelberg)
Zentrifuge (RNA-Isolation): Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen)
Zellzentrifuge: Allegra 6KR (Beckmann, Krefeld)
Ultrazentrifuge: J2-21 (Beckmann, Krefeld)
Autoklav (Gössner, Hamburg)
UVA/UVB Detektor RM21 (Dr. Gröbel GMBH, Ettlingen)
konfokales, inverses Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 40/1.3 DIC
UVObjektive Model LSM 510 Meta (Carl Zeiss AG, Jena)
UV-Laser: Modell Enterprise 2 Ion Laser (Coherent GmbH, Dieburg)
Chemolumineszenz-Detektion: CLD 88e (Ecophysics, München)

2.1.3 UVA – Quellen

Für die Bestrahlungen der Zellkulturen benutzten wir als UVA-Quelle die Sellas 4000W Quecksilber-Lampe (Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland) mit ein UVA₁-Spektrum (340- 410 nm) mit einem Intensitätsmaximum bei 366 nm (84 mW/cm² bei einem Abstand von 25 cm).

Die Versuche des UVA-abhängigen Nitritzerfalls mit der FAMOS-Methode wurden mit einer Sellas 2000W Quecksilber-Lampe mit einem breiteren UVA-Spektrum (320-400nm) mit einer maximalen Intensität zwischen 350-370 nm (70 mW/cm² bei einem Abstand von 25 cm).

Bei dem Nachweis von Trolox-Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wurde eine Quecksilber/Xenon-Hochdrucklampe Hanovia 977-B1 (1-kW) mit einem 3 mm UG-5 Filter von Schott verwendet.

2.1.4 Kit-Systeme

Dc Protein-Assay-Kit (Bio-Rad, München)
LSAB2-Kits (DakoCytomation GmbH)
DAB-Reagenz (DakoCytomation, Hamburg).
RNA Isolierung Kit RNeasy™ (Qiagen, Hilden)
Omniscript™-RT-Kit (Qiagen, Hilden)

Lipid hydroperoxidase assay kit“ (Cayman Chemical Company, USA)

2.1.5 Plastikware

0,5- 2,0 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

6-well, 12-well, 10cm Zellkulturschalen (Greiner, Solingen)

15-50ml Reaktionsgefäße (Greiner, Solingen)

Pipetten (Eppendorf, Hamburg)

2.1.6 Antikörper

Kaninchen-anti-S-Nitrosocystein-Antikörper (Calbiochem, Luzern, Schweiz)

unspezifisches Kaninchen-Antiserum (Calbiochem, Luzern, Schweiz)

Ziege-anti-Kaninchen IgG–Antikörper, HRP-gekoppelt (Santa Cruz, Heidelberg)

2.1.7 NO-Donoren

(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2ammoniomethyl)amino]diazene-1-ium-1,2diolat (DETA/NO) wurde als exogener NO-Donor verwendet, welches zwei Moleküle NO• pro Trägermolekül freisetzen kann. Die Halbwertszeit bei 37°C und einem pH von 7,4 beträgt für DETA/NO ca. 8 Stunden. Für die Herstellung einer 50 mM DETA/NO Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch 0,82 mg DETA/NO in 97 µl PBS auf Eis gelöst und mit 3 µl 1 M HCl Lösung versetzt. Der verwendete NO-Donor wurden freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Etablierung der primären Fibroblastenkulturen

Primäre humane Fibroblasten wurden aus Haut gewonnen, die direkt nach Mamma Reduktionsplastiken im Einverständnis der Patienten aus dem Operationsaal ins Labor in sterilen Behältern transferiert wurden. Die Haut wurde in steriles PBS überführt und nach Reinigung und Befreiung von Fettgewebe in ca. 1,0 cm lange und 0,5 cm breite Stücke geschnitten und mit der Epidermis nach oben in einer Kulturschale mit 10 ml 1%-iger Dispase grade II-Lösung (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Deutschland) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Epidermisstücke leicht von der Dermis mit Hilfe einer Pinzette abgezogen. Die gewonnenen Dermisstücke wurden in ein steriles Gefäß mit Kollagenase/PBS-Lösung (1 mg/1 ml) überführt und 30 min bei 37°C im Schüttelbad (250 U/min) inkubiert. Die angedauten Dermisstücke wurden in einen Zellsieb gegeben, mit einem Spritzenstempel gepresst und anschließend mit kalten PBS gespült. Die gewonnenen Flüssigkeiten mit suspendierten Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 1000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Nitrit/Nitratfreiem Vollmedium resuspendiert und in 10 cm Zellkulturschalen unter Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂) in Kultur genommen.

Kulturbedingungen

Die Kultur der humanen Hautfibroblasten erfolgte in 12 ml RPMI 1640 Vollmedium mit 2% inaktiviertem FCS in 10 cm-Zellkultur-Petrischalen bei 37°C und 5% CO₂. Fibroblasten wachsen adhärent und wurden, sobald die Zellen auf der Petrischale einen subkonfluenten Zellrasen gebildet haben, in regelmäßigen Abständen durch Trypsinbehandlung von der Platte gelöst und passagiert oder für die Versuche ausgesät.

Bei der Trypsinbehandlung wurden die Kulturüberstände von der Zellkulturplatte abgesaugt und die Zellen mit isotonischer NaCl/EDTA 0,02% 2x gewaschen und anschließend 2,5 ml NaCl-HEPES zugeführt. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen wie z.B. Calcium, welches sich im Medium befindet und die Trypsin-Aktivität hemmt. Durch Zugabe von EDTA wird die Trypsin-Aktivität gewährleistet. Es wurden 800 µl der Trypsinlösung in die Zellkulturschale pipettiert, vermischt und die Petrischale ca. 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Überprüfung wurden die abgelösten Zellen in 20 ml RPMI 1640 überführt und 5 min bei 1000 g zentrifugiert,

nochmals gewaschen und in gewünschter Zelldichte neu ausgesät oder kryokonserviert. Nach 4 - 7 Stunden wuchsen die Zellen wieder adhärent.

Die Kryokonservierung erfolgte in RPMI 1640 Vollmedium und 20% DMSO (Dimethylsulfoxid) pH 7,5; sterilfiltriert, 4 °C als Einfriermedium. Nach Trypsinierung und Zentrifugation in RPMI 1640 Vollmedium wurden die Fibroblasten auf die Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und im Verhältnis von 1:1 mit dem Einfriermedium vermischt. Je 2 ml dieser Suspension wurden in Kryoröhrchen abgefüllt und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox, die eine Abkühlung von 1°C/min gewährleistet, bei –80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für das Auftauen der Zellen wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und unverzüglich in ein Wasserbad mit 37°C überführt und inkubiert bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zusehen war. Der Inhalt des Kryoröhrchen wurde in einem Zentrifugationsröhrchen mit 13 ml RPMI Vollmedium bei 1000 g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 5 ml RPMI 1640 Vollmedium resuspendiert und auf 37°C vorgewärmte Kulturplatten mit 15 ml RPMI 1640 Vollmedium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert. Das Medium wurde nach 24 Stunden erneuert um die noch vorhandene DMSO Konzentration weiter zu verringern.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl/relativen Zellzahl

Die Zellzahl wurde durch auszählen der Zellen in der Neubauer-Kammer und anschließender Multiplikation mit dem Zählkammerfaktor 10^4 bestimmt. Die relative Zellzahl wurde mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot (2-Amino-3-methyl-7-dimethyl-aminophenazoniumchlorid) vorgenommen. Die Zellen wurden mit einer 1:100 Verdünnung einer Neutralrot-Lösung (3%) in RPMI 1640 Vollmedium versetzt und für 90 min unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die Wells mit den angefärbten Zellen 2x mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend vollständig getrocknet. Für Messungen wurden die Zellen mit Isopropanol/1% HCl lysiert (500 µl/Well). Von den gefärbten Lysaten wurden je 100 µl in durchsichtige 96-Well-Platten gegeben und deren Extinktion mittels ELISA-Reader bei 530 nm bestimmt. Da der Einbau der Neutralrot-Kristalle nur in vitalen Zellen erfolgt, steigt die Extinktion proportional zur Anzahl vitaler Zellen und so eignet sich diese Methode zur Überwachung des Zellwachstums [108].

2.2.3 Depletierung von intrazellulärem Nitrit und intrazellulärer Nitrosoverbindungen

Um den intrazellulären Gehalt an Nitrit und Nitrosoverbindungen zu reduzieren, welche als Produkte zellulärer NOS Aktivität betrachtet werden [109], wurden die Zellen mit Nitrit-, Nitrat- und L-Arginin-freien RPMI-Medium in Anwesenheit von 500 μM Na-Ascorbat, 10 μM Kupfersulfat und/oder den NOS-Inhibitoren N^G -monomethyl-L-Arginin (L-NMMA; 1 mM) und N-iminoethyl-L-ornithin (L-NIO; 0,5 mM) für 7 Tage gehalten. Nach mehrmaligen intensiven Waschen wurden die Zellkulturen für drei weitere Tage nur in Anwesenheit der oben genannten NOS-Inhibitoren in dem modifizierten RPMI-Medium mit täglichen Mediumwechsel kultiviert, um die noch vorhandenen Cu^{2+} -Ionen auf ein Minimum zu reduzieren.

2.2.4 Induzierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Eine Induzierung der Expression und Aktivität der iNOS in humanen Hautfibroblasten wurde über die Inkubation mit einem Zytokin-Cocktail, bestehend aus (rh) IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (HBT, Leiden, Niederlande) mit insgesamt je 500 U/ml in Medium für 24 h bei normalen Kultivierungsbedingungen wie beschrieben bei Wang et al [110] vorgenommen.

2.2.5 Nachweis von Apoptose und Nekrose in humanen Hautfibroblasten

Nach verschiedenen Zeitpunkten (0-24 h) nach Behandlung bzw. Bestrahlung einer Fibroblastenkultur in einer 6-Well-Kulturschale, wurde diese mit dem Höchstfarbstoff H33342 (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und oder mit Propidiumjodid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 für 5 min inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen. Unmittelbar danach wurden die Zellen unter der Benutzung eines Fluoreszenz-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) visualisiert. Mindestens 400 Zellen wurden für jedes Experiment gezählt. Apoptotische Zellen zeichnen sich durch kondensierte oder fragmentierte Zellkerne aus, die man durch die Färbung mit H33342 gut erkennen kann. Eine positive Anfärbung der Zellen mit Propidiumjodid bedeutet einen nekrotischen Zelltod, da lebende Zellen diesen Farbstoff aktiv ausscheiden. Die Anzahl der H33324- bzw. Propidiumjodid-positiven Zellen wurde in Prozent bezüglich der insgesamt gezählten Zellzahl ausgedrückt.

2.2.6 Nachweis von Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation wurde unter Verwendung des „Lipid hydroperoxidase assay kit“ (Cayman Chemical Company) bestimmt. Dazu wurden Fibroblasten (2×10^6) in 10 cm Kulturschalen kultiviert und nach der Behandlung mit Ultraschall in HPLC-Grade Wasser homogenisiert. 500 μ L des Homogenisates wurden mit 500 μ l des nach Hersteller mit „Extract R“ vorbereiteten Methanols versetzt und unter Benutzung eines Vortex-Mixers gemischt. Zu dieser Lösung wurde 1 ml kaltes Chloroform gegeben und gemischt und anschließend bei 1500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

Die Chloroformschicht wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein anderes Gefäß auf Eis überführt. 500 μ l dieses Chloroformextraktes wurden mit 450 μ l einer Chloroform/Methanol Lösung (2 Volumen Chloroform/1Volumen Methanol) gemischt. Je 50 μ L der nach Herstellerangaben frisch vorbereitet Chromogenlösung (1 Volumen FTS I Lösung, bestehend aus 4,5 mM Eisensulfat in 0,2 M Salzsäure mit einem Volumen FTS II- Lösung, bestehend aus einer 3% Methanollösung mit Ammonium Thiocyanat) wurden in die Probenröhrchen dazu gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption von jeweils 300 μ l der Lösung wurden in

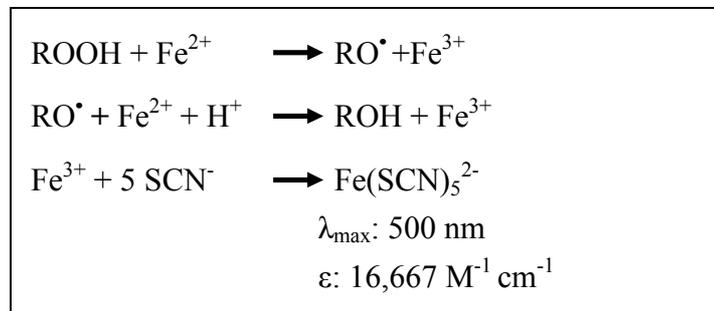


Abbildung 5 Zugrunde liegende Reaktionen für den quantitativen Nachweis von Hydroperoxide.

einer 96-well Glasplatte bei 500 nm in einem Photospektrometer gemessen. Die Hydroperoxide reagieren (Abbildung 5) mit zweiwertigen Eisenionen. Die entstandenden dreiwertigen Eisenionen reagieren mit dem Chromogen Thiozyanat zu einem farbigen Komplex, dessen Absorption bei 500 nm bestimmt werden kann [111].

2.2.7 Detektion intrazellulären Stickstoffmonoxid-Generierung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

Fibroblasten wurden auf Glasobjektgläschen ausgesät und in einer spezialangefertigten Kammer mit einer HEPES-gepufferten Lösung (138 mM NaCl, 6 mM KCL, 1 mM MgCl₂ 1 mM CaCl₂ 5,5 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH 7,5) mit frisch zugegebenen DAF-2DA Farbstoff (Endkonzentration 10 µM) fünf Minuten vor Versuchsbeginn im Brutschrank bei 37°C inkubiert. DAF-2DA (Diaminofluoreszein-2 Diacetat) ist ein nicht fluoreszierender, zellmembrangängiger Farbstoff, bei dem intrazellulär die Diacetatgruppe durch zytosolische Esterasen abgebaut und somit eine Diffusion aus der Zelle verhindert wird. Freies NO• in der Zelle konvertiert den nichtfluoreszierenden Farbstoff DAF-2 in das fluoreszierende Triazol-Derivat DAF-2T, welches durch eine Anregung bei 488 nm und einer Emission bei 515 nm mikroskopisch visualisiert werden kann. Für die Visualisierung wurde ein konfokales, inverses Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 40/1.3 DIC UV Objektiv (Modell LSM 510 Meta; Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) benutzt, bei dem die Möglichkeit bestand, die Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen zu halten. Pinholes wurden auf 0,9 µm adjustiert.

Das mikroskopische Sichtfeld wurde digital auf 512 x 512 Pixel unterteilt. Für einen Zyklus wurde jedes Pixel nacheinander mit einer Wellenlänge von 488 nm bestrahlt (3,2 µs pro Pixel) und die Fluoreszenzemission mittels einem Breitbandfilter (505 – 530 nm) 3,2 µs pro Pixel beobachtet und gegebenenfalls in einem gewählten Quadranten im aufgezeichneten Sichtfeld mit einem UV-Laser (Modell Enterprise 2 Ion Laser; Coherent GmbH, Dieburg, Deutschland) 3,2 µs pro Pixel mit einer Wellenlänge von 351 nm bestrahlt. Die Bestrahlung wurde mit 50 % der möglichen Leistung vorgenommen, was nach Herstellerangaben bei einer Bestrahlungszeit von 3,2 µs pro Pixel einer Dosis von ungefähr 1,5 µJ/cm² pro Zyklus entspricht. Dabei ließen sich einzelne oder mehrere Zellen komplett oder auch punktuell spezielle Bereiche abhängig von der Größe des gewählten Quadranten bestrahlen.

Für ein Experiment wurden die DAF-2 Fluoreszenzen von Zellen in einem gewählten Quadranten drei Zyklen ohne UV-Bestrahlungen, 10-40 weiteren Zyklen je nach Experiment mit UV-Bestrahlung und sieben weiteren Zyklen ohne Bestrahlung aufgenommen. Als interne Kontrollen dienten unbestrahlte Zellen außerhalb des gelegten Quadranten. Für eine Quantifizierung der DAF-2 Fluoreszenz, wurde die Zeiss Image Exa-

miner Software benutzt und die Rohdaten von 5-9 Zellen für eine weitere Auswertung nach Excel exportiert.

2.2.8 Herstellung von Homogenisaten aus humanen Fibroblasten

Die Bestimmung der intrazellulären Nitrit bzw. Nitrosoverbindungen geschah aus hergestellten Homogenisaten aus humanen Fibroblasten. Dazu wurden die in 10 cm-Zellkulturschalen kultivierten Fibroblasten einer Trypsinbehandlung unterzogen (siehe Abschnitt 2.1.2) und 1×10^7 in 300 μl NEM Puffer (PBS, 5 mM N-Ethyl-Maleimide (NEM), 2,5 mM EDTA, Proteaseinhibitor-Cocktail) aufgenommen. Diese Zelllösung wurde durch 1 min Ultraschallbehandlung homogenisiert und kurz abzentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml verdünnt und direkt mittels Chemolumineszenz-Detektion gemessen oder bei -20°C für maximal 2 Wochen eingefroren.

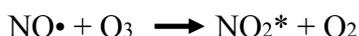
2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen eines Fibroblasten-Homogenisates oder andere biologischer Proben benutzen wir das Dc-Protein-Assay-Kit der Firma Bio-Rad. Dieser Assay basiert auf dem Bradford Assay [112], bei dem die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung nach einer Bindung mit Proteinen für eine Quantifizierung der Proteinkonzentration ausgenutzt wird. Dazu wurden 5 μl einer Probe bzw. einem BSA-Standard mit 25 μl des Arbeitsreagenz in eine durchsichtige 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und anschließend 200 μl Reagenz B vorsichtig zugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und gegebenenfalls Luftblasen mit einer Pipettenspitze entfernt. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.2.10 Quantifizierung von Nitrit und Nitrosoverbindungen mittels Chemolumineszenz-Detektion (CLD)

Die Konzentration von Nitrit und anderen Nitrosoverbindungen in Fibroblasten-Homogenisaten, Haut-Homogenisaten und Zellkulturüberständen wurde mit der Chemolumineszenz-Detektion (CLD 88e, Ecophysics, München, Deutschland) bestimmt [113].

Der Analysator erzeugt Ozon, welches mit dem angesaugten NO-enhaltenden Trägergas (Helium) nach folgenden Reaktionen reagiert:



Es entsteht bei 20 % der Reaktionen NO_2 in einem elektronisch angeregten Zustand (NO_2^*), welches beim Übergang der Elektronen in den Grundzustand Energie in Form von Licht im Wellenbereich von 600-3000 nm mit einem Emissionsmaximum bei ca. 1200 nm emittiert. Diese Lichtemission wird mit Hilfe eines Photomultipliers verstärkt und in elektrische Impulse umwandelt, die dann aufgezeichnet werden und deren Stärke bei großem Ozonüberschuss proportional mit der NO-Konzentration im Probegas ist. Die Menge des gemessenen $\text{NO}\cdot$ korreliert dabei mit der Fläche und nicht mit der Höhe der Peaks. Diese sind weitgehend von der Geschwindigkeit der Probeninjektion, Mischung und Reduktionseffizienz abhängig. Mittels einer Eichreihe im Konzentrationsbereich von 0-1 μM Nitrit kann man mit dieser Methode die Quantifizierung von Nitrit und Nitrosoverbindungen im Femtomol-Bereich erreichen.

Die Überführung des Nitrit und anderen Nitrosoverbindungen in gasförmiges $\text{NO}\cdot$ erfolgt in einer Reaktionslösung aus 45 mM Kaliumjodid (KJ) und 10 mM Jod in Eisessig bei 65°C. Nach Reduktion der Proben mit dieser Reaktionslösung geht das entstandene $\text{NO}\cdot$ in die Gasphase über. Für die Entfernung von Säure und Jodid wird das Trägergas erst durch eine Kältebrücke und eine 4°C kalte 1 M NaOH-Lösung geführt und anschließend in den Analysator geleitet.

Für eine differenzielle Quantifizierung zwischen Nitrit und Nitrosoverbindungen wurden die Proben vor der CLD Analyse aliquotiert und verschieden behandelt. Durch die Aufbewahrung im Dunkeln und auf Eis wurde eine photolytische bzw. thermolytische Spaltung umgangen. Die unbehandelte Probe dient zur Detektion des Gesamtbetrages an Nitrit und Nitrosoverbindungen. Für die Entfernung von Nitrit wurden die Proben mit Behandlung einer 1 N HCl / 0,5 % Sulfanilamid in für 15 min RT behandelt, wel-

ches mit Nitrit unter Entstehung eines stabilen Diazoniumion reagiert, das nicht in der KJ/Jod-Reaktionslösung zu NO reduziert wird. Somit kann man die Konzentrationen an Nitrosoverbindungen bestimmen und durch Subtraktion von der unbehandelten Probe die Nitritkonzentration errechnen.

2.2.11 Detektion von S-Nitrosoverbindungen durch immunzytochemische Färbung

Für die Versuche wurden humane Hautfibroblasten auf sterile Glasobjekträger ausgesät und unter normalen Bedingungen kultiviert.

Für immunhistochemischen Färbungen wurden diese 2x in PBS gewaschen und anschließend mit Glutaraldehyd fixiert (0,2% in TBS, pH 7,0, 15 min bei 4°C). Nach einem einstündigen Blockierungsschritt mit 3% Magermilchpulver/0,5% Tween in TBS wurden die Objektgläschen mit Kaninchen-anti-S-Nitrosocystein-Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in TBS/3 % Magermilchpulver/0,5% Tween eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Inkubation mit einem unspezifischen Kaninchen-Antiserum (Calbiochem, Luzern, Schweiz). Nach drei Waschschritten folgte eine einstündige Inkubation mit Peroxidasegekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG als Sekundär-Antikörper (1:30 in TBS). Alle Schritte wurden bei 4°C vorgenommen. Nach dreimaligen Waschen mit TBS wurden für die Blockierung endogener Peroxydaseaktivität die Proben mit einer 0,015%-igen H₂O₂-Lösung in TBS bei Raumtemperatur behandelt und anschließend nach Herstellerangaben des Universal DAKO LSAB2-Kits (DakoCytomation GmbH) weiter verfahren. Die Detektion erfolgte mit dem DAB-Reagenz (DakoCytomation GmbH). Nach einer einminütigen Gegenfärbung mit Hämotoxylin und einer Entwässerung über einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließenden Xylol-Waschschritt, wurden die Objektgläschen mit Eukitt auf Objekträger gebracht, getrocknet und mikroskopisch ausgewertet.

2.2.12 Nachweis des GSH-induzierten oxidativen Stresses

Für den Nachweis eines oxidativen Stresse in Zellen verwendeten wir das MitoSOX red Reagenz. (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). MitoSOX red dringt schnell in lebende Zellen ein und wird durch Superoxid oxidiert. Durch die Oxidation wird das MitoSOX red Reagenz nach Bindung an Nukleinsäuren hochfluoreszierend. Andere reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder reaktive Nitrosospezies wie Peroxynitrit reagieren nicht mit dem MitoSOX red Reagenz.

2.2.13 Messung der ecNOS- und iNOS-Genexpression mittels PCR

Die Isolierung zellulärer RNA aus humanen Hautfibroblasten wurde mittels Qiagen RNA Isolierung Kit RNeasy™ durchgeführt.

Das Medium wurde von den Zellkulturschalen komplett abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 350 μ l eines RLT-Lysepuffer mit β -Mercaptoethanol (10 μ l/ml) lysiert. Die lysierten Zell-Suspensionen wurden in QIAshredder™-Säulen überführt und 2 min in der Zentrifuge bei 8000 g homogenisiert.

Die homogenisierten Lysate wurden je mit 1 Volumen (350 μ l) Ethanol (70 %) versetzt und durch Pipettieren vermischt. Die Gemische wurden je auf RNeasy™-Spin-Säulen pipettiert und 15 s bei 8000 g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Auf die Säulen wurden 700 μ l des RW-1-Puffers gegeben und 15 sek bei 8000 g zentrifugiert. Die Eluate wurden verworfen und die Säulen in neue 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Daraufhin wurden zwei weitere Waschschrte mit je 500 μ l RPE-Puffer mit anschließenden Zentrifugationen bei 8000 g vorgenommen (30 s beim ersten und 2 min beim zweiten Waschschrte) und das Eluat jeweils verworfen. Die Säulen wurden je in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 8000 g zentrifugiert und anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Auf die Säulen wurden 40 μ l RNase-freies Wasser pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen und schließlich 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde auf Eis gelagert und die Säulen verworfen.

Mittels Spektralphotometer wurde das Absorptionsspektrum (A_{260}/A_{280} -Quotient) der Eluate (1/50 verdünnt) gemessen und somit die Reinheit und die isolierte Menge an Gesamt-RNA bestimmt.

Die RNA wurde entweder auf Eis für die RT-Reaktion portioniert und direkt verwendet oder bei -20 °Celsius eingefroren. Für die RT-PCR ist es notwendig, die RNA mittels

reverser Transkriptase in DNA umzuschreiben. Der gebildete DNA-Strang ist komplementär zur Ausgangs-RNA und wird als cDNA bezeichnet.

