

Masterarbeit

Effekt von Kombinationsstrahlung (UVB+UVA+VIS+IRA) auf die DNA Schadensinduktion und Reparatur

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Studiendepartment pharmazeutische Biotechnologie**

Vorgelegt von

Benjamin Abendt

Matrikelnummer: XXXXXXXXXX

Hamburg, den 21. Februar 2019

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)**
2. Gutachter: Dr. rer. nat. Rüdiger Greinert (Elbeklinikum Buxtehude)

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

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich aussprechen, der es mir ermöglichte diese Arbeit erstellen zu können und sich auch immer die Zeit für Fragen genommen hat. Auch Frau Dr. Beate Volkmer und Herrn Dr. Rüdiger Greinert bin ich sehr zu großem Dank für die Aufnahme im Labor für molekulare Zellbiologie verpflichtet. Es war mir eine große Freude dort arbeiten zu dürfen. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. I-Peng Chen, Frau Dr. Mouna Mhamdi-Ghodbani und Herrn Dipl. Ing. Stefan Henning für die intensive Betreuung und die kompetente Beratung bedanken. Ein herzlicher Dank gilt auch dem gesamten Team (Frau Dr. Sarah Degenhardt, Christin Starzonek, Marc Bender, Stefanie Balk, Rebecca Keck, Maren Brunsen, Regina Börger-Hoppe und Sylke Engel-Haskiris), das mir die Grundlagen der Arbeit in der Zellkultur vermittelte und das mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich freue mich, dass ich in einem so überragend tollen und freundlichen Team arbeiten durfte. Ein sehr großer Dank gilt auch meiner Familie und meiner Freundin Tatjana Herman, die mich während meines Studiums immer tatkräftig und mit viel Geduld unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusatzverzeichnisse	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abstract.....	IX
1 Aufgabenstellung	1
2 Einleitung	1
2.1 Aufbau der Haut.....	1
2.2 Das solare Strahlenspektrum.....	2
2.3 Minimale Erythemdosis (MED).....	4
2.3.1 Bestrahlungsgrößen.....	5
2.4 Eindringtiefe von UVA und UVB in die Haut und die Auswirkung auf die Hautzellen	6
2.5 UV induzierte DNA-Schäden	7
2.6 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und XP-Gene.....	9
2.7 Growth Arrest and DNA damage-inducible 45 (GADD45) Gen	11
2.8 Epigenetik	12
2.9 Hautkrebs	15
3 Geräte und Materialien	17
3.1 Geräte.....	17
3.2 Reagenzien.....	17
3.3 Kits	18
3.4 Antikörper, Enzyme und Zellysate.....	18
3.5 Gebrauchslösungen und Puffer	18
3.6 Primer	18
3.7 Software.....	20
4 Methoden	21
4.1 KAUVIR-Lampe	21
4.2 Zellkultur	23

4.3	Bestrahlung der HaCaT-Zellen	24
4.4	CPD-Anfärbung	26
4.4.1	Durchflusszytometrie	27
4.4.2	Auswertung	27
4.5	Methylierung der Reparatur-Gene	29
4.5.1	Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung	29
4.5.2	Pyrosequenzierung	31
4.6	Analyse der Expression von Reparaturgenen	34
4.6.1	Reverse Transkription	34
4.6.2	Quantitative PCR	35
4.7	Statistische Analyse.....	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Dosiseffekt, Reparaturkinetik und Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten	37
5.1.1	Dosiseffekt	37
5.1.2	Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion	38
5.1.3	Reparaturkinetik.....	40
5.2	Analyse der Reparaturgenexpression	42
5.3	Methylierungsanalyse.....	44
6	Diskussion	46
6.1	Dosiseffekt	46
6.2	Einfluss unterschiedlicher Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion.....	46
6.3	Reparaturkinetik.....	48
6.4	Expression der XP-Reparaturgene und <i>GADD45A</i> nach Exposition mit verschiedenen Bestrahlungen	49
6.5	Methylierung der XP-Reparaturgene und <i>GADD45A</i> nach Exposition mit verschiedenen Bestrahlungen.....	51
7	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	54
	Eidesstattliche Erklärung.....	61

Zusatzverzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5mC	5-Methylcytosin
6-4PP	6-4 Pyrimidinpyrimidondimer
8-oxodG	8-Oxodeoxyguanin
ACTB	β-Aktin
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	Basalzellkarzinom (engl.: basal cell carcinoma)
BS-DNA	Bisulfit-behandelten DNA
CETN2	Centrin2
cDNA	Kopierte DNA (engl.: copy DNA)
CPD	Cyclobutanpyrimidindimere
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid (in 5' □ 3'-Richtung)
DDB1	DNA-Schadenbindendes Protein 1 (engl.: DNA damage-binding protein 1)
DDR	DNA Schadensantwort (engl.: DNA damage response)
DDB2	DNA-Schadenbindendes Protein 2 (engl.: DNA damage-binding protein 2)
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERCC1	DNA-Exzisionsreparaturprotein 1 (engl.: DNA excision repair protein 1)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GADD45-Gene	Wachstumsstopp und DNA-Schaden Gene (engl.: Growth Arrest and DNA Damage genes)
GGR	Globale Genomreparatur
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

HPV	Papillovirus
IRA	Infrarot
KAUVIR	Kombination statt Addition von UV, VIS, IRA
MED	Minimale Erythemdosis
MEKK alias MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl.: mitogen-activated protein kinase)
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Engl.: messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NMSC	Nicht-Melanom-Hautkrebs (engl.: Non-Melanoma Skin Cancer)
P21 (auch CDK-Inhibitor 1)	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCNA	Proliferations-Zellkern-Antigen (engl.: Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PJ	Propidiumiodid
POLH	DNA-Polymerase eta
PP _i	Pyrophosphat
qPCR	quantitativen PCR
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAPII	RNA Polymerase II
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (engl.: reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
RPA	Replikationsprotein A
SAH	Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SCC	Plattenepithelkarzinom (engl.: squamous cell carcinoma)
SEA	Sonnenwinkel (engl.: solar elevation angel)
SYBR Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
ssDNA	Einzelstrang DNA (engl.: single stranded DNA)

TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: Tris-buffered saline)
TCR	Transkriptions-gekoppelte Reparatur (engl.: transcription coupled repair)
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
UVR	Ultraviolette Strahlung
VIS	Visuelles Licht
XRCC1	Kreuzreagierendes Protein 1 (engl.: X-ray repair cross-complementing protein 1)
XP	Xeroderma Pigmentosum

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss der Wellenlängen auf verschiedene photobiologische Prozesse.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden.	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des TCR und GGR.	9
Abbildung 4: Darstellung der methylierungsinduzierten Transkriptionsinaktivierung	13
Abbildung 5: Methylierung von Cytosin.	14
Abbildung 6: Einfluss der Pigmentierung der Haut auf da Krebsrisiko.....	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung der KAUVIR-Lampe.....	21
Abbildung 8: Darstellung der Steuereinheit und Bestrahlungskammer.	22
Abbildung 9: Analyse der CPD-Schäden via Flowing Software.	28
Abbildung 10: Prinzip der Bisulfit-Konvertierung.	30
Abbildung 11: Prinzip der Pyrosequenzierung.	31
Abbildung 12: Dosiseffekt.....	37
Abbildung 13: CPD-Induktion nach unterschiedlichen Strahlenqualitäten und – Kombinationen.	39
Abbildung 14: CPD-Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen Bestrahlungen.	41
Abbildung 15: Darstellung des Expressionsmusters der XP-Gene und des <i>GADD45A</i> Gens. 43	
Abbildung 16: Expressionsmuster der XP-Gene und des <i>GADD45A</i> Gens.....	45
Abbildung 17: Addierung UVA induzierter CPD-Schäden.	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Wellenlängen und Anteile der Strahlenqualitäten.	3
Tabelle 2: Standardisierte Richtwerte der MED für verschiedene Hauttypen.....	5
Tabelle 3: Die XP-Gene, ihre Proteinfunktion und der Pathway.....	11
Tabelle 4: Bestrahlungsstärken der einzelnen und kombinierten Strahlenquellen.	23
Tabelle 5: Bestrahlungsdosen des Gesamtspektrums zur jeweiligen Bestrahlungsdauer.	24
Tabelle 6: Bestrahlungsprotokoll für die Versuche zur Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten.....	25
Tabelle 7: Bestrahlungsprotokoll für den Dosiseffektversuch.....	25
Tabelle 8: Reaktionsansatz der ersten Netsed-PCR für die Amplifizierung aller Ziel-Gene. ...	32
Tabelle 9: Nested-PCR1-Programm.....	32
Tabelle 10: Reaktionsansatz der zweiten Nested-PCR zur spezifischen Amplifikation der Ziel-Gene.....	33
Tabelle 11: Nested-PCR2-Programm.....	33
Tabelle 12: Dispersionsreihenfolge der Kandidatengene für die Pyrosequenzierung.	34
Tabelle 13: MasterMix für einen Reaktionsansatz von 20 µl.	35
Tabelle 14: Real Time quantitative PCR-Protokoll.	35

Abstract

UV radiation is the main risk factor in development of skin cancer. In addition to UV radiation, there are other types of radiation in the spectrum of solar radiation such as visible light (VIS) and infrared radiation (IRA). Therefore it is important to determine the impact of radiation qualities individual or in combination in relation to their potential to trigger biological effects like induction of DNA-damage and development of diseases especially skin cancer. This is of particular importance since e.g. for radiation protection so far, possible risk assessment has only been derived from results related to individual UV radiation qualities (UVA, UVB). Therefore, a new developed irradiation system was used (KAUVIR-Source). With this source it was possible to irradiate cells with UVA and UVB radiation as well as with visible light and infrared alone and in combination. In this work radiation experiments with HaCaT cells were done to determine induction of CPD-damage and its repair as well as changes in methylation and expression of genes involved in repair of CPDs after exposition to different radiation qualities. The investigations showed that VIS+IR have no impact in induction of CPDs. UVA in comparison to UVB induced a small but a detectable number of CPDs that added to UVB-induced CPDs upon simultaneous exposure (UVA+UVB).

The results of repair kinetics of CPDs after different radiation qualities indicate that the infrared fraction (IRA) of solar radiation has an accelerating effect on the repair kinetics of the induced CPD damage in HaCaT cells.

Since expression of genes involved in nucleotide excision repair of CPDs might have important impact on repair kinetics, the expression of the repair genes *XPA*, *XPB*, *XPC* and *XPD* and *GADD45A* was investigated. It has been shown that in the investigated genes, with the exception of *XPD*, a radiation induced response can be measured in the expression. However, this change is always associated to the UVB content in the exposure spectrum. The faster repair after UVA+UVB+VIS+IRA compared to UVB or UVA+UVB determined by the repair kinetics can therefore probably not be explained by the differential expression data of the repair genes investigated in this work alone.

Investigations in promotor methylation of genes studied in this work didn't show any significant changes in methylation. Thus they could not confirm a possible correlation between the methylation state and the expression of the genes (at least for the methylation sites in the promoters investigated here).

The results of this work, especially the IRA impact on repair kinetics of UV-induced DNA damage, could be of importance for the radiation protection of solar radiation. They show that

an important biological endpoint (the cellular repair capacity of UV-induced CPDs), which is often used to assess the risk of UV radiation, is highly dependent on the quality of the radiation. In particular IRA seems to have an important role. Previous risk assessments, which only relate to the effect of individual spectral qualities (UVA or UVB), must therefore be reconsidered again to better understand the influence of combined solar radiation. Further work is needed to explain the underlying molecular mechanisms of the IRA effect.

1 Aufgabenstellung

Die Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung unterschiedlicher biologischer Effekte nach Kombinationsbestrahlung mit dem gesamten solaren Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA) im Vergleich zu Bestrahlungen mit den Einzelkomponenten. Dazu sollten die Bestrahlungsversuche mit einer neu entwickelten Bestrahlungseinheit, der KAUVIR-Lampe, durchgeführt werden, die es erlaubt, Kombinations- und Einzelbestrahlungen mit definierten Spektren und Bestrahlungsstärken durchzuführen. Menschliche Keratinozyten (HaCaT-Zellen) sollten daher in-vitro mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten exponiert werden. Der Einfluss dieser Bestrahlungen auf die Induktion von DNA-Schäden (Cyclobutan-Pyrimidindimere, CPD), deren Reparatur, sowie auf die Expression und Methylierung von Genen, die an der enzymatischen Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden beteiligt sind (XPA, XPB, XPC, XPD und GADD45A), sollte untersucht werden.

2 Einleitung

2.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers mit einer Oberfläche von 1,5 bis 2 m². Eine wichtige Aufgabe der Haut ist es, den Körper vor der Außenwelt und äußeren Umwelteinflüssen, wie z.B. der Sonnenstrahlung, abzugrenzen sowie zu schützen. Um einen Schutz dieser Art zu ermöglichen bedarf es unterschiedlicher Zellen, Strukturen, Fasern, Gefäßen sowie deren Kommunikation untereinander (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Haut besteht aus der Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut), Subkutis (Unterhautfettgewebe) und den Adnexorganen wie Haaren, Nägeln, Talgdrüsen und Schweißdrüsen. Epidermis und Dermis können zusammen, bei einem normal gewichtigen Menschen, etwa 3 kg wiegen, mit der Subkutis sogar 15 kg. Bei der Epidermis, die vor allem für diese Arbeit relevant ist, handelt es sich um ein geschichtetes, verhornendes Plattenepithel ektodermaler Herkunft. Dabei machen die Keratinozyten einen Zellanteil von 90 % aus. Die entstehenden Schichten der verhornenden Haut werden in vier Untertypen unterschieden. Das Stratum basale (Basalschicht) bildet die unterste Schicht, weist teilungsaktive Stammzellen auf und hat direkten Kontakt zu der Basalmembran, die die Epidermis von der Dermis trennt.

Den Hauptanteil der Epidermis macht das Stratum spinosum mit polygonalen Keratinozyten aus. Darauf folgend liegt das Stratum granulosum (Körnerschicht), welches aus zwei bis drei Zelllagen besteht. Die äußerste Schicht der Epidermis bildet dann das Stratum corneum (Hornschicht). Die Hornschicht besteht aus kernlosen Keratinozyten, die durch Filaggrin, Involucrin, Loricrin und Barrierelipiden zusammen gehalten werden. Im Stratum basale werden neue Keratinozyten durch Stammzellen und weniger differenzierte Zellen durch häufige Zellteilungen gebildet. Die Keratinozyten werden durch die sich nachbildenden Zellen Schicht für Schicht nach oben gedrückt und entwickeln sich dabei durch terminale Differenzierung schließlich zu den kernlosen Keratinozyten im Stratum corneum. Die Transitzeit einer Zelle vom Stratum basale zum Stratum corneum beträgt 14 Tage und die Verweilzeit im Stratum corneum beträgt nochmal 14 Tage, bis sich die toten Zellen von der Haut lösen. So erneuert sich die Haut innerhalb von ca. einem Monat (Hamm, 2017) (Lüllmann-Rauch, 2006).

Neben den Keratinozyten befinden sich in der Epidermis auch Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkel-Zellen. Bei den Langerhans-Zellen handelt es sich um dendritische Zellen, die der Immunabwehr dienen. Sie sind in der Lage eingedrungene Fremdantigene zu erkennen und zu phagozytieren. Anschließend wandern sie in die regionalen Lymphknoten, in denen sie die Antigene nach Prozessierung naiven T-Helfer-Zellen präsentieren und somit eine Abwehrantwort induzieren. Melanozyten sind dendritische Zellen, die im Stratum basale lokalisiert sind. Ihre Hauptfunktion besteht in der Synthese von Melanin, dem wichtigsten endogenen Pigment. Für die Synthese von Melanin, der sogenannten Melanogenese, werden Tyrosine von einem Schlüsselenzym, der Tyrosinase, polymerisiert. Durch spezielle Zellorganellen, den Melanosomen, wird das Melanin über die Dendriten der Melanozyten an die Keratinozyten transferiert, um dort die Zellkerne vor UV-Strahlung zu schützen (Hamm, 2017).

2.2 Das solare Strahlenspektrum

Die Sonnenstrahlung setzt sich aus verschiedenen Wellenlängenbereichen zusammen. Dabei handelt es sich um Infrarot (IRA), sichtbares Licht (VIS), sowie die ultravioletten Strahlungen UVA, UVB und UVC. Ein großer Teil der Sonnenstrahlung wird durch die Atmosphäre gefiltert und so treffen nur etwa 30 % des Ultraviolettpektrums auf die Erdoberfläche (Dummer, 2003). UVA, UVB und UVC haben einen schädigenden Effekt auf die menschliche Haut, wobei das sehr schädliche UVC von der stratosphärischen Ozonschicht

vollständig daran gehindert wird, bis zur Erdoberfläche vorzudringen (Dunaway et al., 2018). Die Strahlung, die auf die Erdoberfläche trifft, enthält Infrarot mit 50 %, sichtbares Licht mit 44 % und UVA und UVB mit zusammen 6 % (Dummer, 2003). UVA stellt dabei den größeren Anteil (etwa 95 %) der UV-Strahlung, die auf die Erde trifft, wobei das Verhältnis, in Abhängigkeit von Geo-Orbitalen- und Umwelt-Faktoren, zwischen UVA und UVB variiert. Bei den Geo-Orbitalen-Faktoren spielen der Breitengrad, die Jahres- und Tageszeit eine Rolle. Der Sonnenhöhenwinkel (SEA, solar elevation angle), der Winkel zwischen der Sonne und dem Horizont, hat ebenfalls einen starken Einfluss auf die UV-Einstrahlung. Je höher die Sonne steht, desto höher ist der UVB-Gehalt. Zudem beeinflussen Umweltfaktoren die UV-Strahlung, wie Wolken und die Dicke der Ozonschicht, welche eine sehr hohe Auswirkung auf den UVB-Anteil, der die Erde erreicht, hat. Auch Schadstoffe, Aerosole oder die Reflektionen von UV-Strahlung von der Oberfläche ändern die Zusammensetzung oder Stärke der UV-Strahlung (Marionnet, Tricaud, & Bernerd, 2015). Die Belastung mit UV ist somit auch abhängig von dem geographischen Standort, da die Sonnenintensität an verschiedenen Orten auf der Welt sehr unterschiedlich sein kann. Die UV-Strahlen werden durch atmosphärische Partikel reflektiert und gestreut. Je dicker die Atmosphäre beschaffen ist, desto abgeschwächer treffen die Strahlen auf den Erdboden. Aus diesem Grund sind die UV-Dosen in der Nähe des Äquators, in höheren Lagen und bei schwacher Bewölkung oder weniger partikulärem Schutz höher. Die individuell empfangene UV-Dosis hängt nicht nur von der Stärke der Strahlung ab, sondern auch von anderen Faktoren, wie z.B. der Länge des Aufenthalts in der Sonne, dem Einsatz von UV-schützender Kleidung oder Sonnencreme und der Nutzung von Schatten (D’Orazio, Jarrett, Amaro-Ortiz, & Scott, 2013).

Tabelle 1: Darstellung der Wellenlängen und Anteile der Strahlenqualitäten.

Strahlentyp	Wellenlänge in nm	Anteil der Wellenlängen in %
Infrarot	700-2500	50.00
Sichtbar	400-700	44.00
UVA	320-400	5.75
UVB	295-320	0.25
UVC	200-295	0.00

2.3 Minimale Erythemdosis (MED)

Das Problem der Dosimetrie bei der Hautphysiologie ist, dass die Entstehung eines Erythems, wie auch andere photobiologische Effekte, stark Wellenlängen-abhängig ist. Also kann allein über die eingesetzte physikalische UV-Bestrahlungsdosis keine Aussage über die Konsequenzen in Form von Erythemen gemacht werden.

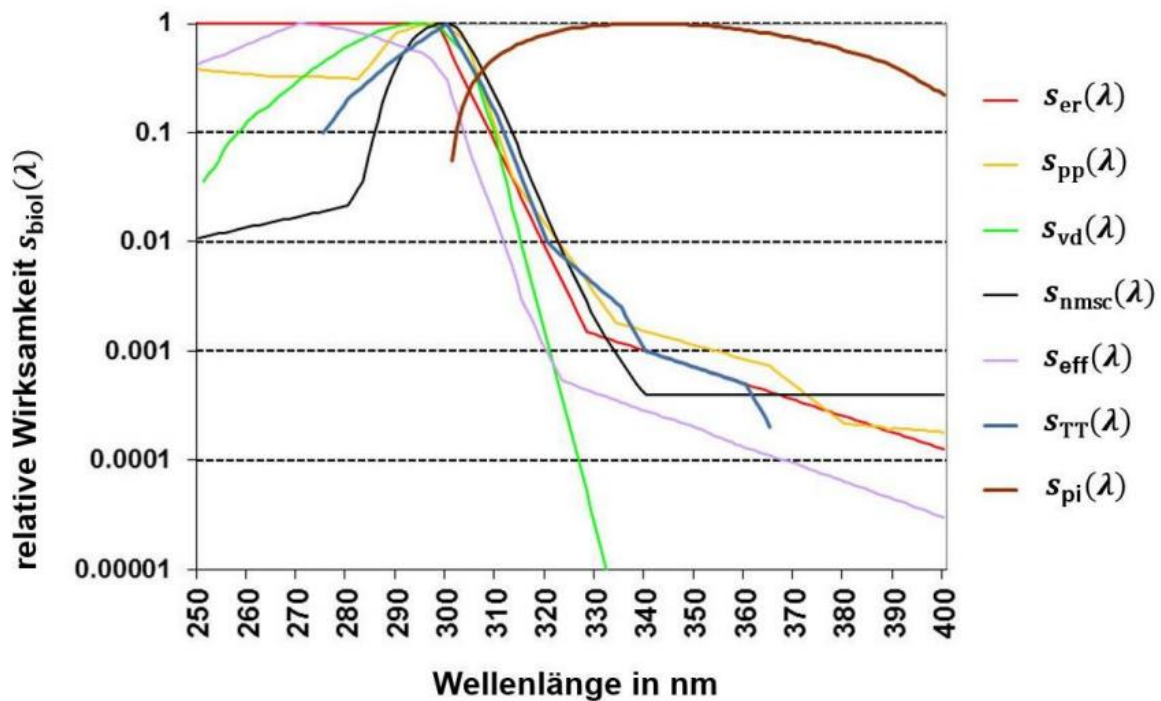


Abbildung 1: Einfluss der Wellenlängen auf verschiedene photobiologische Prozesse (Strahlenschutzkommission, 2016).

