

Bachelorarbeit

Untersuchung der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden in humanen Zelllinien aus SCC-Tumoren mit unterschiedlicher Aggressivität

Fakultät Life Sciences

Studiendepartment Biotechnologie

vorgelegt von

Maren Merten

Matrikelnummer: 2128972

Hamburg, den 31. Januar 2017

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)**
- 2. Gutachter: Dr. Beate Volkmer (Elbeklinikum Buxtehude)**

Diese Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für molekulare Zellbiologie des Elbeklinikums Buxtehude

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Beate Volkmer und Herrn Dr. Rüdiger Greinert für die Aufnahme im Labor für molekulare Zellbiologie aussprechen. Es war mir eine große Freude dort arbeiten zu dürfen.

Auch Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er im Rahmen der externen Betreuung meiner Arbeit für alle anstehenden Fragen immer ein offenes Ohr hatte und mir, trotz meiner sehr spontanen Terminplanung, stets entgegen kam.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. I-Peng Chen und Herrn Dipl.-Ing. Stefan Henning für die intensive Betreuung und die kompetente, fachliche Beratung bedanken.

Daneben danke ich auch Frau Dr. Mouna Mhamdi-Ghodbani, die mir bei der Arbeit im Labor wertvolle Ratschläge gegeben hat und so manchen Frust mit mir teilte.

Ein herzlicher Dank gilt auch Frau Regina Börger-Hoppe, Frau Sylke Engel-Haskiris, die mir die Grundlagen der Arbeit in der Zellkultur vermittelten und mir bei persönlichen und fachlichen Fragen mit größtem Engagement halfen.

Zudem möchte ich mich bei Frau Maren Brunsen, Frau Rebecca Keck und Frau Stefanie Balk für die alltägliche Unterstützung und die guten Gespräche danken. So ein nettes Team findet man selten.

Ein großes Dankeschön auch an Daniela Gapski und Thorben Buck für die Korrektur der englischen Übersetzung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir alle meine Träume ermöglicht haben, und meinem Freund, der mir auch in schwierigen Momenten immer zur Seite steht.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
Abstract	VII
Zusammenfassung	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die menschliche Haut	1
1.2 Physikalische Grundlagen der UV-Strahlung	4
1.3 Einfluss von UV-Strahlung auf die Haut	6
1.3.1 DNA-Schäden	6
1.3.2 Reparaturmechanismen	8
1.3.3 Apoptose	11
1.4 Das kutane Plattenepithelkarzinom	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Verwendete Geräte	14
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.3 Gebrauchs- und Pufferlösungen	15
2.1.4 Antikörper	17
2.1.5 Nährmedien	17
2.1.6 Zelllinien	18
2.1.6.1 SCC-Zelllinien- MET-1, MET-2, MET-4	18
2.1.6.2 HaSk-pw	18

2.1.7 Software	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur	19
2.2.1.1 Passagieren und Ablösen	19
2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen	19
2.2.2 UV-Bestrahlung	20
2.2.3 Durchflusszytometrie	22
2.2.4 CPD-Nachweis	24
2.2.5 Apoptose-Messung mit Annexin V	28
2.2.6 Viabilitäts-Messung mit Guava ViaCount	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Vergleich der Reparatur UV-induzierter CPD in MET-Zelllinien und HaSk-pw	31
3.2 UVB-induzierte Apoptose in MET-Zelllinien und HaSk-pw	33
3.3 Untersuchung der Viabilität von MET-Zelllinien und HaSk-pw nach UVB-Bestrahlung	37
4 Diskussion und Ausblick	40
Literaturverzeichnis	44

Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
6-4PP	(6-4) Pyrimidin- Pyrimidon- Photoprodukte
BCC	Basal Cell Carcinoma
BCL	B-Cell Lymphoma
CaCl₂	Calciumchlorid
CIE	Commission Internationale de l'Éclairage
CPD	Cyclobutan- Pyrimidin- Dimere
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h-EGF	Human epidermal growth factor
FITC	Fluorescein –Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forwardscatter
H₂O	Dihydrogenmonoxid (Wasser)
HCl	Chlorwasserstoff
IR	Infrarot
MgCl₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat

NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
PBS	Phosphate Buffered Solution
PJ	Propidiumjodid
PS	Phosphatidylserin
RNA pol II	RNA- Polymerase II
RNAse	Ribonuclease A
ROS	Reactive Oxygen Species
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SSC	Sidescatter
XP	Xeroderma Pigmentosum

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau einer Epidermis	2
1.2	Schematische Darstellung der Dermis	3
1.3	Strahlenspektrum der Sonne	5
1.4	Formation von CPD und 6-4PPs	8
1.5	Schematische Darstellung der verschiedene NER-Pfade	10
2.1	Emissionsspektrum der UVB-Strahlenquelle TL12	21
2.2	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	23
2.3	Histogramm und Dot-Plot-Diagramm	24
2.4	Annexin V-Färbung apoptotischer Zellen	28
3.1	Reparaturkinetiken der tumorigenen Zelllinien MET1, MET-2 und MET-4 und der Kontroll-Zelllinie HaSk-pw	32
3.2	Darstellung einer Auswertung der Apoptose-Messung mittels guavaSoft	34
3.3	Darstellung des Anteils frühapoptotischer Zellen nach UVB Bestrahlung	35
3.4	Darstellung des Anteils frühapoptotischer und spätapoptotischer/nekrotischer Zellen nach UVB Bestrahlung	36
3.5	Darstellung der Auswertung vitaler Zellen im Flusszytometer mit guavaSoft	37
3.6	Darstellung des Anteils vitaler Zellen nach UVB-Bestrahlung (guava ViaCount-Assay)	38
3.7	Darstellung des Anteils vitaler Zellen nach UVB-Bestrahlung (Clonetech-Assay)	39

Tabellenverzeichnis

2.6	CIE-gewichtete und ungewichtete Bestrahlungsstärke der verwendeten UVB-Quelle TL12	21
3.1	Reparaturkinetiken von MET-1, MET-2, MET-4 und HaSk-pw	32

Abstract

Squamous cell carcinoma (SCC) is known to be one of the most common skin cancers in the Caucasian society. SCCs are often linked to chronic UV exposure in which UVB radiation is presumed to be the main risk factor. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), the dominant lesion induced by UVB radiation, may lead to mutations in cancer relevant genes, if not repaired properly. Therefore the DNA repair system is an essential mechanism to overcome mutations and cancer. Besides the cell's complex repair system, the process of programmed cell death, or apoptosis, represents another mechanism securing genomic integrity and normally occurs when the cell fails to repair DNA lesions.

This thesis focuses on the investigation of repair efficiency, induction of apoptosis and cell viability in different SCC tumour lines (MET-1, MET-2, MET-4) of progressive manifestation after UVB treatment. Comparatively, a well established cell line of non tumorous keratinocytes (HaSk-pw) was analysed.

The evidence from this thesis suggest that repair efficiency and UVB sensitivity differs in the different MET cells lines as well as the control line. This may be explained by chromosomal aberrations common in all MET cells or specific for only one cell line. The genetic reasons responsible for the discrepancy, concerning repair efficiency and UVB sensitivity, between the different MET cell lines have to be further investigated. Since the maintenance of the tumorous phenotype and the development from tumour to metastasis has great impact on survival of cancer patients, further investigation of this skin cancer model could be fundamental for medical research.

Zusammenfassung

Das kutane Plattenepithelkarzinom (SCC=Squamous Cell Carcinoma) gehört zu den verbreitetsten Hautkrebstypen der kaukasischen Bevölkerung. Oft ist die Entstehung eines SCCs auf die chronische Exposition gegenüber UV-Strahlung, darunter besonders UVB, zurückzuführen. Die prominentesten DNA-Schäden, die durch UVB-Strahlung induziert werden, sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs), die in der Lage sind Mutationen hervorzurufen. Mutationen in krebsrelevanten Genen treten dann auf, wenn die Reparatur der induzierten Schäden bis zur nächsten Replikation nicht gelungen ist. Aufgrund dessen ist das Reparatursystem der Zelle im Bezug auf die Prävention von Mutationen und Hautkrebs von zentraler Bedeutung. Daneben ist der programmierte Zelltod, die Apoptose, ein wichtiger Mechanismus Mutationen und Krebs zu umgehen. Er findet dann Anwendung, wenn die Reparatur der induzierten Schäden fehlschlägt.

Ziel dieser Arbeit war es in verschiedenen SCC-Tumor-Zelllinien (MET-1, MET-2, MET-4) unterschiedlicher Aggressivität die Reparaturleistung, Apoptose-Induktion und Viabilität nach Bestrahlung mit UVB zu untersuchen. Zum Vergleich wurde eine etablierte, nicht tumorigene Keratinozyten-Zelllinie (HaSk-pw) verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die einzelnen SCC-Zelllinien sowohl untereinander, als auch im Bezug auf die Kontroll-Zelllinie bei der Reparatur von UVB-induzierten CPDs und in der Sensitivität gegenüber UVB-Strahlung unterscheiden. Grund für diese Unterschiede können bestimmte chromosomale Aberrationen sein, die entweder in allen oder nur einzelnen MET-Zelllinien auftauchen. Welche genetischen Ursachen den ermittelten Unterschieden innerhalb der MET-Zelllinien zugrunde liegen, muss durch weitere Untersuchungen noch näher erforscht werden. Da der Erhalt des tumorigenen Phänotyps und die Entwicklung von Tumoren zu Metastasen großen Einfluss auf das Überleben von Krebspatienten haben, können weitere Untersuchung dieses Hautkrebsmodells für medizinische Erkenntnisse von großer Bedeutung sein.

1 Einleitung

1.1 Die menschliche Haut

Mit einer Gesamtfläche von 1,5 bis 2 m² und einem Gewicht von 3,5 bis 10 kg macht die Haut als größtes Organ einen nennenswerten Anteil der Körpermasse aus. Ihre wesentliche Aufgabe besteht darin, vor äußeren Einflüsse wie Kälte, Hitze, Strahlung, mechanischen Reizen, Chemikalien und Infektion zu schützen. Zudem übernimmt sie regulatorische Funktionen des Temperatur- und Flüssigkeitshaushaltes und ist aktiv an Stoffwechselfvorgängen wie der Synthese von Vitamin D beteiligt (Lehmann, 2005). Allgemein ist die Haut in drei große Schichten gegliedert, der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut).

Die Epidermis, deren Dicke von Lokalisation, Alter und Geschlecht abhängt, ist ein verhorntes Plattenepithel, welches zu 90 % aus Keratinozyten besteht. Die Minderheit der Zellpopulation dieser Hautschicht besteht aus Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen. Langerhans-Zellen sind dendritische Zellen, die suprabasal (oberhalb der Basalschicht) im Stratum spinosum vorkommen. Ihre Funktion besteht darin, nach Antigenkontakt durch Aktivierung von T-Helferzellen eine Immunreaktion auszulösen (Romani et al., 2010). Merkelzellen sind langsam adaptierende Mechanorezeptoren, welche im Stratum basale vorkommen. Sie sind über Desmosomen mit benachbarten Keratinozyten verbunden, wodurch sie in der Lage sind Druck im umliegenden Gewebe zu detektieren (Nakatani et al., 2015). Ebenfalls im Stratum basale lokalisiert sind die Pigmentzellen Melanozyten. Charakterisiert werden sie durch ihre pigmentierenden Organellen, die Melanosomen, welche das Hautpigment Melanin über die Vorstufe Tyrosin synthetisieren und speichern. In Form von Vesikeln, den Melanosomen, wird Melanin an benachbarte Keratinozyten abgegeben (Yamaguchi und Hearing, 2009).

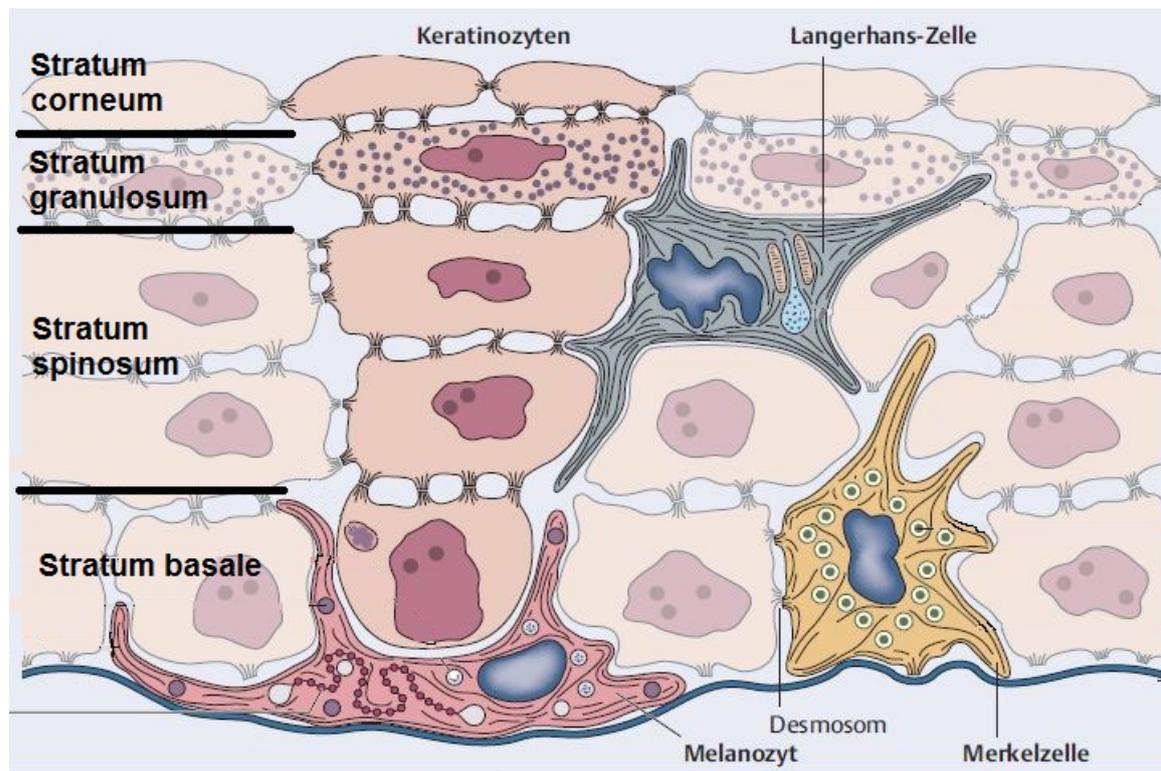


Abbildung 1.1: Die Epidermis besteht im Wesentlichen aus vier Schichten, der Hornschicht (Stratum corneum) der Körnerzellschicht (Stratum granulosum), der Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und der Basalschicht (Stratum basale), welche großteilig aus Keratinozyten bestehen. Das Gewebe ist durchzogen von vereinzelt Merkelzellen, Langerhans-Zellen und Melanozyten. Die Schichten entstehen durch die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten, die mit der Änderung der Zellstruktur einhergehen. Quelle: Moll, 2010.

Keratinozyten verändern im Laufe ihrer Differenzierung ihre Struktur (Stachelzelle, Körnerzelle, Hornzelle) und durchwandern die suprabasalen Schichten, bevor sie im Rahmen der terminalen epidermalen Differenzierung als Hornzelle des Stratum corneum das Gewebe verlassen (Fuchs und Raghavan, 2002). Die Epidermis als Proliferationsgewebe unterliegt ständiger Erneuerung. Ort der Proliferation ist das Stratum basale, in dem Stammzellen unter Teilung ausdifferenzieren (Barrandon und Green, 1987; Lavker und Sun, 1982). Während eine Tochterzelle in die suprabasale Schicht entlassen wird, verbleibt die andere als Stammzelle in der Basalschicht. Die erste suprabasale Schicht, das Stratum spinosum, ist eine vielschichtige Anordnung von Keratinozyten, die im oberen Bereich des Stratum spinosum abflachen und untereinander über Desmosomen verbunden sind. Zellen des Stratum granulosum werden durch die

Anreicherung von basophilen Keratohyalingranula im Cytoplasma charakterisiert. Diese sind durch Bildung von Keratin maßgeblich an der Verhornung im Stratum corneum beteiligt (Lüllmann-Rauch, 2015). Das Stratum corneum ist die äußerste Zellschicht und besteht aus sehr flachen, kernlosen Hornzellen, die nach der terminalen Differenzierung unmerklich abgeschilfert werden.