Für die reverse Transkription (RT) wurde das Omniscript™-RT-Kit von Qiagen verwendet. Wir setzten 1 µg der isolierten RNA für die cDNA Synthese ein wobei dT16-Oligonukleotide als Primer verwendet wurden, die spezifisch an den poly(A)-Schwanz von eukaryontischen mRNAs binden.

Alle Schritte dieses Verfahrens fanden auf Eis statt. Die Reaktion erfolgte für 60 min bei 37 C da die Omniscript™-Transkriptase ein Temperaturoptimum von 37°C besitzt.

Die hier verwendete Der RT-Schritt wurde nach folgenden Pipettierschema (s. Tabelle 1) vorgenommen

Tabelle 1 RT-Pipetierschema

RNase freies Wasser	4,5 µl
10x RT Puffer	2 µl
d-NTP (5 mM)	2 µl
Oligo dT (20 pM)	1 µl
RNA-Probe (0,1 µg/µl)	10 µl
RNase Inhibitor 40 U/µl	0.25 µl
Omniscript RTase(4U/µl)	0,25 µl

Für den anschließenden PCR-Schritt wurde das Taq PCR Core Kit von Qiagen verwendet und 500 ng (photometrisch bestimmt) der synthetisierten cDNA als Template eingesetzt.

Es wurden pro Probe 5 µl der durch die RT-Reaktion erhaltenen c-DNA eingesetzt. Als Housekeeping-Gen wurde das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH) verwendet, welches ein Enzym kodiert, das in der Zelle eine lebensnotwendige Grundfunktion bei dem Elektronentransport aus dem Zytosol in die Mitochondrien der Atmungskette wahrnimmt.

Unter experimentellen Bedingungen wird das GAPDH-Gen konstant exprimiert und kann bei der Expressionskontrolle anderer Gene als quantitativer Standart dienen.

Pro PCR-Probe wurde nach folgendem Pipettierschema (s. Tabelle 2) verfahren.

Tabelle 2 Einfacher PCR-Ansatz

DNAse freies Wasser	36,75 μ l
10x PCR Puffer	5 μ l
d-NTP-Mix (10 mM)	1 μ l
c-DNA	5 μ l
Sense-Primer (20 pM)	1 μ l
Antisense-Primer (20 pM)	1 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l

Folgende Tabelle (s. Tabelle 3) zeigt die verwendeten Primersequenzen

Tabelle 3 Verwendete Primer der PCR-Analyse von eNOS, iNOS und GAPDH

Primer		Sequenz	GenBank se- quenz	Frag- mentgrö- ße
eNOS M95296	Sense: Antisense:	TTAAGAGGAGCGGCTCCCAG CACTGTGATGGCCGAGCGAA	433-452 bp 691-710 bp	288 bp
iNOS L09210	Sense: Antisense	TGCCAGATGGCAGCATCAGA TTCCAGGCCCATTCCTCCTGC	1021-1040 bp 1394-1413 bp	393 bp
GAPDH M17851	Sense: Antisense	CAACTACATGGTTTACATGTTCC GGACTGTGGTCATGAGTCCT	153-175 pb 549-568 pb	416 bp

Die Primer hatten eine Länge von 20 - 30 Basenpaaren. Bei allen verwendeten Primern war der Anteil an Purin und Pyrimidinbasen ausgeglichen. Es wurden Polypurin- und Polypyrimidinsequenzen sowie komplementäre Sequenzen an den Primerenden eines Primerpaares wegen der Möglichkeit der Primerdimerbildung vermieden.

Die PCR wurde für die eNOS- und iNOS-cDNA-Amplifikation mit 37-39 Zyklen (Denaturierung: 30 s bei 94°C, annealing: 30 s bei 72°C, Synthese: 45 s bei 72°C) mit einem abschließenden Inkubationsschritt (10 min bei 72°C) durchgeführt.

Für die GAPDH-cDNA-Amplifikation wurden 25 - 27 Zyklen (Denaturierung: 30 s bei 94°C, annealing: 30 s bei 60°C, Synthese: 30 s bei 72°C) mit einem abschließenden Inkubationsschritt (10 min bei 72°C) vorgenommen.

Aliquots jeder DNA-Amplifikation wurden elektrophoretisch für 30 min bei einer Spannung von 180 V bei 4°C in einem 1,8%-igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Die Identifikation der PCR-Produkte erfolgte unter einem UV-Transluminator durch einen Vergleich mit dem mitgeführten DNA-Längenstandard. Zur Dokumentation und Quantifizierung wurde das Gel digitalfotografisch festgehalten und die Intensität der amplifizierten DNA-Fragmente densitometrisch mittels KODAK 1D Software (Kodak, Stuttgart, Deutschland) bestimmt.

2.2.14 Untersuchung der NO-Freisetzung aus UVA-induzierten Nitritzerfall mittels Faraday- Modulation-Spektroskopie (FAMOS)

Mit der Faraday-Modulationsspektroskopie (FAMOS) kann man Radikale und Ionen nachweisen [114]. Sie ist sehr empfindlich und beruht auf dem Faraday-Effekt, die Fähigkeit eines Stoffes, die Ebene vom linear polarisierten Licht durch den Einfluss eines von außen angelegten Magnetfeldes zu drehen.

Mittels eines Quanten-Kaskaden-Lasers (QCL), der linear polarisiertes Licht in eine Gasprobenkammer ausstrahlt ($\lambda=5,2 \mu\text{m}$) [115], wurde die NO-Freisetzung aus unbestrahlten bzw. UVA-bestrahlten Nitritlösungen in An- oder Abwesenheit von Antioxidanzien gemessen..

In dem experimentellen Aufbau haben wir eine pH-gepufferte, wässrige (20 ml PBS, pH 7,4) NaNO_2 -Lösung (5 mM NO_2) in An- oder Abwesenheit von Natrium-Ascorbat, Trolox und/oder Glutathion in unterschiedlichen Konzentrationen mit UVA (74 mW) bestrahlt. Die Lösung wurde mit dem Trägergas Stickstoff durchströmt (N_2 bei 29°C und 600 ml/min), welches in die Gasprobenkammer geleitet wurde, in der hoch spezifisch das aus der Lösung freigesetzte und im Trägergas verdünnte $\text{NO}\bullet$ detektiert und quantifiziert werden konnte. Bei einer Zeitauflösung von 300 ms beträgt die Nachweisempfindlichkeit 25 ppb NO.

2.2.15 Nachweis von Trolox-Radikalen mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Mithilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie kann man Radikale durch eine resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem äußeren Magnetfeld nachweisen.

ESR-Spektren wurden mit einem Bruker ER-420 X-Band Spektrometer aufgezeichnet.

Radikale wurden bei 20°C durch kontinuierliche UV-Bestrahlung einer gepufferten (pH 7,4) wässrigen 5 mM Trolox-Lösung mit einer Kalium-Nitrit Konzentration von 25 mM in einer Quarzflusskammer erzeugt. Während der Bestrahlung wurde die Lösung langsam (10 ml/h) durch die Quarzflusskammer gepumpt. Die Aufzeichnung erfolgte unter folgenden Bedingungen: Mikrowellenfrequenz 9,47 GHz bei einer Leistung von 20 mW, Modulierungsamplitude 1G, sweep range 40G, sweep time 2000 s, Zeitkonstante 0,2 s, signal gain 5×10^6 . Die Spektren wurden mit dem WinSim-Programm simuliert [116].

2.3 Statistische Auswertung

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde ANOVA (Tukey Methode) oder alternativ der Student's t-Test (unabhängige Proben) angewandt. Wenn nicht anders erwähnt galt $p < 0,05$ als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 NO-Generierung durch UVA-induzierten Nitritzerfall bei supraphysiologischen Nitritkonzentrationen

Beim UVA-induzierten Nitritzerfall wird $\text{NO}\cdot$ aber auch Radikale wie das $\text{NO}_2\cdot$ gebildet. Daher lag es nahe mittels Einsatz von Antioxidanzien diese selektiv abzufangen, um so bei gleichzeitiger Erniedrigung der Konzentration von $\text{NO}_2\cdot$ Radikale eine höhere NO-Bildung zu erreichen.

Dazu wurde eine pH-gepufferte, wässrige (20 ml PBS, pH 7,4) NaNO_2 -Lösung (5 mM NO_2^-) mit UVA (74 mW) bestrahlt, mit dem Trägergas Stickstoff durchströmt (N_2 bei

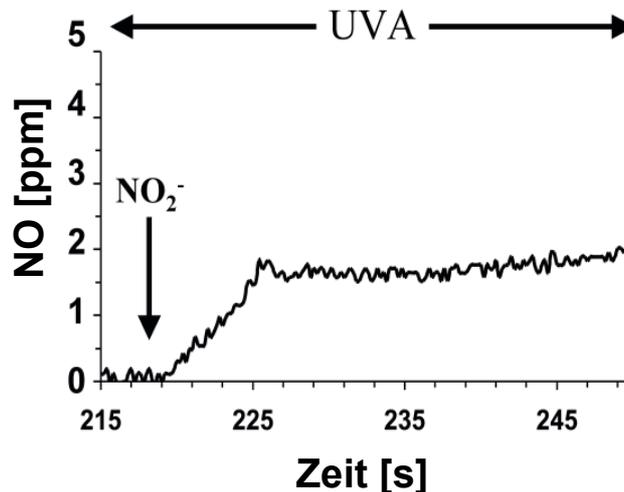


Abbildung 6 Stickstoffmonoxid-Generierung aus einer gepufferten, wässrigen Lösung (pH 7,4) bei einer Nitritkonzentration von 5 mM während UVA-Bestrahlung (74 mW). Stickstoffmonoxidkonzentration im Trägergas detektiert mit der FAMOS-Methode (ppm = parts per million)

29°C und 600 ml/min). Das aus der Lösung freigesetzte, im Trägergas verdünnte $\text{NO}\cdot$ konnte mittels der FAMOS Methode detektiert und quantifiziert werden. Als Antioxidanzien wurden als spezifischer bekannter Fänger von $\text{NO}_2\cdot$ Radikale Ascorbat (Vitamin C), Glutathion (GSH) und Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat eingesetzt [117, 118]. Die Abbildung 6 zeigt eine unter den oben genannten Bedingungen erreichte konstante NO-Generierung von $2,2\pm 0,4$ ppm in Abwesenheit von Antioxidanzien.

In Abbildung 7 erkennt man, dass die Anwesenheit ab ca. 1 mM der antioxidativ wirkenden Substanz Glutathion zu einer etwa 25-fachen Steigerung der NO-Freisetzung führt ($55,8 \pm 6,8$ ppm NO).

Der Einsatz von weiteren NO_2 -Radikal-Scavenger wie Vitamin C und Trolox, zeigte jeweils ab einer Konzentration von ca. 1 mM ebenfalls einen starken Anstieg der NO-Freisetzung (Vitamin C: $57,5 \pm 5,1$ ppm, ca. 25-fach; Trolox: $64,4 \pm 7,2$ ppm, 29-fach).

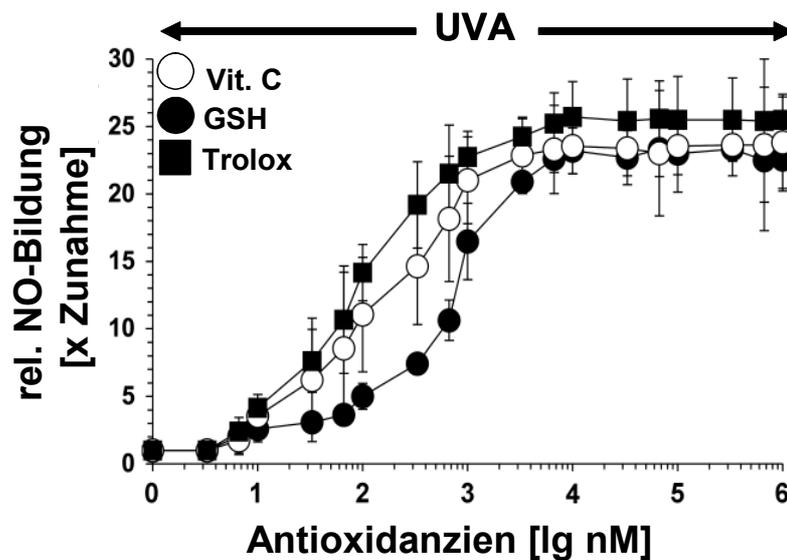


Abbildung 7 Stickstoffmonoxid-Generierung aus einer gepufferten wässrigen Lösung (pH 7,4) bei einer Nitritkonzentration von 1 mM während UVA-Bestrahlung (74 mW) mit steigenden Konzentrationen von **Trolox**, Na-Ascorbat (**Vit. C**) und Glutathion (**GSH**) (0,01 mM - 10 mM). Relative Stickstoffmonoxidkonzentration im Trägergas im Vergleich ohne Antioxidanzien. Stickstoffmonoxid-Detektion mit der FAMOS-Methode. Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Abbildung 8 zeigt, dass sich die NO-Freisetzung beim UVA-induzierten Nitritzerfall bei 5 mM Nitrit auch durch Verwendung von verschiedenen Kombinationen der genannten Antioxidanzien, in Konzentrationen bei der man bei einzelner Zugabe eine maximale NO-Freisetzung beobachtete, nicht weiter gesteigert werden konnte. (z. B. 2 mM GSH + 2 mM Vitamin C + 2 mM Trolox).

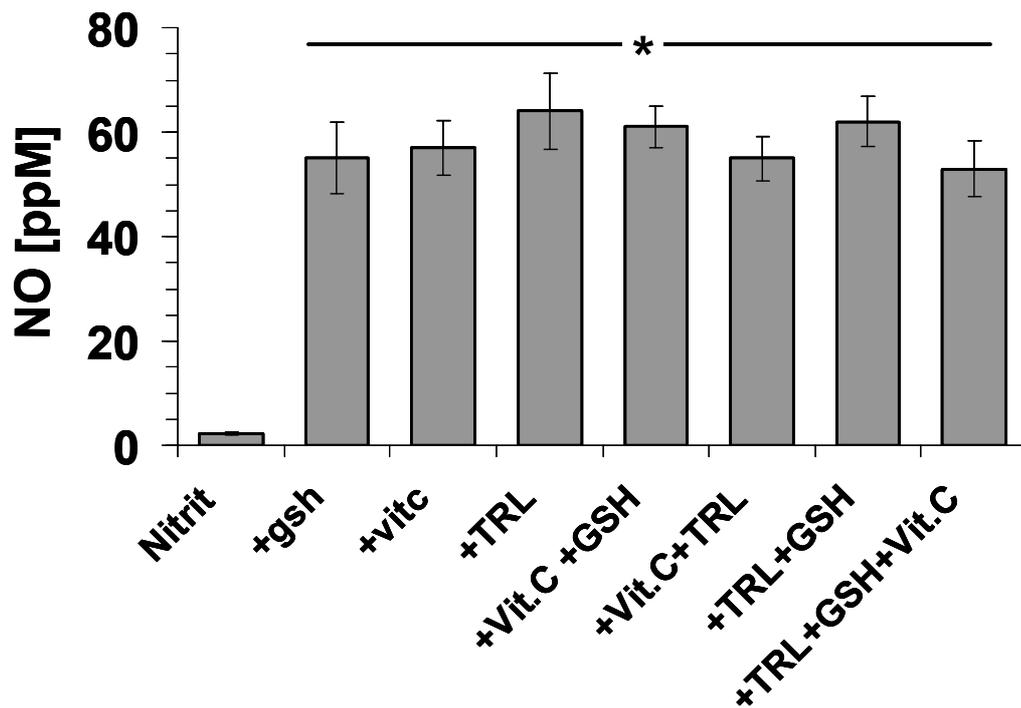


Abbildung 8 Stickstoffmonoxid-Generierung aus einer gepufferten wässrigen Lösung (pH 7,4) bei einer Nitritkonzentration von 5 mM während UVA-Bestrahlung (74 mW) mit verschiedenen Kombinationen von Trolox (TRL, 2 mM), Na-Ascorbat (Vit C, 2 mM) und Glutathion (GSH, 2 mM). Absolute Stickstoffmonoxidkonzentration im Trägergas (ppm=parts per million) mit der FAMOS-Methode. Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen; *, $p < 0.05$ zu Experimenten ohne Antioxidanzien

3.2 Einfluss einer supraphysiologischen Nitritkonzentration auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Fibroblasten

Um die Frage zu klären ob Nitrit oder Nitrat auch in humanen Hautfibroblasten durch den UVA-induzierten Zerfall als exogener NO-Donor mit Schutzfunktion wirken kann, bestrahlten wir humane Hautfibroblasten in Anwesenheit von verschiedenen Nitritkonzentrationen (0-5 mM) mit verschiedenen UVA-Dosen (0-60 J/cm²).

Die Anzahl der lebenden Zellen in den Fibroblastenkulturen (24h nach Bestrahlung) war ab einer Konzentration von 0,1 mM bei allen applizierten UVA-Dosen signifikant erniedrigt. Bei einer Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrat (5 mM) zeigten sich gegenüber der Kontrolle keine Effekte (siehe Abbildung 9).

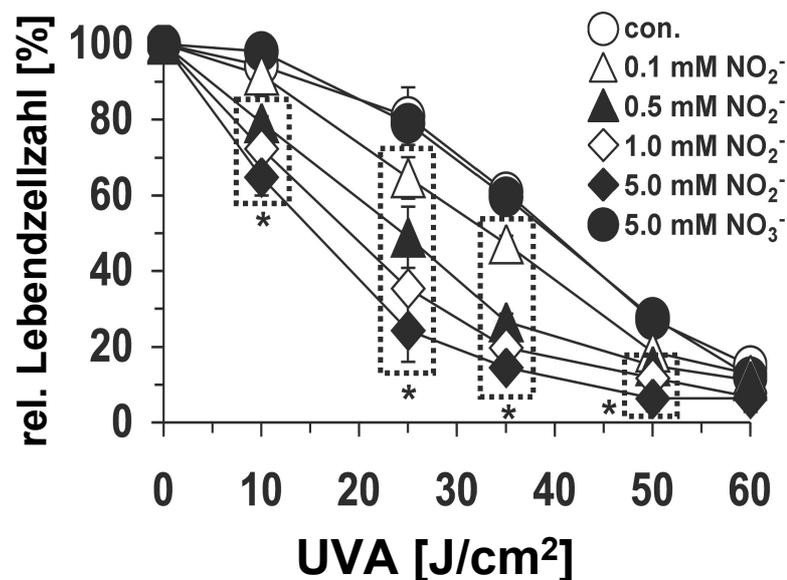


Abbildung 9 Bestimmung der UVA-Dosis abhängigen Toxizität in Fibroblastenkulturen mittels Neutralrot-Methode in Anwesenheit von verschiedenen Nitritkonzentrationen (NO₂⁻) (0,1-5 mM); bzw. Nitrat (NO₃⁻) im Bestrahlungsmedium 24 h nach Bestrahlung. Relative Lebendzellzahl ist bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen. Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von 12 unabhängigen Experimenten; *, $p < 0.001$ bezogen auf die bestrahlten Kontrollen in Abwesenheit von Nitrit

Die Abbildung 10 zeigt, dass die Anzahl der lebenden Zellen bei einer applizierten UVA-Dosis von 25 J/cm^2 linear mit dem dekadischen Logarithmus der Nitritkonzentration sank ($R^2=0,9824$).

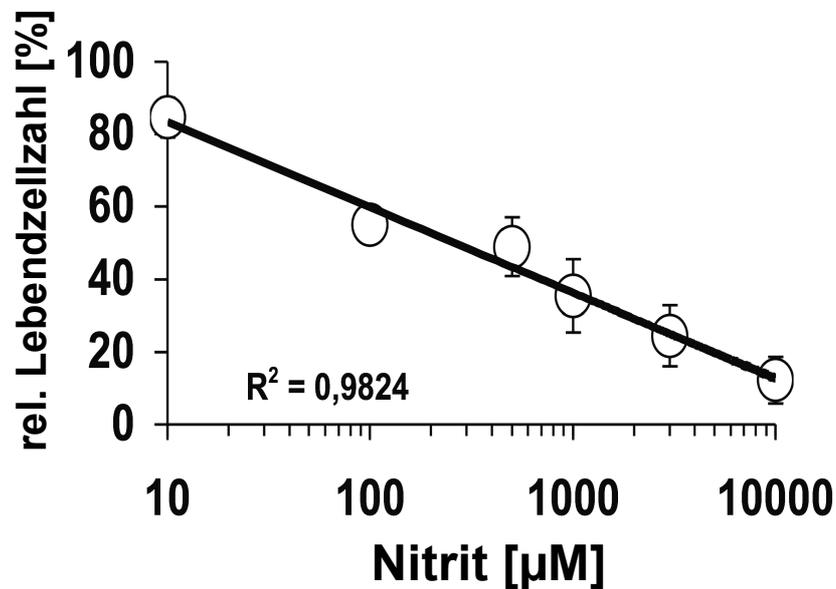


Abbildung 10 Bestimmung der von der Nitritkonzentration abhängigen Toxizität in Fibroblastenkulturen 24 h nach einer UVA-Bestrahlung mit 25 J/cm^2 mittels Neutralrot-Methode in Anwesenheit von verschiedenen Nitritkonzentrationen (0,1-10 mM) während der Bestrahlung. Lebendzellzahl ist bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen in Abwesenheit von Nitrit. Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 7 verschiedenen Experimenten; R^2 , Pearsonkorrelationskoeffizient

3.3 Einfluss einer erhöhten Nitritkonzentration auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten in Anwesenheit von Antioxidanzien

Höhere Konzentrationen von Nitrit bei UVA-Bestrahlungen zeigten in anderen Zelltypen wie Rattenendothelzellen protektive Eigenschaften, während in unseren mit Hautfibroblasten vorgenommenen Experimenten, die UVA-Toxizität verstärkt wurde. Daher nahmen wir weitere Experimente in Anwesenheit von Antioxidanzien vor, um die Bildung von $\text{NO}_2\bullet$ und andere reaktive Spezies beim UVA-induzierten Nitritzerfall zu inhibieren und, wie oben gezeigt, eine NO-Generierung zu verstärken.

Wir bestrahlten Fibroblastenkulturen mit einer UVA-Dosis von 25 J/cm^2 in Anwesenheit von 1 mM Nitrit und verschiedenen Kombinationen von 1 mM Na-Ascorbat, 1 mM Glutathion und 1 mM Trolox. Ferner verwendeten wir zusätzlich DETA/NO als endogener NO-Donor, bzw. DETA als Kontrolle. Dabei zeigte sich wie in Tabelle 4 zu sehen ist, dass nach einer UVA-Bestrahlung von 25 J/cm^2 noch $85.0 \pm 5.8\%$ der bestrahlten Fibroblasten verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle überlebt haben. Durch die Zugabe von Antioxidanzien wurde die Überlebensrate nicht signifikant beeinflusst. In Anwesenheit von 1 mM Nitrit sieht man nach Bestrahlung erhöhte Toxizität in den Zellkulturen ($43.8 \pm 3.3\%$), wobei sich die Zellzahl ohne Bestrahlung nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. In Kombination von Nitrit mit Antioxidanzien während der Bestrahlung, schützte Ascorbat signifikant gegenüber der in Anwesenheit von Nitrit beobachteten Toxizität, ($75.5 \pm 11.6\%$ Lebendzellen), während die einzelne Zugabe von Trolox ($11.6 \pm 2.4\%$) oder GSH ($8.7 \pm 3.7\%$) diesen toxischen Effekt signifikant erhöhte.

In Kombination GSH + Trolox, GSH + Ascorbat oder Trolox + Ascorbat in Anwesenheit von Nitrit zeigte sich nach UVA-Bestrahlung, wie bei Ascorbat alleine, eine signifikant erniedrigte Toxizität.

Die Zugabe von DETA/NO, aber nicht DETA, schützte die Zellkulturen signifikant vor der UVA/Nitrit, UVA/Nitrit/Trolox und UVA/Nitrit/GSH beobachteten Toxizität.

