

4. ERGEBNISSE

4.1. Proliferationsassay

Um optimale Versuchsbedingungen für die mit Tocopherol durchgeführten Versuche zu ermitteln, wurden Proliferationsassays durchgeführt, die die Beeinflussung des Zellwachstums von HaCaT-Keratinocyten durch Tocopherol-Derivate überprüfen sollten.

Die Tocopherol-Derivate wurden in Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-2} M für 24 Stunden ins Kulturmedium gegeben. Anschließend konnte die Beeinflussung des Zellwachstums durch die unterschiedlichen Tocopherol-Derivate miteinander verglichen werden (siehe Abb. 11).

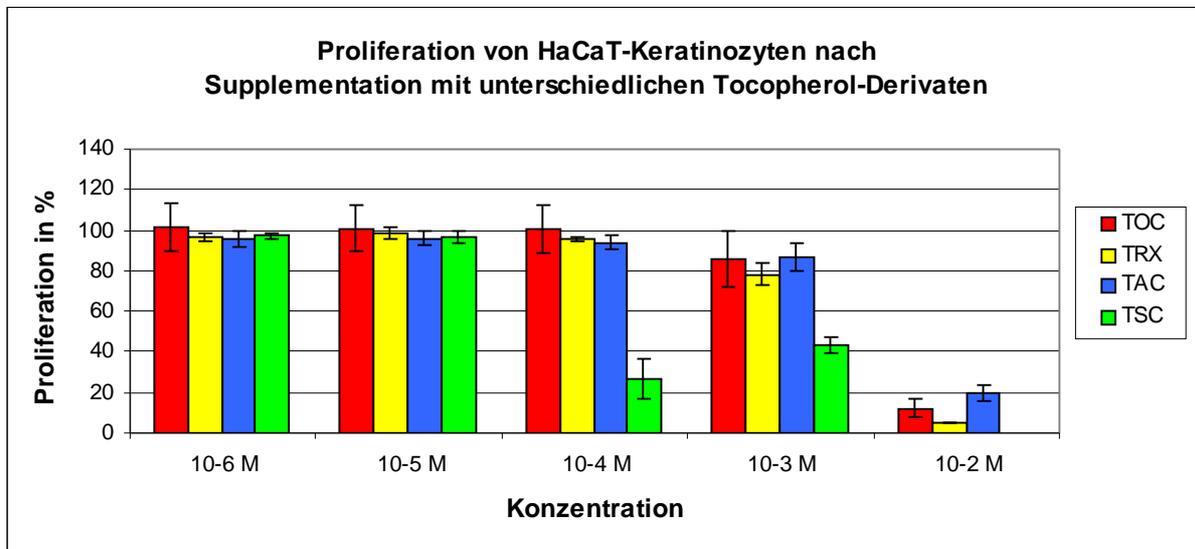


Abbildung 11: Darstellung der Proliferationsbeeinflussung von HaCaT-Keratinocyten nach Supplementation mit verschiedenen Tocopherol-Derivaten.

Nach Zugabe der Tocopherol-Derivate wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Proliferationsmessung wie bei (Gillies 1986) beschrieben. Dargestellt sind die Absorptionen als Relativprozent in Bezug zur nicht-supplementierten Kontrolle (= 100 % Proliferation) errechnet ($n = 3$ Experimente \pm Standardabweichung).

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat

Die Versuchsergebnisse der Proliferationsassays zeigten keine statistisch signifikante Proliferationsbeeinflussung der HaCaT-Keratinocyten bei Zugabe von *α-Tocopherol* in den Konzentrationen 10^{-6} M bis 10^{-4} M. Es zeigte sich eine tendenzielle Wachstumshemmung von 14,1 % bei einer Konzentration von 10^{-3} M, die statistisch nicht signifikant war. Wurde α -Tocopherol jedoch in einer Konzentration von 10^{-2} M zu den Zellen gegeben, war eine signifikante ($p < 0,005$) Proliferationshemmung von 87,9 % zu beobachten.

Die Supplementation mit *Trolox* ergab in den niedrigen Konzentrationen 10^{-6} M bis 10^{-4} M keine signifikante Proliferationshemmung über 5 %, die Zugabe von Trolox in den Konzentrationen 10^{-3} M bzw. 10^{-2} M führte zu einer statistisch signifikanten ($p < 0,005$) Wachstumshemmung von 21,7 % bzw. 95,1 %.

Nach Supplementation mit *α-Tocopherol-Acetat* zeigte sich eine Proliferationsbeeinträchtigung von 13,3 % bei einer Konzentration von 10^{-3} M, die statistisch signifikant ($p < 0,05$) war. Bei einer Konzentration von 10^{-2} M zeigte sich eine starke Proliferationshemmung ($p < 0,005$) von 80,2 %. In den Konzentrationen 10^{-6} M bis 10^{-4} M konnte keine signifikante Proliferationshemmung ($p < 0,005$) gefunden werden.

Nach Supplementation von *α-Tocopherol-Succinat* bei einer Konzentration von 10^{-4} M bzw. 10^{-3} M konnte eine statistisch signifikante ($p < 0,005$) Proliferationshemmung von 73,1 % bzw. 56,7 % beobachtet werden. In den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-5} M war keine signifikante Proliferationsbeeinträchtigung erfolgt.

