

Aus dem Forschungslabor
des Dermatologischen Zentrums
des Elbe-Klinikums-Buxtehude
Direktor Prof. Dr. Eckhard W. Breitbart

Einfluss der UV-Strahlenqualität auf die Reparaturkapazität der
menschlichen Keratinozytenzelllinie HaCaT

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sebastian Lawrenz
aus Bremen
Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 23.06.2008
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. E. Breitbart
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. U. Beisiegel
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. E. Dikomey

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Physikalische Grundlagen	2
2.1.1	UV-Strahlung	2
2.1.2	Natürliche UV-Strahlung auf der Erde.....	2
2.1.3	Physikalische Grundlagen der UV-Strahlen.....	4
2.1.4	Eindringtiefe von UV-Strahlung in die menschliche Haut.....	6
2.1.5	Künstliche UV-Strahlung	6
2.2	Biologische Grundlagen	6
2.2.1	Die menschliche Haut.....	6
2.2.2	Biologische Wirkung von UV-Strahlung auf den Menschen.....	9
2.2.3	DNA-Reparatur	14
2.3	Kutane Karzinome und Karzinogenese	17
2.3.1	Basalzellkarzinom	18
2.3.2	Plattenepithelkarzinom	20
2.3.3	Malignes Melanom	22
2.4	Bedeutung von UVA-Strahlung für die Karzinogenese	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Zellen	26
3.2	Bestrahlungsquellen	26
3.3	Versuchsaufbau	29
3.4	Antikörpermarkierung	30
3.5	Durchflusszytometrie.....	30
3.6	Bestrahlungsprotokolle.....	36
3.6.1	Messung der dosisabhängigen Induktion	36
3.6.2	Messung der Reparaturkinetik strahleninduzierter CPDs	37
3.6.3	Messung der Reparaturkinetik nach UVA-Vorbestrahlung	38
3.7	Zellpräparation.....	39
3.7.1	Zellkultivierung	39
3.7.2	Einsatz der Zellen	39
3.7.3	Zellpräparation nach Bestrahlung.....	40
3.7.4	Präparation zur Antikörperanfärbung.....	41
3.8	Material und Geräteliste	42
3.8.1	Verwendete Geräte	42
3.8.2	Gebrauchswaren	43
3.8.3	Chemikalien.....	43

3.8.4	Antikörper.....	44
3.8.5	Nähr- und Gebrauchslösungen	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	CPD-Induktion durch Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR	45
4.2	Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR	48
4.3	Reparaturkinetik nach kombinierter Bestrahlung.....	52
5	Diskussion	54
5.1	CPD-Induktion nach Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR	54
5.2	Reparatur nach Bestrahlung mit SSR, UVA- und UVB-Strahlung.....	55
5.3	Reparaturkinetik nach kombinierter Bestrahlung.....	56
5.4	Schlussfolgerungen.....	60
6	Zusammenfassung:	61
7	Literaturverzeichnis:.....	62
8	Lebenslauf	78
9	Danksagung	79
10	Erklärung	80

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary units, willkürliche Einheiten
AK	Antikörper
BCC	Basalzellkarzinom
BfS	Bundesamt für Strahlenschutz
BSA	Bovines Serumalbumin
CIE	Internationale Beleuchtungskommission
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CRBC	CPD-zurückhaltende Basalzellen
D	Dosis
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DWD	Deutscher Wetterdienst
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GG-NER	Globales Genom - Nukleotidexzisionsreparatur
HaCaT	Immortalisierte humane adulte Keratinozyten
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
J	Joule
MED	Minimale Erythemdosis
MM	Malignes Melanom
NBCC	Nevoides Basalzellkarzinom
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PJ	Propidiumjodid
PUVA	Psoralen und UVA (Photochemotherapie)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCC	Plattenepithelkarzinom, squamous cell carcinoma
SDS	Natriumdodecylsulfat, sodium dodecyl sulfate
SED	Standarderythemdosis

Shh	Sonic-hedgehog-Signalmolekül
SSR	Sonnenlichtsimulierte Bestrahlung
T	Bestrahlungszeit
TC-NER	Transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur
UBA	Umweltbundesamt
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung (100 – 400 nm)
UVA	Ultraviolette Strahlung (315 – 400 nm)
UVB	Ultraviolette Strahlung (280 – 315 nm)
UVC	Ultraviolette Strahlung (100 – 280 nm)
WMO	World Meteorological Organisation,
6-4PP	Pyrimidin (6-4) Pyrimidon-Photoprodukt
8-oxo-Gua	8-Hydroxyguanin

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Es steht außer Zweifel, dass UV-Strahlung für die Entstehung von malignen Hauttumoren wie dem Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom und malignen Melanom verantwortlich ist. Die Inzidenz dieser Karzinome nimmt in den letzten Jahren zu, was zumindest zum Teil auf eine erhöhte UV-Exposition zurückgeführt wird. Unter den zahlreichen nachgewiesenen UV-induzierten Zellschäden nimmt das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) eine besondere Rolle ein, da es bei fehlerhafter Reparatur zu spezifischen Mutationen kommen kann, die in Hauttumoren nachgewiesen wurden. Während die Induktion von CPDs durch UVB-Strahlung seit langem bekannt ist, konnte deren Genese durch UVA-Strahlung erst kürzlich nachgewiesen werden. Lange Zeit wurde UVA-Strahlung als weitgehend harmlos eingestuft. In jüngeren Studien mehren sich allerdings die Hinweise für eine deutliche Beteiligung von UVA-Strahlung an der Karzinogenese. Eine fundamentale Rolle kommt der zellulären Reparaturkapazität zu, da nicht oder fehlerhaft reparierte Defekte zu Mutationen führen können.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Effektivität der Induktion von CPDs durch unterschiedliche UV-Strahlenqualitäten (UVA, UVB, solares UV) untersucht werden. In weiterführenden Versuchen sollen CPD-Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit UVA, UVB und solarem UV aufgenommen werden, um zu prüfen, ob durch verschiedene UV-Strahlenqualitäten induzierte CPDs unterschiedlich schnell repariert werden, um daraus Rückschlüsse auf die beteiligten Reparaturprozesse ziehen zu können. Schließlich soll ein möglicher Einfluss einer UVA-Vorbestrahlung auf die Reparatur von CPDs, die in einer nachfolgenden Bestrahlung mit UVB oder solarem UV induziert wurden, untersucht werden.

Neue Erkenntnisse, insbesondere in Bezug auf die Wirkung von UVA-Strahlung, die z. B. in Solarien überwiegend eingesetzt wird, sollen zu einer Weiterentwicklung bestehender Empfehlungen an die Bevölkerung zum Umgang mit solarer und künstlicher UV-Strahlung beitragen.

2 Einleitung

2.1 Physikalische Grundlagen

2.1.1 UV-Strahlung

UV-Strahlung ist Teil des elektromagnetischen Spektrums der von der Sonne emittierten Strahlung und wird entsprechend ihrer Wellenlänge in UVA- (315–400nm), UVB- (280–315nm) und UVC- (100–280nm) Strahlung unterteilt. Unter 100nm Wellenlänge spricht man von ionisierender Strahlung, ab 400nm beginnt der Bereich des sichtbaren Lichtes, der bis ca. 700 nm reicht.

2.1.2 Natürliche UV-Strahlung auf der Erde

Der Anteil der solaren UV-Strahlung an der Erdoberfläche und somit für den Menschen biologisch aktive Teil hängt von zahlreichen Faktoren ab.

UVC-Strahlung wird nahezu vollständig und UVB-Strahlung zu über 90% von der Erdatmosphäre absorbiert. Von der emittierten UVA-Strahlung erreichen ca. 95% die Erdoberfläche (Frederick et al., 1989). Es ergibt sich auf der Erde eine große Variabilität der Strahlungsintensität, mit einer Reihe von Einflussgrößen. Die wichtigste Variable stellt die Sonnenhöhe dar. Bei zunehmender Sonnenhöhe nimmt die spektrale Bestrahlungsstärke stark zu (Iqbal, 1986). Es ergeben sich daraus tageszeitliche, jahreszeitliche und geographische Schwankungen. Die Zunahme der Bestrahlungsstärke ist dabei wellenlängenabhängig unterschiedlich. Je kürzer die Wellenlänge, desto größer die Zunahme der Bestrahlungsstärke (Stick und Pielke, 1998). Ca. 60% der UV-Tagesdosis können durch meiden der Sonnenstrahlung zwischen elf und 15 Uhr vermieden werden. (Iqbal, 1986).

Eine weitere wichtige Einflussgröße ist das Ozon, das einen Teil der solaren UV-Strahlung absorbiert. Für die Absorption ist vor allem die Menge des Ozons in einer vertikalen Luftsäule entscheidend. Das stratosphärische Ozon besitzt eine charakteristische, jahreszeitliche und breitenabhängige Verteilung. Zum Äquator hin nimmt das Gesamtozon ab. Im Frühjahr liegt eine höhere Ozonkonzentration als im Sommer vor, so dass dann mit einer vergleichsweise niedrigeren UV-Bestrahlungsstärke zu rechnen ist (Harris et al., 1994; Seckmeyer et al., 1995). Aus der Ozonverteilung ergeben sich somit erhebliche geographische Unterschiede bezüglich

der auftreffenden UV-Strahlung. Die Gesamtozonkonzentration in der Atmosphäre hat in den vergangenen Jahrzehnten um ca. drei Prozent abgenommen. Betroffen ist vor allem die südliche Halbkugel, insbesondere die Antarktis. Dafür verantwortlich gemacht werden freigesetzte Fluorkohlenwasserstoffe (Chipperfield et al., 2003). Dies bedingt einen Anstieg der UV-Strahlungsintensität vor allem auf der südlichen Hemisphäre.

Wolken schwächen die Bestrahlung in der Regel ab, allerdings kann es durch Reflexion auch zur Zunahme der Bestrahlung kommen (Bais et al., 1993).

Bei Aerosolen handelt es sich um feinste Schwebeteilchen oder Flüssigkeit in der Luft. Sie sind in der Lage die Bestrahlungsstärke vor allem bei direkter Strahlung zu reduzieren. Die Reduktion liegt in Modellrechnungen zwischen fünf und 18% (Seckmeyer et al., 1993; Madronich et al., 1998). Die Reflexion von UV-Strahlung an Oberflächen wird als Albedo bezeichnet und ist meistens gering. Bei schneebedeckten Oberflächen kann sich die auf einen Menschen einfallende Dosis jedoch um ein vielfaches erhöhen (Blumthaler und Ambach, 1988). Auch mehrere Kilometer entfernte Schneeflächen können die UV-Strahlung relevant (über fünf Prozent) erhöhen (Kerr et al., 2003). Eine weitere Einflussgröße stellt die Höhe über dem Meeresspiegel dar. Die Zunahme zeigt eine große Variabilität um 10 bis 40% pro 1000 Höhenmeter in Abhängigkeit von Bewölkung und troposphärischer Ozonkonzentration (Seckmeyer et al., 1997). Für erythemwirksame UV-Strahlung kann eine Zunahme von fünf bis zehn Prozent pro Kilometer Höhe angenommen werden (MacKenzie, 2001).

Aufgrund der zahlreichen Einflussfaktoren ist eine genaue Vorhersage der Bestrahlungsintensität nicht möglich. In Deutschland werden vom Bundesamt für Strahlenschutz (BfS), Umweltbundesamt (UBA) und dem Deutschen Wetterdienst (DWD) tägliche Messungen an verschiedenen Orten durchgeführt. Unter Berücksichtigung der Wellenlänge und der erwarteten biologischen Wirksamkeit, z.B. der Hautrötung wird ein vereinfachter Index (UV-Index) zur Information der Bevölkerung, entsprechend internationalen Standards (WMO 1994) herausgegeben.

Die individuelle Dosis ist maßgeblich vom Expositionsverhalten abhängig. Besonders exponiert sind Personen die im Freien arbeiten. Außerdem unterscheidet sich das Freizeitverhalten der Menschen erheblich, so dass sich beträchtliche interindividuelle Differenzen der Strahlendosis ergeben können (Thieden et al., 2004).

2.1.3 Physikalische Grundlagen der UV-Strahlen

Die Energie elektromagnetischer Strahlung ist wellenlängenabhängig und wird physikalisch entsprechend des Teilchen-/Wellendualismus beschrieben durch:

$$c = \lambda \cdot \nu \quad \text{und} \quad E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Formel 2.1}$$

E:	Energie des Strahlungsquants	[J]
ν :	Frequenz des Strahlungsquants	[Hz]
c:	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum	[ms ⁻¹]
λ :	Wellenlänge	[nm]
h:	Plancksches Wirkungsquantum	6,626 · 10 ⁻³⁴ J s

Dementsprechend ist die Energie von der Wellenlänge abhängig und berechnet sich entsprechend folgender Definitionen:

Die Strahlungsleistung W ist definiert als die Energie während eines Zeitraumes.

Die Bestrahlungsstärke E berechnet sich aus der Strahlungsleistung pro Fläche:

$$E = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E_{\lambda}(\lambda) d\lambda \quad [E] = \frac{W}{m^2} \quad \text{Formel 2.2}$$

Die Bestrahlung H bezeichnet das Zeitintegral der Bestrahlungsstärke:

$$H = \int_0^t E(t) dt \quad [H] = \frac{J}{m^2} \quad \text{Formel 2.3}$$

Da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Strahlenquellen nicht um monochromatische Strahler handelt, muss bei Verwendung von Strahlung verschiedener Wellenlängen die spektrale Bestrahlungsstärke E_{λ} als Integral der verschiedenen Wellenlängen berechnet werden.

Die Wirkungen von UV-Strahlung sind in Abhängigkeit vom betrachteten biologischen Endpunkt unterschiedlich. Bei der Analyse biologischer Effekte ist es somit notwendig, die Strahlung entsprechend zu gewichten. So kann ein biologischer Effekt unter Umständen mit einer kleinen Dosis UVB-Strahlung erreicht werden, für den eine hohe Dosis UVA-Strahlung notwendig wäre.

Als Maß der biologischen Wirksamkeit auf die menschliche Haut wird häufig die Erythemschwelldosis verwandt. Dabei handelt es sich um die Dosis der UV-Strahlung, die 24 Stunden nach der Exposition auf der Haut eine sich gegenüber der unbestrahlten Umgebung gerade abhebende Rötung hinterlässt.

Diese ist bei unvorbestrahlter Haut am geringsten und wird dann als minimale Erythemdosis (MED) bezeichnet. Die MED eines Menschen ist individuell stark unterschiedlich und kann annähernd von seinem Hauttyp nach Fitzpatrick abgeleitet werden. Dieser klassifiziert die Haut entsprechend ihrer Charakteristika in die Typen I bis VI (Pathak et al. 1976). Sie beträgt im Mittel für einen hellhäutigen Mitteleuropäer mit Hauttyp II 250 J/m² einer erythemgewichteten Dosis. Die Berechnung der erythemgewichteten Dosen erfolgt nach der Normung durch die Internationale Beleuchtungskommission (CIE) (CIE 1999). Die Abbildung zeigt die Gewichtung entsprechend der Normung.

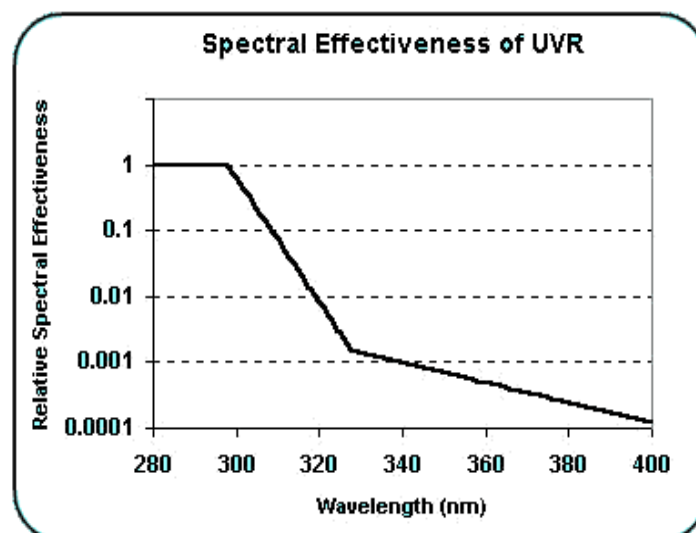


Abb. 2.1: Erythemgewichtete spektrale Effektivität (CIE 1999)

2.1.4 Eindringtiefe von UV-Strahlung in die menschliche Haut

Die Eindringtiefe in die menschliche Haut ist abhängig von der Wellenlänge. Je länger die Wellenlänge ist, desto tiefer dringt die Strahlung ein. Es erreichen ca. neun Prozent UVB- und 19% UVA-Strahlung die Basalzellschicht (Eindringtiefe 70 μ m) der menschlichen Haut (Bruls et al., 1984). Etwa ein Prozent UVA-Strahlung penetriert die gesamte Dermis und erreicht die Subcutis.

2.1.5 Künstliche UV-Strahlung

Zur Erzeugung künstlicher UV-Strahlung werden vor allem Gasentladungslampen eingesetzt. Ein elektrisch angeregtes Gas, meist wird Quecksilber verwendet, emittiert beim Rückfall in den Grundzustand ein charakteristisches Linienspektrum. Auf dem Glaskolben der Lampe befinden sich Leuchtstoffe mit in Abhängigkeit zum gewünschten Spektrum eingebrachten Atomen. Diese werden wiederum angeregt und erzeugen beim Einnehmen des Grundzustandes die jeweils spezifische Strahlung. Durch Kombination verschiedener Atome kann das gewünschte Spektrum erzeugt werden (Kiefer, 1976). So kommen beispielsweise in Solarien Lampen zum Einsatz, die überwiegend UVA-Strahlung emittieren. Diese werden in unterschiedliche Gruppen bezüglich der spektralen Wirksamkeit entsprechend einer Normung eingeteilt (DIN 2003).

2.2 Biologische Grundlagen

2.2.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und besitzt bei einem durchschnittlichen Erwachsenen eine Gesamtfläche von 1,5-2m², ein Gewicht von ca. drei kg und eine Dicke von 1,5-4mm je nach Körperregion. Sie erfüllt lebenswichtige Funktionen für den menschlichen Organismus. Hierzu zählen der Schutz vor chemischen, physikalischen (UV-Strahlung) und mikrobiellen Einwirkungen von außen; die Homöostase des Wasserhaushaltes und Konstanthaltung der Körpertemperatur durch Wärmeabgabe sowie Verdunstung von Schweiß und Wasser. Sie ist peripheres Sinnesorgan mit verschiedenen Rezeptoren und freien Nervenendigungen für unterschiedliche Reize wie Berührungs-, Temperatur- und Schmerzwahrnehmung und vermittelt immunstimulatorische Effekte durch antigenpräsentierende Zellen in der Epidermis.

Die Haut gliedert sich in zwei histologisch gut zu differenzierende Schichten, die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut) mit der sich anschließenden Subkutis (Unterhaut). Abbildung 2.2 stellt den Aufbau schematisch dar.

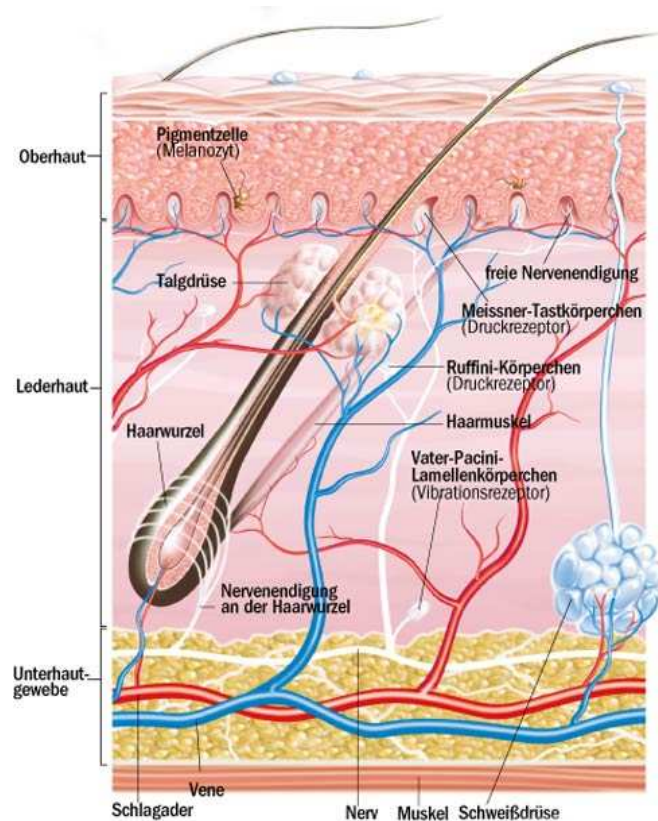


Abb. 2.2: Aufbau der menschlichen Haut

Die Epidermis stellt die externe Begrenzung zwischen Organismus und Umwelt dar. Sie ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dessen Dicke in Abhängigkeit von Lokalisation, Alter und Geschlecht zwischen 30 und 300 μm variiert.

Bei den Zellen der Epidermis handelt es sich zu 90-95 % um Keratinozyten. Sie entstehen aus den Zellen des Stratum basale. Ein Keratinozyt durchläuft verschiedene Differenzierungsstadien und kennzeichnet mit seiner entsprechenden Morphologie die jeweilige Schicht der Epidermis. Histologisch lassen sich das Stratum spinosum, mit zunächst stacheligen, nach peripher zunehmend abgeflachten Zellen, das Stratum granulosum, geprägt von intrazellulären hyalinhaltigen Granula und das Stratum corneum, mit dicht liegenden, flachen kernlosen Zellen, die über kräftige interzelluläre Bindungen verfügen, voneinander abgrenzen.

Die terminale epidermale Differenzierung der Keratinozyten dauert ca. vier bis fünf Wochen, wobei einzelne Zellen im Stratum basale erheblich länger persistieren und als epidermale Stammzellen angesehen werden.

Neben den Keratinozyten liegen in der Epidermis in deutlich geringerer Anzahl weitere Zelltypen vor: die Melanozyten, Langerhanszellen und Merkel-Zellen.

Die Melanozyten sind im Stratum basale der Epidermis lokalisiert. Bei ca. jeder fünften bis achten Zelle in der Basalschicht handelt es sich um einen Melanozyten. Ausgelöst durch UV-Strahlung (vor allem UVB) bilden sie vermehrt Melanin und geben es in Melanosomenkomplexen über dendritische Melanozytenausläufer an die Keratinozyten weiter. Die Keratinozyten nehmen das Melanin in Form von Melanosomen auf und lagern es als Schutz vor auftretender UV-Strahlung über dem Zellkern in Richtung der einfallenden UV-Strahlung ein. Ca. 36 Keratinozyten und ein Melanozyt bilden zusammen eine „epidermale Melanin-Einheit“.

Weitere Zelltypen der Epidermis sind Merkelzellen, denen eine Perzeptionsfunktion zugeschrieben wird, sowie Langerhanszellen, die immunologische Funktion haben.

Die Epidermis enthält keine Gefäße. Die Versorgung wird durch die darunterliegende stark vaskularisierte Dermis über Diffusion gewährleistet.