Unterhalb der Epidermis befindet sich die Dermis, ein faserreiches Bindegewebe das wiederum in Stratum papillare und Stratum reticulare untergliedert wird (Abbildung 1.2.).

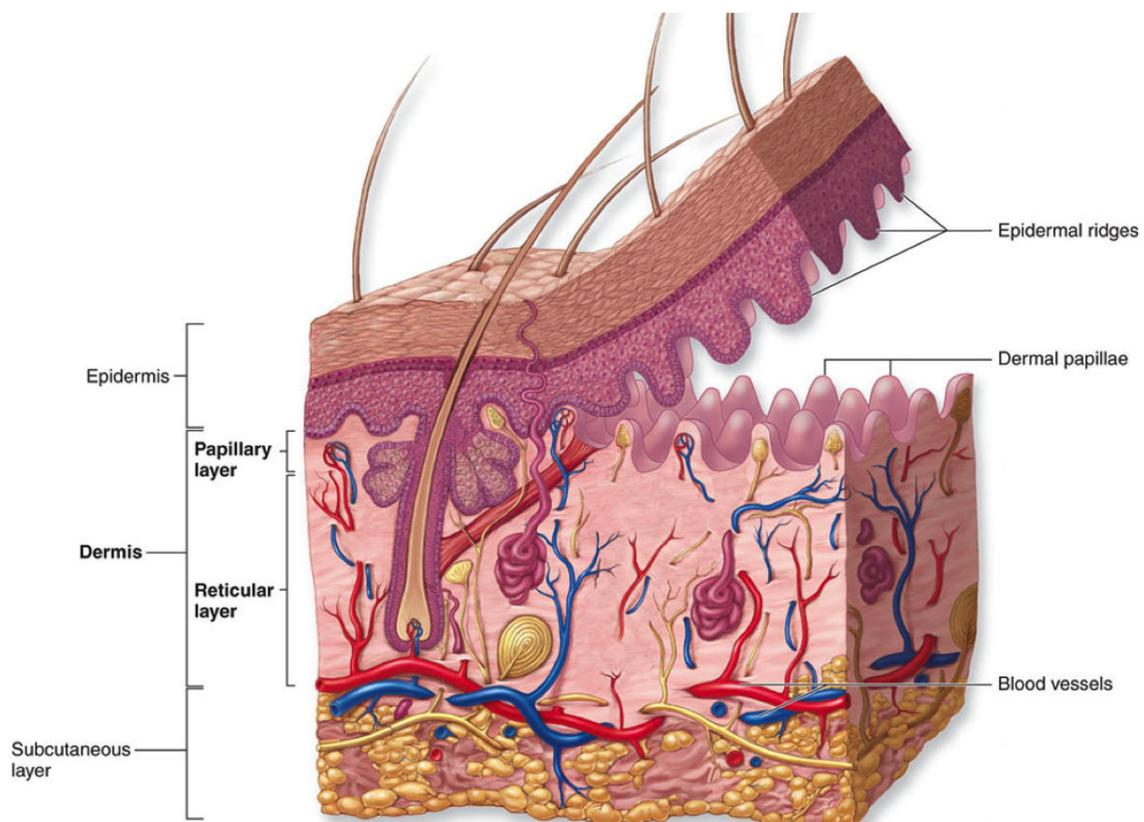


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der drei Hauptschichten der Haut (Epidermis, Dermis, Subkutis) und der Gliederung der Dermis in die Papillarschicht (Stratum papillare) und die Reticularschicht (Stratum reticulare). Im Übergang von Epidermis zu Dermis sind die epidermalen Reteleisten in die dermalen Papillaren eingebettet. Quelle: Studyblue

Die Verbindung von Dermis und Epidermis besteht über Verzahnung der epidermalen Reteleisten und der dermalen Papillen im Stratum papillare, eine Grenzzone, die dermoepidermale Junctionzone genannt wird (Sterry, 2011).

Das Stratum papillare ist verglichen mit dem tieferen Bereich der Dermis sehr zellreich. Hauptbestandteil sind Fibroblasten, die für die Synthese von Kollagen- und Elastinfasern zuständig sind und somit die Grundsubstanz der Dermis bilden. Diese sind in einem engen Netz verwoben und für die Stabilität und Elastizität des Gewebes verantwortlich. Zudem sind verschiedene Immunzellen (Mastzellen, Lymphozyten) und Gewebemakrophagen (Histiozyten), sowie Langerhans-Zellen und vereinzelt Melanozyten vorhanden (Moll, 2010).

Das zellärmere Stratum reticulare ist lichtmikroskopisch dicker als das Stratum papillare und besitzt Kollagenfasern mit größerem Durchmesser (Meves, 2006). Hier entspringen Schweißdrüsen und Haarfollikel, deren Ausgänge sich durch die gesamte restliche Dermis und Epidermis ziehen. Das angrenzende Unterhautfettgewebe (Subkutis) besteht hauptsächlich aus Fettgewebszellen, die in Bindegewebe eingebettet sind und verbindet die oberen Hautschichten mit den darunter befindlichen Muskelfaszien (Meves, 2006).

1.2 Physikalische Grundlagen der UV-Strahlung

Der Begriff ultraviolette Strahlung umfasst elektromagnetische Wellen im Bereich 100 nm bis 400 nm, dessen größte Quelle die Sonne ist. Neben der kurzwelligen UV-Strahlung enthält das elektromagnetische Sonnenspektrum auf der Erde sichtbares Licht (VIS) (400 nm bis 700 nm) und langwelliges Infrarot (IR) – Licht (ab 700 nm). UV-Strahlung ist im Gegensatz zu langwelligeren Strahlungen energiereicher und aufgrund dessen in der Lage die Haut zu schädigen.

Der Zusammenhang zwischen Energiegehalt einer Strahlung und seiner Wellenlänge lässt sich physikalisch durch die mathematische Beziehung der Energie eines Photons und seiner Frequenz erläutern:

$$E = h \cdot f \quad (1)$$

Dabei stellt die Energie das Produkt aus dem Plank'schen Wirkungsquantum,

1. Einleitung

einer physikalischen Konstante, und der Frequenz dar. Die Frequenz f wiederum ist umgekehrt proportional zur Wellenlänge λ des Lichts (Beschrieben durch die mathematische Formel zur Berechnung der Lichtgeschwindigkeit c):

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

Setzt man Gleichung (2) in Gleichung (1) ein wird der direkte Zusammenhang zwischen Wellenlänge und Energie deutlich:

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (3)$$

Je kürzer die Wellenlänge einer Strahlung ist, desto größer ist ihre Frequenz. Die Lichtgeschwindigkeit beschreibt die Geschwindigkeit der elektromagnetischen Strahlung im Vakuum und kann demnach als konstant angenommen werden. Steigt die Frequenz einer Strahlung, steigt somit auch die Energie ihrer Photonen.



Abbildung 1.3: Das Strahlenspektrum der Sonne umfasst den Bereich der optischen Strahlung und besteht aus kurzwelligem UV-Bereich, unterteilt in UVC, UVB und UVA, dem visuellen Licht und der Infrarot Strahlung. Quelle: BAuA

Innerhalb des UV-Spektrums wird in drei Bereiche unterteilt, die hinsichtlich

ihrer Wellenlänge und schädigenden Wirkung bzw. Anwendung charakterisiert werden. Die energiereichste UV-Strahlung stellt die UVC-Strahlung im Bereich 100 nm bis 280 nm dar. Da sie vollständig von der Erdatmosphäre gefiltert wird, ist sie für die umweltmedizinische Betrachtung unbedeutend. Anwendung findet sie aufgrund der desinfizierenden Wirkung hauptsächlich zur physikalischen Entkeimung von Oberflächen (Rastogi et al., 2007), Flüssigkeiten (Labas et al., 2009) und Gasen (McDevitt et al., 2012).

Die UV-Strahlung, die auf der Erdoberfläche ankommt besteht aus ca. 5 % UVB (280 bis 315 nm) und 95 % UVA (315 bis 400 nm). Beide Strahlungen sind bei der Entstehung von strahlungsbedingten Hautschäden im großen Maße beteiligt. Der Einfluss beider Strahlungen auf die Haut wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.3 Einfluss von UV-Strahlung auf die Haut

Obwohl UV-Strahlung ein natürlicher Umweltfaktor ist, mit dem die Haut alltäglich konfrontiert wird, birgt sie bei übermäßiger Exposition gewisse Risiken. Zum Schutz vor akuter Strahlung ist die Haut von Natur aus mit Abwehrmechanismen ausgestattet. Dazu gehören die erhöhte Bildung des UV-absorbierenden Hautfarbstoffs Melanin oder die Verdickung der Hornhaut (Lichtschwiele) (Berger, 2009). Bei zu hoher Exposition, das bedeutet bei Überschreiten der persönlichen und hauttypabhängigen Erythemschwellendosis, kommt es zu einer lokalen Rötung (Erythem) der Haut. Bereits bei Dosen unterhalb der Erythemschwellendosis können innerhalb der Zelle biologische Wechselwirkungen stattfinden (Singh, 2006). Dazu gehört die Beeinflussung des Stoffwechsels von Kollagen und Elastin, welche mit UV-bedingter Hautalterung einhergeht, die Provokation inflammatorischer Prozesse und die Induktion von DNA-Schäden, sowie die Einleitung von Apoptose (Singer et al., 2016).

1.3.1 DNA-Schäden

DNA-Schäden können zum einen indirekt über UV-induzierte Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies und zum anderen durch direkte Interaktion mit UV-

Strahlung induziert werden. Über den direkten Weg reagiert die DNA wie ein Chromophor, welches die ultraviolette Strahlung absorbiert und dabei oft unverändert bleibt, sodass die Energie in Form von Wärme oder Fluoreszenz freigegeben wird. In einigen Fällen verursacht die aufgenommene Energie molekulare Veränderungen innerhalb der DNA. Diese reichen aus, um die Zelle zu schädigen oder dauerhafte Erbgutschäden zu hinterlassen. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass viele UV typische DNA-Schäden wellenlängenabhängig sind.

Die Mutagenität von UVA beruht weitestgehend auf der indirekten Induktion von DNA-Schäden über Anregung endogener Chromophore (Sensibilisatoren). Diese schädigen entweder die DNA direkt (Typ I Reaktion) oder generieren durch Energietransfer auf molekularen Sauerstoff (Typ II Reaktion) reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zum Schadenspektrum oxidativer Schädigung gehören vor allem DNA-Protein Cross-links (Dizdaroglu, 1992) und DNA-Einzelstrangbrüche, aber auch Doppelstrangbrüche (Greinert et al., 2012) und verschiedene Basenmodifikationen. Eine der am besten untersuchtesten und häufig auftretende Basenmodifikationen, die durch ROS generiert werden ist 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG). Diese kann G→T Transversionen durch Fehlpaarung mit Adenin oder A→C Transversionen durch falschen Einbau gegenüber von Adenin hervorrufen (Rünger und Kappes, 2008).

UVB Strahlung ist dafür bekannt, im Rahmen direkter Anregung vor allem DNA-DNA Cross-links durch Dimerisierung benachbarter Basen eines DNA-Stranges zu induzieren (Pfeifer und Besaratinia, 2012; Rünger et al., 2012). Am häufigsten entstehen dabei Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PP) (Abbildung 1.4.). Der Cyclobutanring eines Cyclobutan-Pyrimidin-Dimers entsteht durch eine [2+2]-Cycloaddition an den 5,6 Bindungen zweier benachbarter Pyrimidin Basen. (6-4)PPs werden durch kovalente Einfachbindung zwischen Position 4 und Position 6 zweier Pyrimidin Basen gebildet (Cadet et al., 2015).

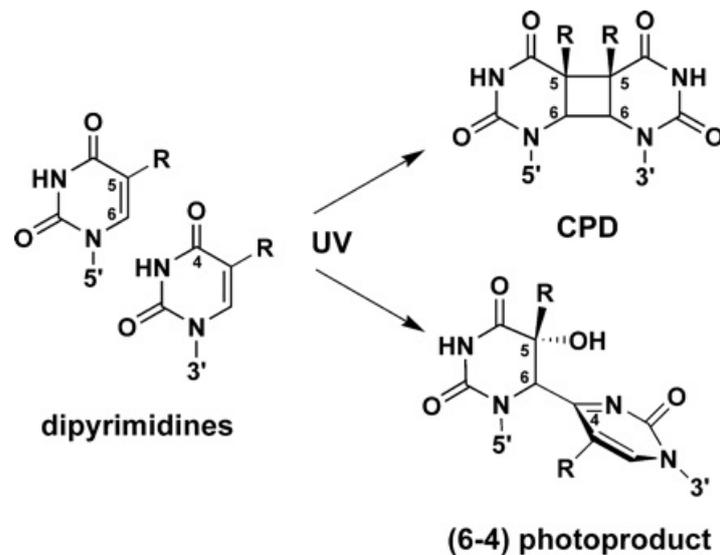


Abbildung 1.4: Formation von CPDs und 6-4PPs aus benachbarten Pyrimidin-Basen. CPDs entstehen unter Bildung eines Cyclobutanrings der Doppelbindungen zwischen C5 und C6. 6-4PPs resultieren aus der kovalenten Bindung zwischen C6 und C4 zweier Pyrimidin Basen. Quelle: Li et al., 2006

CPDs und (6-4)PPs sind die bedeutendsten DNA-Läsionen, die zu Mutationen führen können und in der Regel C→T-Transitionen oder CC→TT-Tandem Mutationen hervorrufen (Ichihashi et al., 2003). Beide Mutationen sind sehr spezifisch für genomische Veränderungen, die durch UV entstanden sind und gelten als Signatur für solare Exposition (Brash, 2015). In den Tumorsuppressorgenen *p53* und *PITCH*, sowie dem *ras*-Onkogen sonnenexponierter Haut konnten C→T- und CC→TT-Transitionen nachgewiesen werden (Ichihashi et al., 2003). Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf die Induktion von CPDs, da (6-4)PPs aufgrund der schnellen Reparatur weniger mutagen sind (You et al., 2001).

1.3.2 Reparaturmechanismen

Die DNA unterliegt aufgrund der hohen Anfälligkeit gegenüber Schäden durch interne Faktoren (Radikale, Replikationsfehler) und externe Faktoren (Strahlung, Toxine, Viren) ständiger Mutation. Eine Akkumulation dieser Veränderungen des Erbguts kann fatale Folgen für den betroffenen Organismus haben. Aufgrund dessen besitzt die DNA als eines der wenigen Biomoleküle eine große Anzahl spezifischer Reparaturpfade. Dabei ist jeder Reparaturpfad von Typ und

Lokalisation der Läsion im Genom abhängig (Essers et al., 2006). Spezielle Reparaturenzyme scannen die DNA kontinuierlich und triggern bei Schäden den notwendigen Reparaturmechanismus.

Im Rahmen der Beseitigung UV-induzierter DNA-Schäden gibt es Reparaturmechanismen, wie die homologe Rekombination und die nichthomologe End-zu-End-Verknüpfung, die für die Beseitigung von Doppelstrangbrüchen zuständig sind, wie sie beispielsweise durch ROS entstehen oder die Mismatch- und Basen-Exzisions-Reparatur, die spezifisch für Einzelstrang-Schäden sind (Rastogi et al., 2010).

Der wichtigste Reparaturmechanismus für die Beseitigung von DNA-DNA- Crosslinks stellt die Nukleotid-Exzisions-Reparatur dar, ein mehrstufiger Prozess bei dem abnormale oder beschädigte Basenabschnitte entfernt werden. Sie ist aufgrund ihres vielseitigen und flexiblen Reparatursystems innerhalb eukaryotischer Zellen stark konserviert und betrifft eine Vielzahl verschiedener DNA-Läsionen, darunter typische Photoprodukte wie CPDs und 6-4PPs, wodurch die Reparatur im Hinblick auf UV-induzierte DNA-Schäden von hoher Wichtigkeit ist (Rastogi et al., 2010).

Bei der NER kann zwischen zwei Subpfaden unterschieden werden: Die globale Genom-Reparatur (GGR), bei der inaktive DNA repariert wird und der Transkription-gekoppelten Reparatur (TGR), welche spezifisch für aktiv transkribierte DNA ist. Während die GGR zufällig im gesamten Genom auftritt, ist das Auftreten der TGR lokal an die Erkennung eines Schadens durch eine RNA Polymerase II (RNA pol II) gebunden.

