

Klinik und Poliklinik
für Dermatologie und Allergologie am Biederstein
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Ring)

**Untersuchungen zum UVA-induzierten oxidativen Stress mittels
direkter Chemilumineszenzdetektion an kultivierten Keratinozyten,
kultivierten Fibroblasten und einem In-vitro-Lipidoxidationsmodell**

Jessica Merkl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. D. Abeck
2. Univ.- Prof. Dr. Dr. J. Ring

Die Dissertation wurde am 04.06.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2002 angenommen.

In Dankbarkeit
meinen Eltern und meinen Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	S.	3
Abkürzungen	S.	7
1. Einleitung	S.	8
1.1 UV-Strahlung	S.	9
1.2 Zelluläre Strukturen der Haut	S.	10
1.3 Weitere wichtige Bestandteile der Epidermis	S.	10
1.3.1 Riboflavin (Vitamin B2)	S.	10
1.3.2 Linolsäure	S.	11
1.3.3 Histidin	S.	11
1.3.4 Urocaninsäure	S.	11
1.3.5 Eisen	S.	12
1.4 Lipidperoxidation	S.	12
1.5 Enzymatische Antioxidantien	S.	13
1.6 Untersuchungen zur Chemilumineszenz im humanen System	S.	14
1.7 Ziel dieser Arbeit	S.	15
2. Material und Methoden:	S.	16
2.1 Zellkultivierung	S.	16
2.1.1 Materialien	S.	16
2.1.1.1 Geräte	S.	16
2.1.1.2 Chemikalien	S.	16
2.1.1.3 Nährmedien	S.	17

2.1.1.4	Verbrauchsmaterialien	S.	17
2.1.2	Patienten	S.	17
2.1.3	Methoden	S.	18
2.1.3.1	Sterile Arbeitsbedingungen	S.	18
2.1.3.2	Primärkultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten	S.	18
2.1.3.3	Kultivierung von Keratinozyten der Zelllinie HaCat	S.	20
2.1.3.4	Zellpassagierung	S.	21
2.1.3.5	Kryokonservierung von Zellen zur Langzeit- konservierung	S.	21
2.2	Chemilumineszenzmessungen	S.	22
2.2.1	Chemilumineszenzmessungen bei der Keratinozyten- linie HaCat, den Keratinozytenprimärkulturen und den Fibroblastenprimärkulturen	S.	24
2.2.1.1	Material	S.	24
2.2.1.1.1	Geräte	S.	24
2.2.1.1.2	Substanzen	S.	24
2.2.1.2	Methode	S.	24
2.2.1.2.1	Vorbereitung der Zellsuspensionen	S.	24
2.2.1.2.2	Vorbereitung der Messgefäße mit konfluent gewachsenen Zellen	S.	25
2.2.1.2.3	Chemilumineszenzmessungen der Zellsuspensionen und der Zellmonolayer	S.	26
2.2.2	Chemilumineszenzmessungen bei einem in vitro-Lipidoxidationsmodell	S.	27
2.2.2.1	Chemilumineszenzmessungen der Linolsäure in Verbindung mit dem Chromophor Riboflavin	S.	27
2.2.2.1.1	Material	S.	27
2.2.2.1.1.1	Geräte	S.	27
2.2.2.1.1.2	Substanzen	S.	27
2.2.2.1.2	Methode	S.	27
2.2.2.2	Chemilumineszenzmessungen von Histidin und Urocaninsäure	S.	28
2.2.2.2.1	Material	S.	28

2.2.2.2.1.1	Geräte	S.	28
2.2.2.2.1.2	Substanzen	S.	28
2.2.2.2.2	Methode	S.	28
3. Ergebnisse:			S. 30
3.1	Chemilumineszenzmessungen bei der Keratinozytenlinie HaCat, den Keratinozytenprimärkulturen und den Fibroblastenprimärkulturen	S.	30
3.2	Chemilumineszenzmessungen bei einem in vitro-Lipidoxidationsmodell	S.	32
3.2.1	Chemilumineszenzmessungen der Linolsäure in Verbindung mit dem Chromophor Riboflavin	S.	32
3.2.1.1	Kontrolle der Chemilumineszenz-Parameter	S.	34
3.2.1.2	Abhängigkeit der Chemilumineszenz vom pH-Wert	S.	35
3.2.1.3	Differenzierung der Chemilumineszenz-auslösenden Sauerstoffradikale durch Zugabe enzymatischer Antioxidantien	S.	36
3.2.1.4	Chemilumineszenzmessungen nach Zugabe von Eisen	S.	37
3.2.2	Chemilumineszenzmessungen von Histidin und Urocaninsäure	S.	38
3.2.2.1	Chemilumineszenzmessungen von Histidin	S.	38
3.2.2.2	Chemilumineszenzmessungen der trans-Urocaninsäure	S.	39
3.2.2.3	Chemilumineszenzmessungen der trans-cis-Urocaninsäure	S.	40
3.2.2.4	Differenzierung der Chemilumineszenz-auslösenden Sauerstoffradikale durch Zugabe von Katalase und SOD	S.	41
3.2.2.4.1	Veränderungen unter Zugabe von Katalase	S.	41
3.2.2.4.2	Veränderungen unter Zugabe von SOD	S.	44

4. Diskussion:	S.	47
4.1 Zelluläre Strukturen	S.	47
4.2 Lipidperoxidation	S.	48
4.3 Linolsäure	S.	49
4.4 Antioxidantien – Unterschiede bei Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu Normalprobanden	S.	50
4.5 Eisen	S.	51
4.6 Histidin und Urocaninsäure	S.	51
4.6.1 Histidin	S.	51
4.6.2 Urocaninsäure	S.	52
5. Zusammenfassung	S.	54
6. Literatur	S.	55
7. Danksagung	S.	62
8. Lebenslauf	S.	63

Abkürzungen:

AE	= atopisches Ekzem
c-AMP	= cyclisches Adenosinmonophosphat
CL	= Chemilumineszenz
CO*	= Triplettketone
c-UCA	= cis-Urocaninsäure
DMEM	= Dulbecco´s modified Eagle Medium
EGF	= epidermaler Wachstumsfaktor
FS	= Fettsäure
FSLW	= Fettsäureleerwert
IFN γ	= Interferon γ
IL1 β	= Interleukin 1 β
IL4	= Interleukin 4
KJ	= Kilo-Joul
K-SFM	= Keratinozyten-SFM-Medium
LH	= ungesättigte Fettsäure
L*	= Lipidradikal
LOO*	= Lipidperoxyradikal
LOOH	= Lipidperoxid
NADH	= reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	= reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
PBS	= phosphate buffered saline
RHE	= Rinderhypophysenextrakt
ROS	= reaktive Sauerstoffspezies
S0	= Grundzustand
S1	= Singulett-Zustand
SOD	= Superoxiddismutase
STABW	= Standardabweichung
T1	= Triplettzustand
t-c-UCA	= trans-cis-Urocaninsäure
TNF α	= Tumornekrosefaktor α
U	= Units
UCA	= Urocanic acid (Urocaninsäure)
UV	= Ultraviolett

1. Einleitung

Molekularer Sauerstoff ist ein essentieller Bestandteil des menschlichen Gewebes. Durch seine Funktion als Elektronen-Akzeptor in oxidativen Prozessen stellt er die für die Vitalität des Gewebes notwendige Energie zur Verfügung. Ein Mangel an Sauerstoff gefährdet die Zellfunktionen und führt letztendlich zum Zelltod. Die kontrolliert endogen entstehenden, reaktiven Sauerstoffspezies haben in physiologischen Konzentrationen kaum zellschädigende Wirkung, sondern sind Bestandteil verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Sie haben damit eine wichtige Funktion bei immunologischen Reaktionen und bei Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptoseereignissen. [55]

Auf der anderen Seite kann Sauerstoff aber an pathologischen Prozessen beteiligt sein, die unter Umständen zur oxidativen Zerstörung von Gewebe führen. Die nicht nur durch enzymatische, sondern auch durch nichtenzymatische Mechanismen entstehenden reaktiven Sauerstoffformen können nahezu alle in lebenden Strukturen vorkommende Verbindungen oxidativ verändern und teilweise auch beschädigen. [46]

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zählen radikalische Sauerstoffverbindungen, wie das Superoxidanion (O_2^-) und das Hydroxylradikal (HO^\cdot), aber auch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid und organische Peroxide. [55]

Oxidativer Stress der Haut kann durch endogene und exogene Faktoren entstehen. Zu den endogenen Faktoren gehören Entzündungsreaktionen, aber auch bestimmte physiologische Signaltransduktionskaskaden, an denen Sauerstoff beteiligt ist.

Die endogen überschießende Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder ihre verminderte Inaktivierung werden auch verdächtigt, in der Pathogenese von Autoaggressions-Krankheiten und bei malignen Lymphomen im Rahmen einer Trisomie 21 eine Rolle zu spielen. Auf der anderen Seite führt eine verringerte Sauerstoffaktivierung gehäuft zu Infektionen mit septischen Komplikationen. [15]

Unter den exogenen Faktoren, die zur Sauerstoffradikalbildung führen, spielt das ultraviolette Licht als physikalische Noxe die wichtigste Rolle.

1.1 UV-Strahlung

Die UV-Strahlung der Sonne, die auf der Erde auftrifft, setzt sich zusammen aus der UVB-Strahlung (290-320nm) und der UVA-Strahlung (320-380nm).

Je höher die Wellenlänge der auf der Haut auftreffenden Strahlung ist, um so tiefer kann sie in die Haut eindringen. In normaler Haut liegt der Anteil der UVB-Strahlen, die durch die Basalschicht der Epidermis tritt, bei 1 - 10%, während fast 20% einer UVA-Strahlung von 365nm diese Schicht durchdringt. [51]

Eine UV-Bestrahlung der Haut führt zu kurzfristigen, reversiblen Reaktionen wie Erythembildung und Pigmentation und zu langfristigen permanenten Reaktionen wie Hautalterung und Karzinogenese.

Während die erythemato gene, lichtalternde und kanzerogene Wirkung von UVB-Strahlung durch direkte Absorption entsteht, verläuft die zellzerstörende, erythemato gene und pigmentierende Wirkung der UVA-Bestrahlung über den Mechanismus der Oxidradikalbildung, wobei für diese Reaktion das Vorhandensein von Sauerstoff notwendig ist. Aber auch die Existenz verschiedener sogenannter Chromophore, die als Photosensibilisatoren fungieren, ist für die UVA-induzierte Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies wahrscheinlich eine wichtige Voraussetzung. [30,11]

Bei der in der Haut entscheidenden photochemischen Anregung werden diese Photosensibilisatoren wie Riboflavine, Flavinnukleotide, Porphyrine, Billirubin, Urocaninsäure (UCA), Tryptophan u. a. durch Licht angeregt. Diese Photosensibilisatoren übertragen die Energie auf den Triplett-Sauerstoff, woraufhin dieser in den angeregten Singulettzustand übergeht. [55]

Zusätzlich kommt es bei der UV-Bestrahlung zu einer vorübergehenden Erhöhung des Eisengehaltes, was seinerseits zu einer Erhöhung der Sauerstoffradikalbildung beitragen kann. [50]

Im folgenden werden zelluläre und nicht-zelluläre Hautbestandteile besprochen, die für eine verstärkte Bildung von ROS nach UVA-Exposition verantwortlich sein können.

1.2 Zelluläre Strukturen

Die Haut besteht aus zwei Schichten, der äußeren Epidermis und der Dermis, die die Epidermis mit der Subcutis verbindet.

Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel, das lichtmikroskopisch in 4-5 Schichten unterteilt werden kann und lokalisationsabhängig eine Dicke von 0,04-1,5mm aufweist. Die einzelnen Schichten entsprechen den verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten, die mit 85% den größten Anteil der Epidermis darstellen.

Die bindegewebige Dermis ist mesodermalen Ursprungs, ist bis zu 3mm dick und verleiht der Haut hohe Zerreißfestigkeit.

Den Hauptbestandteil der Dermis machen die Fibroblasten aus, während Keratinozyten die vorherrschende Zellpopulation der Epidermis darstellen. [55]

1.3 Weitere Bestandteile der Epidermis

1.3.1 Riboflavin (Vitamin B2)

Riboflavin agiert in der Haut bei UVA-Bestrahlung als Chromophor, d.h. es vergrößert die UVA-induzierte, kutane Reaktion bei Sauerstoff-abhängigen, photodynamischen Reaktionen. Lichtsensibilisiertes Riboflavin wird in Lumichrome und in Lumiflavin zerlegt. Es bildet nach UV-Bestrahlung sowohl Singulett-Sauerstoff, Superoxidanionen als auch Hydrogen Peroxid. [17,41]

Die Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies wird für die Licht-induzierte Hautschädigung verantwortlich gemacht. Vor allem die Produktion von Hydrogenperoxid wird als Hauptursache für die lang anhaltende Zelltoxizität angesehen. [41]

Auf der anderen Seite scheint Riboflavin eine entscheidende Rolle in der Wundheilung zu spielen. In Untersuchungen mit Riboflavin-defizienten Ratten zeigte sich, dass die Wundheilung bei diesen Ratten im Vergleich zu normalen Tieren extrem verzögert war. [22]

1.3.2 Linolsäure

In den Phospholipiden biologischer Membrane sind verschiedene Fettsäuren enthalten, unter denen ungesättigte Fettsäuren einen wichtigen Bestandteil dieser interzellulären Membranen darstellen. [45]

Den quantitativ größten Anteil an ungesättigten Fettsäuren hat die Linolsäure, eine zweifach ungesättigte Fettsäure, deren Anteil an den Gesamtfettsäuren 21,5% beträgt.

Sie besteht aus 18 Kohlenstoffatomen und enthält 2 Doppelbindungen an den C-Atomen 6 und 9. Die Linolsäure spielt in der Epidermis eine entscheidende Rolle bei der Barrierefunktion. [10,14]

1.3.3 Histidin

Histidin, ein Bestandteil des Keratins, entsteht bei der Proteolyse filaggrinhaltiger Keratohyalingranula [19], die bei Patienten mit AE erniedrigt sind. [44] Obwohl Histidin zu den häufigsten Aminosäuren in der Epidermis gehört, weiß man sehr wenig über seine pro- und antioxidativen Eigenschaften.

1.3.4 Urocaninsäure

Die UCA wurde 1874 erstmals in Kaninchenharn entdeckt. Auch im Urin von Hunden konnte sie nach der Gabe hoher Histidindosen nachgewiesen werden, was zur Namensgebung führte (Ouron = griech: der Harn, canis = lat: der Hund). [19]

Die UCA ist neben Melanin eine der wichtigsten Komponenten des Antioxidans- und UV-Filtersystems der Haut. Sie ist auch quantitativ mit 0,2% - 0,7% eine der häufigsten Substanzen in der Epidermis, wobei ihr Vorkommen mit dem Melanisierungszustand der Haut korreliert. Sie spielt eine entscheidende Rolle als endogener UV-Absorber in der Haut.