Für die weiteren Versuche wurde daher eine Konzentration von 10^{-4} M für *α-Tocopherol*, *Trolox* und *α-Tocopherol-Acetat* und 10^{-5} M für *α-Tocopherol-Succinat* gewählt. Bei einer Vitaminpersistenz von 24 Stunden war in diesen Konzentrationen keine wesentliche Proliferationshemmung aufgetreten.

4.2. Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizitätsassays gaben Aufschluss darüber, ob eine Behandlung der HaCaT-Keratinocyten mit den verschiedenen Tocopherol-Derivaten oder eine Bestrahlung der Zellen einen zytotoxischen Effekt hatten.

Dazu wurde das Cytotoxicity Detection Kit von Roche # 1 644 793 (Mannheim, Deutschland) benutzt, welches die Quantifizierung von Zelltod und Zellyse möglich macht. Bei Beschädigung einer Zellplasmamembran kann Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Überstand dieser Zellkulturen durch einen enzymatischen Test mit Hilfe einer Farbreaktion quantifiziert werden.

Zwei Versuchsanordnungen wurden gewählt. In der *Versuchsanordnung 1* wurden die Tocopherol-Derivate in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden ins Kulturmedium gegeben (siehe Abb. 12).

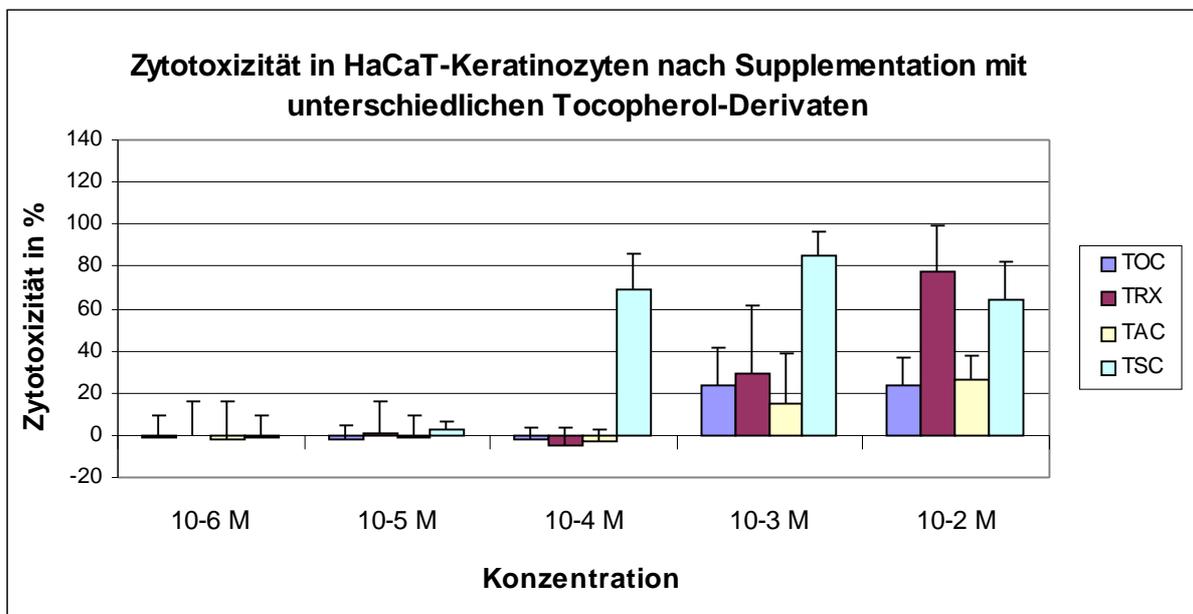


Abbildung 12: Zytotoxizität in HaCaT-Zellen nach Supplementation mit Tocopherol-Derivaten

Die Tocopherol-Derivate wurden in den Konzentrationen 10⁻⁶ M bis 10⁻² M über einen Zeitraum von 24 Stunden ins Kulturmedium gegeben. Die Zytotoxizität wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Probe - neg. Kontrolle}}{\text{pos. Kontrolle - neg. Kontrolle}} \times 100$$

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat
(n = 3 Experimente \pm Standardabweichung)

Es zeigte sich, dass bei der Zugabe von *α-Tocopherol* in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M keine signifikanten zytotoxischen Effekte auftraten. Bei den höheren α -Tocopherol-Konzentrationen 10^{-3} M bzw. 10^{-2} M konnte eine Zytotoxizität von 23,8 % bzw. 24,0 % festgestellt werden, die nur bei 10^{-2} M statistisch signifikant ($p < 0,05$) war.

Bei der Zugabe von *Trolox* in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M trat ebenfalls keine signifikante zytotoxische Wirkung auf. Bei den höheren Trolox-Konzentrationen 10^{-3} M bzw. 10^{-2} M konnte eine Zytotoxizität von 29,3 %, bzw. 77,4 % festgestellt werden, die in der Konzentration 10^{-2} M statistisch signifikant ($p < 0,005$) war.