Die Dermis stellt das bindegewebige Gerüst der Haut dar. Das Bindegewebe setzt sich aus verschiedenen Zellen wie z.B. Fibroblasten, Histiozyten und Mastzellen sowie Bindegewebsfasern (Kollagen-, Retikulin- und Elastinfasern) zusammen, deren einzelne Bestandteile in eine gelartige Grundsubstanz eingelagert sind. Die Dermis ist reich an sensiblen und vegetativen Nervenfasern. Histologisch lässt sie sich weiter gliedern in ein fein strukturiertes Stratum papillare und ein grob strukturiertes Stratum reticulare mit kräftigen Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern, in deren Tiefe sich als integraler Bestandteil der Haut die Adnexe (Haarfollikel, Talgdrüsen, apokrine und ekkrine Drüsen) befinden. Weiter darunter grenzt die Dermis an die aus Fettgewebe bestehende Subkutis.

2.2.2 Biologische Wirkung von UV-Strahlung auf den Menschen

UV-Strahlung verursacht eine Reihe von Effekten im menschlichen Organismus, von denen hier die wichtigsten dargestellt werden.

2.2.2.1 Erythem

Es handelt sich um einen akuten Strahlenschaden nach UV-Exposition. Durch Hyperämie und eine mediatorvermittelte Entzündungsreaktion kommt es zur Rötung der Haut in den bestrahlten Arealen. Verantwortlich ist nahezu ausschließlich UVB-Strahlung. Die minimale Erythemdosis (MED) ist individuell stark unterschiedlich und hängt vom Hauttyp (siehe 2.1.3) ab. Nach Ausbildung des Eigenschutzes, durch UV-induzierte Pigmentierung und Aufbau einer Lichtschwiele kann die aktuelle Erythemschwelldosis um ein Mehrfaches über der MED liegen. Bei der Lichtschwiele handelt es sich um eine reaktive Verdickung der Hornzellschicht (Miescher 1931). Die MED liegt bei hellhäutigen Menschen entsprechend des Hauttypes zwischen 150 und 450 J/m².

2.2.2.2 Pigmentierung

Man unterscheidet Sofort- und Spätpigmentierung. Bei der Sofortpigmentierung handelt es sich um die oxidative Melanindunkelung des bereits vorhandenen Melanins. Die genauen molekularen Mechanismen sind noch nicht geklärt (Ortonne and Schwarz, 2003). Die Sofortpigmentierung ist instabil. In Abhängigkeit vom Hauttyp kommt es bereits nach ca. 1 Stunde zur Abschwächung des Kolorits. Eine protektive Wirkung gegen UV-Strahlung besteht durch Sofortpigmentierung nicht. Die physiologische Bedeutung ist ebenfalls noch unklar (Hönigsmann et al., 1986; Routaboul et al., 1999).

Die Spät- bzw. verzögerte Pigmentierung ist Ausdruck einer Melaninsynthese in den Melanozyten, die ein bis drei Tage nach einer wiederholten Exposition einsetzt. Während Sofortpigmentierung überwiegend durch UVA-Strahlung verursacht wird, ist für die Spätpigmentierung im wesentlichen UVB-Strahlung verantwortlich (Ballotti and Ortonne, 2002). Die Unterscheidung zwischen den Formen der Pigmentierung ist im Besonderen wichtig, da der Frühpigmentierung häufig fälschlich ein protektiver Effekt zugeordnet wird und in der Folge eine zunehmende Exposition stattfindet.

2.2.2.3 Schäden durch chronische UV-Exposition:

Auf chronisch UV exponierter Haut kommt es vor allem im höheren Lebensalter zu Veränderungen. Sehr häufig sind kleinfleckige irregulär konfigurierte Hyperpigmentierungen zu beobachten (Breathnach et al., 1991). Ebenfalls häufig treten Lentigo solaris auf. Die hyperpigmentierten Makulae treten bei über 90% der über 70-jährigen kaukasischen Bevölkerung an UV-exponierten Arealen auf. Es liegt eine lokale Melanozytenvermehrung vor (Garbe et al., 1994). Durch UVA-Bestrahlung können des Weiteren so genannte UVA - bzw. PUVA-induzierte Lentiginen verursacht werden. Die häufig bizarr sternförmige, hyperpigmentierte Läsion findet sich ausschließlich in den bestrahlten Arealen. Histologisch liegt eine vermehrte Anzahl großer Melanozyten im Stratum basale vor. In den letzten Jahren hat die Inzidenz dieser Läsionen - vermutlich durch höhere UV-Exposition - erheblich zugenommen. Die Dignität kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Eine regelmäßige dermatologische Kontrolle wird gegenwärtig empfohlen (Roth et al., 1989; Salisbury et al., 1989).

Weitere pigmentierte Läsionen, die nahezu ausschließlich auf UV-exponierten Hautarealen auftreten sind pigmentierte aktinische Keratosen und Erythrosis interfollicularis colli (Ortonne and Schwarz, 2003). Außerdem kommt es durch UV-Strahlung zur sogenannten aktinischen Elastose (Kligman, 1989). Durch strahleninduzierte Metalloproteinasen werden elastische Fasern geschädigt (Berneburg et al., 2000). Dies führt zu einem Faltenrelief, das als Hautalterung imponiert.

2.2.2.4 Vitamin-D Photoisomerisierung

Durch UVB-Strahlung kommt es durch Photosynthese zur Umwandlung von Provitamin D3 in Prävitamin D3, welches im Körper weiter verstoffwechselt wird. Über 90% des bioaktiven Vitamin D3 werden durch Photosynthese synthetisiert (Norris, 2001). Vitamin D3 spielt eine entscheidende Rolle im Kalziumstoffwechsel des Menschen. Unzureichende Vitamin D-Niveaus führen beim Menschen zu Rachitis, Osteomalazie und Osteoporose. Von einigen Autoren wird Vitamin D des Weiteren in Zusammenhang mit einer Risikoreduktion für verschiedene andere Erkrankungen (Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis) und Malignome (Mamma-, Prostata-, Kolonkarzinom und Malignes Melanom) gebracht. (Ainleigh, 1993; Lucas et al., 2002; Studzinski und Moore, 1995). Zur ausreichenden Vitamin D Synthese ist eine tägliche 10-15 minütige Exposition partieller Hautareale genug (Holick, 2004).

2.2.2.5 Immunsuppression

Seit Längerem ist bekannt, daß UV-Strahlung das Immunsystem beeinflusst. Vor allem UVB- Strahlung induziert eine immunologische Toleranz. Im Tiermodell konnte durch UV-Bestrahlung bereits 1986 die Abstoßung transplantiertter Hauttumoren verhindert werden (Kripke, 1986). In UV bestrahlter Haut wurde eine weit über die Bestrahlung andauernde antigenspezifische Immuntoleranz nachgewiesen, die vermutlich auf T-Suppressorzellen zurückzuführen ist (Schwarz, 1999). Darüber hinaus wird systemische Immunsuppression durch verschiedene Mediatoren vermittelt. Eine zentrale Rolle nehmen dabei Interleukin-10 und Urokaninsäure ein (Ullrich und Schmitt, 2000).

Trotz intensiver Forschung ist der genaue Mechanismus der Immunsuppression nicht vollständig bekannt. Als sicher gilt allerdings, dass neben den eben genannten Mechanismen DNA-Schäden der kutanen Zellen eine entscheidende Rolle spielen (Kripke et al., 1992).

Beim Menschen ist eine verminderte Immunantwort bei verschiedenen Infektionen wie Herpes-simplex, *Candida albicans* und Mykobakterien nachgewiesen. Der Verlauf einer HIV-Infektion kann durch UV-Strahlung negativ beeinflusst werden. (Flegg, 1990). Eine entscheidende Rolle kommt dem Immunsystem bei der Karzinogenese kutaner Tumoren zu. Bei immunsupprimierten organtransplantierten Patienten kommt es zu einer zunehmenden Inzidenz von malignen Hauttumoren. (Sloane et al., 1977, Boyle et al., 1984, Moloney et al., 2006 Gutierrez-Dalmau und Campistol, 2007).

Auch therapeutisch wird in der Phototherapie bei verschiedenen Hautkrankheiten die UV-induzierte Immunsuppression genutzt. Erwähnt seien hier beispielhaft die Psoriasis, das atopische Ekzem und verschiedene Formen des Pruritus (Van Weelden et al., 1988). Die immunologischen Effekte von UV-Strahlung werden am potentesten durch UVB Strahlung ausgelöst. Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl von Studien im UVB Spektrum durchgeführt. Es besteht noch weiterer Forschungsbedarf, aber jüngere Untersuchungen weisen auch auf eine Immunsuppression durch UVA-Strahlung hin (Damian et al., 2001).

2.2.2.6 UV-induzierte DNA-Schäden

Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Schädigung. Durch UVB-Strahlung erfolgt eine direkte Schädigung der DNA durch Photoabsorption und darauf folgende photophysikalische und photochemische Prozesse. Die weitaus häufigsten Läsionen sind stabile Bindungen zwischen benachbarten Pyrimidinen. Diese so genannten Dimerisierungen können in verschiedener Form auftreten. Quantitativ relevant sind vor allem Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD), Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukte(6-4PP) (s. Abb. 2.3) und das Dewar-valence isomer.

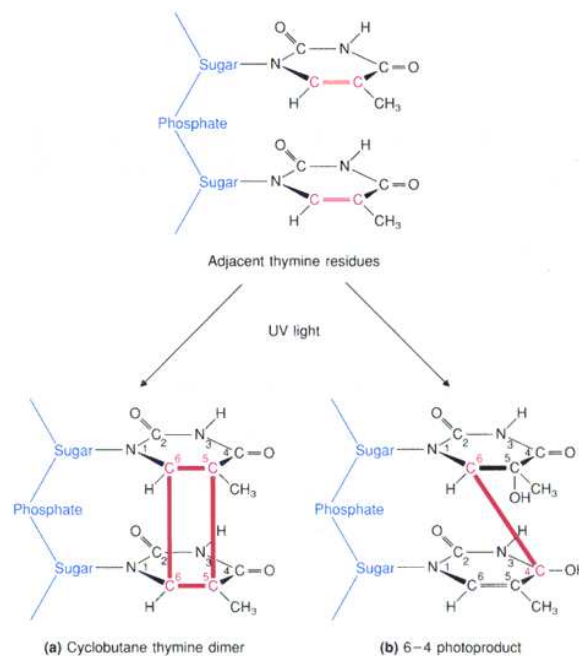


Abb. 2.3: Pyrimidindimere. Dargestellt sind die häufigsten UV-induzierten Dimere, das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) und das Pyrimidin(6-4)Pyrimidon-Photoprodukt (6-4PP).

CPDs sind die am häufigsten induzierte Läsion (Courdavault et al., 2005) und werden im Vergleich zu 6-4PPs etwa im Verhältnis 5:1 induziert (Mitchell et al., 1990b).

Die hier untersuchten CPDs entstehen durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden Basen und kovalente Bindung der beiden nebeneinander liegenden Pyrimidine (Cytosin, Thymin). Die Pyrimidindimere entstehen entlang der DNA in unterschiedlicher Häufigkeit, die von der lokalen Struktur und Basensequenz abhängig ist (Douki und Cadet, 2001). So entstehen CPDs nicht in derselben Frequenz an den verschiedenen Basen, vielmehr entstehen sie in

Abhängigkeit der Wellenlängen an unterschiedlichen Basenpaaren (Rochette et al., 2003).

Am häufigsten finden sich nach UVB-Bestrahlung von Säugetierzellen und humanen Keratinozyten Dimere von benachbarten Thyminen. Seltener treten Thymin-Cytosin oder Cytosin-Thymin Läsionen auf. Die seltenste Form stellt das Cytosin-Cytosin (CC) Dimer dar (Douki et al., 2003; Courdavault et al., 2005). Rochette (Rochette et al., 2003) berichtet über deutlich mehr CC Läsionen nach UVB-Bestrahlung. Insbesondere den CC Läsionen kommt aber eine besondere Bedeutung zu, da sie für die Entstehung der „UV-fingerprint mutations“ verantwortlich gemacht werden. Damit werden Mutationen bezeichnet, die sich in verschiedenen Hauttumoren nachweisen lassen (siehe Abschnitt Karzinogenese) und ursächlich auf eine UV induzierte CC-Läsion zurückgeführt werden (Brash et al., 1991). Es wird von der DNA-Polymerase an Stellen, die sie nicht ablesen kann, eine Adeninbase eingefügt („A-rule“). Dementsprechend wird auf dem Komplementärstrang Thymin ergänzt. Es handelt sich somit um C-T bzw. CC-TT Transitionen. Deren Entstehung durch UVB-Strahlung ist nachgewiesen (Mitchell, 1988; Kielbassa et al., 1997; Greinert et al., 2000a; Perdiz et al., 2000). Somit nehmen CPDs in der Karzinogenese eine zentrale Rolle ein. Weitere direkte, UV-vermittelte DNA-Schäden umfassen das Dewar-valence Isomer und Purindimere wie das Adenin-Thymindimer oder das 8,8-Adenin-Dehydrodimer. (Cadet et al., 2005) Diese spielen allerdings quantitativ eine untergeordnete Rolle.

UVA-Strahlung führt vor allem zu indirekten DNA-Schädigungen. Dabei werden zunächst interzelluläre Chromophore (z.B. Porphyrinen, Flavinen, NADH, 2-Thiouracil) angeregt. In der Folge kommt es zur Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies. (Cunningham et al., 1985). DNA-Protein-Crosslinks, DNA-Einzelstrangbrüche und oxidative Basenschäden treten in der Folge auf (Hönigsmann und Dubertret, 1996; Marnett et al., 2003). Insgesamt sind über 100 verschiedene oxidative Schäden beschrieben (Dizdaroglu, 1992). Auch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde beschrieben (Rapp und Greulich, 2004).

Eine besondere Bedeutung kommt den oxidativen Basenschäden zu, da sie ein mutagenes Potenzial besitzen. Die häufigste UVA-induzierte oxidierte Base stellt das 8-Hydroxyguanin (8-oxo-Gua) dar, das als Marker für oxidative Zellschäden angesehen wird. (Kwam und Tyrell, 1997; Wamer und Wei, 1997). UVB-Strahlung erzeugt hingegen nur sehr wenig 8-oxo-Gua. Das mutagene Potenzial entsteht durch die fehlerhafte Bildung von Basenpaaren mit Adenin (Shibutani et al., 1991) und die

folgende GC – TA Transversion (Cheng et al., 1992; Zhang et al., 1997; Le Page et al., 1998).

Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass das UVA-Mutationsspektrum von Säugerzellen nicht, wie erwartet, überwiegend GC–TA Transversionen aufweist (Sage et al., 1996; Kappes et al., 2006). Zusammen mit Untersuchungen, in denen keine erhöhte Mutationsrate in 8-oxo-Gua-reparaturdefizienten Zellen nachgewiesen werden konnte (Kappes und Rüniger, 2005) stellen diese Daten die Bedeutung von 8-oxo-Gua für UVA induzierte Mutationen in Frage. Darüber hinaus zeigen neue Daten, dass 8-oxo-Gua nicht der häufigste UVA-induzierte Schaden ist, sondern CPDs (Courdavault et al., 2004). So konnten Einzelstrangbrüche, oxidierte Pyrimidine, oxidierte Purine (vor allem 8-oxoGua) und CPDs von Douki im Verhältnis 1:1:3:10 nachgewiesen werden (Douki et al., 2003). Im Vergleich zu UVB ist der Anteil an Thy-Thy-Dimeren an den induzierten CPDs sehr hoch. Diese führen wegen der bekannten „A-rule“ selten zu Mutationen. Allerdings wurde auch die Induktion von Cyt-Thy-Dimeren nachgewiesen, die eine C–T Transition zur Folge haben können (Mouret et al., 2006). Der Mechanismus, der zur Induktion von CPDs durch UVA führt ist noch nicht bekannt. Da im Gegensatz zu UVB keine 6-4PPs erzeugt werden und eine direkte Anregung aus energetischen Gründen ausgeschlossen werden kann, geht man davon aus, dass bei der Anregung der Moleküle ein Triplet-Energietransfer eine Rolle spielt (Cadet et al., 2005; Mouret et al., 2006). Unabhängig vom Mechanismus zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass UVA-Strahlung in der Lage ist mutagene DNA-Läsionen (CPDs) zu erzeugen, deren Bedeutung für die Hautkarzinogenese nachgewiesen ist.

2.2.3 DNA-Reparatur

Da die DNA, wie oben dargestellt vielfachen Schädigungen ausgesetzt sein kann, existieren effektive Reparaturmechanismen, die die Schäden zum großen Teil fehlerlos aus der DNA entfernen. Dabei spielen unterschiedliche Mechanismen mit einer Vielzahl beteiligter Gene (Wood et al., 2001) eine Rolle. So ist für die Reparatur der hier untersuchten CPDs die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) verantwortlich. Oxidierte Basen, wie das beschriebene 8-oxo-Gua werden über Basenexzisionsreparatur eliminiert.

2.2.3.1 Basenexzisionsreparatur

Verschiedene spezifische Glycosylasen erkennen die modifizierten Basen in der DNA und schneiden diese aus. Die apurinische Stelle wird nun durch eine Endonuklease in einen Einzelstrangbruch überführt. Zur weiteren Reparatur existieren zwei Wege: Der „short-patch-way“, bei dem durch die Polymerase β nur die geschädigte Base ersetzt wird und der „long-patch-way“, bei dem mehrere Nukleotide, meistens zwei bis acht, unter Beteiligung zahlreicher Enzyme substituiert werden (Krokan et al., 2000).

2.2.3.2 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Der entscheidende Mechanismus für die Eliminierung von CPDs ist die Nukleotid-exzisionsreparatur (NER). Enzymatisch werden Oligonukleotide mit meist 24 bis 32 Basen entfernt und durch intakte Sequenzen ersetzt (Friedberg et al., 1995). Zwei Subtypen der NER werden unterschieden, die sich in vor allem in der Erkennung des Schadens unterscheiden. Die global genome-NER (GG-NER) repariert Schäden im gesamten Genom transskriptionsunabhängig. Wie dabei die beteiligten Enzyme den Defekt erkennen ist nicht vollständig geklärt. Vermutlich bindet aber zunächst der XPC-hHR23B Proteinkomplex und vermittelt den Beginn des Reparaturvorganges. Entsprechend des gegenwärtigen Standes der Forschung ist der weitere Ablauf identisch mit der zweiten Form, der „transcription coupled-NER“ (TC-NER). Hierbei werden Schäden am transskribierten Strang aktiver Gene repariert. Als Erkennungsmechanismus dient die RNA-Polymerase 2. Beim weiteren Ablauf der NER handelt es sich um einen äußerst komplexen Vorgang unter Beteiligung zahlreicher Enzyme, die den DNA-Strang entwinden und beidseitig des Schadens einschneiden. Endonukleasen entfernen schließlich die geschädigte Region, die dann, den Gegenstrang als Template nutzend, ersetzt wird (Wood, 1996; de Laat et al., 1999). Abbildung 2.4 stellt die NER schematisch dar.

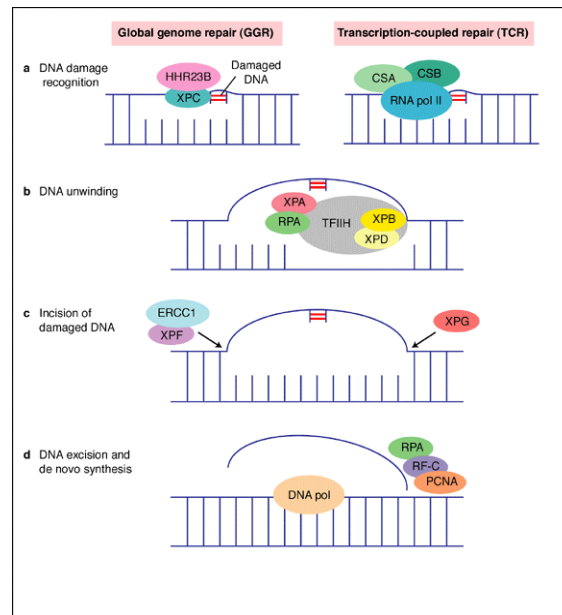


Abb. 2.4: Modell der Nucleotidexzisionsreparatur (Matsumura and Ananthaswamy 2002)

Defekte der NER führen zu einer stark erhöhten Häufigkeit von kutanen Karzinomen. Bei der autosomal rezessiv vererbaren Erkrankung Xeroderma pigmentosa handelt es sich um unterschiedliche Enzymdefekte der an der NER beteiligten Enzyme, die entsprechend benannt wurden (XPA – XPH). Mehrere Subtypen konnten genetisch differenziert werden. Bei den Betroffenen finden sich signifikante Häufungen von melanozytären und nichtmelanozytären Karzinomen bereits im Kindesalter. Häufig versterben die Patienten an malignen Melanomen (Kraemer et al., 1994; Herouy et al., 2003).

Die Geschwindigkeit der NER ist aber auch in gesunden Zellen von zahlreichen Faktoren abhängig. So unterliegt sie einer starken interindividuellen Schwankung (Greinert et al., 2000). Der Typ des Schadens ist ebenfalls von Bedeutung, da 6-4PPs in Hautzellen schneller als CPDs repariert werden (Tung et al., 1996; Courdavault et al., 2005), was möglicherweise dadurch zu erklären ist, dass die PP Mutation zu einer stärkeren Derotation der DNA-Helix (Kim und Choi, 1995), und somit zum schnelleren Erkennen des Schadens durch die Reparaturenzyme, insbesondere bei der GG-NER, führt (Kim et al., 1995). Van Hoffen konnte zeigen, dass die TC-NER für beide Läsionen gleich schnell ist (van Hoffen et al., 1995) und somit die schnellere Reparatur auf der GG-NER beruht. CPDs werden sowohl durch die TC-NER als auch durch die GG-NER repariert, wobei die Reparatur im transskribierten Strang aktiver Gene am schnellsten ist (Mellon et al., 1987; Selby und Sancar, 1993). Außerdem tritt eine

dosisabhängige Sättigung der Reparaturkapazität in humanen Keratinozyten auf (Greinert et al., 2000a). Bei zu zahlreichen Schäden verlangsamt sich somit die Reparaturrate. Für einige Schlüsselmutationen der Karzinogenese, wie dem p53 Gen konnte nachgewiesen werden, dass an den korrespondierenden Genloci nur eingeschränkt NER stattfindet (Gao et al., 1994; Tornaletti und Pfeiffer, 1994).

2.2.3.3 Photoreaktivierung

Einen weiteren Reparaturmechanismus von Zellen stellt die Photoreaktivierung dar. Durch eine lichtabhängige enzymatische Reaktion werden die Dimere gespalten und die originäre DNA Struktur wieder hergestellt. Dafür besitzen Zellen bestimmte Chromophore. Die Möglichkeit humaner Zellen zur Photoreaktivierung wurde lange kontrovers diskutiert. Während Anzeichen für die Möglichkeit der Photoreaktivierung humaner Zellen gefunden wurden (Roza et al., 1991; Sutherland und Bennett, 1995), konnten die beteiligten Chromophore in Säugetierzellen nicht nachgewiesen werden (Yasui et al., 1996). Heute geht man davon aus, dass die Fähigkeit der Photoreaktivierung den Säugetieren und somit den Menschen im Verlauf der Evolution abhanden gekommen ist.