Das Absorptionsvermögen der UCA liegt zwischen 290nm und 340nm mit einem Absorptionsmaximum bei 310nm.

Von der UCA gibt es zwei verschiedene Isomere, das trans- und das cis- Isomer.

Die trans-UCA entsteht durch Abspaltung einer NH_2 - Gruppe von der Aminosäure Histidin durch das Enzym Histidase. [1]

Durch UV-Bestrahlung wird die Aktivität der epidermalen Histidase und damit der trans-UCA-Gehalt erhöht und die trans-UCA physikochemisch in die energiereichere cis-UCA umgewandelt. Der UCA-Gehalt der Haut unterliegt somit UV-bedingten, jahreszeitlichen Schwankungen und weist sein Maximum im Herbst auf. [19]

Die Histidin-Konzentration wird dagegen durch UV-Bestrahlung nicht verändert. [43]

Bei 310nm, dem Maximum des Aktionsspektrums der Photoisomerisierung, stellt sich ein photostationärer Zustand bei 70% cis-UCA und 30% trans-UCA ein.

Die Isomerisierungsreaktion ist verantwortlich für die UV-Filterfunktion der UCA. Ein Teil der in die Haut gestrahlten Lichtenergie wird durch die Ausbildung der energiereicheren Form der UCA kompensiert und neutralisiert. [1]

Zusätzlich besitzt die UCA immunmodulatorische Mediatorfunktionen. Die cis-UCA hat im Gegensatz zur trans-UCA immunsuppressive Eigenschaften, was die Ursache sein kann für die schon öfter beschriebene Verminderung der Kontakt-Hypersensibilisierung durch UVB-Bestrahlung. [20]

1.3.5 Eisen

Nach UV-Bestrahlung kommt es zu einer Erhöhung des freien Eisens, da die entstehenden Superoxidradikale Eisen aus den Speicherproteinen freisetzen. [50]

Dies führt dann wiederum über die Fenton-Reaktion zusätzlich zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. [29]

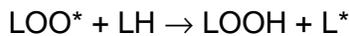
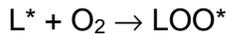
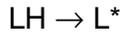
1.4 Lipidperoxidation

Die Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Plasmamembran kann durch UV-Licht-induzierte Oxidradikalbildung ausgelöst werden.

Die Lipidperoxidation wird vor allem durch freie Radikale vermittelt, z.B. die Reaktion eines Hydroxylradikals mit der Methylengruppe einer ungesättigten Fettsäure (LH). Hierbei entsteht ein Lipidradikal (L^*), das wiederum mit molekularem Sauerstoff zum Lipidperoxyradikal (LOO^*) reagiert. Das Lipidperoxyradikal gibt seinen radikalischen Charakter an eine weitere ungesättigte Fettsäure ab und wird dadurch zum Lipidperoxid ($LOOH$). Zusätzlich entsteht aus der ungesättigten Fettsäure ein weiteres

Lipidradikal. (Abbildung 1) Durch diese Kettenreaktion kann der Aufbau und die Funktion der Membrane zerstört werden.

Abbildung 1: Reaktion im Rahmen der Lipidperoxidation [15,55]



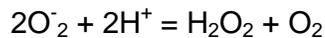
Die mehrfach ungesättigten Lipide sind im allgemeinen die erste Angriffsstelle für freie Radikale. Da sie in biologischen Membranen in großer Anzahl enthalten sind, sind Zellmembrane eine vulnerable Angriffsstelle für Radikale.

Auch die UV-Bestrahlung initiiert die Bildung von Lipidradikalen aus den ungesättigten Fettsäuren. [15,5]

1.5 Enzymatische Antioxidantien

Aerobe Zellen verfügen über mehrere antioxidative Enzyme, die das Gewebe schützen, indem sie die zerstörende Wirkung der Oxidradikal-Bildung abschwächen. Zu diesen Enzymen gehören die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase und verschiedene Peroxidasen.

Die SOD ist ein Metallprotein, das die Reaktion vom Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff in folgender Weise katalysiert:



Die Katalase, ein Hämprotein, katalysiert die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff gemäß folgender Reaktion:



Organische Hydroperoxide, die durch Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies entstehen, können durch Peroxidasen, wie z.B. die Gluthationperoxidase, nach folgendem Reaktionsmuster entgiftet werden:



Neben praktisch allen organischen Peroxiden kann die Gluthationperoxidase ebenfalls Wasserstoffperoxid reduzieren. [40]

Bei kultivierten humanen Keratinozyten kommt es nach der Provokation mit Peroxiden zu einem deutlichen Absinken des GSH/GSSG-Verhältnisses. [53]

1.6 Untersuchungen zur Chemilumineszenz im humanen System

Campell und Mitarbeitern etablierten eine In-vivo-CL-Messmethode der Haut, bei der in einem lichtundurchlässigem, temperiertem Gehäuse mittels eines Photomultipliers die CL gemessen werden kann. [9]

Nach UV-Exposition mit 500 mJ/cm² des rechten Handrückens bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit atopischem Ekzem (AE) konnte ein erhöhtes CL-Signal detektiert werden, das bei Patienten mit AE stärker war als bei gesunden Probanden. [2]

In anderen Studien zeigte sich, dass Granulozyten von Patienten mit AE nach Stimulierung mit N-Formyl-Met-Leu-Phe, Platelet Activating Factor, IL5, opsonierten Zymosanpartikeln, TNF α oder GM-CSF vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bilden. [18,27]

Da aber in der gesunden Haut und in unbefallener Haut von Patienten mit AE fast keine Granulozyten zu finden sind, liegt die Vermutung nahe, dass die beobachtete CL nicht auf diese Zellpopulation zurückzuführen ist.

In einer Studie von Villiotou und Deliconstantinus konnte bereits an humanen, maligne transformierten Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung ein Luminolverstärktes CL-Signal induziert werden. [54]

Aber nicht nur Zellen, sondern auch andere Strukturen der menschlichen Haut können für die Oxidradikalbildung verantwortlich sein, wie beispielsweise ungesättigte Fettsäuren. Insbesondere könnte eine quantitative Vermehrung der Linolsäure, die in der Epidermis den quantitativ größten Anteil an den ungesättigten Fettsäuren bildet, über die Lipidperoxidation eine erhöhte Oxidradikalbildung induzieren.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird in-vivo durch sogenannte Chromophore verstärkt. Es kommt zu einer Erhöhung der gemessenen CL durch Riboflavin, Lumiflavin oder Lumichrome. Diese Substanzen kommen in der Epidermis vor und stellen sehr effektive Chromophore dar, die für eine Entstehung der gemessenen CL verantwortlich sein können. [17]

Auch die UCA, die mit 0,2 - 0,7% ein wichtiger Bestandteil der Epidermis ist, sowie Histidin könnten mit Hilfe eines Chromophors die Fähigkeit besitzen, Oxidradikale zu bilden.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Bestandteile der menschlichen Haut für die erhöhte Chemilumineszenz (CL) nach UVA-Bestrahlung verantwortlich sein können.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultivierung

2.1.1 Materialien

2.1.1.1 Geräte

Werkbank: Lamin Air HBB 2448, Firma Heraeus Instruments

CO₂-begaster Brutschrank: Function Line, Firma Heraeus Instruments

Phasenmikroskop: Nikon TMS-F, Firma Nikon, Japan

Zentrifuge: Hettich Rotanta, Firma Carl Zeiss, Göttingen

Wasserbad: GFL 1012, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

pH-Meter: Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Waage: Sartorius BP110S

Pipettierhilfe

Sterile Schere

Sterile Pinzette

2.1.1.2 Chemikalien

PBS-Puffer (phosphate buffered saline) ohne Calcium und Magnesium: Firma Life Technologies, Schottland

Rinderserum (BSA): Firma Serva, Heidelberg

Trypsin-EDTA-Lösung: Firma Boehringer, Mannheim

Dispase Grade II: Firma Boehringer, Mannheim

Penicillin-Streptomycin-Lösung: Firma Sigma

Gentamycin: Firma Life Technologies

Tryptan-Blau-Lösung: Firma Sigma

Ethanol 70%: Apotheke des Klinikum Rechts der Isar, München

2.1.1.3 Nährmedien:

Keratinocyten-SFM, supplementiert mit Rinderhypophysenextrakt RHE (25 µg/ml) und epidermalem Wachstumsfaktor EGF (0,1 ng/ml): Firma Life Technologies

Dulbeccos` modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% foetalem Kälberserum: Firma Life Technologies

Einfriermedium: DMEM mit 10% Zusatz von fötalem Kälberserum, 10% Dimethylsulfoxid und 100µg/ml Penicillin-Streptomycinlösung

2.1.1.4 Verbrauchsmaterialien:

6-Lochplatten: Firma Nunclon, Dänemark

Zellkulturflaschen: Firma Nunclon, Dänemark

Petrischalen: Falcon 1029, Firma Becton Dickinson, New Jersey, USA

Sterile Pasteurpipette

Sterile Zentrifugenröhrchen

Sterile Kanüle

Verschließbare Kryoröhrchen

2.1.2 Patienten:

Die Keratinocytenprimärkulturen wurden aus Hautproben von Patienten der Klinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München gewonnen.

Ausgewählt wurden Patienten mit AE sowie Patienten, bei denen keine Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis bestand.

2.1.3 Methoden:

2.1.3.1 Sterile Arbeitsbedingungen

Zur Bearbeitung der Hautbiopsien und Zellkulturen überführten wir diese in eine Reinraumwerkbank, die vorher mit Ethanol (70%) gereinigt und ausgesprüht wurde.

Die Zellkulturflaschen und die Falcontubes, in denen sich Zellen oder Hautbiopsien befanden, sprühten wir vor dem Einbringen in die Werkbank mit Ethanol (70%) ab.

Die verwendeten Materialien wurden vor dem Gebrauch steril verpackt und autoklaviert oder waren steril verpackte Einmalprodukte.

Vor dem Einbringen in die sterile Werkbank wurden sie ebenfalls mit Ethanol (70%) besprüht.

Während des Arbeitens sprühten wir die benützten Gegenstände mehrfach ab, oder flammten sie über dem Bunsenbrenner ab. Die Arbeiten in der Reinraumwerkbank verrichteten wir so, dass sich weder die Hände des Laborpersonals noch die unsterilen Anteile der verwendeten Materialien oberhalb der Zellkulturen befanden, da die Luftbewegung des Lamin Air Flows von oben nach unten geht.

Während des Arbeitens an der sterilen Werkbank trugen wir Einmalhandschuhe und Labormäntel. Die Einmalhandschuhe wurden vor und mehrfach während des Arbeitens mit Ethanol (70%) abgesprüht.

Auch der Brutschrank, in dem die Zellen inkubiert waren, wurde regelmäßig gereinigt und mehrfach zwischendurch mit Ethanol (70%) ausgewischt.

2.1.3.2 Primärkultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten:

Für unsere Versuche züchteten wir Keratinozyten und Fibroblasten als Monolayer, die sich in der Grundlagenforschung bewährt haben. Als Ausgangsmaterialien nahmen wir Hautbiopsien verschiedener Körperstellen von Patienten mit AE und hautgesunden Patienten.

Nach ausführlicher Aufklärung der Patienten und deren Einverständnis wurde unter aseptischen Bedingungen in Lokalanästhesie mittels Punchbiopsie eine Hautbiopsie entnommen. Die Biopsie, die epidermale und dermale Anteile enthielt, wurde danach bei +4°C in Keratinozytenmedium mit Gentamycin (5 µg/ml) gelagert. Genatamycin

diente hierbei der Reduktion der Hautkeime und der Kontaminationsprophylaxe durch andere Keime.

Zur Weiterverarbeitung überführten wir das Transportgefäß in die Reinraumwerkbank, um Kontaminationen bei den folgenden Arbeitsvorgängen zu vermeiden.

Die bei der Biopsie gewonnene Haut wurde in einer sterilen Petrischale mit PBS-Lösung, mit Hilfe von Schere und Pinzette, ausgedünnt, indem wir das Fettgewebe bis zum Korium abtrugen. Anschließend wurde sie in 1mm x 1mm große Stücke zerschnitten.

Nachdem wir in die verschiedenen Löcher einer 6-Loch-Platte 70-prozentigen Ethanol, Dispase, Trypsin und zweimal PBS gegeben hatten, desinfizierten wir die Hautstücke in Ethanol, spülten sie in PBS und gaben sie dann in die Dispase-Lösung.

Damit die Verbindung zwischen Epidermis und Dermis gelöst werden konnte, wurde die 6-Loch-Platte verschlossen und im Brutschrank für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation trennten wir in einer mit PBS gefüllten, sterilen Petrischale die epidermale Schicht der Keratinozyten mechanisch mit einer sterilen Kanüle von der Dermis.

Die Dermis-Stücke wurden mit einer sterilen Pinzette auf den Boden einer sterilen T-75-Kulturflasche gelegt, die dann - ohne Medium zuzugeben - in den Brutschrank gestellt wurde, der eine Temperatur von 37°C aufwies. Die Epidermis spülten wir nochmals mit PBS und inkubierten sie danach für ca. 10 Minuten in einer 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung. Dabei wurde das Material mit einer sterilen Pasteurpipette mehrmals hochgezogen, um die Zellen zu dissoziieren.

Das Übertreten der Keratinozyten in Suspension korreliert makroskopisch mit einer Eintrübung der Trypsinlösung, die mikroskopisch unter dem Phasenmikroskop kontrolliert wurde.

Danach wurde die Enzymaktivität der Trypsinlösung durch die Zugabe von α 1-Antitrypsin, das in DMEM enthalten ist, gestoppt.

Die Stratum corneum-Stückchen wurden anschließend mit der Kanüle abgefischt, und die Einzelzellsuspension bei +4°C 10 Minuten bei 500rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit DMEM-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach resuspendierten wir das Zellpellet mit Keratinozytenmedium (K-SFM).

Die Zelldichte und die Vitalität der Zellen bestimmten wir in einer Neubauer-Zählkammer. 20 μ l der Zellsuspension wurden mit Trypanblau gefärbt und in die

Neubauer-Zählkammer eingebracht. Unter dem Phasenmikroskop ermittelten wir nun die Zellkonzentration und die Vitalität der Zellen. Bei den abgestorbenen Zellen färbte sich nicht nur die Zellwand, sondern auch das Zytoplasma blau. Ihr Anteil sollte 10% nicht überschreiten.

Die Primärzellen wurden, in einer Dichte von 3×10^6 Zellen in T-75-Flaschen ausgesät. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5ml Keratinozytenmedium, das mit 5% fötalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin-Lösung supplementiert worden war.

Bei den Fibroblasten erfolgte erstmals nach 24 Stunden die Zugabe von DMEM-Medium. Ansonsten erfolgte bei Fibroblasten und bei Keratinozyten alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel.

Sobald die Zellen konfluent in den Kulturflaschen gewachsen waren, konnten sie trypsiniert und in neuen Kulturflaschen ausgesät werden.