Zu sehen ist die Gegenüberstellung der relativen Wirksamkeit $S_{\text{biol}}(\lambda)$ zu den Wellenlängenbereichen. Aufgetragen sind die relativen Wirkungsfunktionen für verschiedene photobiologische Prozesse:

S_{er} : UV-Erythem

S_{pp} : persistierende Pigmentierung

S_{vd} : Bildung von Prä-Vitamin D3 aus Pro-Vitamin D3 in der Haut

S_{nmssc} : Photokarzinogenese nicht melanozytärer Hautkrebs (non-melanoma skin cancer)

S_{eff} : Gefährdung durch UV-Starhlung

S_{TT} : Ausbildung von Thymin-Dimeren

S_{pi} : Sofort Pigmentierung

An dem Aktionsspektrum zum UV-Erythem (in rot) lässt sich zeigen, dass langwellige UVB-Strahlung im Vergleich mit kurzwelliger UVB-Strahlung nur ca. 2% der Wirksamkeit in Bezug auf die Erythembildung ausmacht. Im UVA-Wellenlängenbereich liegt die Wirksamkeit in diesem Vergleich sogar im Promille-Bereich. Interessant an der der Auftragung ist, dass die anderen Aktionsspektren, wie die Ausbildung von Thymin-Dimeren (in blau) oder der Photokarzinogenese des nicht melanozytären Hautkrebses (in schwarz), einen sehr ähnlichen Verlauf annehmen. Somit ist es durch die Erythemwichtung auch möglich weitere biologische Effekte annähernd zu beschreiben.

Mit Zuhilfenahme des Aktionsspektrums kann die Wirksamkeit einer UV-Lampe Wellenlänge für Wellenlänge beschrieben werden. Durch das gewichtete Spektrum können dann entsprechend der Bestrahlungsstärke erythemgewichtete Dosen berechnet werden. Durch die entsprechende Wichtung können Spektren und Bestrahlungsdosen unterschiedlicher Quellen in Bezug auf das Erythem und die weiteren oben genannten Wirksamkeiten miteinander verglichen werden.

Die minimale Erythemdosis (MED) beschreibt die Dosis, bei der die Haut 24 Stunden nach der Bestrahlung gerade ein Erythem erzeugt und ist abhängig vom Hauttyp. Für Menschen mit Hauttyp II wird als standardisierter Richtwert eine erythemgewichtete Dosis von 250 J/m^2 angegeben (Strahlenschutzkommission, 2001).

Tabelle 2: Standardisierte Richtwerte der MED für verschiedene Hauttypen
(Strahlenschutzkommission, 2001)

Hauttyp	MED in J/m^2	MED in mJ/cm^2
Typ I	200	20
Typ II	250	25
Typ III	350	35
Typ IV	450	45

In dieser Arbeit wird die applizierte Dosis auch als Vielfaches der standardisierten MED für Hauttyp II (250 J/m^2) angegeben (Strahlenschutzkommission, 2001).

2.3.1 Bestrahlungsgrößen

Die erythemwirksame Bestrahlung (Dosis) H_{er} ist das Integral der erythemwirksamen Bestrahlungsstärke E_{er} über die Zeit t (t_I : Dauer des Bestrahlungsvorganges).

$$I. \quad E_{er} = \int_0^{\infty} E_{\lambda}(\lambda) \cdot s(\lambda)_{er,rel} \cdot d\lambda \quad [\text{Wm}^{-3}];$$

mit

E_{er} : Erythemwirksame Bestrahlungsstärke

$E_{\lambda}(\lambda)$: Spektrale Bestrahlungsstärke

$s(\lambda)_{er,rel}$: Relative spektrale Empfindlichkeit für die UV-Erythemreaktion

und Integriert nach der Zeit ergibt dann

$$\text{II. } H_{er} = \int_0^{t_1} E_{er}(t) dt \quad [\text{Jm}^{-2}];$$

mit

H_{er} : Erythemwirksame Bestrahlung

E_{er} : Erythemwirksame Bestrahlungsstärke

Um den genauen Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die erythemwirksame Schwellenbestrahlung $H_{s,er}$ erreicht ist, kann die Schwellenbestrahlungsdauer wie folgt berechnet werden.

$$\text{III. } t_{s,er} = \frac{H_{s,er}}{E_{er}} \quad [\text{s}];$$

mit

$t_{s,er}$: Schwellenbestrahlungsdauer für die Erythembildung

$H_{s,er}$: Erythemwirksame Schwellenbestrahlung

E_{er} : Erythemwirksame Bestrahlungsstärke

2.4 Eindringtiefe von UVA und UVB in die Haut und die Auswirkung auf die Hautzellen

Die Haut bildet den Schutz gegenüber Umwelteinflüssen und dient somit der Aufrechterhaltung der systemischen Homöostase durch mehrere Mechanismen. Ein allgegenwärtiger Umwelteinfluss ist dabei die ultraviolette Strahlung (UVR) (Dunaway et al., 2018).

UV-Strahlung penetriert die Haut in Abhängigkeit der Wellenlängen. Dabei können längere Wellenlängen (UVA) tief in die Dermis eindringen. UVB hingegen wird in der Regel komplett von der Epidermis absorbiert und nur ein sehr kleiner Teil der Strahlung ist in der Lage die Dermis zu erreichen (D’Orazio et al., 2013) (Lopes & McMahon, 2016).

Die Exposition gegenüber UVR kann ein Auslöser für verschiedenste Veränderungen in der Haut sein. Diese beinhalten akute Effekte wie Hautrötung/Sonnenbrand, Pigmentierung und Immunsuppression (Strahlenschutzkommission, 2001), sowie späte Effekte wie UV-bedingte Hautalterung, Augenschäden und Hautkrebs. Ein nützlicher Effekt von UVB ist die Produktion von Prävitamin D, das nach weiteren Stoffwechselschritten eine wichtige Rolle für die Kalziumaufnahme und somit für die Knochengesundheit spielt. Bei chronischer Exposition ist UVB die hauptverantwortliche Strahlung in Bezug auf Photokarzinogenese (Marionnet et al., 2015).

2.5 UV induzierte DNA-Schäden

DNA-Schäden können, basierend auf ihrer Herkunft, in zwei Klassen eingeteilt werden. Der Hauptteil der endogenen DNA-Schädigung stammt von der chemisch aktiven DNA, die hydrolytische und oxidative Reaktionen mit Wasser und reaktiven Sauerstoffspezies eingeht. Solche inhärent prädisponierten Reaktionen der DNA mit Molekülen aus ihrer unmittelbaren Umgebung fördern die Entstehung von Erbkrankheiten und sporadischen Krebsarten. Auf der anderen Seite existiert der exogene DNA-Schaden, der auftritt, wenn physikalische oder chemische Noxen der Umwelt die DNA schädigen. Ein Beispiel hierfür kann die Einwirkung von UV-Strahlung sein (Chatterjee & Walker, 2015).

Die über die Haut absorbierten Sonnenstrahlen sind ein direkter Auslöser von DNA-Schäden und es ist bekannt, dass UVB und UVA für die überwiegende Mehrheit der Läsionen verantwortlich sind (Schuch, Moreno, Schuch, Menck, & Garcia, 2017).

Der schädigende Effekt von UVB beruht hauptsächlich auf der direkten Absorption durch die DNA und der darauf beruhenden Photo-Dimerisierung benachbarter Pyrimidine zu Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) und 6-4 Pyrimidinpyrimidondimeren (6-4PP) (siehe Abbildung 2).

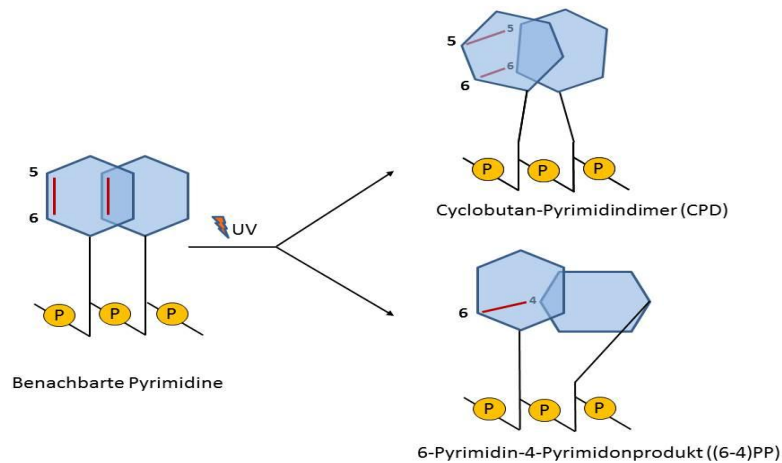


Abbildung 2: Schematische Darstellung der häufigsten UV-induzierten DNA-Schäden

(Strahlenschutzkommission, 2016).

Cyclobutan Pyrimidindimere (CPD) und 6-Pyrimidin-4-Pyrimidonprodukte ((6-4)PP) entstehen nach UV-Einwirkung auf benachbarte Pyrimidine (Strahlenschutzkommission, 2001).

CPDs sind dabei die vorwiegend auftretenden DNA-Photoprodukte und repräsentieren rund 85 % der UVB induzierten DNA-Schäden. Sie sind gekennzeichnet durch kovalent miteinander verbundene C5 und C6 Kohlenstoffatome benachbarter Pyrimidinbasen. Diese Bindung kommt durch Frenkel-Exzitone zustande, die zu einem diastereomeren Ring führen, der aus vier Elementen besteht (Schuch et al., 2017).

Im Vergleich zur UVB-Strahlung schädigt UVA-Strahlung die DNA durch die Produktion von ROS über einen indirekten Mechanismus, zu dem die Anregung intrazellulärer Chromophore wie z. B. Riboflavin und Porphyrin gehört (Dunaway et al., 2018) (Marionnet et al., 2015). Ein erhöhtes Niveau an ROS verursacht die Oxidation von DNA-Basen, insbesondere Guanin, was zur Bildung von 8-Oxodeoxyguanin (8-oxodG), einer stark mutagenen Läsion, führen kann. Auch CPDs werden durch UVA-Strahlung erzeugt, jedoch ist die UVB-Strahlung hier ca. 1000-mal effektiver (Mouret et al., 2012).

CPDs werden, wie auch andere DNA-Läsionen, über den Nukleotid-Exzisionsreparaturweg (NER) repariert. Dabei ist es möglich, dass einige Läsionen falsch repariert werden, insbesondere wenn die Schäden während der Replikation noch unrepariert vorliegen. Die resultierenden Mutationen (aufgrund der Dimerbildung oft auch Tandemmutationen) sind UV-spezifisch und werden als UV-Signatur-Mutationen bezeichnet. CPDs sind für die Mehrheit der DNA-Mutationen verantwortlich, die infolge von UV-induzierten DNA-Schäden auftreten (Dunaway et al., 2018).

2.6 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und XP-Gene

Das Nukleotid-Exzision-Reparatur-System ist das vielseitigste und wichtigste DNA-Reparatursystem zur Entfernung verschiedener DNA-Schäden, die durch Umweltkarzinogene wie unter anderem UVB-Strahlung oder Schadstoffe in der Luft hervorgerufen werden (Spivak, 2015). Das NER hat zwei Untertypen: die globale Genomreparatur (GGR), welche die Schäden im gesamten Genom bearbeitet und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur (transcription coupled repair, TCR), die wiederum die Schäden nur an den aktiv transkribierten Regionen des Genoms repariert (Bonci, Lupica, & Morales, 2015) (Shah, Qiang, Yang, Soltani, & He, 2017).

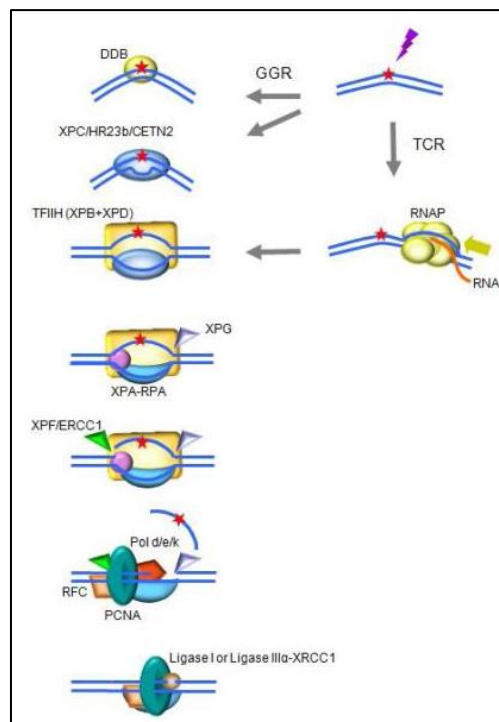


Abbildung 3: Schematische Darstellung des TCR und GGR (Spivak, 2015).

Höhere Eukaryonten nutzen verschiedene Mechanismen für die Detektion von DNA-Veränderungen in aktiv transkribierten Genen und in dem Genom als Ganzes. Bei der Transkriptions-gekoppelten-Reparatur (TCR) wird RNAPII (RNA Polymerase II) an der Läsion gestoppt. Danach werden TCR-Faktoren rekrutiert und RNAPII wird von der DNA entfernt oder zurückgesetzt, sodass es dem TFIIH (Transkriptionsfaktor IIH) und anderen NER-Enzymen ermöglicht wird zu binden. In der globalen genomischen Reparatur (GGR) kann eine helixverzerrende Läsion oder Struktur direkt durch einen Komplex aus XPC mit hRAD23B und Centrin2 (CETN2) erkannt werden. Einige Läsionen wie z.B. CPDs, welche die DNA-Duplex nicht signifikant destabilisieren, werden erst nachdem der Faktor DDB2 (XPE) im Komplex mit DDB1 einen Knick in dem Strang einbringt, durch XPC erkannt. Der XPC-hRAD23b-CENT2-Komplex bricht die DNA um die Läsion herum auf und ermöglicht die Bildung des Multikomplexes TFIIH. TCR und GGR laufen ab diesen Schritt zusammen, wobei XPB und XPD die DNA entwinden um eine 30-Nukleotid-Blase zu erzeugen. Sobald der Pre-Inzisions-Komplex zusammengesetzt ist werden XPA, RPA und XPG rekrutiert und der XPC-Komplex wird frei gelassen. XPA bindet nahe dem 5'-Ende der Blase und RPA bindet die ssDNA gegenüber der Läsion. XPG und ERCC1-XPF assoziieren mit TFIIH. ERCC1-XPF macht die erste Inzision und die Reparatursynthese verläuft für mehrere Nukleotide, die den beschädigten Strang entwinden. XPG schneidet die 3'-Einfach- /Doppelstrangbindung ab und Ligase I oder Ligase III α -XRCC1 verschließen die DNA.

Die Aufklärung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur war insbesondere durch die Untersuchung des Gendefektes in Xeroderma-Pigmentosum-Patienten möglich. Die Krankheit Xeroderma Pigmentosum wird ausgelöst durch Mutationen in Genen, die bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) eine wichtige Rolle spielen, den XP-Genen. Die Krankheit ist definiert durch extreme Sensitivität gegenüber solarer UV-Strahlung, was sich in Sonnenbrand, Pigmentänderungen in der Haut und in einer extrem erhöhten Hautkrebs-Inzidenz äußert. Ungefähr 60 % der betroffenen Personen zeigen eine verstärkte und langanhaltende Sonnenbrandreaktion. In der Minderheit treten neurologische Anomalien unterschiedlicher Schwere auf. XP ist auf allen Kontinenten anzutreffen und über alle ethnologische Gruppen verteilt (A. R. Lehmann, McGibbon, & Stefanini, 2011).

Die Produkte der XP-Gene sind in unterschiedlichen Phasen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur von Schäden in der DNA, die durch Einwirkung von UV-Strahlung induziert werden, beteiligt (siehe Abbildung 3). Dabei werden die XPC- und XPE-Proteine für die Registrierung des Photoproduktes in der DNA benötigt. XPB und XPD sind Teil des Proteinkomplexes TFIIH, welches für das Öffnen der DNA-Struktur im Bereich des Photoproduktes zuständig ist. Das XPA-Protein sorgt dafür, dass sich die beteiligten Proteine an der korrekten Position befinden, während die Nukleasen XPG und XPF die DNA an beiden Seiten der beschädigten Stelle schneiden, sodass diese beschädigte Sektion durch ein intaktes DNA-Fragment ersetzt werden kann.

XPC und XPE werden nur für die globale Reparatur benötigt, wohingegen alle anderen XP-Proteine in beiden Wegen aktiv sind. Als Folge dessen haben Patienten mit einem Defekt in den XPC- und XPE-Genen keine extremen Sonnenbrandreaktionen oder neurologische Abnormitäten.

Defekte in dem achten XP-Gen, dem sogenannten XP-Variante (*XP-V*), haben keinen Effekt auf die NER. Stattdessen haben Zellen mit einer *XP-V* Mutation Probleme DNA zu replizieren, die durch UV beschädigt wurde (Lehman et al., 1975). Die DNA-Replikation wird durch die DNA-Polymerasen durchgeführt. Die DNA-Polymerasen, die normalerweise die DNA replizieren, können nicht mit den Schäden in der Matrize umgehen, wodurch spezialisierte Polymerasen eingesetzt werden müssen, um die Schäden zu beseitigen (Translänionssynthese, auch TLS abgekürzt). Für DNA-Schäden, die durch UV verursacht wurden, verwendet die Zelle die Polymerase η , welche durch das Gen *POLH* enkodiert wird, das wiederum bei den XPV-Patienten mutiert ist (Masutani et al., 1999). Wie die XPC- und XPE-Patienten haben auch die XPV-Patienten selten extreme Sonnenbrandreaktionen oder neurologische Probleme.

Tabelle 3: Die XP-Gene, ihre Proteinfunktion und der Pathway.

Gen	Proteinfunktion	Pathway
XPA	Zusammenbau des Pre-Inzisionskomplex an der beschädigten und aufgewundenen DNA	TCR, GGR
XPB/ERCC3	Helikase, aufwinden der DNA	TCR, GGR
XPC	Schadenserkennung	GGR
XPD/ERCC2	Helikase	NER, TCR, GGR
XPE/DDB2	Schadenserkennung	GGR
XPF/ERCC4	Nuklease	TCR, GGR
XPG/ERCC5	Nuklease	TCR, GGR
XPV/POLH	Polymerase	TLS

Die molekularen Defekte in den XP-Zellen führen zu einer stark erhöhten Induktion von Mutationen in der sonnenexponierten Haut der betroffenen Individuen. Die erhöhte Frequenz der Mutationen ist wahrscheinlich verantwortlich für die Pigmentveränderungen und Entstehung von Hautkrebs. Tatsächlich zeigt die Untersuchung von Mutationen im p53-Gen in Tumoren von XP-Patienten, dass diese Mutationen für eine UV-Exposition charakteristisch sind (Daya-Grosjean & Sarasin, 2005). Der Gen-Defekt führt auch zu einer erhöhten UV-induzierten Letalität, die zwischen den einzelnen Formen stark variiert. Das Ausmaß der Krankheit ist bei Mutationen der *XPC*- und *XPE*-Gene sowie bei einigen hypomorphen Mutationen in anderen XP-Genen wegen der verbleibenden funktionellen TCR geringer.

2.7 Growth Arrest and DNA damage-inducible 45 (GADD45) Gen

Die Growth Arrest and DNA damage-inducible 45 Genfamilie codiert drei verwandte Proteine und zwar GADD45 α , β und γ . *GADD45A* war der erste Angehörige der GADD45-Familie und wurde bei einem Screening einer cDNA-Datenbank als erhöht exprimiertes Transkript nach einer ultravioletten Bestrahlung von Chinese Hamster Ovarien (CHO) Zellen identifiziert (Hollander, 1988) (Fornace et al., 1989).

GADD45 Proteine sind kleine Proteine mit einem molekularen Masse von etwa 18 kDa und sind lokalisiert im Nukleus, sowie in kleinen Mengen im Zytoplasma. Die Funktionen der GADD45-Proteine sind sich ähnlich, aber nicht identisch. Die Induktion unterscheidet sich unter diversen physikalischen Bedingungen (wie z.B. die Einwirkung von UV-Strahlen), sowie in den verschiedenen Zelltypen. GADD45-Proteine sind allgegenwärtig in normalen adulten und fetalem Gewebe feststellbar. Insbesondere in ruhenden Populationen und in der

G1-Phase des Zellzyklus wird GADD45 stark exprimiert, während sich die Proteinexpression in der S-Phase signifikant verringert zeigt (Tamura et al., 2012).