2.3 Kutane Karzinome und Karzinogenese

Die Inzidenz der kutanen Karzinome ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Unterschieden werden melanozytäre (malignes Melanom (MM)) und nichtmelanozytäre Karzinome (Basalzellkarzinom (BCC), Plattenepithelkarzinom (SCC)). Zu den nichtmelanozytären Karzinomen werden des Weiteren sehr seltene Tumore (Merkelzellkarzinom, Karposisarkom, kutane Lymphome) gezählt, die insgesamt nur ca. 1% dieser Tumoren ausmachen (Robert-Koch-Institut, 2004).

Diese steigende Inzidenz ist nur zum Teil aus der demographischen Entwicklung der Bevölkerung heraus zu erklären. Die prognostizierte Alterszunahme der Bevölkerung lässt allerdings eine weitere Zunahme von Alterserkrankungen und somit kutanen Karzinomen erwarten (Diepgen, 2005). Die Letalität ist weitgehend konstant geblieben, was auf eine verbesserte Früherkennung zurückgeführt wird.

2.3.1 Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom ist der häufigste Tumor der Haut (ca. 80 % der nichtmelanozytären Karzinome). Es handelt sich um einen lokal destruierenden Tumor, der nicht metastasiert. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Seit dem Beginn der Registrierung im Saarland 1970 zeigt sich eine deutliche Zunahme der Neuerkrankungen (siehe Abb. 2.5), wobei männliche Personen häufiger betroffen sind.

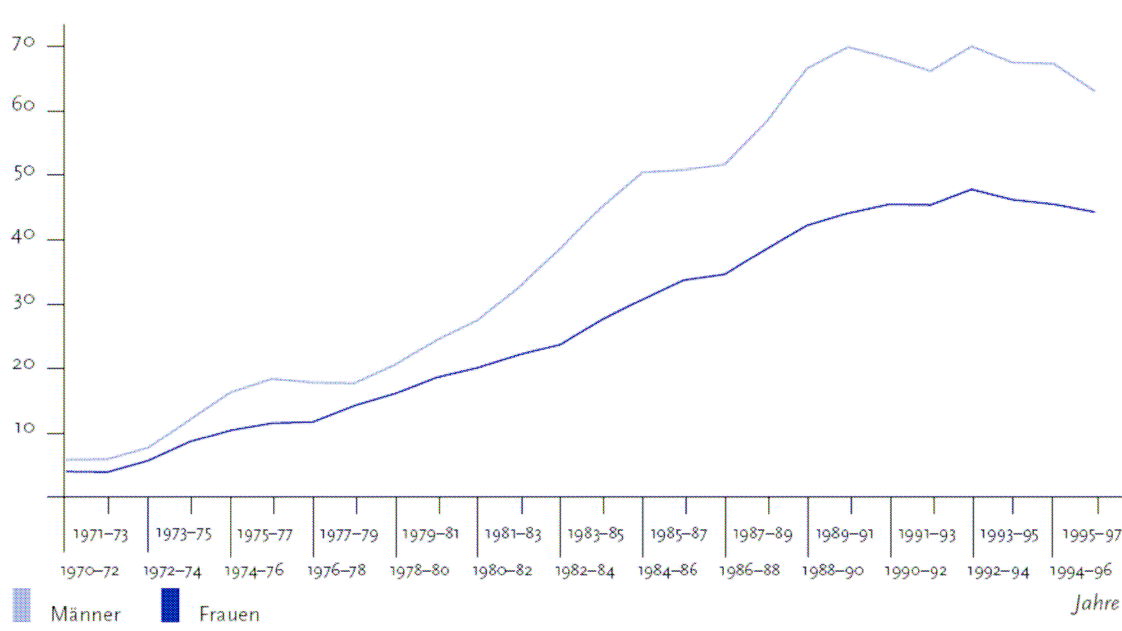


Abb. 2.5: Inzidenz des Basalzellkarzinoms im Saarland, Fälle pro 100.000 Einwohner, altersstandardisiert nach Europastandard (Robert-Koch-Institut 2004)

Das Basalzellkarzinom entwickelt sich überwiegend an sonnenexponierten Arealen der Haut. Daher postulierte man schon lange eine kausale Bedeutung von UV-Strahlung für die Entstehung des BCC. Allerdings kommt auch eine nennenswerte Anzahl von BCCs an nicht UV-exponierten Hautarealen vor, für die ähnlich wie beim malignen Melanom (siehe 2.3.3) intermittierende Expositionen verantwortlich gemacht werden (Vitasa et al., 1990; Gallagher et al., 1995; Krickler et al., 1995a; Krickler et al., 1995b; Rosso et al., 1996; Zanetti et al., 1996; Armstrong und Krickler, 2001).

Mittlerweile gilt eine genetische Prädisposition als weitgehend gesichert. Patienten, die am nevoiden Basalzellkarzinom-Syndrom (NBCC) erkrankt sind, entwickeln oft schon im frühen Alter multiple BCCs (Shanley et al., 1994; Kimonis et al., 1997). Bei ihnen konnte gezeigt werden, dass sie häufig Verluste des Chromosoms 9q aufweisen. Ausgehend von dieser Erkenntnis wurde der (Sonic-)Hedgehog-Patched-Smoothened

Reaktionsweg identifiziert, der in 100% der sporadisch auftretenden BBCs gestört ist (Brellier et al., 2004).

Es handelt sich um eine das Wachstum und die Morphogenese der Haarfollikel determinierende Signalkette. Vom PATCHED-Gen wird das Proteinprodukt Patched 1 kodiert. Dies dient als Zelloberflächenrezeptor für das Signalmolekül Sonic-Hedgehog (Shh). Durch Bindung von Shh an Patched 1 wird das Signalprotein Smoothened freigesetzt und initiiert eine Signaltransduktionskette, die die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Gli bewirkt. Eine erhöhte Konzentration von Gli führt durch Hemmung von Differenzierung und Zellzyklusarrest zur Karzinogenese (Oro et al., 1997; Fan and Khavari, 1999; Aszterbaum et al. 1999b; Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000). In mehr als 70% der sporadisch auftretenden BCC wurden Mutationen in PTCH oder SMO gefunden (Gailani et al., 1996; Xie et al., 1998). Die Störung dieses Reaktionsweges wird allgemein als hauptverantwortlich für die Karzinogenese akzeptiert (Jih et al., 1999). Sowohl im PATCHED-, als auch im Smoothened-Gen wurden UV-fingerprint-mutations (siehe 2.2.2.6) gefunden (Aszterbaum et al., 1999a; Aszterbaum et al., 1999b; Daya-Grosjean and Sarasin, 2000; Evans et al., 2000; Ratner et al., 2001; Couve-Privat et al., 2002; Kim et al., 2002). Daraus geht die Bedeutung der UV-Strahlung für die Entstehung von BCCs hervor.

2.3.2 Plattenepithelkarzinom

Beim Plattenepithelkarzinom handelt es sich um den zweithäufigsten Tumor der Haut, mit ebenfalls deutlicher Zunahme der Neuerkrankungen in Deutschland (siehe Abb. 2.6).

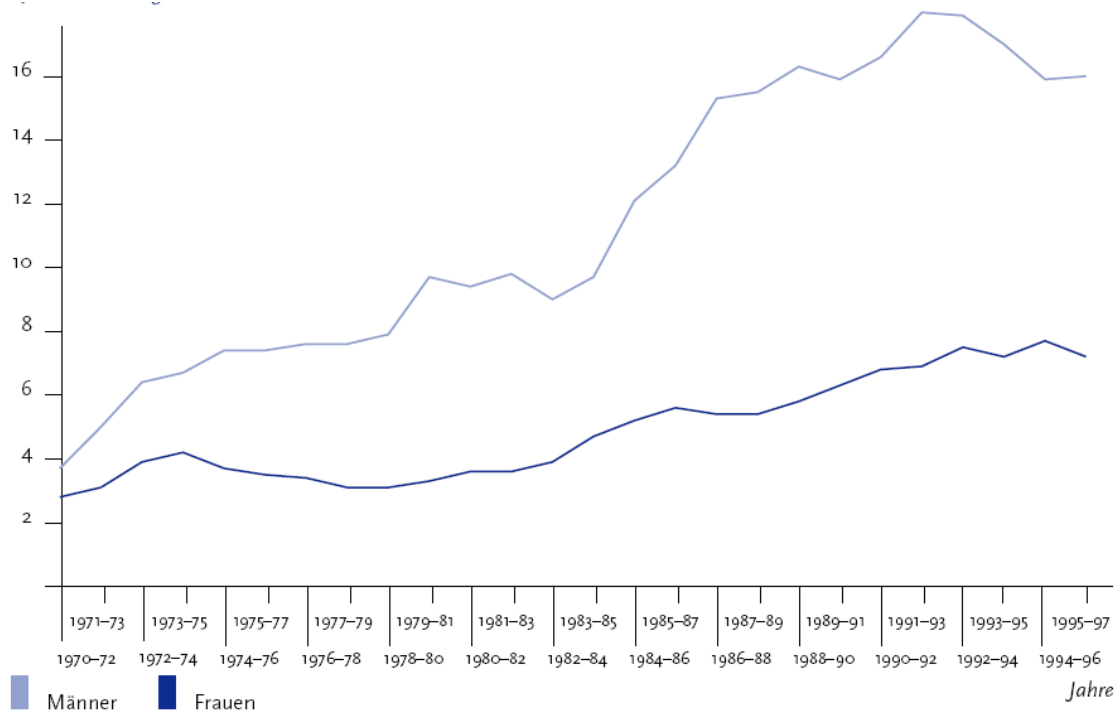


Abb. 2.6: Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms im Saarland, Fälle pro 100.000 Einwohner, altersstandardisiert nach Europastandard (Robert-Koch-Institut 2004)

Es handelt sich um einen destruierend invasiv wachsenden Tumor. Bei fortgeschrittenem Wachstum ist eine Metastasierung möglich. Das Plattenepithelkarzinom tritt vor allem im fortgeschrittenen Lebensalter auf. Lokalisiert ist es vor allem an UV-exponierten Hautarealen und es besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung bezüglich der kumulativen UV-Exposition (Armstrong und Kricger, 2001).

Für die Karzinogenese des SCC existieren dezidierte Modelle. Vermutlich kommt es zunächst zur Mutation eines p53-Allels durch UV-Strahlung. Dies verhindert die Apoptose der Zellen und stellt somit einen Selektionsvorteil der mutierten Zelle dar. Durch weitere Mutationen in anderen Genen wird das invasive Wachstum ermöglicht (Ziegler et al., 1994; Brash, 1997; Cleaver und Crowley, 2002).

Relativ häufig entsteht es aus der aktinischen Keratose als Vorstufe (Ortonne, 2002; Czarnecki et al. 2002). Bei 75-80% der weißen Bevölkerung mit aktinischer Keratose

treten P53 Mutationen auf (Park et al., 1996) und bei über 90% mit invasivem SCC in situ (Ortonne, 2002). Bei den nachgewiesenen p53 Mutationen handelt es sich überwiegend um UV-signature Mutationen (siehe 2.2.2.6) (Matsamura und Ananthaswamy, 2002).

Die Mutationen treten nicht zufällig entlang des p53-Codons auf, sondern an sogenannten „mutation-hot-spots“. Dabei handelt es sich um Orte an denen die enzymatische Reparatur behindert ist. Diese werden als „repair-cold-spots“ bezeichnet (Tornaletti et. al., 1993; Tornaletti und Pfeifer, 1994).

Eine besondere Bedeutung kommt CPD-retaining basal cells (CRBC) zu. Hierbei handelt es sich um interfollikuläre epidermale Zellen, die nicht apoptotisch sind und über einen längeren Zeitraum in der Epidermis persistieren (Mitchell et al., 2001). Möglicherweise handelt es sich um epidermale Stammzellen. Aufgrund ihrer Eigenschaft, DNA-Schäden zu akkumulieren und dauerhaft in der Epidermis zu persistieren, stellen epidermale Stammzelle ein ideales Target für die karzinogene Wirkung von UV-Strahlung dar und werden mit der Entstehung von Plattenepithelzellkarzinomen in Zusammenhang gebracht (Ortonne 2002; Gambardella and Barrandon, 2003). Diese Zellen konnten sowohl im Mausmodell als auch in der menschlichen Epidermis nachgewiesen werden (Mitchell et al., 1999; Mitchell et al., 2001).

Aufgrund der mehrstufigen Entstehung weist das Plattenepithelkarzinom eine große karyotypische Heterogenität auf. Typische Chromosomenaberrationen konnten dennoch nachgewiesen werden (Quinn et al., 1994).

2.3.3 Malignes Melanom

Beim malignen Melanom (MM) handelt es sich um einen besonders aggressiven Hauttumor mit ausgeprägter Metastasierungstendenz. Das MM ist fast ausschließlich für die durch Hautkrebs verursachte Letalität verantwortlich. Seine Inzidenz ist stark zunehmend (Abb. 2.7) und hat sich in den vergangenen 30 Jahren nahezu verdreifacht (Robert-Koch-Institut, 2004).

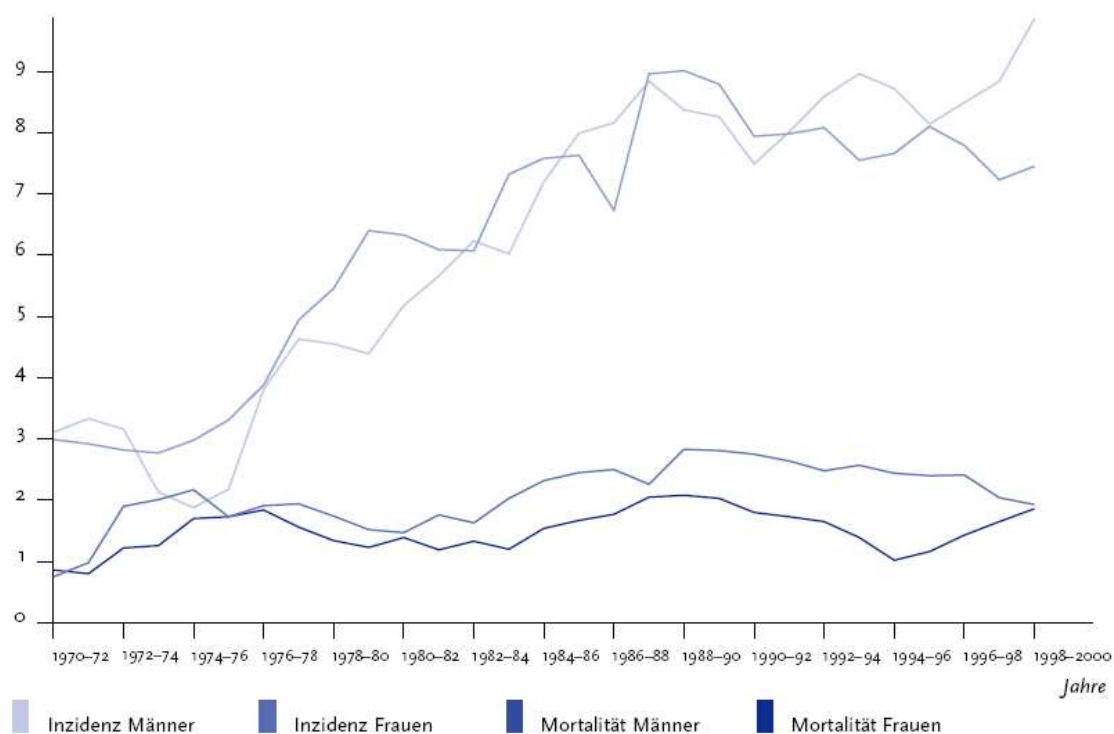


Abb. 2.7: Inzidenz und Mortalität des Malignen Melanoms im Saarland, Fälle pro 100.000 Einwohner, altersstandardisiert nach Europastandard (Robert-Koch-Institut 2004)

Es macht circa drei Prozent der bösartigen Neubildungen (ohne Berücksichtigung der nichtmelanozytären Hautkrebs) aus und verursacht circa ein Prozent der Krebstodesfälle. Circa die Hälfte der Betroffenen ist bei Diagnosestellung jünger als 65 Jahre (Krebsregister Saarland, 2007).

Maligne Melanome treten seltener auch an nicht chronisch sonnenlichtexponierten Hautarealen auf und können sich auch primär an anderen Organen manifestieren. Die Karzinogenese des malignen Melanoms ist nicht abschließend geklärt und somit Gegenstand intensiver Forschung. Multifaktorielle Ursachen werden angenommen.

Als gesichert gilt, dass nach gehäuftem Auftreten von Sonnenbränden in der Kindheit die Wahrscheinlichkeit, am Malignen Melanom zu erkranken, zunimmt (Armstrong und

Kricker, 2001; Cleaver und Crowley, 2002; Dulong et al., 2002). Nicht eindeutig ist die Studienlage bezüglich der lebenslangen UV-Exposition. Während mehrere Studien einen klaren Zusammenhang der kumulativen UV-Dosis und dem individuellen Risiko an einem MM zu erkranken beschreiben (Rodenas et al., 1996; Fears et al., 2002; Fargnoli et al., 2004), sieht Kennedy keinen solchen Zusammenhang (Kennedy et al., 2003). Gehäuft tritt das MM bei Menschen mit Hauttyp I auf. Diese hellhäutigen Menschen bräunen nicht und erleiden leicht einen Sonnenbrand. Als ursächlich wird eine Mutation im Melanocortin-1 Rezeptor postuliert (Schaffner und Bologna, 2001; Chin, 2003). Durch diese Mutation kommt es nicht zur Synthese des schützenden Eumelanins sondern es wird das photosensitivierende Pheomelanin gebildet. Dunkelhäutige Menschen erkranken wesentlich seltener an einem MM. Eine wesentliche Rolle von UV-Strahlung für die Karzinogenese gilt somit als gesichert.

Auch eine genetische Komponente, hochwahrscheinlich eine autosomal dominante Vererbung wird angenommen, da bei fünf bis zwölf Prozent der Patienten ein Verwandtschaftsgrad ersten Grades zu einem weiteren Erkrankten vorliegt. Diese Patienten erkranken zudem durchschnittlich früher und haben ein erhöhtes Risiko an einem Zweitkarzinom zu erkranken (Kopf et al., 1986; Fountain et al., 1990; Barnhill et al., 1992). Bei 25-40% dieser Patienten konnte eine Mutation des Kinase-Inhibitors CDKN2A (p16^{INK4a}) kodierenden Genes nachgewiesen werden, die als prädisponierende Mutation angesehen wird (Hussussian et al., 1994; Kamb et al., 1994). P16^{INK4a} inhibiert die Progression der Zellen in der G1-Phase. Durch Ausfall kommt es zur ungehemmten Proliferation.

Im Gegensatz zu nichtmelanozytären Karzinomen finden sich nur in ca. 20% Mutationen im p53-Gen (Zerp et al., 1999). Melanome entstehen aus vorbestehenden Nävi und nävusunabhängig (de-novo) (Rivers, 2004). Es finden sich jeweils unterschiedliche Mutationen, was erneut verschiedene Entstehungsmechanismen hochwahrscheinlich macht. Gemein ist allen Melanomformen ein hohes Maß an genomischer Instabilität mit einer Vielzahl von Chromosomenaberrationen.

2.4 Bedeutung von UVA-Strahlung für die Karzinogenese

Aus den dargestellten Zusammenhängen geht klar die karzinogene Wirkung von UV-Strahlung hervor. Diese wurde lange Zeit ausschließlich auf den UVB-Bereich des Spektrums zurückgeführt, da die direkte DNA-Schädigung durch UVB-Strahlung ausgeprägter ist.

In jüngerer Zeit mehren sich die Anzeichen für eine entscheidende Beteiligung von UVA-Strahlung an der Krebsentstehung. So zeigte sich, dass die Verwendung von Sonnencremes nicht zu einer Reduktion von Hautkrebs führt (Vainio, und Bianchini, 2000). Neben einer falschen Anwendung könnte ein Grund für diese Phänomen sein, dass lange Zeit die überwiegende Anzahl der verfügbaren Präparate reine UVB-Filter waren und UVA-Strahlung nicht herausgefiltert wurde. Darüber hinaus bezieht sich der angegebene Sonnenschutzfaktor, auf die UVB vermittelte Erytheminduktion, so dass keine hinreichende Aussage über die UVA-Filterleistung gemacht werden kann (Gasparro et al., 1998). Ein verändertes Expositionsverhalten, in der Weise, dass durch die Verwendung von Sonnenschutzmitteln längere Aufenthalte in der Sonne ohne Sonnenbrand möglich sind und zusätzlich ein Sicherheitsgefühl vermittelt wird (Stoebner-Delbarre et al., 2005), kann so dazu beitragen, dass zumindest Teile der Bevölkerung mit entsprechendem Freizeitverhalten einer dramatisch erhöhten UVA-Exposition ausgesetzt sind. Umfangreiche epidemiologische Daten zeigen außerdem eine Zunahme des Hautkrebsrisikos durch Solarienbenutzung, in denen überwiegend UVA-Strahlung mit einem kleinen UVB-Anteil eingesetzt wird (International Agency for Research on Cancer, 2007). Die Bestrahlungsstärken im Solarium übersteigen die maximale UV-Bestrahlungstärke auf der Erde, wie sie bei wolkenlosem Himmel am Äquator zur Mittagszeit erreicht wird (UV-Index 12), häufig. So sind im Solarium erythemwirksame Bestrahlungsstärken von $0,6 \text{ W/m}^2$ zulässig. Das entspricht einem UV-Index von 24 (BfS 2003).

Im Tierversuch konnte bei Mäusen die Induktion von SCCs (Van Weelden et al., 1990) und bei Fischen die Induktion von Melanomen (Setlow et al., 1993) durch reine UVA-Strahlung nachgewiesen werden. Damit konnte die alleinige karzinogene Wirkung von UVA-Strahlung gezeigt werden. Ein wichtiger Aspekt bei der Diskussion eines möglichen Hautkrebsrisikos durch UVA-Strahlung ist die Tatsache, dass UVA weniger als UVB beim Eindringen in die Epidermis gestreut bzw. bereits in den oberen Hautschichten absorbiert wird, so dass ein größerer Anteil die Basalzellschicht erreicht,

und auf die dort lokalisierten epidermalen Stammzellen trifft. Untersuchungen von Haut- und Tumorschnitten zeigten Mutationen, die UVA zugeordnet werden können, überwiegend in den unteren Schichten (Agar et al., 2004).

Wie bereits beschrieben, konnten in jüngerer Zeit CPDs als häufigster UVA-induzierter DNA-Schaden nachgewiesen werden (Courdavault et al. 2004; Mouret et al., 2006). Ein Vergleich von bestrahlten Monolayerkulturen und Haut zeigte auch hier einen großen Unterschied zwischen UVB- und UVA-Strahlung. Während durch UVB-Strahlung in der Haut bedingt durch die Absorption in den oberen Hautschichten ca. 20-mal weniger CPDs induziert werden als in den Primärkulturen beträgt die Reduktion nach UVA-Bestrahlung nur einen Faktor 1,5.