2.1.3.3 Kultivierung von Keratinozyten der Zelllinie HaCat:

Wir verwendeten Keratinozyten aus der Zelllinie HaCat, die freundlicherweise von Prof. Fusening aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden.

Für den Transport von Heidelberg nach München wurden die Keratinozyten in DMEM-Medium gelagert, das mit 5% fötalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin-Lösung supplementiert war.

Wir inkubierten die Zellen nach ihrer Ankunft bei 37°C und pipettierten anschließend das Medium bis auf 5ml ab.

Unter erneuter Inkubation bei 37°C warteten wir nun ab, bis die Zellen konfluent gewachsen waren, um sie in neue Kulturflaschen zu passagieren.

Der Mediumwechsel bei den Zellkulturen wurde alle 2 bis 3 Tage vorgenommen, wobei das alte Medium mit Hilfe einer sterilen Pipette jeweils abgesaugt wurde.

Anschließend wurden die Zellkultur zweimal mit der PBS-Lösung über jeweils 5 Minuten gespült.

Zuletzt gaben wir frisches Medium zu, das mit einer Penicillin-Streptomycin-Lösung versetzt wurde, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

2.1.3.4 Zellpassagierung:

Zur Zellpassagierung wurde das Zellmedium aus den konfluent bewachsenen Kulturflaschen abgesaugt und zweimal mit PBS gespült. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 5ml der Trypsinlösung auf die Zellen mit nachfolgender circa 5-minütiger Inkubation bei 37°C, bis die Zellen sich vom Flaschenboden lösten und in Suspension gingen. Beschleunigt wurde die ca. 10 Minuten dauernde Reaktion durch Klopfen der Kulturflasche an die Tischkante. Um den Zeitpunkt der Lösung der Zellen zu erkennen, erfolgten regelmässige Kontrollen unter dem Phasenmikroskop.

Sobald sich die Zellen gelöst hatten, gaben wir etwa 9ml des mit 10% foetalem Kälberserum versetzten Fibroblastenmediums in die Kulturflasche mit anschliessender Überführung des gesamten Inhalts in ein Zentrifugenreagenzgefäß. Nach dem Zentrifugieren pipetierten wir den Überstand ab und resuspendierten die Zellen erneut in dem Fibroblastenmedium. Anschließend wurde die Lösung erneut zentrifugiert, nochmals resuspendiert und wiederum zentrifugiert.

Nach Zugabe des geeigneten Mediums wurde die Zellsuspension in vier neue Kulturflaschen gegeben und jeweils bis auf 5ml Medium aufgefüllt.

2.1.3.5 Kryokonservierung von Zellen zur Langzeitkonservierung:

Zur Langzeitlagerung können Keratinozyten und Fibroblasten kryokonserviert werden. Die trypsinierten und zweimal mit Zellmedium gewaschenen Zellen wurden abzentrifugiert. Das Einfriermedium wurde auf 37°C erwärmt, und die Zellen wurden im Verhältnis 10:1 (Medium/Zellpellet) im Einfriermedium resuspendiert.

Danach wurden jeweils 1,8 ml der Zellsuspension in die Tiefgefriereröhrchen pipettiert und bei 500rpm für 2 Minuten abzentrifugiert. Das Medium saugten wir nun bis auf 1ml ab.

Die Tiefgefriereröhrchen wurden gut verschlossen in einen Styroporbehälter mit einer Wandstärke von 2-4 cm gegeben. Die Zellen konnten wir in diesem Behälter für mehrere Monate in einem -80°C Tiefgefrierschrank lagern.

Zur längeren Konservierung nahmen wir die Zellen nach etwa 12 Stunden aus dem Tiefgefrierschrank und überführten sie in einen Flüssigstickstoffbehälter. Dazu gaben wir die Tiefgefriergefäße in den Einfrierstopfen des Flüssigstickstoffbehälters und

hängen sie für 2 Stunden in die Dampfphase des Behälters (-150°C). Danach kamen die Röhrcchen in spezielle Gestelle in die Flüssigphase der Stickstoffbehälter.

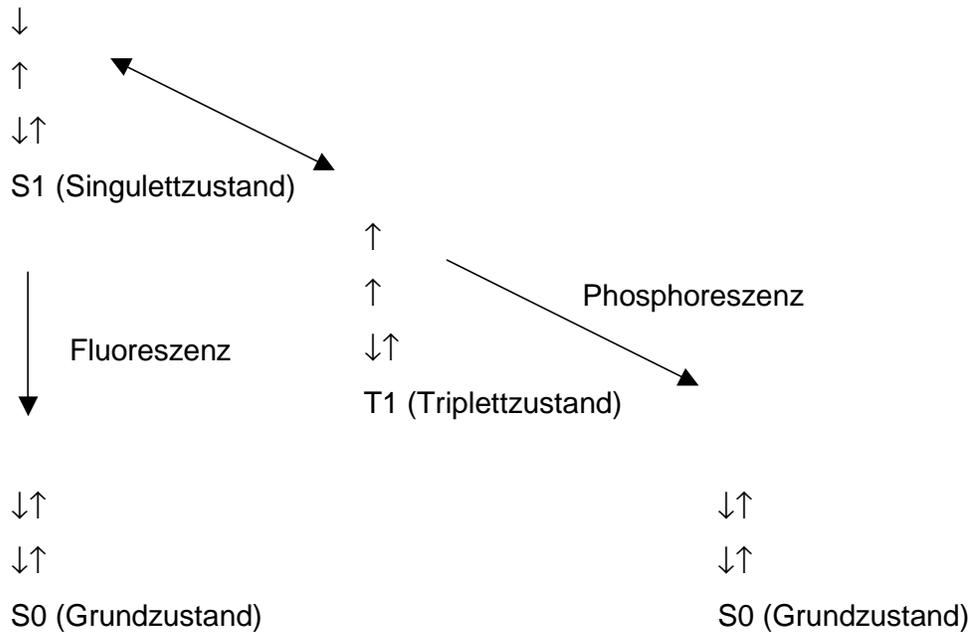
2.2 Chemilumineszenzmessungen

CL ist eine elektromagnetische Strahlung, die von Atomen oder Molekülen emittiert wird, die sich als direkte Folge einer stark exergonen (Energie-freisetzenden) Reaktion in einem elektronisch angeregtem Zustand befinden. Für analytische Zwecke wird die Strahlung gemessen, die im sichtbaren Spektralbereich (400 - 700 nm) liegt.

Um eine sichtbare Lichtemission zu erzeugen, muss dem System ein exergoner Prozess zugrunde liegen, der eine Reaktionsenthalpie zwischen 168 und 294 KJ/Mol liefert. Es muss ein energiereiches Intermediat entstehen, welches eine Konversion von chemischer in elektronische Anregung eines Reaktionsproduktes gestattet. Beim Übergang des elektronisch angeregten Reaktionsproduktes in den Grundzustand wird CL freigesetzt.

Die Mehrzahl der CL-Reaktionen erfolgt von einem sehr kurzlebigen angeregten Singulett-Zustand (S1). Diese Reaktionen sind damit identisch mit der Fluoreszenz. Der langlebige Triplettzustand (T1) kehrt entweder unter Emission der langwelligen Phosphoreszenz in den Grundzustand (S0) zurück, oder er erreicht durch thermische Aktivierung den Singulettzustand (sogenannte verzögerte Fluoreszenz). [3] (siehe Abbildung 2)

Abbildung 2: Fluoreszenz und Phosphoreszenz [3]:



Die Hauptquellen für Singulett-Sauerstoff im Organismus sind Systeme, die

1. mit organischem Sauerstoff reagieren, wie die aus der Lipidperoxidase entstehenden Lipidperoxyradikale,
2. Reaktionen reduzierter Sauerstoff-Zwischenprodukte einbeziehen und
3. eine enzymatische Aktivierung von Sauerstoff beinhalten.

Die direkte CL-Detektion ist ein sehr sensitives Verfahren, um Moleküle im angeregten Zustand nachzuweisen und stellt somit eine sehr effektive Nachweismethode für oxidative Prozesse in Zellen und in Gewebe dar. Da es sich bei der CL-Messung um eine nicht-invasive Messmethode handelt, ermöglicht sie nicht nur In-vitro-, sondern auch In-vivo-Messungen und damit auch einfacher durchzuführende Verlaufskontrollen. [7,45]

Die Lichtemission der Probe wird nach der Single-Photon-Methode mit einem Frequenzzähler ermittelt. Für die Kammer, in der die Probe gemessen wird, ist entscheidend, dass Fremdemissionen und Selbstemissionen ausgeschaltet werden und dass die Platzierung der Probe relativ zur Lichtmesseinrichtung exakt reproduzierbar ist. [25]

2.2.1 Chemilumineszenzmessungen bei der Keratinozytenlinie HaCat, den Keratinozytenprimärkulturen und den Fibroblastenprimärkulturen

2.2.1.1 Material:

2.2.1.1.1 Geräte:

Berthold Bioluminat LB 9500 T, Waldmann UV 180

2.2.1.1.2 Substanzen:

PBS Puffer pH 7,2: Firma Life Technologies

IL4, TNF α , IFN γ , IL1 β , PDGF: Schubert/Weiss, Becton/Dickinson und Firma Sigma

Zymosan A: Firma Sigma

SOD: Firma Sigma

Katalase: Firma Sigma

Luminol: Firma Sigma

Hämin: Firma Sigma

2.2.1.2 Methode:

Die CL-Messungen wurden sowohl an Zellsuspensionen, an Zell-Monolayern, an Zellüberständen und PBS durchgeführt.

2. 2.1.2.1 Vorbereitung der Zellsuspension:

Bei den Messungen mit den Zytokinen IL4, TNF α , IFN γ , PDGF und IL1 β in Konzentrationen von 20pg/ml bis 10ng/ml wurde die Zellkultur vor der Verarbeitung über einen Zeitraum von 30 Minuten, 4 Stunden und 24 Stunden mit den jeweils zu untersuchenden Zytokinen inkubiert.

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden - wie bereits oben beschrieben - trypsiniert und zweimal mit DMEM-Medium gespült und abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und in der Neubauer-Zählkammer - nach Färbung mit Trypanblau - unter dem Phasenmikroskop ausgezählt.

In den verschiedenen Konzentrationen wurden die Zellsuspensionen nun in spezielle CL-Reaktionsgefäße überführt.

Für die Stimulation mit Zymosan A wurden 10mg Zymosan A und 10ml PBS ohne Calcium für 90 Minuten auf 99°C erhitzt, anschliessend mit 3000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde 1ml PBS und 3ml menschliches Serum zugegeben und bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde die Suspension erneut zweimal mit PBS gewaschen, auf 1ml resuspendiert und eingefroren.

Vor der Messung wurden die Zellen mit 1ml dieser Zymosan A-Suspension und 10ml Keratinozytenmedium bei 37°C für 5 Stunden inkubiert, zweimal mit Keratinozytenmedium gewaschen und in PBS mit Calcium für die Messung resuspendiert.

2. 2.1.2.2 Vorbereitung der Messgefäße mit konfluent gewachsenen Zellen:

24 Stunden vor der CL-Messung wurden die Zellen trypsiniert, zweimal mit DMEM-Medium gespült und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen wieder in Medium aufgenommen (Keratinozyten in KBM2, Fibroblasten in DMEM). Nach einer Vitalitäts- und Dichtemessung erfolgte jeweils die Zugabe von 1ml der Zellsuspensionen in verschiedenen Konzentrationen in die CL-Reaktionsgefäße. Durch stündliches Wenden der möglichst waagrecht im Brutschrank gelagerten Reaktionsgefäße konnte ein nahezu konfluenter Zellverband erzeugt werden.

Für die Messungen mit Zytokinen wurden die Zellen mit IL4, TNF α , IFN γ , PDGF und IL1 β in Konzentrationen von 20pg/ml bis 10ng/ml über einem Zeitraum von 30 Minuten, 4 Stunden und 24 Stunden mit den einzelnen Zytokinen inkubiert.

Vor den Messungen wurde das Medium vorsichtig abpipettiert, mit PBS gespült und mit 1ml PBS aufgefüllt.

2. 2.1.2.3 Chemilumineszenzmessung der Zellsuspensionen und der Zellmonolayer

Die Zellsuspensionen, die Zellmonolayer, die Zellüberstände und PBS wurden mit UVA in verschiedenen Dosen ($0,5 - 2\text{J}/\text{cm}^2$) bestrahlt und im Anschluss daran sofort über 10 Minuten – in 1-minütigen Abständen – und danach weitere 10 Minuten – in 5-minütigen Abständen – die CL detektiert.

Zur Verstärkung der CL wurden zusätzlich alle Messungen nach Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ Luminol ($1,7\text{mg}$ in 20% $0,1\text{N}$ NaOH) und/oder $50\ \mu\text{l}$ Hämin ($1,4\text{mg}$ in 10% $0,1\text{N}$ NaOH) durchgeführt.

Bei den Messungen mit unterschiedlichen pH-Werten wurde der pH-Wert mit NaOH titriert. Zusätzlich wurden Messungen durchgeführt nach Zugabe von $5,7\ \text{mmol}$ Eisen.

2.2.2 Chemilumineszenzmessungen bei einem In-vitro-Lipidoxidationsmodell

2.2.2.1 Chemilumineszenzmessungen der Linolsäure in Verbindung mit dem Chromophor Riboflavin

2.2.2.1.1 Material:

2.2.2.1.1.1 Geräte:

Berthold Bioluminat LB 9500 T, Waldmann UV 180

2.2.2.1.1.2 Substanzen:

PBS Puffer pH 7,2: Firma Life Technologies

Borat Puffer pH 9,0, 0,2 M

Linolsäure verschiedener Konzentrationen im Ansatz

Riboflavin verschiedener Konzentrationen im Ansatz

SOD: Firma Sigma

Katalase: Firma Sigma

Eisen: Firma Sigma

2.2.2.1.2 Methode:

Für die Messungen wurde Riboflavin in verschiedenen Konzentrationen in Aqua bidest und Linolsäure in Boratpuffer (pH 9,0; 0,2 M) gelöst. Anschließend wurde der Messansatz mit PBS-Puffer auf 2ml aufgefüllt.

Die verschiedenen Ansätze bestrahlten wir mit unterschiedlichen UVA-Dosen im Bereich von 0,5 – 2 J/cm². 30sec nach der Bestrahlung erfolgte die CL-Messung über einen Zeitraum von 10 Minuten, wobei in Minutenabständen gemessen wurde.

Zur Differenzierung der entstehenden Sauerstoffspezies wurden die selektiven Scavenger SOD und Katalase vor der UVA-Bestrahlung zugegeben, jeweils in einer

Aktivität von 100U, zusätzlich wurde Eisen in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben.