Die Genfamilie spielt eine wichtige Rolle in zellulären genotoxischen und nicht genotoxischen Stressantworten, wie z.B. nach UV-Strahlung, wobei die Proteine als Stresssensoren und Tumorsuppressoren agieren (Tamura et al., 2012) (Liebermann et al., 2011). Nach entstandenen DNA-Schäden wird jeder Angehörige der GADD45 Proteinfamilie schnell induziert, was in einen Zellzyklusarrest und/oder Apoptose resultiert oder sie sind aktiv im DNA-Reparatur-Mechanismus involviert (Tamura et al., 2012).

Es wurde gezeigt, dass Gadd45-Proteine am Zellzyklusarrest, an der DNA-Reparatur, am Zellüberleben und an Apoptose als Reaktion auf Umwelt- und physiologischen Stress sowie an der Karzinogenese beteiligt sind (Liebermann & Hoffman, 2008). GADD45 funktioniert durch die Interaktion mit Partnerproteinen, welche an der Zellzyklusregulation und der Zellantwort auf Stress beteiligt sind. Die Proteine, die mit GADD45 interagieren, umfassen PCNA, Histone, cdk1, p21, MEKK4, MEKK7 und p38. Es gibt Hinweise darauf, dass die Interaktion der GADD45-Proteine mit PCNA die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) von DNA fördert (Liebermann & Hoffman, 2007). Zudem könnte die Interaktion mit PCNA und/oder Histonen eine Rolle in der epigenetischen Genaktivierung durch reparaturvermittelte DNA-Demethylierung spielen (Barreto et al., 2007) (Ma et al., 2009).

2.8 Epigenetik

Das Genom enthält Informationen in zwei Formen, der Genetik und der Epigenetik. Die genetische Information liefert dabei eine Art "Blaupause" zur Herstellung von den wichtigen Proteine. Die Epigenetik hingegen stellt die Information zur Verfügung wie, wo und wann die Genetische Information zu benutzen ist (Katiyar, Singh, Prasad, Sun, & Vaid, 2012) (Goodman & Watson, 2002) (Jones & Baylin, 2002). Die Epigenetik bezieht sich auf reversible aber auch auf vererbare Veränderungen in der Genexpression, die ohne Veränderungen der DNA-Sequenz auftreten (Jones & Baylin, 2002). Neben Veränderungen in der Chromatinstruktur stellt die DNA-Methylierung einen weiteren wichtigen Mechanismus dar. Die Methylierung im Promotorbereich eines Gens führt zu seiner Herunterregulierung, da Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können (Zingg & Jones, 1997) (Egger, Liang, Aparicio, & Jones, 2004) (Jones & Laird, 1999).

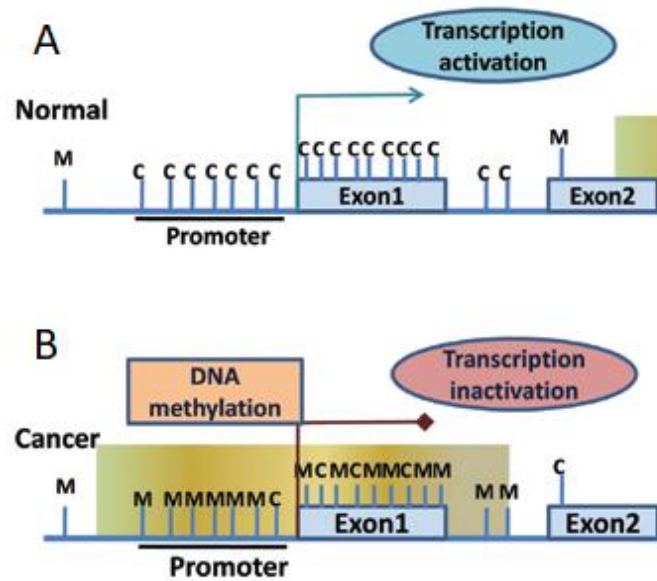


Abbildung 4: Darstellung der methylierungsinduzierten Transkriptionsinaktivierung

(Q. W. Chen et al., 2014).

CpG-Insel-enthaltende Genpromotoren sind normalerweise in normalen Zellen unmethyliert, um die euchromatische Struktur aufrechtzuerhalten, die die transkriptionelle Konformation darstellt, welche die Genexpression ermöglicht (A). Während der Krebsentwicklung werden jedoch viele dieser Gene an ihren CpG-Insel-Promotoren hypermethyliert. Dadurch wird die euchromatische Struktur zu einer kompakten heterochromatischen Struktur geändert was dazu führt, dass die Expression inaktiviert wird (B). Das C steht für das Cytosin in den CpG-Inseln und das M für das methylierte C in den CpG-Inseln.

Die Methylierung im humanen Genom tritt häufig an der C5-Position des Cytosin im Zusammenhang mit einem CpG - Dinukleotid auf. 5-Methylcytosin (5mC) macht dabei 4% des Cytosins im menschlichen Genom aus. In normalen Zellen sind CpG-Stellen, die sich in den Promotor-CpG-Inseln befinden, vor der Methylierung geschützt. CpG-Stellen die außerhalb der Promotor-CpG-Insel-Loci lokalisiert sind, können hingegen methyliert werden. Dabei sind im speziellen die CpG-Stellen, die sich in wiederholenden DNA-Elementen befinden stark methyliert. In Krebszellen erfahren CpG-Stellen, in Abhängigkeit von Ihrer Lage im Genom, Methylierungsänderungen in der entgegengesetzten Richtung. Die geschützten CpG-Stellen in normalen Zellen liegen hypermethyliert vor, wohingegen stark methylierte CpG-Stellen in normalen Zellen eher demethyliert vorliegen. Somit sind DNA-Methylierungsänderungen, die in Krebszellen auftreten, sowohl durch die fokale Promotor-CpG-Insel-Hypermethylierung als auch durch diffuse genomische Hypomethylierung gekennzeichnet (Rhee et al, 2017). Die Promotor-Hypermethylierungen ist ein Hauptmechanismus der Epigenetik für das Abschalten der Expression von Tumorsuppressorgenen (Herman & Baylin, 2003) (Antequera & Bird, 1993).

DNA-Methylierung wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Die Ergänzung von Methylgruppen wird von einer bestimmten Enzym-Familie durchgeführt, den DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Für die Etablierung und Erhaltung der DNA-Methylierung sind drei DNMTs (DNMT1, DNMT3a und DNMT3b), wie in Abbildung 5 zu sehen, erforderlich. Dabei scheint DNMT1 für die Aufrechterhaltung etablierter Methylierungsmuster verantwortlich zu sein, wohingegen DNMT3a und DNMT3b scheinbar die Etablierung neuer oder de novo Methylierungsmuster vermitteln.

Die Methylierung besteht aus einer kovalenten Modifikation der DNA, bei der eine Methylgruppe (CH₃) von einem S-Adenosylmethionin (SAM) auf ein Cytosin übertragen wird, welchem ein Guanin vorrausgeht (da Silva et al, 2017). Dies geschieht an der Position 5 des Pyrimidinrings und wird deshalb auch als 5-Methylcytosin (5mC) bezeichnet. Durch Hydrolysieren des SAM zu Adenosylhomocystein (SAH) steht der Zelle eine Methylgruppe für die Methylierung zur Verfügung.

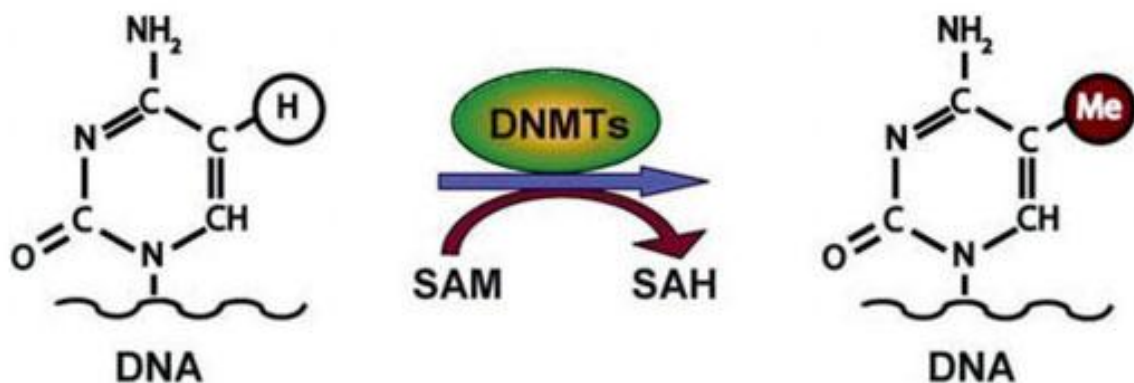


Abbildung 5: Methylierung von Cytosin (Graw, 2015).

Mit Hilfe der DNA-Methyltransferase werden die Cytosin-Reste in der DNA an CpG-Dinukleotiden zu 5-Methylcytosin umgewandelt. Damit die DNMT die Methylgruppe (Me) transferieren kann erhält sie von dem S-Adenosylmethionin (SAM) eine CH₃-Gruppe die sie dann an die Position 5 des Pyrimidinrings anheften kann. Dabei wird das SAM zu S-Adenosylhomocystein (SAH) hydrolysiert.

Die Replikation ist durch die DNA-Methylierung nicht beeinträchtigt. Jedoch kann das 5mC leicht zu Thymin desaminieren. Die Paarung zwischen Thymin und Adenin würde bei der nächsten Replikation zu einer Mutation führen. In Bereichen, in denen die Methylierungen sehr häufig auftreten, ist daher auch mit einem erhöhten Risiko für Mutationen zu rechnen.

Mausmodelle konnten zeigen, dass die DNA-Methylierung für die gesunde Entwicklung eines eukaryotischen Organismus von großer Bedeutung ist, da die Mäuse mit fehlenden Transferasen während der Embryonalentwicklung starben. (Graw, 2015).

2.9 Hautkrebs

Wie bei vielen anderen Krebsarten, die durch Umwelteinflüsse (z.B. UV) herbeigeführt werden, nimmt die Häufigkeit von Hautkrebs mit zunehmenden Alter merklich zu, was vermutlich auf die lange Latenz zwischen Karzinogenexposition und Krebsbildung zurückzuführen ist (D’Orazio et al., 2013). Hautkrebs ist üblicherweise in zwei Gruppen unterteilt, den melanozytären Hautkrebs und den nicht melanozytären Hautkrebs. Das Risiko an Hautkrebs zu erkranken ist unter anderem abhängig von der UV-Exposition und der Hautpigmentierung (siehe Abbildung 6) (Narayanan, Saladi, & Fox, 2010).

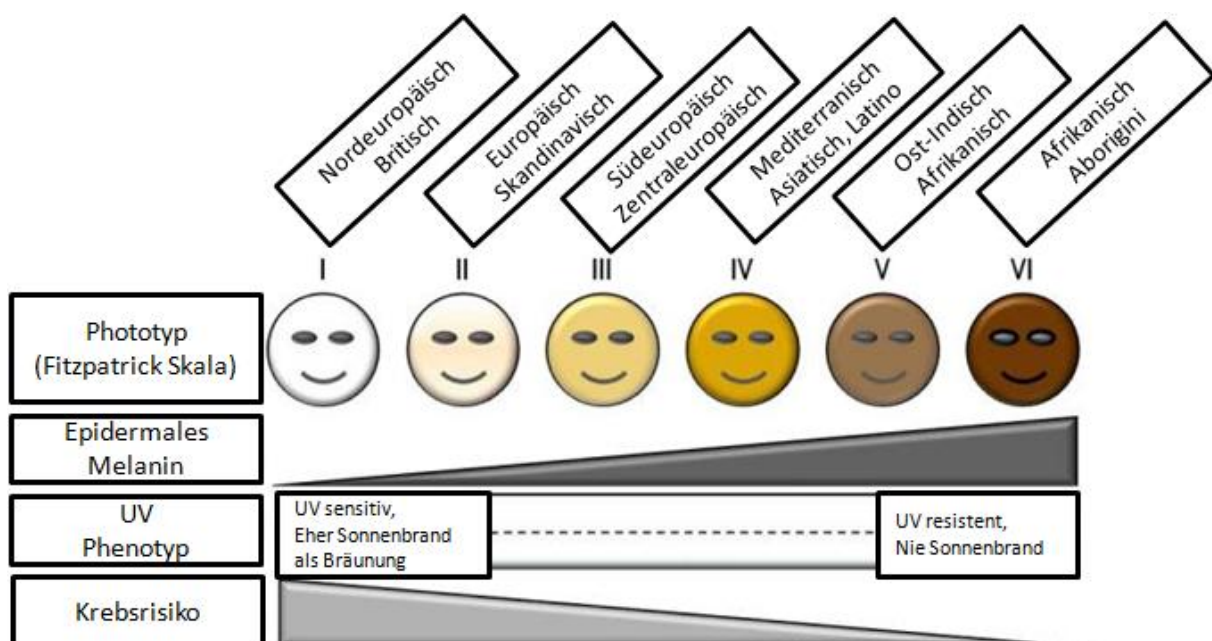


Abbildung 6: Einfluss der Pigmentierung der Haut auf da Krebsrisiko (nach D’Orazio et al., 2013).

Die hier dargestellte Skala repräsentiert das Ausmaß der Pigmentierung durch Melanin. Melanin dient als natürlichen Schutz gegenüber der UV-Strahlung. Nach UV-Exposition wird Melanin, das normalerweise in den untersten Schichten der Epidermis durch Melanozyten gebildet wird, in die obere Schicht der Epidermis verlagert. Das Resultat dieser Verlagerung ist die erkennbare Bräunung der Haut. Nach wiederholter Exposition mit UV wird die Neubildung von Pigmenten verstärkt und es kommt zu einer langanhaltenderen Pigmentierung der Haut (Spätpigmentierung). Die Spätpigmentierung stellt einen länger anhaltenden Schutz gegenüber UV-bedingter Hautschäden dar. Die Intensität dieser Pigmentierung ist vom Hauttyp abhängig, sodass Menschen mit einem niedrigeren Hauttyp einen schlechteren natürlichen Schutz gegenüber UV-Strahlung entwickeln.

Das maligne Melanom der Haut ist die tödlichste Form des Hautkrebses. Das Melanom, das aus Melanozyten entsteht, ist eine behandlungsrefraktäre und zu Metastasierung neigende Malignität, deren Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stetig und signifikant angestiegen ist (Berwick & Wiggins, 2006). Wenn der Tumor rechtzeitig entdeckt wird, können die meisten

Melanome durch eine Exzision entfernt werden. Jedoch werden Melanome schnell invasiv, metastasieren häufig und haben dann eine schlechte Überlebensprognose.

Häufiger als das maligne Melanom treten NMSC's (non-melanoma skin cancer) auf. Der häufigste Hautkrebs ist dabei das Basalzellkarzinom (BCC - basal cell carcinoma) gefolgt von dem Plattenepithelkarzinom (SCC - squamous cell carcinoma). Bei beiden Krebsarten bestehen gute Heilungschancen, insbesondere wenn sie im Anfangsstadium entdeckt werden (Didona et al, 2018).

Das BCC ist ein langsam wachsender, destruierender Tumor, der keine Metastasen bildet und eine sehr geringe Letalität aufweist. Vorwiegend tritt diese Art von Tumor an belichteten Hautpartien, wie und vor allem im Gesicht, an den Ohren und auf der Kopfhaut auf, aber auch am Rumpf kann es entstehen. Zwischen dem BCC und der Exposition der Haut mit UV besteht eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung (Strahlenschutzkommission, 2016).

Bei einem SCC handelt es sich um einen invasiv wachsenden, lokal destruierenden Tumor. Ab einer bestimmten Größe kann diese Art von Tumor auch metastasieren und selten auch zum Tod führen. Wie auch bei dem BCC beschrieben, tritt das Plattenepithelkarzinom vorwiegend an belichteten Hautpartien auf und es besteht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der UV-Exposition (Strahlenschutzkommission, 2016).

Für maligne Melanome werden Risikofaktoren in Dispositions- und Expositionsfaktoren unterschieden. Ein großes Risiko tragen helle Hauttypen (besonders Hauttyp I und II) mit rötlichen oder blonden Haaren, mit einer Neigung zu Sommersprossen, mit Sonnenbrandflecken (Lentigines) und/oder multiplen Pigmentmalen, sowie auch mit einer positiven Familienanamnese bezogen auf das maligne Melanom. Je nach Kombination der aufgeführten Faktoren haben diese Individuen ein bis zu 100fach erhöhtes Risiko im Verlauf ihres Lebens ein malignes Melanom zu entwickeln.

Plattenepithelkarzinome und Basalzellkarzinome treten wie schon beschrieben überwiegend in Bereichen chronisch lichtgeschädigter Haut auf. Diese Tumore werden mit sehr großer Sicherheit hauptsächlich durch den UV-Anteil des Sonnenspektrums verursacht und das Risiko steigt mit der lebenslang erhaltenen UV-Gesamtdosis (Strahlenschutzkommission, 2016).

3 Geräte und Materialien

3.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Vortexer	Vortexer	Bioenzym
- 20 °C Kühlschrank	Comfort	Liebherr
Hybridisierungs-ofen	Hybru Ofen 6/12	Fröbel Labortechnik
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Sterilwerkbank	CleanAir CA/REV4	Haan Deutschland
Brutschrank	VB210	Binder
Wasserbad	1083	GFL
4°C Kühlschrank		Bosch
Vortexer	VF2	Janke & Kunkel
Durchflusszytometer	Guava easyCyte HAT	Millipore
Tischzentrifuge	EBA12	Hettich
Thermomixer	Thermomixer C	eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus-Accu	Hirschmann (Eberstadt)
Bio Photometer		Eppendorf (Hamburg)
Gelelektrophorese-Apparatur	E431	CONSORT (Ottawa, Kanada)
Heizblock	Dri-Block DB-3	Techne (Staffordshire, UK)
Pyrosequenzierer	PyroMark Q24	Qiagen (Hilden)
Zentrifuge	Micro Centrifuge AL Mikro 200 Rotina 46	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Hettich (Tuttlingen) Hettich (Tuttlingen)
Mastercycler	Reallex epigradient S	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	T-personal 48	Biometra (Göttingen)
Bestrahlungsquelle	KAUVIR-Lamp	Eigenentwicklung (KAUVIR)
Mikroskop	CKX53	Olympus

3.2 Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Ort
Agarose-Tabletten	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
DNA Ladder Quick Load® 2-Log (0,1-10,0 kb) 100 µg/ml	New England BioLabs GmbH	Frankfurt a.M.
DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
DMEM-Pulver	Gibco	Paisley, Schottland
FKS 522D	Biochrom	Berlin
Ethanol (100%)	Lohmann	Seevetal
MyTaq™ HS Red Mix	Bioline GmbH	Luckenwalde
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
PBS Tabletten	Gibco	
Salzsäure HCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
SensiMix™ SYBR No-ROX	Bioline GmbH	
Tris (99%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Wasser, Nuklease-frei, steril-filtriert, bidestilliert	Carl Roth GmbH B. Braun Melsungen AG	Karlsruhe Melsungen

Roti-Block	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
EvaGreen®	BIOTIUM	USA, Vermont

3.3 Kits

Name	Hersteller	Ort
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit	Bioline GmbH	Luckenwalde
SensiMix™ SYBR No-ROX Kit	Bioline GmbH	Luckenwalde
EZ DNA Methylation Lightni™ Kit	Zymo Research Corp.	Kalifornien, USA

3.4 Antikörper, Enzyme und Zellysate

Name	Hersteller	Ort
Anti-Thymine Dimer mAb, clone KTM53	Kamiya Biomedical Company	Seattle, USA
FITC Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	USA
Proteinase K	Sigma BioScience	St. Louis, USA
RNAse (Ribonuclease A)	Sigma-Aldrich	Saint Louis, USA

3.5 Gebrauchslösungen und Puffer

Bezeichnung	Ansatz
PBS ^{+/+}	Zwei PBS-Tabletten, 50 mg/l MgCl ₂ · 6 H ₂ O und 132 mg/l CaCl ₂ · 2 H ₂ O in ddH ₂ O. pH 7,3.
PBS ^{-/-}	Zwei PBS-Tabletten in 1 l ddH ₂ O. pH 7,3.
HCL (2M)	
TBS (10x) 1000 ml	12,12 g Tris-Base C ₄ H ₁₁ NO ₃ und 87,66 g NaCl in ddH ₂ O. pH 7,5 einstellen. Auffüllen auf 1000 ml mit ddH ₂ O.
Trypsin/EDTA	0,250 g Trypsin-Pulver und 0,020 g EDTA (Titriplex III) in 100 ml PBS ^{-/-} . pH 7,5, steril filtriert. Lagerung bei -20 °C.
PJ (Propidiumjodid)	2,6 mg PJ-Pulver in 2,6 ml PBS ^{-/-} . Lagerung abgedunkelt bei 4 °C im Kühlschrank.
RNAse (Ribonuklease A)	100 mg RNAse A in 80 ml 10 mM Na-Acetat lösen. Erhitzen auf 100 °C und abkühlen auf RT. pH 7,4 mit 1 M TRIS-HCl. Auffüllen auf 100 ml mit Na-Acetat Puffer.
Roti-Block + Triton X-100	10 ml Roti-Block und 0,125 ml Triton X-100 in 90 ml dH ₂ O lösen.