Darüber hinaus triggert UVA-Strahlung die Photoisomerisierung von 6-4PPs in das Dewarisisomer (Douki et al., 2003). Dieses Valenzisomer wird deutlich langsamer repariert im Vergleich zum 6-4PP (Perdiz et al., 2000).

Durch diese jüngeren Erkenntnisse ist UVA-Strahlung vermehrt in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt und wird als komplettes Karzinogen, genau wie UVB-Strahlung, angesehen (Halliday et al., 2005). Obwohl quantitativ hinsichtlich der induzierten DNA-Schäden UVB-Strahlung deutlich potenter ist, kann es durch die oben dargestellte Überexposition mit UVA-Strahlung in Teilen der Bevölkerung zu einer nicht zu vernachlässigenden Schädigung der DNA, insbesondere auch durch die Induktion von CPDs, kommen. Da es Hinweise darauf gibt, dass nach UVA-Bestrahlung die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden verlangsamt ist (Courdavault et al. 2004; Mouret et al., 2006), kann die Bedeutung von UVA-Strahlung für die Hautkrebsentstehung auch in der Beeinflussung zellulärer Reparaturprozesse liegen. Dieser Fragestellung wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellen

Für die vorliegende Studie wurden spontan immortalisierte, nicht tumorigene humane Keratinozyten (HaCaT) verwendet. Es handelt sich um eine etablierte Zelllinie, die in beiden Allelen des p53 Gens mutiert ist. Die Stammlinie ist weder kanzerogen noch invasiv. Ihr Vorteil liegt in der nahezu unbegrenzten Lebensdauer und dem schnellen Wachstum.

3.2 Bestrahlungsquellen

Um den Einfluss der Strahlenqualität auf die Induktion und Reparatur von CPDs in der Zelllinie zu untersuchen, ist eine möglichst isolierte Bestrahlung mit der entsprechenden Strahlenqualität erstrebenswert. Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene Strahlenquellen verwendet:

- **UVA-Spot 2000:** Es handelt sich um eine reine UVA-Strahlenquelle
- **LOT-Oriel SSR:** Dabei handelt es sich um einen Sonnenlichtsimulator (SSR – Solar Simulating Radiation), der zwei Prozent UVA- und 98% UVB-Strahlung emittiert. Durch Einbringen eines UVB/C-Filters kann die Quelle als reiner UVA-Strahler genutzt werden.
- **UVB TL 12/20:** Der Strahler erzeugt 58% UVA- und 42% UVB-Strahlung.

Durch Verwendung eines UVA-Filters, kann ein Großteil der UVA-Strahlung absorbiert werden.

Die im Vorfeld durchgeführten Spektralanalysen sind in den Abbildungen 3.1 bis 3.4 dargestellt. Dabei entspricht die rote Linie der erythemgewichteten Dosis des jeweiligen Strahlenspektrums entsprechend der CIE-Norm (siehe 2.1.3). Das erythemgewichtete Spektrum des UVA-Spot 2000 ist sehr gering und aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

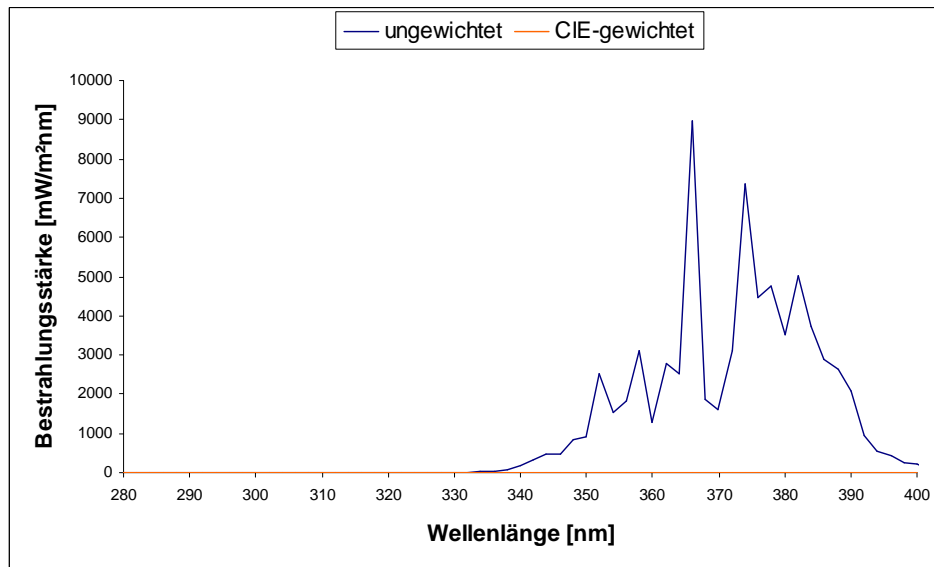


Abb. 3.1: Spektralanalyse UVA-Spot 2000, ungewichtet.

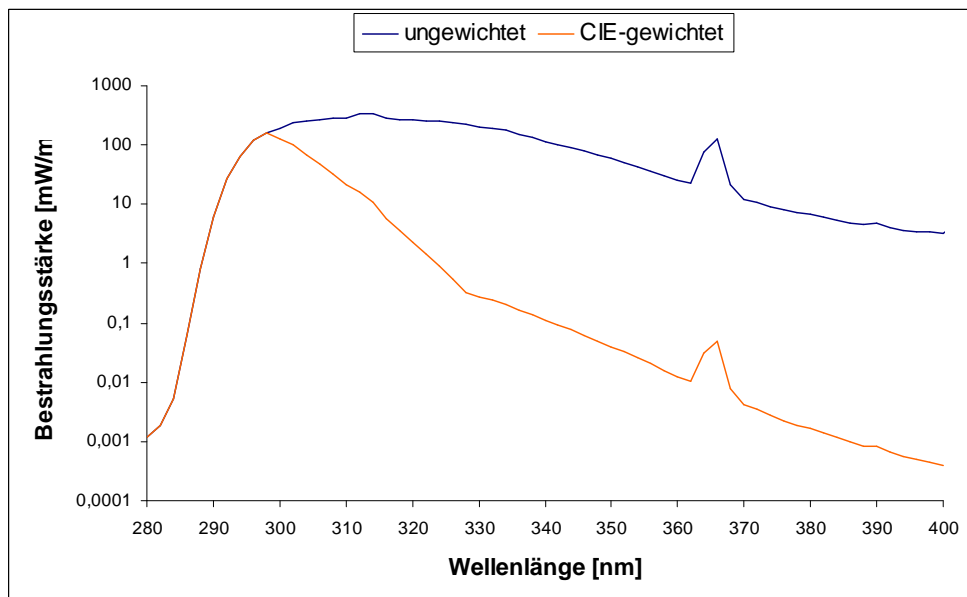


Abb. 3.2: Spektralanalyse UVB TL12/20, ungewichtet und CIE-gewichtet.

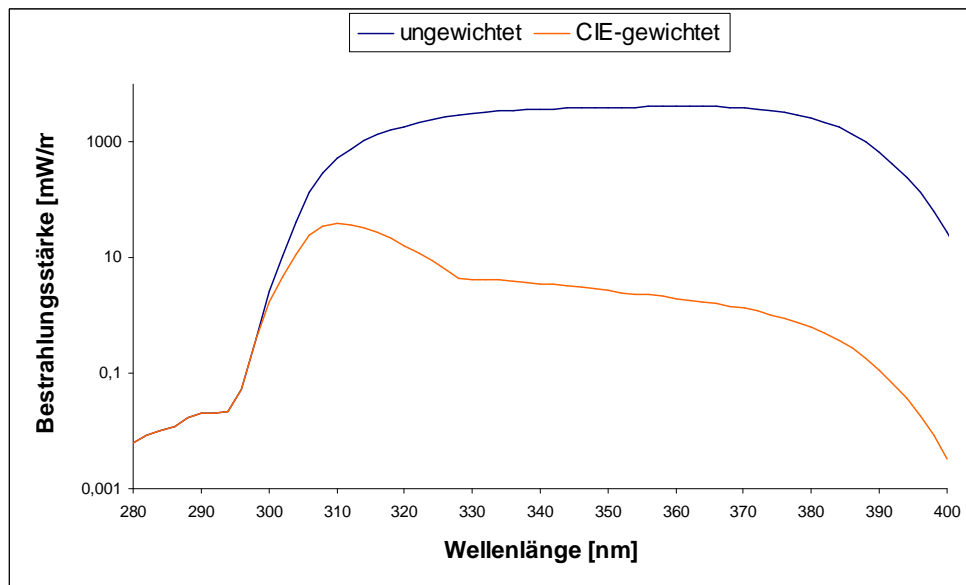


Abb. 3.3: Spektralanalyse LOT-Oriel Sonnenlichtsimulator, ungewichtet und CIE gewichtet.

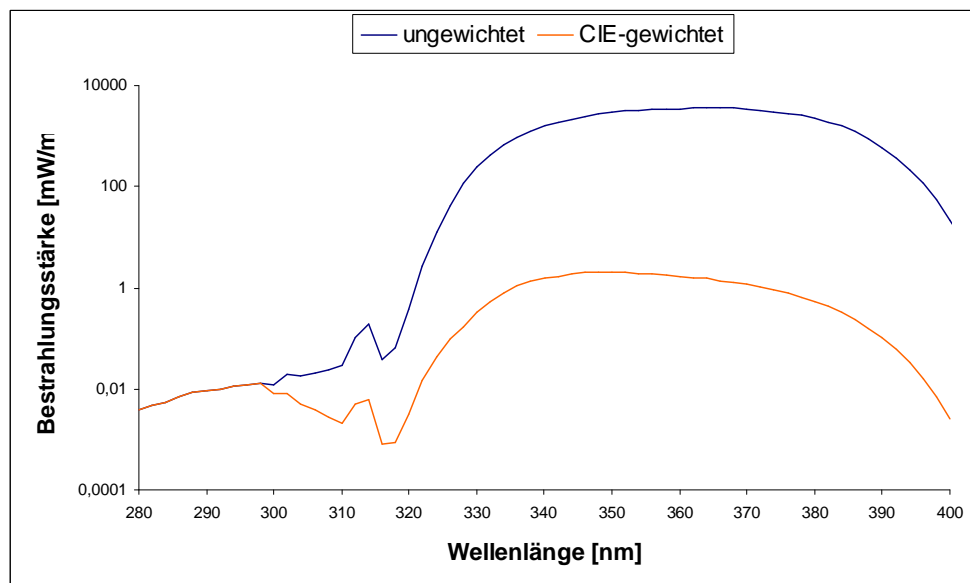


Abb. 3.4: Spektralanalyse LOT-Oriel Sonnenlichtsimulator mit UVB/C-Filter, ungewichtet und CIE-gewichtet.

3.3 Versuchsaufbau

Die Bestrahlung erfolgte im jeweils identischen Versuchsaufbau. Die Abbildung 3.5 gibt den Aufbau wieder. Die mit Zellen beimpften Petrischalen befinden sich bei der Bestrahlung in einer größeren Pyrexschale in Eiswasser. Dies ist notwendig, um eine Erwärmung und somit Messfehler auszuschließen. Im Vorfeld wurde in einer Petrischale während längerer Bestrahlung die Temperatur gemessen. Durch das eingebrachte Eiswasser konnte die Temperatur in engen Grenzen bei ca. fünf Grad Celsius konstant gehalten werden.

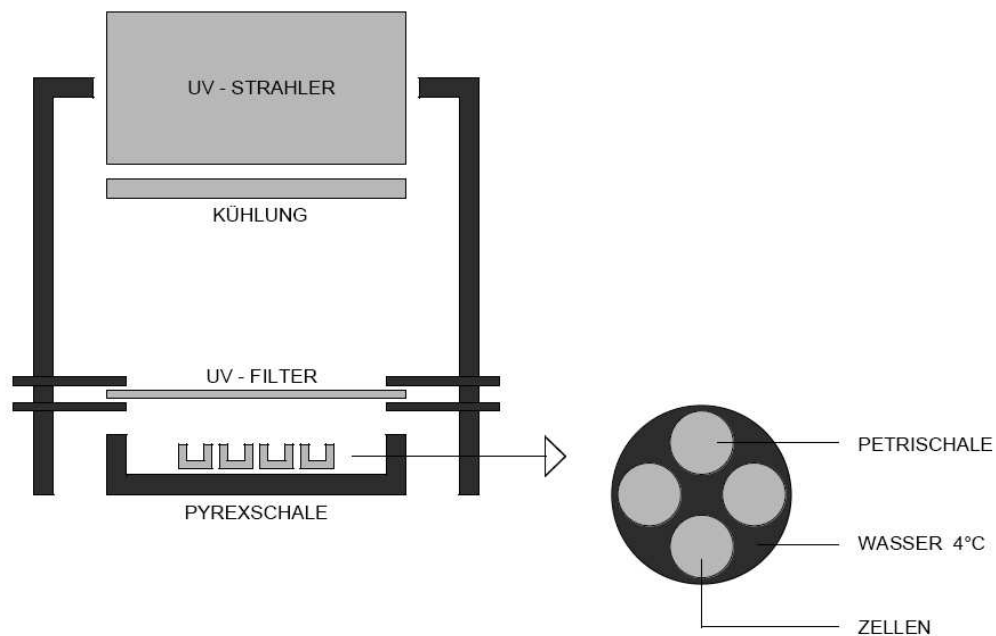


Abb. 3.5: Versuchsaufbau

3.4 Antikörpermarkierung

Voraussetzung für das hier durchgeführte Verfahren ist die Existenz von spezifischen Antikörpern, die ausschließlich an der zu detektierenden Läsion binden. Die so gebundenen Antikörper werden dann durch sekundäre Antikörper markiert. Diese sind mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und können so flusszytometrisch detektiert werden.

Für die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden CPDs existieren monoklonale Antikörper (AK) (Mizuno et al. 1991, Mori et al. 1991). Es handelt sich bei den verwendeten um aus der Maus gewonnene Anti-Cyclobutan-Pyrimidindimer-Klone (KTM 53). An diesen monoklonalen AK bindet der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Anti-Maus Immunglobulin). Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften ist der Nachweis von FITC im Durchflusszytometer möglich (Berg et al. 1993).

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Messung der Fluoreszenz und der Streulichteigenschaften fluoreszenzmarkierter Einzelzellen in Suspension. Dabei werden je nach Fragestellung spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper oder auch fluoreszierende DNA-Farbstoffe eingesetzt.

Das Messprinzip beruht auf der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität bestimmter zellulärer Komponenten. Um zu erreichen, dass jeweils nur eine Zelle der Anregungsstrahlung ausgesetzt ist, wird die hydrodynamische Fokussierung eingesetzt. Hierbei wird unter Verwendung eines Hüllstroms, der gegenüber dem Probenstrom einen höheren Druck aufweist, eine laminare Strömung erzeugt, die den Probenstrom so fokussiert, dass die Zellen perlschnurartig im rechten Winkel an der Anregungsquelle (Laser) vorbeigeleitet werden.

Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Daher ist eine quantitative Analyse möglich.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden in dieser Arbeit Fluoresceinisothiozyanat (FITC) sowie Propidiumjodid (PJ) eingesetzt mit einer Extinktions-/Emissionswellenlänge von 495/525 nm (FITC) bzw. 536/611 nm (PJ).

CPDs wurden in dieser Arbeit durchflusszytometrisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper detektiert. Das verwendete Gerät ist in der Lage mehrparametrische Messungen durchzuführen, womit die simultane Detektion zweier Fluoreszenzsignale, z.B. PJ und FITC, bzw. die Detektion des Streulichtsignals gemeint ist.

Somit lassen sich zunächst die Zellpopulationen aufgrund ihrer Emissionsparameter charakterisieren. Die Zellzyklusverteilung einer Population lässt sich durch die Quantifizierung des DNA-Gehaltes der einzelnen Zellen ermitteln. Eine Zelle durchläuft den Zellzyklus von der G₁-Phase mit einfachem DNA-Gehalt über die S-Phase, während der die DNA verdoppelt wird (ansteigender DNA-Gehalt) bis zur G₂-Phase, in der der doppelte DNA-Gehalt vorliegt. In der folgenden Mitose (M-Phase) wird die DNA kondensiert und es bilden sich Chromosomensätze aus. Als letzter Schritt der Mitose erfolgt die Zellteilung, durch die zwei Einzelzellen mit einfachem DNA-Gehalt entstehen. Im Durchflusszytometer können Zellen so nach ihrem DNA-Gehalt, der durch den proportionalen Einbau von PJ dargestellt wird, der G₁-, S- oder G₂/M-Phase zugeordnet werden. Das Ergebnis dieser Analyse wird graphisch in verschiedenen Diagrammen dargestellt. Über das Setzen von elektronischen Gates lassen sich so bestimmte Zellphasen auswählen (gaten), die dann ausschließlich zur Auswertung verwendet werden. Es wurden für die vorliegende Arbeit die Zellen der G₁-Phase gated, um eine einheitliche Population zu erhalten.

Verwendet wurde ein Durchflusszytometer der Firma Coulter (EPICS XL®) zusammen mit der mitgelieferten Software System II Version 3.0. Im Folgenden sollen die Ergebnisdiagramme kurz erläutert werden:

Um nicht intakte Zellen und Dubletten, d.h. zwei nicht getrennte Einzelzellen in der G₁-Phase, die von Zellen in der G₂-Phase unterschieden werden müssen, zu identifizieren wird die Tatsache genutzt, dass diese Zellen sich von intakten Zellen in ihrem Verhältnis von Signalhöhe zu Signalbreite unterscheiden. In Abbildung 3.6 ist dies am Beispiel von Dubletten dargestellt.

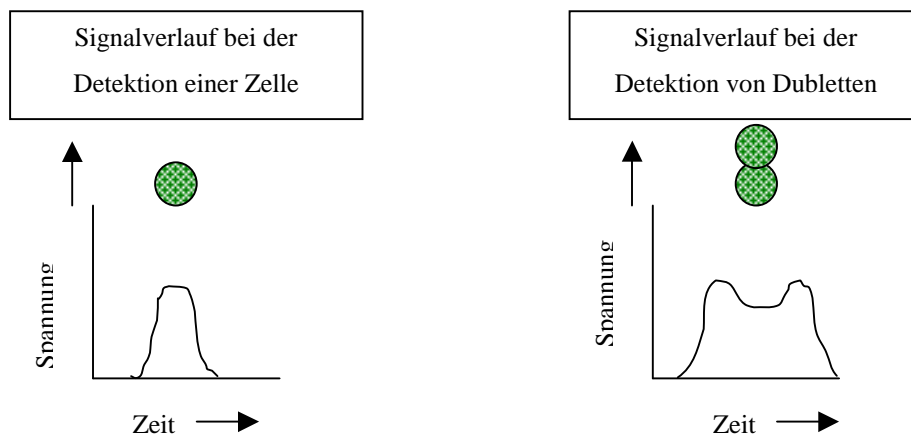


Abb. 3.6: Signalverlauf der Fluoreszenzdetektion bei atypischen Zellen am Beispiel von Dubletten.

Im **Diagramm 1** wird dieses Signalverhältnis gegen den DNA-Gehalt der einzelnen Zelle (PJ-Fluoreszenz) aufgetragen. So werden atypische Signalverläufe erfasst. Durch Setzen eines Gates können atypische Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Abbildung 3.6 zeigt Diagramm1 mit einem gesetzten Gate.

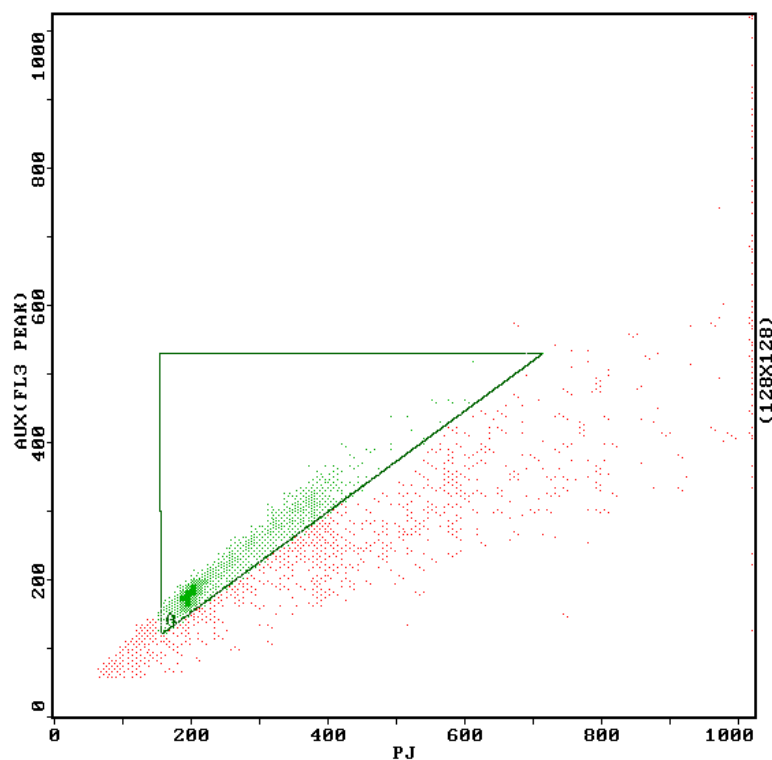


Abb. 3.7: Diagramm 1, Coulter EPICS, 3.0: Signalverlauf der Fluoreszenzdetektion gegen DNA-Gehalt der Zelle, Einheiten der Fluoreszenz in arbitrary units, gesetztes Gate.

In **Diagramm 2** wird die Zellzahl gegen den über die PJ-Fluoreszenz ermittelten DNA-Gehalt dargestellt (siehe Abb. 3.8). Dies entspricht der Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Somit gibt die Grafik Auskunft über den Zustand der Population. Deutliche Veränderungen sind Hinweis auf schwere Schäden in der Population, die zu einer Störung der Proliferation führen. In der dargestellten Abbildung befindet sich die überwiegende Anzahl der Zellen in G₁-Phase.