2.2.2.2 Chemilumineszenzmessungen von Histidin und Urocaninsäure:

2.2.2.2.1 Material:

2.2.2.2.1.1 Geräte:

Berthold Bioluminat LB 9500 T, Waldmann UV 180

2.2.2.2.1.2 Substanzen:

PBS Puffer pH 7,2: Firma Life Technologies

Borat Puffer pH 9,0, 0,2 M: Firma Sigma

Linolsäure verschiedener Konzentrationen im Ansatz

Riboflavin verschiedener Konzentrationen im Ansatz

Histidin verschiedener Konzentrationen im Ansatz

SOD: Firma Sigma

Katalase: Firma Sigma

Eisen: Firma Sigma

2.2.2.2.2 Methode:

Für die Messungen wurden Histidin, trans- und trans-/cis-UCA in verschiedenen Konzentrationen in Aqua bidest gelöst. Die Ansätze wurden mit Boratpuffer, Fettsäureleerwert (statt Fettsäure Zugabe von Aqua bidest) und Linolsäure (1mM) durchgeführt.

Die verschiedenen Ansätze bestrahlten wir mit unterschiedlichen UVA-Dosen im Bereich von 0,5 – 2 J/cm². 30sec nach der Bestrahlung erfolgte die CL-Messung

über einen Zeitraum von 10 Minuten, wobei die Messungen in Minutenabständen erfolgten.

Zur Differenzierung der entstehenden Sauerstoffspezies wurden die selektiven Scavenger SOD und Katalase vor der UVA-Bestrahlung zugegeben, jeweils in einer Aktivität von 100U.

Da die cis-UCA nicht käuflich ist, bestrahlten wir eine trans-Urocanin-Lösung mit UVB. Bei einer UVB-Bestrahlung von 5 Minuten entsteht ein Gemisch aus trans- und cis-UCA von 30 : 70%. Die Herstellung einer reinen cis-Urocanin-Lösung ist auch bei längerer UVB-Bestrahlung nicht möglich. Deshalb verwendeten wir bei unseren Messungen die trans-Urocanin-Lösung und ein trans-cis-Urocaningemisch im Verhältnis 30:70.

3. Ergebnisse

3.1 Chemilumineszenzmessungen bei der Keratiniozytenlinie HaCat, den Keratinozytenprimärkulturen und den Fibroblastenprimärkulturen

Nach Bestrahlung mit Dosen im Bereich von 0,5 - 2J/cm² UVA konnte in den unterschiedlichen Zelldichten (10⁴ bis 10⁶ Zellen/ml) sowohl bei HaCat-Keratinozyten als auch bei Keratinozyten aus Primärkulturen von Patienten mit und ohne AE keine CL detektiert werden. (Tabelle 1)

Auch nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen (IL4, TNF α , IFN γ , IL1 β und einer ZymosanA-Serum-Suspension), in verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten, wurde keine nennenswerte CL gemessen. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Chemilumineszenzdetektion an Zellsuspensionen und konfluent gewachsenen Zellen

Zellkonzentration	UVA-Bestrahlung	Luminol (L) und Hämin (H)	Stimulation	Stimulationsdauer
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²			
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H		
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H		
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H	IL 1-B max. 20pg/ml	30Min., 4Std., 24Std.
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H	IL4 max. 0,4ng/ml	30Min., 4Std., 24Std.
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H	TNF-a max. 0,1ng/ml	30Min., 4Std., 24Std.
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H	IFN-g max. 10ng/ml	30Min., 4Std., 24Std.
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ²	L und/oder H	PDGF max. 0,25 ng/ml	30Min., 4Std., 24Std.
10 ⁴ - 10 ⁶ /ml	0,5-2 J/cm ³	L und/oder H	ZymosanA-Suspension	5 Std.

Zusätzlich führten wir die Messungen bei verschiedenen pH-Werten der Zellsuspensionen durch (pH-Wert: 6,5 – 9). Dies führte ebenso wie der Zusatz von Eisen (5,7mmol) vor der Messung nicht zu einer detektierbaren CL.

Aufgrund der eingesetzten langwelligen UVA-Strahlung, die bis in die Dermis reicht, beschäftigten wir uns auch mit Fibroblasten, die den größten Teil der Dermis ausmachen.

Die Fibroblasten aus den Primärkulturen wurden von uns ebenso auf CL untersucht. Wie bei den Keratinozyten zeigte sich weder nach UVA-Bestrahlung im Bereich von 0,5 - 2J/cm², noch nach zusätzlicher Stimulation mit den oben beschriebenen Zytokinen eine detektierbare CL.

Auch nach Zugabe der CL-Verstärker Luminol und Hämin konnte weder nach UVA-Bestrahlung noch nach Zytokin-Stimulation bei Keratinozyten und bei Fibroblasten eine signifikante CL gemessen werden.

Neben Kontrollmessungen mit PBS führten wir CL-Messungen an den Zellüberständen durch. Auch hier konnte keine CL detektiert werden.

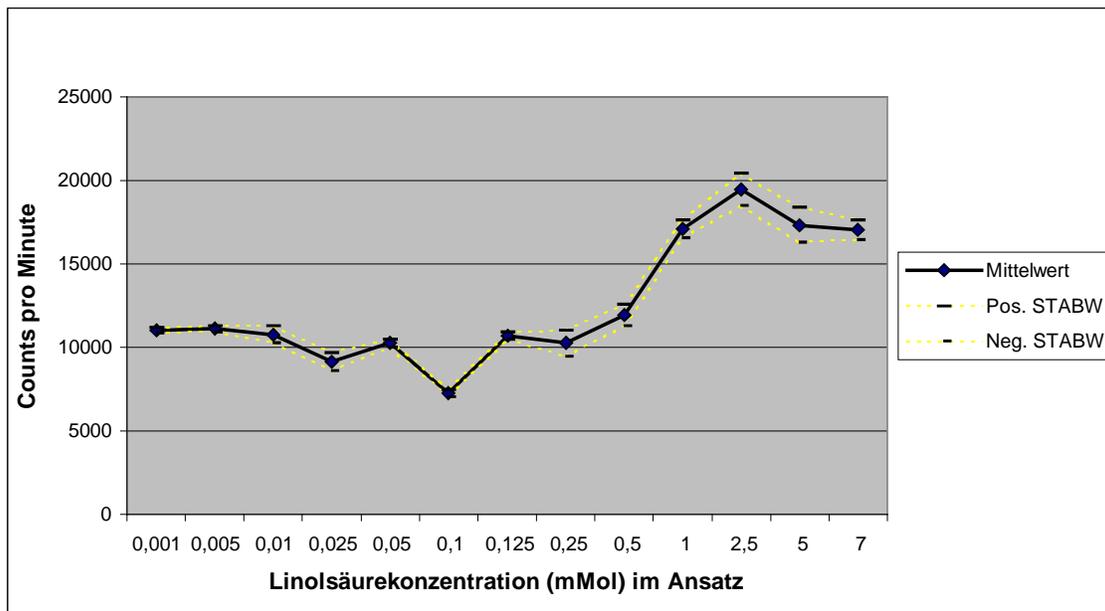
3.2 Chemilumineszenzmessungen bei einem in vitro-Lipidoxidationsmodell

3.2.1 Chemilumineszenzmessungen der Linolsäure in Verbindung mit dem Chromophor Riboflavin.

Nach Bestrahlung von Linolsäure und Riboflavin mit einer UVA-Dosis von $0,55 \text{ J/cm}^2$, wie sie auch von Abeck und Mitarbeitern in In-vivo-Untersuchungen verwendet wurde (Abeck et al., 1994), konnte CL detektiert werden. Die Maximalwerte zeigten sich 3 - 5 Minuten nach der UVA-Bestrahlung.

Die Stärke der CL zeigte sich sowohl abhängig von der Riboflavinkonzentration als auch von der Konzentration der Linolsäure. (Abbildung 3 und 4)

Abbildung 3: Riboflavin-Linolsäure-Assay: Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der Linolsäurekonzentration



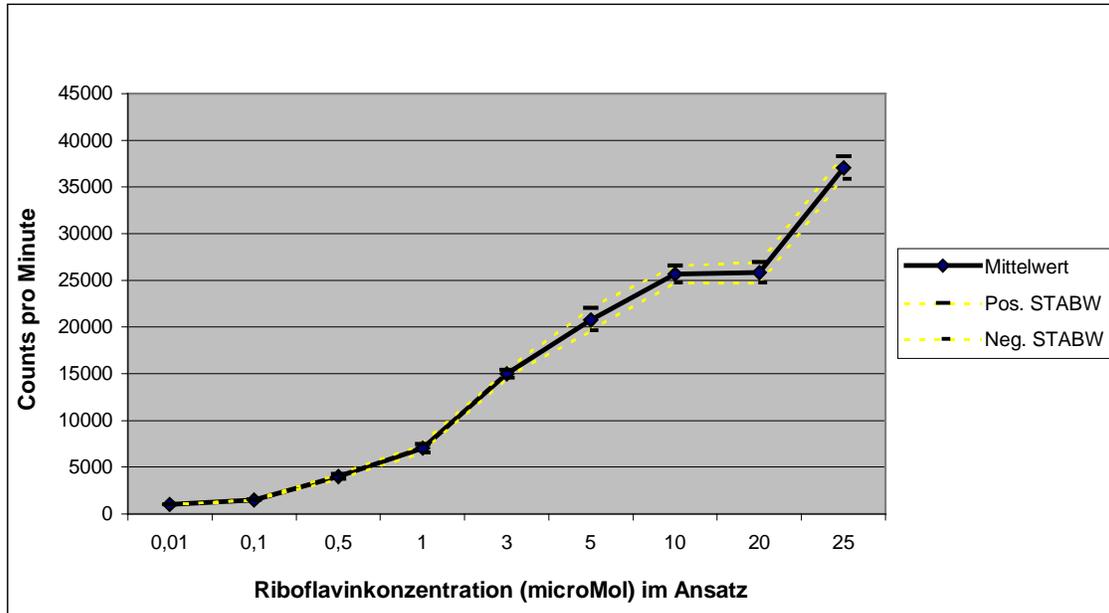
Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Linolsäure (in verschiedenen Konzentrationen) in Boratpuffer

0,5 ml Riboflavin ($2,5 \mu\text{Mol}$ im Ansatz) in H_2O

$0,55 \text{ J/cm}^2$ UVA

Abbildung 4: Riboflavin-Linolsäure-Assay: Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der Riboflavinkonzentration



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Linolsäure (7 mMol im Ansatz) in Boratpuffer

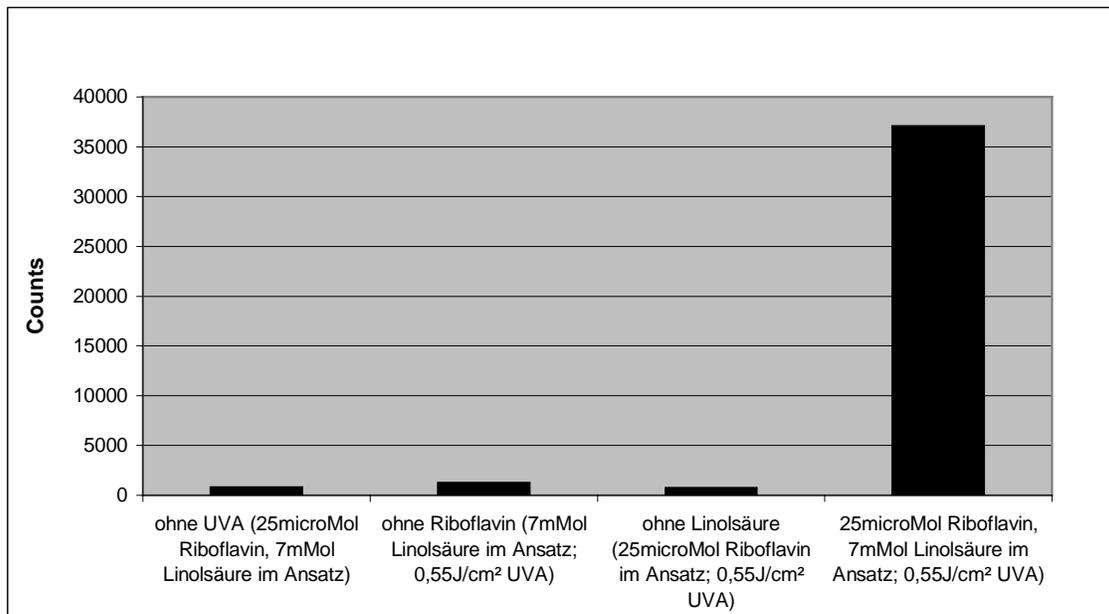
0,5 ml Riboflavin (in verschiedenen Konzentrationen) in H₂O

0,55 J/cm² UVA

3.2.1.1 Kontrolle der Chemilumineszenz-Parameter

Zur Kontrolle wurde sowohl Riboflavin als auch Linolsäure isoliert mit UVA bestrahlt, sowie Riboflavin und Linolsäure ohne UVA-Exposition untersucht. Es zeigte sich keine signifikante CL. (Abbildung 5)

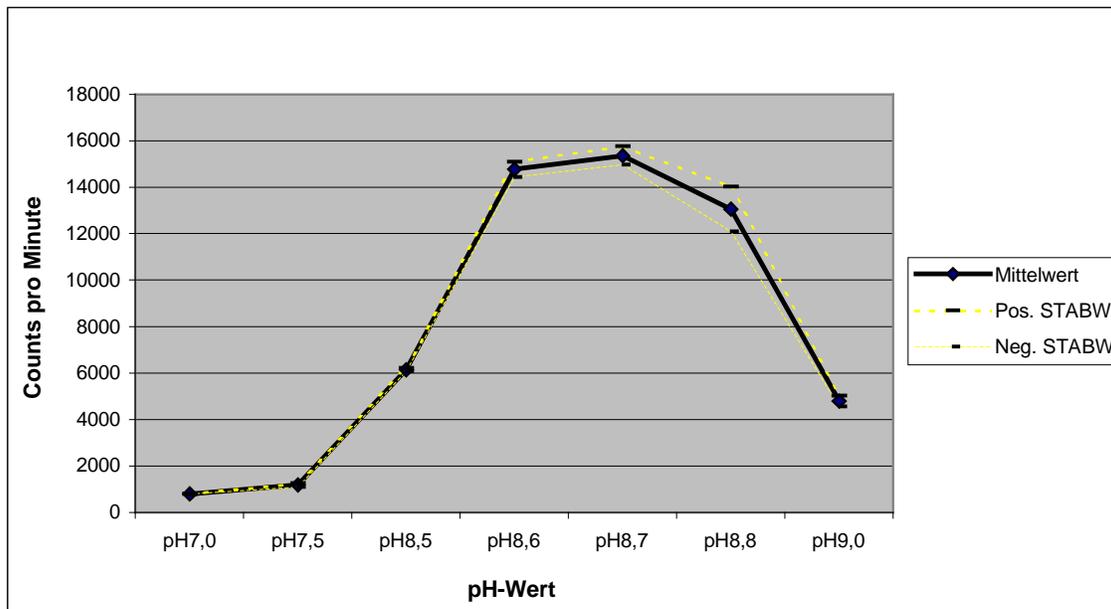
Abbildung 5: Bedingungen für den Nachweis von Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay



3.2.1.2 Abhängigkeit der Chemilumineszenz vom pH-Wert

Die gemessene CL von Riboflavin und Linolsäure zeigte abhängig vom pH-Wert unterschiedliche Werte. (Abbildung 6)