Innerhalb des GGR-Pfades sucht das Protein XPC, welches als Schadenssensor fungiert zusammen mit dem UV-Exzisionsreparatur-Enzym hHR23B die DNA-Helix kontinuierlich nach Veränderungen ab, während UV-DDB (ultraviolet (UV) radiation- DNA damage-binding protein) für die Erkennung des Schadens zuständig ist. Beim TGR wird der Schaden indirekt durch die Blockade der RNA pol II während der Transkription entdeckt. Durch Bildung des Cockayne syndrome WD repeat protein-Komplex CSA-CSB wird RNA pol II zurückgesetzt und der Zugang von NER-Faktoren zur Läsion ermöglicht (Abbildung 1.5.).

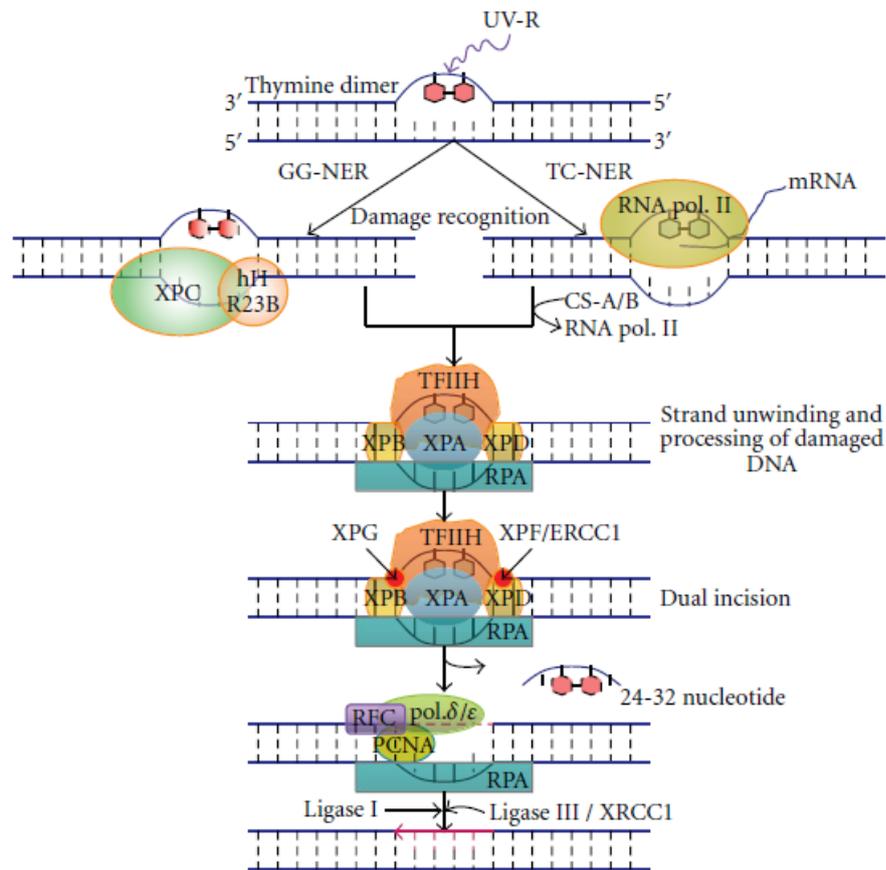


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der zwei NER-Pfade, die sich in Erkennung des DNA-Schadens unterscheiden. Der GGR-Pfad wird durch Bindung des Proteins XPC/HR23B eingeleitet. Im Gegensatz dazu tritt die TGR durch eine Blockade der RNA Polymerase II-Aktivität beim Ablesen des Fehlers auf. Beide Pfade führen zur eigentlichen Reparatur, die bei GGR und TGR gleich verläuft. Quelle: Rastogi et al., 2010

Der Komplex TFIIF, der unter anderem aus den Untereinheiten XPB und XPD besteht, besitzt Helicase-Aktivität und entwindet den betroffenen Abschnitt der DNA. Als Andockstelle für weitere Reparaturenzyme dient das Einzelstrang-bindende Protein RPA (replication protein A) und die Untereinheit XPA. Durch Bindung von XPG wird das Erkennungsprotein XPC/HR23B (im Fall von GGR) verdrängt. XPG ist eine Endonuklease, die den Schaden auf der 3'-Seite schneidet, während ERCC1 (excision repair cross complementing) in 5'-Richtung spaltet. Anschließend wird die entstandene Lücke durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt, bevor eine Ligase die freien Enden verknüpfte.

In vielen Krankheiten, die mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung einhergehen, wie z.B. Xeroderma Pigmentosum (XP) oder das Cockayne

Syndrom, ist der NER-Mechanismus beeinträchtigt. Bei XP-Patienten ist das Hautkrebsrisiko um den Faktor 1000 erhöht, wobei SCC- und BCC-Tumoren häufiger als maligne Melanome auftreten (Boer, 2000). Charakteristisch für die Krankheit ist eine Mutation in solchen Genen, die für die Reparaturproteine XPA bis XPG codieren (Lehmann et al., 2011).

Obwohl der beschriebene Reparaturmechanismus in der Lage ist die genomische Stabilität der Zelle zu bewahren, ist nicht auszuschließen, dass eine massive Anhäufung von DNA-Schäden nicht durch NER effektiv zu behandeln ist. In diesem Fall spielt die Apoptose, der programmierte Zelltod für die Prävention der Ausartung einer befallenen Zelle eine wichtige Rolle und wird im folgenden Abschnitt näher besprochen.

1.3.3 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde 1972 das erste mal von Kerr, Wyllie und Currie verwendet (Kerr et al., 1972) und beschreibt den programmierten Zelltod. Apoptose ist ein Prozess der besonders bei Entwicklung und Alterung eines Organismus oder bei Infizierung und Schädigung einer Zelle einsetzt. Im Gegensatz zur Nekrose, welche mit dem Austreten von Cytoplasma und anschließender Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebe einhergeht, werden apoptotische Zellen vollständig phagozytiert. Im Laufe des Apoptose-induzierten Zelltods wird DNA schrittweise kondensiert und degradiert, während Zellorganellen in kleine, blasenförmige Strukturen (Apoptosekörper) an der Zelloberfläche fragmentiert und anschließend von Makrophagen verdaut werden bis die Zelle restlos verschwunden ist (Williams et al., 1992). Apoptose wird durch physiologische und pathologische Reize induziert. So ist in der Embryogenese der programmierte Zelltod beispielsweise als natürlicher Prozess für die Rückbildung des Stützgewebes zwischen einzelnen Fingern und Zehen zuständig (Müller, 2009). Im Falle eines pathologischen Stimulus, wie zum Beispiel die Induktion von irreparablen DNA-Schäden, sorgt der Mechanismus für das vorherige Absterben der Zelle dafür, eine Replikation der Schäden zu vermeiden.

Die Induktion von Apoptose wird in den intrinsischen und den extrinsischen Signalweg unterteilt (Knippers, 2001). Über den extrinsischen Weg werden über die Bindung von zahlreichen TNF-Rezeptoren (tumor necrosis factor receptor) Caspasen aktiviert, die spezifisch Zielproteine spalten. Die Spaltung führt im späteren Verlauf zur Veränderung der Zellstruktur und damit zum Absterben der Zelle. Der intrinsische Signalweg ist nicht Rezeptor-vermittelt und kann zum einen über das Fehlen von Apoptose Supressoren oder dem Vorhandensein aktivierender Stimuli wie Toxine, Strahlung oder virale Infektionen initiiert werden (Elmore, 2007). Ausgehend von den Mitochondrien wird Cytochrom C freigesetzt, welches mit speziellen Proteinen einen Komplex bildet (Apoptosom) und Caspasen aktiviert (Knippers, 2001).

Es ist bekannt, dass die Supression von Apoptose eine zentrale Rolle in der Entstehung und Entwicklung von Krebs spielen kann (Kerr et al., 1994). Die Mechanismen, über die eine Tumorzelle in der Lage ist den Zelltod zu umgehen, sind vielfältig. Grundsätzlich geschieht dies über Störung der Caspase-Aktivität, einem eingeschränkten TNF-Rezeptorsignalweg oder einem gestörtem Verhältnis pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Proteine (Wong, 2011). BCL-2 ist ein Regulatorprotein, welches die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindert und somit die Caspase-Aktivität und die Einleitung der Apoptose unterbindet (Cotter, 2009; Yang, 1997). BCL steht für B-Cell-Lymphoma, aus dem das Protein erstmalig isoliert wurde. Es spielt jedoch auch in anderen Tumoren eine tragende Rolle. Die Überexpression von BCL-2 wurde ebenfalls in menschlichen Nieren-, Hirn- und Darmtumoren festgestellt (Cotter, 2009). Die Expression von BCL-2 und anderen Regulatorproteinen der Apoptose werden durch das Tumorsuppressorgen *p53* gesteuert (Toshiyuki und Reed, 1995). *p53* ist in über 50 % aller menschlichen Krebsarten mutiert (Elmore, 2007), darunter auch Hautkrebs (Benjamin und Ananthaswamy, 2007).

1.4 Das kutane Plattenepithelkarzinom

Der Begriff Hautkrebs beschreibt maligne Neubildungen, die aus verschiedenen Zelltypen der Haut entstehen können. Im Allgemeinen wird zwischen

melanozytärem Hautkrebs und nichtmelanozytärem Hautkrebs unterschieden. Letzterer umfasst das Basalzellkarzinom (basal cell carcinoma=BCC) und das Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma=SCC), welche als Hauptvertreter dieses Typs gelten. Der melanozytäre Hautkrebs, das maligne Melanom, macht ca 65 % aller hautkrebs-abhängigen Todesfälle aus, repräsentiert jedoch nur 4 % der dokumentierten Hautkrebsfälle (Gordon, 2013). Nichtmelanozytäre Tumore sind vergleichsweise weniger letal, kommen jedoch weitaus häufiger vor (Leiter et al., 2014). Das kutane SCC, welches Hauptgegenstand dieser Arbeit ist, macht rund 16 % aller Krebsfälle aus und ist nach dem BCC der zweithäufigst auftretende Hauttumor (Gordon, 2013).

Am häufigsten sind hellhäutige Menschen mit einem Durchschnittsalter von 70 Jahren betroffen (Leiter et al., 2016). Neben Krankheiten wie Xeroderma pigmentosum, die mit verminderter Reparaturleistung von DNA-Schäden einhergehen, chronisch entzündlichen Erkrankungen und chronischer Narbenbildung, gehört vor allem die regelmäßige und übermäßige Exposition gegenüber UV-Strahlung zu den Hauptrisikofaktoren des SCC (Leiter et al., 2016). Aufgrund dessen ist das kutane SCC hauptsächlich im Kopf- und Gesichtsbereich oder an anderen Stellen, die chronischer UV-Strahlung ausgesetzt sind, lokalisiert. Im Hinblick auf das maligne Melanom und das BCC ist bei dem SCC jedoch eine verstärkte Verteilungsdichte auf der Haut des Handrückens zu beobachten (Armstrong und Kricke, 2001).

SCCs als Tumoren epidermaler Keratinozyten wachsen lokal destruierend, wodurch eine Metastasierung über die Lymph- oder Blutgefäße möglich ist. Die Metastasierungsrate liegt jedoch nur bei 3 bis 10 % je nach Größe, Lokalisation und Differenzierungsstadiums des Tumors (Gordon, 2013). SCC-Tumore weisen eine Vielzahl von genetischen Veränderungen gegenüber gesunden Keratinozyten auf, unter anderem Mutationen in *p53* oder den Verlust der Heterozygotie (Li et al., 2015). Zu dem Krankheitsbild des Tumors gehören somit eine Vielzahl lokaler genetischer Veränderungen, die zelleigene Schutzmechanismen betreffen. Dazu gehören beispielsweise eine Dysregulation des Zellzyklus,

der Apoptose, der DNA-Reparatur, sowie die Beeinträchtigung der Telomeraseaktivität und der Umgehung von Seneszenz (Feller et al., 2016).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller (Ort)
Abzug	7590	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Analyse-Waage	870-61	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Brutschrank	CB210	Binder (Tuttlingen)
	BB 6220	Heraeus Instruments (Hanau)
Durchflusszytometer	Guava easyCyte 8HT	Merck Millipore(Darmstadt)
Hybridisierungsöfen	Hybru Ofen 6/12	Fröbel Labortechnik (Lindau)
Laborzentrifuge	Rotina 64	Hettich (Tuttlingen)
Magnetrührer/Heizplatte	IKAMAG RH,	Janke & Kunkel IKA Labortechnik (Staufen)
	CK-2	Olympus (Tokyo)
Mikroskop	H500	Hund (Wetzlar)
pH-Meter	pH526	WTW (Weilheim)
Sterilwerkbank	BSB-4A	Gelaire Flow Laboratories (Bremen)
Thermomixer	C 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Mikro 200	Hettich (Tuttlingen)
UVB-Quelle	TL T12 20W/12 G13 RS	Philips (Hamburg)
UVC-Filter	Kodacell	Eastman Kodak (Rochester, NY)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Ort
Adenin	Sigma	Steinheim
Annexin-V-FITC	Clontech Laboratories Inc	Kalifornien (USA)
Aqua dest	B. Braun	Melsungen
Calciumchlorid Dihydrat	Roth GmbH	Karlsruhe

2. Material und Methoden

Choleratoxin	Sigma	Steinheim
Dimethylsulfoxid	Roth GmbH	Karlsruhe
DMEM	gibco life technologies	Grand Island, NY
DMSO	Fluka	München
EDTA (Titrplex III)	Merck	Darmstadt
Ethanol vergällt	Lohmann Laborservice	Seevetal
FKS 522D (5%)	Bichrom	Berlin
Guava® ViaCount® Reagent	Merck Millipore	Darmstadt
HAMs F12	Sigma	Steinheim
h-EGF	PromoKine	Heidelberg
Hydrocortison	Sigma	Steinheim
Insulin	Sigma	Steinheim
Kaliumchloridlösung 3N	Roth GmbH	Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumacetat wasserfrei	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth GmbH	Karlsruhe
PBS Tabletten	gibco life technologies	Grand Island, NY
Penicillin/Streptomycin	Sigma	Steinheim
Propidiumjodid	Sigma	Steinheim
Proteinase K	Sigma	Steinheim
RNAse A	Sigma	Steinheim
Roti®-Block 10 x	Roth GmbH	Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Merck	Darmstadt
Triton® X- 100	Sigma	Steinheim
Trypsin	Biochrom	Berlin

2.1.3 Gebrauchs- und Pufferlösungen

Bezeichnung	Ansatz
Annexininkubationspuffer	0,24 g 10 mM HEPES, 0,82 g 140 mM NaCl, 0,074 g 5 mM CaCl ₂ in Aqua dest lösen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, bei 4 °C lagern

2. Material und Methoden

EDTA 0,1 % in PBS -/-	1 g Titriplex III in 1000 ml PBS -/- lösen auf pH 7,3 einstellen, Lagerung bei 4 °C
Einfriermedium	7 ml FKS freies Medium, 1mL DMSO und 2 ml FKS mischen, steril filtrieren
Guava ViaCount	fertige Lösung von Merck Millipore, Lagerung bei 4 °C
HAMS F12	12,6 g HAMS F12, 1,176 g NaHCO ₃ in Aqua dest. lösen, pH auf 7,3 einstellen, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
Markierungslösung (Annexin)	95 µl Annexininkubationsuffer mit jeweils 2,5 µl Annexin-V-FITC und PJ (50 µg/ml) mischen
HCl (2 N)	60 ml 1 0N Salzsäure 1:10 verdünnen mit Aqua dest auf 90 ml auffüllen
Natrium Acetat Puffer	82,03 mg Natriumacetat in 1000 ml Aqua dest lösen
PBS -/-	2 Tabletten PBS in 1000 ml Aqua dest lösen, auf pH 7,3 einstellen, evtl steril filtrieren
PBS +/-	0,05 g MgCl ₂ + 6x H ₂ , 2 Tabletten PBS, 0,132 g CaCl ₂ + 2 x H ₂ O in 1 l Aqua dest lösen pH auf 7,3 einstellen, evtl. steril filtrieren
Propidiumjodid (1 mg/ml)	2,6 mg PJ Pulver in 2,6 ml PBS -/- lösen, Lagerung bei 4 °C
Proteinase K (5 µg/ml)	Proteinase K Stammlsg. 1:10 in PBS +/- oder Aqua dest verdünnen, Lagerung bei -21 °C
Proteinase K Stammlösung (50 µg/ml)	25 mg Proteinase K in 50 ml PBS +/- oder Aqua dest lösen, Lagerung bei -21 °C

