

1. EINLEITUNG

1.1. Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) durch UV-Licht

UV-Licht setzt sich aus Strahlung verschiedener Wellenlängen zusammen: UVA-Licht (320 - 400 nm), UVB-Licht (280 - 320 nm) und UVC-Licht (< 280 nm). Ein großer Anteil davon wird durch die Erdatmosphäre und die Ozonschicht absorbiert und gestreut, bevor das UV-Licht die Erdoberfläche erreicht. In der Ozonschicht der Stratosphäre wird das kurzwellige UVC-Licht durch molekularen Sauerstoff (O_2) absorbiert, wobei sich Ozon (O_3) bilden kann.

Auf die Erdoberfläche gelangt nur ein Bruchteil der von der Sonne ausgehenden Strahlung. Die Haut erreichen ca. 4 % des UVA-Lichtes und ca. 0,5 % des UVB-Lichtes, welches seine biologische Wirkung am Menschen entfaltet. Die Eindringtiefe des UV-Lichtes in die menschliche Haut unterscheidet sich je nach Wellenlänge. Das Stratum basale der Epidermis wird von ca. 1-10 % des auf die Haut einwirkenden UVB-Lichtes erreicht. UVA-Licht ist langwelliger, daher können ungefähr 20 % des UVA-Lichtes bis ins Stratum basale gelangen (Tyrrell 1995). UVA-Licht kann darüber hinaus durch die Dermis bis an die Grenze zur Subcutis penetrieren. UVA- und UVB-Licht werden für eine Reihe von Hautschäden, wie z. B. Photokarzinogenese, Hautalterung und Photodermatosen verantwortlich gemacht.

UV-Licht kann die Zellintegrität der Haut schädigen. Unter anderem wird dafür die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS) verantwortlich gemacht. Unter reaktiver Sauerstoffverbindung versteht man ein freies Radikal oder einen Stoff, der sich ähnlich verhält. Freie Radikale besitzen in ihrer Schale ein oder mehrere ungepaarte Elektronen, was zu einer hohen Reaktivität der Moleküle führt. Das bedeutet, dass reaktive Sauerstoffverbindungen andere Moleküle leicht oxidieren können und selber leicht mit anderen Stoffen reagieren. In der Biologie werden auch nicht-radikale Sauerstoffderivate, wie z. B. Wasserstoffperoxid zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gezählt, da sie wichtige Oxidantien darstellen (Podda und Grundmann-Kollmann 2001).

Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gehören z. B. Singulett-Sauerstoff (1O_2), das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Alkoxyradikal (RO^{\bullet}), das Hydroxyradikal (HO^{\bullet}), das Peroxidradikal (HOO^{\bullet}) und Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}).

ROS entstehen im physiologischen Zustand der meisten Zelltypen bei spezifischen metabolischen Prozessen, wie z. B. bei enzymatischen Oxidationen und bei der aeroben Zellatmung (Cerutti 1985; Darr und Fridovich 1994). Die Zelle kann die schädigenden Effekte von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch spezifische Abwehrmechanismen in einem gewissen Rahmen verhindern. Dazu dient ein antioxidatives System aus primären (*präventiven*) und sekundären (*abfangenden*) Antioxidantien, die ein *antioxidatives Netzwerk* bilden. Antioxidantien sind Substanzen, die in der Lage sind, eine andere Substanz vor der Oxidation zu schützen bzw. eine Oxidation dieses Stoffes zu verzögern. Antioxidantien intervenieren auf unterschiedlichen Stufen mit oxidativen Prozessen, z. B. durch das „Abfangen“ von freien Radikalen, durch Bindung von Metallionen oder durch die Elimination von oxidativ geschädigten Molekülen. Das „antioxidative Netzwerk“ ist dafür verantwortlich, dass die Zelle sich im pro- und antioxidativen Gleichgewicht befindet.

Dieses Gleichgewicht kann ins Wanken geraten, wenn die prooxidativen Einflüsse überwiegen; es können reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen (Sies 1986; Sies 1991). In diesem Fall erhöht sich die Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen, die in der Lage sind, biologisch relevante Moleküle wie z. B. die DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide zu schädigen. Bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen sind ROS involviert, wie z. B. Entzündungsgeschehen, antimikrobieller Schutz, Karzinogenese, Zellalterung und photobiologische Effekte (Ames 1987; Cerutti 1985; Chance et al. 1979; Halliwell 1989; Halliwell et al. 1989; Sies 1986; Sies und Cadenas 1985; Sies 1985).

Die meisten Hinweise darauf, dass UV-Licht die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Hautzellen bewirken kann, sind indirekte Hinweise.

UVA- und UVB-Licht interagieren mit unterschiedlichen Molekülen der Zellen und sind in der Lage, freie Radikale und andere aktive Verbindungen zu generieren. Unter der UV-Strahlung wird vor allem das UVA-Licht für die Produktion von Singulett-Sauerstoff verantwortlich gemacht (Tyrrell 1995).

Petersen et al. konnten in kultivierten HaCaT-Keratinocyten nach einer UVA-Bestrahlung eine dosisabhängige Erhöhung der intrazellulären H_2O_2 -Konzentration und der DNA-Schäden beobachten. Da H_2O_2 allein nicht fähig ist, die DNA direkt zu schädigen, untersuchte diese Gruppe die Bedeutung des Hydroxyl-Radikals. Durch eine Supplementation von $FeSO_4$, welches die Bildung von $\bullet OH$ aus H_2O_2 stimuliert (Fenton Reaktion), konnte ein zweifacher Anstieg der DNA-Schäden beobachtet werden. Desferrioxamin, ein Eisenchelator, welcher die

Fenton Reaktion blockiert, konnte dagegen die UVA-induzierte Entstehung von DNA-Schäden verhindern. Daraus schlossen Petersen et al., dass die Umwandlung von H_2O_2 zu $\bullet\text{OH}$ der wichtigste Schritt bei der Entstehung UVA-induzierter DNA-Schäden sein könnte (Petersen et al. 2000). Auch J. Fuchs et al. untersuchten den Zusammenhang von UVA-Licht und der ROS-Bildung und konnten in Keratinozyten von Nacktmäusen eine erhöhte ROS-Produktion nach in vitro UVA-Bestrahlung beobachten (Fuchs et al. 1989). Soo Lee et al. zeigten kürzlich, dass UVA-Licht oxidativen Stress in HaCaT-Keratinozyten induziert (Soo Lee et al. 2003). Sogar weit reichende Effekte auf die Gesamtheit des Organsystems, wie z. B. das UVA-assoziierte Erythem der menschlichen Haut, scheinen vom Vorhandensein von Sauerstoff abhängig zu sein (Tyrrell 1995).

Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass durch UVA-Licht und die Präsenz von molekularem Sauerstoff aktive Verbindungen entstehen können.

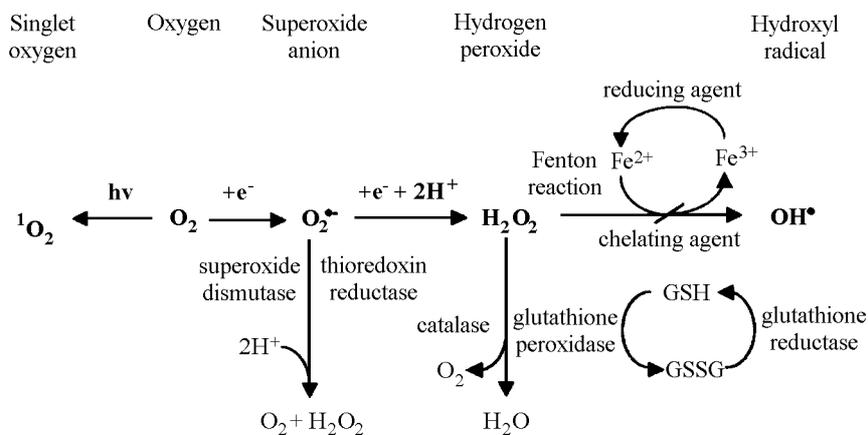


Abbildung 1: Intrazelluläre metabolische Signalwege der ROS-Bildung und Neutralisierung (Petersen et al. 2000)

1.2. Die Wirkung des UV-Lichtes auf die Haut – ROS als Kofaktoren bei der Entstehung von Hautschäden

Eine Anreicherung von ROS führt wie beschrieben zu einem prooxidativen-antioxidativen Ungleichgewicht der Zelle, wodurch Zellschäden und Veränderungen in der Genexpression im Zellkern verursacht werden. Erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffverbindungen können z. B. umfassende Schäden an der DNA (z. B. in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen), an Proteinen (Proteinoxidation) und an Lipiden (Lipidperoxidation) verursachen. Durch eine ROS-Anreicherung in der Zelle können Signaltransduktionswege aktiviert und Gene moduliert werden. Diese Gene regulieren Effektorgene, die das Zellwachstum, die zelluläre Alterung und die Zelltransformation in einen malignen Phänotyp steuern (Cerutti 1985; Cerutti 1994).