Bei der Zugabe von *α-Tocopherol-Acetat* in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M traten keine zytotoxischen Wirkungen auf, bei Konzentrationen von 10^{-3} M bzw. 10^{-2} M α -Tocopherol-Acetat konnte eine Zytotoxizität von 15,0 % bzw. 26,7 % festgestellt werden, die nur bei 10^{-2} M statistisch signifikant ($p < 0,05$) war.

Bei der Zugabe von *α-Tocopherol-Succinat* über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigten sich jeweils statistisch signifikante ($p < 0,005$) zytotoxische Wirkungen in den Konzentrationen 10^{-4} M (68,7 %), 10^{-3} M (85,0 %) und 10^{-2} M (63,9 %). In niedrigeren Konzentrationen konnte keine signifikante Zytotoxizität gemessen werden.

Aufgrund der Proliferations- und Zytotoxizitätsassays wurde für die EMSA-Versuche, die Western Blots und die TBARS-Versuche für *α-Tocopherol*, *Trolox* und *α-Tocopherol-Acetat* eine Konzentration von 10^{-4} M, für *α-Tocopherol-Succinat* eine Konzentration von 10^{-5} M gewählt.

Aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass eine Supplementation der HaCaT-Keratinocyten mit 10^{-4} M Ascorbinsäure weder signifikante proliferationsbeeinträchtigende, noch signifikante zytotoxische Wirkungen hat (Shang 2002).

In der *Versuchsordnung 2* wurden die HaCaT-Keratinocyten mit UVA-Licht in steigender Dosis (1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 und 10 J/cm^2) bestrahlt. Die Zytotoxizität wurde nach unterschiedlichen Zeiträumen gemessen (sofort, eine Stunde und drei Stunden nach der Bestrahlung).

Diese Zytotoxizitätsassays zeigten, dass bei einer Bestrahlung von 1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 oder 10 J/cm^2 keine statistisch signifikante zytotoxische Wirkung auf die HaCaT-Keratinocyten vorlag (siehe Abb. 13).

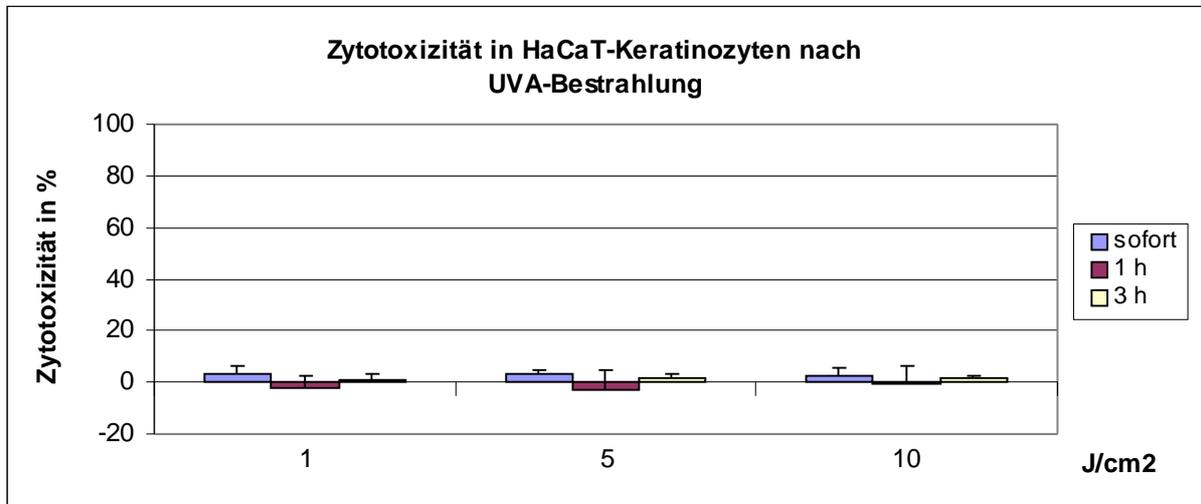


Abbildung 13: Zytotoxizität in HaCaT-Keratinocyten nach UVA-Bestrahlung

Bestrahlung der HaCaT-Keratinocyten mit 1 J/cm², 5 J/cm² und 10 J/cm². Beginn des Zytotoxizitätsassays sofort nach der Bestrahlung, eine und drei Stunden nach der Bestrahlung.

Die Zytotoxizität wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Probe} - \text{neg. Kontrolle}}{\text{pos. Kontrolle} - \text{neg. Kontrolle}} \times 100$$

(n = 3 Experimente ± Standardabweichung)

Für die Electrophoretic mobility shift assays und die Western-Blots wurde eine Dosis von 1 J/cm², für die Bestimmung von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen eine Dosis von 10 J/cm² gewählt.

4.3. NF-κB – EMSA

Mit dem Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) wurde in dieser Arbeit die NF-κB-Bindungsaktivität in HaCaT-Keratinocyten untersucht. Vergleichend wurde die NF-κB-Bindungsaktivität in bestrahlten und unbestrahlten Keratinocyten ausgewertet. Die Bestrahlung erfolgte durch UVA-Licht mit einer Dosis von 1 J/cm². Des Weiteren wurden die Keratinocyten vor der UVA-Bestrahlung mit α-Tocopherol (TOC) behandelt und die NF-κB-Bindungsaktivität in diesen Zellen untersucht. Es folgte ein Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Tocopherol-Derivate (Trolox = TRX, α-Tocopherol-Acetat = TAC und α-Tocopherol-Succinat = TSC). Eine Kombinationsbehandlung der HaCaT-Keratinocyten mit

Ascorbinsäure = C und Tocopherol bzw. den Tocopherol-Derivaten komplettierte die Ergebnisse.