2. Material und Methoden

RNAse Stammlösung (0,1 %)	0,1 g RNAse A in 80 ml Natrium Acetat Puffer lösen, 15 min bei 100 °C erwärmen, pH auf 7,4 einstellen, mit Natriumacetat Puffer auf 100 ml auffüllen, Lagerung bei -21 °C
Roti®-Block/ Triton® X-100	20 ml Roti®-Block 10 x, 250 µl Triton® X-100 in 180 ml Aqua dest lösen
Trypsin (0,1 %)	0,5 g Trypsin Pulver, 1,3 g tri-Natrium-Citrat-Dihydrat, 3 g NaCl, 0,1 g Titriplex III, 5 ml Pen/Strep in 500 ml Aqua dest lösen, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Goat Anti Mouse FITC (sekundär)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.	West Baltimore Pike, USA
Mouse Anti CPD Klon TDM-2 (primär)	COSMO BIO CO., LTD.	Tokyo, Japan

2.1.5 Nährmedien

Bezeichnung	Ansatz
DMEM (Dulbecco's Mod. Eagle Medium)	13,38 g DMEM Pulver 3,7 g NaHCO ₃ 10 ml Pen/Strep in 1 l Aqua dest. Lösen auf pH 7,0 einstellen, steril filtrieren vor Gebrauch 10 % FKS zugeben Lagerung bei 4 °C, Verwendung bei 37 °C
FAD (HAMs F12/DMEM)	375 ml DMEM (+ 1 % Pen/Strep))

125 ml HAM's F12
25 ml FKS 522D (5 %)
500 μ l Adenin (milchig)
5 μ l h-EGF
23 μ l Hydrocortison
500 μ l Insulin
5 μ l Cholera toxin
Steril filtrieren
Lagerung bei 4 °C, Verwendung bei Raumtemperatur

2.1.6 Zelllinien

2.1.6.1 SCC-Zelllinien- MET-1, MET-2, MET-4

Die verwendeten Zelllinien MET-1, MET-2 und MET-4 entstammen einer Serie epidermaler Plattenepithelkarzinome (Squamous Cell Carcinoma oder SCC) eines einzigen Patienten. Dieser war 45 Jahre alt, immunsuppressiert und nierentransplantiert. Die isolierten Zelllinien stammen aus einem primären SCC der linken Handoberfläche (MET-1), einem Rezidiv derselben Stelle (MET-2) und einer Metastase der Lymphknoten (MET-4). In Betracht dessen können die Zelllinien MET-1 bis MET-4 als Anschauungsmodell einer sequenziellen Reihe maligner Transformationen eines SCCs verwendet werden (Proby et al., 2000). Keine der Zelllinien weist eine *p53*-Mutation auf (Popp et al., 2000).

2.1.6.2 HaSk-pw

Als Kontrolle zu den untersuchten SCC Zelllinien wurde die Zelllinie HaSk-pw (human adult skin keratinocytes – *p53* wildtype) verwendet. Hierbei handelt es sich um spontan immortalisierte, nicht tumorigene, Keratinozyten, die aus menschlichem Gewebe kultiviert wurden. Die Zelllinie ist nicht aneuploid und besitzt den *p53*-Wildtyp. Die Zellen stammen aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg und wurden von Professor Boukamp zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Software

Zur Verarbeitung der im Flusszytometer gemessenen Daten wurde das Programm GuavaSoft von Merck Millipore und das Open Source Programm Flowing Software verwendet. Die grafische Darstellung der Messwerte und die Erstellung beziehungsweise Auswertung der Regressionslinien erfolgte mit Sigma Plot.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Passagieren und Ablösen

Das Medium in der Flasche wird abgesaugt und 0,1 prozentiges EDTA zugegeben. Nach Zugabe von EDTA und einer kurzen Einwirkzeit (MET-Zellen 6- 8 min, HaSkpw 8-10 min) wird 0,1 prozentiges Trypsin auf die Zellen gegeben und erneut für 3 bis 4 min (MET-Zellen) beziehungsweise 4 bis 6 min (HaSkpw) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden durch Klopfen der Flasche oder mit einer Pasteurpipette vereinzelt. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wird durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Anschließend werden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Kulturflaschen (75 cm²) mit $1,2 \times 10^6$ Zellen (HaSk-pw) beziehungsweise 5×10^5 Zellen (MET-Zellen) oder Petrischalen (21 cm²) mit 5×10^5 Zellen eingesät. Die Kulturbedingungen betragen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung in Kulturflaschen ca. eine Woche und in Petrischalen drei bis vier Tage.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen

Einfrieren:

Am Vortag des Einfrierens bekommen die Zellen einen Mediumwechsel. Am Folgetag werden die Zellen nach Protokoll abgelöst (s. *Material und Methoden-Passagieren und Ablösen*), ausgezählt und die totale Zellzahl errechnet. Nach 10 minütiger Zentrifugation der Zellen bei 200 g werden diese in frisch angesetzten Einfriermedium resuspendiert und auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension wird in Einfriertubes überführt und die Zellen jeweils

30min bei 4 °C, -20 °C und -72 °C langsam runtergekühlt. Anschließend wird bei -196 °C in Stickstoff gelagert.

Auftauen:

Pro aufzutauendem Tube wird ein 15 ml Röhrchen mit 10 ml des entsprechenden Mediums befüllt. Währenddessen wird das gefrorene Tube zügig im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension im vorgelegten Medium verdünnt. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 200 g zentrifugiert, in etwas Medium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

2.2.2 UV-Bestrahlung

Für die Bestrahlung mit UVB werden Philips TL12/20 W UVB-Lampen verwendet. Die Bestrahlungsquelle setzt sich aus zehn nebeneinander angeordneten Leuchtstoffröhren zusammen, die eine homogene Bestrahlungsfläche von ca 20 cm² bieten. Bestrahlt wird mit einem Abstand von 29 cm zur UV-Quelle, was in einer Bestrahlungsintensität von ca. 4 W/m² resultiert. Strahlung unterhalb von 290 nm wird durch Verwendung eines Celluloseacetat-Filters vollständig herausgefiltert. Ein Emissionsspektrum, das unter Bestrahlungsbedingungen aufgenommen wurde, zeigt die wellenlängenabhängige Bestrahlungsstärke (Abbildung 2.1.). Abgebildet sind die mit dem Spektralradiometer gemessenen Rohwerte und die CIE-gewichteten Werte.

Die CIE-Wichtung wird von der internationalen Beleuchtungskommission (auf fra. Commission Internationale de l'Éclairage=CIE) festgelegt und dient der Bewertung der schädlichen Wirksamkeit von UV-Strahlung für die Haut. Dabei wird die Induktion des Erythems der Haut bei verschiedenen Wellenlängen als Bezugspunkt gewählt. Diese zeigt eine relativ hohe Übereinstimmung mit der Induktion anderer biologischer Endpunkte wie CPDs oder das Auftreten von SC-Cs (SSK, 2008). Die CIE-gewichteten Werte von Abbildung 2.1. werden durch Multiplikation der gemessenen Bestrahlungsstärke mit einem vom CIE festgelegten Wichtungsfaktor errechnet.

Anhand der gemessenen Kennlinie ist ersichtlich, dass die bei der Quelle physikalisch, also ungewichtet, ein großer UVA-Anteil (315 bis 400 nm) vorhanden

ist.. Bei Betrachtung der CIE-gewichteten Bestrahlungsstärke wird jedoch deutlich, dass die Bestrahlungsstärke der UVA-Strahlung nur ca. 2 % der gesamten Bestrahlungsstärke im CIE-gewichteten Bereich ausmacht (Tabelle 2.6.).

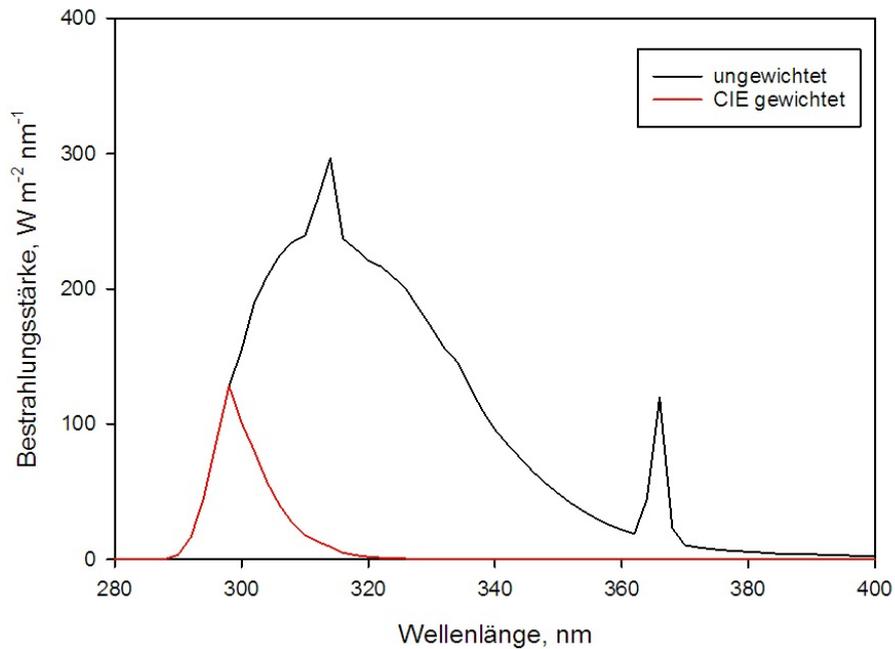


Abbildung 2.1: Das Emissionsspektrum der verwendeten UVB-Quelle TL12 wurde mit einem Spektralradiometer aufgenommen. Die schwarze Linie stellt die ungewichteten Bestrahlungswerte dar, während die rote Linie die mit dem CIE-Faktor multiplizierten Werte abbildet. Quelle: Eigene Daten des Labor für molekulare Zellbiologie

Tabelle 2.6: Bestrahlungsstärke von UVA und UVB der UVB-Quelle TL12 und Gegenüberstellung der CIE-gewichteten und ungewichteten Werte

Bereich	Bestrahlungsstärke (un- gewichtet), W/ m ²	Betrahlungsstärke (CIE gewichtet) W/ m ²
UV (280 bis 400 nm)	10,336	1,278
UVB (280 bis 315 nm)	4,431	1,255
UVA (315 bis 400 nm)	5,906	0,023

Bevor eine Bestrahlung mit der UVB-Quelle möglich ist, ist eine Einbrennzeit von einer Stunde notwendig, bis die Quelle eine konstante Bestrahlungsstärke erreicht hat. Die Zellen werden mit PBS +/- gewaschen und ohne Deckel auf Eis bestrahlt. Der Celluloseacetatfilter wird direkt über den Zellen positio-

niert. Die verabreichte UV-Dosis entspricht dem Produkt aus Bestrahlungsstärke (W/m^2) und Bestrahlungszeit (s), mit der Maßeinheit J/m^2 angegeben.

Alle durchgeführten Bestrahlungen werden mit einer Dosis von $300 J/m^2$ durchgeführt, was einer Bestrahlungsdauer von 1 Minute und 8 Sekunden entspricht.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine (quantitative) Analyse verschiedenster Partikel wie z.B. Zellen, Proteinen, Peptiden oder DNA und erlaubt es diese nach ihren (physikalischen und molekularen) Eigenschaften zu differenzieren. Das Prinzip beruht auf der Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder der Verwendung von Farbstoffen, die beispielsweise mit der DNA interkalieren.

In diesem Versuch wird das guava easyCyte Durchflusszytometer System von Merck Millipore verwendet. In diesem werden die Zellen während der Analyse durch eine sehr dünne Kapillare geleitet, in der sie einzeln an einem blauen (488 nm) und einem roten (640 nm) Dioden-Laser vorbeigeführt werden (Abbildung 2.2.).

Zur Analyse der physikalischen Eigenschaften einer Zelle wird das, von der Zelle emittierte Streulicht von einem Photomultiplier und einer Photodiode detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC=Forwardscatter) dient als Maß für die Beugung des Laserstrahls wenn dieser frontal auf die Zelle trifft und hängt direkt von der Größe der Zelle ab. Je größer die Zelle ist, desto stärker wird Vorwärtsstrahl gebeugt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=Sidescatter) dient als Maß für die Granularität und Größe und wird im 90° Winkel zum einfallenden Laserlicht detektiert. Je größer eine Zelle ist und je mehr Vesikel sie beinhaltet, desto größer ist auch das emittierte Seitwärtsstreulicht.

Neben der Streulichtmessung können vor allem Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Verwendet werden dabei Farbstoffe die an bestimmte Bestandteile der Zelle binden. Farbstoffe wie Propidiumjodid oder DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol) interkalieren in DNA und können Aufschluss über den DNA-Gehalt einer Zelle geben. Ebenfalls verwendet werden verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper, die meist gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet

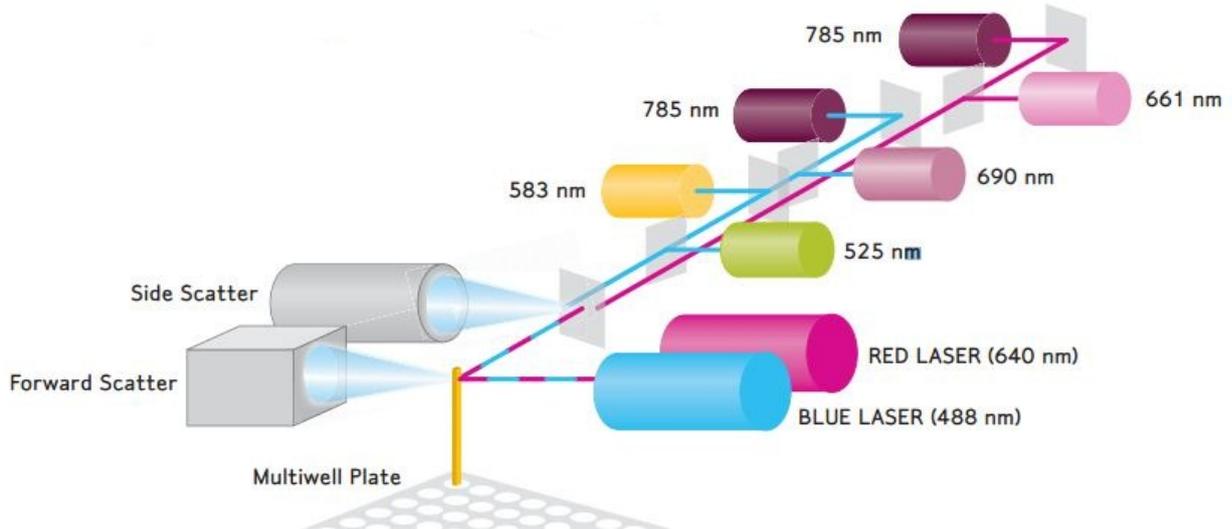


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des verwendeten Durchflusszytometers. Die zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Zellen werden perlenschnurartig durch eine sehr dünne Kapillare geleitet, wo sie durch einen roten und/oder einen blauen Laser angeregt werden. Die von der Zelle emittierten Signale werden jeweils über einen Photomultiplier und eine Photodiode für eine bestimmte Wellenlänge detektiert. Quelle: EMD Millipore Corporation

sind. Der Farbstoff wird über einen Laser mit geeigneter Wellenlänge angeregt und detektiert. Die Stärke des emittierten Lichts korreliert dabei mit der Anzahl gebundener Antikörper.

Die Auswertung der mit dem Flusszytometer ermittelten Daten erfolgt zum einen mit dem Open Source Programm Flowing Software und zum anderen mit GuavaSoft der Firma Merck Millipore. Im Rahmen der Auswertung können die Zellen auf zweierlei Arten dargestellt werden: In einem Dot-Plot werden die Zellen mit den entsprechenden Signalintensitäten der x- und y-Achse als einzelner Punkt dargestellt. Typischerweise werden SSC und FSC gegeneinander aufgetragen, um aus der entstandenen Punktwolke die Zellpopulation mit den gewünschten Eigenschaften für eine weitergehende Analyse auszuwählen (Abbildung 2.3.).

Eine andere Möglichkeit der Darstellung von Messdaten ist in Form eines Histogramms, in dem die Signalstärke gegen die Häufigkeit aufgetragen wird. Bei einer Zellpopulation mit einer relativ homogenen Signalverteilung wäre ein dennoch schmaler Peak zu erwarten.