Abbildung 6: Abhängigkeit der Chemilumineszenz vom pH-Wert im Riboflavin-Linolsäure-Assay



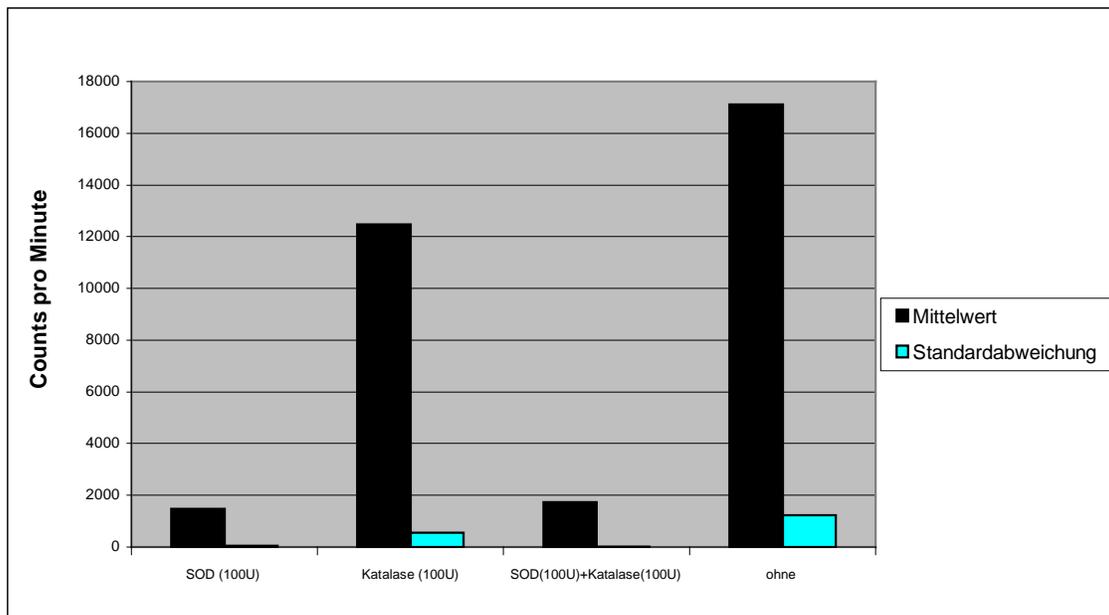
Ansatz: 1ml PBS mit unterschiedlichen pH - Werten
0,5 ml Linolsäure (1 mMol im Ansatz) in Boratpuffer
0,5 ml Riboflavin (2,5 μ Mol im Ansatz) in H₂O
0,55 J/cm² UVA

3.2.1.3 Differenzierung der Chemilumineszenz-auslösenden reaktiven Sauerstoffspezies durch Zugabe enzymatischer Antioxidantien

Zur Spezifizierung der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies wurden selektive Scavenger vor der UVA-Bestrahlung zugegeben.

Nach Zugabe von 100 U SOD zeigte sich eine deutliche Reduktion der CL, wogegen sie bei Zugabe von Katalase nur leicht zurück ging. Bei einer gleichzeitigen Zugabe von SOD und Katalase sank die CL nicht wesentlich stärker als bei Zugabe von SOD alleine. (Abbildung 7)

Abbildung 7: Änderung der Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay nach Zugabe von SOD und/oder Katalase

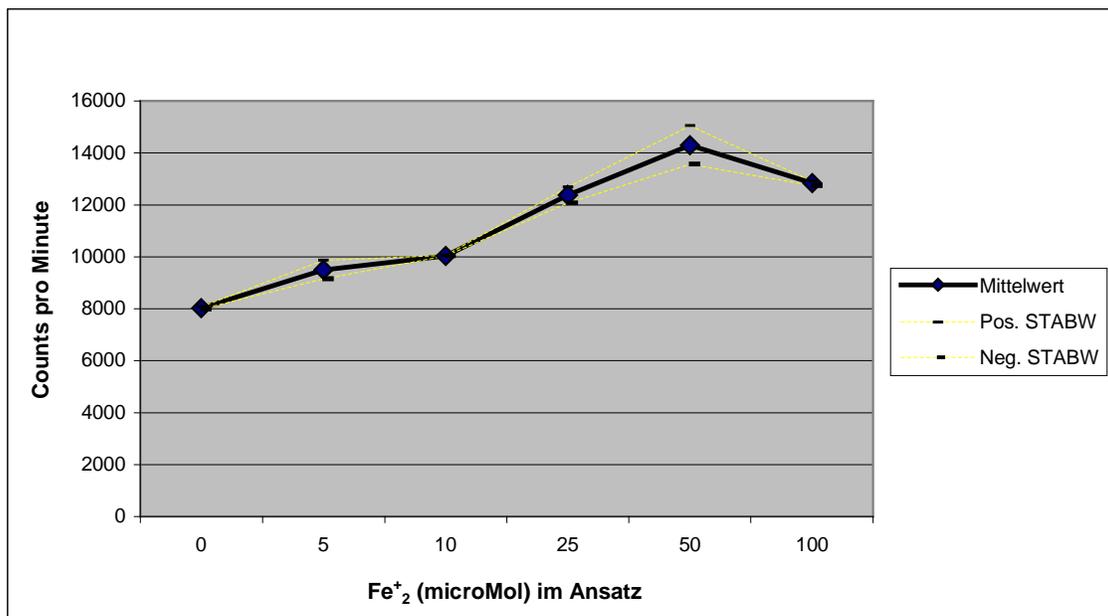


Ansatz: 0,9 ml PBS
0,1 ml Katalase und/oder SOD (in verschiedenen Konzentrationen)
0,5 ml Linolsäure (1 mMol im Ansatz) in Boratpuffer
0,5 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz) in H₂O
0,55 J/cm² UVA

3.2.1.4 Chemilumineszenzmessungen nach Zugabe von Eisen

Die Zugabe von Eisen (Fe^{+2}) führte bei Konzentrationen zwischen $5\mu\text{M}$ und $50\mu\text{M}$ zu einer Zunahme der CL, bei höheren Konzentrationen wieder zu einer leichten Abnahme. (Abbildung 8)

Abbildung 8: Beeinflussung der Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay durch Zugabe von Eisen



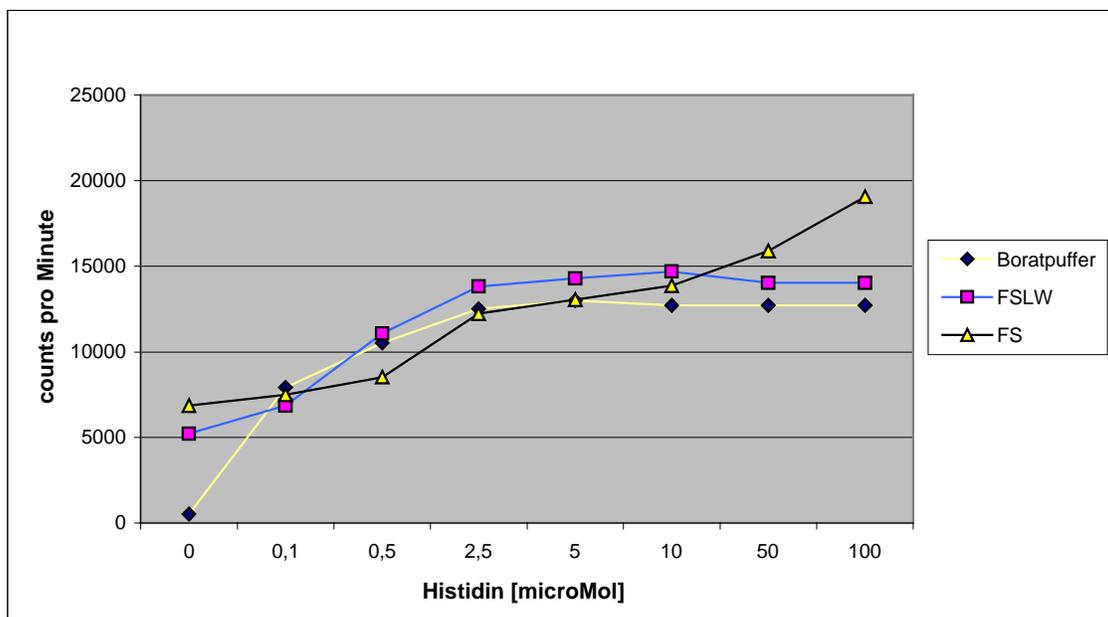
Ansatz: 0,9 ml PBS
0,1 ml Eisen (in verschiedenen Konzentrationen)
0,5 ml Linolsäure (1 mMol im Ansatz) in Boratpuffer
0,5 ml Riboflavin ($2,5\mu\text{Mol}$ im Ansatz) in H_2O
0,55 J/cm^2 UVA

3.2.2 Chemilumineszenzmessungen von Histidin und Urocaninsäure

3.2.2.1 Chemilumineszenzmessungen von Histidin

Die stärkste CL bei Histidin wurde bei einer Konzentration von 5 μ Mol detektiert und konnte durch die Zugabe von Linolsäure nochmals verstärkt werden. (Abbildung 9)

Abbildung 9: Beeinflussung der Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay durch unterschiedliche Histidinkonzentrationen



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,3 ml H₂O

0,1 ml Histidin (versch. Konzentrationen)

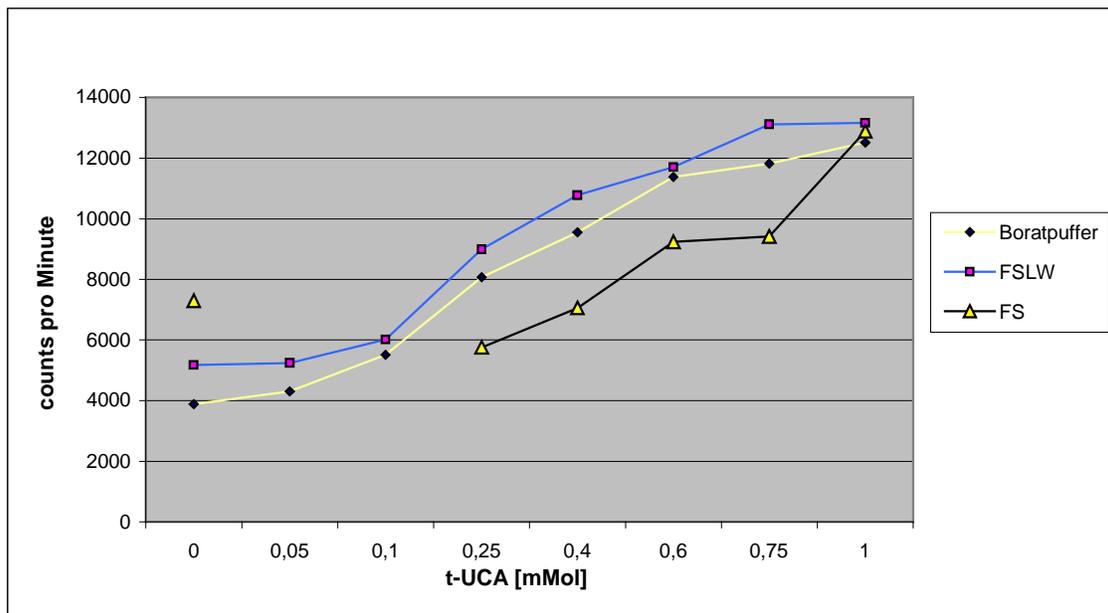
0,1 ml Riboflavin

0,55 J/cm² UVA

3.2.2.2 Chemilumineszenzmessungen der trans-Urocaninsäure

Bei der trans-UCA zeigte sich eine lineare Zunahme der CL, wobei durch die Zugabe von Linolsäure keine Verstärkung der CL bewirkt werden konnte. (Abbildung 10)

Abbildung 10: Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay in Abhängigkeit von der t-UCA - Konzentration



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,3 ml H₂O

0,1 ml t-UCA (versch. Konzentrationen)

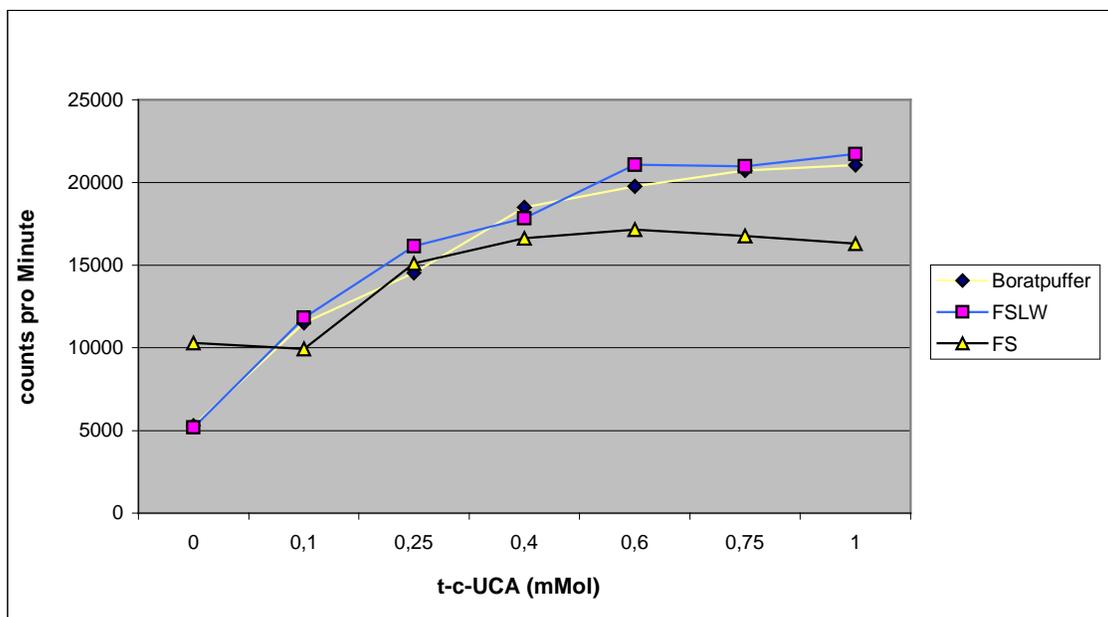
0,1 ml Riboflavin

0,55 J/cm² UVA

3.2.2.3 Chemilumineszenzmessungen der trans-cis-Urocaninsäure

Für die trans-cis-UCA zeigte sich eine höhere CL als bei der trans-UCA, wobei sich ebenfalls eine lineare CL-Zunahme mit einer Sättigungskurve bei 0,6mMol ergab. Durch Zugabe von Linolsäure konnte wie auch bei der trans-UCA keine Verstärkung der CL bewirkt werden. (Abbildung 11)

Abbildung 11: Chemilumineszenz im Riboflavin-Linolsäure-Assay in Abhängigkeit von der t-c-UCA - Konzentration