Tabelle 4 Übersicht der relativen Lebendzellzahl von humanen Hautfibroblasten

	Unbestrahlt				UVA 25 J/cm ²			
	contr.	+NO ₂ ⁻	+NO ₂ ⁻ +DETA/ NO	+NO ₂ ⁻ +DETA	contr.	+NO ₂ ⁻	+NO ₂ ⁻ +DETA/ NO	+NO ₂ ⁻ +DETA
contr.	100 ^a	99.8±4.8	89.4±7.1	92.2±3.4	85.0±5.8	43.8±3.3*	84.6±9.4 [†]	48.3±6.4
TRL	101.5±2.6	101.6±9.8	101.3±3.3	97.7±2.8	92.7±10.9	8.7±3.7 [#]	98.0±2.9 [†]	17.8±2.8
GSH	102.6±5.2	94.1±4.3	95.2±6.1	89.4±3.0	88.6±8.8	11.6±2.4 [#]	94.1±6.8 [†]	23.4±5.2
Vit C	101.3±3.5	100.8±6.5	88.8±9.1	95.5±3.1	78.4±7.4	75.5±11.‡	78.4±2.9	77.8±3.1
TRL+GSH	98.0±2.1	95.4±9.1	nt	nt	83.4±6.5	75.8±12 [§]	nt	nt
TRL+VitC	100.8±5.4	96.2±5.9	nt	nt	84.5±6.4	74.9±9.2 [‡]	nt	nt
GSH+VitC	98.8±5.6	92.2±4.6	nt	nt	78.8±4.5	72.4±10.‡	nt	nt

Übersicht der Lebendzellzahl 24 h nach UVA-Bestrahlung (25 J/cm²) in An- oder Abwesenheit von Nitrit, DETA/NO, DETA und Antioxidanzien in verschiedenen Kombinationen: +NO₂, Nitrit (1 mM); +DETA/NO (1 mM); +DETA (1 mM); **TRL**, Trolox (1 mM); **GSH**, Glutathion (1 mM); **Vit C**, Na-Ascorbat (1 mM); Zellzahlbestimmung mit Neutralrot-Assay, Angaben in Prozent relativ zur unbestrahlten Kontrolle (100%) in Abwesenheit von Additive, Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichungen aus 7-12 unabhängigen Versuchen; *, p<0,001 im Vergleich zu bestrahlten Fibroblastenkulturen in Abwesenheit von Nitrit; #, p<0,001 zu Kulturen mit gleicher Behandlung, aber in Abwesenheit von Nitrit bzw. bei Anwesenheit von Nitrit, aber in Abwesenheit der Antioxidanzien; ‡, p<0,001 zu gleichbehandelten Kulturen in Abwesenheit von Vit C; §, p<0,001 zu Kulturen die nur in Anwesenheit von Trolox oder GSH bestrahlt wurden; †, p<0,001 zu gleichbehandelten und bestrahlten Kulturen in Abwesenheit von DETA/NO; **nt**, nicht getestet

Um eine Wirksamkeit von GSH und Trolox gegenüber UVA-induzierten Toxizität in humanen Hautfibroblasten zu überprüfen und eine Anteilnahme des Nitrits im toxischen Geschehen nachzuweisen, untersuchten wir die protektiven Eigenschaften dieser Antioxidanzien gegen UVA-Strahlung in Abwesenheit von Nitrit.

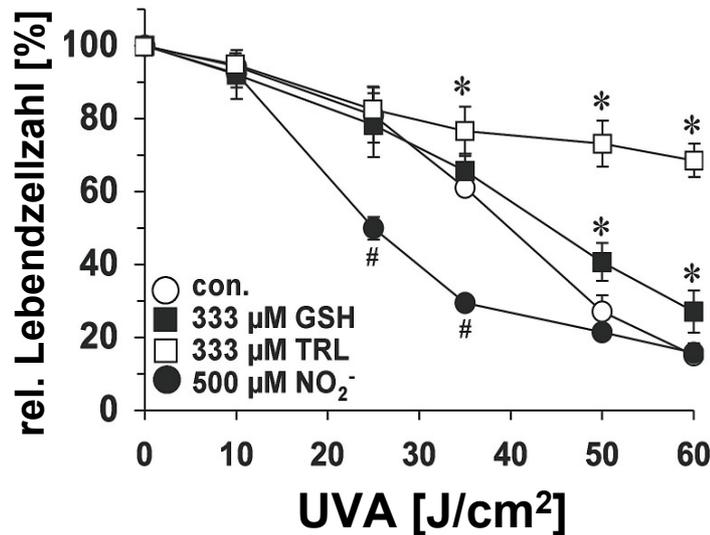


Abbildung 11 Bestimmung einer UVA-Dosis abhängigen Toxizität 24 h nach Bestrahlung in Fibroblastenkulturen mittels Neutral-Rot-Methode in Anwesenheit von Glutathion, Trolox oder Nitrit im Medium während der Bestrahlung: **con.**, Kontrolle; **GSH**, Glutathion (333 µM); **TRL**, Trolox (333 µM); **NO₂⁻**, Nitrit (500 µM); Relative Lebendzellzahl ist bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen. Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten; *, p<0.001 bezogen auf die bestrahlten Kontrollen; #, p<0.001 bezogen auf bestrahlte Kulturen in Abwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung

In Abbildung 11 erkennt man einen signifikanten Schutzeffekt gegen steigende UVA-Dosen (0-60 J/cm²) in bestrahlten Fibroblastenkulturen. Dabei zeigt Trolox in einer Konzentration von 333 µM bei der maximal applizierten UVA-Dosis von 60 J/cm² noch 76% lebende Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrollen, während in Abwesenheit von Antioxidanzien die Lebendzellzahl bei 15% betrug. GSH in einer Konzentration von 333 µM sorgte für einen schwächeren aber signifikanten Schutzeffekt, der bei der maximalen UVA-Dosis mit 30% überlebende Zellen bemerkbar machte.

Die Anwesenheit von Nitrit sorgte, wie auch in den anderen Experimenten, schon bei geringeren Dosen für eine signifikant erhöhte Toxizität in den bestrahlten Fibroblastenkulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen.

Des Weiteren wurden in Anwesenheit von Nitrit UVA-Bestrahlungen (0-60 J/cm²) mit verschiedenen GSH- und Trolox-Konzentrationen (je 0-1000 µM) vorgenommen. In

Abbildung 12 und Abbildung 13 erkennt man bei allen UVA-Dosen, Trolox- und GSH-konzentrationsabhängige Toxizitäten in den bestrahlten Kulturen, die ab einer Konzentration von 333 μM GSH bzw. 33 μM Trolox signifikant wurden.

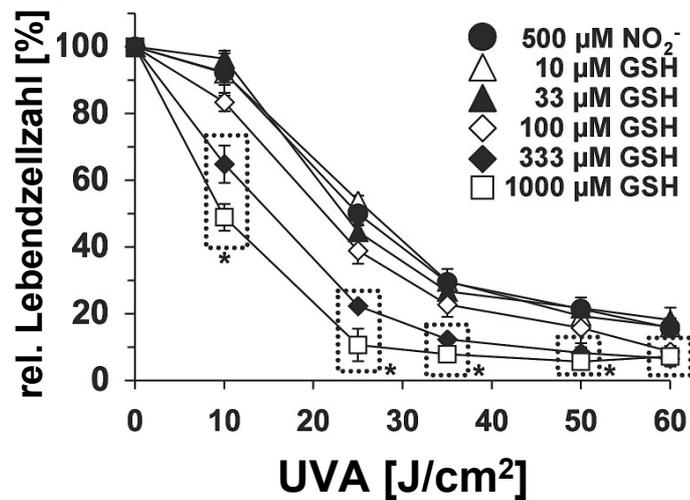


Abbildung 13 Bestimmung der UVA-Dosis abhängigen Toxizität in Fibroblastenkulturen bei Anwesenheit von Nitrit (500 μM) und verschiedenen Konzentrationen an Glutathion (10 μM -1000 μM) mittels Neutralrot-Methode: NO_2^- . Fibroblasten unter normalen Bedingungen kultiviert und in Anwesenheit von 500 μM Nitrit im Medium bestrahlt; **GSH**, normal kultiviert, Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (500 μM) und Glutathion. Relative Lebendzellzahl ist bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen. Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten; *, $p < 0.001$ bezogen auf die jeweils bestrahlten Kontrollen in Abwesenheit von Glutathion.

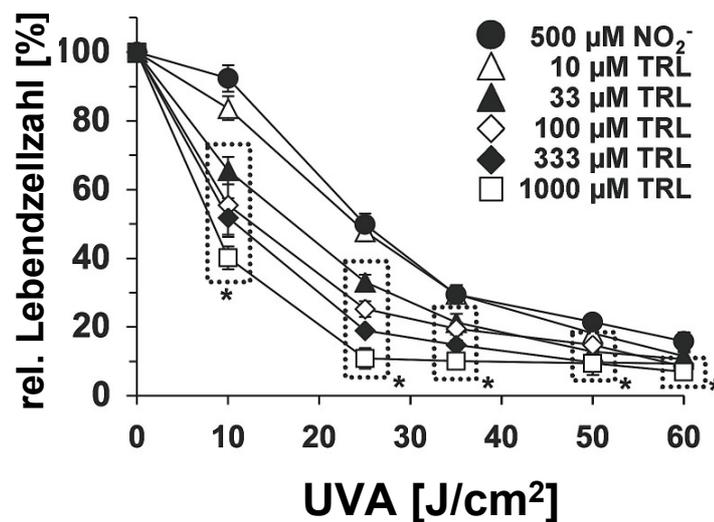


Abbildung 12 Bestimmung der UVA-Dosis abhängigen Toxizität in Fibroblastenkulturen bei Anwesenheit von Nitrit (500 μM) und verschiedenen Konzentrationen an Trolox (10 μM -1000 μM) mittels Neutralrot-Methode: NO_2^- . Fibroblasten unter normalen Bedingungen kultiviert und in Anwesenheit von 500 μM Nitrit im Medium bestrahlt; **TRL**, normal kultiviert, Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (500 μM) und Trolox. Relative Lebendzellzahl ist bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen. Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten; *, $p < 0.001$ bezogen auf die jeweils bestrahlten Fibroblasten in Abwesenheit von Trolox

3.4 UVA-induzierte Lipidperoxidation in Anwesenheit von Nitrit und Antioxidanzen

Wir bestimmten zusätzlich zur Toxizität die Lipidperoxidation als Parameter für das Ausmaß des induzierten Zellschadens. In Abbildung 14 erkennt man, dass die Lipidperoxidation nach UVA-Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit gegenüber der bestrahlten Kontrolle signifikant erhöht war. Dieser Effekt wurde in Anwesenheit von Nitrit mit GSH bzw. Trolox weiter signifikant verstärkt, so dass das Ausmaß der Lipidperoxidati-

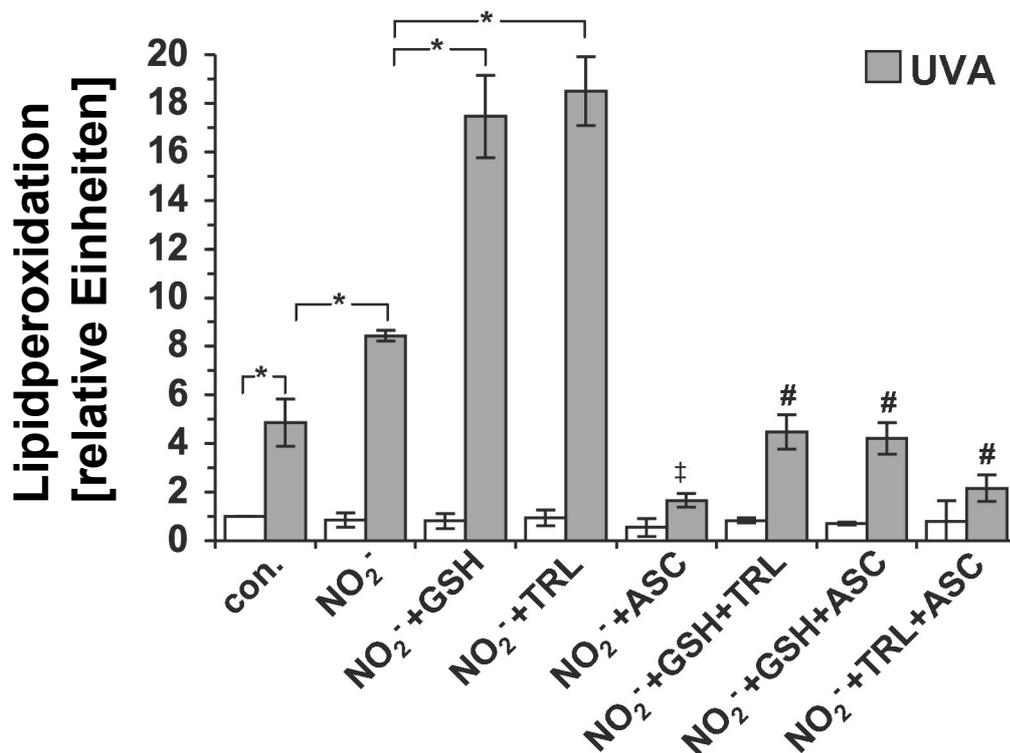


Abbildung 14 Untersuchung des Einflusses von Trolox, Glutathion und Ascorbat in Anwesenheit von Nitrit auf die Lipidperoxidation in UVA-bestrahlten (graue Balken, 25 J/cm²) und unbestrahlten (weiße Balken) Fibroblastenkulturen; Messung der Lipidperoxidation 24 h nach Bestrahlung mittels „Lipid hydroperoxidase assay“ kit; **con.**, Kontrolle unter normalen Bedingungen kultivierte und bestrahlte Fibroblasten; **NO₂⁻**, bestrahlt mit 1 mM Nitrit im Bestrahlungsmedium; **NO₂⁻+GSH**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Glutathion (1 mM); **NO₂⁻+TRL**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Trolox (1 mM); **NO₂⁻+ASC**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Na-Ascorbat (Vitamin C, 1 mM); **NO₂⁻+GSH+TRL**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM), Glutathion (1 mM) und Trolox (1 mM); **NO₂⁻+GSH+ASC**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM), Glutathion (1 mM) und Ascorbat (1 mM); **NO₂⁻+TRL+ASC**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM), Trolox (1 mM) und Ascorbat (1 mM); Werte repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten; *, p<0.001 zur jeweiligen unbestrahlten Probe, bzw. bestrahlten Kulturen mit Nitrit; ‡, p<0.001 zu UVA/Nitrit-behandelten Kulturen; #, p<0.001 zu den jeweiligen UVA-bestrahlten Kulturen mit jeweils nur **GSH** bzw. **TRL**

on sich gegenüber der bestrahlten und mit nitritbehandelten Zellen bei beiden mehr als verdoppelt hatte. Ascorbat kann diese verstärkenden Effekte signifikant wieder senken. Auch in Kombination Nitrit/Trolox/GSH ist die Lipidperoxidation drastisch gesenkt. Das Ausmaß der Lipidperoxidation befindet sich wieder auf dem Niveau der bestrahlten Kontrolle und ist signifikant geringer als die der Zellen, die nur in Anwesenheit von Nitrit bestrahlt wurden.

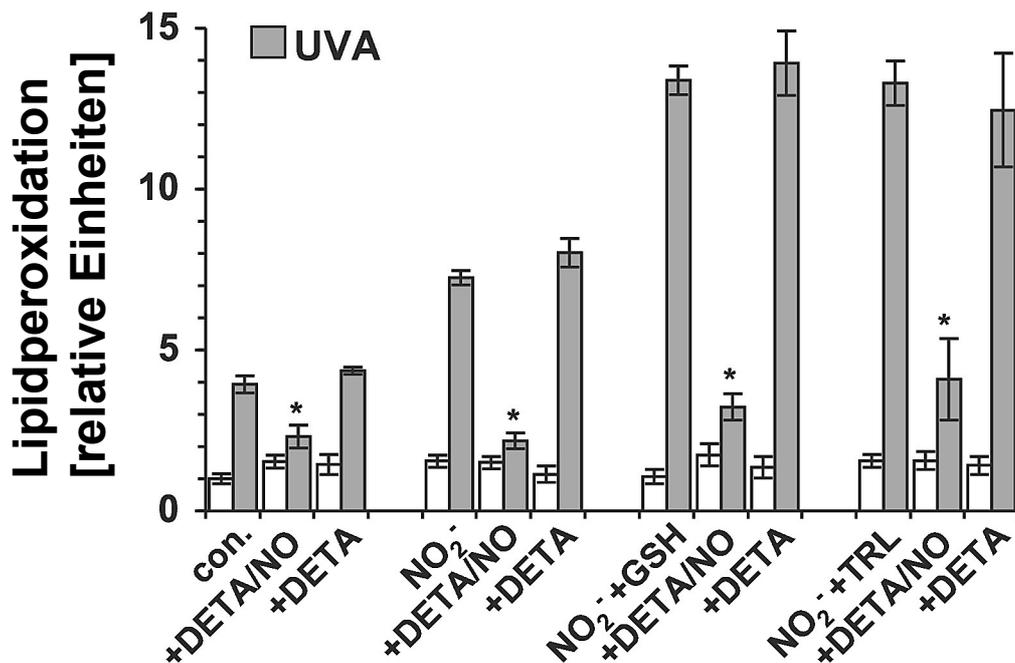


Abbildung 15 Einfluss des NO-Donors DETA/NO bzw. DETA auf die Lipidperoxidation ohne (weiße Balken) oder nach UVA-Bestrahlung (25 J/cm^2 , graue Balken) in Fibroblastenkulturen bei Anwesenheit von Nitrit, Trolox oder Glutathion im Bestrahlungsmedium; Messung der Lipidperoxidation mittels „Lipid hydroperoxidase assay“ kit, **con.**, Kontrolle, Fibroblasten die unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt wurden; **NO₂⁻**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Nitrit im Bestrahlungsmedium; **NO₂⁻+GSH**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Nitrit und 1 mM Glutathion **NO₂⁻+TRL**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Nitrit und 1 mM Trolox; **+DETA/NO**, bei Bestrahlung zusätzlich mit 1 mM DETA/NO im Bestrahlungsmedium; **+DETA**, Bestrahlung zusätzlich mit 1 mM DETA, der Muttersubstanz von DETA/NO im Bestrahlungsmedium; Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten; *, $p < 0.001$ zur den jeweiligen bestrahlten Kulturen ohne DETA/NO im Medium während der Bestrahlung

Die Zugabe von DETA/NO als NO-Donor während der Bestrahlung schützte effektiv bestrahlten Zellen vor Lipidperoxidation (siehe Abbildung 15). Auch die erhöhte UVA-induzierte Lipidperoxidation bei Fibroblastenkulturen, die mit Nitrit, Nitrit/GSH und Trolox/GSH behandelt waren, konnte signifikant gesenkt werden.

Um eine Aussage über die Art des Zelltodes in bestrahlten Fibroblastenkulturen in Anwesenheit von Nitrit mit Antioxidanzien zu treffen wurden zusätzlich in weiteren Experimenten mittels Höchst-33342/Propidiumjodid die Apoptose- bzw. Nekrose-Ereignisse bestimmt

In Abbildung 16 A erkennt man eine deutliche signifikante Steigerung in der Anzahl der apoptotischen Zellen in Anwesenheit von Nitrit gegenüber der Kontrolle, währenddessen die Apoptoserate in Anwesenheit von Nitrit mit Antioxidanzien wie Trolox,

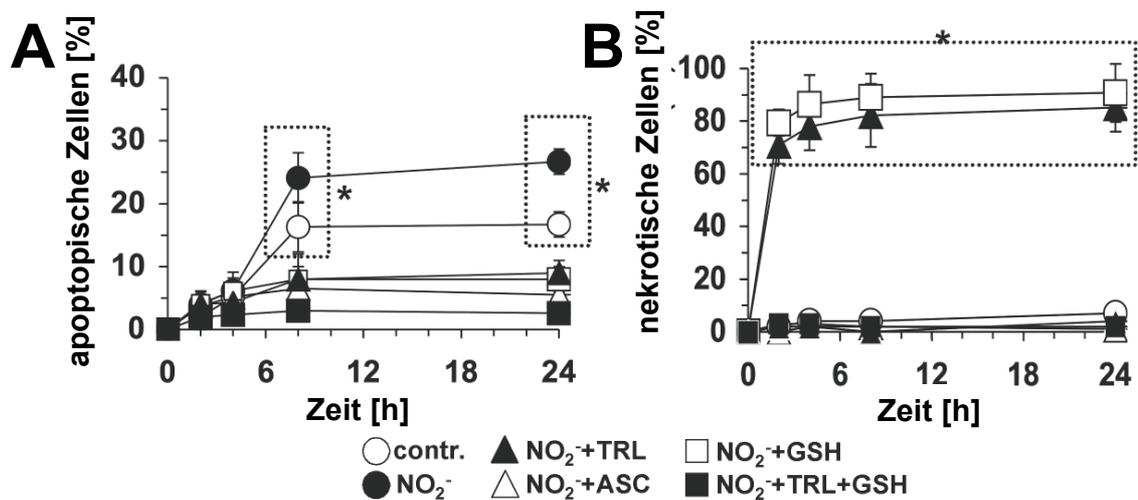


Abbildung 16 Bestimmung der UVA-induzierten (25 J/cm^2) apoptotischen (A) und nekrotischen Ereignisse (B) in unterschiedlich behandelten Fibroblastenkulturen nach verschiedenen Zeiträumen (0-24 h) mittels Propidiumjodid / Hoechst 33342-Färbung mit fluoreszenzmikroskopischer Auswertung: **contr.**, Kontrolle, Fibroblastenkulturen unter normalen Bedingungen kultiviert und ohne Additive im Medium bestrahlt; **NO₂⁻**, bestrahlt mit 1 mM Nitrit im Bestrahlungsmedium; **NO₂⁻+TRL**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Trolox (1 mM); **NO₂⁻+GSH**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Glutathion (1 mM); **NO₂⁻+ASC**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM) und Na-Ascorbat (Vitamin C, 1 mM); **NO₂⁻+TRL+GSH**, bestrahlt in Anwesenheit von Nitrit (1 mM), Glutathion (1 mM) und Trolox (1 mM); Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 5 unabhängigen Experimenten.; *, $p < 0.001$ bezogen in A auf Fibroblasten in Anwesenheit von Antioxidanzien, bzw. in B auf Kontrolle

Ascorbat oder Glutathion niedriger als die Kontrolle war. Bei der Anzahl der nekrotischen Ereignisse in den bestrahlten Kulturen zeigte sich ein anderes Bild. Während in der Kontrolle und in Anwesenheit von Nitrit kaum nekrotische Ereignisse zu sehen sind, führte die Anwesenheit von Glutathion/Nitrit oder Trolox/Nitrit in den bestrahlten Proben zu einer signifikanten Steigerung (80-90%) des nekrotischen Zelltodes (siehe Abbildung 16).

3.5 UVA/Nitrit-induzierte Trolox-Radikalbildung

Für die Aufklärung des vermehrten Zelltodes bzw. Lipidperoxidation wollten wir mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) feststellen, ob eine UVA-Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit zu einer vermehrten Bildung von Trolox-Radikalen führen kann. In Abbildung 17 A sieht man das ESR-Spektrum des Trolox-Radikals, wie es bei einer UVA-Bestrahlung einer 5 mM Trolox-Lösung entsteht. In Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung ist dieses Signal deutlich verstärkt (siehe Abbildung 17 B), was auf eine Erhöhung der Trolox-Radikalbildung zurückzuführen war.

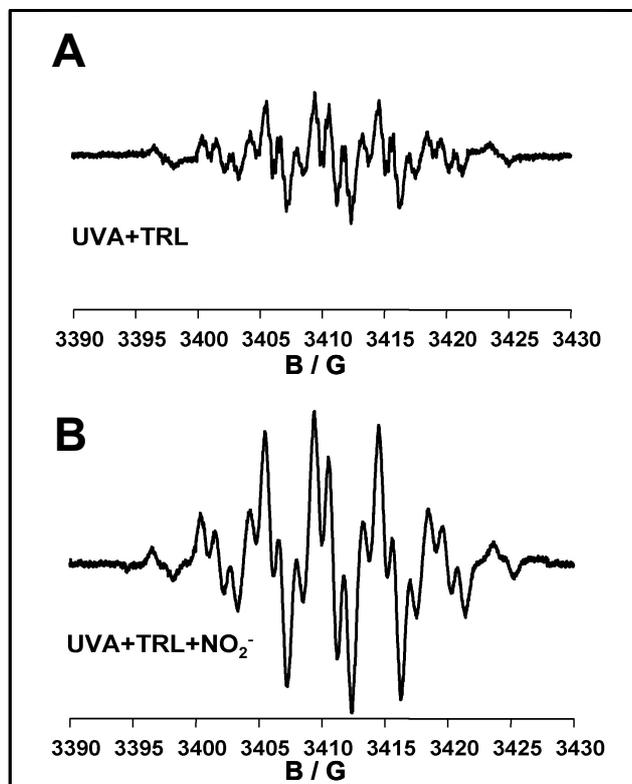


Abbildung 17 Detektierung der Trolox-Radikalbildung bei UVA-Bestrahlung in An- und Abwesenheit von Nitrit mittels ESR (Elektronenresonanz-Spektroskopie): **A** ESR Spektrum einer gepufferten (pH 7,4) 5 mM Trolox-Lösung unter UVA Bestrahlung; **B** ESR Spektrum einer gepufferten (pH 7,4) 5 mM Trolox-Lösung unter UVA Bestrahlung in Anwesenheit von 25 mM Kalium-Nitrit

3.6 Intrazelluläre Superoxid-Radikal-Anion-Bildung in humanen Hautfibroblasten nach UVA-Bestrahlung

Für die Untersuchung der intrazellulären Superoxid-Radikal-Anion-Bildung bestrahlten wir Zellen mit einer UVA-Dosis von 25 J/cm^2 in An- oder Abwesenheit verschiedener Antioxidanzien wie Glutathion, Trolox und Ascorbat in Kombinationen mit Nitrit oder Nitrat. Unmittelbar nach Bestrahlung wurde durch Verwendung des Superoxid-Radikal-Anion-spezifischen MitoSOX-Red Farbstoffes, die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

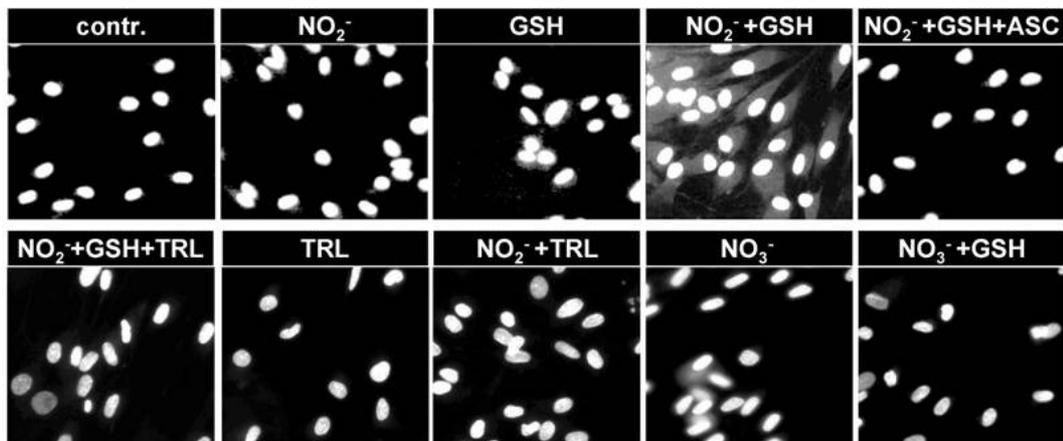


Abbildung 18 Visualisierung der intrazellulären Superoxid-Radikal-Anion-Bildung nach UVA-Bestrahlung (25 J/cm^2) von humanen Hautfibroblasten mittels MitoSOX Red-Reagenz: **contr.**, bestrahlte, unbehandelte Zellen; **NO₂⁻**, Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Natrium-Nitrit; **GSH**, Bestrahlung in Anwesenheit von Glutathion (1 mM); **NO₂⁻+GSH**, Bestrahlung in Anwesenheit von Natrium-Nitrit und Glutathion (je 1 mM); **NO₂⁻+GSH+ASC**, Bestrahlung in Anwesenheit von Natrium-Nitrit, Glutathion und Na-Ascorbat (je 1 mM), **NO₂⁻+GSH+TRL**, Bestrahlung in Anwesenheit von Natrium-Nitrit, Glutathion und Trolox (je 1 mM); **TRL**, Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Trolox; **NO₂⁻+TRL**, Bestrahlung in Anwesenheit von Na-Nitrit und Trolox (je 1 mM); **NO₃⁻**, Bestrahlung in Anwesenheit von 5 mM Nitrat; **NO₃⁻+GSH**, Bestrahlung in Anwesenheit von 5 mM Nitrat und 1 mM Glutathion; Bilder zeigen ein repräsentatives Ergebnis aus 3 Experimenten

Nur die gleichzeitige Anwesenheit von Nitrit und Glutathion während der UVA-Bestrahlung führte zu einer sichtbaren Fluoreszenz des Zytoplasmas. Durch zusätzliche Zugabe von Trolox und Ascorbat verschwand dieses Fluoreszenzsignal.

