

Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus der Klinik und Hochschulambulanz für Dermatologie  
Geschäftsführender Direktor und Abteilungsleiter:  
Prof. Dr. med. Prof. h. c. Constantin E. Orfanos

Einfluss von Tocopherol auf UV-induzierte NF- $\kappa$ B-Regulation und  
Lipidperoxidation in HaCaT-Keratinozyten

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von  
Tatjana Hertting  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. B. Tebbe

Korreferent: Prof. Dr. H. Meffert

Promotionsdatum: 17.12.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der  
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

*Was wir wissen, ist ein Tropfen,  
was wir nicht wissen, ist ein  
Ozean.*

*- Sir Isaac Newton -*

Im Gedenken an meinen Vater

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1.</b>	<b>BILDUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFVERBINDUNGEN (ROS) DURCH UV-LICHT</b>	<b>7</b>
<b>1.2.</b>	<b>DIE WIRKUNG DES UV-LICHTES AUF DIE HAUT – ROS ALS KOFAKTOREN BEI DER ENTSTEHUNG VON HAUTSCHÄDEN</b>	<b>10</b>
<b>1.3.</b>	<b>ANTIOXIDATIVE SCHUTZMECHANISMEN DER HAUT</b>	<b>12</b>
1.3.1.	Enzymatische Antioxidantien	13
1.3.2.	Nicht-enzymatische Antioxidantien	16
1.3.3.	Tocopherol	17
1.3.3.1.	Chemische Struktur	17
1.3.3.2.	Physiologische Funktion und Wirkungsweise von Tocopherol	19
1.3.3.3.	In vitro Untersuchungen zur Funktion von Tocopherol in Hautzellen	21
1.3.3.4.	Effekt von lokaler Tocopherol-Supplementation im Tiermodell	22
1.3.3.5.	Effekt von lokaler bzw. oraler Tocopherol-Supplementation beim Menschen	23
1.3.4.	Kombination von $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbinsäure	24
<b>1.4.</b>	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>27</b>
1.4.1.	Funktion von NF- $\kappa$ B in der Haut	30
1.4.2.	Zusammenhang von NF- $\kappa$ B, ROS und Antioxidantien	31
<b>1.5.</b>	<b>LIPIDPEROXIDATION</b>	<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>34</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>3.1.</b>	<b>MATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>35</b>
3.1.1.	Chemikalien und Lösungsmittel	35
3.1.2.	Geräte	35
3.1.3.	Zellen	36
<b>3.2.</b>	<b>ZELLKULTURTECHNIK</b>	<b>36</b>
<b>3.3.</b>	<b>PASSAGIEREN DER ZELLEN</b>	<b>37</b>
<b>3.4.</b>	<b>VITAMINSUPPLEMENTATION</b>	<b>37</b>
<b>3.5.</b>	<b>UVA-BESTRAHLUNG</b>	<b>38</b>
<b>3.6.</b>	<b>PROLIFERATIONSASSAY</b>	<b>38</b>

<b>3.7.</b>	<b>ZYTOTOXIZITÄTSASSAY</b>	<b>40</b>
3.7.1.	Chemisches Prinzip	40
3.7.2.	Kultivierung und Versuchsanordnung	41
3.7.3.	Messung und Kalkulation der Absorption	43
<b>3.8.</b>	<b>NF-kB - ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)</b>	<b>43</b>
3.8.1.	Kernproteinextraktion	44
3.8.2.	Proteinbestimmung	45
3.8.3.	Markierung der DNA	45
3.8.4.	Bindung der Kernproteine an die DNA	47
3.8.5.	Gelelektrophorese	47
3.8.6.	Auswertung im Phosphor Imaging System BAS 1500	49
<b>3.9.</b>	<b>IKBa-WESTERN-BLOT</b>	<b>49</b>
3.9.1.	Gesamtproteinextraktion	50
3.9.2.	Proteinbestimmung	50
3.9.3.	Elektrophorese	50
3.9.4.	Transfer	52
3.9.5.	Immunodetektion	52
<b>3.10.</b>	<b>BESTIMMUNG VON THIOBARBITURSÄUREREAKTIVEN SUBSTANZEN (TBARS)</b>	<b>53</b>
<b>3.11.</b>	<b>STATISTISCHE METHODE</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>4.1.</b>	<b>PROLIFERATIONSASSAY</b>	<b>55</b>
<b>4.2.</b>	<b>ZYTOTOXIZITÄTSASSAY</b>	<b>57</b>
<b>4.3.</b>	<b>NF-kB – EMSA</b>	<b>59</b>
<b>4.4.</b>	<b>IKBa-WESTERN-BLOT</b>	<b>64</b>
<b>4.5.</b>	<b>BESTIMMUNG VON TBARS</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
<b>5.1.</b>	<b>WIRKUNG VERSCHIEDENER TOCOPHEROL-DERIVATE AUF DIE NF-kB-/I-kB-AKTIVIERUNG IN KULTIVIERTEN HAcAT-KERATINOZYTEN NACH UVA-BESTRAHLUNG</b>	<b>68</b>
<b>5.2.</b>	<b>EINFLUSS VON TOCOPHEROL IN KOMBINATION MIT ASCORBINSÄURE AUF DIE NF-kB-BINDUNGSAKTIVITÄT IN KULTIVIERTEN HAcAT-KERATINOZYTEN</b>	<b>72</b>
<b>5.3.</b>	<b>EINFLUSS VERSCHIEDENER TOCOPHEROL-DERIVATE AUF DIE LIPIDPEROXIDATION IN HAcAT-KERATINOZYTEN NACH UVA-BESTRAHLUNG</b>	<b>75</b>

<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>99</b>
<b>12.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>100</b>