Die biologischen Effekte ultravioletten Lichtes an der Haut hängen unter anderem von der Bestrahlungszeit, -intensität und der Wellenlänge ab. Sie können in akute und chronische Effekte eingeteilt werden.

Eine akute UV-Exposition verursacht ein prostaglandinvermitteltes Erythem. Die zelluläre Immunität kann beeinflusst werden, indem durch UV-Licht die Anzahl von Langerhanszellen in der Haut und ihre Fähigkeit, Antigene zu präsentieren, vermindert wird. Zusätzlich hat UV-Licht eine supprimierende Wirkung auf T-Zellen, wodurch die Immunantwort gehemmt wird. Zu den durch UV-Licht verursachten akuten Hautschäden zählt auch die Bildung von sogenannten Sonnenbrandzellen, worunter man dyskeratotische Keratinozyten in der oberflächlichen Dermis versteht (Coldiron 1998). UVA- und UVB-Licht verursachen in Keratinozyten nach ca. zwei bis vier Stunden oxidative Zellschäden, die sich u. a. als Verlust der Zellkontakte, Vakuolenbildung, geschädigten Mitochondrien und einer Zellschrumpfung äußern (Giacomini et al. 1998).

Wird die Haut einer chronischen UV-Licht-Exposition ausgesetzt, resultieren morphologische Veränderungen der Epidermis, wie Parakeratose, Akanthose und eine Epidermisverdickung. Die Keratinozyten verlieren ihre typische Morphologie und akkumulieren Melanosomenkomplexe über dem Kern („nuclear capping“). Melanozyten können sich vergrößern und migrieren in höhere Epidermisschichten (Coldiron 1998).

An der Dermis zeigen sich nach chronischer UV-Licht-Exposition eine Vermehrung von Glykosaminoglykanen und ein Anstieg der Fibroblastenaktivität. Das Verhältnis von Typ-III-Kollagen zu Typ-I-Kollagen scheint sich zugunsten des Typ-I-Kollagens zu verändern. Dermale Gefäße dilatieren nach chronischer UV-Belastung und werden durchlässiger, inflammatorische Zellen, wie z. B. Mastzellen, ordnen sich um diese Gefäße an (Coldiron 1998).

Die Wirkungen von UV-Licht auf die Haut unterscheiden sich außerdem je nach Wellenlänge der Strahlung. Typischerweise verursacht UVB-Licht, welches aufgrund seiner Wellenlänge hauptsächlich in die Epidermis eindringt, eine Verdickung des Stratum corneum, ein prostaglandinvermitteltes Erythem an der Haut und DNA-Schäden in der Epidermis. UVB-Licht kann durch seine Eigenschaften, die DNA zu schädigen und eine Veränderung im Immunsystem zu bewirken, Hauttumoren hervorrufen. Tierexperimente zeigten, dass das UVB-Licht eine hohe Kanzerogenität besitzt. Ist ein Individuum für längere Zeit UVB-Licht ausgesetzt, können auch an den Augen Schäden wie Keratitis und Konjunktivitis auftreten. Auch das für den Kalziumhaushalt wichtige Vitamin D wird durch UVB-Licht in der Epidermis aus Dehydrocholesterin synthetisiert (Kindl 1993).

UVA-Licht ist langwelliger und kann daher tief in die Haut, durch die Dermis bis an die Grenze zur Subkutis, eindringen. Dadurch kann UVA-Licht Schäden in der Dermis verursachen, wie z. B. die Degeneration von Kollagenen. Die Bildung von freien Radikalen in den Hautzellen ist eine typische Reaktion auf UVA-Licht. Es existieren Hinweise, dass UVA-Licht eine größere Bedeutung – verglichen mit UVB-Licht – für die UV-induzierte oder aggravierte Hautalterung hat (Ambach und Blumthaler 1993). An der Haut sieht man diese Veränderungen als vermehrte Faltenbildung, typische Farbveränderungen, Verdickung des Stratum corneum und Ausbildung trockener und rauher Haut. Diese Zeichen der Hautalterung treten erst nach einer längeren Latenzzeit auf. UVA-Licht wird außerdem für diverse photoallergische Reaktionen verantwortlich gemacht (Rauterberg und Jung 1993).

Die Pigmentierung der Haut, welche einen Schutzmechanismus vor UV-Strahlung darstellt, wird klassischerweise in eine indirekte und eine direkte Pigmentierung eingeteilt. Verantwortlich für die indirekte (oder besser verzögerte) Pigmentierung ist das UVB-Licht. Es kommt nach dessen Einwirkung zu einer Vermehrung der aktiven Melanozyten und zu einer Aktivierung des Enzyms Tyrosinase. Diese Reaktionen erreichen nach 10-20 Tagen ihr

Maximum. Es entsteht eine lang anhaltende Bräunung, die erst mit der normalen Zellerneuerung abzublassen beginnt (Kindl 1993).

Bei der direkten Pigmentierung handelt es sich vorwiegend um die Oxidation und Nachdunklung farbschwacher Melaninvorstufen, die auf die Wirkung des UVA-Lichtes zurückgehen (Kindl 1993).

Nach neueren Untersuchungsergebnissen besteht kein genereller Unterschied zwischen diesen beiden Arten der Pigmentierung. Eine direkte Pigmentierung wird durch eine höhere Intensität der UV-Strahlung ausgelöst. Bei einer Einwirkung von UVB-Licht würden solche bräunungswirksamen Intensitäten durch den unerwünschten Effekt der Sonnenbrandauslösung zu schwersten Schäden führen (Kindl 1993).

1.3. Antioxidative Schutzmechanismen der Haut

Die Haut besitzt unterschiedliche Mechanismen, um sich gegen UV-Licht zu schützen. Vor allem tragen die Absorption von UV-Licht durch Melanin in der Epidermis und der Schutz durch Proteine speziell im Stratum corneum dazu bei, die schädigenden Einflüsse des UV-Lichtes zu minimieren. Die Dicke des Stratum corneum stellt den Hauptschutzmechanismus dar, da große Anteile von UVB-Licht durch diese Schicht absorbiert werden (Thiele et al. 2001). Sehr wichtig in diesem Zusammenhang ist das in den Keratinozyten herrschende Gleichgewicht von Prooxidantien zu Antioxidantien. Keratinozyten besitzen antioxidativ wirkende Schutzmechanismen in Form von enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien, um sich gegen oxidative Zellschäden zu schützen. So konnte zum Beispiel in in-vitro-Studien eine partielle Erholung von Keratinozyten beobachtet werden, in denen sieben Stunden zuvor oxidative Zellschäden aufgetreten waren (Giacomoni et al. 1998). Die maximalen DNA-Schäden nach UVA-Bestrahlung in Keratinozyten wurden sofort nach der Bestrahlung beobachtet, die Reparatur dieser Läsionen erfolgte mit einer Halbwertszeit von ca. 13 Minuten (Lehmann et al. 1998).

Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen molekulare Antioxidantien wie z. B. Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Proxidase und Glutathion-Reduktase (Fuchs et al. 1989). Unter den nicht-enzymatischen Antioxidantien finden sich Vitamine, wie z. B. Vitamin C (Ascorbinsäure) und Vitamin E (Tocopherol).