3.6 Primer

qPCR

Bezeichnung		Sequenz 5' → 3'	Amplikon [bp]	Design
ACTB	F R	TTCCTGGGCATGGAGTC CAGGTCTTTGCGGATGTC	84	Szabo et al., 2004
HPRT1	F R	TGACACTGGCAAAACAATGCA GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	94	Vandesompele et al., 2002
TBP	F	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	227	Radonić et al.,

	R	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC		2004
GADD45a	F R	AGGACGACGACAGAGATGTG GATGAATGTGGATTCGTCACC	211	Eigenes Design
XPA	F R	GTGATAACTGCAGAGATGCTG CCATTGTGAATGATGTGGATTG	149	Eigenes Design
XPB	F R	ATCCAGCCAGGCATCTCG CTTGAAGAGCGGGTGTACAT	127	Eigenes Design
XPC	F R	TATGTGTAGACTGTGTGCACG GCCTGAAACTCCAAGTCTTCT	253	Eigenes Design
XPD	F R	CGAGGGAATCGACTTTGTGC AAAGTCATTCTCACGAATCTGG	139	Eigenes Design

Nested-PCR1 Amplifikationsprimer

Bezeichnung		Sequenz 5' → 3'	Design
GADD45a	F R	TTAGGAGTTGGGGTTAAATTG CCTACTTTCTACACTCACTCACA	Eigenes Design
XPA	F R	TGATAAGAGAGTAGGTAGTTAG ACCCAAACCTCCAATAAC	Eigenes Design
XPB	F R	TTTTTTGTTGTTGTAGTTGTTATGG CTAACTAAAACCACCTACATCC	Eigenes Design
XPC	F R	TATGGGGTGGAGTTTTTTTTAGG TCTCACCTCCTCCTCCT	Eigenes Design
XPD	F R	GAGGATTAATTTTAGTGAATGAGA ATAACCCCATCTTCAAACCC	Eigenes Design

Nested-PCR2 Amplifikationsprimer

Bezeichnung		Sequenz 5' → 3'	Design
GADD45a	F R	TAGGTAGTGGTTGGGAGGTAG CCTACTTTCTACACTCACTCACA	Eigenes Design
XPA	F R	TGGAGTTGGGAGTTAGGTTTT ACCCAAACCTCCAATAAC	Eigenes Design
XPB	F R	TTTTTTGTTGTTGTAGTTGTTATGG CCCAAATCCAACATCTCTCC	Eigenes Design
XPC	F R	GAAGTGGAATTTGTTTAGATAAGTA TCTCACCTCCTCCTCCT	Eigenes Design
XPD	F R	GAGGATTAATTTTAGTGAATGAGA CCTCCCTCATAAATATTCAA	Eigenes Design

Sequenzierprimer, Sequenzierung des PCR-Produkts aus Nested-PCR2

Bezeichnung		Sequenz 5' → 3'	Design
GADD45a	F	GGTAGTGGTTGGGAGGT	Eigenes Design
XPA	F	GAGTGGGTTAGAGATG	Eigenes Design
XPB	F	TTGTTATGGGTAAAAGAGA	Eigenes Design
XPC	F	GTTTAGATAAGTAATATGGT	Eigenes Design
XPD	F	GGTAGGTTAGTTAATGGT	Eigenes Design

3.7 Software

Name	Version	Firma
Adopbe Reader	19.008.20071	Adobe Systems
Mendeley Desktop	1.19.2	Mendeley Ltd.
Microsoft Office (Excel, Word, Powerpoint)	14.0.7214.5000 (32 Bit)	Microsoft Corp.
PyroMark Q24	2.0.8	QIAGEN group
Realplex PCR	Realplex 2.2	Eppendorf
SigmaPlot	13.0	Systat Software Inc.
FlowingSoftware	2.5.1	Perttu Terho
Origin	5.0	Microcal Software, Inc.

4 Methoden

4.1 KAUVIR-Lampe

Die KAUVIR-Lampe wurde von den Arbeitsgruppen im Forschungsverbund KAUVIR entwickelt und ermöglicht verschiedene Kombinations- und Einzelbestrahlungen durch das Zusammenspiel verschiedener Strahlen-/Lichtquellen, sowie dichroitischer Strahlenspiegel (siehe Abbildung 7).

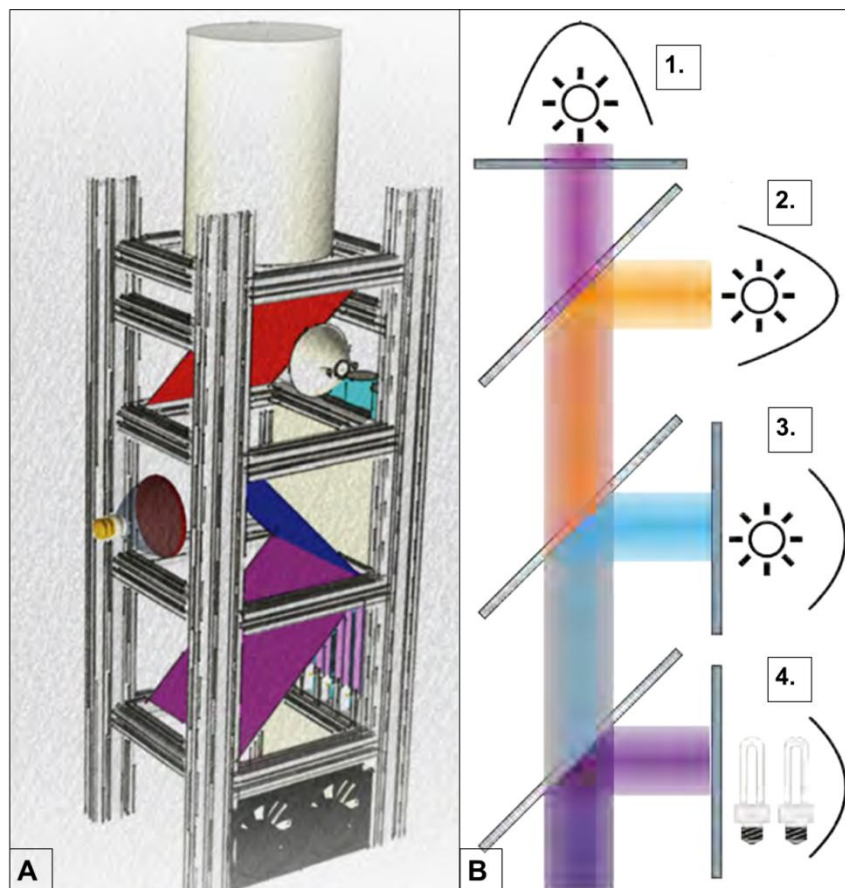


Abbildung 7: Schematische Darstellung der KAUVIR-Lampe.

Das Bild (A) zeigt den Aufbau der KAUVIR-Lampe. Die verschiedenen Strahlenquellen sind übereinander angeordnet. Das volle Spektrum der Sonne liegt in einem Bereich von 280 bis 1200 nm und kann durch die vier unabhängigen Bestrahlungs-/Beleuchtungsquellen generiert werden. UVA, UVB und VIS werden durch dichroitische Strahlenspiegel miteinander kombiniert. Aus der Infrarotquelle werden über einen wassergekühlten Acryl-Bandpass-Filter Wärme und kürzere Wellenlängen gefiltert. Durch die KAUVIR-Lampe ist es möglich, das volle Spektrum der Sonne oder einzelne Qualitäten in verschiedenen Kombinationen zu simulieren. Auf Bild (B) sind die Positionen der Strahlenquellen zu erkennen: 1. Infrarot 2. Visuelles Spektrum 3. UVA 4. UVB.

Für die gewünschte Einzel- oder Kombinationsstrahlung können die Strahlenquellen separat über das Bedienungsfeld geschaltet werden (siehe Abbildung 8, A). Um die Zellen in

den Petrischalen der gewünschten Bestrahlung auszusetzen, wurden die Zellen mit 3 ml PBS⁺⁺ bedeckt und in die Expositions-kammer der KAUVIR-Lampe gestellt (siehe Abbildung 8, B). Über ein Peltier Element, auf dem die Petrischalen platziert werden, kann die Temperatur (35 °C) konstant gehalten werden.

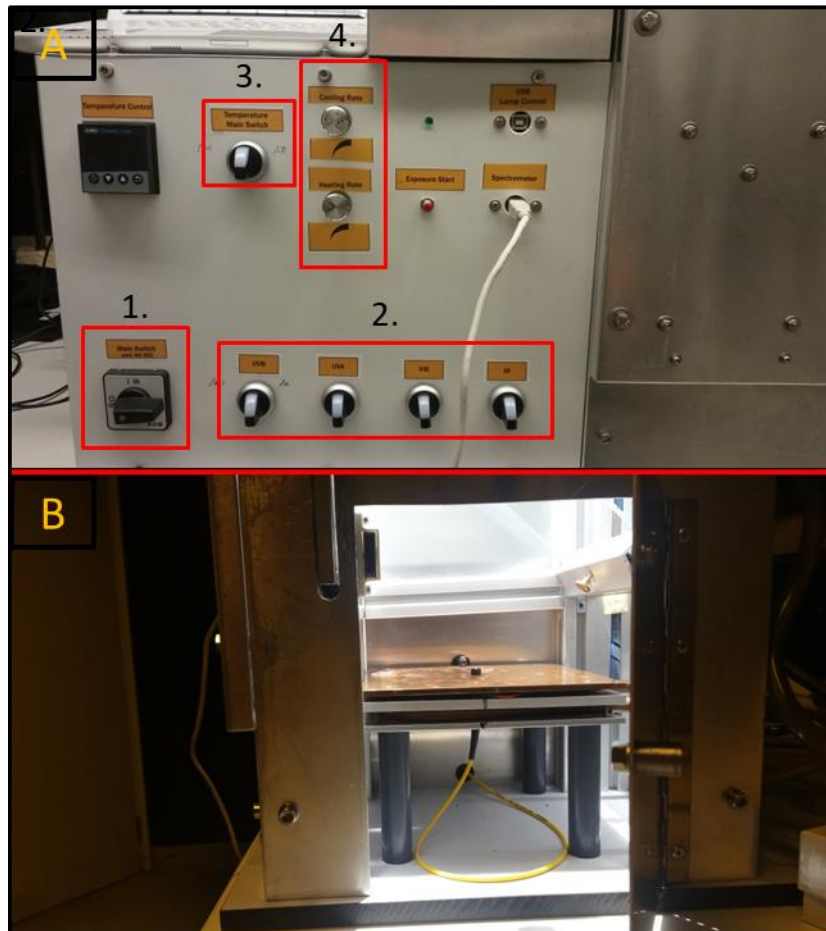


Abbildung 8: Darstellung der Steuereinheit und Bestrahlungskammer.

Bild A zeigt die Steuereinheit des Bestrahlungssystems. 1. Hauptschalter zum Inbetriebnahme der Bestrahlungseinheit. 2. Schalter für Zu- und Abschalten der einzelnen Strahlenquellen. 3. Schalter für Inbetriebnahme der Infrarotlampenkühlung, sowie der beheizten Probenplatte in der Strahlenkammer. 4. Regler für den Peltier-Kühler. Auf Bild B ist die Strahlenkammer mit der beheizten Platte für die Zellproben-Petrischale zu sehen.

Der große Vorteil der KAUVIR-Quelle gegenüber anderen Sonnensimulatoren ist, dass einzelne spektrale Bereiche einfach zu- oder abschaltbar sind. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht für alle einzelnen spektralen Bereiche. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen mögliche Effekte der UV-Strahlung und ein möglicher Einfluss von VIS- und IRA-Strahlung auf die UV-induzierten Effekte. Daher wurde VIS und IRA nur zusätzlich zum UV eingesetzt und nicht einzeln.

Tabelle 4: Bestrahlungsstärken der einzelnen und kombinierten Strahlenquellen.

	UVA+UVB+VIS+IRA in W/m ²	UVA+UVB in W/m ²	VIS+IRA in W/m ²	UVB in W/m ²	UVA in W/m ²	VIS in W/m ²	IRA in W/m ²
UVB	0,4728	0,4518	-	0,4301	-	-	-
UVA	29,16	28,43	-	-	27,91	-	-
VIS	79,63	-	59,88	-	-	59,16	-
IRA	241,25	-	213,3	-	-	-	164

Die schwach voneinander abweichenden Bestrahlungsstärken zwischen den verschiedenen Quellenkombinationen und Einzelquellen ergeben sich durch den Anteil, den die jeweils zugeschalteten Quellen mit einbringen und sind in dieser Arbeit berücksichtigt worden. In den Versuchen wurden unterschiedliche Dosen, sowie Kombinationen verwendet.

4.2 Zellkultur

Für die Untersuchungen wurde die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um spontan immortalisierte, nicht tumorigene, humane Keratinozyten. Mit der HaCaT-Zelllinie ist eine Passagierung von über mehr als 140 Passagen möglich. Sie besitzen im Vergleich zu normalen Keratinozyten eine veränderte Morphologie. Die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung, zur Ausbildung eines funktionsfähigen epithelialen Gewebes und zur Induktion der Apoptose wurde jedoch beibehalten. Sie tragen eine Mutation in beiden Allelen des p53-Gens und besitzen einen aneuploiden Chromosomensatz (72-88 Chromosomen) (Boukamp et al., 1988). Unter anderem liegt auch ein Verlust von Seneszenz-Genen insbesondere auf dem Chromosomenabschnitt 3p vor (Fusenig & Boukamp, 1998). Zur Vorbereitung für die Untersuchungen wurde das Medium aus der Vorkulturflasche (15 ml) abgesaugt und 5 ml PBS^{-/-} auf die Zellen gegeben. Nach absaugen des PBS^{-/-} wurden die Zellen mit 1,5 ml 0,5 % Trypsin/ 0,02 % EDTA in PBS^{-/-} für 15 min und 37 °C inkubiert. Die Trypsin/EDTA-Reaktion wurde mit 8,5 ml DMEM+10 % FKS abgestoppt. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Für die Bestrahlungen wurden die Zellen zu je 5x10⁵ Zellen pro Petrischale eingesät.

Sofort nach der Bestrahlung oder einer entsprechenden Reparaturzeit (nur für Reparaturkinetik) wurden die Zellen abgelöst und für eine Fixierung vorbereitet. Der Vorgang zum Ablösen der Zellen war derselbe wie zur Vorbereitung der Zellen für die Bestrahlung. Es

wurden lediglich 1 ml Trypsin verwendet und für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst und mit einer Pipette vereinzelt werden. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden die vereinzelteten Zellen in 9 ml DMEM+10 % FKS überführt. Nachfolgend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Die Zellen wurden durch Aufklopfen vereinzelt und mit PBS^{+/+} gewaschen und erneut für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurden die Zellen erneut vereinzelt. Die Zellen wurden in 70 %igem -20 °C kalten Ethanol resuspendiert und auf eine Konzentration von 10⁶ Zellen pro ml eingestellt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C.

4.3 Bestrahlung der HaCaT-Zellen

Für die Versuche wurden die Zellen verschiedenen Kombinationen des solaren Spektrums, UV-Strahlung (UVA, UVB), sichtbarem Licht (VIS) und Infrarotstrahlung (IR) ausgesetzt. Dafür wurden die Kombinations- und Einzelbestrahlungen UVB, UVA+UVB, UVA+UVB+VIS+IRA durchgeführt.

Tabelle 5: Bestrahlungsdosen des Gesamtspektrums zur jeweiligen Bestrahlungsdauer.
1 MED entspricht der Dosis, die ein Erythem bei einem Hauttyp II auslöst.

Dosis in MED	Bestrahlungsdauer in hh:mm:ss	VIS in kJ/m ²	IRA in kJ/m ²	UVA in kJ/m ²	UVB in J/m ²
1.50	0:48:50	233	707	85	1385
1	0:32:33	156	471	57	923
0.85	0:27:47	133	402	49	788
0.75	0:24:25	117	353	43	693
0.5	0:16:17	78	236	29	462
0.25	0:08:08	39	118	14	231

Für die Ermittlung der Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion wurden Versuche in Einzel- und Kombinationsbestrahlungen mit UVA, UVB und UVA+UVB durchgeführt. Die Dosen für die Kombinationsbestrahlung entsprechen 0,5 und 1 MED, die Dosen für die Einzelbestrahlung wurden aus der Kombinationsbestrahlung übernommen. Als Kontrolle wurden zu jedem Versuch auch Zellen ohne eingeschaltete Quelle in die Bestrahlungseinheit gestellt. Das Schema zur Durchführung der Versuche zur

Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten kann der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Bestrahlungsprotokoll für die Versuche zur Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten.

Anzahl der Petrischalen	Bestrahlungsart	Dosis UVA in kJ/m ²	Dosis UVB in J/m ²	Zeit in hh:mm:ss
2	Kontrolle	-	-	00:16:17
2	UVA	27	-	00:16:17
4	UVA	55	-	00:32:33
4	UVA+UVB	28	441	00:16:17
4	UVA+UVB	56	882	00:32:33
4	UVB	-	420	00:16:17
4	UVB	-	840	00:32:33

Zur Ermittlung des Dosiseffektes wurden Zellen mit UVB Dosen von 0 bis 1,5 MED (entspricht 1260 J/m² UVB für Einzelbestrahlung) bestrahlt. Wie auch im zuvor beschriebenen Versuch wurden hier ebenfalls zwei Petrischalen als Kontrollen, ohne eingeschaltete Strahlenquellen, in die Bestrahlungseinheit gestellt. Gearbeitet wurde hier nach dem Schema aus Tabelle 7.

Tabelle 7: Bestrahlungsprotokoll für den Dosiseffektversuch.

Anzahl der Petrischalen	Bestrahlungsart	Dosis UVB in J/m ²	Zeit in hh:mm:ss
2	UVB	1260	00:48:50
2	UVB	840	00:32:33
2	UVB	630	00:24:25
2	UVB	420	00:16:17
2	UVB	210	00:08:08
2	Kontrolle	-	00:08:08

Damit eine Reparaturkinetik aufgenommen werden konnte, wurden die Zellen nach Bestrahlung für verschiedene Reparaturzeiten (t = 0 h, 2 h, 6 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h und 168 h) inkubiert und dann für die CPD-Bestimmung präpariert. Mit dem UVB-Spektrum wurden fünf unabhängige Probensets und vier unabhängige Probensets mit den Spektren UVA+UVB und UVA+UVB+VIS+IRA bestrahlt. Die Dosen für die Kombinationsbestrahlung entsprechen 0,5 und 1 MED, die Dosen für die Einzelbestrahlung

wurden aus der Kombinationsbestrahlung übernommen. Auch hier liefen ebenfalls Kontrollen mit, die ohne eingeschaltete Quellen in die Bestrahlungseinheit gestellt wurden. Zwei der Kontrollen wurden bei $t = 0$ h und zwei weitere bei $t = 168$ h abgelöst.

4.4 CPD-Anfärbung

Um CPD-Schäden sichtbar zu machen wurde der monoklonale Antikörper Anti-Thymin Dimer KTM53 als Primärantikörper und als Sekundärantikörper der Goat Anti Mouse FITC Antikörper verwendet.

Zur Vorbereitung der Anfärbung wurden in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen 250 µl TBS vorgelegt und 250 µl der fixierten Zellen (250 000 Zellen) hinzugefügt. Durch Vortexen wurde die Suspension gut durchmischt und bei $1350 \times g$ für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets in 160 µl resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit konisch zulaufendem Boden überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dann mit $500 \times g$ für 3 min zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden mit denselben Bedingungen durchgeführt. Der Überstand konnte, wie auch nach allen nachfolgenden Zentrifugationsschritten, aus der Platte abgegossen werden, während die Zellpellets zurückblieben. Zur DNA-Denaturierung wurden die Zellen in den Wells mit 160 µl 2N HCl resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation und dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen zweimal mit 160 µl Roti Block und einmal mit 160 µl PBS^{+/+} gewaschen. Für den Abbau von Proteinen wurden die Zellen in den Wells mit einer Proteinase K/PBS^{+/+}-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Darauf folgend wurden die Zellen zweimal mit 160 µl PBS^{+/+} und einmal mit 160 µl Roti Block gewaschen.

Für die Bindung des Primärantikörpers wurden die Zellen mit einer 1:500 verdünnten Lösung des CPD-Antikörpers in 160 µl gemischt und auf einem Schüttler mit 600 rpm bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben dann zentrifugiert und dreimal mit Roti Block gewaschen. Die Zellen wurden nach der letzten Wäsche in 160 µl einer 1:100 verdünnten Sekundärantikörperlösung (Goat Anti Mouse FITC, verdünnt mit Roti Block) 30 min bei 37 °C bei 600 rpm einem Thermoschüttler inkubiert. Nach der Anfärbung mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen dreifach mit PBS^{+/+} gewaschen und zentrifugiert.

Zur Anfärbung der DNA im Zellkern wurden je Probe 168 µl 0,01 %ige RNase in PBS-/- und 1,7 µl einer PJ-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Zellen wurden dann für fünf Minuten im Dunkel inkubiert, bevor sie im Durchflusszytometer analysiert wurden.

4.4.1 Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ermöglicht die Erfassung einer Vielzahl von Parametern bei einer großen Anzahl einzelner Zellen in kurzer Zeit. Dadurch ist es möglich, homogene Subpopulationen in einer heterogenen Population zu identifizieren. Ein typisches Durchflusszytometer besteht aus drei funktionalen Einheiten. Erstens besitzt es eine oder mehrere Laserquellen und ein Sensorsystem, das zweitens aus einer Proben-/Flusskammer und optischen Aufbauten besteht. Um einen Fluss aus hintereinander fließenden Zellen zu erreichen, werden in Durchflusszytometern meist hydraulische Systeme, die die Zellen durch die Proben-/Flusskammer befördern, eingesetzt. Schließlich wird ein Computer benötigt, der die Daten sammelt und durch analytische Routinen darstellt (Marion G. Macey, 2007).