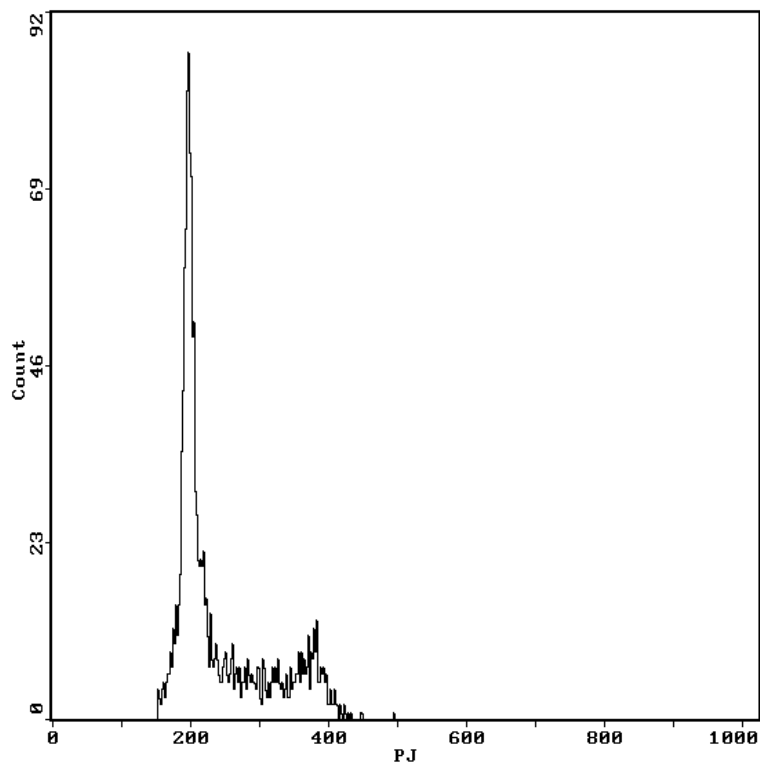


Abb. 3.8: Diagramm 2, Coulter EPICS, 3.0: Zellzahl gegen DNA-Gehalt (PJ-Fluoreszenz in arbitrary units) der Einzelzelle

Diagramm 3 zeigt den CPD-Gehalt (FITC-Fluoreszenz) gegen die Zellzahl, also die Anzahl von Zellen mit einer bestimmten Anzahl von induzierten CPDs. Der Fluoreszenzgehalt gibt damit das Ausmaß der DNA-Schädigung der Zellen wieder. Da im vorliegenden Experiment ein homologes Bestrahlungsfeld verwendet wird, ist auch ein ähnliches Schadensausmaß der einzelnen Zellen zu erwarten. Bei höherem Schadensausmaß kommt es zur Rechtsverschiebung der Kurve. In Abbildung 3.9 ist dies dargestellt.

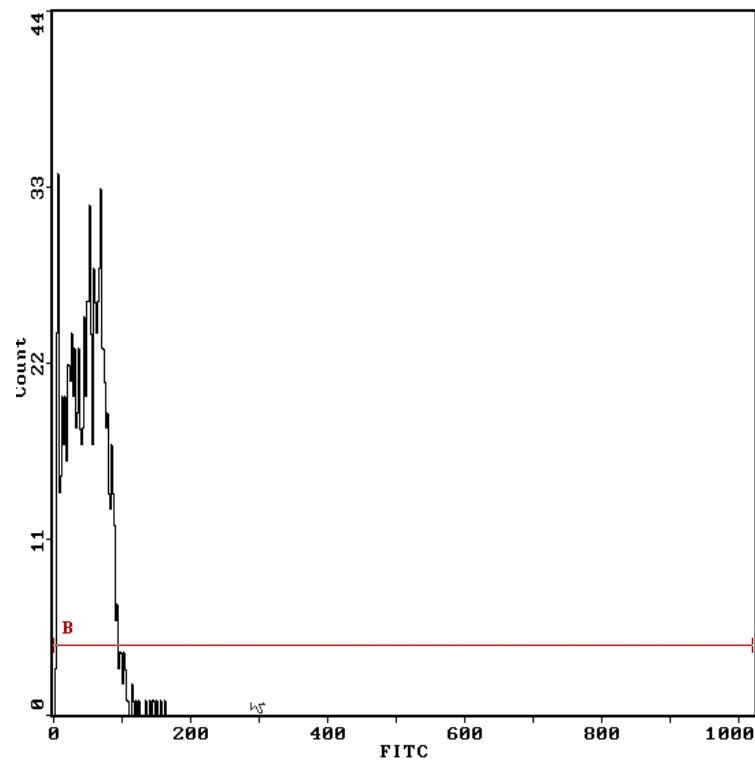


Abb. 3.9: Diagramm 3, Coulter EPICS, 3.0: Zellzahl gegen CPD-Gehalt (FITC-Fluoreszenz in arbitrary units) der Einzelzelle

Den DNA-Gehalt (PJ-Fluoreszenz) der Einzelzellen gegen ihren CPD-Gehalt (FITC-Fluoreszenz) zeigt **Diagramm 4**. Beispielhaft dargestellt ist eine Häufung von Zellen mit ähnlichem DNA- und CPD-Gehalt. Diese der G₁-Phase. entsprechenden Zellen werden durch das eingelegte Gate für die Analyse ausgewählt.

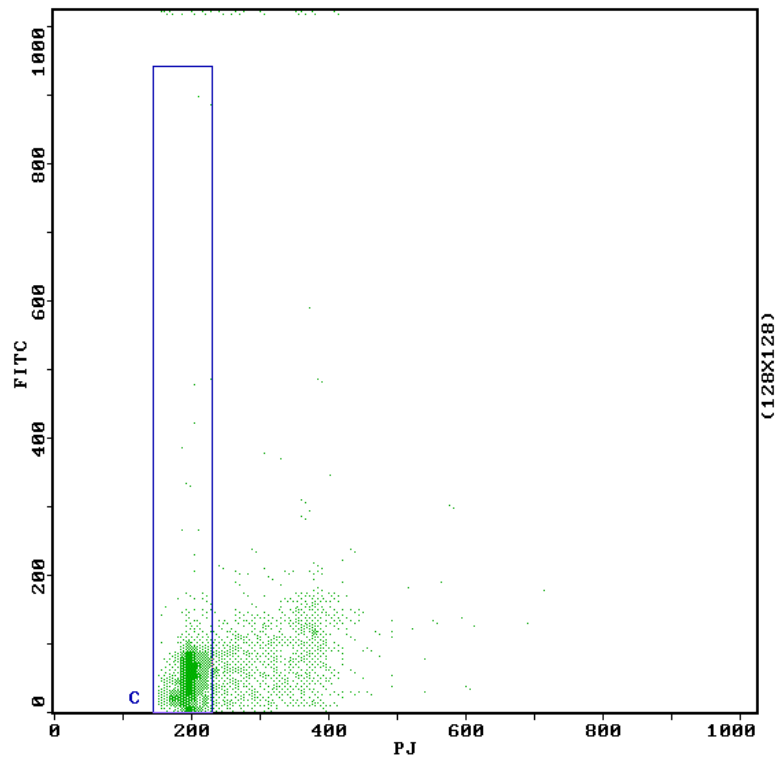


Abb. 3.10: Diagramm 4 Coulter Epics, 3,0: CPD-Gehalt (FITC-Fluoreszenz) gegen DNA-Gehalt (PJ-Fluoreszenz) der Zellen in arbitrary units, gesetztes Gate zur Auswahl der Zellen in G₁-Phase.

3.6 Bestrahlungsprotokolle

Im Folgenden sind die durchgeführten Bestrahlungsprotokolle aufgeführt. Die entsprechende Zellpräparation wurde wie unter 3.7 dargestellt durchgeführt. Es wurden jeweils mehrere Messreihen durchgeführt.

3.6.1 Messung der dosisabhängigen Induktion

Zunächst wurde die dosisabhängige Induktion von CPDs durch unterschiedliche Strahlenqualitäten direkt nach der Bestrahlung gemessen. Die eingesetzten Dosen orientieren sich an der natürlichen terrestrischen UV-Strahlung der jeweiligen Strahlenqualität. Die Messungen erfolgten nach Bestrahlung mit folgenden Dosen:

UVA-Strahlung:

1. UVA Spot 2000:

Dosis: 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 kJ/m²

2. UVA-SSR: (LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator mit UVB/C-Filter)

Dosis: 100, 200, 400, 600, 800, 1000 kJ/m²

UVB-Strahlung:

TL12/20 mit Kodacell-UVA-Filter:

Dosis: 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 J/m²

SSR-Strahlung:

LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator

Dosis: 10, 20, 40, 60, 80, 100 kJ/m²

3.6.2 Messung der Reparaturkinetik strahleninduzierter CPDs

Zur Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeit wurde die Fluoreszenz der Proben im Zeitverlauf gemessen. Dazu wurden insgesamt acht Messzeitpunkte ($t = 0-168$ Stunden) definiert. Für die entsprechende Reparaturzeit wurden die Zellen im Nährmedium im Brutschrank inkubiert. Da bekannt ist, dass schwer geschädigte Zellen Genschäden langsamer reparieren als leicht geschädigte (Greinert et al., 2000b), ist es notwendig, Reparaturkinetiken nach quantitativ ähnlicher CPD-Induktion zu vergleichen. Aus der dosisabhängigen Induktion ergeben sich Äquivalenzdosen bezüglich der CPD-Induktion (siehe Ergebnisse Abb. 4.1 – 4.4). Im UVB-Bereich wurden drei Kinetiken gemessen. Dementsprechend wurden folgende Protokolle gewählt:

UVA-Reparaturkinetik:

Strahlenquelle: UVA-Spot 2000

Dosis: 600 kJ/m^2

Reparaturzeit (t) = 0, 6, 16, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden

UVB-Reparaturkinetiken:

Strahlenquelle: Philips TL12/20 mit UVA-Filter

Dosen: 50 J/m , 200 J/m^2 und $300/\text{m}^2$

Reparaturzeit (t) = 0, 6, 16, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden

SSR-Reparaturkinetik:

Strahlenquelle: LOT-Oriel SSR

Dosis: 100 kJ/m^2

Reparaturzeit (t) = 0, 6, 16, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden

3.6.3 Messung der Reparaturkinetik nach UVA-Vorbestrahlung

Zur Messung des Einflusses einer UVA-Vorbestrahlung auf die Reparaturkinetik der Zelle, wurde die mittlere Fluoreszenz der Zellen analog zum Vorgehen nach singularer Bestrahlung gemessen. Zunächst wurde die Vorbestrahlung mit UVA (LOT-Oriel mit UVB/C-Filter; Dosis 100kJ/m²) durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Pause erfolgte die Nachbestrahlung mit SSR beziehungsweise UVB-Strahlung. Es ergaben sich folgende Protokolle:

SSR mit UVA-Vorbestrahlung – Reparaturkinetik:

Strahlenquellen: LOT-Oriel SSR mit UVB/C-Filter und LOT-Oriel SSR

Dosis(UVA): 100 kJ/m²; 30 min. Pause; Dosis(SSR): 100 kJ/m²

Reparaturzeit (t) = 0, 6, 16, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden

UVB mit UVA-Vorbestrahlung – Reparaturkinetik:

Strahlenquellen: LOT-ORIEL SSR mit UVB/C-Filter; Philips TL12/20 (UVB)

Dosis(UVA): 100 kJ/m²; 30 min. Pause; Dosis(UVB): 300 J/m²

Reparaturzeit (t) = 0, 6, 16, 24, 48, 72, 96, 168 Stunden

3.7 Zellpräparation

Die Zellbehandlung wurde für alle Versuchsreihen identisch entsprechend des folgenden aufgeführten Protokolls durchgeführt.

3.7.1 Zellkultivierung

Kultiviert wurde die Zelllinie in Gewebekulturflaschen (75cm^3) in 15 mL DMEM +10% FKS bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Ein Umsetzen der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen alle 3-4 Tage entsprechend des folgenden Protokolls. Einmal pro Woche wurde das Medium ausgewechselt.

Umsetzen der Zellen:

- Verwendete Lösungen: DMEM + 10% FKS, EDTA 0,1%, Trypsin 0,1% im 37°C warmen Wasserbad aufwärmen
- Medium vom Zellrasen absaugen
- 2 mL EDTA zugeben, im Brutschrank für 10 Minuten inkubieren
EDTA absaugen
- 1,5 mL Trypsin zugeben, im Brutschrank für 5 Minuten inkubieren
- Vereinzeln der Zellaggregate durch Pipettieren
- Zugabe von 9 mL DMEM, gut durchmischen
- Mit Neubauerzählkammer Zellzahl bestimmen
- Einsaat von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro Kulturflasche

3.7.2 Einsaat der Zellen

Für die Bestrahlung werden $2 \cdot 10^5$ bzw. $7 \cdot 10^5$ Zellen in 60/15mm bzw. 35/10mm Petrischalen eingesät. Diese werden bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und so durch Kontaktinhibition zur Synchronisation gebracht. Dadurch kommt es zu einem Proliferationsstopp der Zellen. Die überwiegende Zahl der Zellen befindet sich somit in der G_1 -Phase.

3.7.3 Zellpräparation nach Bestrahlung

Nach der Bestrahlung erfolgte die Zellpreparation entsprechend des folgenden Protokolls:

- DMEM von Zellkultur absaugen
- Zellen mit sterilem PBS ++ bedecken (1mL bei 35/10mm PS, 2mL bei 60/15mm PS)
- Zellen 10 min vor Beginn der Messung auf Eis legen
- Zellen auf Eis bestrahlen
- Sofort nach der Bestrahlung oder nach entsprechender Reparaturzeit abtrypsinieren
- Zellen vom Boden ablösen, vereinzeln und in 2,5mL DMEM aufnehmen
- Zellsuspension in beschriftete Röhrchen geben
- Petrischale mit 1,5 mL DMEM nachspülen
- Auszählen in Neubauerzählkammer
- Zentrifugieren (10min, 150xg)
- Überstand abgießen
- Pellet aufschütteln
- Mit Ethanol (-20°C) auf $6, \cdot 510^5$ Zellen /mL einstellen
- Bei -20°C lagern

3.7.4 Präparation zur Antikörperanfärbung

Die Präparation erfolgte entsprechend folgendem Protokoll:

- Je 1mL Zellsuspension ($6 \cdot 10^5$) aus den eingefrorenen Proben entnehmen und abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Überstand verwerfen, Pellet aufschütteln
- Zellen in 1mL PBS -/- aufnehmen (20min, Raumtemperatur=RT)
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen in 2mL 0,01% RNase-Lösung aufnehmen (10 min, 37°C Wasserbad)
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen in 2mL kalte Pepsinlösung (immer frisch ansetzen) aufnehmen (10 min, 37°C Wasserbad), dann in Eiswasser inkubieren (5 min)
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- 3mL eiskalte PBS -/- dazugeben
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen in 2mL 2N HCL aufnehmen (10 min, RT)
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen in 4 mL PBS -/- waschen
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen mit 4 mL PBS/BSA waschen
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg)
- Zellen in 100µL (CPD 1µL/mL) inkubieren (2 Stunden bei RT, schütteln)
- Zellen in 1mL PBS-/- aufnehmen
- Abzentrifugieren (10 min, 150xg), Überstand gut entfernen
- Zellen in 500 µL PBS -/- und 7,5µL Propidiumjodid (PJ) aufnehmen und in Messröhrchen überführen

3.8 Material und Geräteliste

3.8.1 Verwendete Geräte

Begasbarer Brutschrank	Cell Cultur Incubator, Queue, Ashevielle, USA
Durchflusszytometer	EPICS XL, Coulter, Krefeld
Software	EPICS XL/XL-MCL Version 3.0, Coulter, Krefeld
Lüftermodul	VK 220 Axiallüfter, Voltkraft, München
Mikroskop	Wilovert, Hund, Wetzlar
Neubauerzählkammer	Köthe, Etzhorn
Reagenzglasschüttler	VF 2, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Saugball/Pasteurpipetten	Wilke & Witzel, Hamburg
Schüttler	KL 2, Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank Bremen	BSB 4A, Gelaire Flow Laboratories, Schnakenbert,
UV-Strahler	UVA-Spot 2000, Dr. Hönle, Martinsried LOT-Oriel SSR, Oriel, Darmstadt TL 12/20, Philips, Hamburg
UV-Filter	UVB/C-Filter, Oriel, Darmstadt UVA-Filter, Kodacel, Rochester, USA
Spektralradiometer	FSM 150 Xe, Bentham, Berkshire, UK
Wasserbad	1038, GFL Heraeus Instruments, Burgwedel
Zentrifuge	Labofuge 400e, Heraeus, Osterode

3.8.2 Gebrauchswaren

Pateurpipetten	Köthe, Oldenburg
Petrischalen	Wilke & Witzel, Hamburg
Pipetten	Sarstedt, Wiesloch
Pipettenspitzen	Rudolf & Franke Labortechnik, Hamburg
PP-Röhrchen	Rudolf & Franke Labortechnik, Hamburg
Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson and Company, Heidelberg
Wägebapier	Wilke & Witzel, Hamburg
Zellkulturschalen	Wilke & Witzel, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Wilke & Witzel, Hamburg

3.8.3 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Aqua dest.	Baxter, Erlangen
BSA	Sigma, Deisenhofen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
DMEM-Pulver	Life Technologie, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Georg Hansen, Wrestedt
FKS	Biochrom Seromed, Berlin
HCL	Merck, Darmstadt
Isoton II	Pharmacia, Hilter
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
PBS-Tablets	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Life Tecnologies, Eggerstein
Pepsin	Sigma, Deisenhofen
PJ	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
RNAse	Sigma, Deisenhofen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Trypsin	Biochrom Seromed, Berlin

3.8.4 Antikörper

Anti-Thymine Dimer (Klon KTM 53) - Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA
Fluorescein (DTAF)-konjugiertes Ziege-Maus IgG - Dianova GmbH, Hamburg

3.8.5 Nähr- und Gebrauchslösungen

BSA-Lösung (1%)	1 g BSA, 100 mL PBS
DMEM	13,38 g DMEM-Pulver, 3,7g NaHCO ₃ 10 mL Penicillin/Streptomycin auf 1L Aqua dest pH-Wert auf 7,0 einstellen und steril filtrieren Lagerung bei 4°C, 50 mL FKS vor Verwendung zugeben
EDTA (0,1%)	100 mg Titriplex III, 100 mL PBS
Pepsinslösung	0,5g Pepsin, 97,5 mL Aqua dest., 2,5 mL 2N HCL
PBS	9,6 g PBS, 900 mL Aqua dest., 10 mg Kalziumchlorid
PBS +/-	1) 0,05 g MgCL ₂ , 6*H ₂ O, 2 Tbl. PBS, 500 mL Aqua dest. 2) 0,132 g CaCl ₂ , 2*H ₂ O, 500 mL Aqua dest. Getrennt lösen, anschließend vereinigen
RNAse (0,01%)	100 mg in 100 mL 0,1%PBS steril gelöst, Lagerung bei -20°C, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
Trypsin	0,5 g Trypsinpulver, 1,3 g (tri)Natriumcitrat-Dihydrat, 3,0g NaCl, 0,1 g EDTA, 5 mL Penicillin/Streptomycin (10 mg/mL), 500 mL Aqua dest., auf pH 7,8 einstellen.

4 Ergebnisse

In die Auswertung einbezogen wurden nur Zellen, die entsprechend der Darstellung in Material und Methoden gegatet wurden (vergl. 3.5), also Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden und somit einen gleichen DNA-Gehalt aufweisen. Die Anzahl flusszytometrisch detektierter Zellen lag in allen Messungen über 10.000. Es handelt sich bei den graphischen Darstellungen jeweils um die Mittelwerte mehrerer Messreihen. Verwendet wurde die Software Origin 5,0 Professional.

4.1 CPD-Induktion durch Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR

Die CPD-Induktion in den HaCaT-Zellen ist in den Abbildungen 4.1 bis 4.4 dargestellt. Die Grafiken zeigen jeweils für die betreffende Strahlenquelle die aus mindestens 3 Messreihen gemittelte flusszytometrisch quantifizierte Fluoreszenz pro Zellkern in Abhängigkeit der eingesetzten Strahlendosis.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierung der Achsen zur besseren graphischen Darstellung. So ist die Dosis in der Dosiseffektcurve für UVB-Strahlung in J/m^2 (Abb.4.4), bei den anderen Strahlenquellen in kJ/m^2 angegeben (Abb. 4.1 bis 4.3). Es zeigt sich bei allen Strahlenquellen eine dosisabhängige Schadensinduktion mit linearem Verlauf.

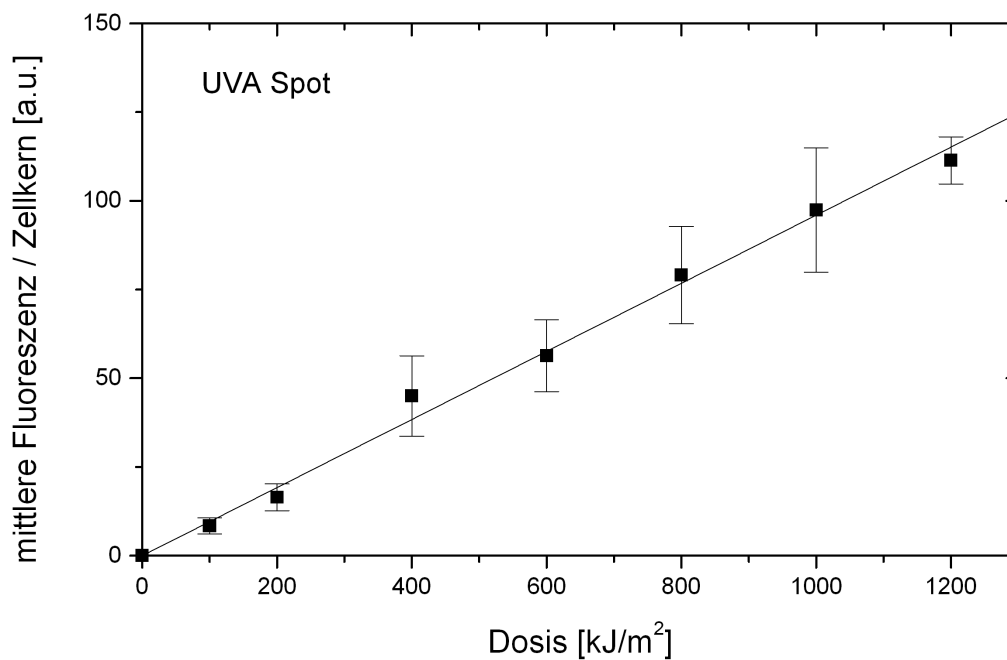


Abb. 4.1: Dosiseffekt der CPD-Induktion durch UVA-Strahlung. Strahlenquelle: UVA-Spot 2000; Dargestellt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

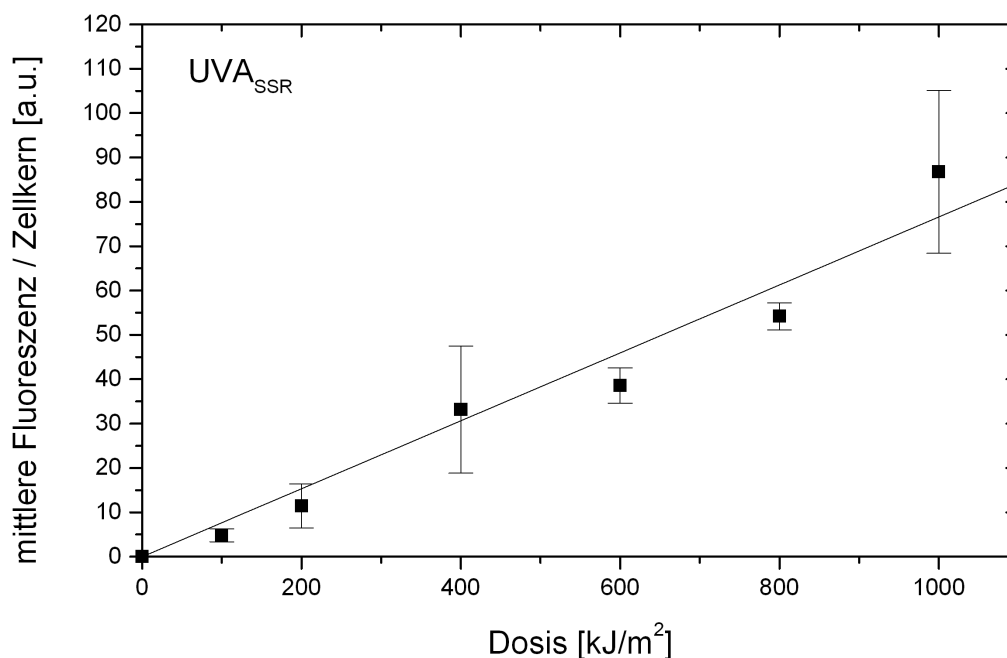


Abb. 4.2: Dosiseffekt der CPD-Induktion durch UVA-Strahlung. Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator mit UVB/C Filter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