1.3.1. Enzymatische Antioxidantien

Biologische Antioxidantien sind natürliche Moleküle, die die unkontrollierte Bildung freier Radikale und aktivierter Sauerstoffverbindungen hemmen bzw. ihre Reaktion mit biologischen Strukturen verhindern können. Die Zerstörung der meisten freien Radikale und aktivierten Sauerstoffverbindungen ist von der Oxidation endogener Antioxidantien, hauptsächlich „Radikalabfängern“ und reduzierenden Molekülen, abhängig.

Die Zellen werden durch enzymatische Antioxidantien geschützt, wenn eine Belastung mit reduzierenden Radikalen, wie z. B. Superoxiden, vorliegt. Diese primären Peroxide werden kontinuierlich von aeroben Zellen produziert (Chaudière 1994) und können zellschädigende Kettenreaktionen auslösen. In der Natur existieren spezifische Enzyme, die in der Lage sind, Superoxide und Hydroperoxide zu zerstören.

Der Schutzmechanismus durch Enzyme bietet den Vorteil, dass die „steady-state“-Konzentration von Peroxiden den herrschenden zellulären Gegebenheiten schnell angepasst werden kann. Unterschiedliche antioxidative Enzyme können durch endogene Effektoren induziert, gehemmt oder aktiviert werden (Harris 1992). Enzyme wirken sehr effektiv und können selektive antioxidative Eigenschaften haben, wie z. B. das Wiederherstellen der DNA-Struktur, die Reparatur von Phospholipiden und die Reparatur bzw. Resynthese von Proteinen. Der enzymatische Abbau von Superoxiden wird durch die Superoxiddismutase vorgenommen, während die Katalase, Glutathionperoxidase und Ascorbatperoxidase den Abbau von Hydroperoxiden gewährleisten. Superoxiddismutase und Katalase sind Dismutasen und benötigen keine Kofaktoren; es wird also keine Energie für diese enzymatischen Reaktionen verbraucht. Dagegen sind die Glutathionperoxidase und die Ascorbatperoxidase Reduktasen, deren reduzierende Koenzyme durch NAD(P)H-Equivalente regeneriert werden (Chaudière und Ferrari-Iliou 1999).

Die Katalase ist ein Enzym mit hohem molekularem Gewicht, welches Porphyrin enthält. Katalase ist hauptsächlich in Peroxisomen lokalisiert und wirkt protektiv, indem es eine Reduktion von H_2O_2 katalysiert (siehe Reaktionsgleichung 1).



Reaktionsgleichung 1: Reduktasewirkung der Katalase

Alternativ kann Katalase bei niedrigen Hydrogenperoxid-Konzentrationen als Peroxidase wirken, wozu reduzierende Ko-Substrate wie z. B. Ascorbinsäure und Phenol benötigt werden (siehe Reaktionsgleichung 2).

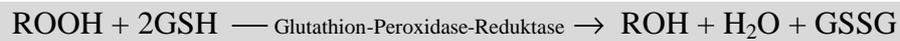


Reaktionsgleichung 2: Peroxidasewirkung der Katalase

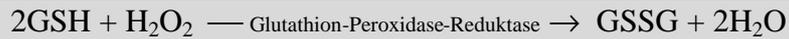
In den Zellen von Säugetieren ist Katalase an NADPH gebunden, welches das Enzym wahrscheinlich vor Inaktivierung durch H_2O_2 schützt (Kirkman et al. 1987).

Eine große Gefahr für die Zelle besteht, wenn durch die Reaktion von H_2O_2 mit Fe^{2+} Hydroxylradikale (HO^\bullet) entstehen. Diese sind sehr reaktiv und können zu DNA-Strang-Brüchen führen (Petersen et al. 2000). Durch die Reduktion von H_2O_2 schützt sich die Zelle also vor oxidativen Schäden. Guarrera et al. berichteten, dass in höheren Schichten des Stratum corneum der Haut gesunder Probanden Katalaseaktivität nachgewiesen werden konnte, die bei Patienten mit polymorpher Lichtdermatose nur in viel geringerem Ausmaß zu finden war (Guarrera et al. 1998).

Gluthation-Peroxidasen haben die vorrangige Aufgabe, Wasserstoffperoxid und organische Hydroperoxide zu eliminieren. Dies geschieht, indem sie die Reduktion von organischen Hydroperoxiden (ROOH) zu Alkoholen katalysieren (siehe Reaktionsgleichung 3) (Chance et al. 1979). Wasserstoffperoxid hingegen wird durch die Glutathion-Peroxidase-Reduktase neutralisiert, indem es durch Oxidation von GSH zu Wasser reduziert wird (siehe Reaktionsgleichung 4). Es existieren selenabhängige Gluthation-Peroxidasen und selenunabhängige Gluthation-Peroxidasen, wobei die Kinetik der selenabhängigen Gluthation-Peroxidasen sehr viel höher ist als die der selenunabhängigen (Flohé 1989; Ursini et al. 1995). Selenabhängige Gluthation-Peroxidasen konnten in tierischen Zellen, nicht jedoch in pflanzlichen Zellen gefunden werden.

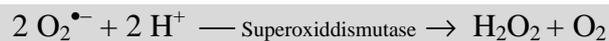


Reaktionsgleichung 3: Reduktion organischer Hydroperoxide durch die Glutathion-Peroxidase-Reduktase



Reaktionsgleichung 4: Wirkungsweise der Glutathion-Peroxidase-Reduktase

Desweiteren existieren verschiedene Superoxiddismutasen, wie die Kupfer/Zink-Superoxiddismutase und die Magnesium-Superoxiddismutase, deren Aufgabe es ist, Sauerstoffradikale abzufangen, indem sie die sehr zelltoxischen Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandeln (siehe Reaktionsgleichung 5) (Fridovich 1997; McCord und Fridovich 1969; Steinman 1982). Der Umsatz der Superoxiddismutasen, sowie ihre intrazelluläre Konzentrationen sind sehr hoch, um Superoxidanionen so schnell wie möglich zu eliminieren. Dadurch schützen Superoxiddismutasen andere Enzyme, wie die Katalase und die Glutathion-Peroxidasen vor der Inaktivierung durch Superoxidanionen (Blum und Fridovich 1985; Kono und Fridovich 1982; Shimizu et al. 1984). Anschließend ist es der Katalase oder der Glutathion-Peroxidase möglich, das durch die Reaktion entstandene Wasserstoffperoxid zu eliminieren.



Reaktionsgleichung 5: Wirkungsweise der Superoxiddismutase

UV-Licht und sichtbares Licht können an verschiedenen Stellen das Zellgleichgewicht stören. Durch UV-Licht wird nicht nur eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen bewirkt, sondern zusätzlich die Aktivität der Katalase und der Glutathion-Reduktase gehemmt. Das bedeutet, dass auch die Schutzmechanismen der Zellen geschwächt werden (Fuchs et al. 1989). Außerdem entsteht nach UVA-Bestrahlung in der Zelle vermehrt freies Eisen, welches mit H_2O_2 zu dem extrem reaktiven Hydroxylradikal (HO^\bullet) reagieren kann (Petersen et al. 2000).

1.3.2. Nicht-enzymatische Antioxidantien

Nicht-enzymatische Antioxidantien sind essentiell für den Schutz der Zelle gegen die meisten reaktiven Sauerstoffverbindungen. Ihre antioxidativen Wirkungen können entweder durch chemische Reaktionen der freien Radikale und aktivierten Sauerstoffverbindungen oder durch physikalische „Radikalabfänger“ erreicht werden. Durch physikalisches „abfangen“ der Radikale bleibt die Struktur des Antioxidationsmittels (z. B. des Vitamins) intakt, so dass keine Regenerationsreaktionen nötig werden. Die Kinetik dieser nicht-enzymatischen Reaktionen ist sehr viel höher als die der meisten anderen biologischen Reaktionen. Grundsätzlich sollte man zwischen hydrophilen nicht-enzymatischen Antioxidantien und hydrophoben nicht-enzymatischen Antioxidantien unterscheiden.