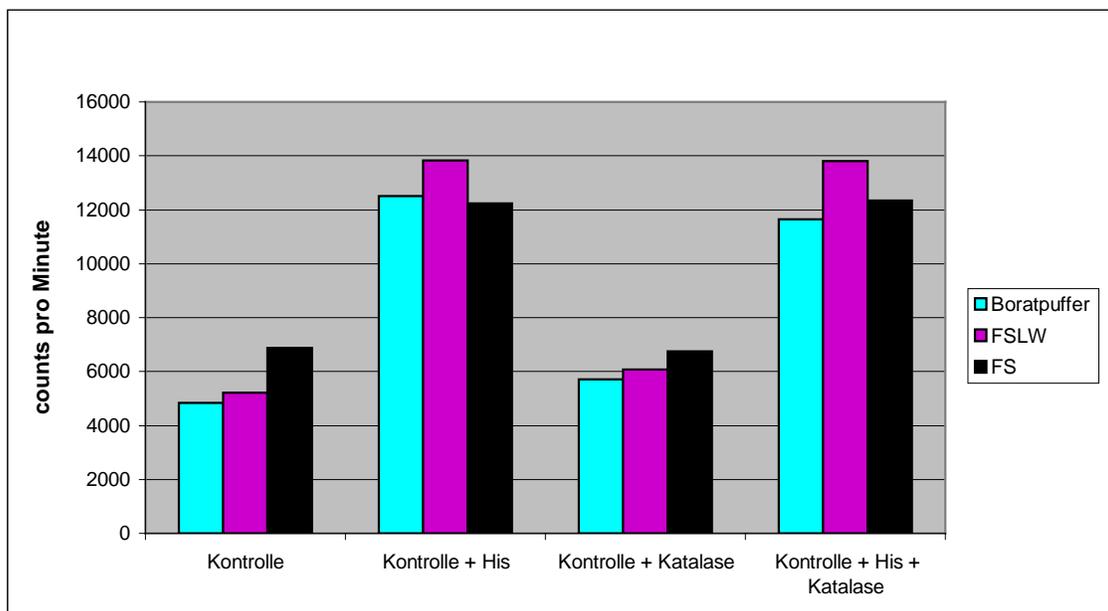
Ansatz: 1ml PBS
0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure
(FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))
0,3 ml H₂O
0,1 ml t-c-UCA (nach 10 Minuten UVB)
0,1 ml Riboflavin
0,55 J/cm² UVA

3.2.2.4 Differenzierung der Chemilumineszenz-auslösenden, reaktiven Sauerstoffspezies durch Zugabe von Katalase und SOD

3.2.2.4.1 Veränderungen unter Zugabe von Katalase:

Durch Zugabe von Katalase zeigte sich weder bei Histidin noch bei der UCA eine signifikante Veränderung der Chemilumineszenz. (Abbildung 12, 13, 14)

Abbildung 12: Chemilumineszenz von Histidin im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von Katalase



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml Histidin (2,5 µMol im Ansatz)

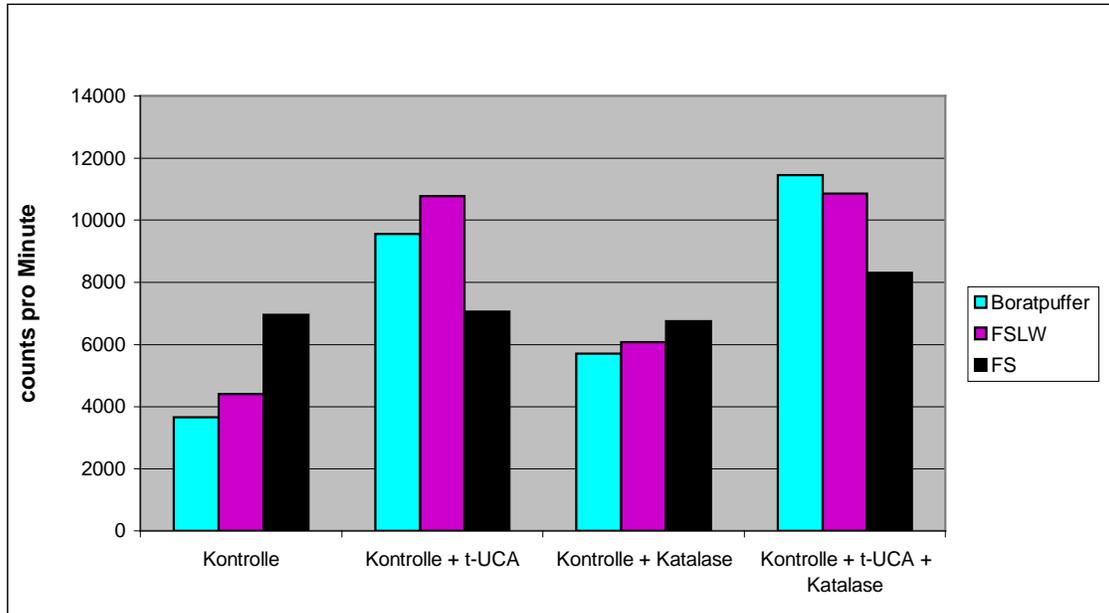
+/- 0,1ml Katalase (100U im Ansatz)

0,1 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz)

ad 2 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

Abbildung 13: Chemilumineszenz von t-UCA im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von Katalase



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml t-UCA (0,4 mMol im Ansatz)

+/- 0,1ml Katalase (100U im Ansatz)

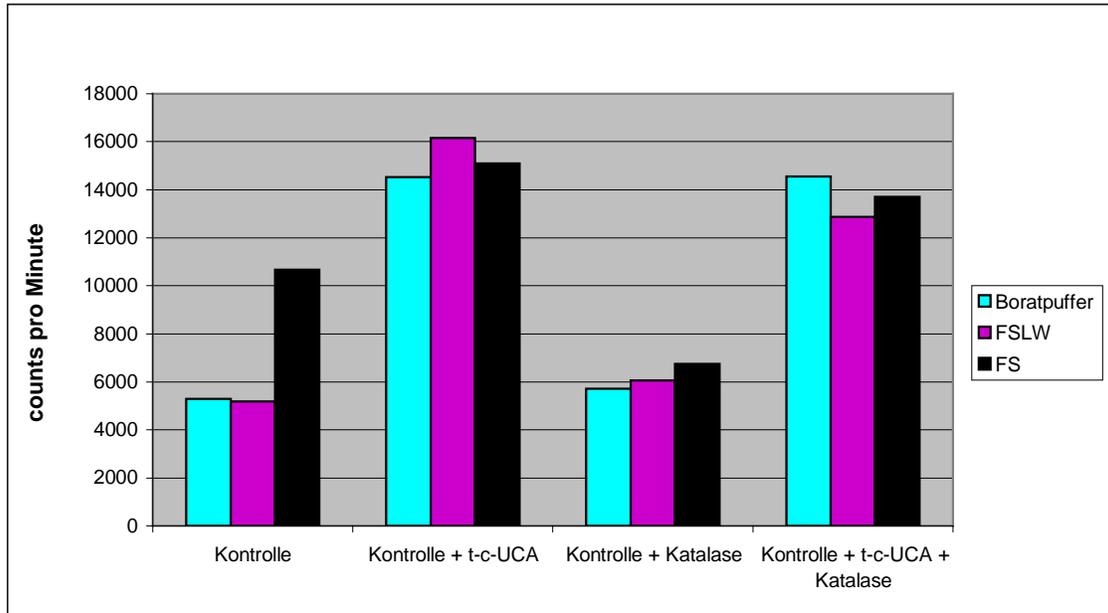
0,1 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz)

ad 2 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

Auch die im Vergleich zur t-UCA deutlicher ausgeprägte CL-Detektion der t-c-UCA, wurde von der Katalase nicht nennenswert verändert.

Abbildung 14: Chemilumineszenz von t-c-UCA im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von Katalase



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml t-c-UCA (0,25 mMol im Ansatz)

+/- 0,1ml Katalase (100U im Ansatz)

0,1 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz)

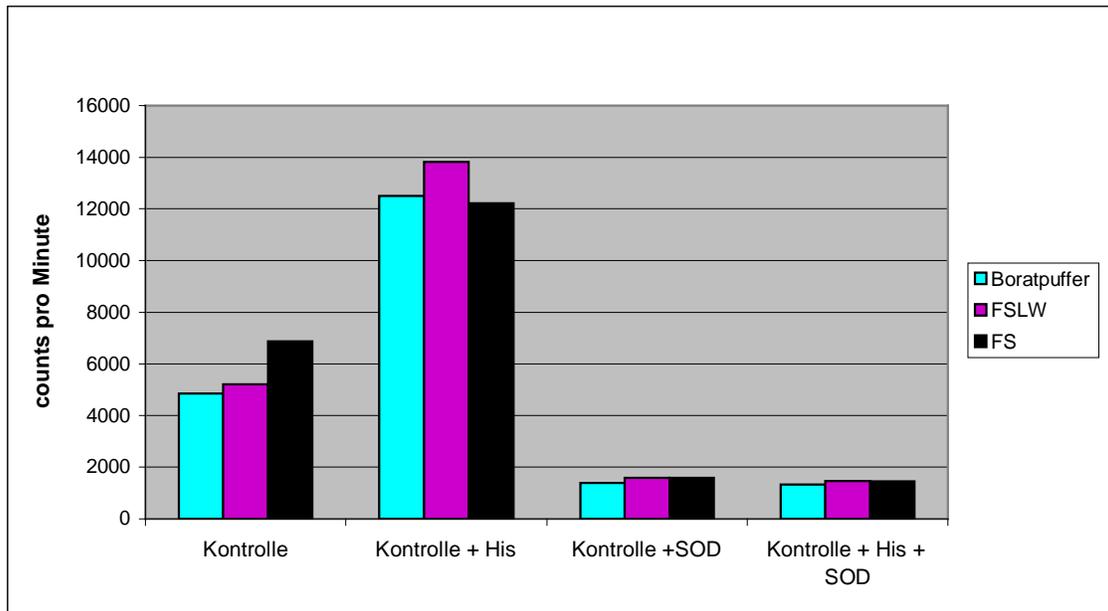
ad 2 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

3.2.2.4.2 Veränderungen unter Zugabe von SOD:

Nach Zugabe von SOD zeigte sich sowohl bei Histidin als auch bei der UCA eine deutliche Abnahme der CL. (Abbildung 15, 16, 17)

Abbildung 15: Chemilumineszenz von Histidin im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von SOD



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml Histidin (2,5 µMol im Ansatz)

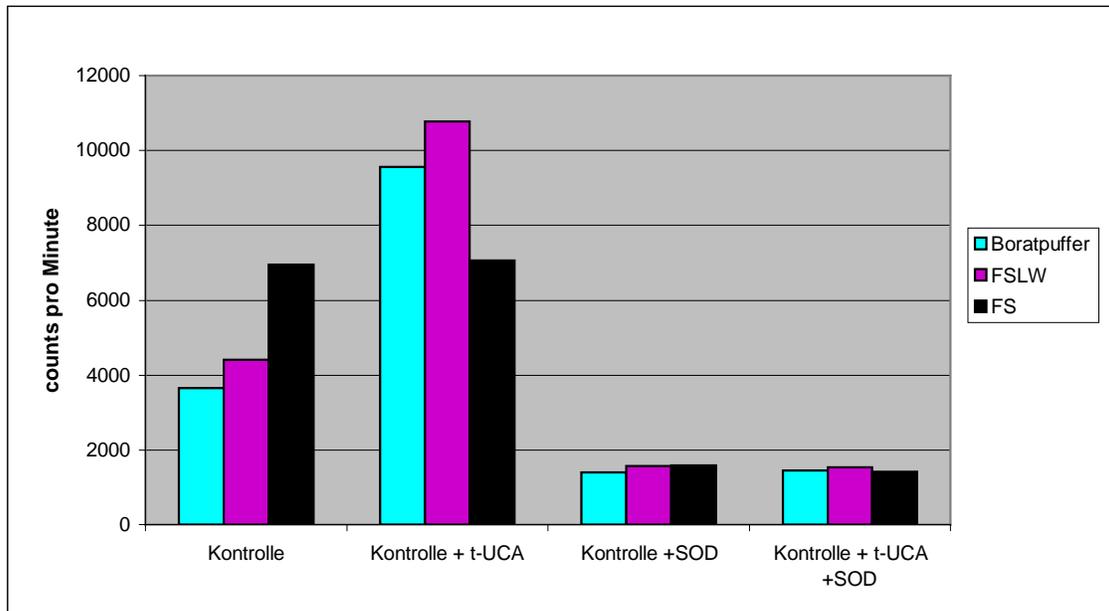
+/- 0,1 ml SOD (100U im Ansatz)

0,1 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz)

ad 2,0 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

Abbildung 16: Chemilumineszenz von t-UCA im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von SOD



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml t-UCA (0,4 µMol im Ansatz)

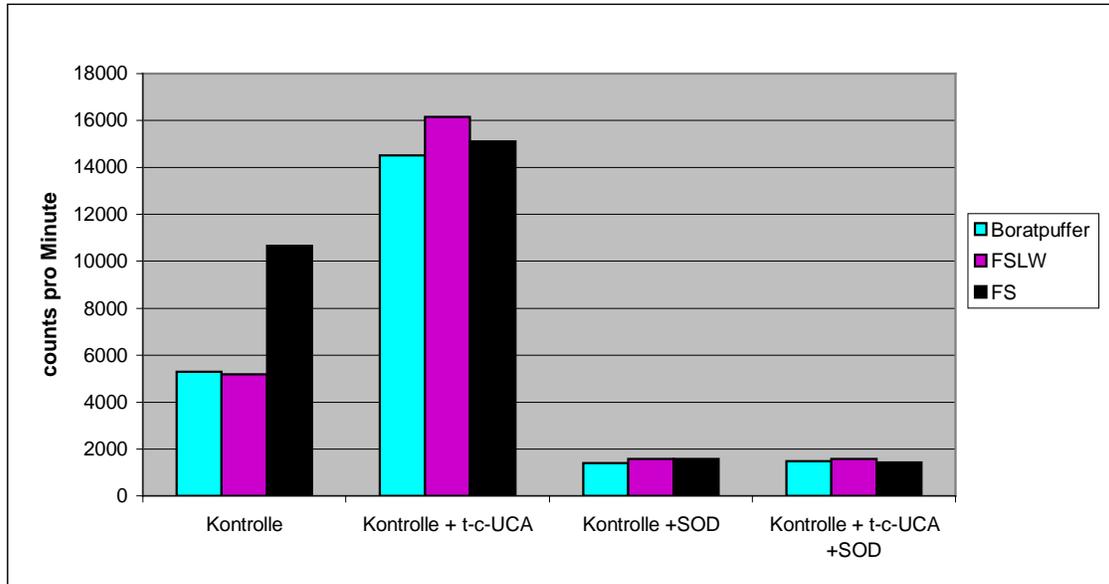
+/- 0,1 ml SOD (100U im Ansatz)

0,1 ml Riboflavin (2,5 µMol im Ansatz)

ad 2,0 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

Abbildung 17: Chemilumineszenz von t-c-UCA im Riboflavin-Linolsäure-Assay in An- und Abwesenheit von SOD



Ansatz: 1ml PBS

0,5 ml Boratpuffer, Fettsäureleerwert (FSLW) oder Fettsäure (FS (1 mMol Linolsäure im Ansatz))

0,1 ml t-c-UCA (0,25 mMol im Ansatz)

+/- 0,1 ml SOD (100U im Ansatz)

0,1 ml Riboflavin (2,5 μ Mol im Ansatz)

ad 2,0 ml H₂O

0,55 J/cm² UVA

4. Diskussion

In-vivo-Untersuchungen konnten nach UVA-Bestrahlungen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit AE nach UV-Bestrahlung ein erhöhtes CL-Signal detektieren, was auf das Vorhandensein eines veränderten oxidativen Status schliessen lässt. [2]

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche epidermale oder dermale Strukturen zu charakterisieren, die für die in vivo beobachtete Entstehung der UVA induzierten CL verantwortlich sind.