Für die Untersuchung der bestrahlten Proben auf CPD-Schäden wurde hier das Durchflusszytometer Guava easyCyte 8HT von Millipore genutzt. Nach der Anfärbung der CPD-Schäden konnten die Proben direkt in den 96-Well-Platten im Durchflusszytometer gemessen werden. Für die Auswertungen der Messungen wurde das Programm "Flowing Software" verwendet und die Ergebnisse in Sigmaplot graphisch dargestellt.

4.4.2 Auswertung

Zur Analyse wurden die Daten aus der Durchflusszytometermessung in die Flowing Software überführt. Im ersten Schritt, zu sehen in Abbildung 9, sind die Zellen nach ihrer Größe und Granularität aufgetragen worden. Um zu verhindern, dass störende Partikel mit analysiert werden, wurde der Bereich im Diagramm, in dem sich erwartungsgemäß die gewünschten Zellen befanden, markiert. Die Markierung wird als „Gate“ bezeichnet. Wird ein Gate gesetzt, werden in den Folgeschritten nur die Zellen analysiert, die sich in diesem Gate befinden. Die in (1) durch das Gate markierten Zellen wurden in den nächsten Schritt weitergeleitet. Zum Ausschluss von Zelldubletten wurde die rote Fluoreszenz in Intensität und Breite aufgetragen. Detektiert wurde hier die emittierte Fluoreszenz des in die DNA stöchiometrisch interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PJ. Der Bereich, in dem die Einzelzellen zu erwarten

waren, wurde hier ebenfalls durch ein Gate markiert und in den nächsten Analyseschritt überführt. In diesem Schritt wurden die erfassten Zellen über das PJ-DNA-Signal in die Phasen G1, S und G2/M unterteilt, wobei nur die G1-Phase in die weitere Analyse übernommen wurde. Als letztes wurde die Intensität der CPD-Schäden in den Zellkernen der G1-Phase, über die Messung der emittierten grünen Fluoreszenz der angefärbten CPDs, erfasst. Die Anzahl der detektierten Zellen betrug immer mindestens 5000 Zellen in der G1-Phase pro Messung.

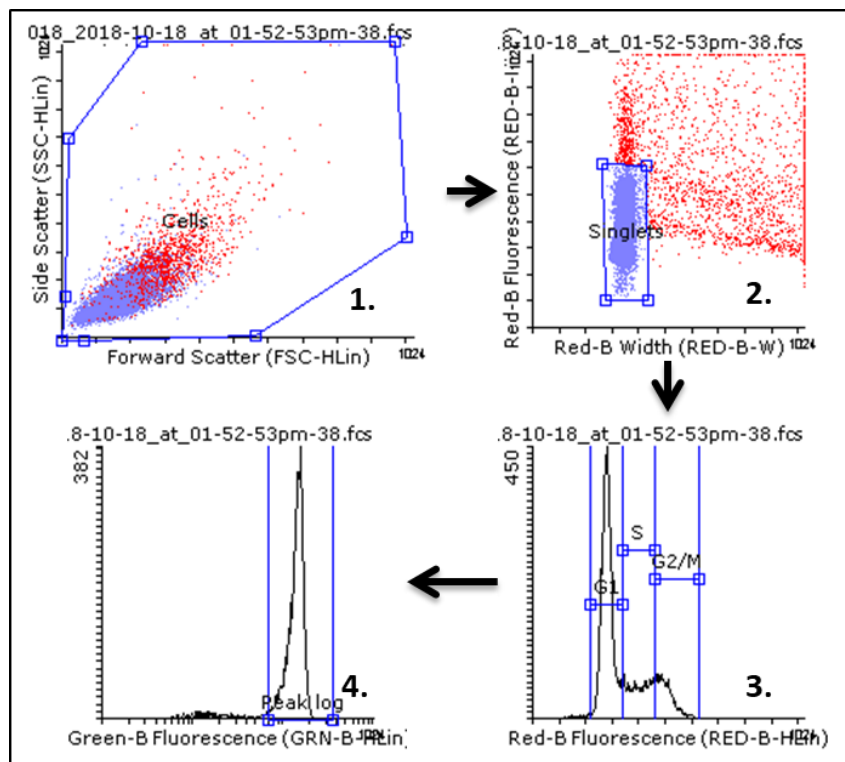


Abbildung 9: Analyse der CPD-Schäden via Flowing Software.

Im 1. Schritt werden die gemessenen Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Der blaue Rahmen zeigt das „Gate“, das nur die gewünschten Zellen in den nächsten Schritt weiterleitet. Dadurch wird verhindert, dass störende Partikel in die Analyse mit eingehen. In Schritt 2 werden die Einzelzellen von den Zelldoubletten separiert und in das dritte Analyse-Histogramm weitergeleitet. Durch das Auftragen der roten Fluoreszenz, die von dem in die DNA interkalierenden Farbstoff PJ emittiert wird, in dessen Signalintensität und Signalbreite, kann zwischen den Einzelzellen und Doubletten unterschieden werden. Für die Weiterleitung der gewünschten Einzelzellen wird ein weiteres Gate in den Bereich gelegt, in dem diese erwartet werden. Der 3. Schritt unterscheidet die Zellzyklus-Phasen in denen sich die Zellen befinden über das DNA-PJ-Signal. Hier werden ausschließlich die Daten der Zellen aus der Phase G1 in den letzten Analyseschritt weitergeleitet. Hier (4.) wird dann die Intensität der emittierten grünen Fluoreszenz der angefärbten CPD-Schäden pro Zellkern ermittelt.

Für die Darstellung der Daten wurde der Hintergrund der Messung, also das gemessene CPD Signal der unbestrahlten Proben von Signalen der bestrahlten Proben abgezogen. Im Versuch zur Reparaturkinetik wurden die Werte der unbestrahlten Proben nach 0 h und 168 h Reparaturzeit abgezogen. Desweiteren sind die Ergebnisse zur Reparaturkinetik normiert

worden. Dazu wurde der Initialschaden, das heißt der ermittelte Schaden direkt nach der Bestrahlung, als hundert Prozent definiert. Alle anderen Werte sind zum prozentualen Anteil gegenüber dem Initialschaden umgerechnet worden.

Das Verhalten der zu ermittelnden Reparaturkinetiken entspricht einer Zerfallskinetik 1. Ordnung und kann wie folgt beschrieben werden.

$$N(t) = N_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

N_i steht hier für den induzierten Schaden zum Zeitpunkt $t = 0$ h (Abgelöst direkt nach Bestrahlung). Definiert ist die Reparaturzeitkonstante als der Zeitraum, in dem die Anzahl der Schäden auf 37 % gegenüber dem anfänglich induzierten Schaden abgesunken ist. Daraus ergibt sich, dass τ als Maß für die Geschwindigkeit eines Reparaturprozesses herangezogen werden kann.

4.5 Methylierung der Reparatur-Gene

4.5.1 Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung

Der Schlüssel zur Bestimmung von methyliertem Cytosin basiert auf der selektiven chemischen Reaktion von Natrium-Bisulfit mit Cytosin, die bei methylierten Cytosin hingegen nicht stattfindet. Diese Reaktion ist einzelstrangspezifisch. Daher ist es wichtig sicherzustellen, dass die genomische DNA vor der Bisulfitreaktion vollständig denaturiert vorliegt. Cytosin ist in der Lage über die 5-6 Bindung mit dem Bisulfit-Ion ein Addukt zu bilden (Esteller, 2004). Bei der Reaktion mit Natrium-Bisulfit und einem unmethylierten Cytosin entsteht durch Desaminierung ein Uracil, welches in einer PCR in ein Thymin umcodiert wird (Huang et al., 2010). Die Folge ist ein Sequenzunterschied in ursprünglich methylierter DNA im Vergleich zu der ursprünglich unmethylierten DNA. Aufgrund des Sequenzunterschieds kann die DNA Methylierung dann durch verschiedene PCR- oder Sequenzieretechniken untersucht werden.

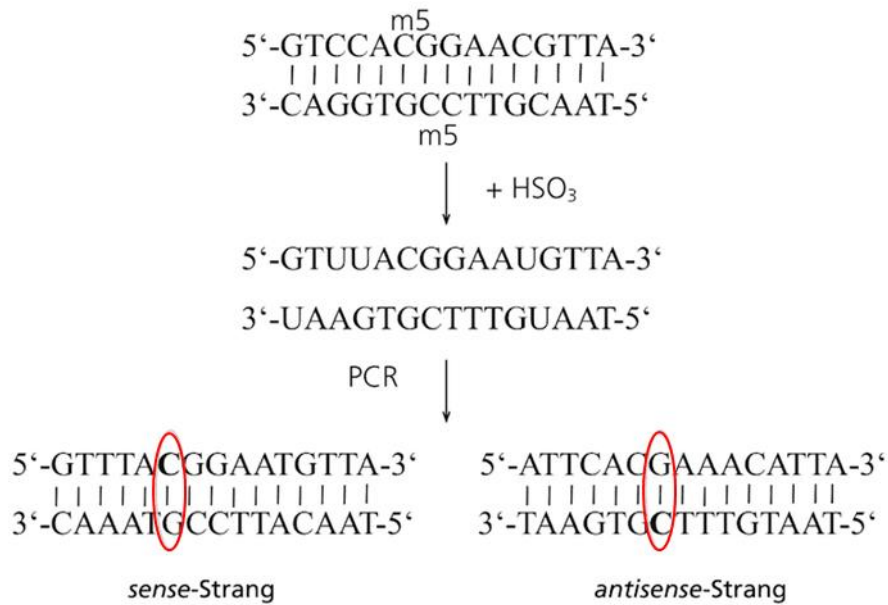


Abbildung 10: Prinzip der Bisulfit-Konvertierung (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Wird die DNA mit Bisulfit (HSO₃-) behandelt erfolgt eine Konvertierung von Cytosin zu Uracil. Mit einer im Anschluss folgenden PCR wird der sense- und antisense-Strang amplifiziert, wobei das Uracil durch Thymin ausgetauscht wird. Alle methylierten Cytosine (mC5) sind vor dieser Reaktion geschützt und bleiben als Cytosine erhalten.

Die Desaminierung von Cytosin durch eine Bisulfitbehandlung beinhaltet drei Schritte. Erstens die Addition von Bisulfit an die 5-6 Doppelbindung des Cytosin. Zweitens die hydrolytische Desaminierung des resultierenden Cytosin-Bisulfit-Derivats, um ein Uracil-Bisulfit-Derivat zu erhalten. Der dritte Schritt ist das Entfernen der Sulfonat-Gruppe durch eine nachfolgende alkalische Behandlung, um zum Endprodukt Uracil zu gelangen (Susan et al., 1994). In einer nachfolgenden PCR werden die uracilhaltigen Matrizen in Amplifikationsprodukte mit Thymin umcodiert und vervielfältigt. In der amplifizierten DNA findet man dann in einer Sequenzierung das Cytosin ausschließlich an den Positionen, an denen vorher 5mC vorhanden war (R. Knippers, 2006).

Für die Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung der DNA in dieser Arbeit wurde das Kit *EZ DNA Methylation-Lightning*TM von der Firma Zymo Research verwendet. Dazu wurden 20 µl mit 0,5 – 1 µg isolierter DNA eingesetzt und zum Schluss mit 50 µl M-Elution Puffer eluiert. Gelagert wurde die Bisulfit-DNA bei -20 °C.

4.5.2 Pyrosequenzierung

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um eine etablierte Methode, die auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese basiert. Diese Technologie ermöglicht es epigenetische Veränderungen der DNA-Methylierung zu identifizieren und quantifizieren. Genutzt wird, zum Ablesen der DNA hierbei die Fähigkeit der Polymerase. Für die Sequenzierung wird zunächst ein spezieller Sequenzierprimer an die DNA angelagert. Danach werden DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase, dNTPs, Adenosin-5'-Phosphosulfat, sowie Luciferin hinzu gegeben. Ist eines der hinzugegebenen dNTPs komplementär zu einer Base in der Ziel-DNA, dann katalysiert die DNA-Polymerase dessen Einbau in den neusynthetisierten Strang. Dabei kommt es zur Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i), wobei die Anzahl des freigesetzten PP_i äquivalent zu der Menge des eingebauten Nukleotids ist. Die ATP-Sulfurylase setzt das PP_i in ATP um. Mit Hilfe des ATP wandelt die Luciferase das Luciferin in Oxyluciferin um. Bei der Umwandlung entsteht ein detektierbares Licht (in Form eines Lichtblitzes). Die gemessene Lichtstärke ist dabei ebenfalls proportional zum eingebauten Nukleotid. Die Apyrase baut vor der nächsten Zugabe von dNTPs überschüssiges Nukleotid ab (U. Lehmann, 2008).

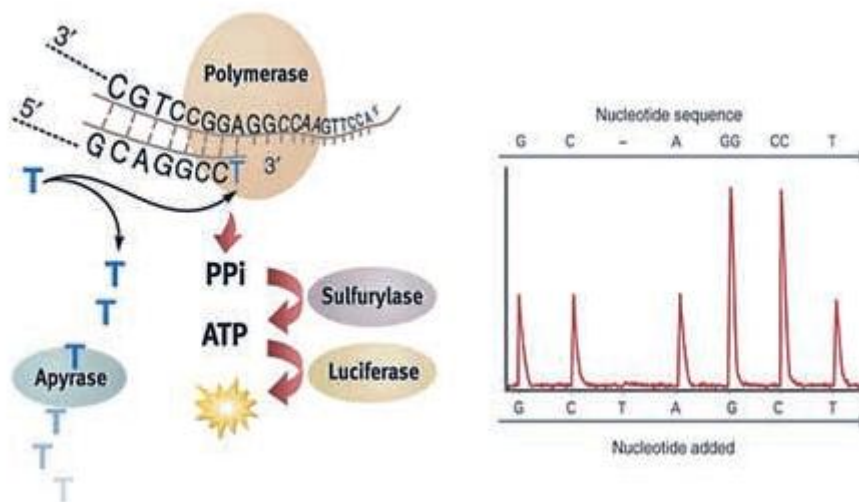


Abbildung 11: Prinzip der Pyrosequenzierung (U. Lehmann, 2008).

Nucleotide (hier T), die nach der Sequenz des Sequenzierprimers eingebaut werden sollen, liegen nicht im Reaktionsansatz vor. Sie werden separat hinzu pipettiert. Das durch den Nucleotideinbau freigesetzte Pyrophosphat (PP_i) setzt eine enzymatische Reaktionkaskade in Gang, die am Ende einen Lichtblitz freisetzt. Dessen Intensität ist proportional zu der eingebauten Menge an Nucleotiden. Vor einer erneuten Zugabe eines Nucleotids (A,T,C oder G) wird das überschüssige Nucleotid aus der Vorreaktion von der Apyrase abgebaut.

Damit die gewünschten Abschnitte der Bisulfit-behandelten DNA (BS-DNA) sequenziert werden konnten, wurde eine Nested-PCR durchgeführt um die zu untersuchende Sequenz spezifisch zu vervielfältigen. Dafür wurden in einer ersten PCR zunächst längere Teilstücke der Gene XPA, XPB, XPC, XPD und GADD45a der BS-DNA amplifiziert. Für die PCR wurde die BS-DNA, sowie *forward* und *reverse*-Primer in den *MyTaq™ HS Red* Mastermix überführt. Diese Reaktionslösung beinhaltet einen geeigneten Puffer, hitzestabile DNA-Polymerase (hier *Taq*-Polymerase) und dNTPs. Tabelle 8 zeigt den verwendeten Ansatz zur Durchführung der ersten Nested-PCR. Nach der PCR wurde der Ansatz 1:5 mit H₂O verdünnt. Der zweite Ansatz wurde ebenfalls mit einem forward- und reverse-Primer und der *MyTaq™ HS Red Mix* Lösung angesetzt. Mit diesem Ansatz konnte dann ein Abschnitt innerhalb des PCR-Produktes amplifiziert werden, während ungewollte, unspezifisch vervielfältigte Nebenprodukte der ersten Runde aufgrund der Spezifität der Primer nicht weiter vervielfältigt wurden. Der Reaktionsansatz der zweiten Nested-PCR kann der Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 8: Reaktionsansatz der ersten Nested-PCR für die Amplifizierung aller Ziel-Gene.

Reaktionskomponenten	Volumen in µl
MyTaq Amplification mix (2x)	17,5
primermix (F+R); 10x	6
BS-DNA template	11,5
total	35

Die zweite PCR unterschied sich in der Anzahl der Zyklen, sowie den Annealing-Temperaturen der Primer. Das PCR-Programm für die Nested-PCR1 und Nested-PCR2 wird in Tabelle 9 und Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 9: Nested-PCR1-Programm.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C 59 °C 72 °C	20 s 20 s 15 s
Annealing		
Elongation		
Finale Elongation	72 °C	30 s
Kühlung	4 °C	Pause

Tabelle 10: Reaktionsansatz der zweiten Nested-PCR zur spezifischen Amplifikation der Ziel-Gene.

Reaktionskomponenten	Volumen in μl
PCR-H ₂ O	12
MyTaq Amplification mix (2x)	17,5
primer (F+R); 10x	3,5
Evagreen	1
BS-DNA template	1
total	35

Tabelle 11: Nested-PCR2-Programm.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C Primer spezifisch 72 °C	20 s 20 s 15 s
Annealing		
Elongation		
Finale Elongation	72 °C	30 s
Kühlung	4 °C	Pause

Zur Überprüfung der Qualität, sowie des Erfolges der Amplifizierung wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 5 μl der Proben in einem 2 %igen TBE-Agarose-Gel für 20 min bei 90 V aufgetrennt. Zur Detektion der PCR-Produkte auf einem UV-Transilluminator wurde das Gel (40 ml) vor dem Gießen zusätzlich mit 2,5 μl des Farbstoffes DNA Stain Clear G (SERVA Electrophoresis GmbH) versetzt. Ein TBE-Puffer diente als Laufpuffer. Als Marker wurden 5 μl *Quick Load® 2-Log DNA Ladder* von der Firma New England BioLabs parallel zu den Proben aufgetragen.

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde mit dem *Pyromark Gold Kit* am Pyrosequenzierer der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Die Kalkulation der verwendeten Mengen an Enzym, Substrat und Nukleotiden wurde mit der *PyroMark Q24*-Software ermittelt. Je nach Bandenstärke im Agarosegel wurden wurden 15 – 20 μl PCR-Produkt zur Sequenzierung verwendet. Ebenfalls wurde der Sequenzprimer in einer Konzentration von 0,3 μM eingesetzt. Die Abfolge der zugegebenen Nukleotide (Dispensation Order) wurde mit Hilfe der PyroMark Software ermittelt und ist in der Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Dispensationsreihenfolge der Kandidatengene für die Pyrosequenzierung.

Ziel-Gen	Dispensation Order
GADD45a	GATGTCAGTCAGTCGAGGTCAGTCGAGATGTCGCTA
XPA	TGTCAGTCAGTCGATCGGTTAGTCGATGTCAGTCGCT CTAGAGCTCGATCAGTC
XPB	GTCGATGTCGTATCAGTCGTGAGTATCGTAGTCAGTC GTGATCG
XPC	GTCGTATCAGTCAGTCAGTCAGTCGGATGTCAGTCG GTATCAGTCGATAGTCG
XPD	GTCGTATATAGTGATGTCGATGTTTCGAGATGCTCGAT CGTATCAGTTCGT

Ausgewertet wurde die Pyrosequenzierung mit Hilfe der *PyroMark Q24* – Software, die eine prozentuale Angabe des Methylierungsstatus der einzelnen CpGs in der zu untersuchenden Sequenz wiedergab.

4.6 Analyse der Expression von Reparaturgenen

Mit der Methode der quantitativen PCR (qPCR) wurde eine Untersuchung der Expressionsmuster nach verschiedenen Strahlungskombinationen durchgeführt. Dafür wurde zunächst die isolierte mRNA aus den bestrahlten Zellen einer reversen Transkription unterzogen und in cDNA umgeschrieben. Anschließend konnte mittels einer quantitativen Real-Time-PCR die relative Menge der Transkripte bestimmt werden.

4.6.1 Reverse Transkription

Durch den Gebrauch des *SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit* der Firma Bioline GmbH wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Dieses Kit verwendet für das Annealing *OligoT*- und *Random-Hexamer*-Primer. Es wurde jeweils 1 µg mRNA eingesetzt und die Reaktion wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt. Nach der Reaktion wurde die cDNA in einem Verhältnis von 1:5 mit H₂O verdünnt und konnte dann bei einer Temperatur von -20 °C gelagert werden.

4.6.2 Quantitative PCR

Im Gegensatz zur klassischen Endpunkt-PCR wird der quantitativen PCR ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Dieser Farbstoff (z.B. SYBR) fluoresziert nach Interkalation in der doppelsträngigen DNA. Das bedeutet, dass die Fluoreszenz proportional zu der Amplifikation der DNA zunimmt. Mittels Ct Werte (threshold cycle) basierend auf den Anstieg der Fluoreszenz können die Proben miteinander über Housekeeping-Gene verglichen werden und ermöglicht so, dass die PCR quantitativ ausgewertet werden kann (Schmidt, 2017).

Eingesetzt wurde hier das qPCR-Kit *SensiMix™ SYBR® No-ROX* der Firma BIOLINE. Hierfür wurde ein Mastermix, wie in Tabelle 13 gezeigt, angesetzt.

Tabelle 13: MasterMix für einen Reaktionsansatz von 20 µl.

Reagenz	Volumen in µl
SensiMix 2x Mix	10
Primer 10x (jeder 3 µM)	2
Template	5
H ₂ O	3

Anschließend wurden die Proben in dem RealTime-qPCR Gerät eingesetzt und nach Protokoll wie in Tabelle 14 gefahren.