Unter den hydrophilen Antioxidantien, welche sich im Zytosol, in Mitochondrien und in hydrophilen Kernkompartimenten befinden, gelten Ascorbinsäure und Glutathion als die bedeutendsten natürlichen „Radikalabfänger“ (Bendich et al. 1986; Gerard-Monnier und Chaudière 1996). Ihre intrazelluläre Konzentration ist sehr viel höher als die der meisten anderen nukleophilen und reduzierenden Biomoleküle und beträgt typischerweise 1 mM bis 10 mM (Chaudière und Ferrari-Iliou 1999).

Hydrophobe Antioxidantien finden sich in Lipoproteinen und Membranen, wo sie entweder die Lipidperoxidation hemmen, indem sie Peroxidradikale (ROO^\bullet) zerstören (Halliwell und Chirico 1993), oder sie blockieren die Hydroperoxidbildung aus Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Zu den hydrophoben Antioxidantien zählen u. a. das Tocopherol, die Carotinoide, und möglicherweise Ubiquinol, die reduzierte Form vom Koenzym Q.

Die durch UV-Licht induzierte ROS-Bildung geht nicht nur mit Lipidschäden, Proteinschäden und DNA-Schäden einher, sondern kann auch die endogenen enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien der Haut erschöpfen. Diese endogenen Reserven durch exogene Zufuhr zu unterstützen, stellt einen möglicherweise sinnvollen Schutzmechanismus vor Schäden dar, die durch UV-Licht verursacht werden.

1.3.3. Tocopherol

RRR- α -Tocopherol (Vitamin E) ist ein lipophiles essentielles Vitamin. Tocopherol fungiert als Koenzym in Zellmembranen und dient als Radikalfänger. Es ist essentiell für die Fruchtbarkeit und die Fortpflanzung, schützt die Zelle vor Oxidation und ist in die Entstehung der roten Blutzellen involviert.

In der Natur findet man Tocopherol vorwiegend in Speiseöl, Sonnenblumenkernen, Mandeln, Nüssen, Margarine, Parmesan, Cheddar-Käse, Avocados, Karotten, Tomaten, Mais und Kartoffeln.

1.3.3.1. Chemische Struktur

Vier natürliche Tocopherol-Isomere sind bekannt:

- *alpha* - Tocopherol $C_{29}H_{50} O_2$ is 5,7,8,-trimethyltolcol
- *beta* - Tocopherol $C_{28}H_{48} O_2$ is 5,8,-trimethyltolcol
- *gamma* - Tocopherol $C_{28}H_{48} O_2$ is 7,8,-trimethyltolcol
- *delta* - Tocopherol $C_{27}H_{46} O_2$ is 8,-trimethyltolcol

| | R₁ | R₂ | R₃ |
|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| α -Tocopherol | CH ₃ | CH ₃ | C ₁₆ H ₃₃ |
| β -Tocopherol | CH ₃ | H | C ₁₆ H ₃₃ |
| γ -Tocopherol | H | CH ₃ | C ₁₆ H ₃₃ |
| δ -Tocopherol | H | H | C ₁₆ H ₃₃ |

Tabelle 1: Unterschiedliche Seitenketten der Tocopherol-Isomere

Von den natürlichen Tocopherolen besitzt alpha-Tocopherol die stärkste biologische antioxidative Aktivität in vivo (vgl. Abb. 2) (Bunyan et al. 1961; Fryer 1993; Nachbar und Korting 1993; Yamauchi et al. 2001).

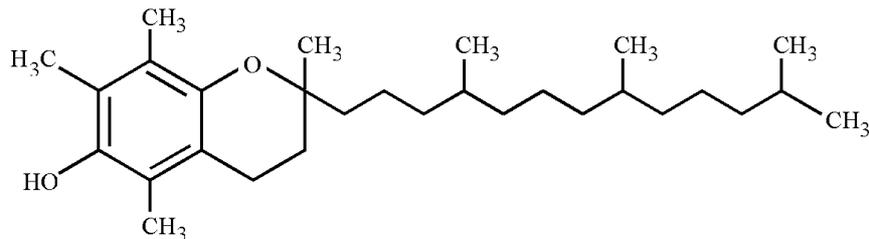


Abbildung 2: Chemische Strukturformel von *α-Tocopherol*

Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid) ist ein wasserlösliches α -Tocopherol-Analogon, welches wie α -Tocopherol ein starkes Antioxidationsmittel ist (siehe Abb. 3) (Barclay et al. 1985).

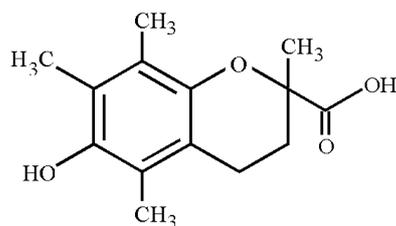


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von *Trolox*

Es existieren α -Tocopherol-Derivate, die aufgrund anderer funktioneller Gruppen leicht veränderte Eigenschaften aufweisen. In dieser Arbeit wurden die α -Tocopherol-Derivate α -Tocopherol-Acetat (siehe Abb. 4) und α -Tocopherol-Succinat (siehe Abb. 5) vergleichend zu α -Tocopherol untersucht.

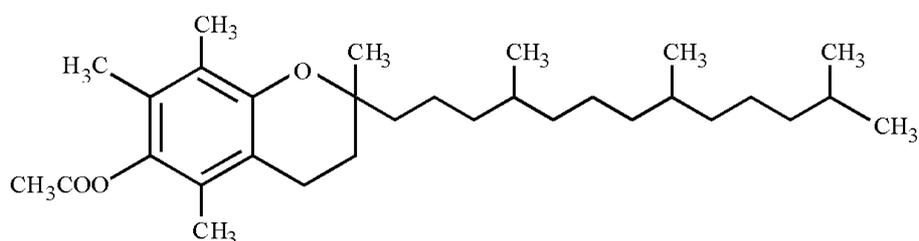


Abbildung 4: Chemische Strukturformel von *α-Tocopherol-Acetat*

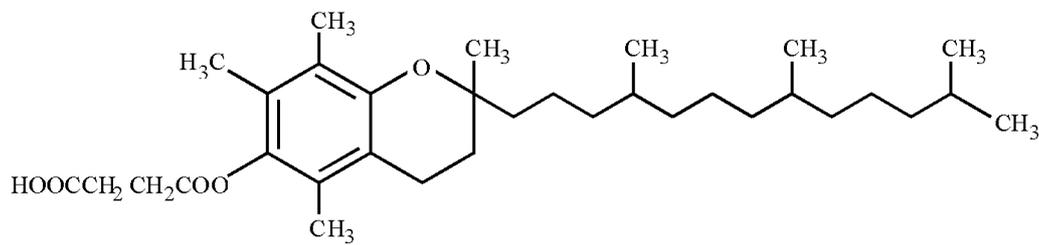


Abbildung 5: Chemische Strukturformel von α -Tocopherol-Succinat

1.3.3.2. *Physiologische Funktion und Wirkungsweise von Tocopherol*

Tocopherol übt Einfluss auf die Zellintegrität, Zellimmunität, Apoptose, DNA-Schäden, maligne Zelltransformation und auf Signaltransduktionswege aus (Claycombe und Meydani 2001; Gensler und Magdaleno 1991). Es existieren viele Studien, die sich mit den Effekten von Tocopherol auf UV-induzierte Zellschäden beschäftigen, jedoch sind die Mechanismen, über die Tocopherol wirkt, nicht vollständig geklärt.

Alpha-Tocopherol gilt als wirksamster Peroxid-Radikalfänger in Membranen und in Lipoproteinen (LDL) (Esterbauer et al. 1991). Es entfaltet seine antioxidative Wirkung, indem es z. B. Peroxid-Radikale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden in Membranen oder in Lipoproteinen reduziert (siehe Abb. 6). α -Tocopherol ist im Plasma (Burton et al. 1982) und in roten Blutzellen (Burton et al. 1983) das wichtigste lipidlösliche Antioxidationsmittel, welches Lipide gegen peroxidative Schäden zu schützen vermag. Alpha-Tocopherol ist das vorherrschende Tocopherol-Isomer und macht ca. 90 % des Gewebe-Tocopherols aus (Sorg et al. 2001). Der Gehalt an α -Tocopherol in der menschlichen Epidermis liegt bei ca. 31-40 nmol/g, in der Dermis bei ca. 16 nmol/g (Shindo et al. 1994; Sorg et al. 2001).