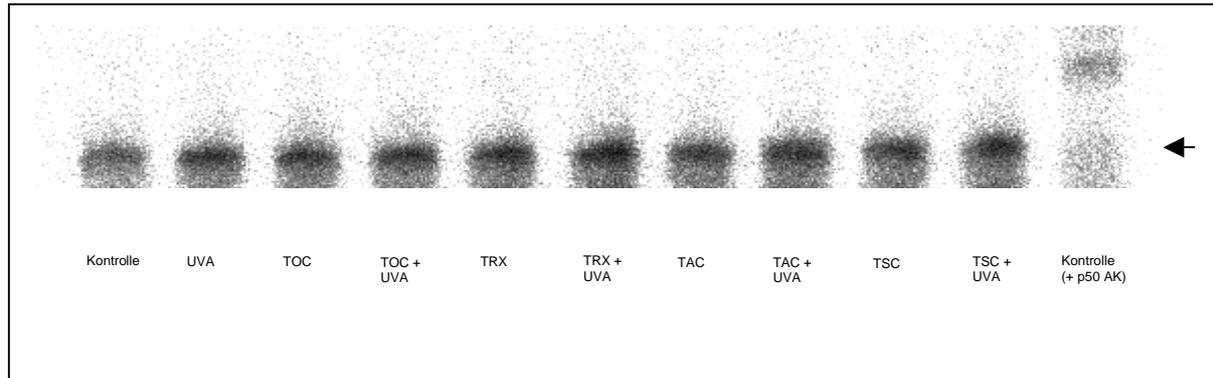


Abbildung 14: Signale der NF-κB-Banden beim EMSA (Supplementation mit Tocopherol)

Darstellung der NF-κB-Bande nach Vitaminsupplementation mit α -Tocopherol, Trolox und α -Tocopherol-Acetat 10^{-4} M und α -Tocopherol-Succinat 10^{-5} M nach UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 .

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat

← = Höhe der NF-κB-Bande

Die Signale der NF-κB-Banden, welche durch den p50-AK-Supershift identifiziert werden konnten (siehe Abb. 14 und 16), wurden mit dem Computerprogramm TINA 2.0 ausgewertet und mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2000 in einem Säulendiagramm als relative NF-κB-Bindungsaktivität in Prozent zur Kontrolle dargestellt (Abb. 15 und 17).

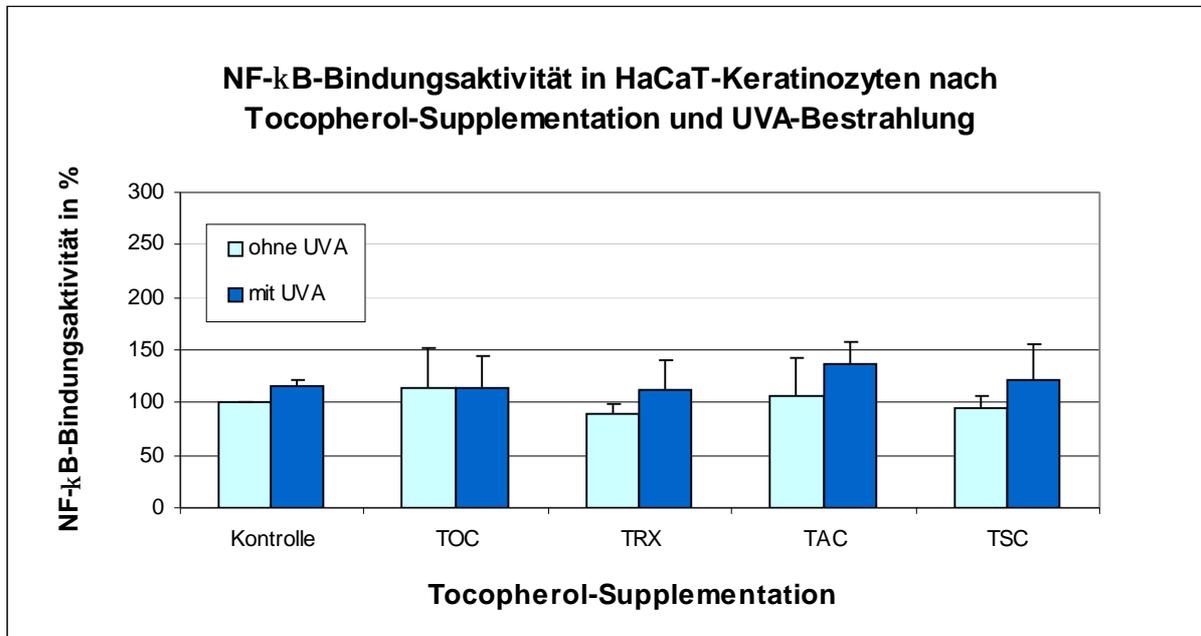


Abbildung 15: Darstellung der NF-κB-Bindungsaktivität in Bezug zur Kontrolle (= 100 %)

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nach Vitaminsupplementation (α -Tocopherol, Trolox und α -Tocopherol-Acetat 10^{-4} M, α -Tocopherol-Succinat 10^{-5} M) und UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 . (n = 3 Experimente \pm Standardabweichung)

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat

Eine Stunde nach UVA-Bestrahlung der HaCaT-Keratinocyten war ein statistisch signifikanter ($p < 0,005$) Anstieg der NF-κB-Bindungsaktivität von 16 % zu finden.