Aufgrund unserer Messungen sind zelluläre epidermale und dermale Faktoren für die aufgezeigte CL nicht verantwortlich. Ungesättigte Fettsäuren, Histidin, UCA und Eisen waren nach UVA-Bestrahlungen zur Auslösung von CL befähigt.

4.1 Zelluläre Strukturen:

In der Epidermis lag unser Augenmerk zunächst auf den Keratinozyten, da diese mit 85% den größten Anteil in der Epidermis ausmachen.

Es konnte weder nach UVA-Bestrahlung noch nach zusätzlicher Stimulation mit den Zytokinen IL4, TNF α , IFN γ , IL1 β und einer Zymosan A-Serum-Suspension CL detektiert werden. Auch bei dem Versuch, die CL mit Luminol zu verstärken, entstanden keine CL-Signale.

Da von den langwelligen UVA-Strahlen auch die Dermis erreicht wird, wurden entsprechende Messungen auch an Fibroblasten vorgenommen.

Obwohl in Studien von Meier und Mitarbeitern eine Luminol-verstärkte "low chemilumineszenz" bei Fibroblasten gemessen wurde, die nach Stimulation mit IL1, TNF α , Zymosan u.a. mehrere Stunden besteht [24], konnten wir auch bei Fibroblasten keine Luminol-verstärkte CL nachweisen.

4.2 Lipidperoxidation

Ein zweiter Erklärungsansatz für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist die Lipidperoxidation. Sie wird in der Haut vor allem durch die Absorption der Strahlungsenergie durch Hautchromophore wie Flavinderivate [11] und Aminosäuren initiiert,[49] die zu einer erhöhten Lipidperoxidation führt. Diese Lipidperoxidation wird verdächtigt, die Ursache für die Zellzerstörung durch UV-Strahlung zu sein. [48]

Die Lipidperoxidation kann sowohl durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst werden, als auch die Entstehung neuer reaktiver Sauerstoffspezies induzieren.

Bisher konnten vor allem nach UVB-Bestrahlungen erhöhte Serumspiegel von Lipidperoxiden gemessen werden. [49]

Der genaue Mechanismus der Lipidperoxidation, hervorgerufen durch UV-Licht, ist noch nicht erforscht worden. [48]

Es ist bekannt, dass während der Lipidperoxidation Moleküle wie Tripletketone CO^* und Singulett-Sauerstoff 1O_2 in einen angeregten Zustand versetzt werden, was durch CL-Detektion nachgewiesen werden kann. [7]

Bei Untersuchungen zur Lipidperoxidation mittels Elektronen-Spin-Resonanz an epidermalen Homogenisaten konnte die Beteiligung von Superoxidanionen und Hydroxylradikale gezeigt werden. [31]

Durch welche Sauerstoffspezies die Lipidperoxidation initiiert wird, bleibt unklar.

Bei den Untersuchungen der Lipidperoxidation konzentrierten wir uns auf die Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren. Nur ungesättigte Fettsäuren sind empfindlich gegen UV-Strahlen, da gesättigte Fettsäuren oxidationsstabil und somit unempfindlich für die UV-induzierte Lipidperoxidation sind. [42]

Ungesättigte Fettsäuren sind ein wichtiger interzellulärer Bestandteil der Epidermis und sind auch in der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen enthalten. Die Linolensäure stellt den quantitativ größten Teil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Haut dar. [6]

Zusätzlich spielen sogenannte Chromophore, Flavine (z.B. Riboflavin), Porphyrine, NADH und NADPH eine entscheidende Rolle bei der UV-induzierten Lipidperoxidation. Sie absorbieren UVA-Strahlen und vergrößern die UVA-induzierte kutane Reaktion bei Sauerstoff-abhängigen photodynamischen Reaktionen. [11]

4.3 Linolsäure

In unseren Versuchen konnte nach einer Bestrahlung von Riboflavin und Linolsäure CL detektiert werden, die ihr Maximum nach 3 – 5 Minuten erreichte.

Die CL zeigte sich abhängig sowohl von der Riboflavin- als auch von der Linolsäurekonzentration. Das Maximum wurde bei einer Linolsäurekonzentration von 2,5 mMol im Ansatz gemessen. Bei der Zugabe von Riboflavin konnte selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen von 1 μ Mol noch CL detektiert werden. Um zu differenzieren, welche Sauerstoffspezies für die gemessene CL verantwortlich ist, gaben wir vor der UVA-Bestrahlung die Antioxidantien SOD und Katalase zu.

In unseren Experimenten benutzten wir diese Antioxidantien, um die verschiedenen Formen der angeregten Sauerstoffformen in den Versuchen unterscheiden zu können. Wir gaben die verschiedenen Enzyme als sogenannte Scavenger hinzu, die dann ihr spezifisches Substrat abbauten, wodurch eine Freisetzung von Lichtemission nicht mehr möglich war. [11]

Nach Zugabe von 100 U SOD zeigte sich eine deutliche Reduktion der CL, wogegen sie bei der Katalase nur leicht zurückging. Bei einer gleichzeitigen Zugabe von SOD und Katalase sank die CL nicht wesentlich stärker als bei der SOD alleine.

Somit kann man davon ausgehen, dass vor allem die Superoxidradikale zu der hier gemessenen CL führten.

Die Erhöhung der in vivo gemessene CL bei Patienten mit AE erklärt sich aber nicht durch eine Differenz in der Linolsäurekonzentration der Haut, da der Linolsäuregehalt bei Patienten mit AE nur im Plasma, aber nicht in der Haut erhöht ist. Es ist fraglich, ob nicht vielleicht die Tatsache, dass mehr Linolsäure vorhanden ist, die nicht im Ceramid gebunden ist, zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation führt.

Keratinocyten enthalten allerdings auch ungesättigte Fettsäuren in ihren Membranen. Aus diesem Grund hätte man in den entsprechenden Untersuchungen eine CL-Detektion erwarten können. Da aber kultivierte Keratinocyten, wenn sie nicht mit ungesättigten Fettsäuren supplementiert werden, statt der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure in ihre Membranen einbauen, könnte hierdurch das Ausbleiben eines CL-Signals erklärt werden. [37,53]

4.4 Antioxidantien – Unterschiede bei Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu Normalprobanden

Durch die in vivo gemessene erhöhte CL bei Patienten mit AE im Vergleich zu Normalprobanden wurde nachgewiesen, dass in der befallenen Haut von Patienten mit AE vermehrt Lipidperoxidationsprodukte vorhanden sind.

Auch die Unterschiede des Antioxidantienstatus der Haut bei Patienten mit AE einerseits und Normalpersonen andererseits können für die unterschiedlichen CL-Signale in vivo verantwortlich sein. [2]

Passend zu unseren In-vitro-Untersuchungen, die bewiesen, dass es durch die Zugabe von SOD zur selektiven Entgiftung von Superoxidanionen kam und damit zur deutlichen Abnahme der CL, wurde von Niwa 1994 nachgewiesen, dass bei Patienten mit AE, die nur leichte Symptome aufwiesen und gut auf die üblichen Therapien ansprachen, eine hohe SOD-Aktivität festzustellen war. Patienten mit schwerem AE, das sich als weitgehend therapieresistent erwies, zeigten dagegen eine wesentlich niedrigere SOD-Aktivität. Vor allem Patienten mit einem AE im Erwachsenenalter und mit zusätzlicher Kataraktbildung wiesen einen besonders hohen Spiegel an Lipidperoxiden und einen niedrigen an SOD auf. Es wurde in der Studie von 1994 bei Untersuchungen zur Abnormalität der SOD bei Patienten mit AE von Niwa auch nachgewiesen, dass die topische Gabe von SOD sowohl in Verbrennungswunden als auch in chronisch entzündeter Haut zu einem Rückgang der Entzündung führt.

Bei Patienten mit einer leichten Ausprägung des AE, die gut auf topische Corticoide ansprachen, scheint demnach die SOD-Bildung reaktiv auf die erhöhte Lipidperoxidation anzusteigen. Bei therapieresistenten Krankheitsverläufen mit schwerer Ausprägung kommt es bei erhöhtem Lipidperoxidationsspiegel nicht zu einer reaktiven Erhöhung der SOD-Konzentrationen. [33,34]

Bei Untersuchungen von Keyhani [19], aber auch von Stäb et al. [47] wurde ebenfalls mittels in-vivo CL-Detektion eine erhöhte Sauerstoffradikalbildung unter UVA-Bestrahlung bei Patienten mit AE festgestellt. Die Arbeitsgruppe von Stäb fand heraus, dass es zu einer Zunahme der UVA-induzierten CL bei zunehmendem Trockenheitsgrad der Haut kommt. Zusätzlich konnten aber auch in dieser Studie in der Haut von Patienten mit AE nachgewiesen werden, dass die SOD-Aktivität vor

allem bei schweren Fällen des AE stark verringert war. Es wurden vermehrt Lipidperoxidationsprodukte nachgewiesen. [55]

Die Konzentration der Antioxidantien in der Haut wird durch UV-Bestrahlung verändert. Die Aktivität der Superoxiddismutase sinkt direkt nach der UV-Bestrahlung ab, während die Katalase vermehrt aktiv ist. Die Gluthationperoxidasen-Aktivität bleibt unverändert. [39]

4.5 Eisen

Auch der Eisengehalt der Haut ist bei Patienten mit AE erhöht. [12] Nach UV-Bestrahlungen wird vermehrt Eisen freigesetzt. Da Eisen an der Entstehung von Hydroxylradikalen beteiligt ist, könnte dies ebenfalls an der erhöhten CL-Detektion bei Patienten mit AE beteiligt sein. [4]

In unseren In-vitro-Untersuchungen konnten wir bei Zugabe von Eisen (Fe^{+2}) zu Linolsäure und Riboflavin eine Zunahme der CL zwischen $5\mu\text{Mol}$ und $50\mu\text{Mol}$ Konzentration an Eisen nachweisen.

4.6 Histidin und Urocaninsäure

4.6.1 Histidin

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Histidin selektiv Singulett-Sauerstoff entgiftet und somit den Körper vor einigen Lichtschäden schützt. Während der Photoaktivierung kann Histidin den Singulett-Sauerstoff deaktivieren und in den Grundzustand überführen. [8]

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass auch Histidin fähig ist, UVA-induziert reaktive Sauerstoffspezies zu bilden.

Während Histidin in niedrigen Konzentrationen ($0.5 - 10 \mu\text{Mol}$) eine antioxidative Wirkung auf die UV-Bestrahlung der Linolsäure zu haben scheint, überwiegt in höheren Konzentrationen die eigene oxidative Wirkung. Es kommt zu einer Addition der Sauerstoffradikalbildung der beiden Substanzen.

Da die Histidinkonzentration in der befallenen Haut von Patienten mit AE erhöht ist, könnte dies ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte Sauerstoffradikalbildung in diesen Arealen sein. Durch Zugabe von SOD und Katalase wird deutlich, dass auch hier vor allem Superoxidanionen für das entstehende CL-Signal verantwortlich sind. Die Zugabe von Eisen führte nicht zu einer Änderung der gemessenen Chemilumineszenz.

4.6.2 Urocaninsäure

Auch UCA, die mit 0,2-0,7% zu den häufigsten Bestandteilen der menschlichen Epidermis zählt, besitzt antioxidative, immunsuppressive und UV-protective Wirkungen.

Ein Erklärungsansatz, warum die UCA bei Sonnenbestrahlung als Schutzfaktor für die Haut fungiert, ist die Tatsache, dass sie ein UV-Absorber ist.

Bei verringerter UCA-Konzentration wird die UV-Strahlung von anderen Chromophoren absorbiert, wodurch es zu einer Generierung reaktiver Sauerstoffspezies kommt. Zusätzlich wirkt die UCA antioxidativ gegenüber OH^\cdot und 1O_2 .

Es wird auch vermutet, dass die UCA eine wichtige Rolle in der UV-induzierten Immunsuppression spielt. [35]

Die bei UV-Bestrahlung aus der trans-UCA gebildete cis-UCA fungiert als Mediator für die immunsuppressive Wirkung von UVB auf die systemisch T-Zell-vermittelte Immunantwort. [28,36] In Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass es dadurch zu einer Unterdrückung der Kontaktsensibilisierung kommt. [35]

Die cis-UCA führt an Langerhanszellen zum Dendritenverlust, zur Abnahme der Rezeptorexpressivität und damit zum Verlust der Antigenpräsentation. [13]

Die trans-UCA fördert außerdem die $\text{IL}1\beta$ -Bildung und hemmt die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion über eine intrazelluläre Erhöhung des c-AMP-Spiegels in Monozyten. [21]

Die durch UVB-Bestrahlung gebildete cis-UCA induziert dagegen eine lokale $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung, welche dann direkt die Veränderungen an den Langerhanszellen bewirkt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die UVB-Bestrahlung der Haut sowie die Injektion von cis-UCA denselben immunsuppressiven Effekt haben wie $\text{TNF}\alpha$ -

Injektionen und zu denselben morphologischen Veränderungen an den Langerhanszellen führen. Weiterhin wurde festgestellt, dass TNF- α -Antikörper diesen Veränderungen in allen drei Fällen vorbeugen können. [20]

Damit ist die cis-UCA anscheinend zusammen mit TNF α für die zellvermittelte, verzögerte Immunantwort auf z.B. Herpes simplex-Viren verantwortlich. [20]

Zusätzlich wirkt die cis-UCA partiell wahrscheinlich über zelluläre Histaminrezeptoren als Histaminantagonist. [26] Dieser Wirkmechanismus an denselben Rezeptoren erklärt sich vielleicht auch durch die ähnliche Struktur von UCA und Histamin, die beide in einem Schritt aus Histidin gebildet werden. Diese Wirkung der cis-UCA scheint H1- und H2-Rezeptor-vermittelt zu sein, da sie durch H1- und H2-Rezeptorantagonisten abschwächbar ist. [36]

Bei Patienten mit AE ist, im Vergleich zu Gesunden, der Urocaninsäure-Gehalt in befallenen sowie in unbefallenen Arealen signifikant verringert. Da aber der Histidinstatus bei Patienten mit AE in den unbefallenen Arealen nicht reduziert und in den befallenen Arealen erhöht ist, ist anzunehmen, dass eine Histidasedysfunktion vorliegt. [2,19]

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass auch die cis- und die trans-UCA fähig sind, UVA-induziert reaktive Sauerstoffspezies zu bilden, wobei die Zugabe von Eisen zu keiner Verstärkung der CL führte.