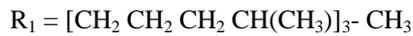
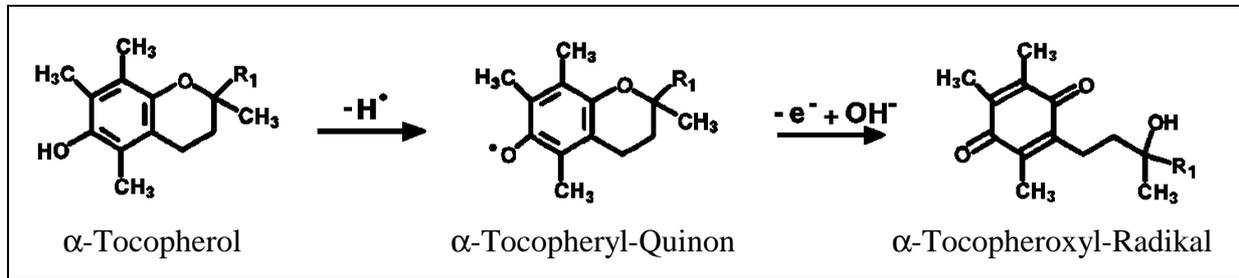


Abbildung 6: Alpha-Tocopherol fängt durch Hydrogentransfer Lipidperoxidradikale ab

Das stabilisierte Peroxidradikal ($\alpha\text{-T}^\bullet$) wird wieder zu $\alpha\text{-Tocopherol}$ reduziert (Chaudière und Ferrari-Iliou 1999).

Tocopherol übt immunstimulierende und anti-inflammatorische Wirkungen aus, die sich daraus ergeben, dass $\alpha\text{-Tocopherol}$ in der Lage ist, Lysosomen zu stabilisieren, die IL-2-Produktion zu erhöhen und mit Eikosanoiden zu interagieren, um die Prostaglandin E_2 -Synthese zu reduzieren (Diplock et al. 1989). Durch $\alpha\text{-Tocopherol}$ wird die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Interleukin- 1β durch Hemmung des 5-Lipoxygenase-Reaktionsweges vermindert (Devaraj und Jialal 1999). Außerdem können die Zelladhäsion und die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Entstehung durch $\alpha\text{-Tocopherol}$ gehemmt werden, welche zentrale Prozesse bei Entzündungsgeschehen ausmachen (Cachia et al. 1998; Devaraj et al. 1996; Kanno et al. 1995; Kanno et al. 1996; Yoshida et al. 1999).

Es existieren folgende Hinweise, dass die antioxidative Wirkung nicht die einzige ist, über die $\alpha\text{-Tocopherol}$ seine Wirkung entfaltet.

Der Zusammenhang zwischen $\alpha\text{-Tocopherol}$ und der Induktion von Signaltransduktionswegen bzw. der Steigerung oder Hemmung der Transkriptionsaktivität in unterschiedlichen Zellen wurde untersucht. Die Arbeitsgruppe von A. Azzi fand heraus, dass $\alpha\text{-Tocopherol}$ in der Lage ist, AP-1 zu aktivieren. Dies geschieht unter Bedingungen, unter denen die Proteinkinase C gehemmt oder inaktiviert wird. Auch findet eine Verhinderung der AP-1-Aktivierung durch $\alpha\text{-Tocopherol}$ statt, wenn die Proteinkinase C stimuliert wird. Diese Effekte konnten durch $\beta\text{-Tocopherol}$, welches sehr ähnliche antioxidative Eigenschaften besitzt, nicht ausgelöst werden. Daraus schlossen Azzi et al., dass $\alpha\text{-Tocopherol}$ in glatten Muskelzellen durch Kontrolle von Signaltransduktionswegen wirken kann (Azzi et al. 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die totale und nicht-spezifische Transkriptionsaktivität in der Leber von Ratten höher war, wenn diesen 30 IU α -Tocopherol-Acetat pro Kilogramm Körpergewicht zugefüttert wurde (Summerfield und Tappel 1984). Auch Azzi et al. stellten fest, dass die Gen-Transkription durch α -Tocopherol reguliert werden kann (Azzi et al. 1998). Durch α -Tocopherol wurde eine erhöhte Expression von α -Tropomyosin beobachtet (Aratri et al. 1999). Die Kollagen- α -1(I)Genexpression in der Leber konnte durch eine Langzeit- oder Kurzzeit-Supplementation mit α -Tocopherol gehemmt werden (Chojkier et al. 1998).

1.3.3.3. In vitro Untersuchungen zur Funktion von Tocopherol in Hautzellen

In unterschiedlichen Forschungsgruppen wurden die Auswirkungen von α -Tocopherol und seiner Derivate auf verschiedene Zelllinien, wie z. B. humane Keratinozyten, Fibroblasten oder HaCaT-Zellen beobachtet. Es wurden u. a. Auswirkungen auf die Morphologie, DNA-Schäden, Signaltransduktionswege, Apoptose und Lipidperoxidation entdeckt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation des zellulären Redoxstatus mit der Sensibilität der Zelle für DNA-Schäden besteht, die durch UV-Licht verursacht wurden. HaCaT-Keratinozyten, die vor der UV-Bestrahlung mit einem durch α -Tocopherol supplementierten Medium versorgt wurden, wiesen signifikant weniger DNA-Schäden auf (Lehmann et al. 1998). Chromosomenschäden, die durch freie Radikale induziert wurden, konnten durch die Anwendung von α -Tocopherol signifikant reduziert werden (Antunes und Takahashi 1998; Factor et al. 2000; Pincheira et al. 1999). Der Einsatz von Tocopherol kann sowohl die durch Wasserstoffperoxid induzierte Bildung von Hydroxylradikalen und sich daraus ergebende DNA-Basenpaar-Modifikationen in humanen oralen Epithelzellen reduzieren (Royack et al. 2000), als auch Wasserstoffperoxid-induzierte DNA-Strang-Brüche in der humanen Hautzelllinie VH10 dezimieren (Slamenova et al. 1999).

Peus et al. konnten darlegen, dass nach Bestrahlung von humanen Keratinozyten mit physiologischen UVB-Dosen folgende Aktivierungen durch ROS vermittelt worden waren: die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor = EGFR), die Aktivierung extrazellulär-regulierter Kinasen 1 und 2 (ERK 1 und 2) und die Aktivierung des p38-Signaltransduktionsweges (Peus et al. 1999a; Peus et al. 1999b; Peus et al. 1998). Diese Aktivierungen können durch Antioxidantien beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang erforschten Peus et al. die Wirkung von Trolox, einem wasserlöslichen Tocopherol-Analogen, auf UVB-induzierte intrazelluläre H₂O₂-Bildung in Keratinozyten. Es stellte sich heraus, dass Trolox in der Lage war, sowohl die basale als auch die durch UVB-Licht induzierte H₂O₂-Bildung konzentrationsabhängig zu hemmen (Peus et al. 2001).

Desweiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Apoptose und Tocopherol entdeckt. Tocopherol war in der Lage, die Lipidperoxidation und Apoptose in HL-60 Zellen zu hemmen (Barroso et al. 1997). Auch konnte dargelegt werden, dass die prostaglandin-F₂-induzierte Apoptose in ovariellen Corpus-luteum-Zellen durch Tocopherol gehemmt wurde (Vierk et al. 1998). Tyurina et al. belegten, dass Tocopherol in der Lage ist, die lipopolysaccharid-induzierte Apoptose in humanen Endothelzellen zu hemmen (Tyurina et al. 1997). Allerdings existieren auch Studien, in denen kein Effekt von α -Tocopherol auf die Apoptose zu finden war. Galleron et al. konnten z. B. keinen Effekt von α -Tocopherol auf die durch Superoxidanionen verursachte Apoptose in Synoviozyten feststellen (Galleron et al. 1999).