Die Supplementationen der HaCaT-Keratinocyten mit *α -Tocopherol*, *Trolox*, *α -Tocopherol-Acetat* und *α -Tocopherol-Succinat* erbrachten keine signifikante Beeinflussung der NF-κB-Bindungsaktivität.

Durch die Kombinationsbehandlung der HaCaT-Keratinocyten ergaben sich interessante Ergebnisse. Die durch die UVA-Bestrahlung ausgelöste Erhöhung der NF-κB-Bindungsaktivität konnte durch eine Kombinationsbehandlung der HaCaT-Keratinocyten mit *α -Tocopherol-Succinat* (10^{-5} M) und *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) signifikant ($p < 0,005$) gehemmt werden.

Eine signifikante ($p < 0,05$) Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle konnte ebenfalls bei der Kombination von *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) und *Trolox* (10^{-4} M) gezeigt werden.

Ebenso war bei einer Supplementation der HaCaT-Zellen mit *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) und *α -Tocopherol-Acetat* (10^{-4} M) eine signifikante ($p < 0,05$) Hemmung der NF- κ B-Bindungsaktivität im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle vorhanden.

Eine Kombinationsbehandlung der HaCaT-Keratinocyten mit *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) und *α -Tocopherol* (10^{-4} M) erbrachte dagegen keine signifikante ($p = 0,0564$) Änderung der NF- κ B-Bindungsaktivität.

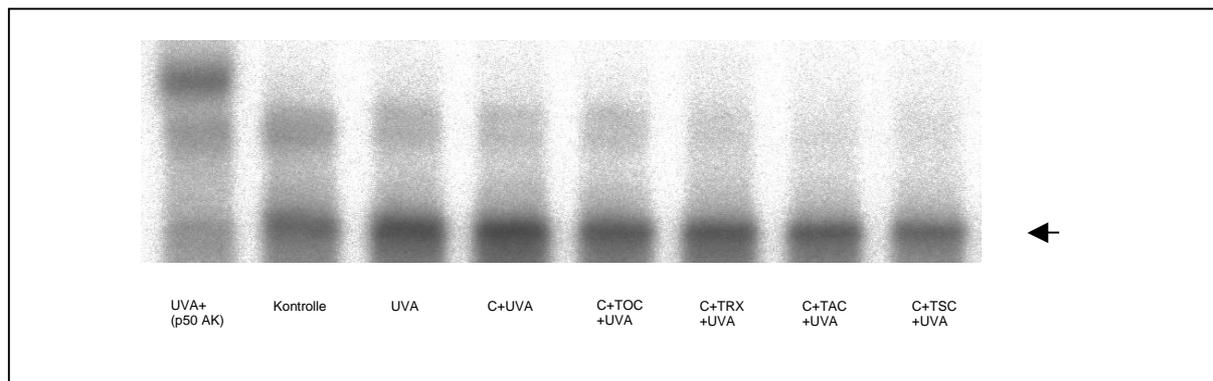


Abbildung 16: Signale der NF- κ B-Banden beim EMSA (Supplementation mit Tocopherol und Ascorbinsäure)

Darstellung der NF- κ B-Bande nach Vitaminsupplementation mit α -Tocopherol, Trolox, α -Tocopherol-Acetat und Ascorbinsäure 10^{-4} M und α -Tocopherol-Succinat 10^{-5} M nach UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 .