3.7 UVA-induzierte intrazelluläre NO-Generierung in humanen Hautfibroblasten

Für den Nachweis einer UVA-induzierten, intrazellulären NO-Generierung kultivierten wir Fibroblasten für die Untersuchung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in Abwesenheit von Nitrit und Nitrat (siehe Methodenteil). Mittels des verwendeten Farbstoffes DAF-2 kann man eine intrazelluläre NO-Generierung nachweisen.

In Abbildung 19 erkennt man mit steigender UVA-Dosis bzw. steigender Zyklenzahl eine stärker werdende Fluoreszenz in den bestrahlten Fibroblasten, während die unbestrahlten Zellen im Sichtfeld kein Signal zeigten. Die induzierte Fluoreszenz begann um die Nuclei der bestrahlten Zellen, wie man bei einer applizierten UVA-Dosis von 0,3

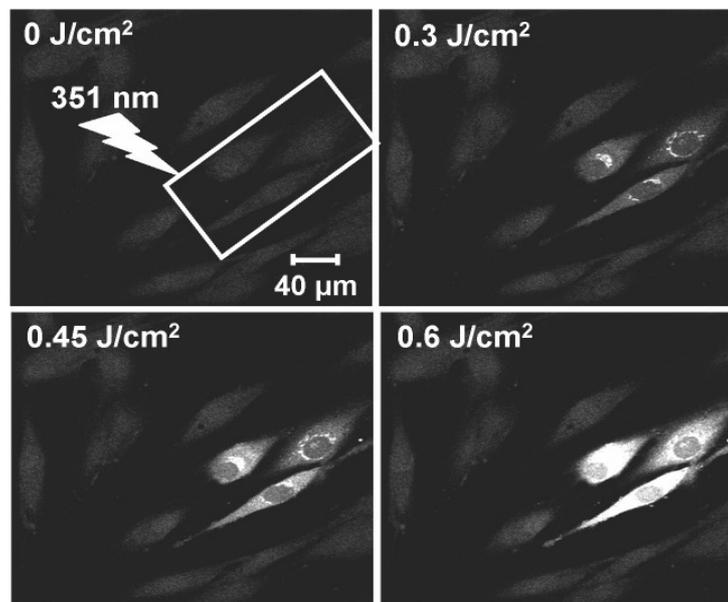


Abbildung 19 Humane Hautfibroblasten, die mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2 in HEPES-Puffer mittels eines UVA-Laser (351 nm) bestrahlt wurden, zeigten in der Untersuchung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie bei steigender UVA-Dosis ein zunehmendes Fluoreszenzsignal im bestrahlten Bereich; unbestrahlte Zellen innerhalb des Sichtfeldes dienten als interne Kontrolle.

J/cm^2 sehen kann. Bei $0,45 \text{ J/cm}^2$ breitete sich die Fluoreszenz im Zytosol aus, wobei sich der intensivste fluoreszierende Bereich direkt um die Nuclei befand. Bei $0,6 \text{ J/cm}^2$ war die Fluoreszenz gleichmäßig in der Zelle verteilt. Nur die Nuclei blieben von der Fluoreszenz ausgespart.

Der typische Verlauf der Fluoreszenzintensität in den bestrahlten Zellen, wie er in Abbildung 19 zu sehen ist, lässt sich auch quantitativ darstellen. Sie ist in eine Anlaufphase (Start-up 1-10 Zyklus), eine lineare Phase (10-20 Zyklen) und in eine Sättigungsphase (>20 Zyklen) unterteilen (siehe Abbildung 20), wobei mit jedem Zyklus die applizierte UVA-Dosis steigt.

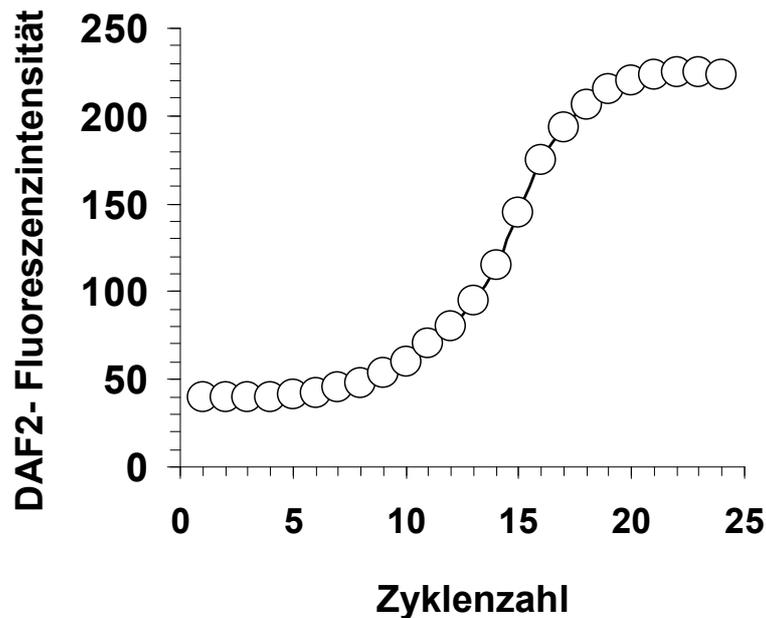


Abbildung 20 Humane Hautfibroblasten, die mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2 in HEPES-Puffer mittels eines UVA- LASER (351 nm) bestrahlt wurden, zeigten bei der Auswertung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie, bei der das Fluoreszenzsignal des bestrahlten Bereiches detektiert wurde, mit steigenden Zykluszahlen, d.h. steigender UVA-Dosis einen Intensitätskurvenverlauf mit Anlaufphase, linearer Phase und Sättigungsphase. Diese Sättigung ist durch die maximale Fluoreszenz-Detektorkapazität bedingt.

Bei punktuell bestrahlten Fibroblasten begann die Fluoreszenz lokal in dem bestrahlten Bereich und breitete sich mit steigender Zyklenzahl bzw. applizierter UVA-Dosis gleichmäßig von dem bestrahlten Bereich über die ganze Zelle aus (Abbildung 21).

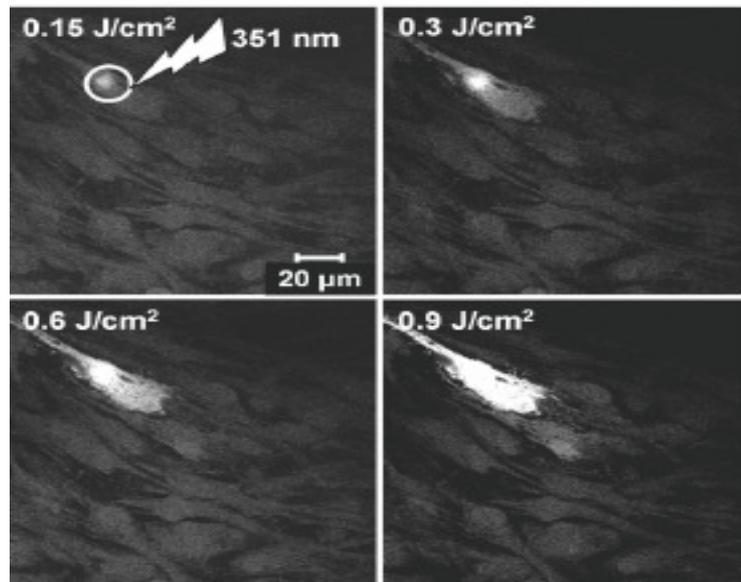


Abbildung 21 Humane Hautfibroblasten in HEPES-Puffer mit NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2 zeigten in der Untersuchung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie bei partieller Bestrahlung eines Fibroblastens mit einem UVA- Laser (351 nm), ein lokales Fluoreszenzsignal innerhalb des bestrahlten Areal. Mit steigender UVA-Dosis bzw. Zyklenzahl breitete sich das Signal auch außerhalb des bestrahlten Areals aus. Bei einer Dosis von 0,9 J/cm² war die Fluoreszenz in der ganzen Zelle gleichmäßig verteilt

In Abbildung 22 ist ersichtlich, dass die punktuelle Bestrahlung in der direkten Nähe eines Fibroblastens in einem nitrithaltigen Bestrahlungsmediums (10µM) eine verzögerte, zeit- und distanzabhängige DAF-2 Fluoreszenz innerhalb der Zelle induzierte.

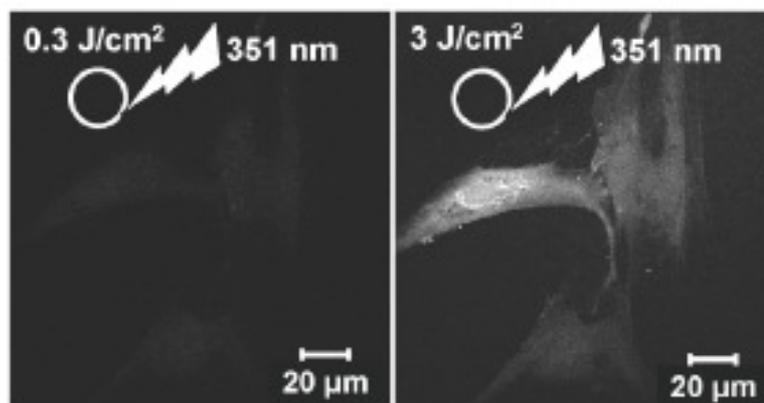


Abbildung 22 Humane Hautfibroblasten, die mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAF-2 in HEPES-Puffer mit Nitrit in einer Konzentration von 10 µM zeigten in der Untersuchung mittels Laser-Scanning-Mikroskopie bei partieller Bestrahlung eines Bereiches in direkter Nähe eines Fibroblastens mit einem UVA- LASER (351 nm) ein zeit- und distanzabhängiges Fluoreszenzsignal innerhalb der Zelle.

3.8 Aktivität der eNOS und iNOS in humanen Hautfibroblasten

Für die Theorie, dass die beobachtete UVA-induzierte intrazelluläre NO-Generierung durch den Zerfall von Derivaten aus NO• enzymatischer Herkunft bedingt ist, überprüfen wir zunächst ob humane Hautfibroblasten die ecNOS, bzw. iNOS exprimieren.

Mittels PCR bestimmten wir die mRNA-Expression der ecNOS und iNOS in humanen Hautfibroblasten, welche alternativ mit den Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ behandelt wurden. In Abbildung 23 erkennt man eine ecNOS Expression bei den zytokinbehandelten wie auch den nicht-behandelten Fibroblastenkulturen. Eine iNOS-Expression ist nur bei den zytokinbehandelten Fibroblastenkulturen vorhanden.

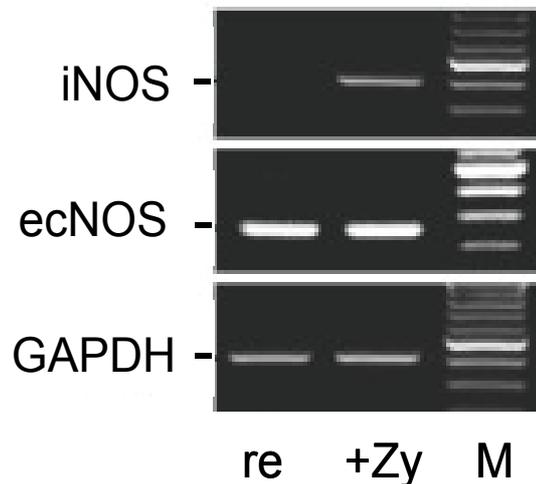


Abbildung 23 Eine PCR-Analyse der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (ecNOS) und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zeigte in Fibroblasten, die mit proinflammatorischen Zytokinen (+Zy = + IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , je 500 U/ml) 24 h inkubiert wurden, eine deutliche Expression der iNOS. Ohne Zytokinbehandlung (re) war kein Signal der iNOS zu erkennen. Die ecNOS wurde in Ab- und Anwesenheit von Zytokinen exprimiert. Die Expression von GAPDH als House-keeping Gen diente als interne Kontrolle und war in allen Proben gleichmäßig vorhanden.

Des Weiteren untersuchten wir ob eine Inhibition der Stickstoffmonoxid-Synthasen-Expression möglich wäre. Eine wirksame Inhibition würde auf den Nitritgehalt der Zellkulturüberstände Einfluss nehmen, da die Konzentration von Nitrit als Oxidationsprodukt des NO• ein guter Marker für die NOS-Aktivitäten der Fibroblasten ist und sich unter Verwendung der Chemolumineszenz-Detektion quantifizieren lässt.

Eine Inhibition der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) mit L-NMMA und L-NIO resultierte bei zytokinaktivierten und nicht-aktivierten Fibroblasten zu einer signifikant

niedrigeren Nitritkonzentration in den Zellkulturüberständen. In den Überständen der nicht-aktivierten Fibroblastenkulturen sank durch die NOS-Inhibition die Nitritkonzentration von $0,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ auf $0,1 \pm 0,08 \mu\text{M}$ während bei den zytokinenaktivierten Zellkulturen die Nitritkonzentration von $1,8 \pm 0,35 \mu\text{M}$ auf $0,3 \pm 0,09 \mu\text{M}$ fiel. (Siehe Abbildung 24)

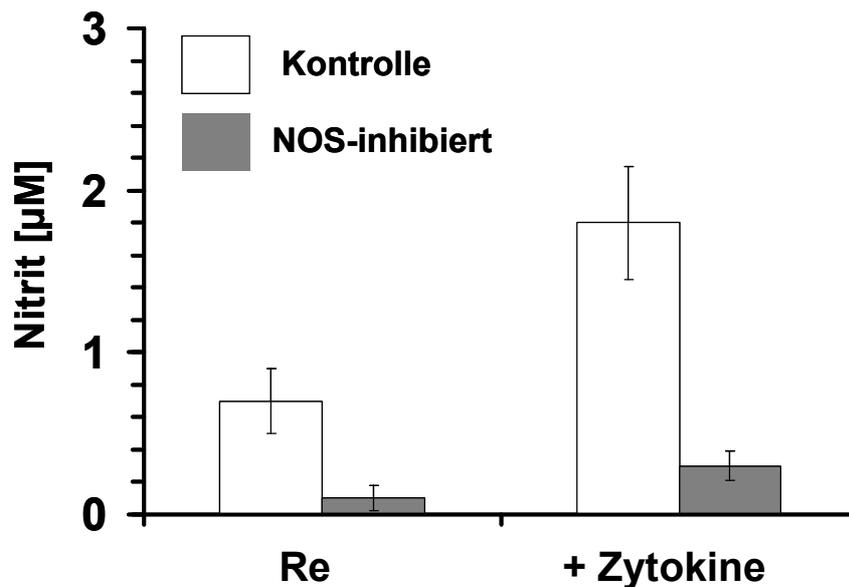


Abbildung 24 Mittels Chemolumineszenz-Detektion wurde im Kulturüberstand von unbehandelten (RE) oder mit zytokinaktivierten Fibroblasten, (24 h, mit IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , je 500 U/ml,) in Abwesenheit von NOS-Inhibitoren (weiße Balken) die Nitritkonzentration bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen in Anwesenheit der Stickstoffmonoxid-Synthasen Inhibitoren N^g-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA; 1 mM) und N-iminoethyl-L-ornithin (L-NIO; 0.5 mM) inkubiert (graue Balken). Balken präsentieren den Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten

3.9 Analyse der Konzentrationen an intrazellulären NO-Derivaten in humane Hautfibroblasten

Um den Einfluss einer NOS-Inhibition auf die intrazellulären Konzentration an photosensiblen NO-Derivaten von humanen Hautfibroblasten zu bestimmen, untersuchten wir mittels Immunzytochemie das Vorkommen an intrazellulären S-Nitrosoverbindungen. Zusätzlich zu der NOS-Inhibition wollten wir die Entstehung von Nitrosoverbindungen (RNO) durch Anwesenheit von Kupfer und Ascorbat im Medium gezielt verhindern. Durch eine 24 h Behandlung mit den Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ nach Absetzung der NOS-Inhibitoren vor der Färbung, versuchten wir die NOS-inhibitionsbedingte Verminderung der S-Nitrosoverbindungen durch eine Induktion der NO-Generierung mittels der iNOS in den Fibroblasten umzukehren.

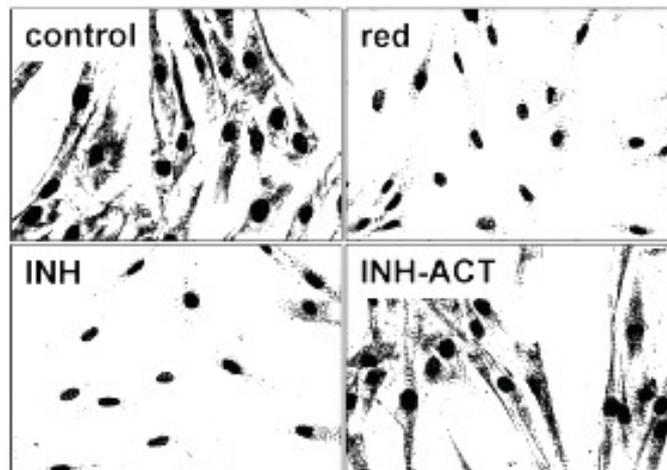


Abbildung 25 Immunzytochemische Analyse von S-Nitroso-Thiolen in Fibroblasten mittels anti-S-Nitroso-Antikörper. Unbehandelte Zellen, die unter normalen Kulturbedingungen gehalten wurden, dienten als Kontrolle (**control**). Die Inkubation der Zellen für 7 Tage mit 10 μM Cu_2SO_4 + 500 μM Na-Ascorbat (**red**) und Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren (**INH**) N^g-monomethyl-L-Arginin (NMMA; 1 mM) und N-iminoethyl-L-ornithin (L-NIO; 0,5 mM) führte zu schwächeren Färbungen des Zytoplasmas. Eine Nachbehandlung der NOS-inhibierten Fibroblasten mit Zytokinen (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , je 500 U/ml) für drei Tage führte zu einer starken Färbung des Zytoplasmas der Zellen (**INH-ACT**).

Nach erfolgter Antikörperfärbung erkennt man eine gleichmäßige Anfärbung des Zytoplasmas in den Kontrollzellen. Zellen, die mit NOS-Inhibitoren oder Kupfer/Ascorbat behandelt wurden, zeigten gegenüber den Kontrollzellen eine deutlich geringe Anfärbung des Zytoplasmas. NOS-inhibierten Zellen, die anschließend mit den proinflammatorischen Zytokinen behandelt wurden, waren von der Färbungsintensität des Zytoplasmas nicht mehr von den Kontrollzellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 25).

Die genaue Quantifizierung der intrazellulären Konzentrationen von Nitrit- und Nitroverbindungen der Fibroblastenkulturen erfolgte durch Messung der Zell-Homogenisate mit der Chemolumineszenz-Detektions-Methode. Gleichzeitig wurden die Proteinkonzentrationen der Homogenisate bestimmt und für die Normalisierung der Proben verwendet. Wie auch bei den Versuchen der Immunzytochemie versuchten wir über eine anschließende Aktivierung der iNOS mittels Zytokinbehandlung (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) in Abwesenheit der NOS-Inhibitoren, die Konzentration an intrazellulären Nitrit und Nitroverbindungen in den inhibierten Fibroblasten zu erhöhen oder wiederherzustellen. Durch Inkubation mit Kupfer und Ascorbat erhofften wir eine selektive Erniedrigung der intrazellulären RNO-Konzentration.

Des Weiteren wurde eine Inkubation der Fibroblastenkulturen mit NOS-Inhibitoren, Kupfer und Ascorbat vorgenommen. Zusätzlich wurden NOS-inhibierte Zellen mit der physiologischen Menge Nitrits (10 μ M) bzw. Nitrat (100 μ M) inkubiert.

In unbehandelten Kontrollkulturen betrug die Nitritmenge/mg Protein $4,5 \pm 1,2$ nmol/mg und die RNO-Menge/mg Protein $0,9 \pm 0,1$ nmol/mg (Abbildung 26).

Bei den mit Cu²⁺/Ascorbat behandelten Zellkulturen erkennt man eine signifikante Abnahme der RNO-Menge auf $0,3 \pm 0,2$ nmol/mg Protein gegenüber den unbehandelten Kontrollkulturen. Der Nitritgehalt zeigte in diesen Proben keine signifikante Veränderung ($4,0 \pm 1,9$ nmol/mg).

Die mit NOS-Inhibitoren und zusätzlich mit Cu²⁺/Ascorbat-behandelten Zellen verzeichneten eine signifikante Abnahme in der Nitrit-, wie auch RNO-Konzentration, gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die Nitritmenge pro mg Protein sank bei beiden auf $0,8 \pm 0,7$ nmol/mg bzw. $0,9 \pm 0,6$ nmol/mg. Die RNO-Menge pro mg Protein nahm bei den NOS-inhibierten Kulturen auf $0,1 \pm 0,09$ nmol/mg, und bei den zusätzlich mit Cu²⁺/Ascorbat-inkubierten auf $0,2 \pm 0,13$ nmol/mg ab.

Die NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen, die mit Nitrat inkubiert wurden, zeigten mit einer intrazellulären Nitritmenge/mg Protein von 1,6 nmol/mg und einer RNO-Menge/mg Protein von 0,15 nmol/mg keinen signifikanten Unterschied zu den NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen.