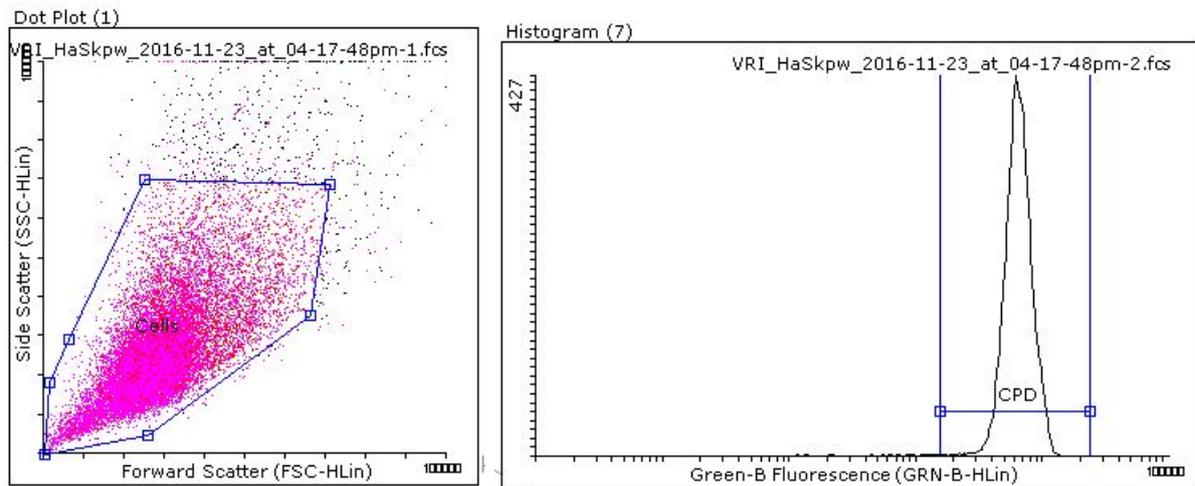


Abbildung 2.3: Links: Darstellung eines Dot-Plot-Diagramms. Jeder Datenpunkt stellt eine Zelle dar, die mit ihren entsprechenden SSC- und FSC-Signalstärken als Punkt eingezeichnet ist. **Rechts:** Histogramm mit Häufigkeitsverteilung der, mit FITC angefärbten Zellen. Bei den ausgewerteten Zellen handelt es sich um HaSk-pw, die für einen CPD-Nachweis angefärbt wurden. Die Darstellungen stammen aus dem Programm Flowing-Software. Quelle: Eigene Daten

Eine Auswertung besteht in der Regel aus mehreren Dot-Plots und Histogrammen, die dazu genutzt werden, nur bestimmte Zellpopulationen auszuwerten. Die gewünschte Population wird über das Anlegen einer Region (Gate) ausgewählt. Soll im folgenden Dot-Plot beziehungsweise Histogramm nur mit dieser Population weiter gearbeitet werden, wird das Gate des vorherigen Plots übernommen, der Plot wird auf diese Zellen "gegatet".

2.2.4 CPD-Nachweis

Der Nachweis von CPDs in HaSk-pw und MET-Zelllinien sollte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung festgestellt werden. Gewählt wurden dafür die Zeitpunkte 0 h, 2 h, 6 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h und 168 h nach Bestrahlung. Zudem wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle jeweils nach 0 und 168 h abgelöst. Diese werden verwendet um das Hintergrundsignal der Antikörperfärbung zu ermitteln. Für den Versuch werden alle Zellen mit 300 J/m^2 UVB bestrahlt und anschließend bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert (außer für den Zeitpunkt 0 h). Nach den jeweiligen Inkubationszeiten werden die Proben abgelöst und mit Ethanol fixiert. Die Fixierung mit Ethanol bewirkt die Denaturierung von

Proteinen unter Wasserentzug. Durch die fehlende Hydrathülle kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrücken, wodurch die Tertiärstruktur der Proteine zerstört wird. Auf diese Weise werden innerhalb der Zelle Zellorganellen zerstört, Nukleinsäuren bleiben jedoch erhalten. Durch die Fixierung wird eine Reparatur der induzierten DNA-Schäden oder Autolyse der Zelle verhindert. Die Proben können somit bei -20 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt angefärbt werden. Die einzelnen Fixierungsschritte wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Zellen nach vorgegebener Inkubationszeit ablösen (s. *Material und Methoden- Zellkulturtechnik*)
- nach Trypsinieren Zellen mit Gummischaber von der Petrischale ablösen und mit einer Mikropipette vereinzeln, 1 ml Medium zugeben, um die Reaktion abzustoppen
- 15 ml Zentrifugenröhrchen entsprechend beschriften, Zellsuspension überführen und 8,5 ml Medium zugeben
- 10 min bei 200 g zentrifugieren
- Überstand absaugen, Pellet auflockern und 10 ml PBS +/- zum Waschen zugeben, Zellen zählen
- 10 min bei 200 g zentrifugieren
- unter Vortexen 70 % Ethanol (eisgekühlt) hinzupipettieren und auf 10^6 Zellen pro ml einstellen
- Lagerung bei -20 °C über Nacht

Im Rahmen der Anfärbung ist es notwendig die Zellmembran zunächst zu permeabilisieren, um ein Eintreten des Antikörpers in das Zellinnere zu gewährleisten. Triton-X-100 ist als nichtionisches Tensid in der Lage Proteine aus der Zellmembran herauszulösen, ohne diese zu denaturieren. Da der verwendete Antikörper nur an Einzelsträngige DNA binden kann, wird HCl verwendet um

die bestehenden Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen aufzulösen. Anschließend werden mithilfe von Proteinase K DNA-bindende Proteine verdaut, um DNA-Schäden für den Antikörper besser zugänglich zu machen.

Der verwendete CPD-Antikörperklon TDM-2 ist das Produkt eines Hybridoms aus fusionierten Myelomzellen und Splenocyten der Maus, welches mit UVC-bestrahlter Kälber-Thymus-DNA immunisiert wurde. Er ist in der Lage an jede Art entarteter Dipyrimidin Sequenz (TT, TC, CT, CC) zu binden, solange ein Oligonukleotid von mindestens acht Basen vorliegt. Unter Inkubationsbedingungen von 37 °C bei 30 min wird der Antikörper im Hybridisierungssofen inkubiert. Nach gründlichem Waschen wird der FITC markierte Sekundärantikörper unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die DNA mit Propidiumjodid (PJ) angefärbt, einem Farbstoff, der mit der DNA interkaliert. Mithilfe der DNA-Anfärbung ist es bei der Flusszytometeranalyse möglich, innerhalb der Zellzyklus-Darstellung Zellen der G₁-Phase (mit einfachem DNA-Gehalt) zu selektieren. Zuletzt werden die Zellen im Flusszytometer gemessen. Die einzelnen Anfärbungsschritte sind im Folgenden beschrieben. Alle Zentrifugationsschritte wurden 8 min bei 1300 g durchgeführt.

- Permeabilisierung
 - nach Fixierung der Zellen 500 µl TBS 1 x in beschrifteten Tubes vorlegen
 - 500 000 Zellen (0,5 ml in die jeweiligen Tubes geben und gut mischen), zentrifugieren
 - 1 ml Roti-Block zugeben und 10 min bei RT inkubieren, zentrifugieren
- DNA-Denaturierung:
 - 1 ml 2 N HCl zugeben und 10 min bei RT inkubieren, zentrifugieren
- Waschen
 - mit 1 ml Roti Block waschen, zentrifugieren
 - mit 1 ml PBS +/- waschen, zentrifugieren

- Proteinverdau
 - 200 μ l Proteinase K (5 μ l/ml in PBS +/+), 10 min bei 37 °C inkubieren
- Waschen
 - mit 1 ml PBS +/+ waschen, zentrifugieren
 - 2 x mit 1 ml Roti Block waschen, zentrifugieren
- Färbung mit Primärantikörper:
 - 200 μ l Mouse Anti CPD (1 μ l/ml in Roti Block) zugeben
 - Inkubation 30 min bei 37 °C bei 600 rpm
 - Zentrifugation
- Waschen
 - 3 x mit 1 mL Roti Block waschen, zentrifugieren
- Färbung mit Sekundärantikörper
 - 200 μ l Goat Anti Mouse FITC (15 μ g/ml in Roti Block) zugeben
 - Inkubation 30 min bei 37 °C bei 600 rpm
 - Zentrifugation
- Waschen
 - 3 x mit 1 mL Roti Block waschen, zentrifugieren
- Anfärbung der DNA im Zellkern:
 - 497 μ l 0,01 % RNase (in PBS -/-) zugeben
 - 3 μ l PJ Lösung (1 mg/ml) zugeben, 5 min bei RT im Dunkeln inkubieren
 - mit 40 μ m Falcon Filter filtrieren
 - Messung im Flusszytometer

2.2.5 Apoptose-Messung mit Annexin V

Für die Anfärbung apoptotischer Zellen wird der Farbstoff Annexin V der Firma Cloneteck verwendet. Zu Beginn der Apoptose wird das an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindliche Phosphatidylserin (PS) nach außen gerichtet. Annexin V ist ein Protein, welches spezifisch an PS bindet. Durch die Konjugation mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC können apoptotische Zellen im Flusszytometer dargestellt werden.

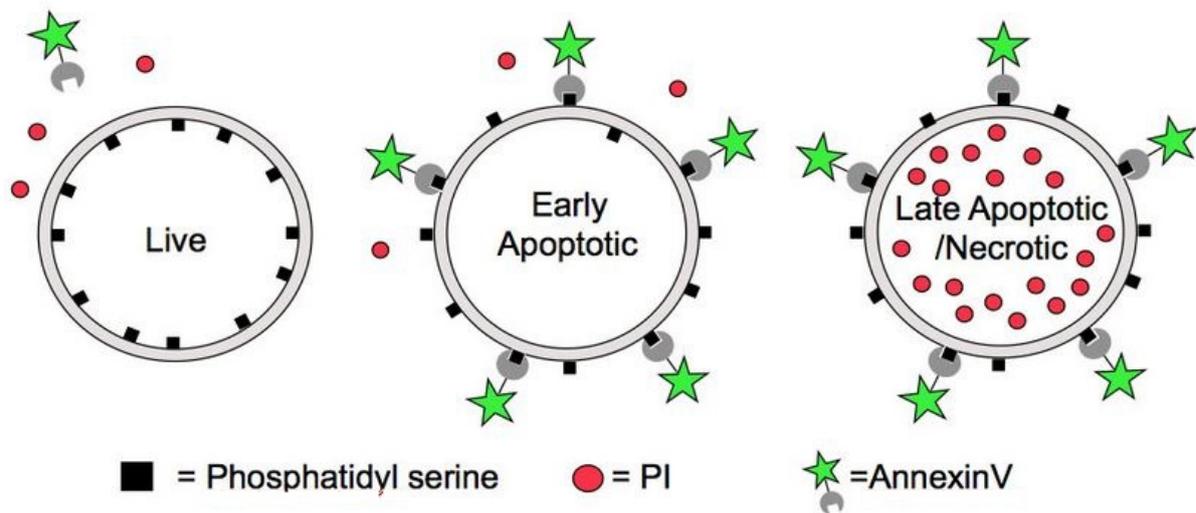


Abbildung 2.4: Der Assay mit fluorescein-konjugiertem Annexin V erlaubt die Differenzierung von lebendigen, frühapoptotischen und nekrotischen Zellen. Annexin V kann nur an das PS apoptotischer und nekrotischer Zellen zu binden, während das PS vitaler Zellen im Inneren der Zelle verborgen ist. Die Unterscheidung von frühapoptotischen und nekrotischen/spätapoptotischer Zellen erfolgt über die Anfärbung mit PI, einem Farbstoff der nur die poröse Membran nekrotischer/spätapoptotischer Zellen überwinden kann. Quelle: University of Dundee

Um Frühapoptotische von Spätapoptotischen und nekrotischen Zellen abgrenzen zu können, ist der Ausschluss über die Anfärbung mit PI sinnvoll, welches nur beschädigte Zellmembranen durchqueren kann. Im Flusszytometer ist anschließend eine Differenzierung zwischen lebendigen Zellen mit sehr niedrigem PI und FITC-Signal, apoptotischen Zellen mit geringem PI- und hohem FITC-Signal und nekrotischen beziehungsweise spätapoptotischen Zellen mit hohem FITC- und PI-Signal möglich (Abbildung 2.4.).

Für den Versuch werden die Zellen zuvor mit 300 J/m^2 UVB bestrahlt und für 24 h, 48 h, und 72 h im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach den jeweiligen Zeitpunkten werden die Zellen nach Protokoll abgelöst (s. *Material und Methoden- Zellkulturtechnik*). Es ist bekannt, dass das Ablösen der Zellen die Annexin-Färbung negativ beeinflussen kann. Das verwendete Trypsin beeinflusst die Membran-Integrität und kann somit zum Eindringen von PJ oder Annexin in die Zelle führen. Zudem wird für die Annexin-Bindung essentielles Ca^{2+} durch die Behandlung mit EDTA komplexiert. Um entsprechende Hintergrundsignale zu bestimmen wurde zu jedem Zeitpunkt eine unbestrahlte Kontrolle parallel zur bestrahlten Probe mit Annexin und PJ angefärbt.

Nach dem Ablösen wird die Zellsuspension 10 min bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Pellett in 10 ml PBS +/- aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wird das Pellett in 2 ml PBS +/- resuspendiert. Daraus werden 250 000 Zellen in ein 1,5 ml Tube überführt und dann für 8 min bei 1300 g zentrifugiert. Danach werden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ Markierungslösung resuspendiert und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss werden $100 \mu\text{l}$ Annexin-Inkubationspuffer zugeben und diese Zellen im Flusszytometer gemessen.

2.2.6 Viabilitäts-Messung mit Guava ViaCount

Der Assay Guava ViaCount zum Nachweis vitaler Zellen von Merck Millipore beruht auf dem Einsatz zweier Farbstoffe, die sich durch ihre Membrangängigkeit unterscheiden. Ein roter, membrangängiger Farbstoff ist in der Lage alle Zellen mit DNA-Gehalt, vital oder nicht, einzufärben. Der andere, orangene Farbstoff kann nur in die Zelle gelangen, wenn die Membran porös ist. Zelldebris oder Zellen ohne DNA werden nicht angefärbt. Somit erscheinen vitale Zellen rot und beschädigte oder tote Zellen rot und orange.

Genau wie bei der Apoptose-Messung wurden die Zellen zuvor mit 300 J/m^2 UVB bestrahlt und anschließend für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Da die Ablöse mit Trypsin und EDTA zu einer künstlichen Zunahme der toten Zellpopulation beitragen kann, wird auch für jeden Zeitpunkt eine unbestrahlte Kontrolle

angefärbt.

Das Protokoll der Zellpräparation ist dem vorherigen Abschnitt (*Apoptose- Messung mit Annexin V*) zu entnehmen. Statt der Markierungslösung wird das Zellpellett nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 225 μ l Guava ViaCount Reagenz resuspendiert und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Messung im Flusszytometer durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Reparatur UV-induzierter CPD in MET-Zelllinien und HaSk-pw

Zur Analyse der Reparaturleistung in den verwendeten Tumorzellen und der Kontroll-Zelllinie wurde die Reparatur UVB induzierter CPDs über einen Zeitraum von 168 h beobachtet. Hierfür wurden CPDs durch Bestrahlung mit 300 J/m^2 UVB induziert. Anschließend wurden die induzierten Schäden mit dem CPD-spezifischen Antikörperklon TDM-2 immunhistochemisch nachgewiesen. Um homogene, zellzyklus-unabhängige CPD-Signale zu erhalten, wurden im Rahmen der Flusszytometeranalyse nur Zellen der G_1 -Phase verwendet (siehe *Material und Methoden- CPD-Nachweis*). Die Hintergrundfärbung wurde durch Mittelung der CPD-Signalen zweier unbestrahlter Kontrollen der Zeitpunkte t_{0h} und t_{168h} ermittelt und vom CPD-Signal der bestrahlten Probe abgezogen. Die Restschäden, die in diesem Zeitraum ermittelt wurden, sind bei Auftragung gegen die Reparaturzeit (in Stunden) aufgetragen worden. Die Reparatur der CPDs konnte in Form einer nichtlinearen Regression an eine Kinetik erster Ordnung angenähert werden:

$$N(t) = (N_0 - N_\infty)e^{-\frac{t}{\tau}} + N_\infty \quad (4)$$

Dabei entspricht $N(t)$ dem reparierten Schaden, N_0 dem induzierten Schaden zum Zeitpunkt t_{0h} direkt nach Bestrahlung und N_∞ dem Restschaden zum Zeitpunkt t . Die Reparaturzeitkonstante τ dient als Maß für die zeitliche Reparaturleistung und gibt an, zu welchem Zeitpunkt t noch 36,8 % ($\hat{=} \frac{1}{e} \cdot 100$ %) vom induzierten Ausgangsschaden vorhanden sind. Die ermittelten CPD-Signale wurden normiert, indem der gemessene CPD-Schaden in prozentualer Anhängigkeit vom induzierten Ausgangsschaden bestimmt wurde.