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat, C = Ascorbinsäure

← = Höhe der NF- κ B-Bande

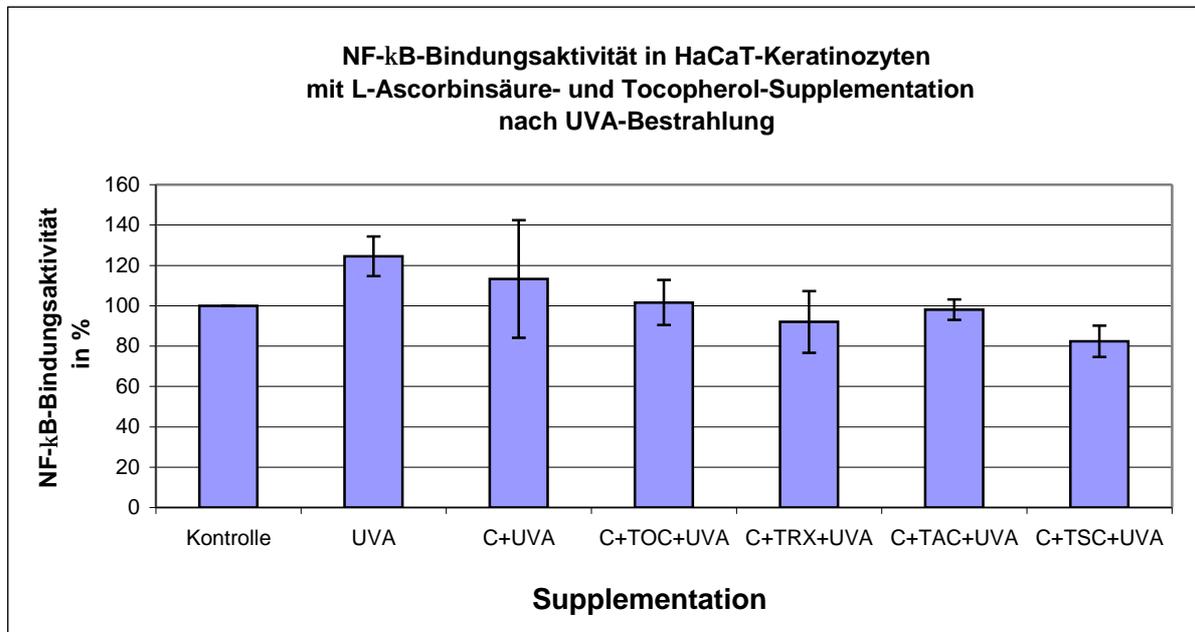


Abbildung 17: Darstellung der NF-κB-Bindungsaktivität nach Ascorbinsäure und Tocopherol-Supplementation in UVA-bestrahlten HaCaT-Keratinocyten

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) nach Vitaminsupplementation (Ascorbinsäure, α -Tocopherol, Trolox und α -Tocopherol-Acetat 10^{-4} M und α -Tocopherol-Succinat 10^{-5} M) und UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 , Darstellung der NF-κB-Bindungsaktivität in Bezug zur Kontrolle (= 100 %); (n = 3 Experimente \pm Standardabweichung).

C = Ascorbinsäure, TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine UVA-Bestrahlung der HaCaT-Keratinocyten die NF-κB-Bindungsaktivität erhöht, ohne dass eine Tocopherol-Supplementation (*α -Tocopherol* (10^{-4} M), *Trolox* (10^{-4} M)) bzw. eine Supplementation mit den Tocopherol-Derivaten *α -Tocopherol-Acetat* (10^{-4} M) und *α -Tocopherol-Succinat* (10^{-5} M) allein einen signifikanten Einfluss auf diese Aktivierung hatte. Auch eine alleinige Supplementation von *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die NF-κB-Bindungsaktivitätserhöhung nach einer UVA-Bestrahlung.

Bei einer Kombination von *Ascorbinsäure* (10^{-4} M) und *α -Tocopherol-Succinat* (10^{-5} M) vor der Bestrahlung konnte jedoch eine signifikante ($p < 0,005$) Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität beobachtet werden. Ebenso konnte eine Kombination von *Ascorbinsäure* und *Trolox* bzw. *α -Tocopherol-Acetat* eine signifikante ($p < 0,05$) Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität in HaCaT-Keratinocyten bewirken.

4.4. IκBα-Western-Blot

Vor Aktivierung der NF-κB-Bindung liegt das NF-κB-Protein als Komplex gebunden an ein IκB-Protein vor. Wird das IκB-Protein phosphoryliert, löst sich der Komplex, und das NF-κB-Protein besitzt nun die Fähigkeit, in den Zellkern zu gelangen. Man kann auf diese Weise anhand der freien IκB-Konzentration in der Zelle die NF-κB-Konzentration im Kern indirekt bestimmen. Die freie IκB-Konzentration im Zytosol der Zellen wurde mit dem IκBα-Western-Blot bestimmt.

Die IκB-Banden wurden mit Hilfe verschiedener Markerproteine mit bekannter Größe detektiert (siehe Abb. 18 und 19).

1) HaCaT-Keratinocyten unbestrahlt

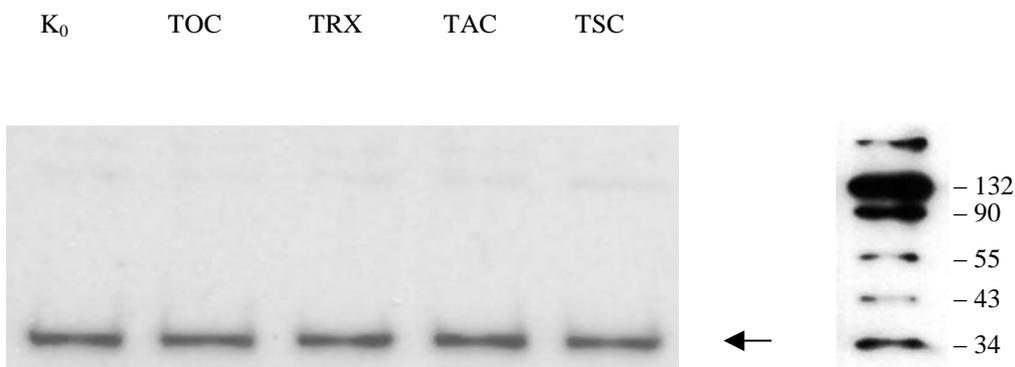


Abbildung 18: Darstellung der IκBα-Proteinbande nach Vitaminsupplementation

Supplementation mit α-Tocopherol (TOC), Trolox (TRX) und α-Tocopherol-Acetat (TAC) in einer Konzentration von 10^{-4} M bzw. α-Tocopherol-Succinat (TSC) in einer Konzentration von 10^{-5} M.