1.3.3.4. Effekt von lokaler Tocopherol-Supplementation im Tiermodell

Eine Supplementation der Haut mit Antioxidantien kann dazu führen, das Gleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien nach einer UV-Bestrahlung aufrecht zu erhalten. Dadurch können oxidative Hautschäden vermindert werden. Die Effekte topisch angewandter Antioxidantien wie α -Tocopherol wurden am Tiermodell untersucht.

Direkt nach einer UVB-Bestrahlung äußerlich angewandtes α -Tocopherol-Acetat reduzierte in Mäusehaut das sonnenbrandassoziierte Erythem, Ödeme und eine erhöhte Hautsensibilität, die ohne diese Behandlung hervorgerufen wurden (Trevithick et al. 1992). Wurde α -Tocopherol in Tierversuchen äußerlich angewandt, sanken die messbaren thiobarbitursäurereaktiven

Substanzen in Mäusehaut ab; die Thymin-Dimer-Bildung wurde verhindert, und auch die Bildung mutagener Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere in p53 wurde gehemmt (McVean und Liebler 1999).

Durch UVA-Licht wird die Antigen-Präsentation der Langerhanszellen gehemmt. α -Tocopherol schützt Langerhanszellen vor dieser Hemmung (Fuchs 1998). Nach topischer α -Tocopherol-Applikation konnte bei Mäusen die durch UV-Licht ausgelöste Schwächung des Immunsystems der Haut verhindert werden (Yuen und Halliday 1997).

1.3.3.5. Effekt von lokaler bzw. oraler Tocopherol-Supplementation beim Menschen

Der Schutz der Haut durch Tocopherol konnte z. T. in Versuchen mit Probanden bestätigt werden.

Meydani et al. fanden heraus, dass eine orale Langzeitbehandlung für 235 Tage mit α -Tocopherol bei gesunden älteren Menschen (≥ 65 Jahre) eine klinisch relevante Erhöhung der T-Zell-vermittelten Immunität bewirkt. Niedrigere (60 mg/d) und höhere (800 mg/d) α -Tocopherol-Dosen waren der Einnahme von 200 mg/d unterlegen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass es einen optimalen Dosisbereich für die immunstimulierenden Effekte von α -Tocopherol gibt. Die von den Probanden selbst dokumentierten Infektionen lagen bei der mit α -Tocopherol behandelten Gruppe 30 % niedriger als in der Placebo-Gruppe. Sämtliche Vitamingaben zeigten keinerlei unerwünschte Begleiterscheinungen (Meydani et al. 1997).

Werninghaus et al. führten eine Langzeitstudie mit gesunden Probanden durch, die täglich α -Tocopherol-Acetat in einer Dosierung von 400 IU über einen Zeitraum von sechs Monaten zu sich nahmen. Die minimale Erythem-Dosis und die Menge der produzierten Sonnenbrandzellen der mit Vitamin supplementierten Gruppe unterschied sich nicht wesentlich von der Placebo-Gruppe, jedoch war auch kein signifikanter Unterschied der Plasmakonzentrationen von α -Tocopherol in den verglichenen Gruppen nach einem bzw. nach sechs Monaten zu sehen (Werninghaus et al. 1994).

Die Wirkung einer topischen Applikation von α -Tocopherol wurde an menschlicher Haut untersucht, da eine unterstützende Wirkung chemischer oder physikalischer Lichtschutzmittel durch Antioxidantien sinnvoll erscheint.

Dreher et al. zeigten in ihrer in vivo Studie, dass eine alkoholische Lotion, die 2 % α -Tocopherol enthielt, als signifikanter Schutz der menschlichen Haut vor einem Erythem diene. Diese Lotion wurde 30 Minuten vor UV-Bestrahlung mit einer Dosis von 2 mg/cm^2 auf die Haut aufgetragen. Die Lotion selber hatte keine signifikanten Lichtschutzeigenschaften, was eine in vitro Untersuchung des Lichtschutzfaktors ergab. Daher könnte der festgestellte photoprotektive Effekt dieser Lotion auf die antioxidativen Eigenschaften des α -Tocopherols zurückgeführt werden (Dreher et al. 1998).

Auch für das topisch angewandte α -Tocopherol-Derivat α -Tocopherol-Acetat konnte eine photoprotektive Wirkung gezeigt werden. Wurde α -Tocopherol-Acetat in einer Konzentration von 1 % topisch angewandt, konnte die Bildung von Sonnenbrandzellen in humaner Haut reduziert werden (Msika et al. 1990).

In einer Studie mit humaner Haut von Dreher et al. konnte jedoch keine signifikante Photoprotektion durch α -Tocopherol bei topischer Anwendung gezeigt werden (Bangha et al. 1997; Dreher et al. 1999). Dreher et al. untersuchten den Schutz der Haut durch topisch angewandtes Tocopherol, topisch angewandte Ascorbinsäure oder eine Kombination dieser beiden Vitamine. Die Supplementation der Haut mit Tocopherol bzw. Ascorbinsäure erfolgte bei diesen Versuchen nach der UV-Bestrahlung. Es konnte auf diese Weise kein signifikanter Schutz der Haut vor UV-Licht erreicht werden. Die Haut muss also zum Zeitpunkt der UV-Bestrahlung mit einer relevanten Konzentration an Antioxidantien versorgt sein, damit oxidative Schäden verhindert werden können.

1.3.4. Kombination von α -Tocopherol und Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (siehe Abb. 7) ist ein für den Menschen essentielles wasserlösliches Vitamin. Ascorbinsäure spielt eine Rolle bei vielen lebensnotwendigen Funktionen innerhalb der Zellen, wie z. B. bei Hydroxylierungsreaktionen der Kollagenbiosynthese (Peterkofsky 1991), bei der Erleichterung des Eisentransportes (Hallberg et al. 1987), und es ist ein wichtiges physiologisches Antioxidationsmittel (Beyer 1994).

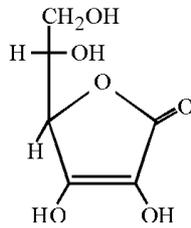


Abbildung 7: Chemische Strukturformel von *Ascorbinsäure*

Es konnte gezeigt werden, dass Ascorbinsäure in der Lage ist, eine NF- κ B-Aktivierung durch multiple Stimuli in der Endothelzelllinie ECV304 und in primären HUVEC-Zellen zu hemmen (Bowie und O'Neill 2000).

Außerdem kann Ascorbinsäure ein „Recycling“ von α -Tocopherol bewirken (siehe Abb. 8), indem es die radikale Form von α -Tocopherol regeneriert (Beyer 1994; Chan 1993; Thiele et al. 2001).

Darr et al. untersuchten die protektive Wirkung einer kombinierten Anwendung von Tocopherol, Ascorbinsäure und einer Sonnencreme, die hauptsächlich einen UVB-Lichtschutzfaktor aufwies. Diese Kombination wurde an Schweinehaut getestet, und es war so möglich, einen guten Schutz vor Zellschäden, die durch UVB-Licht verursacht wurden, nachzuweisen. Wurden Tocopherol und Ascorbinsäure mit einer Sonnencreme kombiniert, die vor allem einen UVA-Lichtschutzfaktor aufwies, so konnte ein über die additive Wirkung hinausgehender Schutz vor phototoxischen Schäden festgestellt werden (Darr et al. 1996).

Eberlein-König et al. stellten einen Schutz der menschlichen Haut vor UVA- bzw. UVB-Licht durch oral applizierte Vitamine (Ascorbinsäure in Kombination mit Tocopherol) fest. Vitamin C wurde acht Tage lang in einer Dosierung von 2000 mg/Tag und Tocopherol ebenfalls acht Tage lang in einer Dosierung von 1000 IU/Tag gegeben. Die minimale Erythem-Dosis (minimal erythema dose = MED) erhöhte sich bei der Probandengruppe, die die Vitamine bekam. In der Placebo-Gruppe konnte ein Abfallen der MED beobachtet werden. Eine kombinierte orale Behandlung mit Ascorbinsäure und Tocopherol konnte also in diesem Fall die Sonnenbrandreaktion abschwächen (Eberlein-König et al. 1998).