Eine Inkubation der NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen mit 10 μ M Nitrit führte zu einem signifikanten Anstieg der Nitritmenge/mg Protein (3,5 nmol/mg) und RNO-

Menge/mg Protein (0,7 nmol/mg) gegenüber den NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen

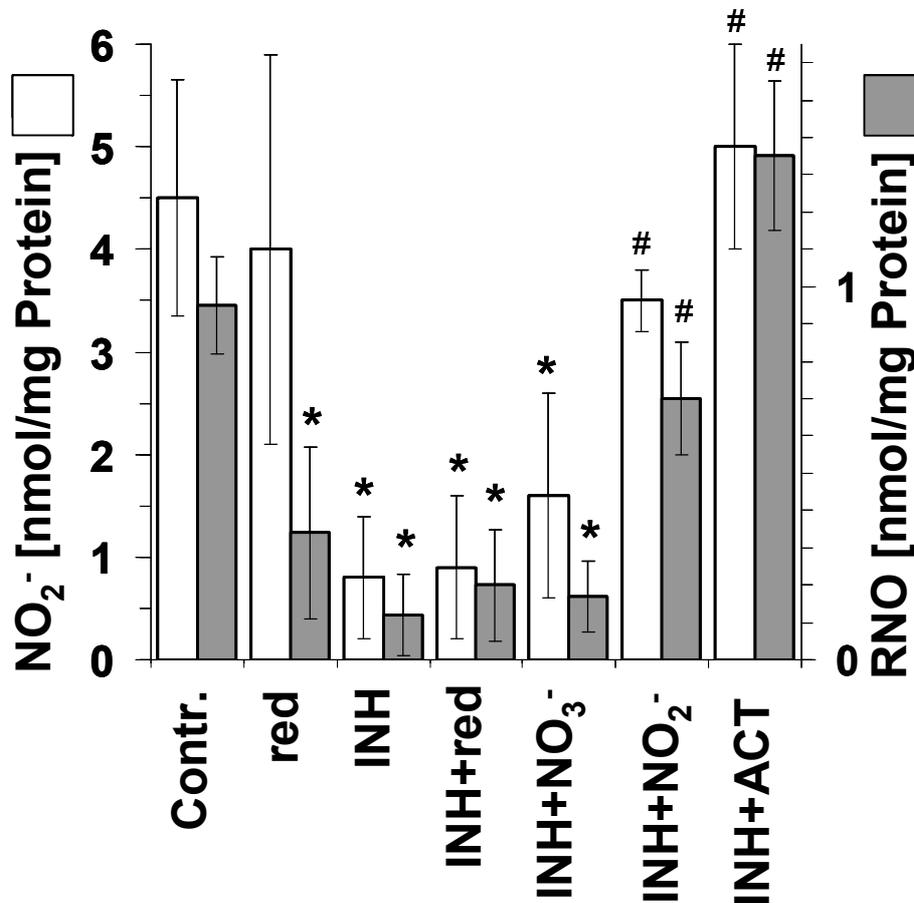


Abbildung 26 Detektion von Nitrit (weiße Balken) und Nitrosverbindungen (graue Balken) in Homogenisaten aus humanen Hautfibroblasten mittels Chemolumineszenz-Detektion: **Contr.**, unbehandelte Fibroblastenkulturen; **red**, 7 d behandelt mit CuSO₄ (10 µM) + Na-Ascorbat (500 µM); **INH**, 7 d behandelt mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM); **INH+red** 7d inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) und CuSO₄ (10 µM) + Na-Ascorbat (500 µM); **INH+NO₃⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) in Anwesenheit von Nitrat im Medium (100µM); **INH+NO₂⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) in Anwesenheit von Nitrit (10 µM) im Medium; **INH+ACT**, 7d inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) mit anschließender Zugabe von den Zytokinen IL-1β, TNF-α und IFN-γ (500 U/ml); Balken präsentieren den Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten; *, p<0,05 zur Kontrolle; #, p<0,05 zu NOS-inhibierte Fibroblastenkulturen

Die Behandlung mit den Zytokinen IL-1β, TNF-α und IFN-γ resultierte bei den NOS-inhibierten Fibroblasten zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an Nitrit bzw. RNO pro mg Protein gegenüber den NOS-inhibierten Zellen. Die Nitritmenge/mg Protein war mit 5 nmol/mg und die RNO-Menge/mg Protein mit 1,25 nmol/mg signifikant höher als

in den unbehandelten NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen aber auch 10% bzw. 25% höher als bei den unbehandelten Kontrollen.

3.10 UVA-induzierte, intrazelluläre NO-Generierung bei unterschiedlichen intrazellulären Nitrit und RNO-Konzentrationen

Um die Frage zu klären, wie die unterschiedlichen intrazellulären Nitrit bzw. RNO-Konzentrationen sich auf die UVA-induzierte, intrazelluläre NO-Generierung auswirken können, untersuchten wir mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

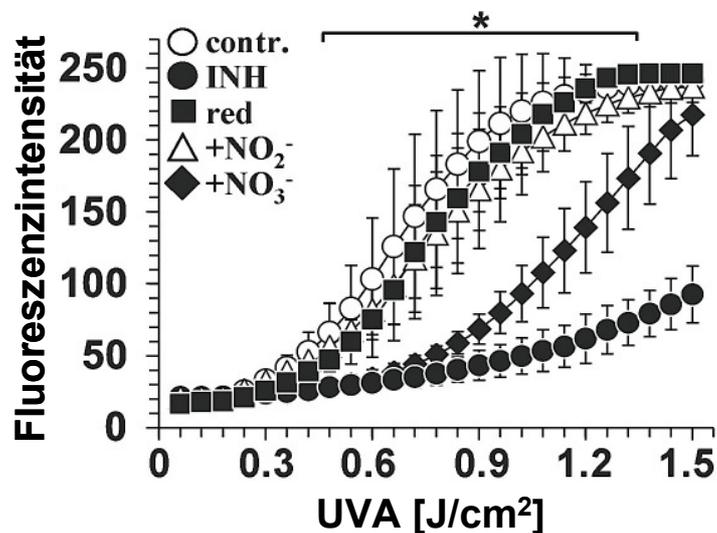


Abbildung 27 Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie, bei der ein Detektor die Stärke des Fluoreszenzsignals aufnahm, untersuchten wir humane Hautfibroblasten, die mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2DA in HEPES-Puffer mittels eines UVA-Lasers (351 nm) bestrahlt wurden. Die verwendeten Fibroblasten wurden vorher unter folgenden Bedingungen kultiviert: **contr.**, Unter normalen Bedingungen; **red**, 7 d behandelt mit CuSO_4 (10 μM) + Na-Ascorbat (500 μM); **INH**, 7 d behandelt mit Stickstoffmonoxid-Synthase Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM); **+NO₂⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) in Anwesenheit von Nitrit (10 μM) im Medium; **+NO₃⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM) in Anwesenheit von Nitrat im Medium (100 μM); Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus 5-9 unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$ INH und +NO₃⁻ zur Kontrolle

Einzelne Fibroblasten wurden mit dem 351 nm UVA-Laser bestrahlt und die NO-abhängige DAF-2-Fluoreszenz detektiert und aufgezeichnet.

Es zeigte sich ein signifikanten Unterschied zwischen dem Verlauf der NO-abhängige DAF-2 Fluoreszenzintensität der Kontroll- und den NOS-inhibierten Fibroblasten (Abbildung 27). Die Kontrollzellen erreichten die maximale detektierbare Fluoreszenz-

stärke (220 ILU) ab 1 J/cm^2 während die NOS-inhibierten Zellen selbst nach $1,5 \text{ J/cm}^2$ nicht mehr als 75 ILU betrug. Die mit Cu^{2+} /Ascorbat behandelten Zellen, die durch ihre Behandlung gegenüber den unbehandelten Zellen eine geringere intrazelluläre RNO-Konzentration aber eine normale Nitritkonzentration besaßen, zeigten keine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollzellen.

Die mit Nitrit ($10 \text{ }\mu\text{M}$) für 24 h kultivierten NOS-inhibierten Fibroblasten, unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle, während die mit Nitrat ($100 \text{ }\mu\text{M}$, 24 h) kultivierten NOS-inhibierten Zellen signifikant unter der Kontrolle, aber nach einer UVA-Dosis von $1,5 \text{ J/cm}^2$ mit einer Fluoreszenzintensität von 200 ILU oberhalb der NOS-inhibierten Zellen lagen.

3.11 Einfluss der intrazellulären Konzentration von NO-Derivate auf UVA-induzierten Zelltod und Lipidperoxidation

Für die Charakterisierung des Einflusses einer erniedrigten Konzentration von intrazellulären NO-Derivate (NOD) auf UVA-induzierten Zelltod, Lipidperoxidation und Modus des Zelltodes, bestrahlten wir unbehandelte und mit NOS-inhibierte Fibroblastenkulturen mit UVA (0-60 J/cm²). Zusätzlich wurden NOS-inhibierte Fibroblastenkulturen, die 24 h mit Nitrit (10 µM) und Nitrat (100 µM) inkubiert waren, bestrahlt. Um einen direkten Einfluss von NO• nachzuweisen, behandelten wir die Fibroblastenkulturen mit dem selektiven NO-Fänger cPTIO (40 µM). Mit der Neutralrot-Methode wurde 24 h nach Bestrahlung die Lebendzellzahl bestimmt.

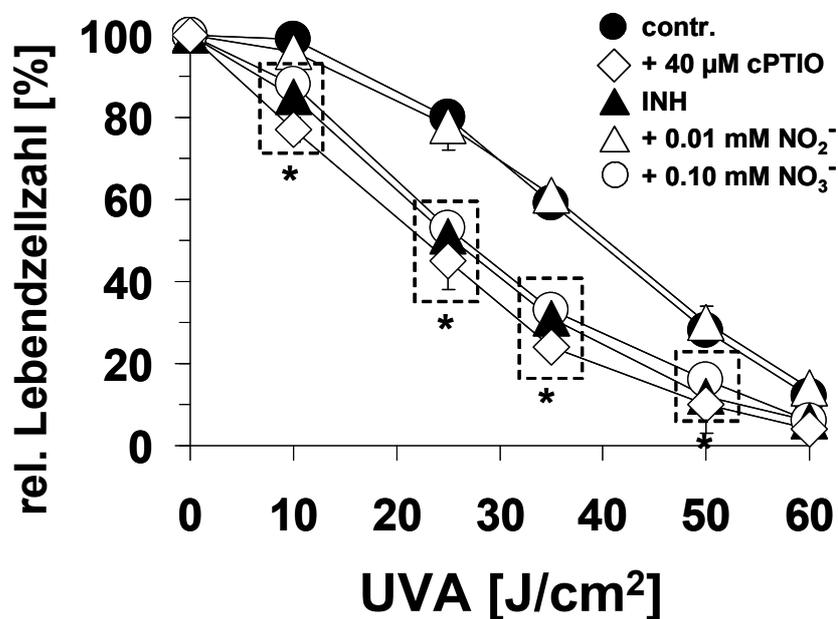


Abbildung 28 Bestimmung der UVA-Dosis abhängigen Toxizität in Fibroblastenkulturen mittels Neutralrot-Methode: **contr.**, Kontrolle, d.h. unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt; +40 µM cPTIO unter normalen Bedingungen kultiviert, Bestrahlung erfolgte mit 15 minütiger Vorinkubation und in Anwesenheit des Stickstoffmonoxid-Scavenger cPTIO (40 µM); **INH**, 7 d behandelt mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung unter normalen Bedingungen; + **0.01mM NO₂⁻**, 7 d inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (10 µM); + **0.10 NO₃⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrat im Medium (100 µM); gezeigte Werte sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten; relative Lebendzellzahl in Prozent im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; *p<0,05 im Vergleich zu unbehandelten Fibroblastenkulturen (**contr.**)

UVA-Bestrahlung führt dosisabhängig in den unbehandelten Kontrollkulturen zu vermehrtem Zelltod (Abbildung 28). Eine halbmaximale Toxizität erzielte man mit einer Dosis von ungefähr 40 J/cm^2 . Die Bestrahlung der NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen zeigte eine signifikant erhöhte Toxizität, bei der die halbmaximale Toxizität bereits mit 25 J/cm^2 erreicht wurde. Wurden diese Kulturen vor der Bestrahlung für 24 h mit Nitrit ($10 \mu\text{M}$) inkubiert, konnte man keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der UVA-induzierten Toxizität zu den bestrahlten Kontrollkulturen feststellen. Durch eine Nitratinkubation der NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen zeigte sich dieser schützende Effekt nicht. Die Anwesenheit von cPTIO bei der UVA-Bestrahlung von unbehandelten Fibroblastenkulturen resultierte in einer signifikant erhöhten Toxizität gegenüber den unbehandelten Kontrollkulturen. Bei einer UVA-Dosis von 25 J/cm^2 unterschied sich das Ausmaß dieser Toxizität nicht von den bestrahlten NOS-inhibierten Zellkulturen.

Das Ausmaß einer UVA-induzierten Lipidperoxidation in Fibroblastenkulturen zeigt Abbildung 29. Bei einer UVA-Dosis von 25 J/cm zeigten die bestrahlten, unbehandelten

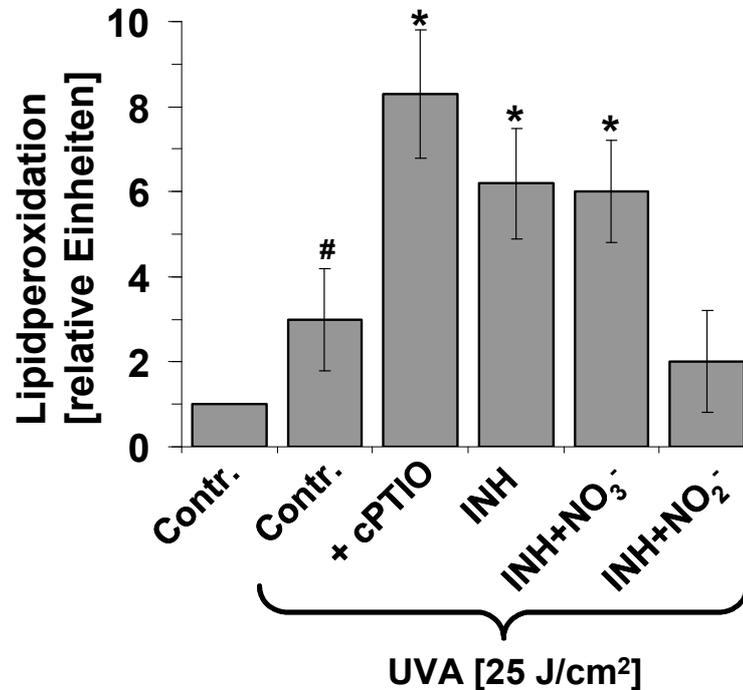


Abbildung 29 Messung der Lipidperoxidation in humanen Hautfibroblasten bei unterschiedlichen Kulturbedingungen nach UVA-Bestrahlung (25 J/cm²) mittels „Lipid hydroperoxidase assay“ kit: **contr.**, Kontrolle, d.h. unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt; **cPTIO** unter normalen Bedingungen kultiviert, Bestrahlung erfolgte mit 15-minütiger Vorinkubation und in Anwesenheit des Stickstoffmonoxid-Scavenger cPTIO (40 µM); **INH**, 7 d behandelt mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung unter normalen Bedingungen; **INH+NO₃⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrat (100 µM); **INH+NO₂⁻**, 7 d inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (10 µM) ; #p<0,05 zur unbestrahlten Kontrolle; *p< 0,05 zur bestrahlten Kontrolle

Zellen eine dreifache Erhöhung der gemessenen Lipidperoxidation gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Durch die Anwesenheit von cPTIO konnte mit UVA-Bestrahlung eine etwa achtfache Erhöhung der Lipidperoxidation gegenüber der unbestrahlten Kontrolle gesehen werden und war somit auch signifikant höher als die der bestrahlten Kontrolle. Man erkennt eine etwa 6-fache Erhöhung der Lipidperoxidation bei Zellkulturen die mit NOS-Inhibitoren inkubiert wurden gegenüber der bestrahlten Kontrolle. Die Anwesenheit von Nitrat bei NOS-inhibierten Zellen resultierte ebenfalls in einer 6-fachen Erhöhung der Lipidperoxidation, während die Anwesenheit von physiologischen Mengen Nitrits (10 µM) bei NOS-inhibierten Zellen die UVA-induzierte Lipidperoxida-

tion auf das Niveau der bestrahlten Kontrolle senken konnte. Die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Ereignisse in den Fibroblastenkulturen zeigt Abbildung 30. In den bestrahlten Kontrollkulturen war der Anteil der Apoptose mit 22,5% gegenüber der Nekrose mit 3% überwiegend vorgekommen. In den Zellkulturen, die mit cPTIO, NOS-Inhibitoren oder NOS-Inhibitoren/Nitrat behandelt wurden, zeigten nach UVA-Bestrahlung signifikant mehr Nekrosen (33-45%), während der Anteil der Apoptosen mit etwa 7% geringer war als bei der bestrahlten Kontrolle.

Die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung in den NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen resultierte wieder in einen Wechsel der Art des Zelltodes, so dass der Anteil der Apoptose gegenüber zur Nekrose überwoog und sich nicht signifikant von den bestrahlten Kontrollzellen unterschied.

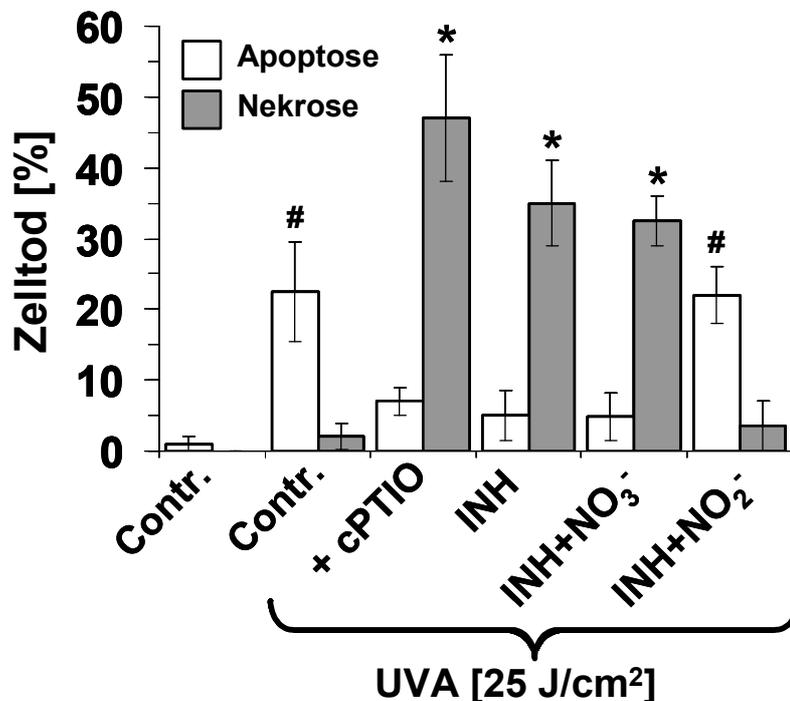


Abbildung 30 Bestimmung des Ausmaßes des Zelltodes via Apoptose und Nekrose in verschieden behandelten Fibroblastenkulturen nach einer Bestrahlung mit einer UVA-Dosis von 25 J/cm² mittels Propidiumjodid/Höchst 33342 Färbung: **contr.**, Kontrolle, d.h. unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt; **cPTIO** unter normalen Bedingungen kultiviert, Bestrahlung erfolgte mit 15-minütiger Vorinkubation und in Anwesenheit des Stickstoffmonoxid-Scavenger cPTIO (40 µM); **INH**, 7 d behandelt mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung unter normalen Bedingungen; **INH+NO₃⁻**, inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrat (100 µM); **INH+NO₂⁻**, 7 d inkubiert mit NOS-Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (10 µM); #, p<0,05 zur unbestrahlten Kontrolle (Apoptose); *, p<0,05 zur bestrahlten Kontrolle (Nekrose), Balken entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen aus 5 unabhängigen Experimenten

3.12 Einfluss von Stickstoffmonoxid und Vitamin C auf UVA-induzierten Zelltod und Lipidperoxidation

Für eine weitere Charakterisierung des Einfluss von NO• bzw. intrazellulär generierten NO• aus photolabilen NO-Derivaten und Ascorbat wurde das Ausmaß der intrazellulären NO-Bildung, des UVA-induzierten Zelltodes und Lipidperoxidation in Anwesenheit von 1 mM Ascorbinsäure (Vitamin C) oder nach exogener Applikation 1 mM des NO-Donor DETA/NO oder DETA, der NO-freien Muttersubstanz, während der Bestrahlung bei Kontroll- und NOS-inhibierten Fibroblastenkulturen untersucht.

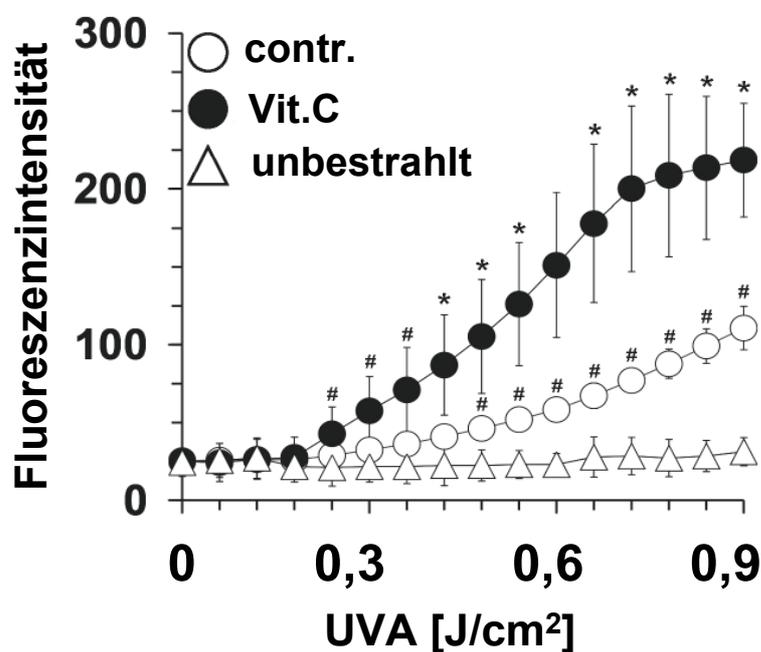


Abbildung 31 Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie, bei der ein Detektor die Stärke des Fluoreszenzsignals aufnahm, untersuchten wir humane Hautfibroblasten, die mit dem NO-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes DAF-2DA in HEPES-Puffer mittels eines UVA-Laser (351 nm) bestrahlt wurden. Die verwendeten Fibroblasten wurden vorher unter folgenden Bedingungen kultiviert: **contr.**, Unter normalen Bedingungen, bestrahlt; **Vit.C**, kultiviert unter normalen Bedingungen, bestrahlt in Anwesenheit von 1 mM Ascorbat (Vitamin C); **unbestrahlt**, kultiviert unter normalen Bedingungen, Fluoreszenzdetektion ohne UVA-Bestrahlung; Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus 5 unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$ Vit C zu **contr.**; # $p < 0,05$ **contr.** zu **unbestrahlt**

Die Anwesenheit von Vitamin C führte innerhalb der Zellen zu einem signifikanten Anstieg der DAF-2-Fluoreszenzintensität bei steigenden UVA-Dosen im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollen (siehe Abbildung 31). Bei fehlender UVA- Bestrahlung zeigt die DAF-2 Fluoreszenzintensität mit der Zeit keinen signifikanten Zuwachs.

24 h nach einer UVA-Bestrahlung (25 J/cm^2) wurden in Fibroblastenkulturen der Grad an Lipidperoxidation und Toxizität bestimmt.

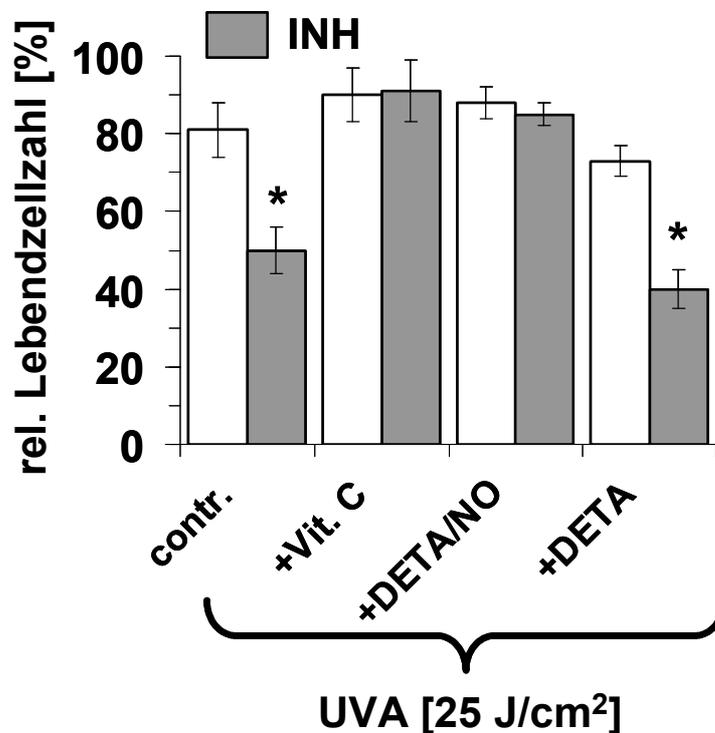


Abbildung 32 Untersuchung des Einflusses des NO-Donors DETA/NO und Ascorbat auf die UVA-induzierte Toxizität bei einer Dosis von 25 J/cm^2 in normalen Fibroblastenkulturen (weiße Balken) und Fibroblasten, die durch Inhibition der Stickstoffmonoxid-Synthasen eine verringerte intrazelluläre Konzentration an photolabile NO-Derivate hatten (graue Balken). Zellzahlbestimmung mittels der Neutralrot-Methode; **contr.**, Fibroblasten die unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt wurden; **Vit.C**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Na-Ascorbat im Medium; **DETA/NO**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM DETA/NO; **DETA**, Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM DETA, der Muttersubstanz von DETA/NO; **INH**, 7d kultiviert mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Balken repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichungen aus 8 unabhängigen Experimenten; *, $p < 0,05$ zur bestrahlten Kontrolle

In Abbildung 32 erkennt man, dass die Toxizität bei einer UVA-Dosis von 25 J/cm^2 in der unbehandelten Kontrollen 20% und in den NOS-inhibierten Kulturen etwa 50% beträgt. In Anwesenheit von $\text{NO}\cdot$ und Vitamin C betrug die UVA-induzierte Toxizität in der Kontroll- wie auch der NOS-inhibierten Kulturen ohne signifikante Unterschiede untereinander 10-15%. Die in Anwesenheit von DETA bestrahlten Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen.