← = Höhe der IκBα-Bande

2) HaCaT-Keratinocyten bestrahlt mit 1 J/cm^2

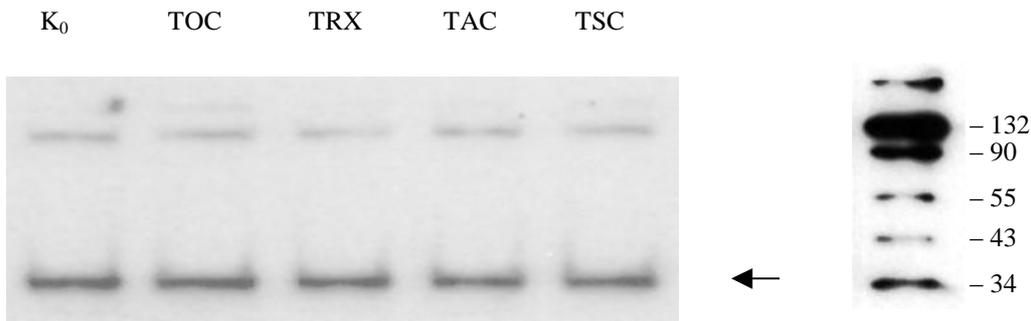


Abbildung 19: Darstellung der IκBα-Proteinbande nach Vitaminsupplementation und UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2

Vitaminsupplementation mit α -Tocopherol (TOC), Trolox (TRX) und α -Tocopherol-Acetat (TAC) in einer Konzentration von 10^{-4} M bzw. α -Tocopherol-Succinat (TSC) in einer Konzentration von 10^{-5} M .

← = Höhe der IκBα-Bande

Die quantitative Auswertung der Western-Blots wurde mit Hilfe des Programms TINA 2.0 vorgenommen.

Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen der IκBα-Proteinkonzentrationen, weder nach der Bestrahlung, noch nach der Vitaminsupplementation (siehe Abb. 20). Die Zeitspanne betrug bei diesem Versuch eine Stunde, was bedeutet, dass die Gesamtproteine für den IκBα-Western-Blot eine Stunde nach der Bestrahlung aus den Zellen extrahiert wurden.

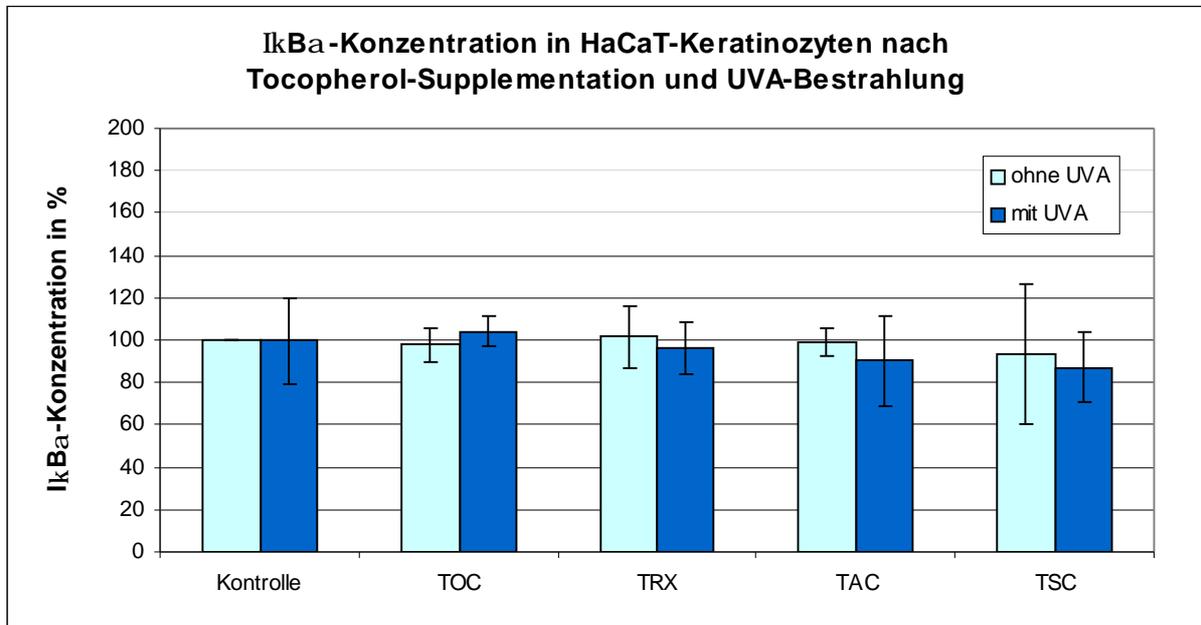


Abbildung 20: Darstellung der IκBα-Konzentration nach Tocopherol-Supplementation und UVA-Bestrahlung