Desgleichen konnten auch Fuchs et al. darlegen, dass α -Tocopherol oral eingenommen in einer Dosierung von 2 g pro Tag über 50 Tage lang kombiniert mit Ascorbinsäure die Sonnenbrandreaktion von gesunden Probanden reduziert. Der Lichtschutzfaktor lag dabei

jedoch nur bei einem Wert von ca. 2. Eine alleinige α -Tocopherol- bzw. Ascorbinsäure-Supplementation zeigte keine signifikante Reduzierung der Sonnenbrandreaktion (Fuchs und Kern 1998).

Eine Kombinationsbehandlung mit α -Tocopherol und Ascorbinsäure kann also synergistisch wirken, und somit eine Wirkungssteigerung der Behandlung hervorrufen.

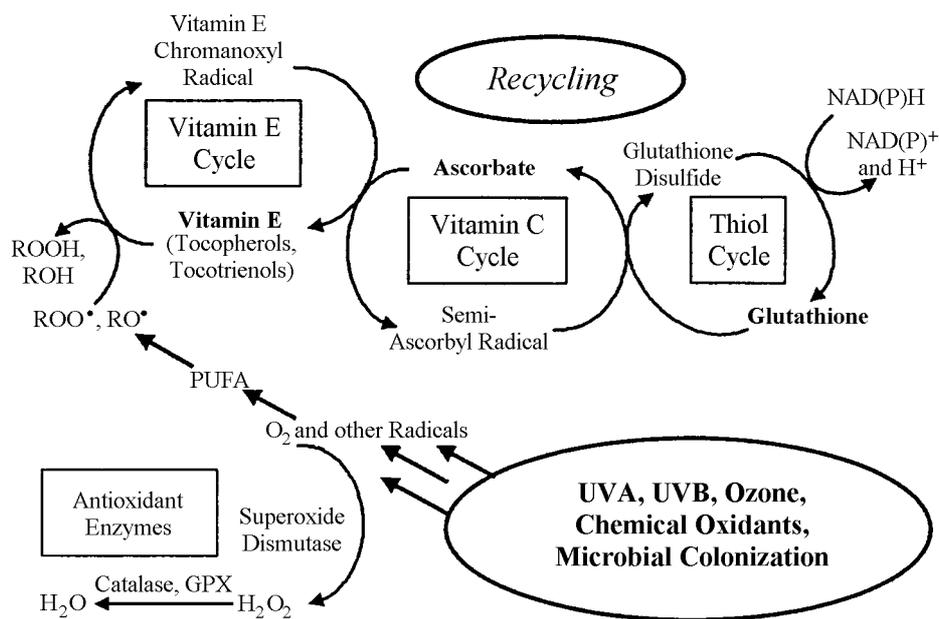


Abbildung 8: Das antioxidative Netzwerk der Haut
Vorherrschende Rolle von α -Tocopherol und sein Recycling durch Co-Antioxidantien.
GPX = Glutathion Peroxidase (Thiele et al. 2001).

1.4. NF- κ B

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch sequenzspezifische Bindung an regulatorische Promotor- und Enhancer-Einheiten der DNA die Transkription von Genen regulieren können. Es existieren zellspezifische Transkriptionsfaktoren, oder solche, die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiviert sind, sowie ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, die durch zahlreiche unterschiedliche Stimuli aktiviert werden können. Unter letzteren findet sich der nuclear factor- κ B (NF- κ B). Die Proteine der NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilie stellen ein spezialisiertes System eines pluripotenten Aktivierungsfaktors für eine zelluläre Antwort auf Veränderungen in der Umwelt dar.

Als erste beschrieben Sen und Baltimore 1986 NF- κ B als Transkriptionsfaktor am kappa-Leichtketten-Enhancer, einer spezifischen DNA-Region in reifen B Lymphozyten der Maus (Sen 1986). Desweiteren wurde NF- κ B in vielen Zellpopulationen, wie z. B. Keratinozyten, Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Neuronen, sowie in Viren entdeckt und mit Immun- und Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht.

In seiner aktiven Form liegt NF- κ B beim Menschen als Homo- oder Heterodimer vor. Am häufigsten findet man NF- κ B, das aus den Untereinheiten p50/p65 zusammengesetzt ist. Auch andere Untereinheiten, wie rel, relB, v-rel und p52 können Teil des aktivierten NF- κ B-Proteins sein. Diese unterschiedlichen NF- κ B-Dimere aktivieren wahrscheinlich unterschiedliche Zielgene.

Das zytoplasmatisch gebundene und somit inaktivierte NF- κ B kann durch Signalwege sofort aktiviert werden (z. B. durch elektromagnetische Wellen, immunologische Reaktionen oder UV-Licht). Eine Vielzahl von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren spielen dabei eine Rolle. NF- κ B wird auf einen solchen Stimulus hin von seinem spezifischen Inhibitorprotein I κ B freigesetzt. Es kommt zu einer Phosphorylierung von I κ B- α durch spezifische Kinasen an den Aminosäuren Ser 32 und Ser 36 (Brown et al. 1995; Traenckner et al. 1995) und einer anschließenden Ubiquitinierung an Lysin 21 und Lysin 22 (Baldi et al. 1996), der der Abbau durch das 26S-Proteasom folgt. Daraufhin liegt das NF- κ B-Protein ungebunden und somit aktiviert vor.

Vor einigen Jahren wurde ein alternativer Signaltransduktionsweg zur NF- κ B-Aktivierung beschrieben. Hierbei führt die Phosphorylierung von I κ B- α an Tyrosin 42 zur Dissoziation von NF- κ B und I κ B- α , wobei kein Abbau von I κ B- α stattfindet (Imbert et al. 1996).

Freigesetztem NF- κ B ist es möglich, in den Zellkern zu wandern, wo es an genomischer DNA sequenzspezifische DNA-Erkennungsmotive in der Promotorregion besetzt und so zu einer Initiierung oder Verstärkung der Gentranskription an verschiedenen Zielgenen führen kann (Chen et al. 1996). Auf diese Weise können Proteine der NF- κ B-Familie bei vielen inflammatorischen und immunologisch vermittelten Reaktionen regulierend eingreifen (z. B. auch durch die Regulation der Apoptose).

Die Stimuli, welche NF- κ B aktivieren, reichen von physikalischem Stress (ionisierende Strahlung, UV-Licht) über infektiöse Agenzien (wie Viren, Bakterien, Parasiten und ihre Produkte) bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen wie den Zytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren (Messer und Rupec 2001).

| NF-κB aktivierende Stimuli | |
|---|--|
| Bakterielle Produkte | Lipopolysaccharide |
| Eukaryonte Parasiten | Theileria parva |
| Viren | HIV-1 HTLV-1 HBV HSV-1 HHV 6 EBV CMV Sendai-Virus |
| Inflammatorische Zytokine | TNF- α LT- α IL-1, IL-2, IL-18 |
| Chemikalien | Phorbolster Cycloheximid |
| Physikalische Noxen | UV-Strahlung Ionisierende Strahlung |
| Oxidativer Stress | H ₂ O ₂ Reoxygenierung Ozon |

Tabelle 2: Beispiele NF- κ B aktivierender Stimuli (Messer und Rupec 2001)

Der Vielfalt an Stimuli, die NF- κ B aktivieren können, steht eine nicht minder große Anzahl an Genen gegenüber, die durch NF- κ B reguliert werden. Darunter finden sich z. B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress-Proteine, immunmodulierende Moleküle oder Haupthistokompatibilitätsantigene (Messer und Rupec 2001).

Die Zelle muss auf äußere Noxen reagieren, um das Gleichgewicht des Gewebeverbandes durch Reparaturvorgänge oder Initiation einer Entzündungsreaktion und Immunantwort zu erhalten. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B nimmt durch seine schnelle Einflussnahme und sein breites Aktivierungsmuster von pro-inflammatorisch und proliferativ wirksamen Genen sowie durch seine anti-apoptotische Wirkung diesbezüglich eine Schlüsselposition ein.