Die Anwesenheit von DETA-NO oder Ascorbat während der Bestrahlung führte ebenfalls zu einer signifikanten Erniedrigung des Ausmaßes der Lipidperoxidation in NOS-inhibierten Zellen gegenüber den bestrahlten NOS-inhibierten Fibroblasten ohne Additive (Abbildung 33). Die Anwesenheit von DETA während der UVA-Bestrahlung brachte in den NOS-inhibierten Fibroblasten keinen signifikanten Unterschied.

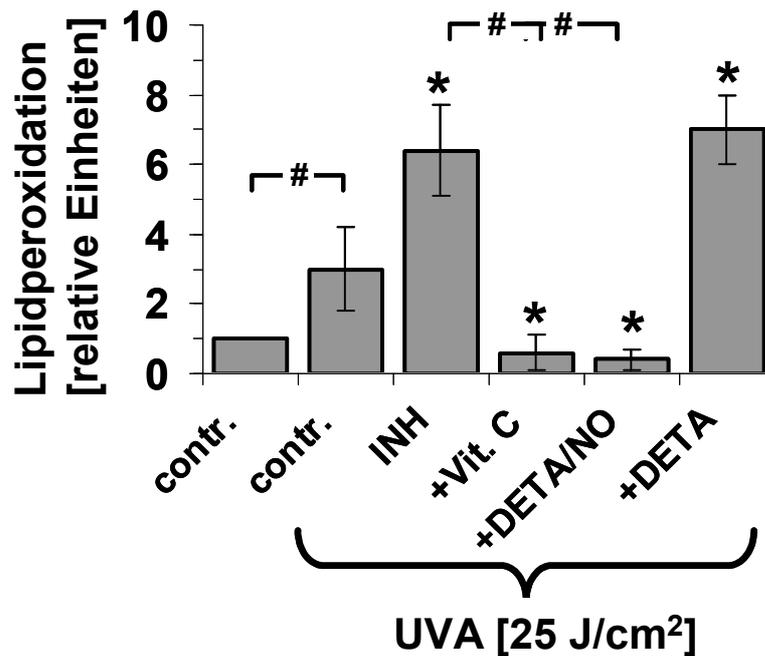


Abbildung 33 Untersuchung des Einflusses des NO-Donors DETA/NO und Ascorbat auf die UVA-induzierte Lipidperoxidation bei einer Dosis von 25 J/cm² in Fibroblastenkulturen; Messung der Lipidperoxidation mittels „Lipid hydroperoxidase assay“ kit; **contr.**, Fibroblasten die unter normalen Bedingungen kultiviert und bestrahlt wurden; **VitC**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM Na-Ascorbat im Medium; **DETA/NO**, bei Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM DETA/NO; **DETA**, Bestrahlung in Anwesenheit von 1 mM DETA, der Muttersubstanz von DETA/NO; **INH**, 7 d kultiviert mit Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) Inhibitoren L-NMMA (1 mM) und L-NIO (0,5 mM), Bestrahlung unter normalen Bedingungen; Balken repräsentieren den Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten; #, p < 0,05 zur unbestrahlten Kontrolle, *, p < 0,05 zur bestrahlten Kontrolle, #, p < 0,05 zu **INH**

4 Diskussion

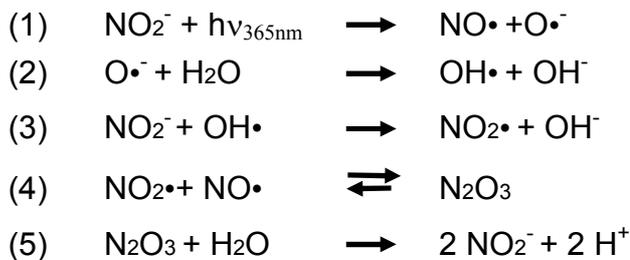
Stickstoffmonoxid (NO) spielt bei vielen lokalen Effekten der Haut, insbesondere nach UV-Exposition wie auch in der Hautphysiologie eine wichtige regulierende Rolle [119, 120]. Der Fokus der Forschung lag bisher auf der Untersuchung der UV-induzierten NO-Bildung durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), insbesondere der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) sowie dem Einfluss exogen zugesetzter NO-Donoren. Dabei konnte auch schützende und antioxidative Wirkung von NO• in der menschlichen Haut gezeigt werden [50, 52, 121].

Unter dem Gesichtspunkt der Photoaktivität der natürlich vorkommenden NO-Derivaten wurden bisher S-Nitrosoverbindungen und Nitrit eine hohe Photoaktivität zugesprochen, d.h. ein potentieller UV-induzierten Zerfall unter gleichzeitiger nicht-enzymatischer NO-Generierung [122]. Im Folgenden wird der Mechanismus des UVA-induzierte Nitritzerfalls weiter charakterisiert und dessen Beeinflussung durch Antioxidanzien zur Verbesserung der NO-Ausbeute diskutiert. Des Weiteren wird der mögliche Einsatz von Nitrit mit und ohne Antioxidanzien als schützendes NO-Donorsystem betrachtet und die Auswirkungen auf humane Hautfibroblasten erläutert.

Schließlich wird die physiologische Rolle des UVA-induzierten Zerfalls von natürlich vorkommender NO-Derivate, insbesondere Nitrit beleuchtet und dessen Funktion im Rahmen des Schutzes gegenüber UVA-induzierten Zellschäden diskutiert

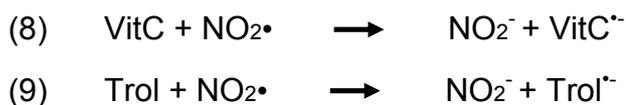
4.1 Charakterisierung des UVA-induzierten Nitritzerfalles bei supraphysiologischen Nitritkonzentrationen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann Stickstoffmonoxid durch UVA-Strahlung nach folgenden Reaktionen nicht-enzymatisch gebildet werden:



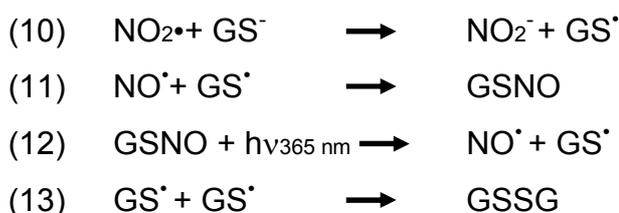
Aus dem gezeigten Mechanismus (Reaktionen 1-5) geht hervor, dass eine Eliminierung des in Gleichung 3 gebildeten $\text{NO}_2\cdot$ mit Hilfe von Antioxidanzien bzw. spezifischer Scavenger, die Reaktion 4 und somit den Konsum von $\text{NO}\cdot$ inhibieren würde und dadurch eine maximale und selektive NO -Freisetzung aus dem Zerfall erreicht werden könnte.

Versuche mit Antioxidanzien wie Glutathion, Vitamin C oder Trolox von denen bekannt ist, dass sie nach Gleichungen 8-13 NO_2 -Radikale abbauen [117] zeigten jeweils eine etwa 24-fache Zunahme der UVA-induzierten NO -Freisetzung aus Nitrit.



(VitC, Vitamin C, Ascorbat, Ascorbinsäure; $\text{VitC}\cdot^-$, das Radikal von VitC; Trol, Trolox; $\text{Trol}\cdot^-$, das Radikal von Trolox)

Und für Glutathion:



(GS^- , Glutathion; GSNO, S-Nitroso-Glutathion; $\text{GS}\cdot$, Glutathionylradikal)

Aus den Ergebnissen und aus dem gezeigten Mechanismus des UVA-induzierten Nitritzerfalls geht weiter hervor, dass Kombinationen der Antioxidanzien zu keiner weiteren Erhöhung der NO-Freisetzung führte und so eine vollständigen Eliminierung von Stickstoffdioxidradikalen schon durch einzelne Zugabe wie z.B. Vitamin C erreicht werden konnte.

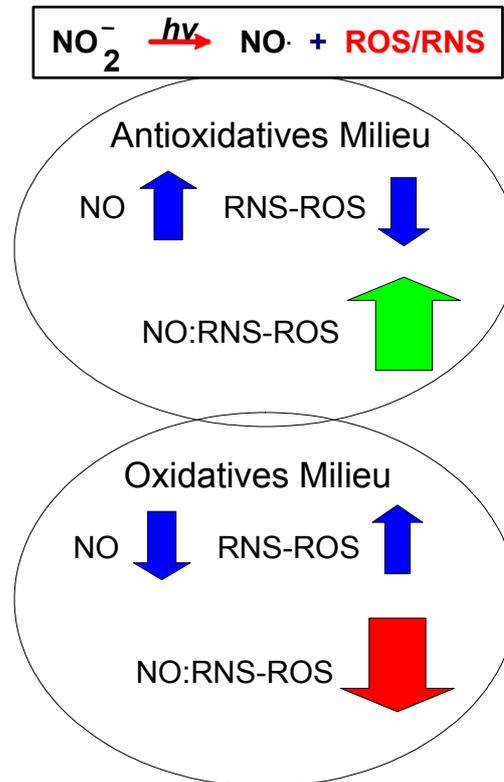


Abbildung 34 Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse des UVA-induzierten Nitritzerfalls in Anwesenheit von Antioxidanzien; **RNS**, reaktive Stickoxidspezies; **ROS**, reaktive Sauerstoffspezies

Eine praktische Anwendung des UVA-induzierten Nitritzerfalles in Anwesenheit von Antioxidanzien ergibt sich durch die Bildung von reinem NO, welches für medizinische Zwecke, wie Behandlung pulmonaler Hypertonien und Wundheilungsstörungen, eingesetzt werden könnte.

4.2 Wirkung supraphysiologischer Nitritkonzentrationen auf die UVA-induzierte Toxizität in humanen Hautfibroblasten

In endothelialen Zellen aus der Aorta der Ratte kann die exogene Zugabe von Nitrit in Konzentrationen bis zu 10 mM vor einer UVA-induzierten Toxizität signifikant schützen [106]. Daher lag der Schluss nahe, dass eine durch Nitrit vermittelte Protektion gegenüber UVA-induzierte Schäden auch in humanen Hautfibroblasten erreicht werden könnte und so die topische Applikation von Nitrit als zukünftiger NO-basierter Therapieansatz in der Dermatologie denkbar wäre.

Supraphysiologische Nitrit-Konzentrationen erhöhen UVA-induzierte Toxizität

Entgegen der Erfahrung der Arbeitsgruppe mit endothelialen Rattenzellen, haben wir in humanen Hautfibroblasten nach UVA-Exposition in Anwesenheit von Nitrit, eine signifikant erhöhte Toxizität und Lipidperoxidation beobachten können, als nach alleiniger UVA-Bestrahlung (Ergebnisse 3.2). Dieses Ergebnis lässt eine Beteiligung von $\text{NO}\bullet$ und/oder anderen beim UVA-induzierten Nitritzerfall entstanden Produkten, wie $\text{NO}_2\bullet$, an der gesehenen Toxizität vermuten.

Weitere Versuche mit Zugabe des NO-Donors DETA-NO während UVA-Bestrahlung, konnten eine Beteiligung von $\text{NO}\bullet$ als toxisches Agens nicht nur ausschließen, sondern seine protektive Rolle in humanen Fibroblasten der Haut bestärken (siehe 3.12). Vitamin C als Radikal-Fänger und Positivkontrolle inhibierte ebenfalls die gesehene UVA-induzierte Toxizität.

Daher lässt sich die erhöhte UVA/Nitrit-induzierte Toxizität auf die Bildung des zelltoxischen $\text{NO}_2\bullet$ und/oder weiteren reaktiven Sauerstoffspezies zurück zuführen, die nach den bekannten Reaktionen des UVA-induzierten Nitritzerfalles neben $\text{NO}\bullet$ entstehen können.

$\text{NO}_2\bullet$ ist durch seine Reaktivität und Beschaffenheit in der Lage, die Kettenreaktion der Lipidperoxidation einzuleiten, die Struktur von Biomolekülen zu ändern und weitere reaktive Spezies zu generieren [117].

Versuche, bei denen neben Nitrit zusätzlich auch DETA/NO während der UVA-Bestrahlung verwendet wurden, zeigten eine Inhibition der UVA/Nitrit-induzierte Toxizität und Lipidperoxidation. Zudem war die Toxizität signifikant geringer als in den bestrahlten Kontrollzellen (siehe 3.3).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht alleine die NO-Konzentration für einen Zellschutz gegenüber UVA-induzierte Schäden wichtig ist, sondern eher das redox-abhängige Verhältnis NO• zu RNS-ROS. Die gleichzeitige Bildung z.B. von NO₂• während des UVA-induzierten Nitritzerfalles hebt nicht nur die zellschützende Wirkung des in hohen Mengen generierten NO• auf, sondern verstärkt auch die UVA-bedingte Toxizität in den Fibroblasten. Durch Veränderung des Verhältnisses von NO• zu RNS-RNO- in Richtung NO• durch Zugabe von DETA/NO oder Abfangen von NO₂• durch Vitamin C konnte die gesehene UVA/Nitrit-induzierte Toxizität vermieden werden. Da der Mensch nicht in der Lage ist selber Vitamin C zu synthetisieren [123], zeigen diese Ergebnisse schon auf zellulärer Ebene die Wichtigkeit von Vitamin C bzw. seine ausreichende Aufnahme durch Nahrungsmittels im Rahmen des Zellschutzes.

Die Gründe des einerseits toxischen Effektes bei Fibroblasten und andererseits der gesehene Protektion bei Endothelialzellen der Ratte vor UVA-induzierten Zellschäden in Anwesenheit von höheren Nitritkonzentrationen könnten in den unterschiedlichen antioxidativen Kapazitäten der verschiedenen Zelltypen und somit der Resistenz gegenüber Radikale liegen. Endotheliale Zellen sind durch ihre Funktion, in der NO• für blutdruckregulatorische Aufgaben vermehrt auftritt, besser an die durch die Reaktivität von NO• resultierenden reaktiven Stickoxidspezies angepasst als Fibroblasten. In anderen Worten, die Fähigkeit der Endothelialzellen NO₂• abzufangen sorgt für ein einen Zellschutz günstiges NO•/RNS-ROS -Verhältnis, bei dem das NO• gegenüber den anderen durch UVA-Strahlung gebildeten Radikalen seine volle protektive Wirkung entfalten kann.

Trolox- und Glutathion-Radikalbildung erhöhen UVA/Nitrit-induzierte Toxizität

Neben Vitamin C spielen auch Glutathion und Vitamin C eine wichtige Rolle als Antioxidanzien beim Menschen. Glutathion und das wasserlösliche Vitamin E Derivat Trolox konnten ebenfalls das Verhältnis von NO• zu NO₂• im UVA-induzierten Nitritzerfall erhöhen.

Somit könnten diese Substanzen potentiell in der Lage sein, eine UVA/Nitrit induzierte Toxizität und Lipidperoxidation durch vermehrt gebildetes NO• und gleichzeitiger Verminderung von NO₂• in Fibroblasten zu inhibieren.

Überraschenderweise konnten die erzielten Ergebnisse (3.3 Tabelle 2 und 3.4) diese Annahmen nicht bestätigen. Im Gegenteil wurde eine fulminante Erhöhung der UVA/Nitrit-induzierten Toxizität und Lipidperoxidation gefunden, wenn Nitrit und Tro-

lox bzw. Nitrit und GSH während der UVA-Bestrahlung anwesend waren. Diese Ergebnisse waren insbesondere erstaunlich, da Trolox und Glutathion alleine in der Lage sind Fibroblasten gegen hohe UVA-Dosen zu schützen (siehe 3.3 und Übersicht in Abbildung 35).

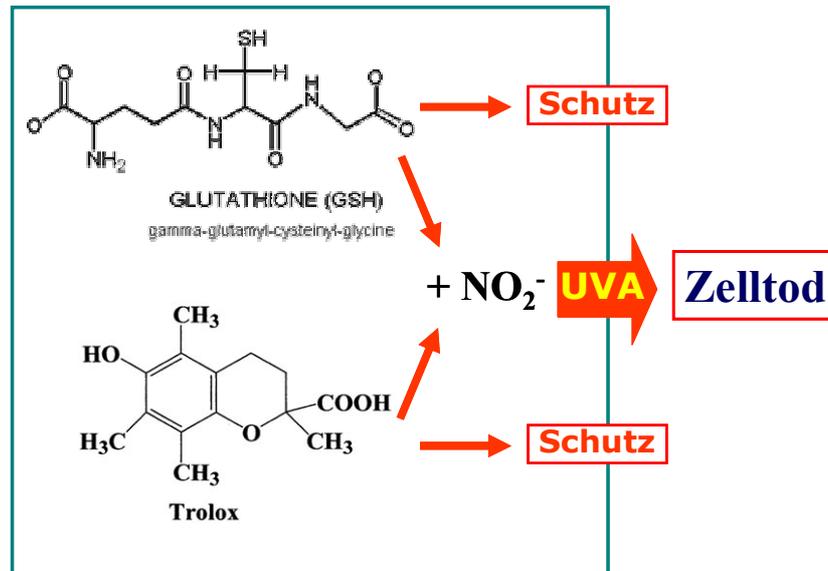


Abbildung 35 Übersicht der in Anwesenheit von Trolox bzw. Glutathion und supraphysiologischen Nitritkonzentrationen während UVA-Bestrahlung von humanen Hautfibroblasten erzielten Ergebnisse n; NO_2^- , Nitrit

Bemerkenswertweise zeigte sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trolox und Glutathion gemeinsam während der Bestrahlung eine Inhibition der UVA/Nitrit-induzierten Toxizität und Lipidperoxidation. Die Anwesenheit von DETA/NO oder Vitamin C konnte auch hier die Fibroblasten effektiv schützen. Auch die verstärkte Toxizität bei Anwesenheit von Trolox/Nitrit oder Glutathion/Nitrit während der UVA-Bestrahlung konnte vermieden werden.

Vitamin C verringert einerseits als effektiver NO_2^\bullet -Antagonist das durch den UVA-induzierten Nitritzerfall entstandene zelltoxische NO_2^\bullet , andererseits verstärkt es effektiv die NO-Bildung. So wird genau wie mit Zugabe von exogenen NO^\bullet durch NO-Donoren das Verhältnis $\text{NO}^\bullet/\text{NO}_2^\bullet$ bzw. in Richtung NO^\bullet verschoben und so eine Lipidperoxidation bzw. Toxizität verhindert.

Glutathion bzw. die Thiolatform GS^- erhöht als wichtiger, natürlich vorkommender intrazellulärer NO_2^\bullet -Antagonist ebenfalls wie Vitamin C die NO-Bildung beim UVA-induzierten Nitritzerfall und kann in Abwesenheit von Nitrit vor UVA-induzierter Toxi-

zität schützen. Aber in Anwesenheit von Nitrit erhöht es nach UVA-Bestrahlung die Lipidperoxidation in Fibroblasten dermaßen, dass eine signifikante Erhöhung der UVA/Nitrit-induzierten Toxizität vorwiegend durch eine Nekrose anstatt einer Apoptose der Zellen zu beobachten war (siehe 3.4).

Oxidativer Stress kann aus einem Ungleichgewicht zwischen Prooxidanten und Antioxidanzien entstehen. Im Falle des Vitamin C hat das in seiner Funktion als Antioxidanz entstehende Ascorbyl-Radikal keine oxidierenden Eigenschaften. Bei dem Abfangen von Radikalen durch Glutathion entstehen jedoch vorwiegend Sulfur-zentrierte Glutathionyl-Radikale (GS[•]), von denen eine oxidierende Wirkung bekannt ist und eine Oxidation von Phospholipiden in lebenden Zellen und die intrazelluläre Generierung von zelltoxischen Superoxid verursachen kann [118, 124], welches in höheren Konzentration Eisen aus intrazellulären Eisenspeichern wie z.B. Ferritin löst und zu Fe²⁺ reduziert [125]. Reduziertes 2-wertiges Eisen ist mittels Fenton-Reaktion beteiligt an der Generierung von extrem toxischen Hydroxyl-Radikalen oder es reagiert direkt mit Lipidhydroperoxide. Beides trägt zur Initiierung der Lipidperoxidation bei [126, 127].

Diese vermehrte intrazelluläre Generierung von Superoxid bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitrit und Glutathion während UVA-Bestrahlung konnten wir mittels der spezifischen MitoSox-Färbung nachweisen (siehe 3.6). Dieses Ergebnis steht im Einklang der oben erwähnten Beteiligung des Glutathionyl-Radikals an der intrazellulären Generierung von Superoxid.

Superoxid kann mit NO[•] das zelltoxische Peroxynitrit bilden, wobei diese Reaktion von der Diffusion beider Reaktionspartner abhängig ist. Durch Zugabe von DETA/NO zur Erhöhung des freien NO[•] in den Zellen, überwog aber die radikalfangende Wirkung des NO[•], wobei auch Glutathionyl-Radikale (GS[•]) mit NO[•] zu S-nitrosylierten Glutathion (GSNO) reagieren. Zusätzlich kann NO[•] unter Reaktion mit Lipid-Peroxo-Radikalen die Radikalkettenreaktion terminieren und auf diese Art effektiv eine radikalabhängige Lipidperoxidationen beenden und so den durch Glutathion verstärkten UVA/ Nitrit induzierten Zellschaden zu verhindern.

Analog zu Glutathion gilt in lipophilen Umgebungen wie Zell- oder Mitochondrienmembranen Vitamin E (α -Tocopherol) als der wichtigste NO₂[•]-Antagonist. Aber es ist auch bekannt, dass durch die Reaktion mit NO₂[•] ein α -Tocopherol-Radikal gebildet wird, welches *per se* ein effektives lipidperoxidatives Agens darstellt [128, 129].

Das wasserlösliche Vitamin E-Derivat Trolox kann ebenfalls durch die Reaktion mit $\text{OH}\cdot$ und $\text{NO}_2\cdot$ über einen schnellen Ein-Elektron-Transfer bzw. Hydrogen-Transfer ein relativ stabiles Phenoxyl-Radikal bilden. Eine verstärkte UVA-induzierte Bildung dieses Phenoxyl-Radikal konnten wir in Anwesenheit von Nitrit mittels Elektrospin-Resonanz-Spektroskopie direkt nachweisen (siehe 3.5).

Wie bei Glutathion auch, führt hier bei Verwendung von Trolox in Anwesenheit von Nitrit und die damit verbundene vermehrte Radikalbildung zu einem hohen Ausmaß an UVA-induzierter Lipidperoxidation, die nicht nur in einer erhöhten Toxizität resultiert, sondern auch zu einem Wechsel des Zelltodmodus von Apoptose zur Nekrose. Daher war der verursachte Schaden so gravierend, dass die Zellen für einen regulierten apoptotischen Zelltod nicht mehr in der Lage waren.

Vitamin C ist in der Lage die beobachteten toxischen Effekte zu inhibieren. Die Funktion von Vitamin C für eine Re-Reduzierung der durch Vitamin E gebildeten Tocopheryloxy-Radikale bzw. Phenoxyl-Radikale bei Trolox ist bekannt [130, 131]. Zusätzlich sorgt Vitamin C für einen Anstieg der nicht-enzymatischen NO-Bildung des UVA-induzierten Nitritzerfalles durch effektives Abfangen des $\text{NO}_2\cdot$ für eine höhere Konzentration an $\text{NO}\cdot$. Beide Mechanismen sind protektiv und haben daher einen großen Anteil an der Inhibition der UVA-induzierten toxischen Effekte von Trolox bzw. Glutathion in Kombination mit Nitrit.

Neben Vitamin C sind auch Trolox und Glutathion selbst in der Lage, die durch UVA/Nitrit vermehrt gebildeten Phenoxyl-Radikale bzw. Glutathionyl Radikale auf wechselwirkender Weise abzufangen. Daher führte die Bestrahlung bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Antioxidanzien zu einer vollständiger Aufhebung der verstärkten UVA/Nitrit-induzierten Lipidperoxidation und Toxizität.

Zusammenfassend könnte die nicht-enzymatische Bildung von Stickstoffmonoxid durch UVA-induzierten Nitritzerfalls in und auf der Haut ein schützendes antioxidatives Prinzip darstellen, jedoch ist die gleichzeitige Generierung von $\text{NO}_2\cdot$ ein starker toxischer Einfluss. Aufgrund der verschiedenen antioxidativen Kapazitäten der verschiedenen Zelltypen, kann Nitrit vor UVA-induzierten Schäden schützen oder im Falle von Fibroblasten die Toxizität verstärken. Die Verbesserung des $\text{NO}\cdot/\text{RNS-ROS}$ -Verhältnisses durch NO-Donoren kann die UVA/Nitrit induzierte Toxizität inhibieren. Der viel versprechende Einsatz von Antioxidanzien zur Verbesserung des $\text{NO}\cdot/\text{RNS-ROS}$ -Verhältnis führte bei alleinigem Einsatz von GSH und Trolox durch eine vermehr-

te Radikalbildung zu einer verstärkten Toxizität. Vitamin C oder unterschiedliche Kombinationen von GSH, Trolox und Vitamin C konnten die Zellen vor UVA/Nitrit-induzierten Schäden effektiv schützen.