Darstellung in Bezug zur Kontrolle (= 100 %) nach Tocopherol-Supplementation (α -Tocopherol, Trolox und α -Tocopherol-Acetat 10^{-4} M, α -Tocopherol-Succinat 10^{-5} M) und UVA-Bestrahlung mit 1 J/cm^2 . (n = 3 Experimente \pm Standardabweichung)

TOC = α -Tocopherol, TRX = Trolox, TAC = α -Tocopherol-Acetat, TSC = α -Tocopherol-Succinat

4.5. Bestimmung von TBARS

Werden die Lipide der Zellmembran durch Peroxid-Radikale verändert (Lipidperoxidation), so kann das zu Zellmembranschäden führen. Eine durch UVA-Bestrahlung induzierte Radikalbildung kann zur Lipidperoxidation führen. Die Bildung von thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) gilt als Indikator für die Lipidperoxidation.

In dieser Arbeit wurden die thiobarbitursäurereaktiven Substanzen durch einen schon früher beschriebenen Versuch (Mihara und Uchiyama 1978) mit leichten Änderungen bestimmt.

Ergebnisse von Vorversuchen (Tebbe et al. 1997), bei denen mit Dosen von 1 J/cm^2 über 5 J/cm^2 und 10 J/cm^2 bis zu 20 J/cm^2 gearbeitet wurde, ergaben, dass thiobarbitursäurereaktive Substanzen ab einer Dosis von 10 J/cm^2 nachzuweisen waren. Daher wurden die HaCaT-Keratinozyten für diese Versuche mit einer Dosis von 10 J/cm^2 bestrahlt. Es konnte dabei ein Anstieg der extrazellulären thiobarbitursäurereaktiven Substanzen um das 2,6-fache gemessen werden. Durch die Supplementation von *α -Tocopherol*, *Trolox*, *α -Tocopherol-Acetat* bzw. *α -Tocopherol-Succinat* konnte eine Verminderung der TBARS im

Vergleich zur bestrahlten Probe festgestellt werden, die bei *α-Tocopherol* und *Trolox* stärker ausgeprägt war. *Trolox* hemmte den Anstieg der extrazellulären TBARS nach der UVA-Bestrahlung statistisch signifikant ($p < 0,05$) um 63,79 % im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle. Die Hemmung der TBARS nach UVA-Bestrahlung durch *α-Tocopherol* betrug 60,34 % und war im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle auch statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Behandlung der HaCaT-Keratinocyten mit *α-Tocopherol-Acetat* und *α-Tocopherol-Succinat* ergab eine Verminderung der TBARS, die nicht statistisch signifikant war (siehe Abb. 21). Es war kein signifikanter Anstieg der intrazellulären thiobarbitursäurereaktiven Substanzen nach UVA-Bestrahlung der Zellen festzustellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

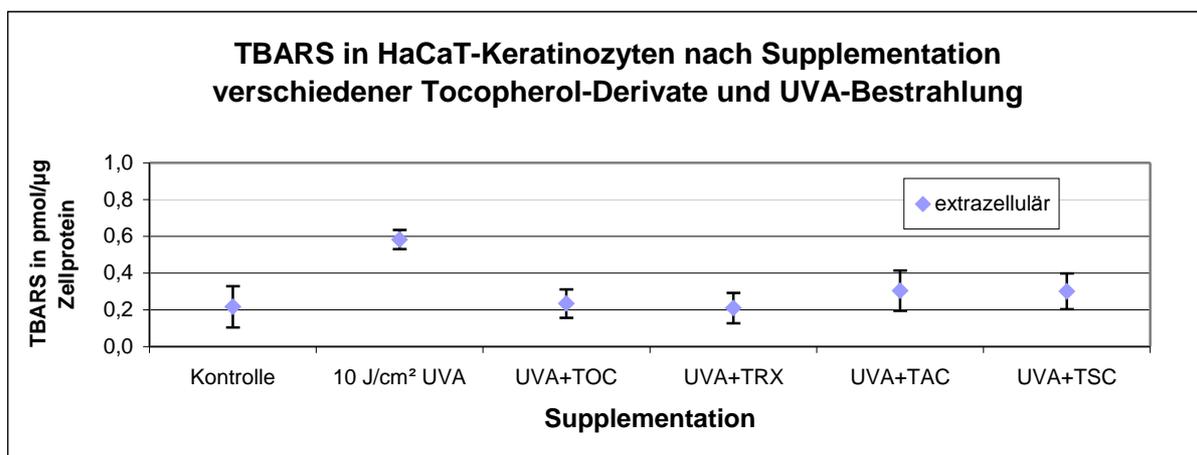


Abbildung 21: Absolute *extrazelluläre* TBARS-Konzentrationen in HaCaT-Keratinocyten

Darstellung in pmol/μg Zellprotein nach Vitaminsupplementation (*α-Tocopherol*, *Trolox* und *α-Tocopherol-Acetat* 10^{-4} M, *α-Tocopherol-Succinat* 10^{-5} M) und UVA-Bestrahlung (10 J/cm^2) ($n = 3$ Experimente \pm SEM)