Wird eine Zelle Stimuli ausgesetzt, die NF- κ B aktivieren, so ist I κ B schon nach wenigen Minuten nicht mehr nachweisbar und erscheint de novo erst wieder nach etwa 30 Minuten (Baldwin 1996). Diese de-novo-Synthese wird durch NF- κ B selbst induziert, da I κ B- α -Gene in ihrer Promotorregion eine κ B Erkennungssequenz besitzen (Ito et al. 1994; Le Bail et al. 1993). Das Wiedererscheinen des Inhibitorproteins I κ B- α beendet wiederum die NF- κ B-Aktivierung, da es sich an NF- κ B bindet und der Komplex wieder ins Zytoplasma übertritt. Es handelt sich hierbei also am ehesten um einen autoregulatorischen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus (Sun et al. 1993).

Durch NF- κ B kann somit eine schnelle Immunantwort auf zellschädigende Ereignisse eingeleitet werden. Dabei werden nicht nur pro-inflammatorische, sondern auch geweberekonstruierende Gene aktiviert. NF- κ B scheint also eine positive Rolle bei immunologischen Prozessen für die Zellproliferation zu spielen. NF- κ B könnte auch eine bedeutende Rolle bei dem Verlust oder der Steigerung von Zellfunktionen wie z. B. Wachstum und Differenzierung einnehmen, wie in Mäuseversuchen gezeigt wurde (Seitz et al. 1998).

Kontrovers sind die Beobachtungen, dass NF- κ B einerseits mit der Induktion von Apoptose in Thymozyten assoziiert wurde (Olnes et al. 1994), andererseits eine NF- κ B-Aktivierung jedoch eine relative Resistenz humaner Keratinozyten und anderer Zelllinien gegenüber Apoptose bewirkt (Beg und Baltimore 1996; Foo und Nolan 1999; Liu et al. 1996; Qin et al. 1999; Wang et al. 1999; Wang et al. 1996). In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass die UV-induzierte Apoptose in humanen Keratinozyten über den NF- κ B-Signaltransduktionsweg nicht wesentlich beeinflusst werden konnte (Wang et al. 2003).

1.4.2. Zusammenhang von NF- κ B, ROS und Antioxidantien

Um NF- κ B zu aktivieren, d. h. eine Dissoziation von I κ B und NF- κ B zu bewirken, ist der I κ B-Abbau nötig, welcher durch die Phosphorylierung durch Proteinkinasen möglich wird. Antioxidantien, wie z. B. Pyrrolidin, Dithiocarbamat und Acetylcystein können die Aktivierung mancher dieser Proteinkinasen blockieren, weshalb angenommen wird, dass ROS eine vermittelnde Rolle bei der NF- κ B Regulation spielen (Schreck et al. 1991).

Es wird vermutet, dass der zelluläre Redoxstatus einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression hat, und das ROS direkt als chemische Botenstoffe dienen, die die Genexpression durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen regulieren (Packer und Suzuki 1993; Schreck 1992; Sun und Oberley 1996).

Unter den Induktoren des NF- κ B-Signalweges findet man oxidativen Stress induzierende Agenzien, wie z. B. H₂O₂, Ozon und UV-Licht. In verschiedenen Arbeiten konnte ein Zusammenhang von ROS und einer NF- κ B-Aktivierung festgestellt werden. Es wurde schon früh vermutet, dass H₂O₂ ein potenter NF- κ B-Aktivator ist (Schreck 1992; Schreck et al. 1991). In der Arbeit von Schmidt et al. wurde in Katalase-überexprimierenden Zellen keine NF- κ B-Aktivierung nach Stimulierung der Zellen mit Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

beobachtet (Schmidt et al. 1995). Diese Ergebnisse belegen, dass die reaktive Sauerstoffverbindung H_2O_2 als Vermittler bei der $TNF\alpha$ -induzierten Aktivierung von NF- κ B agiert.

Einen weiteren überzeugenden Hinweis auf den Zusammenhang von oxidativem Stress und einer anschließenden NF- κ B-Aktivierung liefern die Beobachtungen, dass Antioxidantien (wie z. B. PDTC, N-Acetylcystein, Dithiocarbamat) eine NF- κ B-Aktivierung durch H_2O_2 verhindern können (Meyer et al. 1993; Schreck et al. 1992; Schreck et al. 1991). So konnte z. B. Tocopherol, ein natürliches Antioxidationsmittel, in humanen Jurkat T Zellen eine NF- κ B-Aktivierung hemmen (Packer und Suzuki 1993; Suzuki und Packer 1993; Suzuki und Packer 1993 a). In Versuchen von Nakamura et al. konnte α -Tocopherol-Succinat eine NF- κ B-Aktivierung bzw. eine Translokation des NF- κ B-Proteins in den Kern in THP-1-Zellen hemmen (Nakamura et al. 1998).

Desweiteren wurde vermutet, dass auch ein ROS-unabhängiger Weg der NF- κ B-Aktivierung existiert (Bonizzi et al. 1996). Bonizzi et al. konnten darlegen, dass IL-1 β ein potenter NF- κ B-Aktivator in verschiedenen transformierten Epithelzelllinien ist. Dabei konnte ein Unterschied in der Kinetik des I κ B-Abbaus festgestellt werden. Eine NF- κ B-Aktivierung durch IL-1 β zieht einen schnellen kompletten I κ B- α -Abbau nach sich; eine NF- κ B-Aktivierung durch H_2O_2 hat eine langsamere partielle Degradierung zur Folge. Deshalb wird vermutet, dass eine NF- κ B-Aktivierung sowohl durch redox-abhängige, als auch durch redox-unabhängige Signalwege möglich ist (Legrand-Poels et al. 1997).

1.5. Lipidperoxidation

Die Lipidzusammensetzung und -struktur des Stratum corneum ist wichtig, um die Integrität dieser Barriere beizubehalten, die essentiell für die Feuchtigkeit der Haut, Desquamation und einen gesunden Hautzustand ist (Rawlings et al. 1994). Die Lipide der Membran können durch Peroxid-Radikale geschädigt werden, was man als Lipidperoxidation bezeichnet. Diese Schädigung kann strukturelle und funktionelle Membranveränderungen nach sich ziehen, die sich in Form von veränderter Fluidität, erhöhter Permeabilität und Inaktivierung zellulärer Enzyme und Transporter zeigen, was zu Membranschäden führen kann (Black 1987; Girotti 1985; Pryor 1978). In gesunder menschlicher Haut sind Lipidperoxidationsprodukte in gewissem Maße physiologisch. Die Konzentration dieser Lipidperoxidationsprodukte kann jedoch durch UV-Licht beträchtlich erhöht werden.

Die Lipidperoxidation wird als wichtiger Mechanismus für UVA- und UVB-induzierte Hautgewebeschäden angesehen. Es ist bekannt, dass UVA-Licht die Lipidperoxidation z. B. in kultivierten humanen Fibroblasten hervorrufen kann (Morliere et al. 1991).

Tocopherol schützt Zellmembranen vor der Lipidperoxidation (Burton 1986; Packer 1991). Alpha-Tocopherol wirkt während der Lipidperoxidation als Antioxidationsmittel (Chow 1991; Fryer 1993). Es wurde gezeigt, dass α -Tocopherol in der Lage ist, die Lipidmembran zu stabilisieren (Bommaman et al. 1990), indem es die Kettenreaktion der Lipidperoxidation durch „Abfangen“ von Peroxid-Radikalen unterbricht (Christen et al. 1997).

Durch den Einsatz von α -Tocopherol konnte in verschiedenen Untersuchungen eine Beeinflussung der Lipidperoxidation, gemessen an der Konzentration der thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS), festgestellt werden. Durch eine Tocopherol-Supplementation von NCTC 2544 humanen Keratinozyten vor der UVA-Bestrahlung wurde die TBARS-Bildung gehemmt (Djavaheri-Mergny et al. 1999). Die Inkubation von Epidermiszellen mit α -Tocopherol führte nach anschließender UVA-Bestrahlung der Zellen zu einem partiellen Schutz vor immunsuppressiven Effekten und verminderte die TBARS-Bildung (Clement-Lacroix et al. 1996). In HL-60-Zellen konnte Tocopherol die Lipidperoxidation und Apoptose verhindern (Barroso et al. 1997).