Tabelle 14: Real Time quantitative PCR-Protokoll.

Step	Temp	Time	Cycles
Initialisierung der Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	45x
Annealing	61,5 °C	20 s	
Extension	72 °C	20 s	
Schmelzkurve	60 bis 95 °C	10 min	1X

Dafür wurden standardmäßig 45 Zyklen und eine Aneling-Temperatur von 61,5 °C verwendet. Für eine robuste relative Quantifizierung wurden drei Housekeeping-Gene verwendet. Bei diesen Genen handelte es sich um β -Aktin (ACTB), die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und das TATA-Box-bindendes Protein (TBP). Ausgewertet wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, wobei jeweils das geometrische Mittel der drei Housekeeping Gene bei der Berechnung eingesetzt wurde.

Das $\Delta\Delta C_T$ beschreibt die Differenz zwischen dem ΔC_T -Wert der bestrahlten Probe und der unbestrahlten Probe. Wobei der ΔC_T -Wert folgendermaßen beschrieben wurde.

$$\Delta C_T = C_T(\text{bestrahlte Probe}) - C_T(\text{Housekeeping Gen})$$

4.7 Statistische Analyse

Für die qPCR-Ergebnisse und die Methylierungsanalyse wurde die Signifikanz der Änderung im Vergleich zur Kontrolle über einen t-Test mit Hilfe der Daten-Analyse-Funktion von Sigmaplot durchgeführt.

Die ermittelten p-Werte gaben einen Aufschluss über die Signifikanz der ermittelten Änderungen. P-Werte kleiner als 0,05 wurden mit einem *, p-Werte kleiner 0,01 mit zwei ** und p-Werte unter 0,001 mit drei *** gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Dosisseffekt, Reparaturkinetik und Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten

5.1.1 Dosisseffekt

In einem ersten Versuch sollte überprüft werden, ob und bis zu welcher Dosis die flußzytometrisch bestimmte CPD-Schadensinduktion noch einer linearen Dosis-Effekt-beziehung folgt.

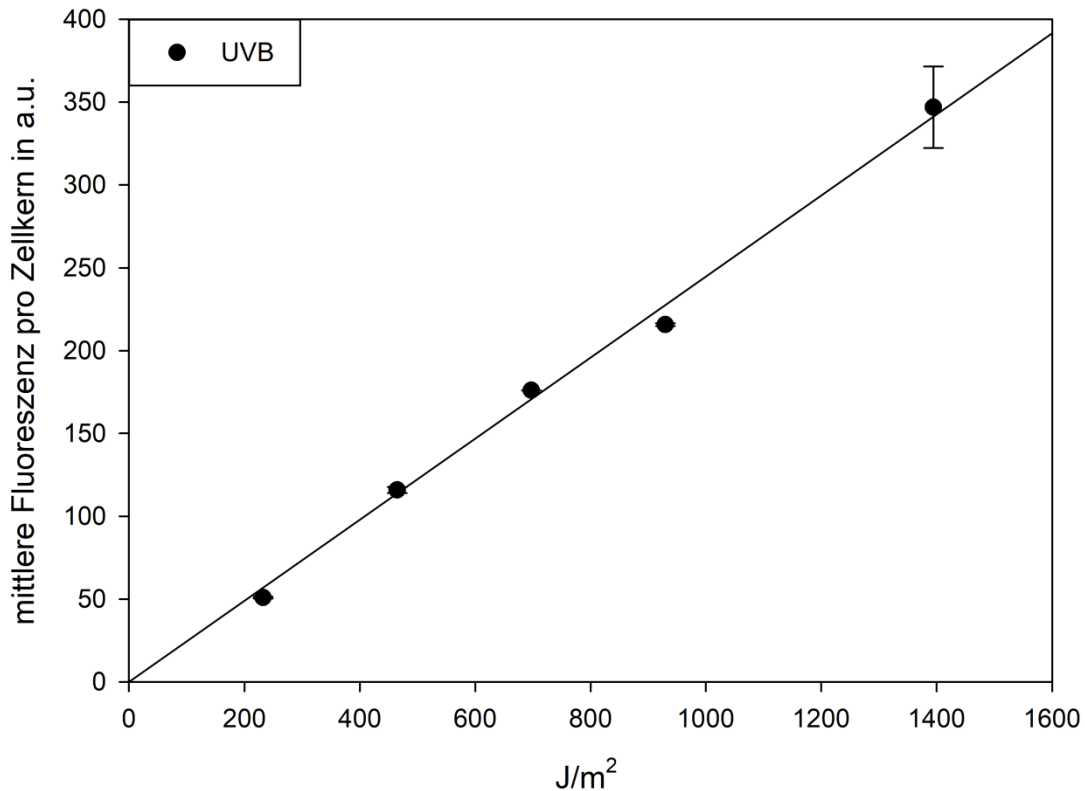


Abbildung 12: Dosisseffekt

Das Diagramm zeigt die CPD-Schadensinduktion in Abhängigkeit von der UV-Dosis. Für die Ermittlung der Datenpunkte wurden die Zellen mit den Dosen $210 J/m^2$, $420 J/m^2$, $630 J/m^2$, $717 J/m^2$, $840 J/m^2$ und $1260 J/m^2$ UVB bestrahlt und direkt nach Bestrahlung fixiert, sowie die CPD-Schäden immunhistochemisch markiert. Jeder Datenpunkt setzt sich aus einer Doppelbestimmung zusammen wodurch sich die gezeigten Standardabweichungen ergaben.

Die Daten der durchflußzytometrischen Messung zeigten in einem Dosisbereich von 0 bis $1260 J/m^2$ einen linearen Anstieg der CPD-Schäden (siehe Abbildung 12). Auch bei der

höchsten Dosis (die höher ist als die in den folgenden Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten) wird keine Sättigung des Signals erreicht. Damit ist davon auszugehen, dass alle CPD Messungen dieser Arbeit im linearen Bereich des Assays stattfanden.

5.1.2 Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion

Um die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion zu untersuchen, wurden die Zellen unter Verwendung der KAUVIR-Quelle mit UVA, UVB, einer Kombination UVA+UVB oder mit dem Gesamtspektrum UVB+UVA+VIS+IRA bestrahlt.

Die Proben wurden mit den folgenden Dosen bestrahlt:

Für gesamtes Spektrum: UVB 462 J/m², UVA 29 kJ/m², VIS 78 kJ/m² und IRA 236 kJ/m².

Für UVA+UVB Kombination: UVB 441 J/m² und UVA 28 kJ/m².

Für Einzelbestrahlung: UVB 420 J/m², UVA 27 kJ/m², VIS 58 kJ/m² und IRA 160 kJ/m².

Die leicht voneinander abweichenden Dosen zwischen den verschiedenen Quellenkombinationen und Einzelquellen ergeben sich durch den Anteil, den die jeweils zugeschalteten Quellen mit einbringen (vgl. Bestrahlungsstärke Tabelle 4). Für die Bestrahlung mit dem kompletten Spektrum der KAUVIR-Lampe summierten sich die Dosen dann zu 0,5 MED. Um den Einfluss der einzelnen Quellen und der UVA+UVB Kombination bei der CPD Induktion zu überprüfen, wurde jeweils mit der gleichen Bestrahlungszeit, die bei der Kombinationsbestrahlung gewählt wurde, bestrahlt. Somit war ein Vergleich der Schadensinduktion für die eingesetzten Spektren möglich (siehe Abbildung 13).

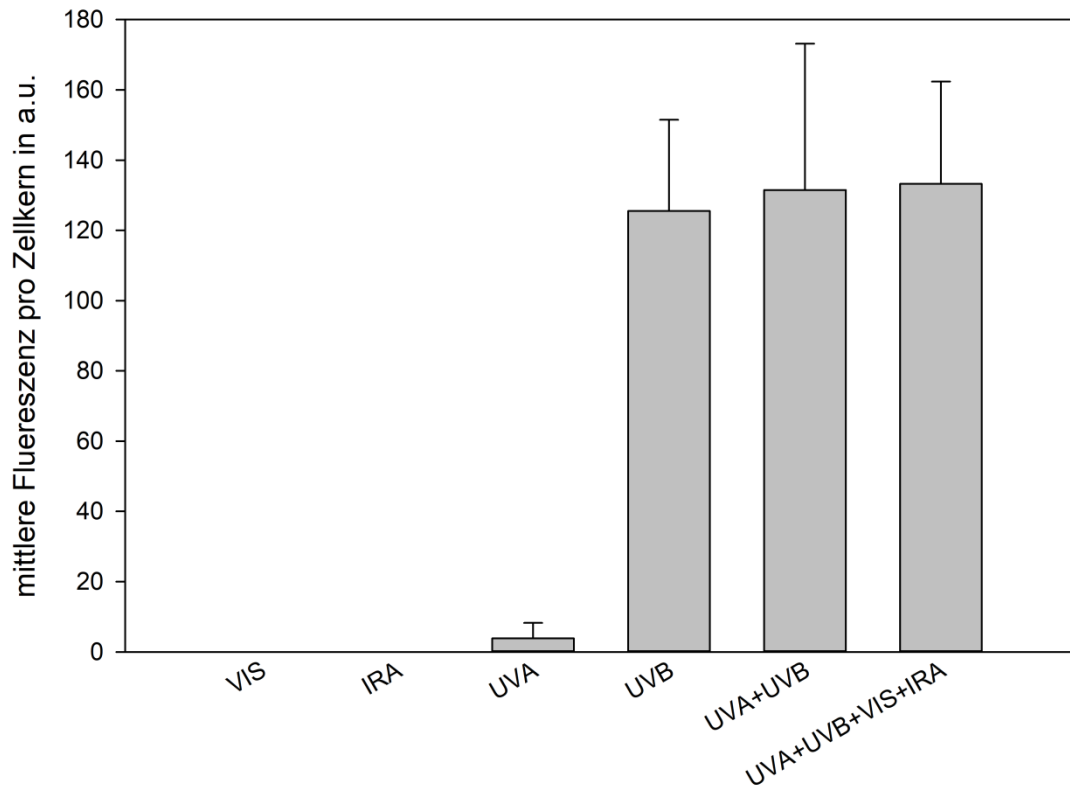


Abbildung 13: CPD-Induktion nach unterschiedlichen Strahlenqualitäten und –Kombinationen. Beim kompletten Spektrum (UVA+UVB+VIS+IRA) wurden die Dosen UVB 462 J/m^2 , UVA 29 kJ/m^2 , VIS 78 kJ/m^2 und IRA 236 kJ/m^2 , sowie für die UVA+UVB Kombination die Dosen UVB 441 J/m^2 und UVA 28 kJ/m^2 und für die Einzelbestrahlungen die Dosen UVB 420 J/m^2 , UVA 27 kJ/m^2 , VIS 58 kJ/m^2 und IRA 160 kJ/m^2 eingesetzt. Durch die einheitliche Bestrahlungszeit konnte der jeweilige Anteil bzw. Einfluss in Bezug auf die CPD Induktion bestimmt werden. Für die Ermittlung der Daten wurden mindestens vier Versuche durchgeführt aus denen sich die gezeigte Standardabweichung ergab. In allen Versuchen wurden die Daten mit einer Doppelbestimmung ermittelt.

Der Erwartung entsprechend bewirkten VIS und IRA keine CPD-Schäden. Durch UVA wurde eine kleine Menge (4 a.u.) an CPD-Schäden induziert. Diese entspricht nur ca. 3 % des Schadens, der durch UVB allein induziert wurde und für den in diesem Versuchen im Mittel ein Schadenssignal von 125 a.u. gemessen wurde. Für die Bestrahlungskombinationen UVA+UVB und UVA+UVB+VIS+IRA wurde eine vergleichbare Anzahl von Schäden nachgewiesen. Die Schäden nach der UVA+UVB Kombination lagen bei 132 a.u. und entsprechen damit der Induktion nach dem kompletten Spektrum (133 a.u.). Hiermit deutet sich an, dass die UVA induzierten Schäden sich zu den Schäden von UVB addierten und sich kein protektiver oder verstärkender Effekt durch gleichzeitige Bestrahlung der unterschiedlichen Strahlenqualitäten einstellt. Auch VIS und IRA scheinen keinen Einfluss auf die CPD-Induktion zu haben, da der CPD-Schaden im kompletten Spektrum dem nach UVA+UVB entspricht.

5.1.3 Reparaturkinetik

Viele Faktoren, z.B. die Anzahl der Schäden oder die Qualität der Gesamtschädigung in Abhängigkeit von der Strahlenqualität, können den Reparaturprozess der UV-induzierten DNA-Schäden beeinflussen. Um einen möglichen Einfluss von UVA, VIS und IRA auf die Reparatur von UVB-induzierten CPDs zu untersuchen, wurde die Reparaturkinetik nach UVB allein, nach UVA+UVB und nach UVA+UVB+VIS+IRA in HaCaT bestimmt. Die Proben wurden mit den folgenden Dosen bestrahlt:

Für gesamtes Spektrum: UVB 462 J/m^2 , UVA 29 kJ/m^2 , VIS 78 kJ/m^2 und IRA 236 kJ/m^2 .

Für UVA+UVB Kombination: UVB 441 J/m^2 und UVA 28 kJ/m^2 .

Für Einzelbestrahlung: UVB 420 J/m^2 .

Die leicht voneinander abweichenden Dosen zwischen den verschiedenen Quellenkombinationen und Einzelquellen ergeben sich durch den Anteil, den die jeweils zugeschalteten Quellen mit einbringen (vgl. Bestrahlungsstärke Tabelle 4). Nach der Bestrahlung wurden die Petrischalen im Brutschrank, bis zum Ablösen der Zellen, für eine Reparaturzeit von 0 bis 168 h inkubiert. Alle induzierten Schäden, waren nach sieben Tagen weitestgehend repariert (siehe Abbildung 14).

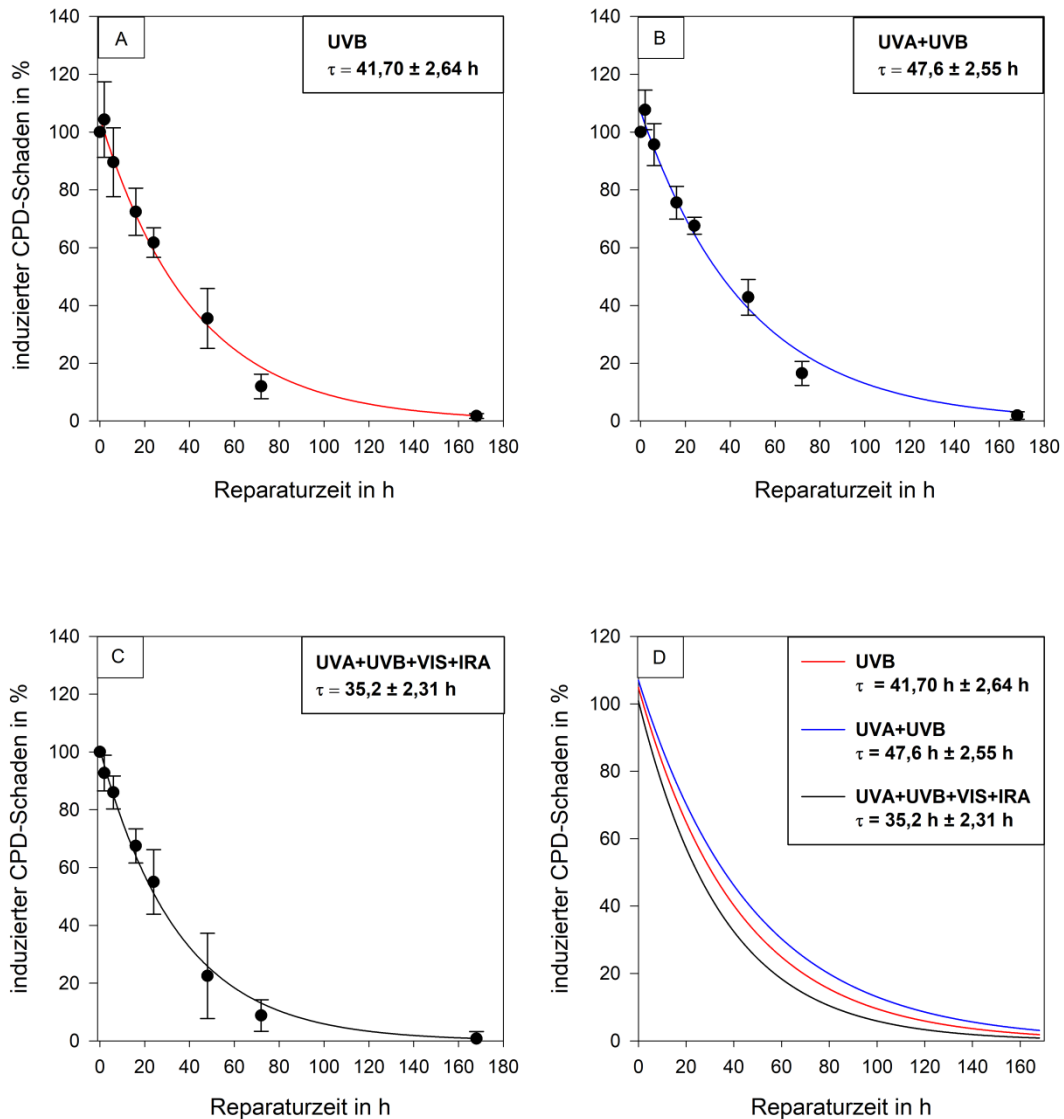


Abbildung 14: CPD-Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen Bestrahlungen.

In den Diagrammen A bis C sind die CPDs in Abhängigkeit von der Reparaturzeit mit der jeweils berechneten Kinetik zu sehen. Diagramm D fasst die ermittelten Kinetiken aus A bis C zusammen. Aus den Daten wurde die Reparaturzeitkonstante τ bestimmt, welche ein Maß für die Geschwindigkeit der Reparatur darstellt. Die Proben wurden mit den folgenden Dosen in unterschiedlichen Kombinationen bestrahlt: UVB 462 J/m^2 , UVA $28,5 \text{ kJ/m}^2$, VIS $77,8 \text{ kJ/m}^2$ und IRA $253,6 \text{ kJ/m}^2$. Anschließend wurden die Zellen nach Bestrahlung für definierte Zeiten von 0 - 168 h inkubiert und dann für die Messung im Durchflusszytometer präpariert. Die induzierten CPDs wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen und auf den Initialschaden normalisiert. Für die Ermittlung der Daten wurden mindestens vier Versuche durchgeführt aus denen sich die gezeigte Standardabweichung ergab. In allen Versuchen wurden die Daten mit einer Doppelbestimmung ermittelt.

Unabhängig von den eingesetzten Strahlenqualitäten war 168 h nach Bestrahlung nur noch ein sehr geringer Restschaden messbar, d.h. praktisch alle CPDs waren repariert (siehe Abbildung 13). Es zeigte sich jedoch, dass sich die zeitlichen Verläufe der jeweiligen Kinetiken (siehe Abbildung 14 D) unterschieden d.h., die verschiedenen Strahlenqualitäten und Kombinationen auch zu unterschiedlichen Reparaturzeitkonstanten (τ) führen. Die Reparaturzeitkonstanten lagen für UVB bei 41,70 h, für UVA+UVB bei 47,6 h und für UVA+UVB+VIS+IRA bei 35,2 h. Besonders auffällig war, dass sich die Reparatur nach der

Bestrahlung mit dem vollen Spektrum im Vergleich zu den beiden anderen Bestrahlungen als deutlich schneller erwies. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Infrarotstrahlung einen beschleunigenden Einfluss auf die Reparatur der durch UV verursachten DNA-Schäden haben könnte. Um diesen Effekt (mechanistisch) weiter zu analysieren, wurde im Folgenden die Expression bestimmter Reparaturgene nach Applikation unterschiedlicher Bestrahlungsqualitäten untersucht (Siehe Kapitel 6.2).

5.2 Analyse der Reparaturgenexpression

Mit Hilfe von quantitativer PCR wurde die Expression von Reparaturgenen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenqualitäten verglichen. Untersucht wurden zum einen Reparaturgene der XP-Familie, die an der NER beteiligt sind und zum anderen das Gen *GADD45A*, welches als Antwort auf Stressfaktoren (wie. Z.B. UV-Strahlung) exprimiert wird und auch einen Einfluss auf DNA-Methylierungen aufweist.

Die Proben wurden mit den folgenden Dosen bestrahlt:

Für gesamtes Spektrum: UVB 462 J/m², UVA 29 kJ/m², VIS 78 kJ/m² und IRA 236 kJ/m².

Für UVA+UVB Kombination: UVB 441 J/m² und UVA 28 kJ/m².

Für VIS+IRA Kombination: VIS 58 kJ/m² und IRA 160 kJ/m².

Für Einzelbestrahlung: UVB 420 J/m² und UVA 27 kJ/m².

Die schwach voneinander abweichenden Dosen zwischen den verschiedenen Quellenkombinationen und Einzelquellen ergeben sich durch den Anteil, den die jeweils zugeschalteten Quellen mit einbringen (vgl. Bestrahlungsstärke Tabelle 4). Die Expression der Gene wurde 6 h und 24 h nach Bestrahlung untersucht.