3. Ergebnisse

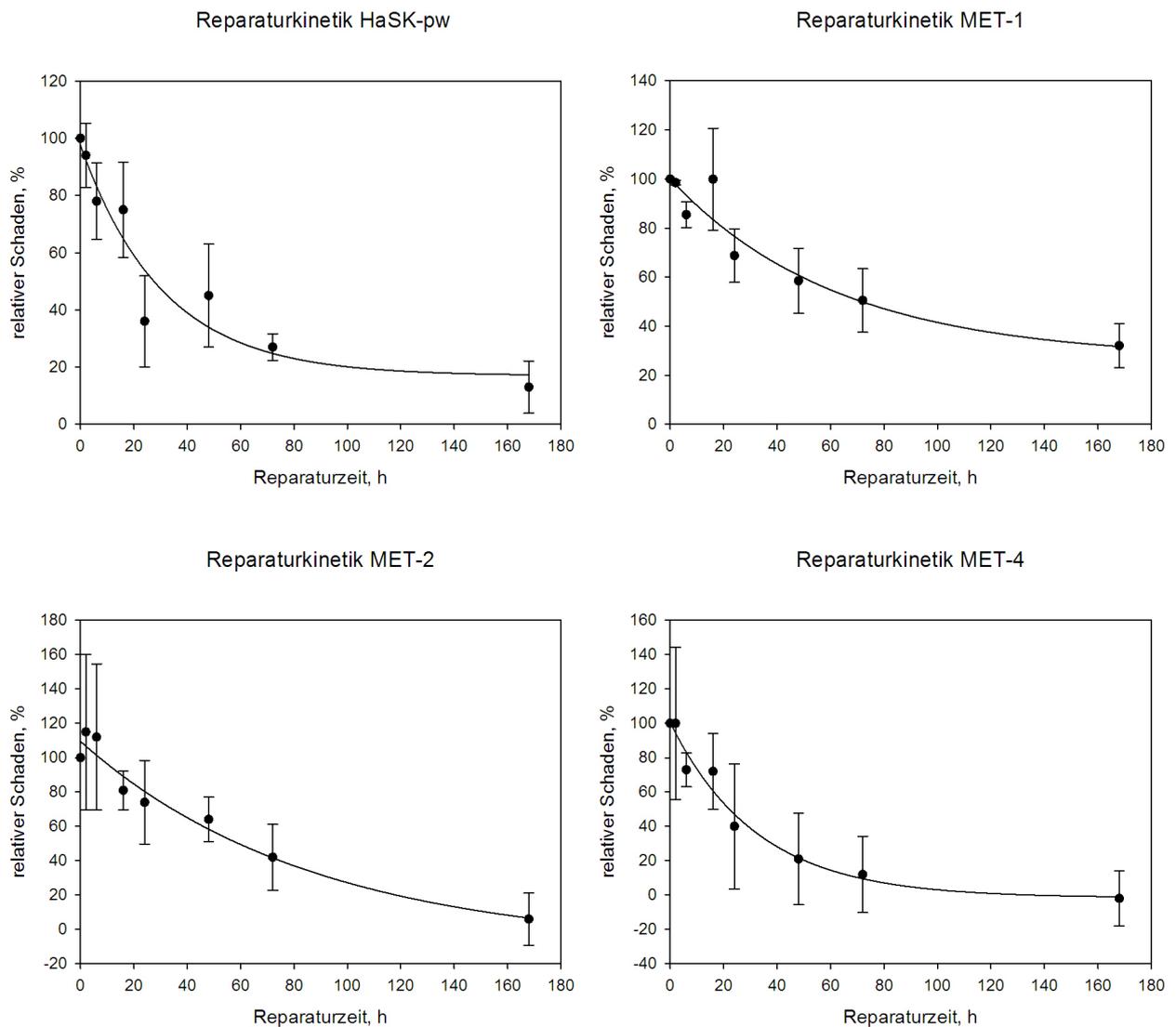


Abbildung 3.1: Kinetiken der Reparatur UV-induzierter CPDs in der Kontroll-Zelllinie HaSk-pw und den Tumorzelllinien MET-1, MET-2 und MET-4. Die gemessenen CPD-Schäden wurden relativ zum induzierten Schaden prozentual dargestellt. Die Standardabweichungen resultieren aus der Mittelung von vier unabhängig durchgeführten Versuchsreihen.

Tabelle 3.1: Reparaturzeitkonstanten und Restschäden der untersuchten Zelllinien

Zelllinie	Reparaturzeitkonstante τ , h	Restschaden, %
HaSk-pw	31 ± 12	13
MET-1	63 ± 29	32
MET-2	86 ± 33	6
MET-4	33 ± 7	-2

In Abbildung 3.1. sind die Kinetiken der CPD-Reparatur nach Bestrahlung mit UVB aller untersuchten Zelllinien abgebildet. Verglichen mit den tumorigenen Zelllinien MET-1 und MET-2 ist die nicht tumorigene Zelllinie HaSk-pw mit einer Reparaturzeitkonstante von 31 h relativ schnell in der Lage die induzierten UV-Schäden zu reparieren. Eine vollständige Reparatur der induzierten Schäden kann jedoch nicht beobachtet werden. Nach 168 h sind noch 13 % der Anfangsschäden vorhanden.

Der Primärtumor MET-1 hat mit 63 h die zweithöchste Reparaturzeitkonstante. Er benötigt doppelt so lang wie die Kontroll-Zelllinie um die induzierten Schäden zu reparieren. Zudem hat er von allen Zelllinien die höchste prozentuale Anzahl an Restschäden. Nach 168 h sind noch ungefähr ein Drittel der induzierten Restschäden vorhanden.

Bei dem Rezidiv MET-2 ist die Reparaturzeitkonstante mit 86 h fast dreifach so hoch wie in HaSk-pw. Besonders auffällig ist jedoch, dass trotz der langsamen Reparatur nach 168 h kaum noch Restschäden vorhanden sind.

MET-4, die Lymphknotenmetastase repariert mit einer Reparaturzeitkonstante von 33 h ähnlich schnell wie HaSk-pw und ist zudem in der Lage innerhalb von 168 h alle induzierten Schäden zu reparieren.

3.2 UVB-induzierte Apoptose in MET-Zelllinien und HaSk-pw

Da die Induktion von DNA-Schäden mit dem Eintreten von Apoptose in UVB bestrahlten Zellen zusammenhängt, sollte in diesem Versuch herausgefunden werden, welchen Einfluss die verwendete UVB-Dosis auf die Tumor- und die Kontroll-Zelllinie hat.

Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte über Anfärbung von Phosphatidylserin, welches vermehrt auf der Membran-Außenseite apoptotischer Zellen lokalisiert ist. Die Trennung von frühapoptotischen und spätapoptotischen beziehungsweise nekrotischen Zellen geschah über den Farbstoff PJ. Die Auswertung der Zellen im Flusszytometer ist in Abbildung 3.2. dargestellt.

Aufgrund des Einflusses von EDTA und Trypsin (siehe *Material und Methoden-Apoptose-Messung mit Annexin V*) auf das Anfärben der Zellen, wurde parallel

zu jeder bestrahlten Probe eine unbestrahlte Kontrolle angefärbt.

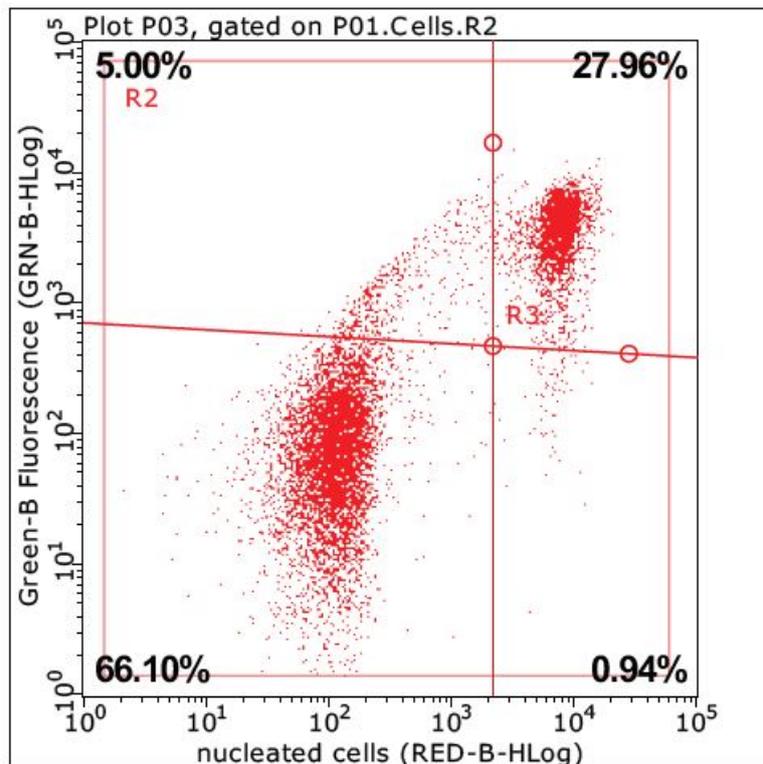


Abbildung 3.2: Darstellung einer Auswertung der Apoptose-Messung mittels guavaSoft. Aufgetragen ist das grüne Annexin-Signal gegen das rote PJ-Signal. Die vitalen Zellen sind im Quadranten links unten abgebildet, die frühapoptotischen Zellen mit hohem Annexin-Signal links oben. Die spätapoptotischen und nekrotischen Zellen mit hohem PJ-Signal befinden sich im oberen rechten Quadranten. Abgebildet sind unbestrahlte HaSk-pw. Quelle: Eigene Daten

In Abbildung 3.3. ist der Anteil frühapoptotischer Zellen in bestrahlten (300 J/m^2 UVB) und unbestrahlten Zellen dargestellt. Untersucht wurden die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung.

Der Anteil frühapoptotischer Zellen ist in allen Zelllinien eher gering. Jedoch wird deutlich, dass durch UVB-Bestrahlung der Anteil frühapoptotischer Zellen zu allen drei Zeitpunkten in MET-1 und MET-2 verdoppelt bis verfünffacht wird. Bei MET-4 ist dies nach 24 h und 48 h zu sehen. In HaSk-pw hingegen ist kein Einfluss der UVB-Strahlung auf Induktion von Apoptose zu erkennen. Teilweise sind die ermittelten Differenzen signifikant, sodass trotz der geringen Apoptoseraten eindeutige Strahlen induzierte Effekte nachgewiesen werden konnten.

3. Ergebnisse

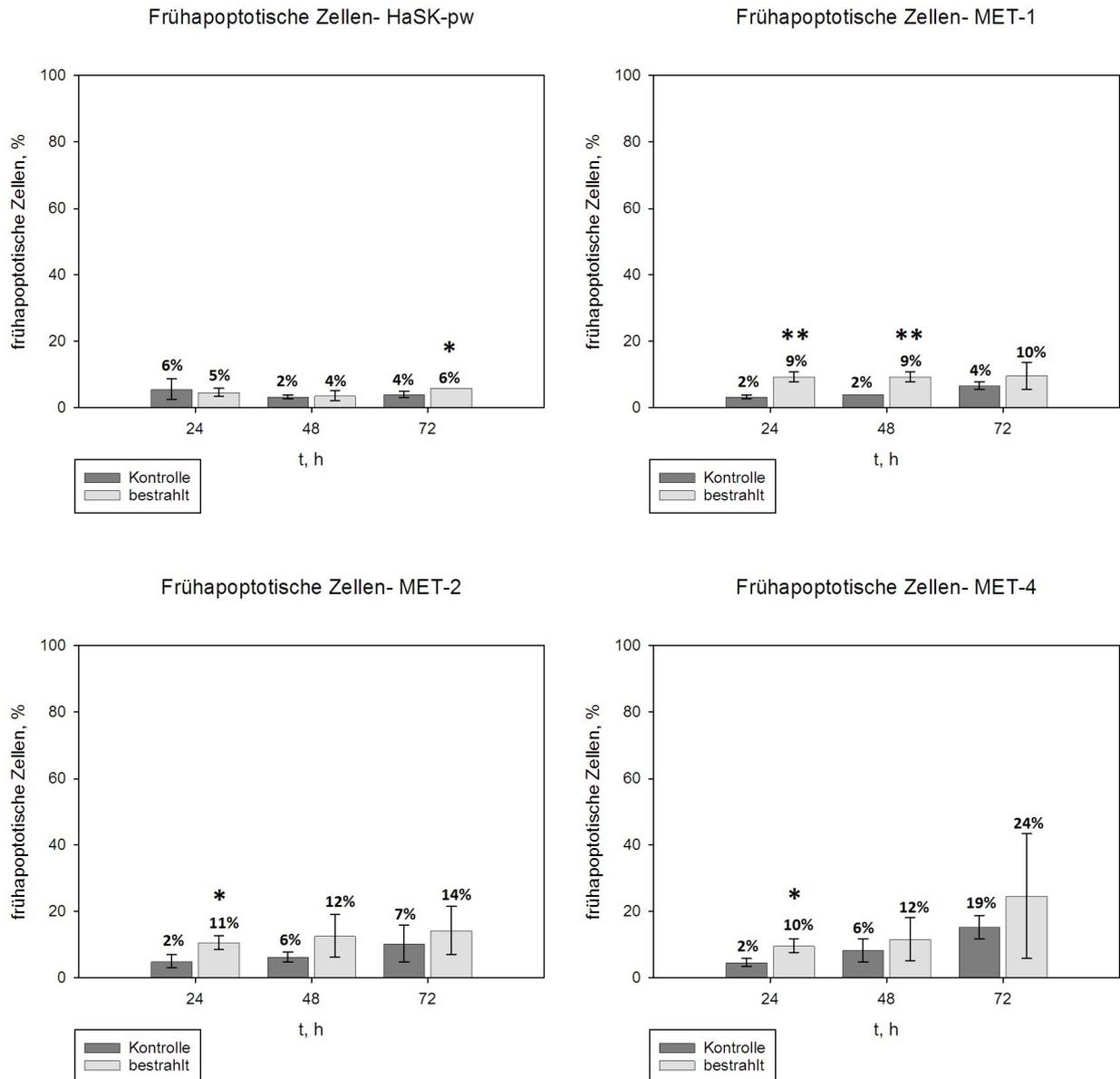


Abbildung 3.3: Vergleich induzierter Apoptose in UVB-bestrahlten und unbestrahlten MET-Zelllinien und HaSk-pw. Dargestellt ist der Anteil frühapoptotischer Zellen, die mit dem Fluoreszenz-konjugierten Annexin V markiert sind, jedoch kaum PJ-Signal aufweisen. Die Standardabweichungen resultieren aus der Mittelung von drei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen. Sterne über den Balken repräsentieren signifikanten Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$).

Da Zellen nur einen sehr kurzen Zeitpunkt in einem frühapoptotischen Stadium verweilen, ist der prozentuale Anteil frühapoptotischer Zellen sehr gering. Aufgrund dessen wurden in Abbildung 3.4. die Anteile der frühapoptotischen und spätapoptotischen/nekrotischen Zellen zusammengefasst und prozentual

3. Ergebnisse

zur gesamten Zellpopulation dargestellt. Beim Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander fällt auf, dass bei UVB-bestrahlten MET-1 und MET-2 bereits nach 24 h mehr apoptotische Zellen vorhanden sind als bei den Kontrollen, während bei HaSk-pw und MET-4 dies erst nach 72 h der Fall ist.