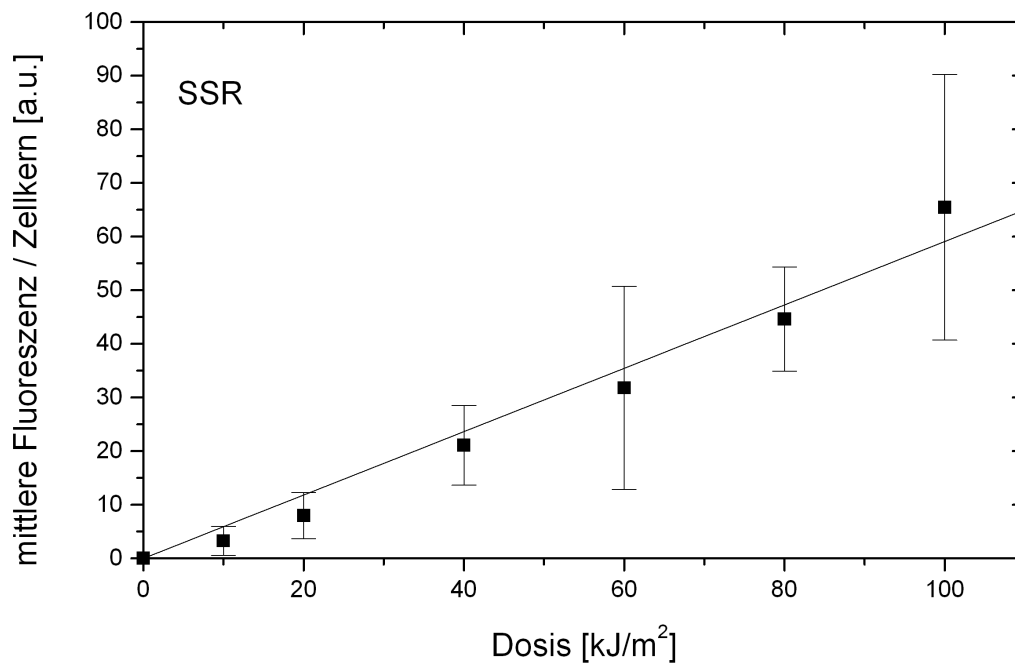


Abb. 4.3: Dosiseffekt der CPD-Induktion in HaCaT-Zellen durch SSR. Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

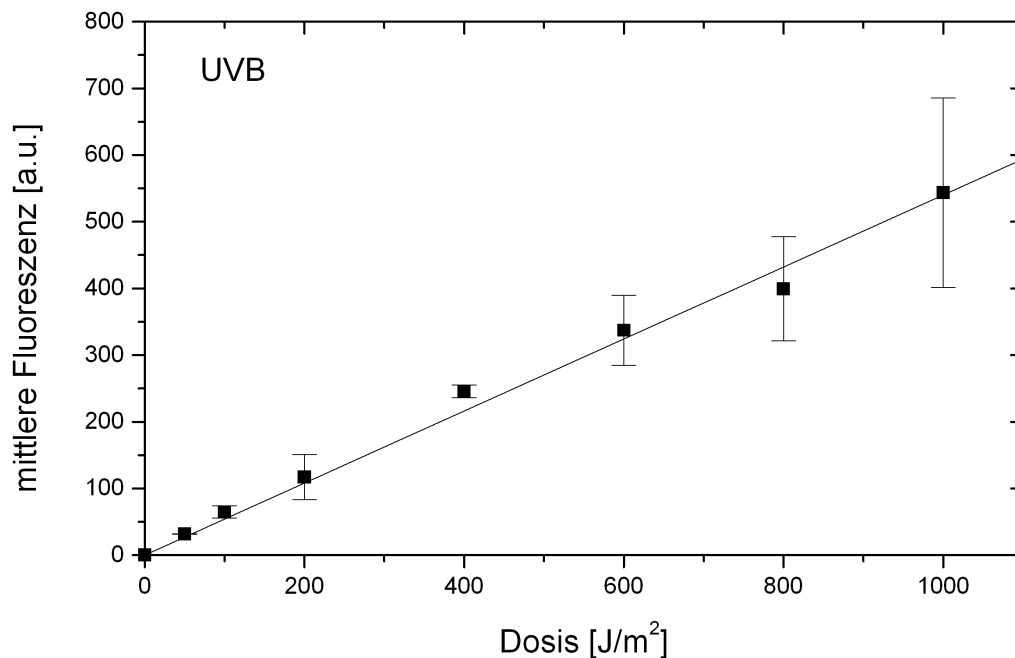


Abb. 4.4: Dosiseffekt der CPD-Induktion durch UVB-Strahlung. Strahlenquelle: UVB-TL12/20. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zu beachten ist die unterschiedliche quantitative Induktion. Dieser Unterschied wird beim Vergleich der Steigung der Dosiseffektbeziehungen deutlich. Dabei liegen die beiden UVA Quellen (UVA-Spot und Oriel-SSR mit UVB/C-Filter) in ihrer Effektivität um vier Größenordnungen, der UV-Sonnensimulator um drei Größenordnungen niedriger als die UVB-Quelle. Die beiden UVA-Quellen unterscheiden sich mit einer Steigung von $0,96 \times 10^{-4}/\text{J}$ (UVA Spot) und $0,77, \times 10^{-4}/\text{J}$ (Oriel SSR mit UVB/C-Filter) nur wenig in ihrer Effektivität (siehe Tabelle 4.1).

Strahlenquelle	Induzierte CPDs/J
UVA-Spot 2000	$0,96 \times 10^{-4}$
SSR LOT-Oriel mit UVB/C-Filter	$0,77 \times 10^{-4}$
SSR LOT-Oriel (sonnenlichtäquivalent)	$0,59 \times 10^{-3}$
UVB TL12/20	0,59

Tab. 4.1: Induzierte CPDs/J in Abhängigkeit von der Strahlenquelle

4.2 Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR

Zur Ermittlung der Reparaturkinetik wurden die eingesetzten Strahlendosen so gewählt, dass das Maß an induzierten Schäden etwa gleich war, da ein höheres Schadensausmaß eine langsamere Reparatur bedingt. Dies ist im UVB-Bereich nachgewiesen (Greinert et al. 2000). Für UVA-Strahlung ist dieser Effekt nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht auszuschließen. Daher erscheint es zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch hier sinnvoll ein ähnliches quantitatives Schadensausmaß zu betrachten. Die Äquivalenzdosen wurden aus den oben dargestellten Dosiseffektkurven ermittelt. Es wurden zwei Vergleichspaare gewählt.

UVA Spot 2000, Dosis 600 kJ/m²

UVB TL12/20, Dosis 50 J/m²

SSR LOT-Oriel, Dosis 100 kJ/m²

UVB TL12/20, Dosis 200 J/m²

Zur graphischen Darstellung der gemessenen Reparaturkinetiken wurden auf der y-Achse die ermittelten Fluoreszenzwerte auf den Maximalwert zu Zeitpunkt $t = 0$ normiert. Dadurch entsteht eine prozentuale Auftragung bei der die unmittelbar nach der Bestrahlung ermittelte mittlere Fluoreszenz pro Zelle auf 100% ergibt. Die Kinetiken können mit einer Exponentialfunktion der Form

$$N(t) = (N_0 - N_r) \cdot e^{(-t/\tau)} + N_r \quad \text{Formel 4.1}$$

beschrieben werden, wobei N_0 den induzierten Gesamtschaden und N_r den verbleibenden (irreparablen) Schaden beschreibt. Die Reparaturzeitkonstante τ gibt an, nach welcher Zeit die reparablen Schäden auf einen Wert von $1/e$, also um 37% abgesunken sind und stellt ein Maß für die Geschwindigkeit eines Reparaturprozesses dar.

In Abb. 4.6 sind die Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit Äquivalenzdosen für UVA (600 kJ/m²) und UVB (50 J/m²) zur Veranschaulichung gemeinsam dargestellt. Die Reparaturkinetiken zeigen, dass sich die Reparaturkapazität nach UVA, mit einer Reparaturzeitkonstanten $\tau = 14,5 (\pm 3,9)$ Stunden und nach UVB mit einer Reparaturzeitkonstanten $\tau = 16,5 (\pm 2,4)$ Stunden nicht wesentlich unterscheidet. Man kann also davon ausgehen, dass die Reparatur in diesem Dosisbereich für beide Strahlenqualitäten identisch abläuft.

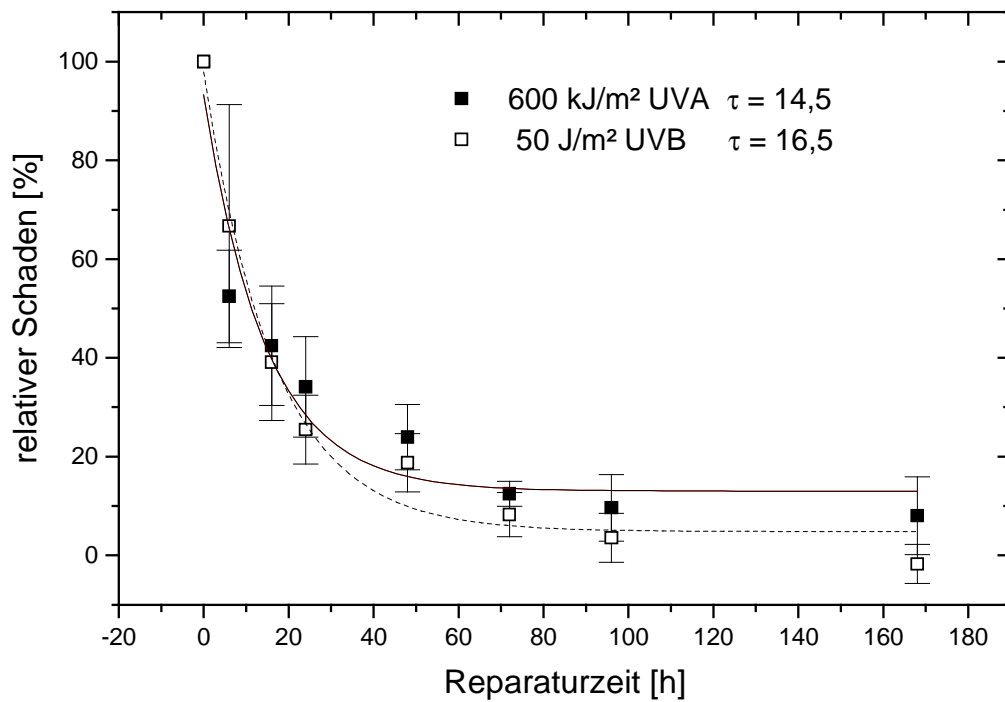


Abb. 4.6: Reparaturkinetiken von HaCaT-Zellen nach UVA-Strahlung (Strahlenquelle: UVA-Spot 2000, $D=600\text{kJ/m}^2$) und UVB-Strahlung (Strahlenquelle: TL12/20; $D=50\text{J/m}^2$). Reparaturzeitkonstante τ . Dargestellt sind die Ergebnisse aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Für die Untersuchung der Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit dem UV-Sonnensimulator wurde eine Dosis von 100kJ/m^2 gewählt und mit einer CPD-Äquidosis von 200J/m^2 UVB verglichen. In Abb. 4.7 sind die Reparaturkinetiken dargestellt. Für beide Strahlenqualitäten ergab sich eine Reparaturzeitkonstante von $20,6 (\pm 1,6)$ Stunden.

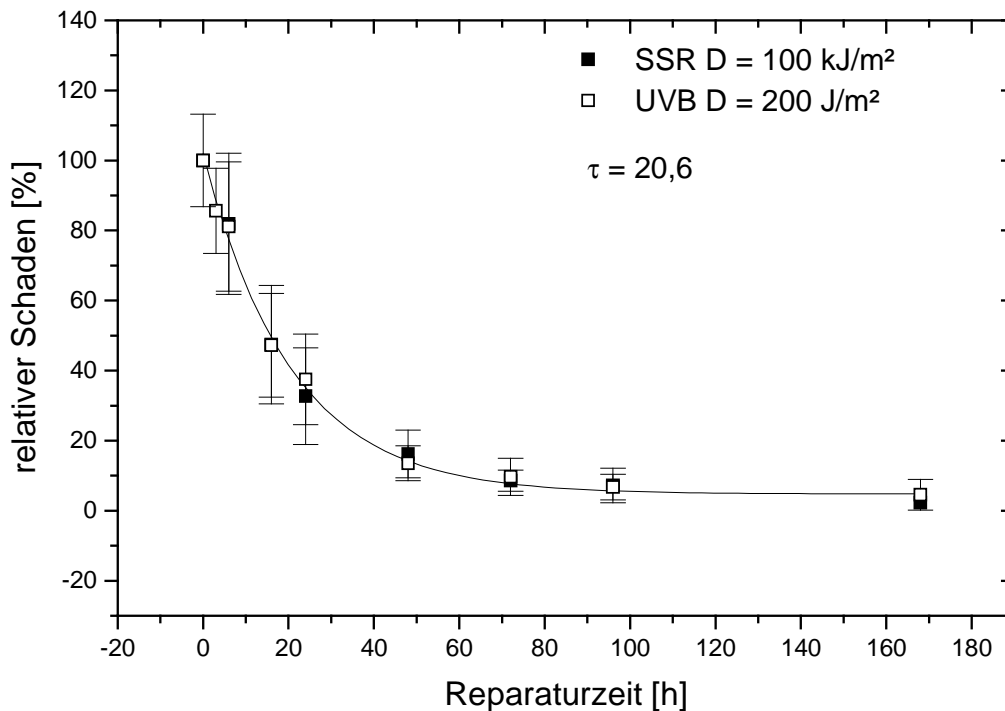


Abb. 4.7: Reparaturkinetiken von HaCaT-Zellen nach SSR (Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator; Dosis: 100kJ/m²) und UVB-Strahlung (Strahlenquelle TL12/20; Dosis: 200J/m²). Reparaturzeitkonstante τ . Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Die Reparaturzeitkonstanten für UVB-Strahlung betragen somit 16,5 ($\pm 2,4$) Stunden für UVB 50 J/m² und 20,6 ($\pm 1,6$) Stunden für UVB200 J/m². Die Bestrahlung der Zellen mit verschiedenen UVB-Dosen (50 und 200 J/m²) bestätigt somit den bekannten Effekt, dass sich mit ansteigender Anzahl an induzierten Läsionen die Reparatur verlangsamt. Vergleicht man jedoch verschiedene UV-Strahlenqualitäten (UVA, SSR und UVB) bei gleichem Schadensmaß, so sind die ermittelten Reparaturzeiten annähernd gleich.

Beim Einsatz von UVB, UVA oder sonnenähnlicher UV-Strahlung scheint also nur die Anzahl der induzierten CPDs einen Einfluss auf die Reparaturzeitkonstante zu haben, nicht aber die Strahlenqualität. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wird dagegen von einer im Vergleich zu UVB-Bestrahlung verlangsamteten Reparatur nach UVA-Bestrahlung berichtet (Mouret et al., 2006). Für diese Diskrepanz könnte der erythemgewichtet geringe UVA-Anteil der hier eingesetzten UVB-Quelle, der zwar nur einen sehr kleinen Teil zur CPD-Induktion beiträgt, aber über andere Mechanismen die Reparatur beeinflussen könnte, verantwortlich sein.

4.3 Reparaturkinetik nach kombinierter Bestrahlung

Um zu untersuchen, ob eine UVA-Vorbestrahlung einen Einfluss auf die Reparaturkapazität von Zellen nach einer UVB bzw. SSR-Exposition hat, wurden Zellen mit 100 kJ/m^2 UVA (Oriol-SSR mit UVB/C Filter) vorbestrahlt und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte die Bestrahlung mit 100 kJ/m^2 SSR oder 300 J/m^2 UVB. Die Induktion an CPDs durch die UVA Vorbestrahlung ist sehr gering (vgl. Abb. 4.2). Somit ist die Anzahl der Schäden im Vergleich zur singulären Bestrahlung nur minimal erhöht. Die Darstellung erfolgt analog zur singulären Bestrahlung in den Abbildungen 4.8 und 4.9. Zur Veranschaulichung sind die Kinetiken jeweils ohne Vorbestrahlung mit aufgetragen.

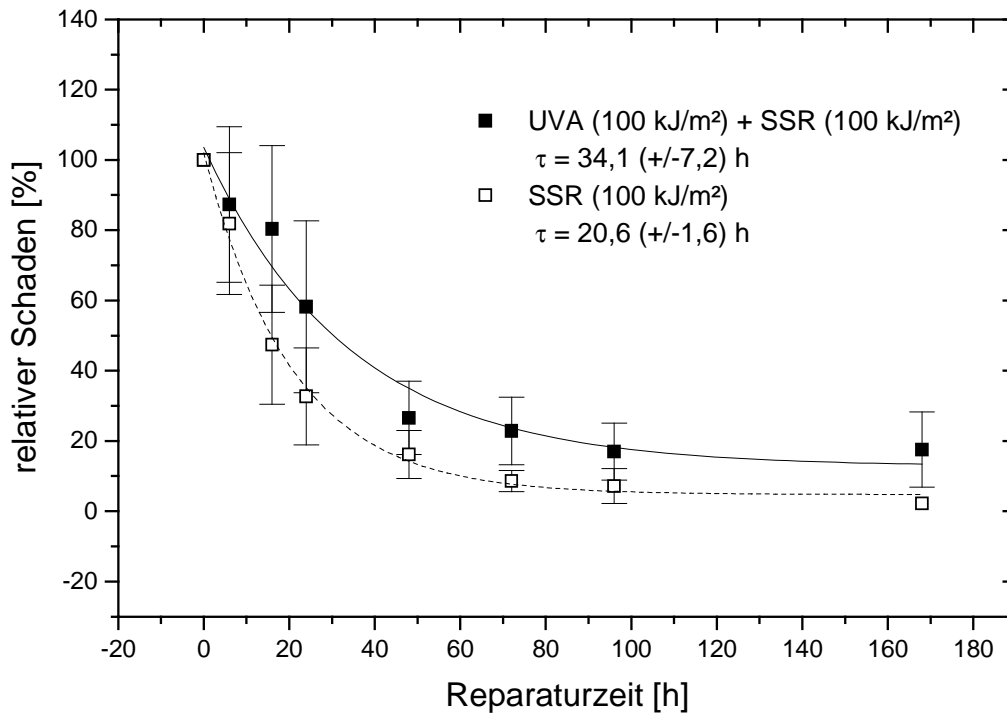


Abb. 4.8: Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit SSR (Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator; Dosis: 100 kJ/m^2) und Vorbestrahlung mit UVA-Strahlung (Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator mit UVB/C-Filter; Dosis: 100 kJ/m^2). Zum Vergleich dargestellt Reparaturkinetik nach isolierter SSR (Dosis: 100 kJ/m^2); (vgl. Abb. 4.7). Reparaturzeitkonstante τ . Dargestellt sind die Ergebnisse aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

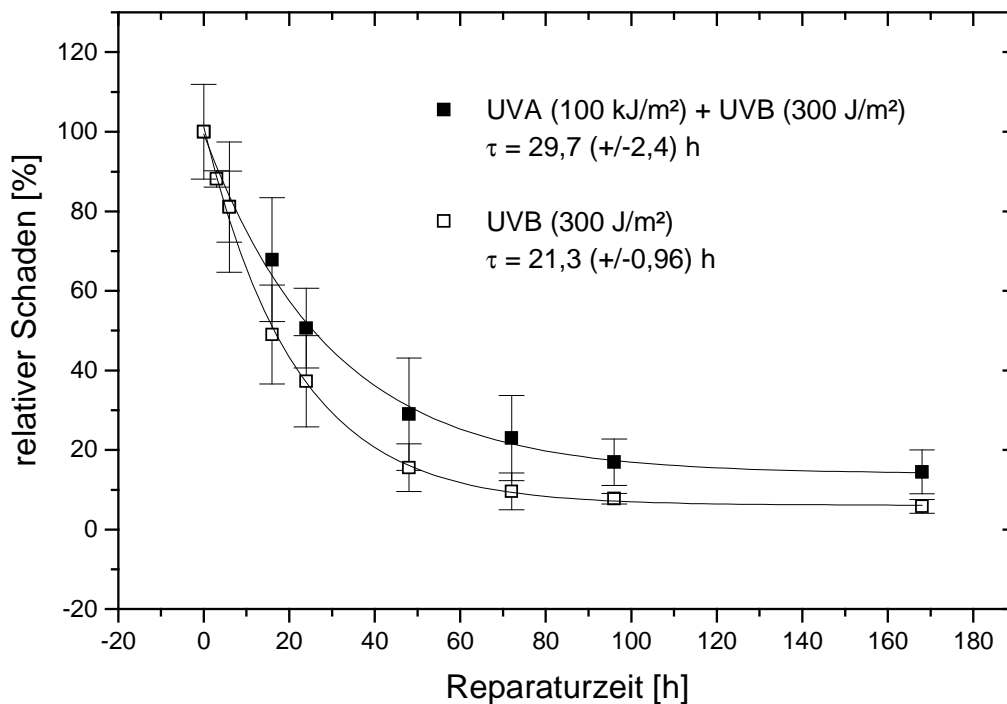


Abb. 4.9: Reparaturkinetik nach Bestrahlung mit UVB-Strahlung (Strahlenquelle TL12/20; Dosis: 300J/m²) und Vorbestrahlung mit UVA-Strahlung (Strahlenquelle: LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator mit UVB/C-Filter; Dosis: 100kJ/m²). Zum Vergleich dargestellt Reparaturkinetik nach isolierter UVB-Bestrahlung (Strahlenquelle TL12/20; Dosis: 300J/m²). Reparaturzeitkonstante τ . Dargestellt sind die Ergebnisse aus mind. drei Versuchen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Wie aus Abbildung 4.8 zu entnehmen, kommt es durch eine UVA Vorbestrahlung zu einer Verlangsamung der Reparatur nach einer Bestrahlung mit SSR. Die Reparaturzeitkonstante τ erhöht sich von 20,6 ($\pm 1,6$) Stunden nach singularer Bestrahlung auf 34,1 ($\pm 7,2$) Stunden nach kombinierter Bestrahlung. Auch die Reparaturzeit nach UVB Bestrahlung erhöht sich durch eine UVA-Vorbestrahlung mit einer Erhöhung der Reparaturzeitkonstanten τ von 21,3 ($\pm 0,96$) Stunden nach singularer Bestrahlung auf 29,7 ($\pm 2,4$) Stunden nach kombinierter Bestrahlung (s. Abb. 4.9).

