

## VI. Zusammenfassung

Das Zytokin TNF- $\alpha$  spielt eine entscheidende Rolle bei der Auslösung und Manifestation von inflammatorischen und immunpathologischen Zuständen der Haut, so auch bei der Manifestation der caninen Atopie.

Mit Hilfe des elektrophoretischen Mobility Shift Assay (EMSA) wurde auch bei der Spezies Hund eine Beteiligung des eukaryotischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an der TNF- $\alpha$  induzierten Genexpression gezeigt. Die biologische Wirksamkeit des hier verwendeten humanen TNF- $\alpha$  konnte über die Induktion der PGE<sub>2</sub> Synthese in caninen Hautzellen dargestellt werden ( $p < 0.05$ ).

Da bei den Spezies Mensch und Maus eine Beteiligung von intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an dem Aktivierungsmechanismus des NF- $\kappa$ B diskutiert wird, wurde dies im Hinblick auf eine therapeutische Modulation der TNF- $\alpha$  induzierten NF- $\kappa$ B Aktivierung mit antioxidativen Substanzen in eigenen Untersuchungen mit caninen Hautzellen überprüft. Die EMSA Untersuchungen demonstrierten eine Beteiligung von Superoxidradikalen sowie Hydroperoxiden an der TNF- $\alpha$  induzierten Aktivierung des NF- $\kappa$ B:

(i) Der schwach aktivierende Einfluß von Antimycin A, das Superoxide generiert, sowie der hemmende Einfluß von  $\alpha$ -Lipoat, dessen reduzierte Form unter anderem direkt Superoxide beseitigt, wiesen auf eine Superoxidbeteiligung hin.

(ii) Für die Beteiligung von Hydroperoxiden an der TNF- $\alpha$  Signaltransduktion sprachen die direkt aktivierende Wirkung von Butylhydroperoxid sowie die partielle Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten Aktivierung des NF- $\kappa$ B durch  $\alpha$ -Lipoat, das unter anderem auch direkt Hydroperoxide abfangen und den Glutathion-Status der Zelle (und damit die Glutathion-Peroxidase) regenerieren kann. Ferner konnte auch das lipophile Antioxidans butyliertes Hydroxyanisol (BHA), das direkt die bei der Lipidperoxidation der Membran entstehenden Lipidperoxide abfängt, die TNF- $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B Mobilisierung partiell hemmen.

Die Existenz einer redox-sensitiven Kinase könnte die Beteiligung mehrerer Radikalspezies im TNF- $\alpha$  vermittelten Aktivierungsmechanismus des NF- $\kappa$ B erklären.

Die Beteiligung von Superoxidradikalen an der TNF- $\alpha$  vermittelten Signaltransduktion wurde durch zwei weitere Untersuchungsmethoden näher überprüft:

(i) Die photometrische Bestimmung der Reduktion von Cytochrom c nach TNF- $\alpha$  Inkubation beider Zellarten zeigte keine meßbare Superoxidproduktion. Allerdings beschränkt sich die Methode auf die Detektion von in den Extrazellulärraum diffundierenden Superoxidradikalen.

(ii) In einer zweiten Versuchsanordnung wurde deshalb elektronenmikroskopisch die TNF- $\alpha$  induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion (als Dismutationsprodukt des Superoxidradikals) über die Bildung von elektronendichten Cerhydroperoxid-Präzipitaten nach Vorinkubation mit Cer-Ionen untersucht. Da mit der konventionellen Transmissions-elektronenmikroskopie keine Präzipitate beobachtet werden konnten, wurde die Elektronen Energie Verlust Spektroskopie (EELS) angewendet. Mit diesem Verfahren konnte eine gegenüber der Negativkontrolle signifikante ( $p < 0,01$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion in den Mitochondrien, im endoplasmatische Retikulum, im Zytosol und zu geringeren Anteilen auch an der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden. Eine einzige TNF- $\alpha$  vermittelte Superoxidquelle erscheint deshalb unwahrscheinlich.

Da drei der vier Produktionsstätten die biologische Membran als Gemeinsamkeit aufweisen, könnte letztere den Angriffspunkt des TNF- $\alpha$  bzw. seiner intrazellulären Mediatoren darstellen. Eine TNF- $\alpha$  induzierte Störung der Membranintegrität könnte die Aktivierung verschiedener, Membran-assoziiierter Redoxsysteme zur Folge haben. Das Vorkommen von membranumgrenzter Peroxisomen im Zytoplasma könnte auch in dieser Lokalisation das Auftreten von Cerhydroperoxide und damit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erklären.