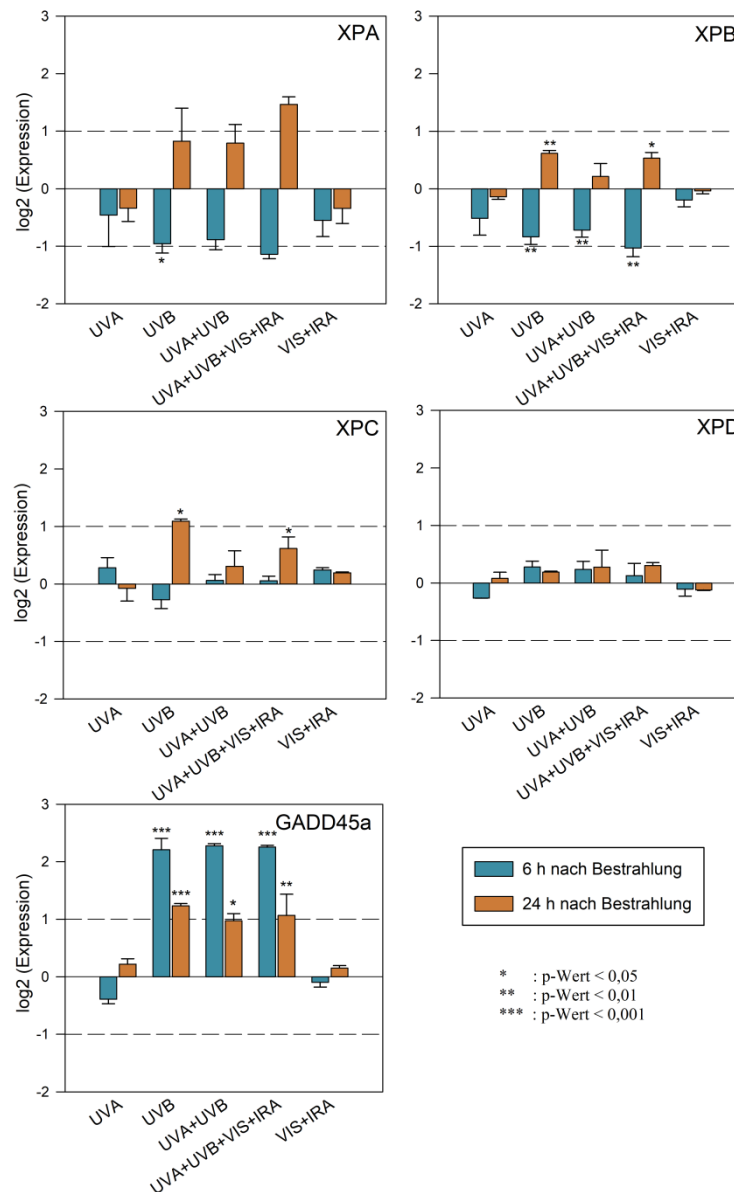


Abbildung 15: Darstellung des Expressionsmusters der XP-Gene und des GADD45A Gens.

HaCaT-Zellen wurden mit UVA, UVB, UVA+UVB, UVA+UVB+VIS+IRA und VIS+IRA bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 6 bzw. 24 h lysiert. Beim kompletten Spektrum (UVA+UVB+VIS+IRA) wurden die Dosen UVB 462 J/m², UVA 29 kJ/m², VIS 78 kJ/m² und IRA 236 kJ/m², sowie für die UVA+UVB und VIS+IRA Kombinationen die Dosen UVB 441 J/m², UVA 28 kJ/m², VIS 58 kJ/m² und IRA 160 J/m² und für die Einzelbestrahlungen die Dosen UVB 420 J/m² und UVA 27 kJ/m² eingesetzt. Für die Ermittlung der Daten wurden mindestens vier Versuche zu jeder Strahlenqualität und Kombination, sowie zu den einzelnen Genen durchgeführt, aus denen sich die gezeigte Standardabweichung ergab.

Das Kandidaten-Gen *GADD45A* zeigte nach Bestrahlung einen signifikanten Anstieg der Expression nach einer Reparaturzeit von 6 h, jedoch nur in den Bestrahlungskombinationen, die UVB enthielten. Auch nach einer Reparaturzeit von 24 h zeigte sich weiterhin eine Hochregulierung des Gens, die nun jedoch geringer ausfiel als nach 6 h Reparaturzeit.

Im Gegensatz zu *GADD45A* deutet sich für die *XPA*- und *XPB*- Gene nach 6 h eine UV-induzierte Repression an (eine Veränderung, die ebenfalls nur nach Strahlenqualitäten, die

UVB enthielten, auftrat). Auffallend ist, dass beide Gene 24 h nach Bestrahlung hochreguliert wurden. Für *XPC* zeigte sich 6 h nach Bestrahlung kein Effekt, nach 24 h wurde das Gen, wie auch *XPA* und *XPB*, nach Bestrahlung mit Kombinationen, die UVB enthielten, hoch reguliert. Für *XPB* wurde weder nach 6 h noch nach 24 h Reparaturzeit eine strahlenabhängige Expressionsänderung beobachtet. Für alle anderen untersuchten Gene ist offensichtlich die Bestrahlung mit UVB eine Expressionsänderung ausschlaggebend, während UVA und VIS+IRA keinen Einfluss auf die Expression haben.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in den untersuchten Genen mit Ausnahme von *XPB* eine strahleninduzierte Antwort in der Expression zu messen ist. Diese ist jedoch gebunden an eine UVB-Bestrahlung. Größere Unterschiede in der Expression dieser Gene bei den Kombinationen mit UVB sind nicht auszumachen. Die durch die Reparaturkinetiken ermittelte schnellere Reparatur nach UVA+UVB+VIS+IRA im Vergleich zu UVB oder UVA+UVB lässt sich daher vermutlich nicht durch die Expressionsdaten der in dieser Arbeit untersuchten Reparaturgene allein erklären.

5.3 Methylierungsanalyse

Da Genexpression von DNA-Reparaturgenen auch epigenetischer Kontrolle unterliegen kann (z.B. durch Hypo- bzw. Hypermethylierung von Promotorbereich der Gene, siehe Kap. 6.2), wurde in dieser Arbeit zusätzlich der Methylierungsstatus der Kandidaten-Gene in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UV-Qualitäten untersucht. Hierzu wurden eine Bisulfid-Konvertierung und anschließend eine Pyrosequenzierung der interessierenden Genabschnitte durchgeführt.

Die Promotoren aller untersuchten Gene erwiesen sich in den jeweiligen unbestrahlten Kontrollen als praktisch unmethyliert. Es wurde maximal eine Methylierung von ca. 4% der CpGs in den untersuchten Bereichen festgestellt. In Diese schwache Methylierung änderte sich sowohl abhängig von den eingesetzten Strahlenqualitäten als auch von den Inkubationszeiten nicht und offenbarte sich daher als sehr stabil.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass sich alle Promotoren der untersuchten Gene als nur schwach methyliert präsentierten und nur einige geringe, nicht signifikante, durch Strahlung induzierte Methylierungsänderungen in den Promotoren der Kandidaten-Gene gemessen werden konnten. Damit ist ein Einfluss der DNA-Methylierung dieser Gene sowohl auf die veränderte Expression nach (hauptsächlich) UVB (siehe 6.1) als auch auf die Unterschiede in der Reparaturkinetik (siehe 6.2) als eher gering einzuschätzen.

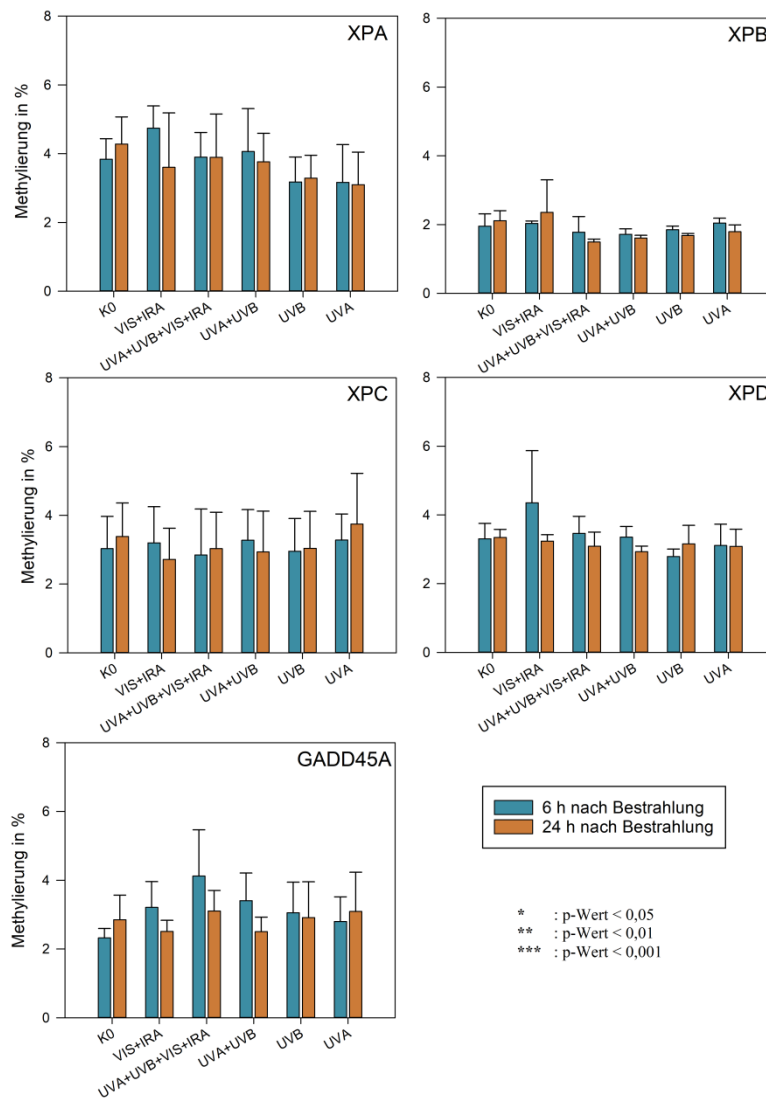


Abbildung 16: Expressionsmuster der XP-Gene und des GADD45A Gens.

In Türkis dargestellt sind die Proben, in denen der Methylierungsstatus 6 h nach Bestrahlung gemessen wurde. Proben, deren Methylierungsstatus 24 h nach Bestrahlung gemessen wurde, sind in Orange dargestellt. Die HaCaT-Zellen wurden mit UVA, UVB, UVA+UVB, UVA+UVB+VIS+IRA und VIS+IRA bestrahlt. Beim kompletten Spektrum (UVA+UVB+VIS+IRA) wurden die Dosen UVB 462 J/m², UVA 29 kJ/m², VIS 78 kJ/m² und IRA 236 kJ/m², sowie für die UVA+UVB und VIS+IRA Kombinationen die Dosen UVB 441 J/m², UVA 28 kJ/m², VIS 58 kJ/m² und IRA 160 kJ/m² und für die Einzelbestrahlungen die Dosen UVB 420 J/m² und UVA 27 kJ/m² eingesetzt. Zur Ermittlung der Daten wurden drei unabhängige Versuche zu jeder Strahlenqualität und Kombination, sowie zu den einzelnen Genen durchgeführt, aus denen sich die gezeigte Standardabweichung ergab.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung unterschiedlicher biologischer Effekte nach Kombinationsbestrahlung mit dem gesamten solaren Spektrum (UVB+UVA+VIS+IRA) im Vergleich zu Bestrahlungen mit den Einzelkomponenten. Dazu wurden die Bestrahlungsversuche mit einer neu entwickelten Bestrahlungseinheit, der KAUVIR-Lampe, durchgeführt, die es erlaubt, Kombinations- und Einzelbestrahlungen mit definierten Spektren und Bestrahlungsstärken durchzuführen. Dazu wurden Bestrahlungsversuche in HaCaT-Zellen zur Induktion von DNA-Schäden (CPD) und deren Reparatur, sowie Untersuchungen der Methylierung und Expression von Reparaturgenen und einem Tumorsuppressorgen (*GADD45A*) durchgeführt.

6.1 Dosiseffekt

Die Untersuchung des Dosiseffektes zeigte, dass der gewählte anti-CPD-Antikörperklon KTM53 auch bei einer hohen Anzahl an induzierten CDD-Schäden verlässliche Werte für den Fluoreszenznachweis von CPDs ergab. Bis zu einer UVB-Dosis von 1260 J/m² (entsprechend einer für den Einsatz in Zellkulturversuchen hohen Dosis von 1,5 MED) zeigte sich noch ein linearer Dosiseffekt. Die Bestrahlungsversuche wurden in Einzel- oder Kombinationsbestrahlung mit Dosen durchgeführt, die zwischen 0,5 und 1 MED lagen, sodass sichergestellt werden konnte, dass mögliche Veränderungen immer noch vor dem Hintergrund einer linearen Dosis-Effekt-Beziehung gemessen wurden.

6.2 Einfluss unterschiedlicher Strahlenqualitäten bei der CPD-Induktion

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Strahlenqualitäten erkennen zu können, wurde die Induktion von CPDs nach verschiedenen Bestrahlungen gegenübergestellt. Es ergab sich, dass durch VIS und IRA allein keine CPDs induziert wurden. UVA hingegen rief eine kleine, aber nachweisbare Anzahl an CPDs hervor. Dies steht im Einklang mit älteren Ergebnissen. Nachdem lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass UVA nur oxidative DNA-Schäden und Einzelstrangbrüche induzieren kann, wurde von Mouret et al. bereits 2006 beschrieben, dass UVA ebenfalls CPDs erzeugen kann. Es wurde sogar gezeigt, dass UVA-induzierte CPDs in menschlicher Haut den größten Anteil an UVA-induzierten DNA-Schäden ausmachen. Legt man das solare Spektrum zugrunde, ist die biologische Effektivität und

somit auch die Induktion von CPDs durch den UVB-Anteil des Spektrums jedoch um ein Vielfaches höher als durch den UVA-Anteil (Mouret et al., 2006). Wie in Abbildung 13 dargestellt, wird dieser Effekt auch nach Bestrahlung mit der sonnenähnlichen KAUVIR-Quelle beobachtet. Nach den Bestrahlungen, bei denen UVB involviert war, war die CPD-Induktion wie erwartet hoch. Betrachtet man die vergleichende Darstellung in Abbildung 17, fällt auf, dass der Initialschaden nach der Bestrahlung mit UVA+UVB und UVA+UVB+VIS+IRA etwas höher ausfällt, als bei den UVB bestrahlten Zellen. Wie in Abbildung 17 grafisch hervorgehoben, ist dies am ehesten durch einen rein additiven Effekt von UVA und UVB zu erklären.

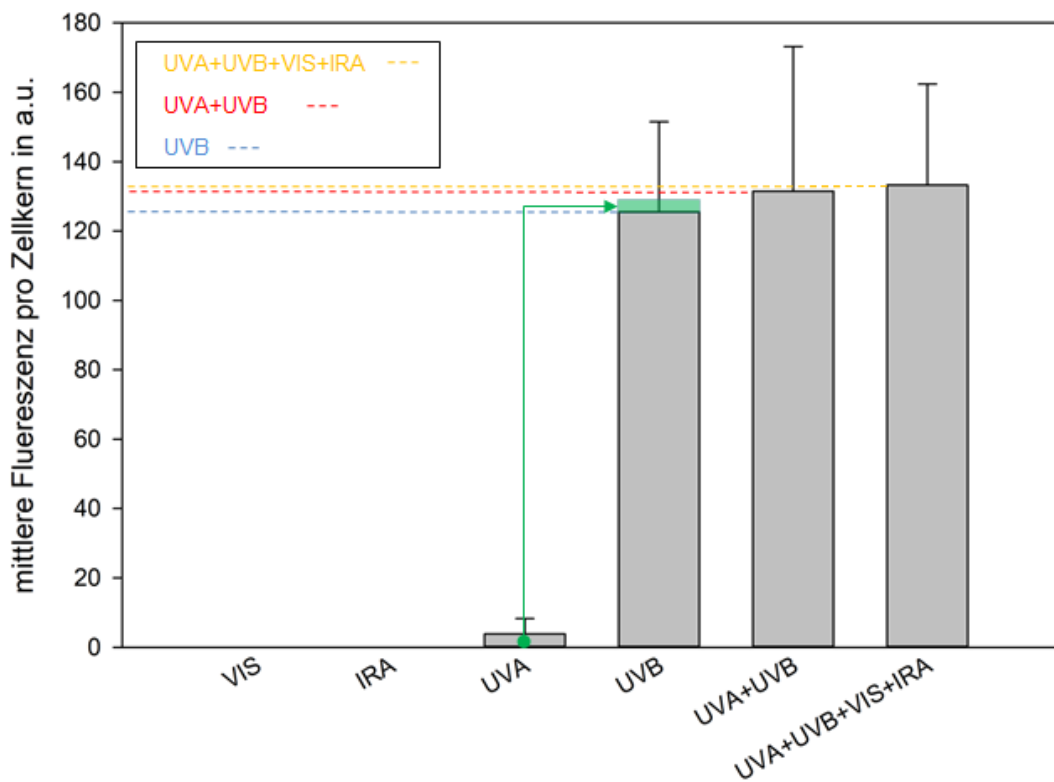


Abbildung 17: Addierung UVA induzierter CPD-Schäden.

In Grün dargestellt sind die UVA induzierten CPD-Schäden die hinzugefügt zu den UVB induzierten CPD-Schäden ein ähnliches Bild ergeben, wie die UVA+UVB und UVA+UVB+VIS+IR induzierten CPD-Schäden.

6.3 Reparaturkinetik

Besonders interessante Resultate zeigte die Erfassung der Reparaturkinetik nach der Bestrahlung mit UVB, UVA+UVB und der solaren Kombination von UVA+UVB+VIS+IRA. Wie schon in Kapitel 6.1.3 erwähnt zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Reparaturzeitkonstante (τ) der Zellen nach der Bestrahlung mit dem kombinierten Spektrum gegenüber der Bestrahlung mit UVB und UVA+UVB. Die Reparaturzeitkonstante der Zellen nach Kombinations-Bestrahlung war um 6,5 h im Vergleich zu den UVB bestrahlten Zellen und 12,4 h im Vergleich zu den UVA+UVB bestrahlten Zellen verkleinert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Ergebnissen aus jüngsten Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe (AG Rapp aus Darmstadt, Poster bei der GBS Tagung 2018).

Es ist schon länger bekannt, dass IRA (auch in Verbindung mit UV-Strahlung) einen biologischen Effekt hervorrufen kann, der nicht auf einer thermischen Wirkung von IRA beruht (Merk et al., 2006). Unter anderem ist die IRA-Strahlung in menschlichen Fibroblasten an der Hochregulation von mRNA- und Protein-Expression der Matrix-Metalloproteinase1 durch die Aktivierung des ERK1/2 beteiligt (Schieke et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Infrarot in der Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs involviert ist. Das bedeutet, dass Infrarot-Strahlung in der Lage ist, molekulare Reaktionen in menschlichen Hautzellen auszulösen (Schieke, Schroeder, & Krutmann, 2003).

In einer weiteren Arbeit wurden murine Keratinozyten (Jantschitsch et al., 2009) mit einer IRA-Dosis von 1350 J/m^2 vorbestrahlt, bevor sie drei Stunden später mit UVB ($0,75 \text{ J/m}^2$) bestrahlt wurden. Unmittelbar und 16 h nach UVB-Bestrahlung wurden Proben genommen und CPDs angefärbt. Das Ergebnis zeigte einen großen Unterschied in der CPD-Induktion bei den Proben, die nach 16 h genommen wurden, im Vergleich zu den Proben die direkt nach UVB Bestrahlung genommen wurden. 16h nach UVB-Bestrahlung war die Anzahl der CPDs in den Infrarot-vorbestrahlten Zellen deutlich vermindert. Eine Reduktion der CPDs in den Zellen konnte nicht beobachtet werden, wenn das XPA-Gen in den Zellen abgeschaltet war. (Jantschitsch et al., 2009). Das legt die Vermutung nahe, dass Infrarot auch in dieser Arbeit einen Effekt auf die Reparatur von CPDs in HaCaT-Zellen hat, auch wenn bemerkt werden muss, dass im Falle der Arbeit von Jantschitsch et al. IRA- und UVB-Bestrahlung sequentiell appliziert wurden und nicht, wie bei den Untersuchungen in dieser Arbeit, in Kombination.

Die Ergebnisse für die Reparaturkinetiken von CPDs nach unterschiedlichen UV-Bestrahlungsqualitäten und (solarer) Kombinationsstrahlung könnten von großer Bedeutung für den Strahlenschutz im Bereich von UV-Strahlung sein. Sie zeigen, dass ein wichtiger

biologischer Endpunkt (das zelluläre Reparaturvermögen von UV-induzierten CPDs), der oft zur Risikoeinschätzung von UV-Strahlung herangezogen wird, stark von der Strahlenqualität abhängt und insbesondere IRA-Strahlung eine wichtige Rolle zuteilt. Bisherige Risikoabschätzungen, die sich nur auf die Wirkung einzelner Strahlenqualitäten (UVA oder UVB) bezogen, müssen daher neu überdacht werden, um den Einfluss (solarer) Kombinationsbestrahlung besser zu erfassen.

6.4 Expression der XP-Reparaturgene und *GADD45A* nach Exposition mit verschiedenen Bestrahlungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiter untersucht, ob mögliche Unterschiede der Reparaturkinetik von UV-induzierten CPDs nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlungsqualitäten in möglichem Zusammenhang mit der Expression einiger, ausgesuchter Reparaturgene stehen.

Änderungen in der Gen-Expression nach UV-Exposition von Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten sind schon beschrieben worden (Boros et al., 2015). Auch in dieser Arbeit konnten Expressionsänderungen nach Exposition von HaCaT-Zellen mit verschiedenen UV-Strahlenqualitäten und -kombinationen festgestellt werden.