5 Diskussion

5.1 CPD-Induktion nach Bestrahlung mit UVA, UVB und SSR

In den durchgeführten Experimenten konnte eine dosisabhängig linear ansteigende Induktion von CPDs durch alle verwendeten Strahlenqualitäten gezeigt werden. Während die CPD-Induktion durch UVB-Strahlung gut nachgewiesen ist, konnte erst in jüngerer Zeit deren Induktion durch UVA-Strahlung gezeigt werden (Courdavault et al., 2004; Mouret et al., 2006). Dies ist von besonderer Bedeutung, da die CPDs, wie einleitend dargestellt, eine besondere Rolle in den aktuellen Modellen der Karzinogenese kutaner Tumore einnehmen. Quantitativ werden durch UVA-Strahlung und SSR deutlich weniger CPDs induziert, als durch UVB-Strahlung. Betrachtet man die Steigung der Dosiseffektkurven, so sind die hier verwendeten UVA-Quellen vier und der UV-Sonnensimulator (SSR) um drei Größenordnungen weniger effektiv als die UVB-Quelle (s. Abb 4.5). Dieser wellenlängenabhängige Unterschied steht in Einklang mit bekannten Aktionsspektren für CPDs (Freeman et al., 1989) sowie dem CIE Erythemspektrum (CIE, 1999).

Der Mechanismus, der der Induktion von CPDs durch UVA-Strahlung zu Grunde liegt, ist noch nicht bekannt. Im Vergleich zu UVB zeigen UVA-induzierte Schäden ein anderes Verteilungsmuster entlang der DNA (Besarantina et al. 2005). Auch in der Induktion der verschiedenen Pyrimidindimere finden sich Unterschiede. Durch UVA werden, bezogen auf alle induzierten Dipyrimidine, mit ca. 80% mehr Thy-Thy-Dimere induziert als nach UVB-Bestrahlung (ca. 40%). Im Gegensatz zu UVB-Strahlung werden durch UVA keine 6-4PPs erzeugt (Courdavault et al., 2004; Mouret et al., 2006). Diese Daten weisen darauf hin, dass der UVA-bedingten CPD-Induktion ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Diskutiert wird ein zur direkten Photodimerisierung durch UVB-Strahlung alternativer Prozess der über einen Triplet-Energietransfer abläuft, in den bisher nicht identifizierte intrazelluläre Chromophore involviert sind (Cadet et al. 2005).

Die für die Induktion von CPDs verwendeten physikalischen Dosen für UVA von maximal 1200 kJ/m² (UVA-Spot 2000) und 1000 kJ/m² (LOT-Oriel-Sonnenlichtsimulator mit UVB/C-Filter) entsprechen etwa der täglichen erdnahen UVA-Dosis an einem Sommertag in England (54° Nord) (Diffey, 1998). Der gewählte

Dosisbereich ist deshalb physiologisch relevant und es wird deutlich, dass schon deutlich geringere UVA-Dosen eine messbare Anzahl an CPDs erzeugen können.

Die herausragende Bedeutung von CPDs als wichtiger mutagener Schaden bei der Entstehung von Hautkrebs wurde einleitend beschrieben (vergl. Einleitung 2.3). UVA-Strahlung ist somit als komplettes Karzinogen anzusehen. Insbesondere vor diesem Hintergrund kommt dem Vergleich der Reparaturkapazitäten besondere Bedeutung zu.

5.2 Reparatur nach Bestrahlung mit SSR, UVA- und UVB-Strahlung

Alle hier untersuchten Reparaturkinetiken können mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden. τ charakterisiert dabei die Reparaturzeitkonstante und stellt ein Maß für die Geschwindigkeit eines Reparaturprozesses dar. In früheren Untersuchungen konnte für die Reparatur von UVB-induzierten CPDs eine schadensabhängige Verlangsamung der Reparatur gezeigt werden. Dieser Effekt wird auf Schädigungen der Zelle und ihrer Enzyme zurückgeführt (Greinert et al. 2000b). Ein solcher Effekt zeigte sich auch in den hier durchgeführten Versuchen nach UVB-Bestrahlung. Nach einer Dosis von 50 J/m^2 wurde eine Reparaturzeitkonstante von 16,5 Stunden gemessen wurde, nach einer größeren Dosis von 200 bzw. 300 J/m^2 und somit größeren Anzahl an Schäden erhöht sich die Reparaturzeitkonstante auf 20,3 bzw. 21,6 Stunden.

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede in der Reparatur von UVA- und UVB-induzierten CPDs wurden Reparaturkinetiken bei CPD-Äquivalenzdosen gemessen, um den Einfluss des Schadensgehaltes auf die Reparaturgeschwindigkeit auszuschließen. Die ermittelten Reparaturzeitkonstanten von 14,5 und 16,5 Stunden nach Bestrahlung mit 600 kJ/m^2 UVA und 50 J/m^2 UVB unterscheiden sich nicht signifikant (siehe. Abb: 4.6). Dies steht im Gegensatz zu Daten von Mouret et al. 2006, die andeuten, dass 48 Stunden nach UVA-Bestrahlung 72% der Schäden noch unrepariert vorliegen, während das Schadensmaß nach UVB-Bestrahlung zu diesem Zeitpunkt bereits auf 55% abgesunken ist. Allerdings zeigen die von den Autoren beschriebenen Daten im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer Veröffentlichungen (z. B. Bykov et al., 1999; Young et al., 1996; Freeman 1988) keinen exponentiellen Verlauf, sondern ein linear mit der Zeit abfallendes Ausmaß des Schadens. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte der Einsatz anderer UVA- bzw. UVB-Quellen und Bestrahlungsdosen sein. Der Vergleich der Reparaturkinetik nach Exposition der Zellen mit CPD-Äquivalenzdosen von 100 kJ/m^2 SSR (mit einem hohen UVA-Anteil von 98%) und 200 kJ/m^2 UVB zeigte ebenfalls keine Unterschiede. Beide Kinetiken können

mit einer Reparaturzeitkonstanten von 20,6 h beschrieben werden (siehe. Abb. 4.7). Die CPD-Reparaturkinetik ändert sich also nur in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung. Die Strahlenqualität, die zur Induktion der CPDs verwendet wurde, hat dagegen keinen Einfluss.

5.3 Reparaturkinetik nach kombinierter Bestrahlung

Der Einfluss einer UVA-Vorbestrahlung wurde sowohl für UVB- als auch für SSR-induzierte CPDs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorbestrahlung mit UVA (100kJ/m²) 30 Minuten vor der Hauptbestrahlung eine Reduktion der Reparaturkapazität der Zellen hervorruft. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob die Nachbestrahlung mit UVB oder SSR durchgeführt wurde. Die Reparaturzeitkonstante verlängert sich um 9 (UVB) bzw. 13,4 (SSR) Stunden. Die zusätzliche Schadensinduktion durch die UVA-Vorbestrahlung ist entsprechend der ermittelten mittleren Fluoreszenz pro Zellen von 4,8 nur sehr gering (vgl. Abb. 4.2) und erhöht die insgesamt induzierte Anzahl an Schäden nur so wenig, dass die verlängerte Reparaturzeit nicht durch eine Schadensmaß bedingte Verringerung der Reparaturkapazität erklärt werden kann. Eine Sättigung an der NER beteiligten Enzyme durch die minimal erhöhte Anzahl an CPDs durch die UVA-Vorbestrahlung ist nicht zu erwarten. Da außerdem gezeigt werden konnte, dass UVA induzierte CPDs in gleicher Geschwindigkeit wie UVB-induzierte repariert werden, ist auch der Einfluss durch eine mögliche UVA-spezifische Induktion schwer reparabler CPDs auszuschließen. Auch ein Einwirken anderer UVA-spezifischer Schäden, z. B. oxidative Basenmodifikationen wie das 8-oxoG oder oxidative Läsionen an anderen Zellstrukturen, müsste bereits nach einer singulären UVA-Bestrahlung zu einer verlangsamten Reparatur der CPDs führen. Dies ist nicht der Fall.

Die Ursachen müssen also anderer Natur sein. Eventuell spielt der Zeitpunkt der Bestrahlungsfolge eine wichtige Rolle. Zwischen den beiden Bestrahlungen lag eine Pause von 30 Minuten in der Reparaturprozesse zur Eliminierung verschiedener UVA-induzierter DNA-Schäden begonnen werden. In dieser Zeit finden Zellstrukturveränderungen statt, die möglicherweise bedingen, dass die Nachbestrahlung in eine besonders vulnerable Phase fällt. So ist denkbar, dass laufende UVA-Reparaturprozesse für UVA-spezifische Schäden, wie z. B. Basenexzisionsreparatur oder Doppelstrangbruchreparatur, die Reparatur benachbarter neu induzierter CPDs verzögern.

Eine besondere Bedeutung könnte auch der Chromatinstruktur der DNA zukommen. Die DNA liegt in den Zellen nicht in nackter Form vor, sondern bildet mit den Histonproteinen Nucleosomen, die sich mehrfach spiralförmig anordnen. Daraus ergibt sich eine strukturell dicht gepackte DNA (s. Abb. 5.1).

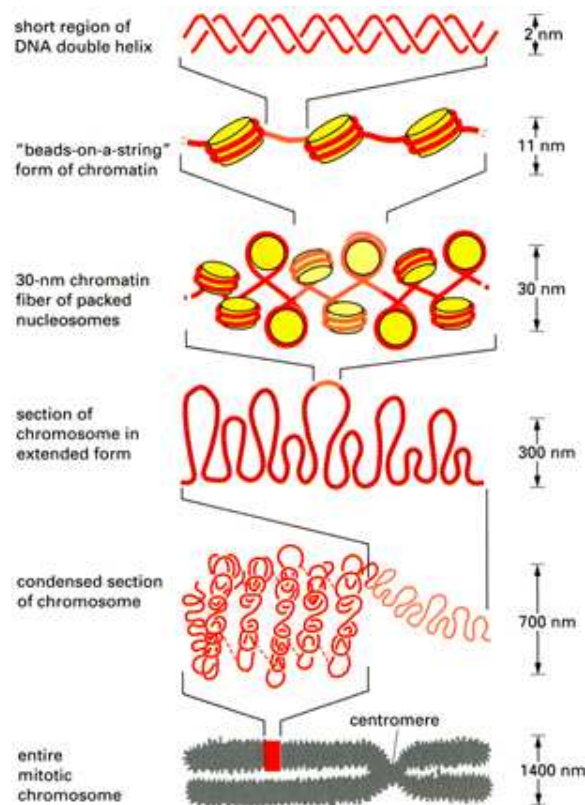


Abb. 5.1: Chromatinstruktur

Diese Struktur ist sehr wichtig, da die Verteilung induzierter CPDs von der lokalen Chromatinstruktur abhängig ist (Pehrson und Cohen, 1992; Schieferstein und Thoma, 1996; Pfeifer, 1997). Es wurde ein regelmäßiges Verteilungsmuster UV-induzierter Pyrimidindimere entlang der DNA gezeigt, das vermutlich auf der Lagebeziehung zu den Histonproteinen beruht (Gale et al., 1987). Auch die Reparaturgeschwindigkeit ist von der Chromatinstruktur abhängig (Smerdon und Thoma, 1990). Läsionen am nicht transskribierten Strang zeigen eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer Reparaturzeiten. Es wird ein direkter Zusammenhang zur Zugänglichkeit durch Reparaturenzyme vermutet (Wellinger und Thoma, 1997) (siehe Abb.5.2).

Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Reparatur von 6-4PPs *in vitro* in eng liegenden Nucleosomen auf 10% der Geschwindigkeit frei liegender DNA absinken kann (Hara et al., 2000).

Auch die für die Reparatur entscheidende Nucleotidexzisionsreparatur (NER) ist auf eine Umstrukturierung des Chromatins angewiesen. Bei den an der NER beteiligten Enzymen handelt es sich um relativ große Proteinkomplexe, die vermutlich nur Zugang zur DNA bekommen können, wenn eine Lockerung der Chromatinstruktur stattgefunden hat. Abbildung 5.2 zeigt mögliche Lokalisierungen UV-induzierter Läsionen und Konformationsänderungen des Chromatins.

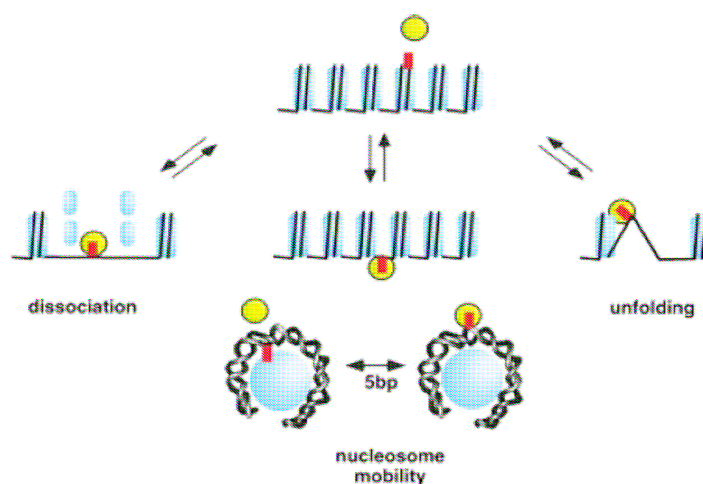


Abb. 5.2: DNA-Läsionen in Lagebeziehung zu Nucleosomen und Chromatinstrukturänderungen: DNA-Läsion rot, Nucleosom blau, DNA schwarz, Erkennungsprotein gelb. Chromatinstrukturänderungen könnten zur besseren Zugänglichkeit der Läsion führen. Eine Positionsänderung des Nucleosoms um 5 Basenpaare (bp) führt zur „Präsentation“ der Läsion.

Die Umstrukturierung des Chromatins beginnt sofort nach der Bestrahlung. So konnten Yu und andere nachweisen, dass bereits 10 Minuten nach einer UV-Bestrahlung das Niveau der Histon 3-Acetylierung ansteigt (Yu et al. 2005). Demzufolge fällt die Nachbestrahlung in eine Phase, in der eine Umstrukturierung des Chromatins stattgefunden hat oder noch stattfindet. Dies könnte verschiedene Folgen haben. Zum einen könnten die induzierten Läsionen sich an anderen Stellen der DNA befinden und somit einer Reparatur schlechter zugänglich sein. Zum anderen ist eine quantitativ höhere Induktion von DNA-Schäden möglich. Da in den vorliegenden Versuchen nach UVA-Vorbestrahlung keine erhöhte Induktion von CPDs beobachtet wurde, müsste sich der Effekt auf andere Läsionen beziehen. So entstehen beispielsweise in freier DNA die

hier nicht erfassten 6-4PPs etwa sechsmal so häufig wie in nukleosomaler DNA (Mitchell et al. 1990b). Es läge also ein insgesamt höheres Schadensausmaß vor, das hier nicht erfasst wurde und dennoch zu einer Verlangsamung der Reparatur geführt haben könnte. Andererseits könnten bereits Prozesse zur Wiederherstellung des Chromatins aktiv sein und gegenläufige Prozesse wie die Entwindung der DNA die Reparatur der neu induzierten CPDs behindern.

Um den Mechanismus der verlangsamten Reparatur aufzuklären, sind weitere Versuche notwendig. So sind Arbeiten notwendig, um die Abhängigkeit des Effektes vom Zeitraum zwischen Vor- und Hauptbestrahlung oder von der Strahlenqualität zu untersuchen.

Wie die Befunde bei Xeroderma pigmentosum Patienten mit NER-Reparaturdefizienz eindrücklich zeigen, kann jede Verschlechterung der Reparaturkapazität zu einem erhöhten Risiko an einem kutanen Karzinom zu erkranken führen (vergl. Einleitung: 1.2.3.2). Insbesondere angesichts der Tatsache, dass in der Arbeit nur physiologische Strahlendosen verwendet wurden, gewinnen die Beobachtungen eine Bedeutung für ein zu empfehlendes Expositionsverhalten der Bevölkerung. So sollte ein konsequenter Schutz gegen UVA-Strahlung empfohlen werden. Insbesondere bei der Verwendung von Sonnenschutzpräparaten sollte auf eine Breitbandwirkung auch im UVA-Bereich geachtet werden.

Darüberhinaus simuliert die durchgeführte Bestrahlung mit SSR nach einer UVA-Vorbestrahlung einen Solariumbesuch mit anschließendem Sonnenbad. Eine derartige Exposition führt somit zu einer verlangsamten Reparatur der induzierten CPDs. Die gezeigten Ergebnisse unterstützen die Empfehlung der WHO und der Deutschen Strahlenschutzkommission (SSK, 2001; WHO, 2007), Solarien zu kosmetischen Zwecken nicht zu nutzen, da UVA-Strahlung bei der Entstehung von Hautkrebs offensichtlich eine größere Rolle spielt als bisher angenommen.

5.4 Schlussfolgerungen

1. UVA-Strahlung im physiologischen Dosisbereich induziert in humanen Keratinozyten eine relevante Anzahl CPDs und ist als komplettes Karzinom zu betrachten.
2. Durch unterschiedliche Strahlenqualität (UVA, UVB, SSR) induzierte CPDs werden von humanen Keratinozyten in gleicher Geschwindigkeit repariert, sofern das Gesamtschadensausmaß vergleichbar ist.
3. Nach einer niedrigdosierten Vorbestrahlung mit UVA, verlangsamt sich die Reparatur UVB- bzw. SSR-induzierter CPDs in humanen Keratinozyten gegenüber einer Einzelbestrahlung gleicher Dosis relevant.
4. Die Ergebnisse haben Bedeutung für ein zu empfehlendes Expositionsverhalten der Bevölkerung. Eine UVA-Exposition sollte vermieden werden. Von der Solarienbenutzung aus kosmetischen Gründen ist abzuraten.

6 Zusammenfassung:

Maligne Tumore der Haut stellen die häufigste Krebsform des Menschen dar. Ihre Inzidenz ist in den letzten Jahren stark steigend, was nicht zuletzt auf ein verändertes Strahlenexpositionsverhalten zurückgeführt wird. Konnten die Mechanismen der Karzinogenese auch bislang nicht abschließend geklärt werden, ist die Rolle von UV-Strahlung in der Tumorentstehung unbestritten. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei das UV-induzierte Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) ein. Nachdem lange Zeit ausschließlich UVB-Strahlung für die Induktion dieses DNA-Schadens verantwortlich gemacht wurde, mehren sich in jüngerer Zeit die Hinweise für eine Beteiligung von UVA-Strahlung. Kommt es nicht zur vollständigen und korrekten Reparatur der Läsion, können UV-spezifische Mutationen auftreten, die in Hauttumoren nachgewiesen wurden. Der CPD-Reparaturkapazität der Zelle kommt somit nach UV-Bestrahlung eine zentrale Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde in immortalisierten menschlichen Keratinozyten (HaCaT) die Induktion von CPDs durch verschiedene UV-Strahlenqualitäten (UVA, UVB und solare UV) unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers durchflusszytometrisch quantifiziert, sowie der Einfluss einer UVA-Vorbestrahlung auf die CPD-Reparaturkapazität untersucht.

Es konnte eine relevante Induktion von CPDs durch UVA-Strahlung in einem physiologischen Dosisbereich gezeigt werden. Weiterhin wurde eine deutliche Verlangsamung der CPD Reparatur der Zellen nach UVA-Vorbestrahlung und Nachbestrahlung mit UVB- beziehungsweise sonnenähnlicher UV-Strahlung nachgewiesen. Dieser Effekt könnte auf UVA-induzierten Veränderungen der Chromatinstruktur beruhen. Auch ein Einfluss gerade ablaufender UVA-spezifischer Reparaturprozesse ist nicht auszuschließen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse weisen darauf hin, dass UVA-Strahlung bei der Hautkarzinogenese eine wichtige, bisher unterschätzte Rolle spielt. In Empfehlungen an die Bevölkerung zum Expositionsverhalten sollte deshalb verstärkt auf einen konsequenten Schutz, auch vor UVA-Strahlung, hingewiesen werden. Setzt man die UVA-Vorbestrahlung mit der Nutzung eines Solariums gleich, so würde sich der schädigende Effekt eines anschließenden Sonnenbades verstärken. Unter diesem Gesichtspunkt ist von einer Solariumnutzung abzuraten.