Die partielle Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch die Antioxidantien  $\alpha$ -Lipoat und BHA deutet allerdings auf gleichzeitig ablaufende, redox-unabhängige Aktivierungswege hin.

Aufgrund des partiellen Inhibitionserfolges des natürlichen Antioxidans  $\alpha$ -Lipoat auf die NF- $\kappa$ B Aktivierung könnte dessen Einsatz in der Hundedermatologie, vor allem bei der Atopie des Hundes, über die Hemmung einer überschießenden NF- $\kappa$ B Aktivierung eine therapeutisch wichtige, immunmodulatorische Funktion erfüllen. Ob sich dies klinisch am atopischen Hund als erfolgreich erweist, muß in

als erfolgreich erweist, muß in standardisierten, klinischen Studien ermittelt werden. Die hier aufgeführten Ergebnisse sollen die Grundlage für zukünftige Untersuchungen bezüglich der TNF- $\alpha$  abhängigen Signaltransduktion und ihrer therapeutischen Beeinflussung in der caninen Haut bilden.

## VII. Summary

Heike B. Karolina Köhler

### **Involvement of reactive oxygen species (ROS) in TNF- $\alpha$ mediated activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in canine skin cells.**

The cytokine TNF- $\alpha$  plays a major role in the initiation and manifestation of inflammatory and immune-pathological conditions of the canine skin, e.g. in canine atopy.

Using the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) the involvement of the eukaryotic transcription factor NF- $\kappa$ B in TNF- $\alpha$  mediated gene expression in the dog was shown. The biological activity of human recombinant TNF- $\alpha$  in the dog was demonstrated by a significant TNF- $\alpha$  induced prostaglandine E<sub>2</sub> synthesis ( $p < 0,05$ ) both in canine keratinocytes and fibroblasts.

Reactive oxygen species (ROS) possibly function as second messengers in the signal transduction of NF- $\kappa$ B in man and rodents. With respect to a therapeutic modulation of NF- $\kappa$ B with antioxidants, the role of ROS as messengers was investigated in canine skin cells:

Antimycin A, a superoxide generating substance, activated NF- $\kappa$ B. In contrast,  $\alpha$ -lipoic acid, a superoxide and hydroperoxide quenching antioxidant, inhibited TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B mobilisation. These results indicated the involvement of superoxides in the activation process.

The involvement of hydroperoxides in NF- $\kappa$ B activation was demonstrated by (i) direct activation of NF- $\kappa$ B with butyl-hydroperoxide, (ii) inhibition with butylated hydroxyanisol (BHA), a chain breaking antioxidant, and (iii) inhibition with  $\alpha$ -lipoic acid.

The existence of a redox-sensitive I- $\kappa$ B kinase would explain the stimulatory effect of several radical species on NF- $\kappa$ B in the canine species.

The direct involvement of superoxide radicals in TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B activation was subsequently analysed with two different methods:

The photometrical determination of cytochrome c reduction in TNF- $\alpha$  incubated keratinocytes and fibroblasts revealed no superoxide production. This method, however, can only detect superoxide radicals diffusing into the extracellular compartment.

Thus, a second method was applied, detecting intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by formation of electron dense cerium-hydroperoxide precipitates following preincubation with cerium and TNF- $\alpha$ . As H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was not detectable with standard transmission electronmicroscopy, an electron energy loss spectroscopic (EELS) technique was applied. Using this technique significant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production ( $p < 0,01$ ) relative to the controls was detected in the mitochondria, endoplasmatic reticulum (ER), the cytoplasm and to a smaller extent on the plasma membrane.

A sole, specifically TNF- $\alpha$  regulated superoxide production is therefore unlikely.

However, as the biomembrane is the common denominator of three of the four production sites, it may represent an unspecific target for TNF $\alpha$  conveyed ROS-generation. A TNF- $\alpha$  associated modulation of membrane integrity could lead to unspecific activation of various membrane-associated redox systems producing superoxides. The membrane coated peroxisomes in the cytoplasm possibly account for the cerium precipitates in this location.

The incomplete NF- $\kappa$ B inhibition by  $\alpha$ -lipoic acid and BHA, however, demonstrates that redox independent signalling pathways coexist in canine skin cells.

Bearing the results of these in-vitro investigations in mind, the therapeutic administration of  $\alpha$ -lipoic acid to modulate potential NF- $\kappa$ B overactivation in atopic dogs in the future is promising. However, further studies including standardized

clinical trials are mandatory to evaluate the in-vivo efficacy of this antioxidant in canine dermatology.