Die Expression von *GADD45A* zeigte einen starken Anstieg nach 6 h der Bestrahlungen die UVB enthielten. Auch 24 h nach Bestrahlung konnte eine erhöhte Expression, wenn auch auf niedrigerem Niveau als nach 6h, nachgewiesen werden. Es wurde bereits beschrieben, dass *GADD45α* im Rahmen des „DNA damage response, DDR“, einen kritischen Faktor im Schutz gegenüber der UV-induzierten Tumorigenese darstellt, indem es die Apoptose und/oder den Stillstand im Zellzyklus in Keratinozyten fördert (Hildesheim et al., 2002). Dies könnte ein Grund für den starken Anstieg der in dieser Arbeit nachgewiesenen Expression von *GADD45A* 6 h nach UVB-Bestrahlungen sein. Dies steht auch im Einklang mit Ergebnissen anderer Untersuchungen (Maeda et al., 2002), (Hildesheim et al., 2002), (Virolle, Aberdam, & Virolle, 2005) und (Gyenis et al., 2014), bei denen eine erhöhte Expression an *GADD45A* festgestellt wurde.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der Expression von *GADD45*, 24 h nach UV-Bestrahlung, zeigt, dass im Lauf der DNA-Reparatur von CPDs in 24 Stunden nach Bestrahlung, die „Schutzfunktion“ von *GADD45A* zurück gefahren wird.

Interessant war, dass die Expression von *XPA* und *XPB* 6 h nach Bestrahlung mit UVB, UVA+UVB und UVA+UVB+VIS+IRA runter reguliert wurde, 24 h nach den Bestrahlungen

aber eine starke Zunahme der Expression beobachtet werden kann (siehe Abbildung 15). Wie schon beschrieben (Boros et al., 2015), (Garinis et al., 2005), können mehr als 50 % der Expressionsänderungen durch UV-induzierte CPDs und in vielen Fällen durch eine Verringerung der Transkriptionsrate erklärt werden. Wie in den Reparaturkinetiken dieser Arbeit gezeigt wurde (vgl. Abb. 13), sind gerade im Bereich zwischen 0 und 20 h CPD-Schäden noch im hohen Maß vorhanden. Dies führt nach UVB-Bestrahlung zu einer verringerten RNA-Synthese, da die Polymerasen von den DNA-Schäden (CPDs) gestoppt werden (Mellon, 2005). Allerdings ist ein kleiner Teil regulatorischer Gene, wie z.B. *GADD45*, von dieser Hemmung der Transkription ausgenommen, so dass ihre Expression nicht gestört ist (Gyenis et al., 2014).

Eine Vielzahl von Zellen geht unter dem Einfluss verschiedener genetischer Faktoren, wie unter anderem auch *GADD45 α* , direkt nach einer Bestrahlung, gerade mit UVB, in Apoptose oder in einen Zellzyklusarrest in der G1/S oder G2/M-Phase. Durch den Zellzyklusarrest ist die Zelle, im Rahmen eines „DNA damage response, DDR“ in der Lage die DNA-Schäden vor der Replikation oder Chromosom-Segregation zu reparieren (Maeda et al., 2002) (Hildesheim et al., 2002). Diese frühe Antwort ist wichtig für das Überleben der Zelle nach Exposition mit UV-Strahlung (Mayne & Lehmann, 1982). Dabei kann sich die RNA-Synthese erholen, indem zuerst transkribierte Stränge und aktive Gene repariert werden (Mellon, 2005). Diese Erkenntnisse liefern eine mögliche Erklärung für die inverse Korrelation zwischen *GADD45A* und *XPA* und *XPB*.

Bei der Analyse der anderen, in dieser Arbeit untersuchten XP-Reparaturgene (*XPC*, *XPB*) nach Bestrahlung in verschiedenen Kombinationen waren die Veränderungen in der Expression relativ klein (allenfalls für UVB-Bestrahlung kann ein merklicher Effekt bei *XPC* nachgewiesen werden (vgl. Abb 14), so dass eine Korrelation mit *GADD45A* nicht möglich ist.

Für *XPC* konnte allerdings gezeigt werden, dass in HaCaT-Zellen, die mit UVB bestrahlt wurden, ein Anstieg von *Nrf1* 24 h nach der Bestrahlung zu sehen war, welcher die Expression von *XPC* erhöhte (Han et al., 2012), so wie dies auch nach UVB-Bestrahlung in dieser Arbeit der Fall ist (vgl. Abb.14).

Zu *XPB* wurde berichtet, dass die Expression kurze Zeit nach einer Bestrahlung mit UVB leicht runter reguliert wurde und gefolgt wurde von einem Anstieg der Expression (Rezvani et al., 2010). Entgegen der Literatur konnten nach 6 h und 24 h der Bestrahlung keine Antwort in der Expression von *XPB* gefunden werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei den Versuchen dieser Arbeit eine HaCaT-Zelllinie und keine primären Keratinozyten, mit

unterschiedlichen Dosen und unterschiedlichen Strahlenqualitäten, im Vergleich zu Rezvani et al. behandelt wurde.

In Bezug auf den Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsqualitäten auf die Genexpression zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit insgesamt, dass UVA-Strahlung und die Kombinationsbestrahlung keine anderen signifikanten Expressionsveränderungen in den ausgesuchten Genen, hervorrufen, als UVB-Strahlung allein.

6.5 Methylierung der XP-Reparaturgene und *GADD45A* nach Exposition mit verschiedenen Bestrahlungen

Da bekannt ist, dass die Genexpression stark von epigenetischer Regulation abhängt, wurde in dieser Arbeit auch die Promotormethylierung ausgesuchter DNA-Reparaturgene, in Abhängigkeit von der eingesetzten UV-Bestrahlungsqualität, untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Abbildung 16) zeigten eine nur schwache Änderung in den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen (K0). Die Unterschiede lagen in einem Bereich von ein bis zwei Prozent (bei vorliegender schwacher Methylierung unbestrahlter Kontrollen). Zudem vielen die Abweichungen zwischen einzelnen Versuchsreihen in den meisten Fällen relativ hoch aus. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Methylierung und der Genexpression kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Möglich wäre, dass sich ein signifikanter Zusammenhang nach einer chronischen Bestrahlung einstellt. Ein Indiz für diese Vermutung liefert die Arbeit von Chen et al., 2012, in der sich Änderungen in der Methylierung und Expression für P16^{INK4a}, in chronisch bestrahlten, aus einem Tumor isolierten Hautzellen und chronisch bestrahlten HaCaT-Zellen ergaben. Auch die Analyse von anderen CpG-Inseln der XP-Gene könnte nach akuter Bestrahlung (wie in dieser Arbeit) oder nach einer chronischen Bestrahlung Ergebnisse erbringen, die einen Zusammenhang aufzeigen. Dies müssen zukünftig Untersuchungen klären.

7 Zusammenfassung

UV-Strahlung ist einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Hautkrebs. Neben der UV-Strahlung befinden sich im optischen Spektrum der solaren Strahlung weitere Strahlenqualitäten wie sichtbares Licht („visible light“, VIS) und Infrarot-Strahlung (IRA). Es ist deshalb wichtig, auch den Einfluss dieser Strahlungs-Qualitäten in Bezug auf ihr Potenzial zur Auslösung biologischer Effekte (z.B. Induktion von DNA-Schäden) und auf ihr Risikopotenzial für die Entstehung bestimmter Krankheiten, insbesondere Hautkrebs, zu untersuchen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da z.B. im Strahlenschutz bisher mögliche gesundheitliche Risiken nur aus Ergebnissen abgeleitet wurden, die mit einzelnen UV-Strahlenqualitäten (UVA, UVB) zusammenhängen. In dieser Arbeit wurde daher eine neu entwickelte Bestrahlungsquelle eingesetzt (KAUVIR-Quelle), die sowohl UVA- und UVB-Strahlung als auch sichtbares Licht und Infrarot A jeweils einzeln oder aber auch in Kombination (UVA+UVB+VIS+IRA) emittiert, um eine solare Exposition so gut wie möglich zu simulieren. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Bestrahlungsversuche in HaCaT-Zellen zur Induktion von DNA-Schäden (CPD) und deren Reparatur, sowie Untersuchungen der Methylierung und Expression von Genen, die an der enzymatischen Reparatur von CPDs beteiligt sind, nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten, durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass bei der CPD-Induktion VIS+IRA keine Rolle spielen. UVA induzierte, im Vergleich zu UVB, eine kleine, aber nachweisbare Anzahl an CPDs, die sich bei simultaner Exposition (UVA+UVB) zu den UVB-induzierten CPDs addierten.

Die Ergebnisse der Reparaturkinetik von CPDs nach unterschiedlichen Bestrahlungsqualitäten erbrachten das wichtige Ergebnis, dass der Infrarotanteil (IRA) der solaren Strahlung einen beschleunigenden Effekt auf die Reparaturgeschwindigkeit von induzierten CPD-Schäden in HaCaT-Zellen bewirkt.

Da die Expression von Genen, die in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur von CPDs involviert sind und deren Expression über epigenetische Mechanismen reguliert werden kann, für Reparaturkinetiken wichtig ist, wurde in dieser Arbeit weiterhin die Expression der Reparaturgene XPA, XPB, XPC und XPD und GADD45A untersucht. Es zeigte sich, dass in den untersuchten Genen mit Ausnahme von *XPD* eine strahleninduzierte (teilweise nur geringe) Antwort in der Expression zu messen ist. Diese ist jedoch immer an den UVB-Anteil im Expositionsspektrum gebunden. Die durch die Reparaturkinetiken ermittelte schnellere Reparatur nach UVA+UVB+VIS+IRA im Vergleich zu UVB oder UVA+UVB lässt sich

daher vermutlich nicht durch die differentiellen Expressionsdaten der in dieser Arbeit untersuchten Reparaturgene allein erklären.

Untersuchungen der Promotor-Methylierung der in dieser Arbeit behandelten Gene zeigten keine signifikanten Methylierungsänderungen, wodurch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Methylierung und der Expression der Gene (zumindest bei den hier untersuchten Methylierungsstellen in den Promotoren) nicht bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, besonders der Einfluss von IRA auf die Reparaturkinetik UV-induzierter DNA-Schäden, könnten von Bedeutung für den Strahlenschutz im Bereich von UV-Strahlung sein. Sie zeigen, dass ein wichtiger biologischer Endpunkt (das zelluläre Reparaturvermögen von UV-induzierten CPDs), der oft zur Risikoeinschätzung von UV-Strahlung herangezogen wird, stark von der Strahlenqualität abhängt und insbesondere IRA-Strahlung eine wichtige Rolle zuteilt. Bisherige Risikoabschätzungen, die sich nur auf die Wirkung einzelner Strahlenqualitäten (UVA oder UVB) bezogen, müssen daher neu überdacht werden, um den Einfluss solarer Kombinationsbestrahlung besser zu erfassen.

Weitere Arbeiten müssen zukünftig die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erklären.

Literaturverzeichnis

- Antequera, F., & Bird, A. (1993). CpG islands. *EXS*, *64*, 169–185. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418949>
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., ... Niehrs, C. (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, *445*(7128), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nature05515>
- Berwick, M., & Wiggins, C. (2006). The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *11*, 1244–1254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368510>
- Bonci, A., Lupica, C. R., & Morales, M. (2015). Nucleotide excision repair in humans, *18*(3), 386–392. <https://doi.org/10.1038/nn.3945>.Dopaminergic
- Boros, G., Miko, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., van der Horst, G. T. J., ... Remenyik, É. (2015). Identification of Cyclobutane Pyrimidine Dimer-Responsive Genes Using UVB-Irradiated Human Keratinocytes Transfected with In Vitro-Synthesized Photolyase mRNA. *PLOS ONE*, *10*(6), e0131141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131141>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. *The Journal of Cell Biology*, *106*(March), 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Cadet, J., Mouret, S., Ravanat, J. L., & Douki, T. (2012). Photoinduced damage to cellular DNA: Direct and photosensitized reactions. *Photochemistry and Photobiology*, *88*(5), 1048–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01200.x>
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2015). Mechanism of DNA damage, repair and mutagenesis, *2*(2), 147–185. <https://doi.org/10.1515/jci-2013-0007>.Targeted
- Chen, I. P., Henning, S., Faust, A., Boukamp, P., Volkmer, B., & Greinert, R. (2012). UVA-induced epigenetic regulation of P16INK4ain human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *11*(1), 180–190. <https://doi.org/10.1039/c1pp05197k>
- Chen, Q. W., Zhu, X. Y., Li, Y. Y., & Meng, Z. Q. (2014). Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncology Reports*, *31*(2), 523–532. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2913>
- D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12222–12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>

- da Silva, M. B., Melo, A. R. da S., Costa, L. de A., Barroso, H., & de Oliveira, N. F. P. (2017). Global and gene-specific DNA methylation and hydroxymethylation in human skin exposed and not exposed to sun radiation. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(6), 793–800. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175875>
- Daya-Grosjean, L., & Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1–2), 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.013>
- Didona, D., Paolino, G., Bottoni, U., & Cantisani, C. (2018). Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010006>
- Dummer. (2003). *Physikalische Therapiemaßnahmen in der Dermatologie*. (R. Dummer, Ed.). Heidelberg: Steinkopff. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-12704-9>
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L. (2018). Natural antioxidants: Multiple mechanisms to protect skin from solar radiation. *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
- Esteller, M. (2004). *DNA Methylation: Approaches, Methods, and Applications*. CRC Press.
- Fornace, A. J., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., & Holbrook, N. J. (1989). Mammalian Genes Coordinately Regulated by Growth Arrest Signals and DNA-Damaging Agents, 9(10), 4196–4203.
- Fusenig, N. E., & Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*, 23(3), 144–158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199811\)23:3<144::AID-MC3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199811)23:3<144::AID-MC3>3.0.CO;2-U)
- Garinis, G. A., Mitchell, J. R., Moorhouse, M. J., Hanada, K., de Waard, H., Vandeputte, D., ... van der Horst, G. T. J. (2005). Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks. *The EMBO Journal*, 24(22), 3952–3962. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600849>
- Goodman, J. I., & Watson, R. E. (2002). A <sc>LTERED</sc> DNA M <sc>ETHYLATION</sc>: A Secondary Mechanism Involved in Carcinogenesis.

- Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1), 501–525.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.092001.141143>
- Graw, J. (2015). *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-44817-5>
- Gyenis, Á., Umlauf, D., Újfaludi, Z., Boros, I., Ye, T., & Tora, L. (2014). UVB Induces a Genome-Wide Acting Negative Regulatory Mechanism That Operates at the Level of Transcription Initiation in Human Cells. *PLoS Genetics*, 10(7), e1004483.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004483>
- Hamm, H. (2017). *Basiswissen Dermatologie*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-52811-2_1
- Han, W., Ming, M., Zhao, R., Pi, J., Wu, C., & He, Y.-Y. (2012). Nrf1 CNC-bZIP Protein Promotes Cell Survival and Nucleotide Excision Repair through Maintaining Glutathione Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18788–18795.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.363614>
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042–2054.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- Hildesheim, J., Bulavin, D. V., Anver, M. R., Alvord, W. G., Hollander, M. C., & Fornace, A. J. (2002). Gadd45a Protects against UV Irradiation-induced Skin Tumors , and Promotes Apoptosis and Stress Signaling via MAPK and p53 1 , 2, 38(42), 7305–7315.
- Hollander, M. C. (1988). DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells, 85(December), 8800–8804.
- Huang, Y., Pastor, W. A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R., & Rao, A. (2010). The Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. *PLoS ONE*, 5(1), e8888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008888>
- Jansohn, M., & Rothhämel, S. (2012). *Genetische Methoden*. Springer Berlin Heidelberg.
- Jantschitsch, C., Majewski, S., Maeda, A., Schwarz, T., & Schwarz, A. (2009). Infrared radiation confers resistance to UV-induced apoptosis via reduction of DNA damage and upregulation of antiapoptotic proteins. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(5), 1271–1279. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.362>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrg816>
- Jones, P. A., & Laird, P. W. (1999). Cancer-epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, 21(2), 163–167. <https://doi.org/10.1038/5947>
- Katiyar, S. K., Singh, T., Prasad, R., Sun, Q., & Vaid, M. (2012). Epigenetic Alterations in

- Ultraviolet Radiation-Induced Skin Carcinogenesis: Interaction of Bioactive Dietary Components on Epigenetic Targets†. *Photochemistry and Photobiology*, 88(5), 1066–1074. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.01020.x>
- Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik*. (R. Knippers, Ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-002-25587>
- Lehman, A. R., Kirk-Bell, S., Arlett, C. F., Paterson, M. C., Lohman, P. H., de Weerd-Kastelein, E. A., & Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 219–223. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.219>
- Lehmann, A. R., McGibbon, D., & Stefanini, M. (2011). Xeroderma pigmentosum. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-70>
- Lehmann, U. (2008). Quantitative DNA-Methylierungs- analyse mittels Pyrosequenzierung, 374–375.
- Liebermann, D. A., & Hoffman, B. (2007). Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 39(3), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2007.06.006>
- Liebermann, D. A., & Hoffman, B. (2008). Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*, 3, 15. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-3-15>
- Liebermann, D. A., Tront, J. S., Sha, X., Mukherjee, K., Mohamed-Hadley, A., & Hoffman, B. (2011). Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 16(1–2), 129–140. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>
- Lopes, D. M., & McMahon, S. B. (2016). Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 22(2), 118–126. <https://doi.org/10.1111/cns.12444>
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Histologie (2. Auflage)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Ma, D. K., Jang, M.-H., Guo, J. U., Kitabatake, Y., Chang, M. -l., Pow-anpongkul, N., ... Song, H. (2009). Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis. *Science*, 323(5917), 1074–1077. <https://doi.org/10.1126/science.1166859>
- Maeda, T., Hanna, A. N., Sim, A. B., Chua, P. P., Chong, M. T., & Tron, V. A. (2002). GADD45 Regulates G2/M Arrest, DNA Repair, and Cell Death in Keratinocytes Following Ultraviolet Exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(1), 22–26. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01781.x>

- Marion G. Macey. (2007). *Flow Cytometry: Principles and Applications*.
- Marionnet, C., Tricaud, C., & Bernerd, F. (2015). Exposure to non-extreme solar UV daylight: Spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(1), 68–90. <https://doi.org/10.3390/ijms16010068>
- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., ... Hanaoka, F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature*, *399*(6737), 700–704. <https://doi.org/10.1038/21447>
- Mayne, L. V., & Lehmann, A. R. (1982). Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: an early defect in cells from individuals with Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum. *Cancer Research*, *42*(4), 1473–1478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6174225>
- Mellon, I. (2005). Transcription-coupled repair: A complex affair. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *577*(1–2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.016>
- Merk, H. F., Baron, J. M., Heise, R., Fritsche, E., Schroeder, P., Abel, J., & Krutmann, J. (2006). Concepts in molecular dermatotoxicology. *Experimental Dermatology*, *15*(9), 692–704. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00475.x>
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., & Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(37), 13765–13770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604213103>
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, *49*(9), 978–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Rezvani, H. R., Mahfouf, W., Ali, N., Chemin, C., Ged, C., Kim, A. L., ... Mazurier, F. (2010). Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acids Research*, *38*(3), 797–809. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1072>
- Rhee, Y.-Y., Kim, K.-J., & Kang, G. H. (2017). CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the

- Serrated Neoplasia Pathway. *Gut and Liver*, 11(1), 38–46.
<https://doi.org/10.5009/gnl15535>
- Schieke, S. M., Schroeder, P., & Krutmann, J. (2003). Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 19(5), 228–234. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0781.2003.00054.x>
- Schieke, S. M., Stege, H., Kürten, V., Grether-Beck, S., Sies, H., & Krutmann, J. (2002). Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(6), 1323–1329. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19630.x>
- Schmidt, O. (2017). *Genetik und Molekularbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50274-7>
- Schuch, A. P., Moreno, N. C., Schuch, N. J., Menck, C. F. M., & Garcia, C. C. M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 107(September 2016), 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>
- Shah, P., Qiang, L., Yang, S., Soltani, K., & He, Y. (2017). Regulation of XPC deubiquitination by USP11 in repair of UV- induced DNA damage, 8(57), 96522–96535. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22105>
- Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair*, 36, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>
- Strahlenschutzkommission. (2001). Schutz des Menschen vor den Gefahren der UV-Strahlung in Solarien. *Stellungnahme Der Strahlenschutzkommission*.
- Strahlenschutzkommission. (2016). Schutz des Menschen vor den Gefahren solarer UV-Strahlung und UV-Strahlung in Solarien. *Empfehlung Der Strahlenschutzkommission*.
- Szabo, A., Perou, C. M., Karaca, M., Perreard, L., Palais, R., Quackenbush, J. F., & Bernard, P. S. (2004). Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology*, 5(8), R59. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-8-r59>
- Tamura, R. E., Vasconcellos, J. F. de, Sarkar, D., Towia, Libermann Fisher, P., & Zerbini, L. F. (2012). GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *National Institutes of Health*.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

- geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>
- Violle, V., Aberdam, D., & Violle, T. (2005). NF- κ B / Egr-1 / Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death, *EMBO Journal*, 24(1), 128–137. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600501>
- Zingg, J. M., & Jones, P. A. (1997). Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18(5), 869–882. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163670>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel – insbesondere keine im Quellenverzeichnis nicht benannten Internet-Quellen – benutzt habe und die Arbeit von mir vorher nicht einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich bin damit einverstanden, dass die Masterarbeit veröffentlicht wird.

Hamburg, den 21. Februar 2019

Benjamin Abendt