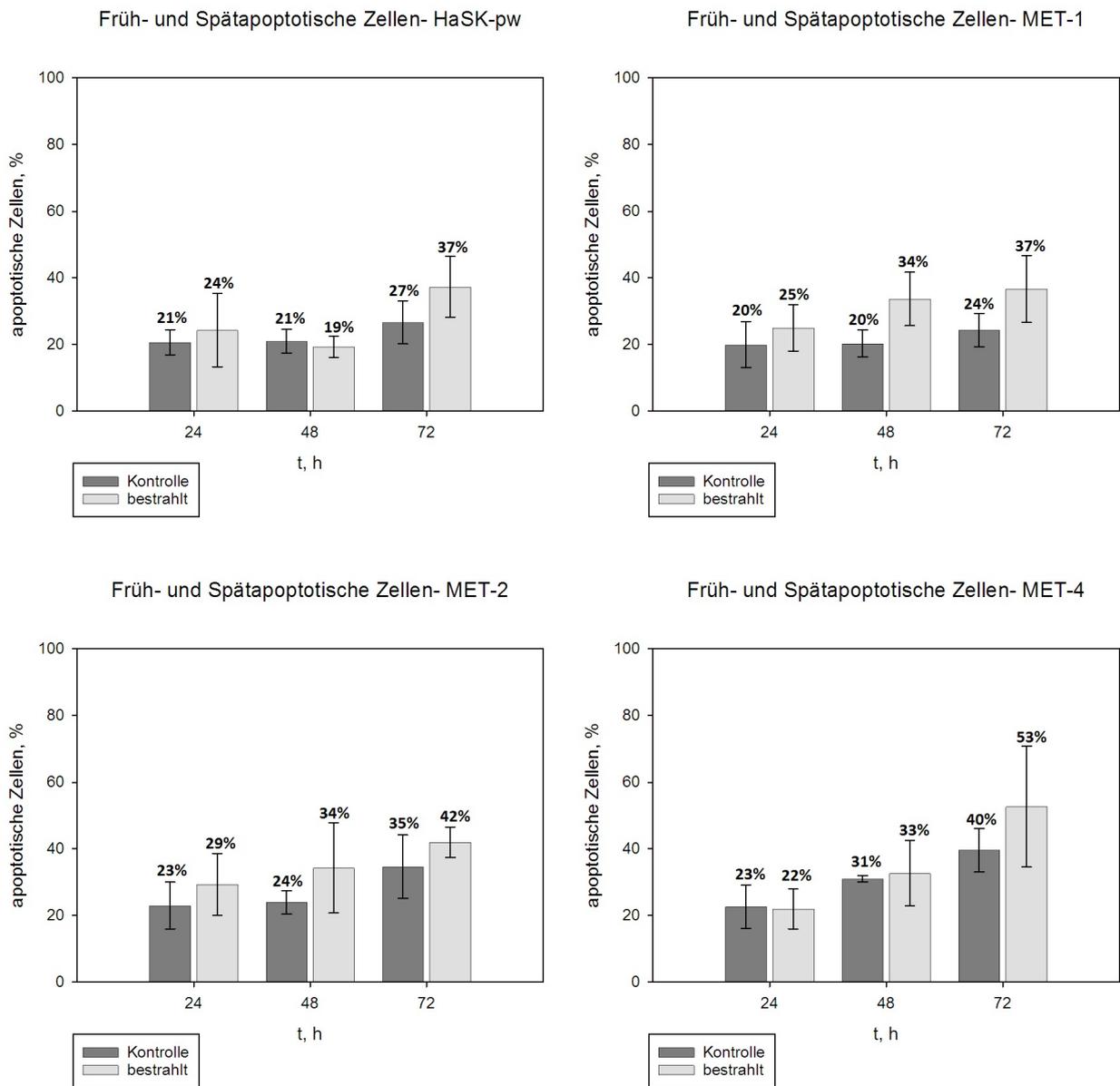


Abbildung 3.4: Vergleich induzierter Apoptose in UVB-bestrahlten und unbestrahlten MET-Zelllinien und HaSk-pw. Dargestellt ist der Anteil frühapoptotischer und spätapoptotischer Zellen, die sowohl mit dem Fluoreszenz-konjugierten Annexin V markiert sind, als auch ein hohes PJ-Signal aufweisen. Die Standardabweichungen resultieren aus der Mittelung von drei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen.

3.3 Untersuchung der Viabilität von MET-Zelllinien und HaSk-pw nach UVB-Bestrahlung

Die Viabilitätsmessung mit guava ViaCount sollte zeigen, welchen Einfluss 300 J/m² UVB auf die Viabilität der verwendeten Zelllinien hat und ob ein Unterschied der Sensitivität der einzelnen Zelllinien gegenüber der Bestrahlung zu erkennen ist. Für die Messung der Viabilität wurden dieselben Zellen verwendet, die im Rahmen des Apoptose-Nachweises angefärbt wurden. Ähnlich wie bei der Apoptose-Messung wurden parallel nicht bestrahlte Kontrollen angefärbt. In Abbildung 3.5 ist eine exemplarische Auswertung der vitalen Zellen im Flusszytometer dargestellt.

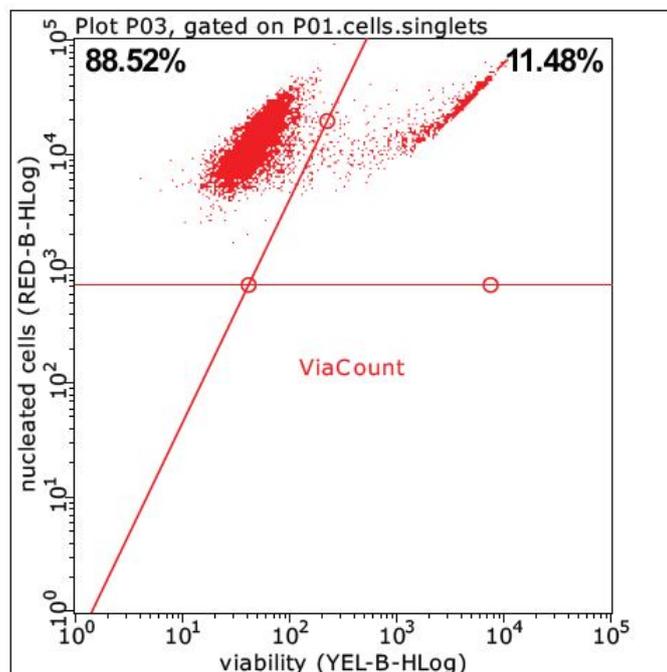


Abbildung 3.5: Darstellung der Auswertung vitaler Zellen im Flusszytometer mit guavaSoft. Aufgetragen ist das rote Signal des membrangängigen Farbstoffs, der alle Zellen (die DNA enthalten) anfärbt gegen den orangen Farbstoff, der nur in Zellen mit geschädigter Membran eindringt. Die vitalen Zellen befinden sich demnach links oben. Abgebildet sind nicht bestrahlte HaSk-pw. Quelle: Eigene Daten

Da mit dem Clonotech-Assay für die Apoptose-Messung ebenfalls eine Darstellung der Zell-Viabilität möglich ist, werden die vitalen Zellpopulationen, die mit beiden Methoden ermittelt wurden, verglichen. Auf diese Weise kann geprüft werden, ob und welchen Einfluss die Selektion apoptotischer Zellen auf das

3. Ergebnisse

Ergebnis der Viabilitäts-Messung hat.

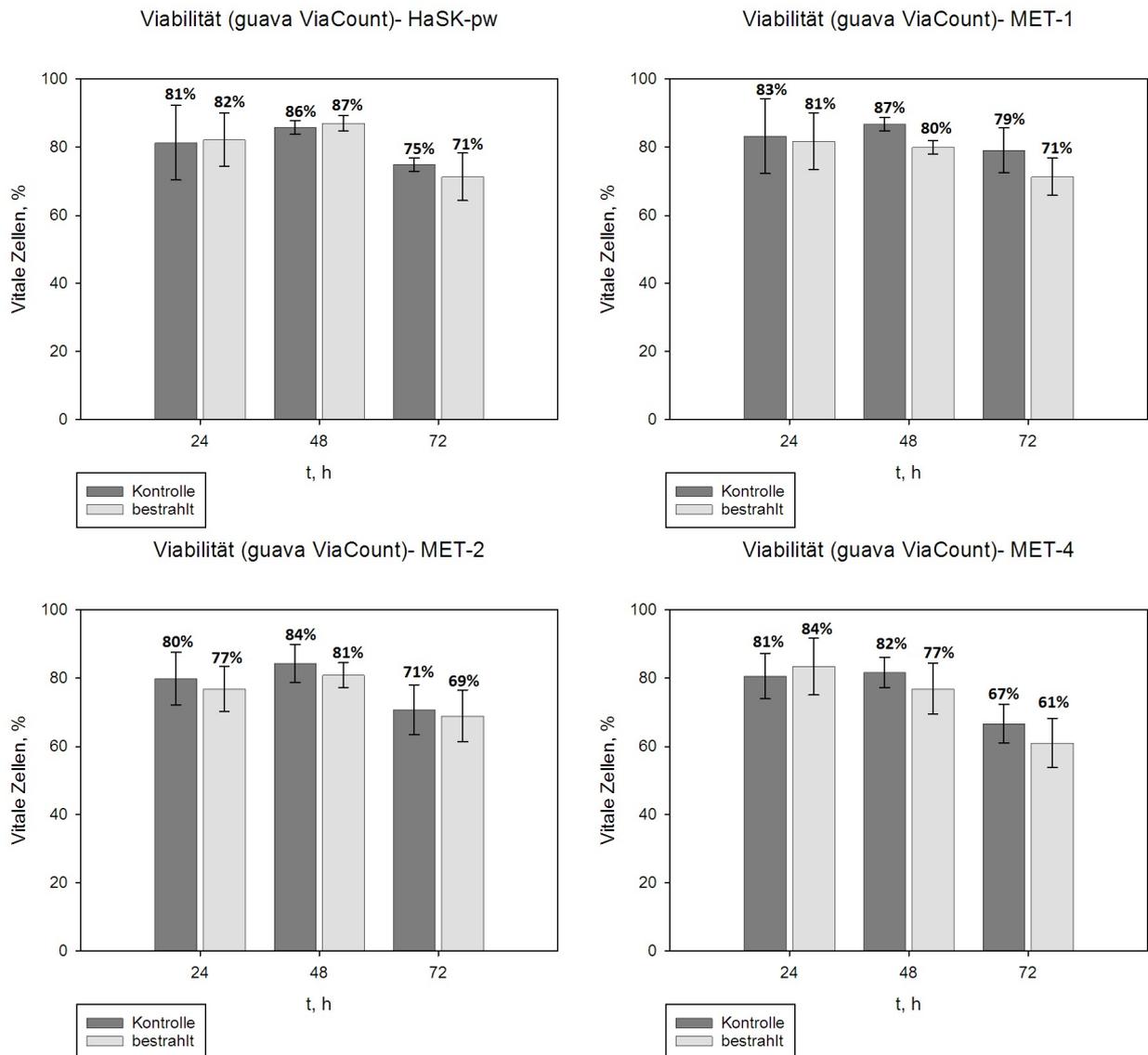


Abbildung 3.6: Vergleich der Viabilität von UVB-bestrahlten und unbestrahlten MET-Zelllinien und HaSk-pw. Dargestellt ist der Anteil vitaler Zellen, die mit 300 J/m^2 UVB bestrahlt wurden im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Messung erfolgte mit dem guava ViaCount-Assay. Die Standardabweichungen resultieren aus der Mittelung von drei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen.

In Abbildung 3.6. ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen dargestellt, der durch die Messung mit dem Assay von guava ViaCount ermittelt wurde. Im Vergleich der bestrahlten Zellen mit den Kontrollen wird deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede im Überleben der Zellen festgestellt werden kann. Allerdings fällt auf, dass in allen Zelllinien eine Abnahme der Viabilität nach 72 h auftritt.

3. Ergebnisse

Da dies aber ebenfalls in der Kontrolle zu beobachten ist, kann ein strahlungsbedingter Effekt ausgeschlossen werden.

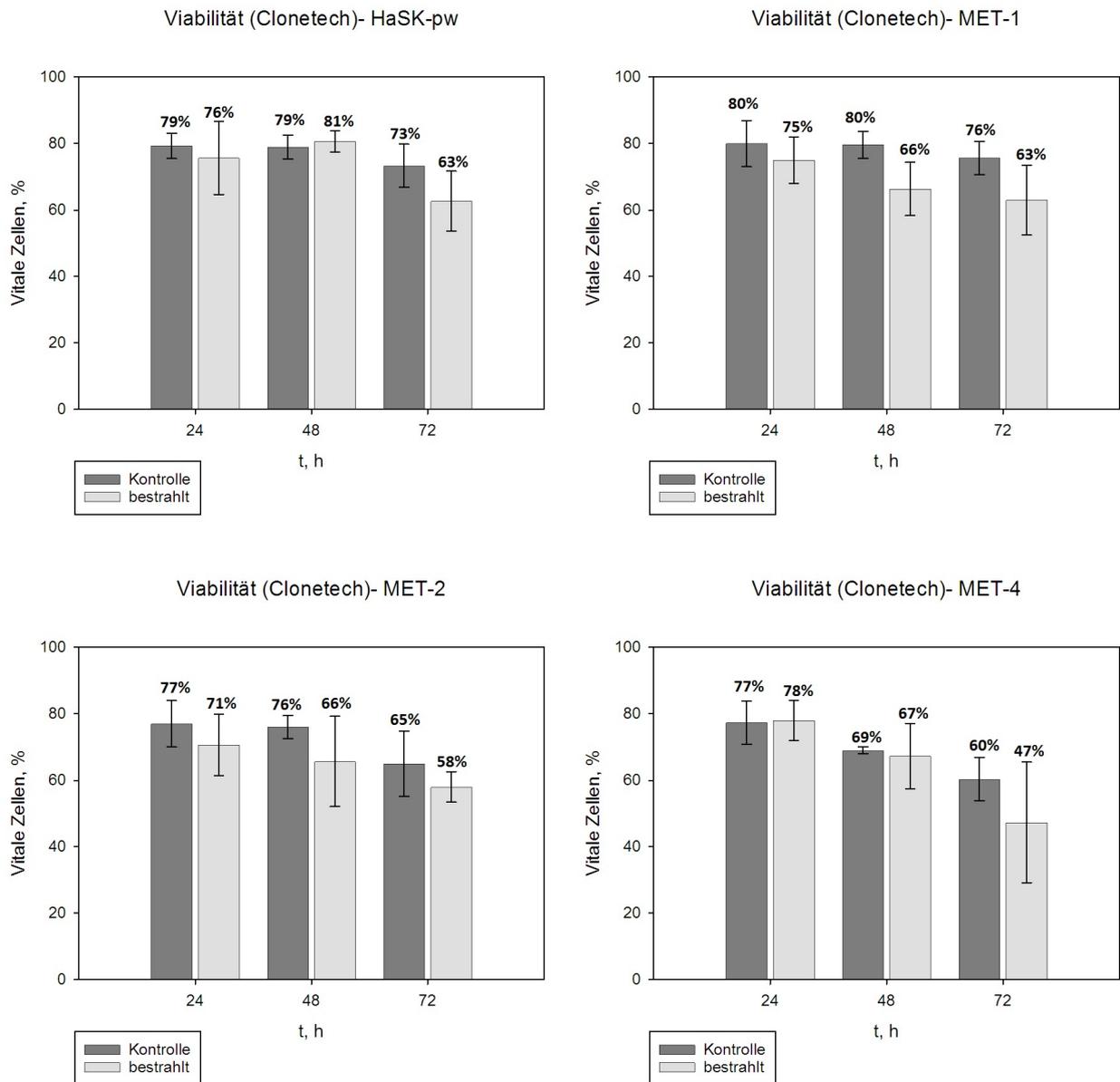


Abbildung 3.7: Vergleich der Viabilität von UVB-bestrahlten und unbestrahlten MET-Zelllinien und HaSk-pw. Dargestellt ist der Anteil vitaler Zellen, die mit 300 J/m^2 UVB bestrahlt wurden im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Daten entstammen der Apoptose-Messung mit dem Clonotech-Assay. Die Standardabweichungen resultieren aus der Mittelung von drei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen.