Die Nitritkonzentration von Schweiß auf der Haut scheint die Rate der kutanen NO-Bildung zu reflektieren. Es wurden Konzentrationen von 15 μM Nitrit gefunden [107, 132] und es ist durchaus denkbar, dass unter normalen Sonne- oder Hitze-Bedingungen, die lokalen Nitritkonzentrationen im Schweiß ein Vielfaches der gefundenen 15 μM betragen, da der Schweiß über den Flüssigkeitsverlustes durch Verdampfung aufkonzentriert werden kann. In Anbetracht der heutigen Verwendung von Hautcremes mit hochdosierten Konzentrationen wie z.B. an Vitamin E und Glutathion und einer stärkeren UV-Exposition aufgrund des modebedingten Hautbräunungswunsch, mahnen die in Rahmen dieser Arbeit entstandenen Ergebnisse zur Vorsicht. Das Prinzip „viel hilf viel“, wie es heute vorherrscht, kann ebenso wie einen Mangel an Antioxidanzien schnell zu negativen Effekten führen. Eher scheint es auf eine vernünftige Balance zwischen den Antioxidanzien und einer mäßigen UVA-Belastung für eine Gesunderhaltung der Haut anzukommen.

So können schon eine lokale Erhöhung des ubiquitär vorhandenen Nitrits durch Schwitzen, eine künstliche Erhöhung durch nitrithaltige Cremes in Kombination mit einer einseitigen Erhöhung, wie z.B. von Vitamin E, bei UVA-Exposition der Haut den gewollten schützenden Effekt ins Gegenteil umkehren und auf lange Sicht die Lichtalterung der Haut durch eine Verminderung oder oxidativer Schädigung der Fibroblastenpopulation beschleunigen.

Andererseits kann die Verwendung von Nitrit in einer abgestimmten Kombination von Antioxidanzien und UVA-Bestrahlung ein viel versprechender Ansatz als NO-Donor-System in der Medizin sein und Einsatz z.B. in der Behandlung von Wundheilungsstörungen, Akne oder anderer Hautkrankheiten finden.

4.3 Physiologische Rolle natürlich vorkommender intrazellulärer NO-Derivate in humanen Hautfibroblasten.

Jeder Hautzelltyp ist in der Lage durch mindestens eine der drei bekannten NO-Synthasen NO• zu erzeugen. Man nimmt an, dass ein Teil dieses enzymatisch gebildeten NO• innerhalb des Hautgewebes verbleibt und zur Bildung von S-Nitrosothiolen, N-Nitrosoaminen und den Oxidationsprodukten Nitrit und Nitrat führt.

All diese Substanzen können unter dem Einfluss von UV-Strahlung zerfallen und NO• freisetzen [133].

In der Tat konnte in der Haut von gesunden Probanden Nitrit ($5,1 \pm 1,6 \mu\text{M}$), Nitrosothiole ($2,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$), Nitrosamine ($1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$) und Nitrat ($82,4 \pm 33,6 \mu\text{M}$) gefunden werden. Diese ermittelten Konzentrationen der NO-Derivate sind bei Nitrit ca. 25-fach, Nitrat 6-fach und von S- und N-Nitrosoverbindungen 370- bzw. 40-fach höher als im Blutserum gesunder Probanden. Paunel et al beschrieb zudem eine UVA-induzierte nicht-enzymatische NO-Generierung in der Haut, welche durch den Zerfall dieser photolabilen NO-Derivate zurückzuführen ist [107]. Dabei ist aber unklar, welche Aufgabe

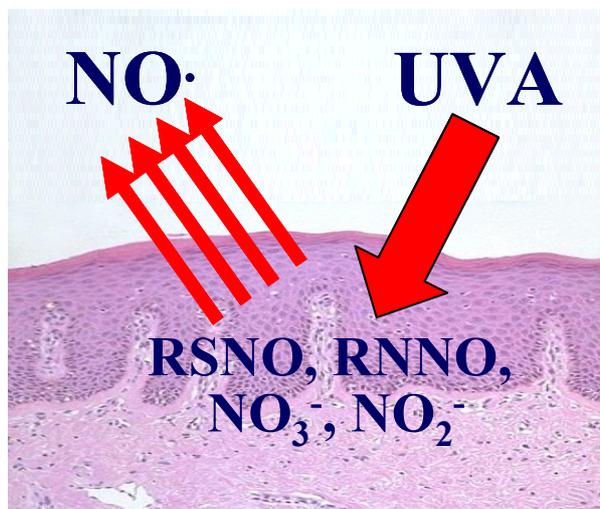


Abbildung 36 NO-Freisetzung in der Haut durch UVA-induzierten Zerfall von NO-Derivaten

dieser Zerfall während UV-Bestrahlung in der Hautphysiologie haben könnte. In diesem Rahmen könnte der Zerfall vielleicht über die Generierung von NO₂-Radikalen eine weitere toxische Komponente in der UV-induzierten Toxizität darstellen. Auf der anderen Seite könnte durch die Bereitstellung von freiem NO• die Zelle z.B. vor UV-induzierter Lipidperoxidation geschützt sein und so die NO-Derivate eine protektive Rolle einnehmen.

Daher beschäftigte sich ein Teil dieser Arbeit mit der Frage, ob eine UVA-induzierte nicht-enzymatische NO-Bildung im Gewebe auch schon auf zellulärer Ebene stattfindet. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, welche NO-Derivate vorwiegend beteiligt sind, deren Herkunft und welche physiologische oder pathophysiologische Rolle sie in Fibroblasten in Bezug auf UVA-induzierten oxidativen Stress und Toxizität bzw. Lipidperoxidation spielen könnten.

NO-Synthasen sind an der Bildung von intrazellulären NO-Derivate beteiligt

Prinzipiell können an der Bildung intrazellulärer NO-Derivate in der Haut die NO-Synthasen beteiligt sein, aber auch die Aufnahme von Nitrit und Nitrat durch die Nahrung wäre denkbar.

Durch eine Blockierung der NO-Synthasen sollte sich in unserem *in vitro* System daher die Konzentration der NO-Derivate innerhalb der Zelle senken lassen, da ein nitrit- und nitratfreies für die Kultivierung der Fibroblasten verwendet wurde.

Mittels PCR konnte eine mRNA-Expression der eNOS und iNOS in humanen Hautfibroblasten nachgewiesen werden. Diese Expression bzw. NOS-Aktivität zeigte sich auch in den gemessenen Nitritkonzentrationen in Zellkulturüberständen. Nitrit als Oxidationsprodukt von NO• stellt einen guten Marker der NOS-Aktivitäten dar und anhand der gemessenen signifikant niedrigeren Konzentrationen in den Zellkulturüberständen konnten eine Inhibition der NO-Synthasen gezeigt werden. Die Aktivierung der iNOS mittels proinflammatorischen Zytokinen führte andererseits zu einer deutlich höheren Nitritkonzentration (siehe 3.7).

Durch eine Inhibition der NO-Synthasen konnte erstmals auch eine Reduzierung der intrazellulären Konzentrationen an NO-Derivate wie Nitrit und S-Nitrosverbindungen durch Immunzytochemie und Chemolumineszenz-Detektion gezeigt werden (siehe 3.9).

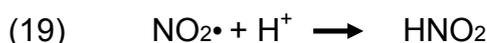
Bei der immunzytochemischen Analyse mit S-Nitroso-Antikörper kann man eindeutige Unterschiede zwischen Kontrollzellen und den NOS-inhibierten Zellen in der Färbung des Zytoplasmas erkennen. Die stärker angefärbten Kontrollen im Vergleich zu den NOS-inhibierten Zellen war ein direkter Hinweis auf einen niedrigeren Gehalt an intrazellulären S-Nitrosoverbindungen. Die Inkubation der Zellen mit Cu₂SO₄/Askrobat die durch eine Veränderung des Redox-Status eine intrazelluläre S-Nitroso-Bildung verhin- derte, zeigte ebenfalls eine viel schwächere Färbung im Vergleich zur Kontrolle. Ein weiterer Beleg für eine enzymatische Herkunft von intrazellulärer S-

Nitrosoverbindungen konnte durch die immunzytochemische Auswertung der NOS-inhibierten Zellen, die anschließend für kurze Zeit mit proinflammatorischen Zytokinen behandelt wurden, gezeigt werden. Hier unterschied sich die Intensität der Antikörperfärbung nicht von der Kontrolle. Daher konnte der intrazelluläre Gehalt an S-Nitrosoverbindungen durch die NO-Bildung der aktivierten iNOS wiederhergestellt werden.

Weitere Analysen von Fibroblasten-Homogenisaten mittels Chemolumineszenz-Detektion zeigten eine Beeinflussung der intrazellulären Konzentrationen an Nitrit und S-Nitrosoverbindungen durch Behandlungen mit NOS-Inhibitoren, Cu_2SO_4 , Ascorbat und Zytokinen. Die Inkubation der Fibroblasten mit Cu_2SO_4 /Ascorbat sorgte wie auch schon durch die Immunzytochemie gezeigt, zu einer selektiven Reduzierung an intrazellulären S-Nitrosoverbindungen, während die intrazellulären Nitritkonzentrationen gegenüber der Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich waren. Die Inhibition der NO-Synthasen führte zu einer signifikanten intrazellulären Verarmung der Nitrit und S-Nitrosoverbindungen und stellt somit einen direkten Beweis der enzymatischen Herkunft dieser NO-Derivate dar. Die Verwendung von NOS-Inhibitoren zusammen mit Cu_2SO_4 /Ascorbat führte zu keiner weiteren Erniedrigung.

Ein weiterer Hinweis auf die enzymatische Herkunft der intrazellulären NO-Derivate ist ein „Wiederaufladen“ der intrazellulären Mengen an Nitrit und S-Nitrosoverbindungen durch Aktivierung der iNOS durch proinflammatorische Zytokine in NO-Derivat verarmten bzw. NOS-inhibierten Fibroblasten..

Aber auch durch eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit Nitrit, aber nicht mit Nitrat, konnte man in NOS-inhibierten Fibroblasten die intrazellulären Konzentrationen von Nitrit und S-Nitrosoverbindungen signifikant steigern. Dieses Ergebnis ist interessant, da es zeigt, dass Nitrit mit intrazellulären Proteinen zu S-Nitrosoverbindungen reagieren kann. Daran könnten Redox-Vorgänge innerhalb der Zellen oder ein pH-induzierten Nitritzerfall nach Gleichungen 19-21 im Zytoplasma beteiligt sein, bei dem als zwischen Produkt $\text{NO}\cdot$ entsteht.



$\text{NO}\cdot$ ist viel reaktionsfreudiger als Nitrit, welches im neutralen pH kaum mit Proteinen wie Albumin zu S-Nitroso-Albumin reagiert. Beim reaktionsträgeren Nitrat als quasi

ubiquitär vorkommendes NO-Derivat, konnten wir keine entscheidende Rolle für die intrazelluläre NO-Derivat Bildung nachweisen

Zusammenfassend konnte erstmals in humanen Fibroblasten gezeigt werden, dass intrazellulären NO-Derivate enzymatisch gebildet werden können. Ebenfalls konnte aber auch eine Beteiligung eines nitrithaltigen Milieus der Zellen an der Bildung von intrazellulärer NO-Derivate nachgewiesen werden. Daher waren wir in der Lage die Konzentration an intrazellulären NO-Derivaten endogen zu beeinflussen und konnten so in weiteren Experimenten die Effekte einer intrazellulären Verarmung von NO-Derivaten der Zellen im Rahmen des Zellschutzes gegenüber UVA-induzierten Schäden studieren.

NO-Bildung durch UVA-induzierten Zerfall intrazellulärer NO-Derivate

Viele der biologischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid sind bedingt durch seine rasche Diffusion und seine Fähigkeit Zellmembrane zu durchdringen. Der Diffusionskoeffizient von NO• bei 37°C ist 1,4 mal höher als der von Sauerstoff oder Kohlenstoffmonoxid und es wurde eine Diffusionsstrecke in Geweben wurde mit 500 µm kalkuliert [134]. Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie und der Verwendung des NO-spezifischen Farbstoffes DAF-2 konnte man eine durch UVA-induzierte intrazelluläre NO-Bildung in Fibroblasten live beobachten (siehe 3.2). Die Fluoreszenzstärke in den Zellen war abhängig von der UVA-Dosis und ist proportional zur intrazellulären NO-Konzentration. Bei punktueller Bestrahlung der Zellen breitete sich das Fluoreszenzsignal mit der Zeit gleichmäßig über die ganze Zelle aus. Auch eine lokale UVA-Bestrahlung eines nitrithaltigen Mediums (10 µM) eines Bereiches außerhalb der Zellen führte zu einer zeitverzögerten, distanzabhängigen intrazellulären Fluoreszenz.

Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von NO• und demonstrieren erstmals anschaulich, wie durch UVA-Bestrahlung intrazellulär nicht-enzymatisch NO• gebildet werden kann, welches sich schnell innerhalb der Zelle durch Diffusion verteilt, die Zellmembran durchdringt und längere Strecken außerhalb der Zellen überwinden kann.

Somit konnte zum ersten Mal ein UVA-induzierter Zerfall von NO-Derivaten, der auf zellulärer Ebene stattfindet, in humanen Hautfibroblasten bewiesen werden

Mangel intrazellulärer NO-Derivate führt zu einer geringeren UVA-induzierten intrazellulären NO-Bildung

Für die Aufklärung der physiologischen Rolle der intrazellulären NO-Derivate und deren Bedeutung für die Zellen während UVA-Bestrahlung, waren die bereits erzielten Ergebnisse bedeutend. Sie gaben Gelegenheit das Ausmaß der UVA-induzierte nicht-enzymatische NO-Bildung in lebenden Zellen unter verschiedenen intrazellulären NO-Derivat-Konzentrationen und deren Einfluss gegen UVA-bedingte Lipidperoxidation bzw. Toxizität zu beurteilen.

Im Ergebnisteil 3.10 lässt sich eindrucksvoll verfolgen, wie eine erniedrigte Konzentration an intrazellulären NO-Derivaten sich auf die intrazelluläre UVA-induzierte NO-Bildung auswirkt. Zellen die mit NOS-Inhibitoren und Cu_2SO_4 behandelt wurden zeigten eine signifikante Erniedrigung der intrazellulären NO-Bildung. Die differentielle Erniedrigung der intrazellulären S-Nitrosoverbindungen durch die Inkubierung mit Cu_2SO_4 /Ascorbat zeigte keine signifikante Erniedrigung der UVA-induzierten intrazellulären NO-Bildung. Daher ist anzunehmen, dass vorwiegend Nitrit bzw. der Nitritzerfall für die UVA-induzierter intrazelluläre NO-Bildung verantwortlich sind.

Eine Inkubation mit physiologischen Nitrit-Konzentrationen (10 μM) von NOS-inhibierten Zellen resultierte in eine intrazelluläre UVA-induzierte NO-Bildung, welche sich Stärke und Verlauf nicht von den Kontrollzellen unterschied.

Daher kann man, wie schon erwähnt, von einem „Wiederaufladen“ der intrazellulären Speicher an NO-Derivaten sprechen. Zusätzlich führte die Anwesenheit von Vitamin C während der Bestrahlung zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären NO-Bildung im Vergleich zu bestrahlten Kontrollzellen (siehe 3.12).

Mit einer Inkubation physiologischer Mengen an Nitrat, welches in Geweben in einer 10-fachen Konzentration als Nitrit vorkommt, ließ sich die intrazelluläre NO-Bildung während UVA-Bestrahlung bei Weitem nicht wie mit Nitrit wiederherstellen. Die leichte Erhöhung des Signals könnte man auf eine Anreicherung von Nitrat in der Zelle zurückführen, welches wie von anderen Arbeitsgruppen in anderen Zelltypen beschrieben, unter UV-Bestrahlung $\text{NO}\cdot$ bilden soll [105]. Denkbar wäre auch eine Rückreaktion von Nitrat zu Nitrit, die aufgrund der Stabilität von Nitrat gegenüber Nitrit vernachlässigbar klein sein muss.

Mangel an intrazellulären NO-Derivaten führt und zu einer Erhöhung der UVA-bedingten Toxizität und Lipidoxidation

Der Mangel an intrazellulären Nitrit, und die damit eingehende verringerte UVA-induzierte, nicht-enzymatische NO-Bildung gehen einher mit einer signifikanten Erhöhung der Lipidperoxidation, Nekrosen und Toxizität in den bestrahlten Fibroblasten (siehe 3.11). Die Verwendung des NO-Fängers cPTIO oder dem NO-Donor DETA/NO gaben direkte Hinweise auf die vorherrschende Rolle von NO• in diesen Prozessen. So führte ein Abfangen von NO• zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation und Toxizität, während zusätzlich vorhandenes freies NO• auch die NO-Derivat-verarmten Zellen schützen konnte. Die Anwesenheit von physiologischen Mengen von Nitrit (10 µM) im Bestrahlungsmedium führte ebenfalls zu einem Zellschutz. Daher scheinen hier im Gegensatz zu höheren Nitrit-Konzentrationen, die Mengen an generierten NO• im Vergleich zu NO₂• für die Zellen ein günstiges Verhältnis bzw. Konzentrationen angenommen zu haben, welches wichtiger zu bewerten ist, als die absolute NO-Konzentration.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass in humanen Hautfibroblasten intrazelluläre NO-Derivate enzymatisch durch die eNOS und über eine aktivierte iNOS gebildet werden können. Zusätzlich konnte eine nicht-enzymatische Beteiligung eines nitrithaltigen Milieu bei der Bildung intrazellulärer NO-Derivate nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine wichtige, physiologische Rolle von intrazellulären NO-Derivate insbesondere Nitrit für den Zellschutz hin.

Die menschliche Haut ist mit einem Volumen von 10-20 Liter und einer Oberfläche von 2 m² ein immenser Speicher für Nitrit und andere NO-Derivate wie S-Nitrosoverbindungen. Diese sind photolabil und setzten unter UVA-Bestrahlung direkt NO• in hoher Menge frei, die ein Vielfaches des enzymatisch Gebildeteten betragen kann. Daher stellt der UVA-induzierte Zerfall von Nitrit eine Quelle von freien, sofortverfügbaren und bioaktiven NO• dar, die in dem Zeitfenster während und unmittelbar nach UVA-Bestrahlung seine protektive Eigenschaften in den Zellen gegen eine übermäßige Lipidperoxidation und die dadurch bedingte Toxizität entfaltet. Insbesondere unter der Betrachtung der enzymatischen NO-Bildung wie durch die iNOS, die erst 16-24 h nach erfolgter Aktivierung durch UV-Strahlung ihr Expressions- bzw. Aktivitätsmaximum erreicht [107] und somit erst viel später NO• zur Verfügung stellt, scheint dieser Mechanismus der nicht-enzymatischen NO-Bildung eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie als schützendes Prinzip einzunehmen.

So könnte die Konzentration der NO-Derivate wie Nitrit in der Haut ein diagnostischer Marker für eine verstärkte Alterung sein, da die NO-Synthasen im Alter weniger aktiv sind. Eine neue Studie unserer Arbeitsgruppe konnten eine Bildung von NO• mittels

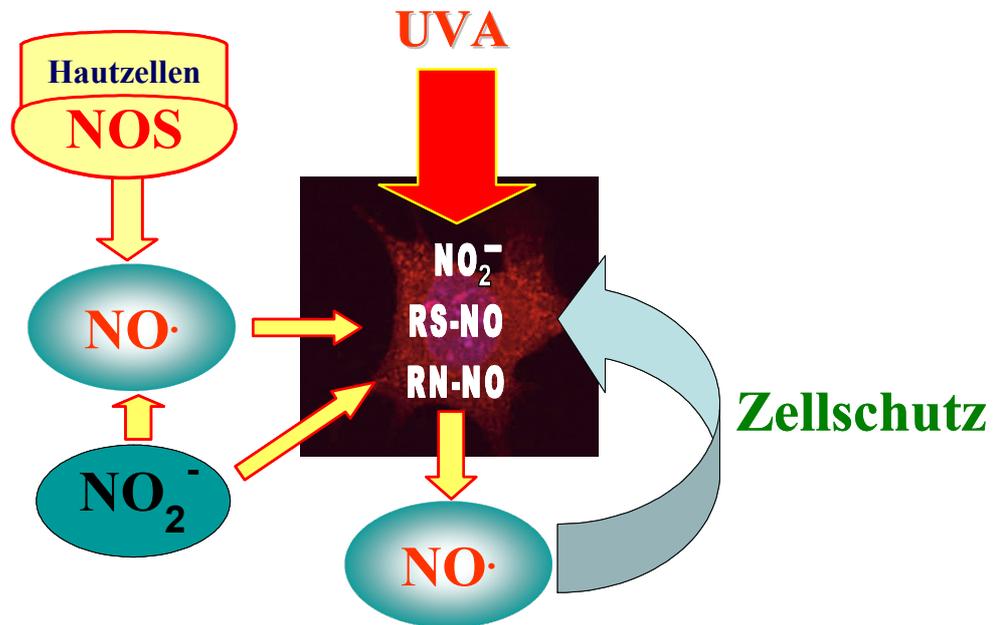


Abbildung 37 Enzymatisch gebildetes NO reagiert teilweise zu NO-Derivate, welche in der Zelle verbleiben und bei UVA-Strahlung zerfallen und NO mit zellschützender Wirkung freisetzen. Zusätzlich kann ein nitrithaltiges Milieu die intrazelluläre Konzentration an NO-Derivate erhöhen; NO_2^- , Nitrit; **RS-NO**, S-Nitrosoverbindungen; **RN-NO**, N-Nitrosoverbindungen

ESR in der Haut nachweisen, wenn diese mit einer handelsüblichen Pflegecreme mit Nitrit behandelte worden war. Daher wäre eine mögliche Substitution, wie z.B. durch Nitrit-Cremes ein viel versprechender therapeutischer Ansatz gegenüber vorzeitiger Hautalterung und deren verbundenen negativen Folgen und könnte somit ein Konzept für eine klinische Studie darstellen.

5 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO•) spielt in der Hautphysiologie eine wichtige Rolle und ist an vielen biologischen Prozessen, wie z.B. Hautbräunung, Wundheilung sowie Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten und Fibroblasten beteiligt. Des Weiteren ist NO• ein zellprotektives Agens, welches z.B. effektiv vor der UVA-induzierten Apoptose schützen kann. NO• wird *in vivo* enzymatisch durch NO-Synthasen gebildet, kann aber auch enzymunabhängig durch UV- oder pH-induzierten Zerfall natürlich vorkommender NO-Derivate (NOD), wie Nitrit und S-Nitrosoverbindungen, in hohen Mengen entstehen. Der Mechanismus und die Rolle der nicht-enzymatischen NO-Bildung in der menschlichen Haut sind weitgehend unbekannt.

In Rahmen dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass UVA-Strahlung unter physiologischen Bedingungen das Nitrit-Anion unter der Generierung von NO• effektiv spalten kann. Dabei entstehen redoxaktive Zwischenprodukte die mit dem entstehenden NO reagieren können und dadurch die NO-Generierung limitieren. Andererseits werden durch die Verwendung starker Antioxidanzien diese Zwischenprodukte eliminiert und führen so zu einer maximalen Ausbeute der NO-Freisetzung.

In einen weiteren Ansatz wurde überprüft, ob die nicht-enzymatische NO-Generierung aus Nitrit als protektives NO-Donorsystem in einem Modell der UVA-induzierten Toxizität humaner Fibroblasten Verwendung finden kann. Entgegen unserer Erfahrungen mit Zellen der Ratte, konnten wir mit humanen Hautfibroblasten bereits bei supraphysiologischen Nitritkonzentrationen von 100 µM eine signifikante Zunahme der UVA-induzierten Zellschäden beobachten. Als das eigentliche zelltoxische Agens dieser Reaktion konnten wir das Stickstoffdioxidradikal (NO₂•) identifizieren. Eine Veränderung des im System entstandenen NO•/ NO₂•-Verhältnisses, z.B. durch die exogene Zugabe von NO oder eine NO₂•-Eliminierung durch Vitamin C, führte hingegen zu einem Schutz der Zellen vor UVA-induzierten Zelltod. Somit konnten wir erstmal zeigen, dass der UVA-bedingte Nitritzerfall als ein Schutzsystem verwendet werden kann, wenn es gelingt die Bildung der toxischen Zwischenprodukte zu verhindern oder diese zu eliminieren. Interessanterweise führten Glutathion und Trolox, zwei potente NO₂•-Scavenger, zu einer Steigerung der UVA/Nitrit-induzierten Toxizität. Diese paradoxen Befunde konnten wir auf die Generierung toxischer Glutathionyl- bzw. Phenoxyl-Radikalen zurückführen. Unsere Ergebnisse zeigen somit imposant, dass in redoxabhängigen Systemen vermeintlich positiv wirksame Agenzien toxisch wirken können.