Die UCA ist zwar in der Haut von Patienten mit AE vermindert, aber die Auswirkungen der UV-Filterfunktion dieser Substanz könnte die Auswirkung eigener Sauerstoffradikalbildung der UCA übertreffen.

Durch Zugabe von SOD und Katalase wird deutlich, dass auch hier vor allem Superoxidanionen für das entstehende CL-Signal verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

Die in vivo beobachtete Chemilumineszenz nach UVA-Bestrahlung der Haut ist unseren Untersuchungen zufolge nicht auf die zellulären Bestandteile der Epidermis und Dermis zurückzuführen, da in vitro weder an primär isolierten noch an etablierten Keratinozyten oder Fibroblasten eine UVA-induzierte CL gemessen werden konnte.

In unseren Versuchen unter Verwendung eines Lipidoxidationsmodells konnte nach einer Bestrahlung von Riboflavin und Linolsäure CL detektiert werden, die sich abhängig sowohl von der Riboflavin- als auch von der Linolsäurekonzentration zeigte, wobei vor allem Superoxidanionen für das entstandene CL-Signal verantwortlich waren.

Eisen, das bei Patienten mit AE erhöht ist und nach UV-Bestrahlungen vermehrt freigesetzt wird, konnte als weitere Substanz der Haut identifiziert werden, die im Rahmen der CL-Generierung von Bedeutung ist, da nach Zugabe von Eisen in unserem Lipidoxidationsmodell in bestimmten Konzentrationsbereichen (5 – 50 μMol) eine Zunahme der CL gemessen werden konnte.

Auch Histidin kann eine vermehrte Sauerstoffradikalbildung induzieren, wobei unseren Untersuchungen zufolge ebenfalls vor allem die Superoxidanionen für das entstehende CL-Signal verantwortlich sind. Da die Histidinkonzentration in der befallenen Haut von Patienten mit AE erhöht ist, ist dies ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte Sauerstoffradikalbildung in diesen Arealen.

In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass auch die cis- und die trans-UCA neben ihrer UV-Filterfunktion fähig sind, UVA-induziert reaktive Sauerstoffspezies zu bilden.

Unsere Untersuchungen belegen, daß verschiedene Strukturen in der Haut für die Sauerstoffradikalbildung nach UV-Bestrahlung verantwortlich sind.

Neben einem veränderten Antioxidantienstatus können eine Veränderungen im Lipidstatus, eine Erhöhung des Histidins, eine Verringerung des UCA-Gehaltes als UV-Absorber und ein erhöhter Eisengehalt für dieses Phänomen verantwortlich sein.

6. Literatur

1. Abeck D., Stüb F.: Urocaninsäure - eine essentielle multifunktionelle Komponente der menschlichen Haut. *Aktuelle Dermatologie* 22 (1996) 123-128
2. Abeck D., Stüb F., Keyhani A., Keyhani R., Lange T., Sauermann G., Hoppe U., Ring J.: Antioxidant- and urocanic acid- status in atopic eczema: The *Journal of Investigative Dermatology* 103 (1994) 417
3. Albrecht S., Brandl H., Zimmermann T. Chemilumineszenz. *Hüthig GmbH (1996) Heidelberg* 2-8, 52-59
4. Aubailley D., Santus R., Salmon S.: Ferrous ion release from ferritin by ultraviolet-A radiations. *Photochemistry and Photobiology* 54 (1991) 769-773
5. Black Homer S.: Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochemistry and Photobiology* 46 (1987) 213-221
6. Bonte F., Saunois A., Pinguet P., Meybeck A.: Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Archives of Dermatological Research* 259 (1997) 78-82
7. Cadenas E., Sies H.: Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods in Enzymology* 105 (1984)
8. Cai Q., Takemura G., Ashraf M.: Antioxidative properties of histidine and its effect on myocardial injury during ischemia / reperfusion in isolated rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 25 (1995) 147-155

9. Campell A.K.: Chemiluminescence, principle and application in biology and medicine. *Ellis Horwood LTD., Chister (England) (1988) 15-67*

10. Chapkin R.S., Zibob V.A., Marcelo C.L., Voorhees J.J.: Metabolism of essential fatty acids by human epidermal enzyme preparation: evidence of chain elongation. *Journal of lipid research 27 (1986) 945-954*

11. Dalle Carbonare M., Pathak M.A.: Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *Photochemistry and Photobiology B: Biology 14 (1992) 105-124*

12. David T.J., Wells F.E., Sharpe T.C.: Serum levels of trace metals in children with atopic eczema. *British Journal of Dermatology 122 (1990) 485-489*

13. El-Ghorr A. A., Norval M. A monoclonal antibody to cis-urocanic acid prevents the ultraviolet-induced changes in Langerhans cells and delayed hypersensitivity responses in mice, although not preventing dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the site of irradiation and contact hypersensitivity responses. *Journal of Investigative Dermatology 105 (1995) 264-268*

14. Fischer T.: Die topische Wirkung eines Gamma-Linolensäurepräparates auf die Barrierefunktion und das Oberflächenrelief der Haut. Promotionsarbeit, München (1998) 26

15. Fuchs J.: Oxidative stress in dermatology. *Marcel Dekker, Inc. 11 (1993) 5, 50*

16. Goerz G., Merk H.: Biochemische Aspekte der Entzündungsreaktion -unter besonderer Berücksichtigung des Sauerstoffs. *Zeitschrift für Hautkrankheiten 58 (1983) 1669-1686*

17. Joshi P.C.: Ultraviolet radiation-induced photodegradation and $1O^2$, O^2 -production by riboflavin, lumichrome and lumiflavin. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 26 (1989) 186-189*

18. Kapp A., Zeck-Kapp G.: Interleukin-5-induced granulocyte activation in atopic patients. *British Journal of Dermatology* 125 (1991) 108-115
19. Keyhani A.: Untersuchungen pathologisch veränderter Hautzustände beim atopischen Ekzem mit nichtinvasiven in vivo Messmethoden – Promotionsarbeit, Hamburg (1994)
20. Kurimoto I., Streilein J.W.: Cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor- α 1. *The Journal of Immunology* 148 (1992) 3072-3078
21. Laihia J.K., Jansen C.T., Uksila J., Punnonen J., Neuvonen K., Pasanen P., Äyräs P.: Effects of cis- and trans – urocanic acids on the secretion of interleukin -1 β and tumor necrosis factor - α by peripheral blood monocytes. *Acta dermato – venereologica* 74 (1994) 266-268
22. Lakshmi R., Lakshmi A.V., Bamji M.S.: Skin wound healing in riboflavin deficiency. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 42 (1989) 185-191
23. Lowe N.J., Stoughton R.B.: Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. *British Journal of Dermatology* 96 (1977) 155-162
24. Meier B., Cross A.R., Hancock J.T., Kaup F.J., Jones O.T.G.: Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochemical Journal* 275 (1991) 241-245
25. Mendenhall G. D.: Analytische Anwendungen der Chemilumineszenz. *Angewandte Chemie* 89 (1977) 220-228
26. Mitra R.S., Shimizu Y., Nickoloff B.J.: Cis-urocanic acid and histamine augment TNF- α mediated induction of keratinocyte ICAM-1 expression and

- suppress IFN- γ induction of HLA-DR. *The Journal of Investigative Dermatology* 103 (1994) 490
27. Miyasato M., Taguchi K., Tsuda S., Kitamura N., Kato K.: Eosinophil chemiluminescence response to cytokines and opsonized zymosan in atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 104(suppl 1) (1994) 24-26
28. Moodycliffe A.M., Bucana C.D., Kripke M.L., Norval M., Ullrich S.E.: Differential effects of a monoclonal antibody to cis-urocanic acid on the suppression of delayed and contact hypersensitivity following ultraviolet irradiation. *Journal of Immunology* 157 (1996) 2891-2899
29. Morliere P., Salmon S., Aubailly M., Risler A., Santus R.: Sensitization of skin fibroblasts to UVA by excess iron. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334 (1997) 283-290
30. Moysan A., Marquis I., Gaboriau F., Santus R., Dubertret L., Morlier P.: Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology* 100 (1993) 692-698
31. Nishi J., Ogura R., Sugiyama M., Hidaka T., Kohno M.: Involvement of active oxygen in lipid peroxide radical reaction of epidermal homogenate following ultraviolet light exposure. *The Journal of Investigative Dermatology* 7 (1991) 115-119
32. Niwa Y., Kanoh T., Sakane T., Soh H., Kawai S. und Miyachi Y.: The ratio of lipidperoxides to superoxide dismutase activity in the skin lesions of patients with an accurate prognostic indicator. *Life sciences* 40 (1987) 921-927
33. Niwa Y.: Lipid peroxides and superoxide dismutase (SOD) induction in skin inflammatory diseases, and treatment with SOD preparations. *Dermatologica* 179(suppl 1) (1989) 101-106

34. Niwa Y., Iizawa O.: Abnormalities in serum lipids and leukocyte superoxide dismutase and associated cataract formation in patients with atopic dermatitis. *Archives of Dermatology* 130 (1994) 1387-1392
35. Noonan F., De Fabo E.C.: Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. *Immunology Today* 13 (1992) 250-254
36. Norval M., Gilmour J.W., Simpson T.J. : The effect of histamine receptor antagonists on immunosuppression induced by the cis-isomer of urocanic acid. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine* 7 (1990) 243-248
37. Ponc M., Weerheim A., Kempenaar J., Mommaas A.-M., Nugteren D.H.: Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation. *Journal of Lipid Research* 29 (1988) 949-961
38. Punnonen K., Autio P., Kiistala U., Ahotupa M.: In-vivo effects of solar-simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *British Journal of Dermatology* 125 (1991) 18-20
39. Punnonen K., Puntala A., Ahotupa M.: Effects of ultraviolet A and B irradiation on lipid peroxidation and activity of the antioxidant enzymes in keratinocytes in culture. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine* 8 (1991) 3-6
40. Saran M.: Bildung und Aktivitäten biologisch relevanter Sauerstoffspezies. *Angewandte Chemie* 98 (1986) 1061-1075
41. Sato K., Taguchi H., Maeda T., Minami H., Asada Y., Watanabe Y., Yoshikawa K. The primary cytotoxicity in ultraviolet-A-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *Journal of Investigative Dermatology* 105 (1995) 608-612

42. Schneider I-M., Wohlrab W.: Fettsäuren und Epidermis. *Der Hautarzt* 48 (1997) 303-310
43. Schwarz W., Schell H., Hüttinger G., Wasmeier H., Diepgen T.: Effects of UVA on human stratum corneum histidine and urocanic acid isomers. *Photodermatology* 4 (1987) 269-271
44. Seguchi T., Chang-Li C., Kusuda S., Takahashi M., Aisu K., Tezuka T.: Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Archives of Dermatology Research* 288 (1996) 442-446
45. Sies H.: Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie* 98 (1986) 1061-1075
46. Sies H.: Oxidative stress. *Academic Press Inc, London* (1985)
47. Stäb F., Keyhani A., Sauermann G., Hoppe U., Abeck D., Lange T., Ring J.: Oxidative stress – an important factor in the pathogenesis of atopic dermatitis. *53rd annual meeting of American Academy of Dermatology, New Orleans, 1995*
48. Sugiyama M., Kajiyama K., Hiadaku T., Kumanu S., Ogura R.: Lipid peroxidation and radical formation in methyl linoleate following ultraviolet light exposure. *Journal of Dermatology* 11 (1984) 455-459
49. Tedesco A. C., Martinez L., Gonzalez S.: Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30 (1997) 561-575
50. Trenam C.W., Blake D.R., Morris C.J. : Reactive oxygen species and the role of iron. *The Journal of Investigative Dermatology* 99 (1991) 675-682

51. Tyrrell Rex M.: Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Swiss Institute for Experimental Cancer Research, CH-1066 Epalinges, Switzerland.* S. 48
52. Uksila J.: Trans-urocanic acid, a natural epidermal constituent, inhibits human natural killer cell activity in vitro. *Experimental Dermatology* 3 (1994) 61-65
53. Vessey D. A., Lee K-H., Blacker K.L.: Characterization of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with peroxides. *The journal of Investigative Dermatology* 99 (1992) 859-863
54. Villiotou V., Deliconstantinos G.: Nitric oxide, peroxynitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Research* 15 (1995) 931-942
55. Wolber R.: Einfluss von oxidativem Stress auf die menschliche Haut unter besonderer Berücksichtigung des AE, Promotionsarbeit, Marburg (1996) S.5-9, 159

7. Danksagung

Herrn Professor Ring danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Herrn Professor Abeck danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvolle Unterstützung und die eingehende Beratung.

Frau Dr. Kerstin Strom und Frau Dr. Tanja Schmidt danke ich für die intensive und freundschaftliche Betreuung, sowohl im Rahmen der experimentellen Versuche als auch bei der Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten.

Herrn Professor Elstner, Frau Susanne Hippeli und Frau Kerstin Dornisch danke ich für ihre organisatorische Unterstützung und die fachliche Betreuung im Bereich der Chemilumineszenzdetektion.

Frau Susanne Plaschke gilt mein Dank für die angenehme Zusammenarbeit und die kompetente Hilfe bei der Durchführung meiner experimentellen Untersuchungen.

8. Lebenslauf:

NAME Corinne Cornelia Jessica Merkl
GEBURTSDATUM 28. Oktober 1971
GEBURTSORT München

SCHULBILDUNG

1978 - 1982 Grundschule Waldtrudering, München
1982 - 1992 Pestalozzi - Gymnasium, München

HOCHSCHULBILDUNG

1992 Okt - 1993 Feb Studium der Biotechnologie, Technische Universität Berlin
1993 Mai - 1995 Apr Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
1995 Mai – 1999 Sep Studium der Humanmedizin, Technische Universität München

FAMULATUREN

Sep - Okt 1995: Innere Medizin, Hospital San Carlos Madrid
Apr 1996: Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München
Sep 1996: Pathologie, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München
Okt 1996: Gynäkologie und Geburtshilfe, Kreiskrankenhaus Erding

Mär - Apr 1997: Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München

MED. PRAKTISCHES JAHR

Okt 1998 - Feb 1999 1. Tertial: Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München

Feb 1999 - Jun 1999 2. Tertial: Innere Medizin, Klinikum Passau

Jun 1999 - Sep 1999 3. Tertial: Chirurgie, Krankenhaus Bogenhausen

ÄRZTIN IM PRAKTIKUM

Nov 1999 – Mai 2001 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München

ASSISTENZÄRZTIN

Seit Jun 2001 Tätigkeit als Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München