In Abbildung 3.7. sind die vitalen Zellen der Apoptose-Messung abgebildet. Hier wird der Einfluss der zusätzlichen Selektion apoptotischer Zellen deutlich. Im Gegensatz zur ViaCount-Methode treten die Unterschiede zwischen Kontrol-

le und bestrahlten Zellen etwas stärker auf. Die dargestellten Balken entsprechen dem Anteil vitaler Zellen, der nach Abzug des prozentualen Anteils früh- und spätapoptischen Zellen übrig bleibt. Bei MET-1 und MET-2 können schon ab 24 h eine Reduktion der vitalen Zellen in den bestrahlten Proben festgestellt werden, während dies bei MET-4 und HaSk-pw erst nach 72 h auftritt.

4 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, die etablierten, tumorigenen SCC- Zelllinien untereinander zu vergleichen und in Gegenüberstellung einer nicht tumorigenen, etablierten Keratinozyten-Zelllinie zu betrachten. Dabei sollte die Reparatur UV-induzierter CPDs als Gegenstand dieses Vergleichs dienen.

Da das Auftreten von SCC-Tumoren stark mit einer Defizienz im NER-Pfad korreliert, wird die verminderte Reparatur von UV-induzierten Schäden als einer der grundlegenden, molekularen Mechanismen bei der Entstehung von Hautkrebs angesehen (Reichrath und Rass, 2014). Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass sich die betrachteten SCC-Tumor-Zelllinien in ihrer Reparaturleistung deutlich von der gesunden, nicht tumorigenen Zelllinie unterscheiden. Zu erwarten wäre, dass die UVB-induzierten CPDs in MET-Zelllinien schlechter repariert werden als in HaSk-pw.

Bei der Untersuchung der Reparatur von CPDs in den tumorigenen Zelllinien und der nicht tumorigenen Zelllinie (Abbildung 3.1.) hat sich herausgestellt, dass der Primärtumor MET-1 im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie HaSk-pw deutlich langsamer reparierte und zudem von allen betrachteten Zelllinien den höchsten Anteil Restschaden aufwies. Das Rezidiv MET-2 reparierte noch langsamer als MET-1, behielt jedoch kaum Restschaden zurück. Im Gegensatz zu MET-1 und MET-2 reparierte die Metastase MET-4 als aggressivstes und fortgeschrittenstes Stadium des Tumor-Modells ähnlich schnell wie die Kontroll-Zelllinie und eliminierte zudem alle Restschäden.

Da es bezüglich der MET-Zelllinien noch relativ wenige Untersuchungen gibt, ist die große Differenz in der Reparaturleistung in MET-4 und den anderen MET-Zelllinien, nicht eindeutig zu erklären. Allerdings konnten Popp et al., 2000 im Rahmen einer genetischen Analyse wesentliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten auf chromosomaler Ebene feststellen. Die, für diese Arbeit bedeutendste Gemeinsamkeit betraf den chromosomalen Abschnitt 3p, der funktional relevant für die Entstehung von Hautkrebs ist. Zwischen dem Verlust von 3p und dem Verlust der Expression des NER-relevanten Proteins XPC (s. *Einleitung- Reparaturmechanismen*) besteht eine eindeutige Korrelation. Die fehlende Expression des XPC als essentieller Erkennungssensor für DNA-Schäden führt unweigerlich zu einer Defizienz der globalen Genom-Reparatur, infolgedessen die allgemeine Reparaturkapazität herabgesetzt werden kann (Feraudy et al., 2010). Bei der genetischen Charakterisierung konnte in allen Zelllinien ein Verlust des Abschnitts 3p nachgewiesen werden. Der Befund kann zwar eine Erklärung dafür sein, dass MET-1 und MET-2 im Gegensatz zur nicht tumorigenen Zelllinie HaSk-pw langsamer reparieren, es kann dadurch jedoch nicht geklärt werden, warum MET-4 sich von den anderen beiden SCC-Zelllinien in der Reparaturleistung abgrenzt. Der signifikanteste genetische Unterschied zwischen MET-4 und den anderen beiden Tumor-Zelllinien ist eine hohe Anzahl chromosomaler Zugewinne, die vermutlich auf der Polyploidie von MET-4 beruhen (Popp et al., 2000). Da die hohe Anzahl an Zugewinnen die Expression vieler Gene beeinflussen kann, ist nicht auszuschließen, dass die bessere Reparaturleistung auf die Polyploidie von MET-4 zurückzuführen ist.

Mithilfe der Daten des Clonotech-Assays konnte ein Effekt der UVB-Strahlung auf Induktion der Apoptose und Zell-Viabilität nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der frühapoptotischen Zellen aus Abbildung 3.3. kann in den MET-Zelllinien eine Vervielfachung der apoptotischen Zellen durch Bestrahlung beobachtet werden, während die Kontroll-Zelllinie keinen Effekt aufwies. Abbildung 3.4. zeigt, dass bei bestrahlten MET-1- und MET-2-Linien nach 24 h einen höherer Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen vorliegt als bei nicht

bestrahlten Zellen. Bei MET-4 und HaSk-pw hingegen, konnte eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen in den bestrahlten Proben erst nach 72 h ermittelt werden.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass in MET-1 und MET-2 ein Strahlungs bedingter Effekt schneller auftritt, als in MET-4 und HaSk-pw. Dass MET-1 sensitiver gegenüber UVB-Strahlung ist als MET-4, ist auch in anderen Arbeiten bei einer höheren UVB-Dosis eindeutig beobachtet worden. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass dies ebenfalls mit einer früheren Aktivierung der Apoptose-Mechanismen in Verbindung zu bringen ist (Barrette et al., 2013). Oft geht der Erwerb von Mutationen und die Entstehung von Hautkrebs mit einem defekten oder eingeschränkten Apoptose-Mechanismus einher (Erb et al., 2005). Dass die Zellantwort in den SCC-Zelllinien MET-1 und MET-2 nach Bestrahlung schneller ausfällt als in HaSk-pw, ist aus diesem Grund nicht erwartet worden. Allerdings muss die Entstehung der Tumore, aus denen die MET-Zelllinien isoliert wurden, nicht zwingend mit einer defekten Apoptose-Maschinerie zusammenhängen. Auch konnten bei der genetischen Charakterisierung keine typischen Apoptose-hemmenden Faktoren, wie eine Mutation in *p53* oder die Inhibierung dieses Gens durch das Papilloma-Virus, gefunden werden (Popp et al., 2000; Proby et al., 2000).

Die untersuchten SCC-Zelllinien als isogenes Modell des progressiven Verlaufs eines epidermalen Tumors sind einzigartig. Vor allem die Unterschiede, die nachweislich zwischen dem Primärtumor und der Metastase bestehen, sind von großer Bedeutung. Da der Erhalt und die Verbreitung tumorigener Zellen über Leben und Tod entscheiden, ist das bessere Verständnis über die genetischen Veränderungen, die damit einhergehen medizinisch sehr wertvoll. Obwohl die Zelllinien auf karyotypischer Ebene bereits ausgiebig erforscht wurden, kann keine eindeutige Aussage über die Bedeutung der ermittelten Abberationen für die phänotypische Ausprägung der einzelnen Tumoren getroffen werden. Um die genetischen Ursachen, die hinter den Unterschieden in der Reparaturleistung von Tumor und Metastase stecken, besser verstehen

zu können, könnte beispielsweise eine Expressionsanalyse der *XP*-Gene oder anderer Reparaturgene sinnvoll sein.

Literaturverzeichnis

Fachliteratur

- Armstrong, B. K. und A. Krickler (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63 (1-3), S. 8–18.
- Barrandon, Y und H Green (1987). "Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (8), S. 2302–2306.
- Barrette, K., N. Zutterman, S. V. Kelst, C. Proby und M. Garmyn (2013). "Pattern of sensitivity of progressive cutaneous squamous cell carcinoma cells to UVB and oxidative stress-induced cell death". *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (1), S. 104–110.
- Benjamin, C und H Ananthaswamy (2007). "p53 and the pathogenesis of skin cancer". *Toxicology and Applied Pharmacology* 224 (3), S. 241–248.
- Berger, U. (2009). *Diagnose Hautkrebs - Die Krankheit, ihre Ursachen und Behandlungsmethoden*. Baltic Sea Press. 92 S.
- Boer, J. de (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes". *Carcinogenesis* 21 (3), S. 453–460.
- Brash, D. E. (2015). "UV signature mutations." *Photochemistry and photobiology* 91 (1), S. 15–26.
- Cadet, J., A. Grand und T. Douki (2015). "Solar UV Radiation-Induced DNA Bipyrimidine Photoproducts: Formation and Mechanistic Insights". *Photoinduced Phenomena in Nucleic Acids II*.
- Cotter, T. G. (2009). "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field". *Nature Reviews Cancer* 9 (7), S. 501–507.

- Dizdaroglu, M. (1992). "Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin". *Mutation Research/DNAging* 275 (3-6), S. 331–342.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516.
- Erb, P., J. Ji, M. Wernli, E. Kump, A. Glaser und S. A. Büchner (2005). "Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation". *Immunology Letters* 100 (1), S. 68–72.
- Essers, J., W. Vermeulen und A. B. Houtsmuller (2006). "DNA damage repair: anytime, anywhere?" *Current Opinion in Cell Biology* 18 (3), S. 240–246.
- Feller, L., R. A. G. Khammissa, B. Kramer, M. Altini und J. Lemmerast (2016). "Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face". *Head & Face Medicine* 12 (1).
- Feraudy, S. de, K. Ridd, L. M. Richards, P.-Y. Kwok, I. Revet, D. Oh, L. Feeney und J. E. Cleaver (2010). "The DNA Damage-Binding Protein XPC Is a Frequent Target for Inactivation in Squamous Cell Carcinomas". *The American Journal of Pathology* 177 (2), S. 555–562.
- Fuchs, E. und S. Raghavan (2002). "Getting under the skin of epidermal morphogenesis." *Nature reviews. Genetics* 3 (3), S. 199–209.
- Gordon, R. (2013). "Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors". *Seminars in Oncology Nursing* 29 (3), S. 160–169.
- Greinert, R, B Volkmer, S Henning, E. W. Breitbart, K. O. Greulich, M. C. Cardoso und A. Rapp (2012). "UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages." *Nucleic acids research* 40 (20), S. 10263–10273.

- Ichihashi, M., M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru und T. Horikawa (2003). "UV-induced skin damage". *Toxicology* 189 (1-2), S. 21–39.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie und A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* 26 (4), S. 239–257.
- Kerr, J. F., C. M. Winterford und B. V. Harmon (1994). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." *Cancer* 73 (8), S. 2013–2026.
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Labas, M. D., R. J. Brandi, C. S. Zalazar und A. E. Cassano (2009). "Water disinfection with UVC radiation and H₂O₂. A comparative study." *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 8 (5), S. 670–676.
- Lavker, R. M. und T. T. Sun (1982). "Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations." *Science (New York, N.Y.)* 215 (4537), S. 1239–1241.
- Lehmann, A. R., D. McGibbon und M. Stefanini (2011). "Xeroderma pigmentosum". *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6 (1), S. 70.
- Lehmann, B. (2005). "The vitamin D₃ pathway in human skin and its role for regulation of biological processes." *Photochemistry and photobiology* 81 (6), S. 1246–1251.
- Leiter, U., R. Gutzmer, M. Alter, C. Ulrich, A. S. Lonsdorf, M. M. Sachse und U. Hillen (2016). "Kutanes Plattenepithelkarzinom". *Der Hautarzt* 67 (11), S. 857.
- Leiter, U., T. Eigentler und C. Garbe (2014). "Epidemiology of Skin Cancer". *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*. Springer.

- Li, J., T. Uchida, T. Todo und T. Kitagawa (2006). "Similarities and Differences between Cyclobutane Pyrimidine Dimer Photolyase and (6-4) Photolyase as Revealed by Resonance Raman Spectroscopy electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA". *Journal of Biological Chemistry* 281 (35), S. 25551–25559.
- Li, Y. Y., G. J. Hanna, A. C. Laga, R. I. Haddad, J. H. Lorch und P. S. Hammerman (2015). "Genomic Analysis of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma". *Clinical Cancer Research* 21 (6), S. 1447–1456.
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme Georg Verlag. 700 S.
- McDevitt, J. J., S. N. Rudnick und L. J. Radonovich (2012). "Aerosol susceptibility of influenza virus to UV-C light." *Applied and environmental microbiology* 78 (6), S. 1666–1669.
- Meves, A. (2006). *Intensivkurs Dermatologie*. Urban & Fischer/Elsevier. XIV S.
- Müller, W. (2009). *Molekulare Onkologie*. Thieme Georg Verlag. 424 S.
- Moll, I. (2010). *Duale Reihe Dermatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Nakatani, M., S. Maksimovic, Y. Baba und E. A. Lumpkin (2015). "Mechanotransduction in epidermal Merkel cells." *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 467 (1), S. 101–108.
- Pfeifer, G. P. und A. Besaratinia (2012). "UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer". *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (1), S. 90–97.
- Popp, S, S Waltering, H Holtgreve-Grez, A Jauch, C Proby, I. M. Leigh und P Boukamp (2000). "Genetic characterization of a human skin carcinoma progression model: from primary tumor to metastasis." *The Journal of investigative dermatology* 115 (6), S. 1095–1103.

- Proby, C., K. Purdie, C. Sexton, P Purkis, H. Navsaria, J. Stables und I. Leigh (2000). "Spontaneous keratinocyte cell lines representing early and advanced stages of malignant transformation of the epidermis". *Experimental dermatology* 9 (2), S. 104–117.
- Rastogi, R. P., Richa, A. Kumar, M. B. Tyagi und R. P. Sinha (2010). "Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair". *Journal of Nucleic Acids* 2010, S. 1–32.
- Rastogi, V. K., L. Wallace und L. S. Smith (2007). "Disinfection of *Acinetobacter baumannii*-contaminated surfaces relevant to medical treatment facilities with ultraviolet C light." *Military medicine* 172 (11), S. 1166–1169.
- Reichrath, J. und K. Rass (2014). "Ultraviolet damage, DNA repair and vitamin D in nonmelanoma skin cancer and in malignant melanoma: an update." *Advances in experimental medicine and biology* 810, S. 208–233.
- Romani, N., B. E. Clausen und P. Stoitzner (2010). "Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin." *Immunological reviews* 234 (1), S. 120–141.
- Rünger, T. M. und U. P. Kappes (2008). "Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA)". *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 24 (1), S. 2–10.
- Rünger, T. M., B. Farahvash, Z. Hatvani und A. Rees (2012). "Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: a less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones". *Photochemical & Photobiological Sciences* 11 (1), S. 207–215.
- Singer, S., T. Schwarz und M. Berneburg (2016). "Wirkmechanismen und Anwendungsgebiete der Phototherapie". *Phototherapie*. Springer.

Singh, K. K. (2006). *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Imperial College PR. 1084 S.

SSK (2008). *Einfluss der natürlichen Strahlenexposition auf die Krebsentstehung in Deutschland : Stellungnahme der Strahlenschutzkommission mit wissenschaftlicher Begründung. Stellungnahme der Strahlenschutzkommission mit wissenschaftlicher Begründung*. Bd. 62. H. Hoffmann GmbH- Fachverlag, Berlin.

Sterry, W. (2011). *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Thieme Georg Verlag.

Toshiyuki, M. und J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene". *Cell* 80 (2), S. 293–299.

Williams, G. T., C. A. Smith, N. J. McCarthy und E. A. Grimes (1992). "Apoptosis: final control point in cell biology." *Trends in cell biology* 2 (9), S. 263–267.

Wong, R. S. Y. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30, S. 87.

Yamaguchi, Y. und V. J. Hearing (2009). "Physiological factors that regulate skin pigmentation." *BioFactors (Oxford, England)* 35 (2), S. 193–199.

Yang, J. (1997). "Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked". *Science* 275 (5303), S. 1129–1132.

You, Y. H., D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui und G. P. Pfeifer (2001). "Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells." *The Journal of biological chemistry* 276 (48), S. 44688–44694.

Internetquellen

BAuA, o. V. zugegriffen am 23.01.17. URL: <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Optische-Strahlung/Optische-Strahlung.html>.

Dundee, o. V. University of. zugegriffen am 23.01.17. URL: www.lifesci.dundee.ac.uk/technologies/flow-cytometry-cell-sorting/techniques/cell-death-and-apoptosis.

EMD Millipore Corporation, o. V. zugegriffen am 23.01.17. URL: <https://www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/cell-analysis/guava-easycyte-flow-cytometers/Optical-Configurations/BgGb.qB.XW0AAAFRCJE.0Kwi,nav>.

Studyblue, o. V. zugegriffen am 23.01.17. URL: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/ch-6-for-test/deck/15409061>.