7 Literaturverzeichnis:

Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4954-9

Ainsleigh HG.(1993) Beneficial effects of sun exposure on cancer mortality. *Prev Med.* 22:132-40

Armstrong BK and Kricger A. (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 63: 8-18

Aszterbaum M, Beech J, Epstein EH Jr. (1999a) Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 4: 41-5

Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP, Epstein EH Jr. (1999b) Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med.* 5:1285-91

Bais BA, Zerefos CS, Meleti C, Ziomas IC, Toupali K. (1993) Spectral Measurements of Solar UVB Radiation and its Relations to Total Ozone, SO₂ and Clouds. *J.G.R., Vol.* 98: 5199-204

Barnhill RL, Roush GC, Titus-Ernstoff L, Ernstoff MS, Duray PH, Kirkwood JM. (1992) Comparison of nonfamilial and familial melanoma. *Dermatology.* 184:2-7

Ballotti R, Ortonne JP. (2002) Sunlight and cutaneous melanocytes: An overview. In Ortonne JP, Ballotti R: *Mechanisms of Suntanning.* Dunitz London: 1-22

Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 16: 239-44

Berg RJ, de Gruijl FR, Roza L, van der Leun JC. (1993) Flow cytometric immunofluorescence assay for quantification of cyclobutylthymine dimers in separate phases of the cell cycle. *Carcinogenesis.* 14:103-6

Besaratinia A, Synold TW, Chen HH, Chang C, Xi B, Riggs AD, Pfeifer GP. (2005) DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10058-63

BfS-Bundesamt für Strahlenschutz (2003) UV-Fibel, Zertifiziertes Solarium – Allgemeine Grundlagen zur Schulung der im Kundenkontakt stehenden Betreiber und Mitarbeiter von Solarien: 30-33, Salzgitter

Bodiwala D, Luscombe CJ, Liu S, Saxby M, French M, Jones PW, Fryer AA, Strange RC. (2003) Prostate cancer risk and exposure to ultraviolet radiation: further support for the protective effect of sunlight. *Cancer Lett.* 192:145-9

Boyle J, MacKie, RM, Briggs JD, Junor BJR, Aitchison TC. (1984) Cancer, warts and sunshine in renal transplant patients. *Lancet.* 1:702-5

Blumthaler M, Ambach W. (1988) Solar UVB-Albedo of Various Surfaces. *Photochem Photobiol.* 48:85-8

Brash DE. (1997) Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet.* 10:410-4

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10124-8

Breathnach AS, Nazzaro-Porro M, Passi S, Picardo M. (1991) Ultrastructure of melanocytes in chronically sun-exposed skin of elderly subjects. *Pigment Cell Res.* 2:71-9

Brellier F, Marionnet C, Chevallier-Lagente O, Toftgard R, Mauviel A, Sarasin A, Magnaldo T. (2004) Ultraviolet irradiation represses PATCHED gene transcription in human epidermal keratinocytes through an activator protein-1-dependent process. *Cancer Res.* 64:2699-704

Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. (1984) Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochem Photobiol.* 39:63-7

Bykov VJ, Sheehan JM, Hemminki K, Young AR. (1999) In situ repair of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in human skin exposed to solar simulating radiation. *J Invest Dermatol.* 112:326-31

Cadet J, Sage E, Douki T. (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 571: 3-17

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Leob LA. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitution. *J Biol Chem.* 267:166-72

Chin L. (2003) The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer*. 3:559-70

Chipperfield MP, Randel WJ (lead authors), Bodeker GE, Dameris M, Fioletov VE, Friedl RR, Harris NRP, Logan JA, McPeters RD, Muthama NJ, Peter T, Shepherd TG, Shine KP, Solomon S, Thomason LW, Zawodny JM. (2003) Global Ozone – Past and future, Chapter 4 in *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002*, Global Ozone Research and Monitoring Project Report No. 47, Geneva

CIE: COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE – Internationale Beleuchtungskommission. (1999) ISO 17166/CIE S007/E : joint ISO/CIE standard: Erythema reference action spectrum and standard erythema dose, Wien

Cleaver JE and Crowley E. (2002) UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci*. 7:1024-43

Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. (2004)

Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat Res*. 556:135-42

Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T. (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)*. 4:836-44

Couve-Privat S, Bouadjar B, Avril MF, Sarasin A, Daya-Grosjean L. (2002) Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothed gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res*. 62:7186-9

Cunningham MJ, Krinsky NI, Giovanazzi SM, Peak MJ. (1985) Superoxide anion is generated from cellular metabolites by solar radiation and its components. *J Free Radic Biol Med*. 1: 381-385

Czarnecki D, Meehan F, Bruce F and Culjak G. (2002) The majority of cutaneous squamous cell carcinoma arise in actinic keratoses. *J Cutan Med Surg*. 6:207-9

Damian DL, Barnetson RS, Halliday GM. (2001) Effects of low-dose ultraviolet radiation on in vivo human cutaneous recall responses. *Australas J Dermatol*. 42:161-7

Daya-Grosjean L, Sarasin A. (2000) UV-specific mutations of the human patched gene in basal cell carcinomas from normal individuals and xeroderma pigmentosum patients. *Mutat Res*. 450:193-9

de Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13:768–85

Diepgen TL. (2005) Demographic development of the population, *J Dtsch Dermatol Ges.* 3 Suppl 2:36-9

Diffey BL. (1998) Population exposure to solar UVA radiation. In: Rougier A, Schaefer H (Hrsg). *Protection of the Skin against Ultraviolet Radiations:11-4*, John Libbey Eurotext, Paris

DIN: Deutsches Institut für Normung (2003) Sicherheit elektrischer Geräte für den Hausgebrauch und ähnliche Zwecke: Besondere Anforderungen für Hautbestrahlungsgeräte mit Ultraviolett- und Infrarotstrahlung (IEC 60335-2-27:2002); Deutsche Fassung, Berlin

Dizdaroglu M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 275:331-42

Douki T, Cadet J. (2001) Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry.* 40:2495-501

Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. (2003) Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry.* 42:9221-6

Dulon M, Weichenthal M, Blettner M, Breitbart M, Hetzer M, Greinert R, Baumgardt-Elms C, Breitbart EW. (2002) Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *J Clin Epidemiol.* 55:1075-81

Evans T, Boonchai W, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Georgas K, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wicking C. (2000) The spectrum of patched mutations in a collection of Australian basal cell carcinomas. *Hum Mutat.* 16:43-8

Fan H, Khavari PA. (1999) Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol.* 147:71-5

Fargnoli MC, Piccolo D, Altobelli E, Formicone F, Chimenti S, Peris K. (2004) Constitutional and environmental risk factors for cutaneous melanoma in an Italian population. A case-control study. *Melanoma Res.* 14:151-7

Fears TR, Bird CC, Guerry D 4th, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Tucker MA. (2002) Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res.* 62:3992-6

Flegg PJ. (1990) Potential risk of ultraviolet radiation in HIV infection. *Int J STD & AIDS.* 1:46-48

Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC. (1990) Genetics of melanoma. *Cancer Surv.* 9:645-71

Frederick JE, Snell HE, Haywood EK. (1989) Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol.* 51: 443-450

Freeman SE. (1988) Variations in excision repair of UVB-induced pyrimidine dimers in DNA of human skin in situ. *J Invest Dermatol.* 90:814-7

Freeman SE, Hacham H, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC, Sutherland BM. (1989) Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:5605-9

Friedberg EC, Walker C., Siede W. (1995) DNA repair and mutagenesis. Chapter 1: 40-54, ASM Press, Washington D.C.

Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Uden AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgard R. (1996) The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet.* 14:78-81

Gale JM, Nissen KA, Smerdon MJ. (1987) UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:6644-8

Gallagher RP, Hill GB, Bajdik S, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ. (1995) Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 131:157-63

Gambardella L and Barrandon Y. (2003) The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr Opin Cell Biol.* 15:771-7

Gao S, Drouin R, Holmquist GP. (1994) DNA repair rates mapped along the human PGK1 gene at nucleotide resolution. *Science.* 263:1438-40

Garbe C, Buttener P, Weib J. (1994) Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic naevi and actinic lentiginos: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol.* 102:700-5

Gasparro FP, Mitchnick M, Nash JF. (1998) A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem Photobiol.* 68:243-56

Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, Newmark HL, Giovannucci E, Wei M, Holick MF. (2005) Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97:179-94

Grachtchouk M, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC, Dlugosz AA. (2000) Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet.* 24:216-7

Greinert R, Breitbart E.W., Mitchell D.L., Smida J., Volkmer B. (2000) Characterization for human keratinocytes by measuring cellular repair capacity of UVB-induced DNA damage and monitoring of cytogenetic changes in melanoma cell lines. *Radiat Protect Dossim.* 91:41-45

Greinert R, Boguhn O, Harder D, Breitbart EW, Mitchell DL, Volkmer B. (2000) The dose dependence of cyclobutane dimer induction and repair in UVB-irradiated human keratinocytes. *Photochem Photobiol.* 72:701-708

Gutierrez-Dalmau A, Campistol JM. (2007) Immunosuppressive Therapy and Malignancy in Organ Transplant Recipients : A Systematic Review. *Drugs* 67:1167-98

Halliday GM, Agar NS, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Jones AM. (2005) UV-A fingerprint mutations in human skin cancer. *Photochem Photobiol.* 81:3-8

Hara R, Mo J, Sancar A. (2000) DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol Cell Biol.* 20:9173-81

Harris RP., Ancellet G, Bishop L, Hofmann DJ, Kerr JB, McPeters RD, Prendez M, Randel W, Staehlin J, Subbaraya BH, Volz-Thomas A, Zawodny JM, Zerefos CS. (1994) "Ozone Measurements" in Scientific Assessment of Ozone Depletion : Chapter 1, World Meteorological Organization, Global Ozone Research and Monitoring Projekt - Report No. 37

Herouy Y, Krutmann J, Norgauer J, Schöpf E. (2003) Xeroderma Pigmentosum: Mondscheinkinder. *J Dtsch Dermatol Ges.* 3 :191-198

Hönigsmann H, Schuler G, Aberer W, Romani N, Wolff K. (1986) Immediate pigment darkening phenomenon. A reevaluation of its mechanisms. *J Invest Dermatol.* 87:648-52

Hönigsmann H, Dubertret L. (1996) UVA and the skin: round table. *E J of Derm.* 3:219-238

Holick MF. (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 80(6 Suppl):1678-88

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 8:15-21

International Agency on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. (2007) The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer.* 120:1116-22

Iqbal, M. (1986) An introduction to solar radiation. Springer, Heidelberg

Jih DM, Lyle S, Elenitsas R, Elder DE, Cotsarelis G. (1999) Cytokeratin 15 expression in trichoepitheliomas and a subset of basal cell carcinomas suggests they originate from hair follicle stem cells. *J Cutan Pathol.* 26:113-8

Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J. (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet.* 8:23-6

Kappes UP, Runger TM. (2005) No major role for 7,8-dihydro-8-oxoguanine in ultraviolet light-induced mutagenesis. *Radiat Res.* 164:440-5

Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Runger TM. (2006) Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J Invest Dermatol.* 126:667-75

Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. (2003) Leiden Skin Cancer Study. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol.* 120:1087-93

Kerr JB, Seckmeyer G (Lead Authors), Bais AF, Bernhard G, Blumthaler M, Diaz SB, Krotkov N, Lubin D, McKenzie RL, Sabziparvar AA, Verdebout J. (2003) Surface

ultraviolet radiation: Past and future, Chapter 5 in Scientific Assessment of Ozone Depletion: 2002, Global Ozone Research and Monitoring Project - Report No. 47, Geneva

Kiefer J. (1976) Ultraviolette Strahlen. Walter de Gruyter Verlag, Berlin

Kielbassa C, Roza L, Epe B. (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UVA and visible light. *Carcinogenesis*. 18:811-6

Kim JK, Choi BS. (1995) The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *Eur J Biochem*. 228:849-54

Kim JK, Patel D, Choi BS. (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol*. 62:44-50

Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. (2002) Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci*. 29:1-9

Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, DiGiovanna JJ, Bale AE, Bale SJ. (1997) Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet*. 69:299-308

Kligman LH. (1989) Photoaging, Manifestations, Prevention and treatment. *Clin Geriatr Med*. 5:235-51

Kopf AW, Hellman LJ, Rogers GS, Gross DF, Rigel DS, Friedman RJ, Levenstein M, Brown J, Golomb FM, Roses DF, et al. (1986) Familial malignant melanoma. *JAMA*. 256:1915-9

Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. (1994) The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol*. 130:1018-21

Krebsregister Saarland (2007) <http://www.krebsregister.saarland.de/datenbank/datenbank.html> Zugriff am 12.2.2007

Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. (1995a) A dose-response curve for sun exposure and basal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 60:482-8

Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. (1995b) Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? a case-control study in Western Australia. *Int J Cancer*. 60:489-94

Kripke ML. (1986) Immunology and photocarcinogenesis. New light on an old problem. *J Am Acad Dermatol*. 14:149-55

Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB. (1992) Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:7516-20

Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*. 476:73-7

Kvam E, Tyrrell RM. (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*. 18:2379-84

Le Page F, Guy A, Cadet J, Sarasin A, Gentil A. (1998) Repair and mutagenic potency of 8-oxo G:A and 8-oxo G:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 26:1276-81

Lucas RM, Ponsonby AL. (2002) Ultraviolet radiation and health: friend and foe. *Med J Aust*. 177:594-8

Madronich S, McKenzie RL, Bjorn LO, Caldwell MM. (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *J Photochem Photobiol B*. 46:5-19

Marnett LJ, Riggins JN, West JD. (2003) Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest*. 111:583-93

Matsumura Y. and Ananthaswamy HN. (2002) Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci*. 7:765-83

McKenzie RL, Johnston PV, Smale D, Bodhaine BA, Madronich S. (2001) Altitude effects on UV spectral irradiance deduced from measurements at Lauder, New Zealand, and at Mauna Loa Observatory, Hawaii, *J. Geophys. Res*. 106:22845-60

Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC. (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 51:241-9

Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. (2004) Iowa Women's Health Study. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 50:72-7

Miescher G. (1931) Schutzfunktion der Haut gegenüber Lichtstrahlen. *Strahlentherapie* 39: 601-18

Mitchell DL. (1988) The relative Cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol.* 48:51-57

Mitchell DL, Nguyen TD, Cleaver JE. (1990b) Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J Biol Chem.* 265:5353-6

Mitchell DL, Greinert R, de Gruijl FR, Guikers KL, Breitbart EW, Byrom M, Gallmeier MM, Lowery MG, Volkmer B. (1999) Effects of chronic low-dose ultraviolet B radiation on DNA damage and repair in mouse skin. *Cancer Res.* 59:2875-84

Mitchell DL, Volkmer B, Breitbart EW, Byrom M, Lowery MG, Greinert R. (2001) Identification of a non-dividing subpopulation of mouse and human epidermal cells exhibiting high levels of persistent ultraviolet photodamage. *J Invest Dermatol.* 117:590-5

Mizuno T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido O. (1991) Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA: a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4)photoproducts. *Mutat Res.* 254:175-84

Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P, O'Kelly P, Conlon PJ, Murphy GM. (2006) A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol.* Mar;154:498-504

Mori T, Nakane M, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido O. (1991) Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol.* 54:225-32

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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13765-70

Nilsson M, Uden AB, Krause D, Malmqwist U, Raza K, Zaphiropoulos PG, Toftgard R. (2000) Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3438-43

Norris JM. (2001) Can the sunshine vitamin shed light on type 1 diabetes? *Lancet*. 358:1476-8

Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP. (1997) Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science*. 276:817-21

Ortonne JP. (2002) From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 146 Suppl 61:20-3

Ortonne JP, Schwarz T. (2003) Klinik und Pathogenese UV-induzierter Pigmentveränderungen. *J Dtsch Dermatol Ges*. 1:274-84

Park WS, Lee HK, Lee JY, Yoo NJ, Kim CS, Kim SH. (1996) p53 mutations in solar keratoses. *Hum Pathol*. 27:1180-4

Pathak MA, Kimbav J, Szabo G, Fitzpatrick TB. (1976) Sunlight and melanin pigmentation. In: Smith K (Editor) *Photochemical and Photobiological Reviews Vol I*: 211–239

Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*. 275:26732-42

Pehrson JR, Cohen LH. (1992) Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation. *Nucleic Acids Res*. 20:1321-4

Pfeifer GP. (1997) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol*. 65:270-83

Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. (1994) Delineation of two distinct deleted regions on chromosome 9 in human non-melanoma skin cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 11:222-5

Rapp A, Greulich KO. (2004) After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci*. 117:4935-45

Ratner D, Peacocke M, Zhang H, Ping XL, Tsou HC. (2001) UV-specific p53 and PTCH mutations in sporadic basal cell carcinoma of sun-exposed skin. *J Am Acad Dermatol*. 44:293-7

Rivers JK. (2004) Is there more than one road to melanoma? *Lancet*. 363:728-30

Robert-Koch-Institut (2004) Breitbart EW, Wende A, Mohr P, Greinert R, Volkmer B. Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Heft 22 Hautkrebs Robert-Koch-Institut (Herausgeber), Berlin

Rochette PJ, Therrien JP, Drouin R, Perdiz D, Bastien N, Drobetsky EA, Sage E. (2003) UVA induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res.* 31:2786-94

Rodenas JM, Delgado-Rodriguez M, Herranz MT, Tercedor J, Serrano S. (1996) Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control.* 7:275-83

Rosso S, Zanetti R, Martinez C, Tormo MJ, Schraub S, Sancho-Garnier H, Franceschi S, Gafa L, Perea E, Navarro C, Laurent R, Schrameck C, Talamini R, Tumino R, Wechsler J. (1996) The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer.* 73:1447-54

Roth DE, Hodge SH, Callen JP. (1989) Possible ultraviolet A-induced lentigines: a side effect of chronic tanning salon usage. *J Am Acad Dermatol.* 20:950-4

Routaboul C, Denis A, Vinche A. (1999) Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol.* 9:95-9

Roza L, De Gruijl FR, Bergen Henegouwen JB, Guikers K, Van Weelden H, Van Der Schans GP, Baan RA. (1991) Detection of photorepair of UV-induced thymine dimers in human epidermis by immunofluorescence microscopy. *J Invest Dermatol.* 96:903-7

Sage E, Lamolet B, Brulay E, Moustacchi E, Chteauneuf A, Drobetsky EA. (1996) Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:176-80

Salisbury JR, Williams H, du Vivier AW. (1989) Tanning bed lentigines: ultrastructural and histopathologic features. *J Am Acad Dermatol.* 21:689-93

Schaffer JV, Bolognia JL. (2001) The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol.* 137:1477-85

Schieferstein U, Thoma F. (1996) Modulation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in a positioned nucleosome containing poly(dA.dT) tracts. *Biochemistry.* 35:7705-14

- Schwarz T. (1999) UV radiation-induced tolerance. *Allergy*. 54:1252-61
- Selby CP, Sancar A. (1993) Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science*. 260:37-8
- Seckmeyer G, Mayer B, Bernhard G, McKenzie RL, Johnston PV, Kotkamp M, Booth CR, Lucas T, Mestechkina T, Roy CR, Gies HP, Tomlinson D. (1995) Geographical differences in the UV Measured by Intercompared Spectroradiometers. *Geophysical Research Letters*. 22:1989-92
- Seckmeyer G, Mayer B, Bernhard G, Albold A, Erb R, Jäger H, Stockwell WR. (1997) New Maximum UV Irradiance Levels Observed in Central Europe. *Atmospheric Environment*. 31:2971-6
- Setlow RB, Grist E, Thompson K, Woodhead AD. (1993) Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6666-70
- Shanley S, Ratcliffe J, Hockey A, Haan E, Oley C, Ravine D, Martin N, Wicking C, Chenevix-Trench G. (1994) Nevroid basal cell carcinoma syndrome: review of 118 affected individuals. *Am J Med Genet*. 50:282-90
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 349:431-4
- Sloane G, Cole P, Wilson R. (1977) Risk indicators of de novo malignancy in renal recipients. *Trans Plant Proc*. 9:1129-32
- Smerdon MJ, Thoma F. (1990) Site-specific DNA repair at the nucleosome level in a yeast minichromosome. *Cell*. 61:675-84
- SSK-Strahlenschutzkommission des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (2001) Schutz des Menschen vor den Gefahren der UV-Strahlung in Solarien. Seite 5, Bonn
- Stick C and Pielke L. (1998) Die Zusammensetzung der solaren UV-Strahlung im Tagesverlauf. *Akt Dermatol*. 24:1509-16
- Stoebner-Delbarre A, Thezenas S, Kuntz C, Nguyen C, Giordanella JP, Sancho-Garnier H, Guillot B; Le Groupe EPI-CES. (2005) Sun exposure and sun protection behavior and attitudes among the French population. *Ann Dermatol Venereol*. 132:652-7
- Studzinski GP, Moore DC. (1995) Sunlight--can it prevent as well as cause cancer? *Cancer Res*. 55:4014-22

Sutherland BM and Bennett PV. (1995) Human white blood cells contain cyclobutyl pyrimidine dimer photolyase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:9732-6

Thieden E, Philipsen PA, Heydenreich J, Wulf HC. (2004) UV radiation exposure related to age, sex, occupation, and sun behavior based on time-stamped personal dosimeter readings. *Arch Dermatol*. 140:197-203

Tornaletti S, Pfeifer GP. (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science*. 263:1436-8

Tornaletti S, Rozek D, Pfeifer GP. (1993) The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene*. 8:2051-7

Tung BS, McGregor WG, Wang YC, Maher VM, McCormick JJ. (1996) Comparison of the rate of excision of major UV photoproducts in the strands of the human HPRT gene of normal and xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res*. 362:65-74

Ullrich SE, Schmitt DA. (2000) The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression. *J Dermatol Sci*. 23 Suppl. 1:10-2

Vainio H, Bianchini F. (2000) Cancer-preventive effects of sunscreens are uncertain. *Scand J Work Environ Health*. 26:529-31

Van Hoffen A, Venema J, Meschini R, van Zeeland AA, Mullenders LH. (1995) Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J*. 14:360-7

Van Weelden H, De la Faille HB, Young E, Van der Leun JC. (1988): A new development in UVB phototherapy of psoriasis. *Br J Dermatol*. 119:11-9

Van Weelden H, van der Putte SC, Toonstra J, van der Leun JC. (1990) UVA-induced tumours in pigmented hairless mice and the carcinogenic risks of tanning with UVA. *Arch Dermatol Res*. 282:289-94

Vitasa BC, Taylor HR, Strickland PT, Rosenthal FS, West S, Abbey H, Ng SK, Munoz B, Emmett EA. (1990) Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer*. 65:2811-7

Wamer WG, Wei RR. (1997) In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol*. 65:560-3

Wellinger RE, Thoma F.(1997) Nucleosome structure and positioning modulate nucleotide excision repair in the non-transcribed strand of an active gene. *EMBO J.* 16:5046-56

WHO (2007) Sunbeds, tanning and UV-exposure. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs287/ Zugriff am 18.03.2007

Wood RD. (1996) DNA-repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.* 65:135-67

Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. (2001) Human DNA repair genes. *Science.* 291:1284-9

Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ. (1998) Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature.* 391:90-2

Yasui A, Eker AP, Yasuhira S, Yajima H, Kobayashi T, Takao M, Oikawa A. (1994) A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.* 13:6143-51

Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Hawk JL, Nikaido O, Potten CS. (1996) The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *J Invest Dermatol.* 106:1307-13

Yu Y, Teng Y, Liu H, Reed SH, Waters R. (2005) UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8650-5

Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Navarro C, Schraub S, Sancho-Garnier H, Franceschi S, Gafa L, Perea E, Tormo MJ, Laurent R, Schrameck C, Cristofolini M, Tumino R, Wechsler J. (1996) The multicentre south European study 'Helios'. I: Skin characteristics and sunburns in basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer.* 73:1440-6

Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. (1999) p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *Br J Cancer.* 79:921-6

Zhang X, Rosenstein BS, Wang Y, Lebwohl M, Mitchell DM, Wei H. (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol.* 65:119-24

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 372:773-6

Lebenslauf

Name: Sebastian Lawrenz
 Geburtsdatum: 1. März 1976
 Geburtsort: Bremen
 Anschrift: Gaußstraße 152
 22765 Hamburg

Eltern: Carola Margarete Lawrenz, geborene Leonhard
 Bodo Kurt Lawrenz

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulausbildung: 1982 – 1983 Grundschule Bremen
 1983 – 1986 Grundschule Jork
 1986 – 1988 Orientierungsstufe Jork
 1988 – 1995 Halepaghengymnasium Buxtehude
 1995 Abitur, Halepaghengymnasium Buxtehude

Wehrdienst: 07/1995 – 04/96 Grundwehrdienst bei der Marine

Studium: 04/96 Immatrikulation an der Georg-August-Universität
 Göttingen, Fachbereich Humanmedizin
 04/98 Ärztliche Vorprüfung
 04/99 1. Staatsexamen
 10/00 – 10/01 Studium an der Universidad Miguel Hernandez de
 Elche/ Spanien
 10/01 – 10/02 Studium an der Georg-August-Universität Göttingen
 10/02 2. Staatsexamen
 11/03 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr: 10/02 – 02/03 Hospital Universitario Reina Sofia de Cordoba/
 Spanien, Orthopädie
 02/03 – 04/03 Hospital Universitario Reina Sofia de Cordoba/
 Spanien, Innere Medizin
 04/03 – 08/03 Hospital Universitario Virgen de las Nieves
 Granada/Spanien, Chirurgie
 08/03 – 10/03 Pius-Hospital Oldenburg, Innere Medizin

Berufstätigkeit: 11/03 – heute Elbe-Klinikum Buxtehude, Abteilung für Chirurgie
 10/04 Vollaprobation

Danksagung

Prof. Dr. Eckhard Breitbart danke ich für die mir zuteil gewordene Förderung und die Überlassung des Themas.

Herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Dermatologischen Forschungszentrums Buxtehude für ihre kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Betreuern Dr. Beate Volkmer und Dr. Rüdiger Greinert, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Vor allem aber für ihre immer freundliche, geduldige und menschliche Art. Eine bessere Aufnahme und Betreuung kann man sich nicht wünschen.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für den umfangreichen moralischen Beistand.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer an anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Sebastian Lawrenz

Hamburg, den 05.06.2007