Bei der Charakterisierung der physiologischen Rolle von natürlicherweise, intrazellulärer vorkommenden NO-Derivaten konnten wir mittels Laser-Scanning-Mikroskopie erstmals nachweisen, dass in der Zelle hauptsächlich Nitrit unter Einfluss von UVA-Strahlung zerfällt und NO generiert. Fibroblastenkulturen, in denen experimentell eine signifikante Verarmung des intrazellulären Nitrits erreicht werden konnte, wiesen eine fehlende UVA-induzierte intrazelluläre NO-Generierung und eine gleichzeitige signifikante Erhöhung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber UVA-induzierten Zellschäden auf. Die Substitution der nitritverarmter Zellen mit physiologischen Nitritkonzentrationen (10 μM) konnte hingegen die gesehene erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UVA-Strahlung aufheben. Somit konnten wir hier erstmals beweisen, dass intrazelluläre, photoaktive NO-Derivate, wie Nitrit, eine physiologische Rolle im Rahmen des Zellschutzes vor UVA-Strahlung erfüllen und die nicht-enzymatische NO-Bildung ein schnell agierendes, natürliches Schutzprinzip der menschlichen Haut darstellt.

6 Abstract

Nitric oxide (NO•) plays a pivotal role in the physiology of the human skin and is involved in many biological processes like tanning, wound healing as well as the proliferation and differentiation of keratinocytes and fibroblasts. Furthermore NO• can act as a cell protective agent and prevent effectively e.g. from UVA-induced apoptosis. NO• can be produced *in vivo* enzymatically by NO-synthases. Additionally NO can be generated in high quantities by enzyme independently UV- and pH-induced decomposition of naturally occurring NO-derivates (NOD) like nitrite and nitroso-compounds. Function and mechanism of non-enzymatic NO-generation in human skin is largely unknown.

Within this work we could show for the first time that under physiological conditions UVA-radiation can decompose effectively nitrite anions, which result in NO-formation. During nitrite decomposition occur reactive intermediates which react with NO and decrease that way the NO-generation. But an elimination of this intermediates by strong antioxidants leads to a maximal yield of NO.

In a further approach we examined the optional use of the non-enzymatic NO-generation from nitrite as a NO-donor system against UVA-induced cell damage in human skin fibroblasts. Contrary to our experience with rat cells supraphysiological concentrations of nitrite up to 100 mM already led to a significant increase of UVA-induced cell damage. We could identify NO₂• as the toxic component. Alteration of the NO•/ NO₂• ratio by exogenous addition of NO or NO₂•-Scavenger like ascorbic acid, however, led to a protection from the UVA/nitrite-induced cell death.

Hence we could demonstrate for the first time that the UVA-induced decomposition of nitrite can be used as a cell protection system, if the resulting toxic intermediates can be prevented or eliminated. Interestingly glutathione and trolox, two potent NO₂•-scavengers, caused an increase of the UVA/nitrite-induced toxicity. The UVA-induced generation of glutathionyl-radicals by glutathione and phenoxyl-radicals by trolox respectively in the presence of nitrite can explain these paradoxical results. Thus, our results show impressively that supposed protective substances can become toxic in redox-dependent systems.

In a further characterisation of the physiological role of naturally intracellular occurring NOD, we could show for the first time by using Laser-scanning-Microscopy-Technique, that UVA-radiation can generate intracellular NO by decomposition of nitrite. Fibroblasts

cultures which nitrite-amount had been reduced experimentally, revealed a lower UVA-induced intracellular NO-formation accompanied by a significant higher susceptibility to UVA-induced cell damage. Substitution of the nitrite-depleted cells with physiological concentration of nitrite (10 μ M), however, could restore this higher susceptibility. So we demonstrate for the first time that intracellular, photolabile NO-derivates like nitrite take place in cell protection against UVA-radiation and that non-enzymatic NO-generation by nitrite-decomposition is a naturally rapidly acting principle in the human skin.

7 Literaturverzeichnis

1. Lancaster, J.R., Jr., *A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide*. Nitric Oxide, 1997. **1**(1): p. 18-30.
2. Schmidt, K., et al., *Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentrations in aerobic solutions*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **355**(4): p. 457-62.
3. McGrath, H., Jr., *Ultraviolet-A1 irradiation decreases clinical disease activity and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 1994. **12**(2): p. 129-35.
4. Feelisch, M., *[Nitrogen monoxide (NO)--the active principle of organic nitrates]*. Schweiz Rundsch Med Prax, 1993. **82**(42): p. 1167-71.
5. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298** (Pt 2): p. 249-58.
6. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17478-88.
7. Brecht, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 714-8.
8. Janssens, S.P., et al., *Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22694.
9. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
10. Brecht, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder, *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide*. Nature, 1990. **347**(6295): p. 768-70.
11. Mayer, B., M. John, and E. Bohme, *Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin*. FEBS Lett, 1990. **277**(1-2): p. 215-9.
12. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance*. Eur J Clin Invest, 1991. **21**(4): p. 361-74.
13. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell, 1994. **78**(6): p. 915-8.
14. Ruan, J., et al., *Inducible nitric oxide synthase requires both the canonical calmodulin-binding domain and additional sequences in order to bind calmodulin and produce nitric oxide in the absence of free Ca²⁺*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22679-86.
15. Jurkiewicz, B.A. and G.R. Buettner, *Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study*. Photochem Photobiol, 1994. **59**(1): p. 1-4.
16. Laurent, M., M. Lepoivre, and J.P. Tenu, *Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase*. Biochem J, 1996. **314** (Pt 1): p. 109-13.

17. Di Rosa, M., et al., *Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **172**(3): p. 1246-52.
18. Bogdan, C., et al., *Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 227-33.
19. Granger, D.L., et al., *Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages*. J Clin Invest, 1990. **85**(1): p. 264-73.
20. Stuehr, D.J. and C.F. Nathan, *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1543-55.
21. Liew, F.Y. and F.E. Cox, *Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide*. Immunol Today, 1991. **12**(3): p. A17-21.
22. Kroncke, K.D., C.V. Suschek, and V. Kolb-Bachofen, *Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(3): p. 585-605.
23. Wink, D.A., et al., *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors*. Science, 1991. **254**(5034): p. 1001-3.
24. Kroncke, K.D., K. Fehsel, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?* Nitric Oxide, 1997. **1**(2): p. 107-20.
25. Bolanos, J.P., et al., *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases*. J Neurochem, 1997. **68**(6): p. 2227-40.
26. Rachmilewitz, D., et al., *Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease*. Gut, 1995. **36**(5): p. 718-23.
27. Kooy, N.W., et al., *Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite*. Crit Care Med, 1997. **25**(5): p. 812-9.
28. Wheeler, M.A., et al., *Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 110-6.
29. Molina y Vedia, L., et al., *Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 24929-32.
30. Gopalakrishna, R., Z.H. Chen, and U. Gundimeda, *Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27180-5.
31. Henry, Y., et al., *EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles*. Faseb J, 1993. **7**(12): p. 1124-34.
32. Berendji, D., et al., *Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release*. FEBS Lett, 1997. **405**(1): p. 37-41.
33. Kroncke, K.D., et al., *Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast tran-*

- scription activator LAC9*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **200**(2): p. 1105-10.
34. Schlossmann, J., R. Feil, and F. Hofmann, *Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases*. Ann Med, 2003. **35**(1): p. 21-7.
 35. Brune, B., A. von Knethen, and K.B. Sandau, *Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis*. Cell Death Differ, 1999. **6**(10): p. 969-75.
 36. Schafer, F.Q., et al., *Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 671-81.
 37. Holbrook, K.A., Wolff, K., Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K., and A.K.F. Freedberg I.M., *The structure and development of skin*. Dermatology in General Medicine. 1987, New York: McGraw-Hill.
 38. Stenn, K.S., *The skin, in Histology, Cell and Tissue Biology*. Elsevier Biomedical ed. L. Weiss. 1983, New York. 569.
 39. Eckert, R.L., *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte*. Physiol Rev, 1989. **69**(4): p. 1316-46.
 40. Senegal, P., *Morphogenesis of skin*. Nitric Oxide, 1976. **7**(1): p. 1-10.
 41. Doran, T.I., A. Vidrich, and T.T. Sun, *Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells*. Cell, 1980. **22**(1 Pt 1): p. 17-25.
 42. Jimbow, K., et al., *Some aspects of melanin biology: 1950-1975*. J Invest Dermatol, 1976. **67**(1): p. 72-89.
 43. Aubin, F., *Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression*. Eur J Dermatol, 2003. **13**(6): p. 515-23.
 44. Wolff, K., *Melanocyte-keratinocyte interactions in vivo: the fate of melanosomes*. Yale J Biol Med, 1973. **46**(5): p. 384-96.
 45. Quevedo, W.C., Jr. and R.D. Fleischmann, *Developmental biology of mammalian melanocytes*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(1): p. 116-20.
 46. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblast heterogeneity: more than skin deep*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 5): p. 667-75.
 47. Heckmann, M., *Taschenlexikon Dermatologie*. 1999, Berlin: Springer-Verlag.
 48. Jordana, M., et al., *Immune-inflammatory functions of fibroblasts*. Eur Respir J, 1994. **7**(12): p. 2212-22.
 49. Broughton, G., 2nd, J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 12S-34S.
 50. Weller, R., et al., *Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?* Clin Exp Dermatol., 2003. **28**(5): p. 511-4.
 51. Frank, S., et al., *Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 882-8.
 52. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide in human skin: current status and future prospects*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(1): p. 1-7.

53. Bogdan, C., *Nitric oxide and the regulation of gene expression*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 66-75.
54. Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity*. Immunol Today, 1992. **13**(5): p. 157-60.
55. Suschek, C.V., et al., *Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(5): p. 1200-5.
56. Kuhn, A., et al., *Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(1): p. 149-53.
57. Suschek, C.V., et al., *Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 6130-6137.
58. Chang, D.S., S.J. Seo, and C.K. Hong, *The effect of amniotic membrane extract on the expression of iNOS mRNA and generation of NO in HaCaT cell by ultraviolet B irradiation*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2002. **18**(6): p. 280-6.
59. Yamasaki, K., et al., *Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 967-71.
60. Benrath, J., M. Zimmermann, and F. Gillardon, *Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation*. Neurosci Lett, 1995. **200**(1): p. 17-20.
61. Stallmeyer, B., et al., *The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(6): p. 1090-8.
62. Schaffer, M.R., et al., *Nitric oxide metabolism in wounds*. J Surg Res, 1997. **71**(1): p. 25-31.
63. Seabra, A.B., et al., *Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin*. Br J Dermatol, 2004. **151**(5): p. 977-83.
64. Schwentker, A., et al., *Nitric oxide and wound repair: role of cytokines?* Nitric Oxide, 2002. **7**(1): p. 1-10.
65. Efron, D.T., D. Most, and A. Barbul, *Role of nitric oxide in wound healing*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2000. **3**(3): p. 197-204.
66. Crutzen, P.J., *Ultraviolet on the increase*. Nature, 1992. **356**: p. 104-105.
67. Bruls, W.A., et al., *Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths*. Photochem Photobiol, 1984. **40**(4): p. 485-94.
68. Kindl, G., W. Raab, and G. Kindl, *Licht und Haut*. 4 ed, ed. W. Raab. 1998, Govi: Eschborn. 47-133.
69. Moan, J. and M.J. Peak, *Effects of UV radiation of cells*. J Photochem Photobiol B, 1989. **4**(1): p. 21-34.

70. Peak, J.G. and M.J. Peak, *Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays*. *Mutat Res*, 1991. **246**(1): p. 187-91.
71. Peak, M.J., J.G. Peak, and C.A. Jones, *Different (direct and indirect) mechanisms for the induction of DNA-protein crosslinks in human cells by far- and near-ultraviolet radiations (290 and 405 nm)*. *Photochem Photobiol*, 1985. **42**(2): p. 141-6.
72. Hemminki, K., et al., *Demonstration of UV-dimers in human skin DNA in situ 3 weeks after exposure*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(4): p. 605-9.
73. Schwarz, A., et al., *Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 26-31.
74. Tyrrell, R.M. and S.M. Keyse, *New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells*. *J Photochem Photobiol B*, 1990. **4**(4): p. 349-61.
75. Godar, D.E., et al., *Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis*. *Photochem Photobiol*, 1993. **57**(6): p. 1018-26.
76. Churchill, M.E., J.G. Peak, and M.J. Peak, *Correlation between cell survival and DNA single-strand break repair proficiency in the Chinese hamster ovary cell lines AA8 and EM9 irradiated with 365-nm ultraviolet-A radiation*. *Photochem Photobiol*, 1991. **53**(2): p. 229-36.
77. Siems, W.G., et al., *Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus*. *Pharm. Ztg.*, 1998. **143**: p. 1515-1527.
78. Sies, H., *Biochemistry of oxidative stress*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1986. **25**: p. 1058-1071.
79. Emerit, I. and A.M. Michelson, *Mechanism of photosensitivity in systemic lupus erythematosus patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(4): p. 2537-40.
80. Gange, R.W. and C.F. Rosen, *UVA effects on mammalian skin and cells*. *Photochem Photobiol*, 1986. **43**(6): p. 701-5.
81. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. *Exp Physiol*, 1997. **82**(2): p. 291-5.
82. Black, H.S., *Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage*. *Photochem Photobiol*, 1987. **46**(2): p. 213-21.
83. Masaki, H., T. Atsumi, and H. Sakurai, *Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **206**(2): p. 474-9.
84. Klotz, L.O., N.J. Holbrook, and H. Sies, *UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events*. *Curr Probl Dermatol*, 2001. **29**: p. 95-113.
85. Yaar, M. and B. Gilchrist, *Aging of Skin*. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 2003: p. 1386-1398.
86. Ghadially, R., et al., *The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 2281-90.

87. Langley, R.G. and A.J. Sober, *A clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma*. *Cancer Invest*, 1997. **15**(6): p. 561-7.
88. Serraino, D., et al., *Epidemiological aspects of cutaneous malignant melanoma (review)*. *Oncol Rep*, 1998. **5**(4): p. 905-9.
89. Dennis, L.K., *Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry*. *Arch Dermatol*, 1999. **135**(3): p. 275-80.
90. Roza, L., et al., *UVA hazards in skin associated with the use of tanning equipment*. *J Photochem Photobiol B*, 1989. **3**(2): p. 281-7.
91. Krutmann, J., *[Phototherapy of neurodermitis disseminata atopica]*. *Hautarzt*, 1996. **47**(9): p. 719.
92. Krutmann, J., et al., *High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis*. *J Am Acad Dermatol*, 1992. **26**(2 Pt 1): p. 225-30.
93. McGrath, H., P. Martinez-Osuna, and F.A. Lee, *Ultraviolet-A1 (340-400 nm) irradiation therapy in systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 1996. **5**(4): p. 269-74.
94. Stege, H., et al., *High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa*. *Lancet*, 1996. **347**(8993): p. 64.
95. Gruss, C., et al., *Low dose UVA1 phototherapy in disabling pansclerotic morphea of childhood*. *Br J Dermatol*, 1997. **136**(2): p. 293-4.
96. Vessey, D.A., *The cutaneous antioxidant system*. *Oxidative stress in dermatology*, ed. L. Packer and J. Fuchs. Vol. 6. 1993, New York Basel Hongkong: Marcel Dekker Inc. 81-103.
97. Kagan, V., et al., *Ultraviolet light-induced generation of vitamin E radicals and their recycling. A possible photosensitizing effect of vitamin E in skin*. *Free Radic Res Commun*, 1992. **16**(1): p. 51-64.
98. McVean, M. and D.C. Liebler, *Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake*. *Mol Carcinog*, 1999. **24**(3): p. 169-76.
99. Sorg, O., C. Tran, and J.H. Saurat, *Cutaneous vitamins A and E in the context of ultraviolet- or chemically-induced oxidative stress*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001. **14**(6): p. 363-72.
100. Stahl, W., et al., *Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(3): p. 795-8.
101. Wink, D.A., et al., *Antioxidant effects of nitric oxide*. *Methods Enzymol*, 1999. **301**: p. 413-24.
102. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(42): p. 26066-75.
103. Suschek, C.V., et al., *Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug'*. *Biol Chem*, 2006. **387**(5): p. 499-506.

104. Foster, M.W., et al., *Role of circulating S-nitrosothiols in control of blood pressure*. Hypertension, 2005. **45**(1): p. 15-7.
105. Dejam, A., et al., *Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(12): p. 1551-9.
106. Suschek, C.V., et al., *The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis*. Faseb J, 2003. **17**(15): p. 2342-4.
107. Paunel, A.N., et al., *Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(5): p. 606-15.
108. Finter, N.B., *Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays*. J. Gen. Virol., 1969(5): p. 419-425.
109. Shimizu, Y., et al., *Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes*. J Dermatol, 1997. **24**(2): p. 80-7.
110. Wang, R., et al., *Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms*. 106, 1996(419-427).
111. Roomi, M.W. and C.Y. Hopkins, *Some reactions of sterculic and malvalic acids. A new source of malvalic acid*. Can J Biochem, 1970. **48**(7): p. 759-62.
112. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
113. Suschek, C.V., A. Paunel, and V. Kolb-Bachofen, *Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure*. Methods Enzymol, 2005. **396**: p. 568-78.
114. Horstmann, A., et al., *Release of nitric oxide from novel diazeniumdiolates monitored by laser magnetic resonance spectroscopy*. Nitric Oxide, 2002. **6**(6): p. 135-141.
115. Capasso, F., et al., *High performance quantum cascade lasers*. Opt.Photo.News, 1999. **10**: p. 32-37.
116. Duling, D.R., *Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra*. J Magn Reson B, 1994. **104**(2): p. 105-10.
117. Kirsch, M., et al., *The pathobiochemistry of nitrogen dioxide*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 389-99.
118. Kirsch, M., et al., *Inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine by glutathione in the presence of carbon dioxide through both radical repair and peroxynitrate formation*. Chemistry, 2001. **7**(15): p. 3313-20.
119. Bruch-Gerharz, D., T. Ruzicka, and V. Kolb-Bachofen, *Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review*. Arch Dermatol Res, 1998. **290**(12): p. 643-51.
120. Cals-Grierson, M.M. and A.D. Ormerod, *Nitric oxide function in the skin*. Nitric Oxide, 2004. **10**(4): p. 179-93.

121. Suschek, C.V., et al., *Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(5): p. 515-27.
122. Rodriguez, J., et al., *Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 336-41.
123. Stone, I., *The Natural History of Ascorbic Acid in the Evolution of the Mammals and Primates and Its Significance for Present Day Man*. Orthomolecular Psychiatry, 1972. **1**(2&3): p. 82-89.
124. Borisenko, G.G., et al., *Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. Evidence for glutathionyl radical-induced peroxidation of phospholipids and cytotoxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23453-62.
125. Winterbourn, C.C., G.F. Vile, and H.P. Monteiro, *Ferritin, lipid peroxidation and redox-cycling xenobiotics*. Free Radic Res Commun, 1991. **12-13 Pt 1**: p. 107-14.
126. Shaw, S., *Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol*. Free Radic Biol Med, 1989. **7**(5): p. 541-7.
127. Gutteridge, J.M., *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin Chem, 1995. **41**(12 Pt 2): p. 1819-28.
128. Bedard, L., et al., *Quantitative studies on the peroxidation of human low-density lipoprotein initiated by superoxide and by charged and neutral alkylperoxyl radicals*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(50): p. 12439-48.
129. Alessi, M., et al., *The contrasting kinetics of peroxidation of vitamin E-containing phospholipid unilamellar vesicles and human low-density lipoprotein*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(24): p. 6957-65.
130. Davies, M.J., L.G. Forni, and R.L. Willson, *Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions*. Biochem J, 1988. **255**(2): p. 513-22.
131. Packer, J.E., T.F. Slater, and R.L. Willson, *Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C*. Nature, 1979. **278**(5706): p. 737-8.
132. Weller, R., et al., *Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate*. J. Invest. Dermatol., 1996. **107**: p. 327-331.
133. Feelisch, M. and J. Stamler, *Donors of nitrogen oxides*. Methods in Nitric Oxide Research, ed. F.M.a.S. JS. 1996, Chichester, UK: Wiley. 71-115.
134. Dawson, T.M. and S.H. Snyder, *Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain*. J Neurosci, 1994. **14**(9): p. 5147-59.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	signifikant
+	mit
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
µs	Mikrosekunde
¹O₂	Singulett-Sauerstoff
Act	Zytokin-aktiviert
ATP	Adenosintriphosphat
BH₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CLD	Chemolumineszenz-Detektion
cm	Centimeter
cm²	Quadratcentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Con.	Kontrolle
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
Cu²⁺	2-fach positiv geladenes Kupferion
d	day, Tag
d. h.	das heißt
DAF-2DA	Diaminofluoreszein-2 Diacetat
DETA/NO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniomethyl)amino]diazene-1-ium 1,2diolat
DMSO	Dimethylsulfoxid
e_{aq}	aquatisiertes Elektron
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
et al.	Et alii, und andere
etc.	et cetera
FADH₂	Flavin-adenin-dinucleotid (reduziert)

FAMOS	Faraday-Modulationsspektroskopie
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
x g	x-fache Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, Glutamyl-Cysteinyl-Glycin
H⁺	Proton
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	in Zellkultur (im Reagenzglas)
<i>in vivo</i>	am Lebenden
Inh	inhibiert
J/cm²	Joule/Quadratmeter
KCL	Kalium-Chlorid
kD	kiloDalton
kg	Kilogramm
L-NIO	N-iminoethyl-L-ornithin, NOS-Inhibitor
L-NMMA	N ⁹ -monomethyl-L-Arginin; 1 mM), NOS-Inhibitor
m²	Quadratmeter
mg	Milligramm
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
N₂	Stickstoff
N₂O₃	Distickstofftrioxid
NaCl	Natrium-Chlorid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NEM	N-ethyl-maleimide
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NO•	Stickstoffmonoxid
NOD	Stickstoffmonoxid-Derivate

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase(n)
O₂	Sauerstoff
O₂^{-•}	Superoxidanion
O₃	Ozon
OH•	Hydroxylradikal
ONNO⁻	Peroxynitrit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (pro Hydrogeni)
ppb	parts per billion (Teil pro Milliarde)
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert
QCL	Quanten-Kaskaden-Lasers
RNA	ribonucleic acid
RNO	Nitrosoverbindungen
RNS	reactive nitrogen species, reaktive Stickoxid-Spezies
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
TRL	Trolox
U	Unit(s)
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
UVA	Ultraviolettes Licht, Wellenlängenbereich 320 nm-400 nm
Vit C	Vitamin C, Ascorbatsäure
z.B.	zum Beispiel

9 Curriculum vitae

Zur Person

Name: Christian Opländer
Geburtsdatum: 21.06.1975
Geburtsort: Hilden
Familienstand: Verheiratet seit dem 29.05.2008
mit Emily Karin Chavez Linares
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Werdegang

09/1981 – 06/1985 Grundsschule Südstrasse, Solingen
09/1985 – 06/1992 Albert – Schweitzer – Realschule Solingen
Abschluss: Fachoberschulreife mit Qualifikation
09/1992 – 06/1996 Geschwister – Scholl – Gesamtschule, Solingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
07/1996 – 09/1997 Zivildienst: Krankenhaus und Altenheime der Diakonie Bethanien, Solingen
10/1997 – 06/2004 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Immunologie und Molekularbiologie an der HH - Universität Düsseldorf.
Abschluss: Diplom-Biologe
Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung der entzündungsinduzierenden Signaltransduktion nach UVA - und UVB – Strahlungsexposition“.
07/2004 – 04/2005 Orientierungsphase mit Aufenthalte und Praktika in Frankreich, Chile, Argentinien, Bolivien, Peru. Pflegepraktikum in der internistischen Station und Tagespflegehaus der Lukas Klinik, Solingen
05/2005 – 02/2006 Unendgeldliche Nebentätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter von Priv. Doz. Dr. rer. nat. C. Suschek im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, HH - Universität Düsseldorf, Themenschwerpunkt: „Nicht-enzymatische NO-Generierung in dermalen Zellen“.
Seit 03/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie der RWTH-Aachen

10 Danksagung

Meinen großen Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Christoph Suschek für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung in allen Bereichen. Besonderen Dank für seine unerschöpfliche Geduld, Großzügigkeit und Optimismus.

Großen Dank an Univ.-Prof. Dr. Dr. Prof. h.c. (RC) Norbert Pallua für die Ermöglichung meiner Promotion.

Meinen Dank gilt auch Prof. Dr. Rainer Fischer und Prof. Dr. Klaus Wolf für die uneigennützigere Bereitschaft meine Promotion zu betreuen.

Dank gilt auch an Dr. Dr. Miriam Cortese für ihre technische Unterstützung und fachliche Kompetenz.

Danke auch an Dr. Wiebke Wetzel, Marija Lenzen, Christa Wilkens Roth für alles.

Danke auch an Apothekerin Jutta Trzeziak fürs Korrekturlesen unter erschwerten Bedingungen. Hoffen wir mal, dass wir nicht soviel übersehen haben.

Danke an meine Familie, die mehr Zeit, Energie und Geduld abverlangte als notwendig.

Danke auch an Mirco Röhle für gelegentliches mentales Training.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Labors der Plastischen Chirurgie, insbesondere Andrea Fritz und Tanja Wollersheim für stetige Unterstützung, Verköstigung und nette Diskussionen.

Vielen Dank an meine Frau Emily, denn reine Wissenschaft alleine ist keine Lebensgrundlage.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift