

Dermatologikum Hamburg
Praxis Prof. Dr. V. Steinkraus und Partner
Stephansplatz 5, 20354 Hamburg

**Untersuchung der Einflussnahme verschiedener UVB
Bestrahlungsquellen auf die Mikronukleus Entstehung in
humanen Keratinozyten**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nicola Otte
aus Bünde

Hamburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
Universität Hamburg am: 15. Juli 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. V. Steinkraus

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Neuber

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Mensing

*Auf der Suche
nach etwas Schönem wie Schnee
ging ich leer aus
bis es des Wegs zu schneien begann*

Elisabeth Borchers

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	3
2.1	Aufbau und Funktion der Haut	3
2.2	Solare Strahlung	5
2.2.1	Ultraviolette Strahlung und ihre biologische Wirkung auf die Haut	8
2.2.2	Schädigende Effekte der UV-Strahlung auf die Haut	13
2.2.3	Endogene Schutz- und Reparaturmechanismen vor bzw. nach UV-Strahlung	15
2.3	Nachweisverfahren für UV-vermittelte DNS-Schäden	17
2.4	Mikronukleustest	18
2.4.1	Zytokinese-Block-Technik	20
2.4.2	Kriterien zur Identifizierung von Mikronuklei	22
3.	Material und Methoden	24
3.1	Zellen	24
3.2.	Zellkulturtechnik	24
3.2.1	Isolierung von primären Keratinozyten aus Hautbiopsien und Bestimmung der Spontanraten	25
3.2.2	Passage von Zellkulturen	29
3.3	Mikronukleustest	31
3.4	Dosimetrie und Bestrahlung	35
3.4.1	Breitband-UVB-Bestrahlung	36
3.4.2	Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung	37
3.4.3	Bestrahlung von Zellkulturen	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Bestimmung der optimalen Cytochalasin-B Konzentration für humane Keratinozyten	40

Inhaltsverzeichnis

4.2	Die Frequenz spontan entstandener Mikronuklei in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Probanden	41
4.3	Phototoxizitätsprüfung mit Breitband-UVB-Bestrahlung	42
4.3.1	Bestimmung des NDI nach Breitband-UVB-Bestrahlung	44
4.4	Phototoxizitätsprüfung mit Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung	45
4.4.1	Bestimmung des NDI nach Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung	47
4.5	Vergleich der Phototoxizität von Breitband-UVB und Schmalspektrum-UVB Bestrahlung	48
5.	Diskussion	51
6.	Zusammenfassung	55
7.	Anhang	57
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Lebenslauf	73
10.	Danksagung	74
11.	Erklärung	75

Abkürzungsverzeichnis

BPE	Boviner Hypophysenextrakt
Cyt-B	Cytochalasin-B
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBSS	Earl's gepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FCS	Fötales Kälberserum
HaCaT	Immortalisierte humane adulte Keratinozyten
Hoechst 33258	2'-(4-Hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol
IR	Infrarot
Ig	Immunglobulin
J	Joule
KBM	Keratinozyten Basal Medium
KGM	Keratinozyten Wachstumsmedium
MED	Minimale Erythemdosis
MN	Mikronukleus / Mikronuklei
MNT	Mikronukleustest
NHEK	Normale Humane Epidermale Keratinozyten
NDI	Nuclear Division Index
n.d.	nicht durchgeführt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PBL	Humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut
PUVA	Psoralen + UVA (Photochemotherapie)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCL-2	Humane Keratinozytenzelllinie aus einem spinozellulären Karzinom
SD	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
UVA	Ultraviolette Strahlung von 320-400 nm
UVB	Ultraviolette Strahlung von 280-320 nm

1 Einleitung

Haut und Sonne

Als Grenzorgan des menschlichen Organismus ist die Haut in besonderem Maße Umwelteinflüssen ausgesetzt. Unter den vielfältigen Arten von Strahlen spielt das Sonnenlicht eine herausragende Rolle, weil wir ständig einer mehr oder weniger starken Exposition durch die Strahlung der Sonne und künstlichen Lichtquellen (z.B. Solarium, UV-Therapie) ausgesetzt sind. Im Gegensatz zur Außenfläche von z.B. empfindlichen, technischen Geräten stellt die Haut keine Grenzfläche, sondern eine Grenzschicht dar, in die die UV-Strahlung bis zu über einen Millimeter tief eindringen kann. Der Einfluss ultravioletter Strahlung auf die Haut hängt in erster Linie von der Fähigkeit der in der Haut gelegenen Moleküle und Zellstrukturen ab, Lichtquanten bestimmter Wellenlängen zu absorbieren. Neben den bekannten wohltuenden und entspannenden Wirkungen der Sonnenstrahlen, führt ein zu ausgiebiges „Sonnenbad“ zu akuten und nach langjähriger UV-Exposition auch zu chronischen Schäden der Haut. Insbesondere das in den letzten Jahren veränderte Freizeitverhalten der Bevölkerung birgt ein stark erhöhtes Risiko für Strahlenschäden der Haut, wie die ansteigende Inzidenz von epithelialen und nicht-epithelialen Hauttumoren zeigt.

Neben der Kausalität von UV-Strahlen für das Auftreten von Hauttumoren ist bereits seit der Antike der positive Einfluss von ultravioletter Strahlung auf verschiedene Hauterkrankungen bekannt. Die Phototherapie ist heute eine wichtige Säule der modernen dermatologischen Therapie. Bereits 1903 erhielt Niels Finsen den Nobelpreis für die Einführung der Phototherapie in der Behandlung der Hauttuberkulose und legte damit den Grundstein für die heutige Anwendung von UVA- und UVB-Strahlung in der Behandlung dermatologischer Krankheitsbilder. Nachdem man bereits 1923, zu Zeiten der Etablierung der UVB-Therapie in der Behandlung der Psoriasis, erkannte, dass der therapeutische Effekt einer ultravioletten Behandlung eng mit der phototoxischen Wirkung verbunden ist, beschäftigte man sich in den vergangenen Jahren ausgiebig mit der Erforschung des Wirkspektrums der verschiedenen Wellenlängen. So fanden Parrish und Jaenicke 1981 für die antipsoriatische Therapie einen maximalen Effekt und eine minimale erythemotogene Wirkung bei einer Wellenlänge um 311 nm heraus und legten damit den Grundstein für die UVB-Schmalspektrum Behandlung. Sie ist heute fester Bestandteil der Phototherapie. In wissenschaftlichen Arbeiten ist bereits ein breites

1 Einleitung

Indikationsspektrum mit hoher therapeutischer Effektivität für die UVB-Schmalspektrum Therapie belegt. Im Vergleich zur UVB-Breitband Bestrahlung (280-320 nm) werden bei der UVB-Schmalspektrum Bestrahlung 5- bis 15-fach höhere UV-Dosen eingesetzt. Da sie in zunehmendem Maße die UVB-Breitband Therapie und zum Teil auch die PUVA-Therapie ersetzt, ist das karzinogene Potential der UVB-Schmalspektrum Therapie im Vergleich zu anderen UV-Therapien von wissenschaftlichem Interesse und derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Daraus resultiert ein Bedarf an Testmethoden, mit denen UV-vermittelte DNS-Schäden quantitativ und qualitativ bestimmt werden können. Der Mikronukleustest gehört zu den häufig angewandten Nachweisverfahren zur Identifizierung der unterschiedlichen genotoxischen Potentiale einzelner Agenzien. Gegenüber anderen Nachweisverfahren ist er einfach durchführbar, preiswert und ohne großen apparativen Aufwand. Darüber hinaus ist dieses Verfahren sowohl im *in vitro* als auch im *in vivo* Test anwendbar. Über Ursprung und Genese der Mikronukleusentstehung sind vereinzelt Arbeiten veröffentlicht worden. Die meisten Ergebnisse basieren auf Daten, die anhand von Lymphozyten gewonnen wurden. Diese gelten als sehr empfindlich und leicht kultivierbar. Sie stellen jedoch *in vivo* nicht das Ziel der ultravioletten Strahlung dar. Es erscheint daher sinnvoll, Keratinozyten der Haut, die primär der ultravioletten Strahlung ausgesetzt sind, für wissenschaftliche Arbeiten zur Erforschung der Wirkung beziehungsweise Schädigung von UV-Strahlung zu verwenden.

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Die Etablierung des Mikronukleustests an humanen Keratinozyten
2. Die Untersuchung des genotoxischen Potentials einer Breitspektrum-UVB Bestrahlung im Vergleich zu einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung an humanen Keratinozyten

2 Grundlagen

2.1. Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und besitzt bei einem durchschnittlichen Erwachsenen eine Gesamtfläche von 1,5 - 2 m², ein Gewicht von ca. 3 kg und eine Dicke von 1,5 bis 4 mm je nach Körperregion. Sie erfüllt lebenswichtige **Funktionen** für den menschlichen Organismus. Hinzu zählen z. B.: **(1) Schutz vor chemischen, physikalischen (UV-Strahlung) und mikrobiellen** Einwirkungen von außen; **(2) Homöostase des Wasserhaushalts** und **Konstanthaltung der Körpertemperatur** durch Wärmeabgabe sowie Verdunstung von Schweiß und Wasser; **(3) Sinnesorgan** der Peripherie mit verschiedenen Rezeptoren und freien Nervenendigungen für unterschiedliche Reize wie Berührungs-, Temperatur- und Schmerzwahrnehmung sowie **(4) die Vermittlung immunstimulatorischer Effekte** durch antigenpräsentierende Zellen in der Epidermis und andere.

Der **Aufbau der Haut** gliedert sich in zwei histologisch gut zu differenzierende Schichten, (1) die Epidermis und (2) die Dermis mit der sich anschließenden Subkutis.

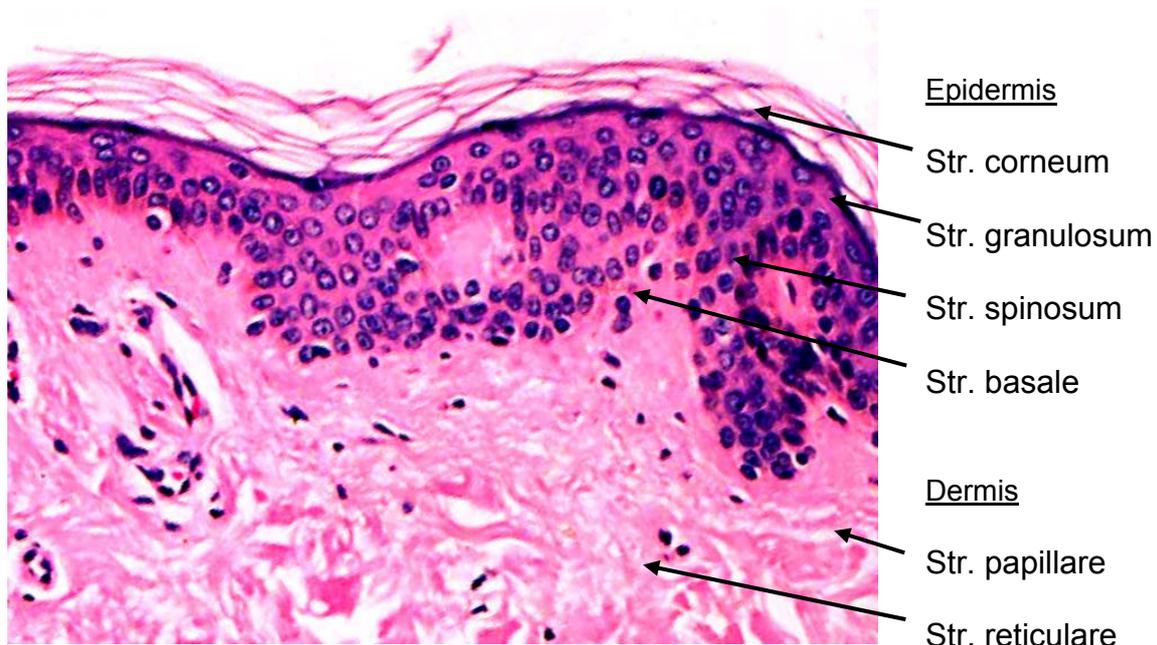


Abb. 1: Aufbau der Haut

Die **Epidermis**, als externe Begrenzung zwischen Organismus und Umwelt, ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dessen Dicke in Abhängigkeit von Lokalisation, Alter und Geschlecht zwischen 30 und 300 µm variiert. Die Zellen der

2 Grundlagen

Epidermis setzen sich zu 90 - 95 % aus **Keratinocyten** zusammen. Sie entstehen aus den Zellen des **Stratum basale**. Ein Keratinozyt durchläuft verschiedene Differenzierungsstadien und charakterisiert mit seiner Morphologie die jeweilige Schicht der Epidermis. Histologisch lassen sich das **Stratum spinosum**, mit seinen stachelig wirkenden, zunehmend abflachenden Zellen, das **Stratum granulosum**, geprägt von intrazellulären Keratohyalin granula und das **Stratum corneum**, mit seinen flach und fest gepackten, kernlosen Keratinozyten voneinander abgrenzen. Die Entwicklung der terminalen epidermalen Differenzierung der Keratinozyten beansprucht einen Zeitraum von 4 - 5 Wochen. Neben den Keratinozyten kommen in der Epidermis in wesentlich geringerer Zahl weitere Zelltypen vor, die Melanozyten, Langerhanszellen und Merkel-Zellen.

Die melaninproduzierenden **Melanozyten** sind im Stratum basale der Epidermis lokalisiert. Etwa jede 5. bis 8. Zelle in der Basalschicht ist ein Melanozyt. Unter dem Einfluss der UV-Strahlung bilden sie vermehrt Melanin und „verpacken“ es in Melanosomenkomplexe, die über dendritische Melanozytenausläufer an die Keratinozyten weitergegeben werden. Das Melanin wird in den Keratinozyten kappenartig über dem Zellkern angeordnet, um so die DNS vor den einfallenden UV-Strahlen zu schützen. Ein Melanozyt und 36 Keratinozyten bilden zusammen eine „epidermale Melanin-Einheit“.

Die Versorgung der Epidermis, die selbst keine Gefäße enthält, erfolgt durch Diffusion von der darunterliegenden Dermis, die besonders im oberen Anteil sehr gefäßreich ist.

Die **Dermis** bildet das bindegewebige Gerüst der Haut. Sie ist durch eine komplex gebaute Junktionszone mit der Epidermis verbunden. Das Bindegewebe setzt sich aus verschiedenen Zellen wie z.B. Fibroblasten, Histiozyten und Mastzellen sowie Bindegewebsfasern (Kollagen-, Retikulin- und Elastinfasern) zusammen. Die einzelnen Bestandteile sind eingebettet in eine gelartige Grundsubstanz, deren Gerüst Proteoglykane bildet. Die Dermis enthält ein verzweigtes System von Blutgefäßen, sowie sensiblen und vegetativen Nervenfasern. Sie lässt sich histologisch 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) finden. Die Dermis grenzt an die **Subkutis**. Diese besteht aus Fettgewebe, das durch locker,

2 Grundlagen

lamellär angeordnetes Bindegewebe unterteilt wird und in der Tiefe den Faszien der Muskulatur aufliegt.

2.2 Solare Strahlung

Mit einem Durchmesser von 1,4 Millionen km und einer Masse, die rund das 300.000 -fache der Erde ausmacht, bildet die Sonne das Zentrum unseres planetarischen Systems. Im Inneren des fast 150 Millionen km entfernten Fixsterns finden fortwährend Kernreaktionen statt, die unvorstellbar große Energiemengen in Form elektromagnetischer Strahlung freisetzen. Unterteilt wird dieses Spektrum entsprechend der Wellenlängen, die in nm angegeben werden ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$).

Spektralbereich	Wellenlänge
Gammastrahlung	$10^{-4} - 10^{-1}$ nm
Röntgenstrahlung	$10^{-2} - 10$ nm
Vakuum-Ultraviolett Strahlung	10 – 200 nm
UV Strahlung (A, B, C)	200 – 400 nm
Sichtbares Licht	400 - 780 nm
Infrarot-(IR)-Strahlung	0,78 – 1000 μm
Mikrowellen	> 1 mm

Tab. 1: Das gesamte elektromagnetische Spektrum. Die Infrarotstrahlung, das sichtbare und das ultraviolette Spektrum bilden zusammen den Bereich der optischen Strahlung.

Die von der Sonne emittierte Strahlung erreicht nur teilweise, insbesondere im UVB Bereich, als **direkte** Sonneneinstrahlung die Erdoberfläche. Der Großteil kommt aufgrund von Absorption, Streuung und Reflexion bei Eintritt in die Atmosphäre abgeschwächt als **indirekte** Strahlung auf die Erde. Die Summe von direkter Sonnenstrahlung und Himmelsstrahlung (Streulicht der Atmosphäre) bezeichnet man als Globalstrahlung. Ihre Intensität wird von folgenden Faktoren beeinflusst:

2 Grundlagen

Sonnenstand: er ist abhängig von geographischer Breite, Jahres- und Tageszeit. Mit zunehmender Höhe des Sonnenstandes nimmt auch die Bestrahlungsstärke zu (Iqbal, 1986). Diese ist außerdem wellenlängenabhängig, so dass mit zunehmender Sonnenhöhe der kurzwellige Anteil der UV-Strahlung überproportional ansteigt (Stick und Pielke, 1998).

Ozongehalt: er ist jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen. Ozon entsteht bei der photochemischen Reaktion von kurzwelliger UV-Strahlung (< 250 nm) mit molekularem Sauerstoff. Es absorbiert ca. 95% der einfallenden UVB-Strahlung, während UVA ungehindert passiert. UVC wird in erster Linie durch molekularen Sauerstoff und nur in geringem Ausmaß von Ozon absorbiert (Kindl und Raab, 1998).

Wolken: die UV-Strahlung wird durch die Bewölkung stark beeinflusst. Normalerweise führt eine stärkere Bewölkung zu einer geringeren Bestrahlungsstärke, unter bestimmten Bedingungen kann durch Reflexion der Strahlung an den Wolken jedoch eine höhere Bestrahlungsstärke auftreten als bei wolkenlosem Himmel (Bais et al., 1993).

Aerosole: als Aerosole werden feinste Schwebeteilchen in der Luft bezeichnet, die die UV-Bestrahlungsstärke reduzieren. Je nach Beschaffenheit, Größenverteilung und Menge können diese Bestandteile laut Modellrechnung eine 5 - 18% ige Abnahme der UVB-Strahlung verursachen (Madronich et al., 1991; Seckmeyer und Bernhard, 1993).

Bodenalbedo: als Albedo wird der Reflexionskoeffizient der Erdoberfläche für Licht bezeichnet. Die Albedo ist abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit, der Wellenlänge und dem Einfallswinkel des Lichts; eine Schneedecke oder eine Wasseroberfläche führen beispielsweise zu einer erhöhten Albedo. Hiervon ist insbesondere auch der UVA-Anteil des Sonnenlichts betroffen.

Höhenlage: die Bestrahlungsstärke nimmt mit der Höhe zu. Da sich mit zunehmender Höhe viele der genannten Faktoren zusätzlich ändern, ist eine allein auf die Höhe zurückzuführende Komponente schwierig zu bestimmen. Laut

2 Grundlagen

Modellrechnung kann die erythemwirksame Bestrahlung zwischen 10 und 40% pro 1000 Höhenmetern ansteigen (Seckmeyer et al., 1997).

Um die Stärke der Globalstrahlung zu ermitteln, wurden die auf der Erdoberfläche höchstmöglichen Werte zugrunde gelegt bei *90° Sonnenstand, wolkenlosem Himmel und klarer Luft*. Derartige Idealwerte lassen sich z.B. im Hochsommer um 12 Uhr in der Karibik unter aerosolfreien Bedingungen mit einer Ozonschichtdicke von 0,24 cm an STP (Standard, Temperature, Pressure) für eine ebene, horizontale Empfangsfläche definieren (s. Tab. 2).

	Wellenlänge	Bestrahlungsstärke (W/m ²) in %	
UVB	295 – 315	5	0,5
UVA	315 – 380	63	5,6
Sichtbar	380 – 780	580	51,8
Infrarot A	780 – 1400	339	29,4
Infrarot B	1400 - 3000	143	12,7

Tab. 2: Bestrahlungsstärken der Globalstrahlung auf der Erdoberfläche, Sommer, senkrechter Einfall (CIE Nr. 20, TC-2.27 1972)

Die energiereiche, kurzwellige **UVC**-Strahlung wird von atmosphärischem Sauerstoff und der Ozonschicht vollständig absorbiert und hat daher auf der Erdoberfläche keine Bedeutung. Im Zuge der sich ausdünnenden Ozonschicht muss jedoch damit gerechnet werden, dass in Zukunft auch Anteile dieser Strahlung bis auf die Erde vordringen könnten. Für die längerwellige **UVB**-Strahlung, die zum Teil auch von der Ozonschicht absorbiert wird, konnte eine Korrelation zwischen abnehmendem Ozongehalt in der Stratosphäre und zunehmend höherer UVB-Strahlung auf der Erde nachgewiesen werden (Bojkov et al., 1993; Seckmeyer et al., 1994). Die langwelligere **UVA**-Strahlung wird von der Atmosphäre in nur sehr geringem Maße zurückgehalten und stellt damit den prozentual größten Anteil, ca. 90%, der auf der Erde messbaren UV-Strahlung dar.

2 Grundlagen

2.2.1 Ultraviolette Strahlung und ihre biologische Wirkung auf die Haut

Die ultraviolette Strahlung macht nur etwa 6% der gesamten Globalstrahlung aus. Ihr hoher Energiegehalt, aufgrund ihrer Kurzwelligkeit, reicht jedoch aus, um eine große biologische Wirkung auf die Haut auszuüben (Kindl und Raab, 1998; Griffiths et al., 1998). In der Photomedizin erfolgt die Einteilung des ultravioletten Spektralbereichs anhand ihres biologischen Wirkungspotenzials auf die Haut:

UVC	200 - 280 nm
UVB	280 - 320 nm
UVA	320 - 400 nm (UVA₁: 340 – 400 nm, UVA₂: 320 – 340 nm)

In der Literatur finden sich abweichende Einteilungen der ultravioletten Wellenlängenbereiche (Deutsches Institut für Normierung (DIN-NR. 5031); Comité Internationale d'Éclairage (CIE) ; in der Physik).

Die jeweilige Wellenlänge bestimmt die Eindringtiefe und Wirkung der UV-Strahlung in der Haut.

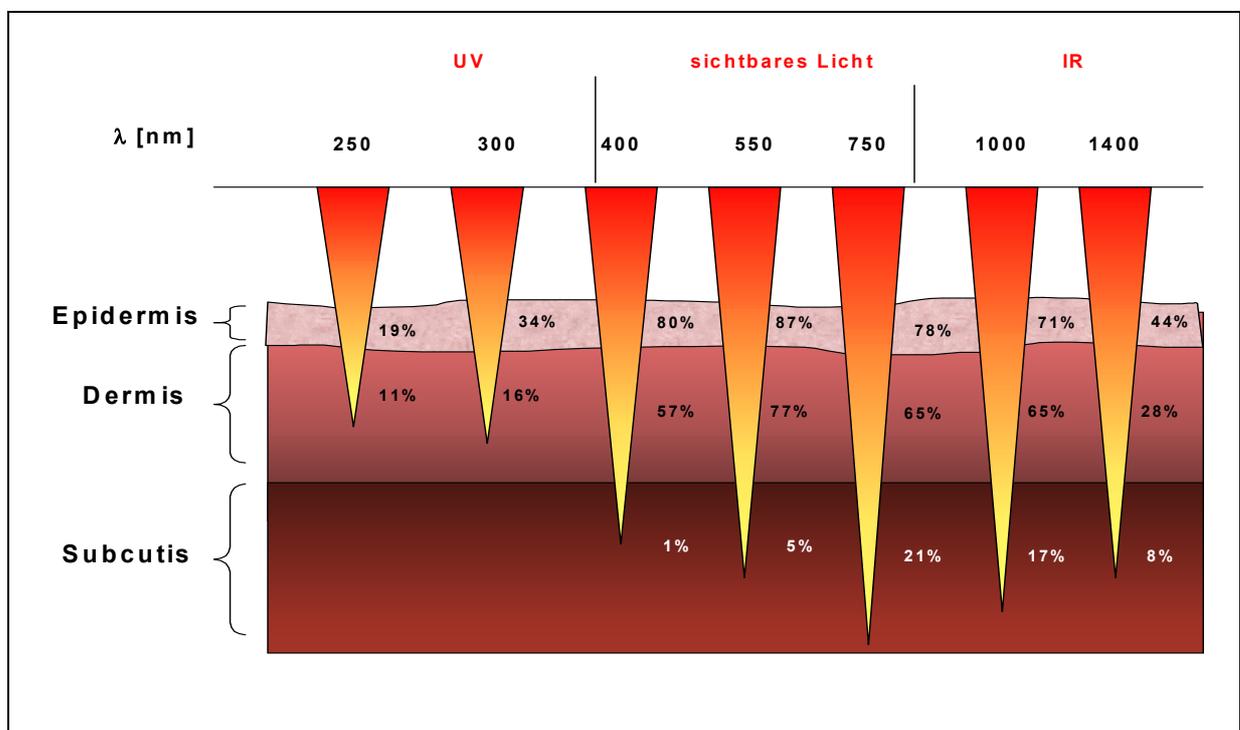


Abb. 2: Eindringtiefe der verschiedenen Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung in die Haut. Je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher ist die Strahlung und um so geringer ist die Eindringtiefe in die Haut (Rünger, 1995).

2 Grundlagen

Bei einer UV-Bestrahlung bleibt das Stratum corneum unverändert und wirkt als schützender Filter, ca. 10% der UVB und 50% der UVA Energie wird hier absorbiert bzw. reflektiert. Die Eindringtiefe der verschiedenen Wellenlängen hängt ganz entscheidend von der Streuung innerhalb der Haut ab. Unterhalb 200 nm dringen die ultravioletten Strahlen kaum in die Epidermis ein, sondern werden zum größten Teil vom Stratum corneum absorbiert. Mit steigender Wellenlänge nimmt der Prozentsatz der eindringenden Strahlen zu. So erreichen UVB-Strahlen zu etwa 20% das Stratum spinosum und zu ca. 10% das obere Korium. UVA-Strahlen dagegen dringen zu 30 - 50% in das obere Korium ein. Daraus ergeben sich zum Teil die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Wellenlängen auf die Haut.

UVC kommt auf der Erdoberfläche normalerweise nicht vor. Da es auf Einzeller letal wirkt, wird es für technische Zwecke, z.B. für die bakterielle Entkeimung der Luft, verwendet. Aus Untersuchungen mit UVC-Strahlern ist bekannt, dass sie an der Haut ein Erythem auslösen, das ca. 6 h post expositionem sichtbar wird. Die UVC bedingte Hautbräunung ist gering, es führt jedoch in extremem Maße zu einer konjunktivalen Reizung.

UVB hat die Eigenschaft Quarzglas und Wasser zu durchdringen, wird jedoch von Fensterglas abgefiltert. Es führt ebenfalls zu einer Reizung der Konjunktiven, jedoch in geringerem Ausmaß, als dies durch UVC-Strahlung geschieht. Zu den biologischen Wirkungen gehört das Erythema solare, welches bereits 1894 von Paul Gerson Unna beschrieben wurde (Unna, 1984). Es entsteht durch eine Prostaglandinsynthese der Keratinozyten nach Überschreitung eines individuell unterschiedlich hohen Grenzwertes der Bestrahlungsdosis. Nach einer Latenz von 6 - 8 Stunden kommt es zu einer sichtbaren schmerzhaften Rötung der lichtexponierten Areale, die nach 24 - 36 Stunden ihr Maximum erreicht und nach ca. 72 Stunden abklingt. In extremen Fällen geht das Erythema solare mit Blasen- und Krustenbildung einher. Die geringste UVB Dosis, die zu einer gleichförmigen Rötung mit scharfer Begrenzung auf der Haut führt, wird als minimale Erythemdosis, kurz MED, definiert. Sie hängt vom Hauttyp und der bestrahlten Körperregion ab. Bei Hauttyp II wird 1 MED durch ca. 20 - 40 mJ/cm² erreicht (Fitzpatrick et al., 1997). UVB-Strahlen von mehr als einer MED führen

2 Grundlagen

histologisch zu einer charakteristischen phototoxischen Veränderung an den Keratinozyten. Dosisabhängig treten intra- und interzelluläre Ödeme und dyskeratotische Zellen, sogenannte „sunburn cells“, auf, sowie dilatierte Gefäße im oberen Korium mit perivaskulär lokalisierten lymphozytären Infiltraten.

Ein weiterer biologischer Effekt der UVB-Strahlung ist die Spätpigmentierung (Sonnenbräune). Durch Anregung der Melanogenese werden vermehrt Melanosomenkomplexe in allen Ebenen der Epidermis in die Keratinozyten eingelagert und über die Hornschicht ausgeschleust, so dass in der gesamten Epidermis, einschließlich des Stratum corneums, Melanin als Schutzpigment zur Verfügung steht. Die Spätpigmentierung tritt etwa 24 - 72 h nach UV-Applikation auf, wobei Wellenlängen um 297 nm die stärkste Pigmentierungskapazität aufweisen. Das Melanin setzt sich aus Eumelanin (braun-schwarz) und Phäomelanin (gelb-rötlich) zusammen. Die Melaninbildung ist in ihrem quantitativen Ausmaß von genetischen und hormonellen Faktoren abhängig. So ist das Verhältnis von Eumelanin zu Phäomelanin bei Hauttyp I - II geringer als bei Hauttyp III - IV (Hunt et al., 1995). Phäomelanin ist weniger potent als UV-Absorber und kann zudem zur Auslösung von phototoxischen Radikalreaktionen unter UVA-Strahlung führen (Kaidbey et al., 1979; Menon et al., 1983; Wenczel et al., 1998). Nach wiederholter UVB-Applikation kommt es zur Akanthose und Hyperkeratose der Epidermis, die nach Miescher (1931) als sogenannte Lichtschwiele der Haut bezeichnet wird und ebenso wie die Melanogenese zu den endogenen photoprotektiven Mechanismen der Haut zählt.

Eine weitere biopositive Wirkung der UVB-Strahlung ist die Photoisomerisierung von 7-Dehydrocholesterin und Ergosterol zu den biologisch wirksamen Vorstufen des Vitamin D₂ und D₃, die eine entscheidende Rolle in der Homöostase des Calcium-Haushaltes einnehmen.

Desweiteren ist insbesondere die UVB-Strahlung in der Lage, ausgewählte zellvermittelte Immunantworten zu hemmen, z.B. die Immunität gegen UVB-induzierte Hauttumoren, gegen kontaktsensibilisierende Substanzen, gegen Transplantate und gegen bestimmte Mikroorganismen (Schwarz, 2003).

Durch übermäßig starke UVB-Strahlung können akute und chronische Schäden an DNS, RNS, Proteinen und Zellmembranen der Epidermis, des Bindegewebes und der Blutgefäße entstehen. So ist eine chronisch erhöhte Sonnenexposition z. B. eine der Hauptursachen für die vorzeitige Hautalterung und die Entstehung von

2 Grundlagen

sogenannten Präkanzerosen an der Haut. Durch UV-Strahlung induzierte mutagene Effekte an der DNS können zur Entstehung von Karzinomen an der Haut führen. Hierzu zählen Basaliome, spinözelluläre Karzinome (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1993; Greinert et al., 2003) und maligne Melanome. In letzter Zeit häufen sich auch Hinweise darüber, dass nicht nur UVB, sondern auch UVA eine entscheidende Rolle bei der Entstehung chronischer lichtprovozierter Hautveränderungen inklusive Hauttumoren einnimmt.

UVA besitzt ganz im Gegensatz zu UVB und UVC die Fähigkeit Fensterglas zu durchdringen. Es reizt die Konjunktiven in niedrigen Dosen nur in Kombination mit Photosensibilisatoren (z.B. nach systemischer Einnahme von Psoralenen). Die Intensität des UVA-Anteils in der Sonnenstrahlung ist etwa 500 - 1000 fach höher, als die des UVB.

UVA ist verantwortlich für die Sofortpigmentierung. Die maximal wirksame Wellenlänge liegt bei 340 nm und es reichen häufig 10 - 30 J/cm² zur unmittelbaren Auslösung einer aschgrauen bis bräunlichen Pigmentierung aus. Bei der Sofortpigmentierung handelt es sich um eine Photooxidation nicht gefärbter Melaninvorstufen, die sich nach Stunden verliert. Einmal applizierte hohe oder wiederholte kleinere UVA-Dosen führen auch zu einer Induktion der Melaninsynthese, einer Pigmentierung vom verzögerten Typ. Im Gegensatz zu der von UVB induzierten Pigmentierung bleibt das neugebildete Melanin jedoch vorwiegend auf die basalen Zellen beschränkt und bietet somit keinen Schutz für die darüber liegenden Keratinozyten.

In höheren Dosen bewirkt UVA ein Soforterythem, welches sich biologisch von der durch UVB ausgelösten Dermatitis solaris unterscheidet, da es zu keiner Schädigung der Keratinozyten kommt. Im Gegensatz zu UVB führt UVA in Dosen bis zu 100 J/cm² histologisch nicht zu phototoxischen Veränderungen in der Epidermis.

Auch immunmodulierende Effekte, wie sie in der PUVA-Therapie ausgenutzt werden, einer Kombination aus UVA-Licht und Psoralen als Photosensibilisator, spielen bei der Einwirkung von UVA-Strahlung eine Rolle.

UV-Strahlung ist die wichtigste exogene Noxe, durch die es zu einer vorzeitigen Alterung der Haut kommt. Es besteht heute kein Zweifel mehr daran, dass sowohl UVB als auch UVA wesentlich an diesem Prozess beteiligt sind. Mit hoher

2 Grundlagen

Wahrscheinlichkeit kommt dem UVA durch seine größere Eindringtiefe in die Haut eine entscheidendere Rolle bei der Pathogenese der lichtinduzierten Hautalterung zu, da sich die für das klinische Bild der Lichtalterung verantwortlichen strukturellen Veränderungen in der Haut vor allem in der Dermis finden (Krutmann, 2003).

Neben Erkrankungen wie den **Photodermatosen**, die durch UV-Licht ausgelöst werden (z.B. Polymorphe Lichtdermatose, phototoxische und photoallergische Reaktionen), oder Erkrankungen, die durch UV-Licht aggraviert werden können (z.B. Lichen ruber planus, Lupus erythematoses, Rosazea) kommt der UV-Strahlung auch eine wichtige Rolle in der Therapie von Hauterkrankungen zu. Die **Phototherapie** nach heutigem Verständnis wurde von Nils Finzen zur Behandlung der Hauttuberkulose in der Medizin eingeführt, wofür er 1903 den Nobelpreis erhielt (Roelandts, 2002). Kurz genannt seien hier die Photochemotherapie (PUVA), die eine Kombination von oral oder topisch appliziertem lichtsensibilisierenden Psoralen mit UVA-Strahlung darstellt, die Kombinationstherapie von UVA und UVB, die Monotherapie UVA oder UVB, als auch Kombinationstherapien von UVB mit topischen und oralen Medikamenten z.B. Dithranol, Vit. D₃-Derivaten und Retinoiden.

Unter dem Gesichtspunkt der Induktion chronischer Schäden der Haut durch übermäßige und unkontrollierte UV-Strahlung entstand der Gedanke, Wellenlängen des UV-Lichts mit einer maximal therapeutischen und einer minimal erythemato-genen Wirkung in der Therapie von Hauterkrankungen zu nutzen. In den 80-iger Jahren erfolgte anhand der Ausarbeitung des antipsoriatisch wirksamsten UV-Spektrums (Fischer, 1976; Parrish und Jaenicke, 1981) die Einführung einer TL01-Leuchtstoffröhre (Philips), die im UVB Bereich nahezu monochromatisch die Wellenlänge 311 nm emittiert (Degitz, 1998). Diese sogenannte **Schmalspektrum-UVB** Therapie ist heutzutage fester Bestandteil in der Phototherapie. Im Gegensatz zur herkömmlichen Breitspektrum-UVB Behandlung, die bei einem Hauttyp II - III mit einer Anfangsdosis von 20 - 30 mJ/cm² startet, können hier 5 bis 15-fach höhere UV Einzel- und Gesamtdosen zum Einsatz kommen. Eine Reihe von Untersuchungen zeigen die Wirksamkeit der Anwendung von Schmalspektrum-UVB in der Behandlung der Psoriasis (Walters et al., 1999). Halbseitenversuche belegen hier, dass UVB 311 nm dem

2 Grundlagen

Breitspektrum-UVB therapeutisch überlegen und einer oralen PUVA-Therapie gleichwertig ist (Van Weelden et al., 1988; Karvonen et al., 1989; Storbeck et al., 1991; Storbeck et al., 1993; Degitz et al., 1998; Tzung et al., 1998; Tanew et al., 1999). Ergebnisse aus der Behandlung der Vitiligo zeigen zum Teil sogar eine höhere Effektivität der Schmalspektrum-UVB Therapie gegenüber der PUVA-Therapie und sicher ein geringeres Nebenwirkungspotential (Westerhof et al., 2000; Scherschun et al., 2001). Derzeit findet die Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung ebenfalls sehr erfolgreich Anwendung bei der Behandlung des atopischen Ekzems, des Lichen ruber planus und des Pruritus verschiedener Ätiologien. Neben der Erweiterung des Indikationsspektrums gilt es gegenwärtig in wissenschaftlichen Arbeiten nicht nur ihre hohe Effektivität im Vergleich mit herkömmlichen UV-Therapien zu belegen, sondern auch das kanzerogene Potential abzuschätzen, um eine sichere Anwendung gewährleisten zu können.

2.2.2 Schädigende Effekte der UV-Strahlung auf die Haut

Die Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf die Haut hängt in erster Linie von der Fähigkeit der getroffenen Moleküle und Zellstrukturen ab, Lichtquanten zu absorbieren. Die wichtigsten Chromophore der Haut sind die aromatischen Basen der DNS sowie Peptide und Proteine, speziell Enzyme. Ihr Absorptionsspektrum liegt im kurzwelligen **UVB und UVC** Spektrum, da in diesem Bereich sowohl die Absorptionsmaxima der Pyrimidine und Purine der DNS, als auch der in den Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, sowie der heterozyklischen Aminosäuren Tryptophan und Histidin liegen. Durch die aufgenommene Energie werden die Moleküle in einen angeregten Zustand versetzt, der zu einer permanenten chemischen Modifikation des Chromophors, der Entstehung eines Photoprodukts, führen kann. An der DNS sind dies primär Pyrimidin-Dimere vom Cyclobutantyp (in 5 von 10 Fällen) (Griffiths, 1998) bestehend aus Cytosin-Cytosin, Thymin-Thymin oder gemischten Verbindungen, aber auch Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukte und ihre Dewar-Valenz-Isomere (Rosenstein und Mitchell, 1987).

2 Grundlagen

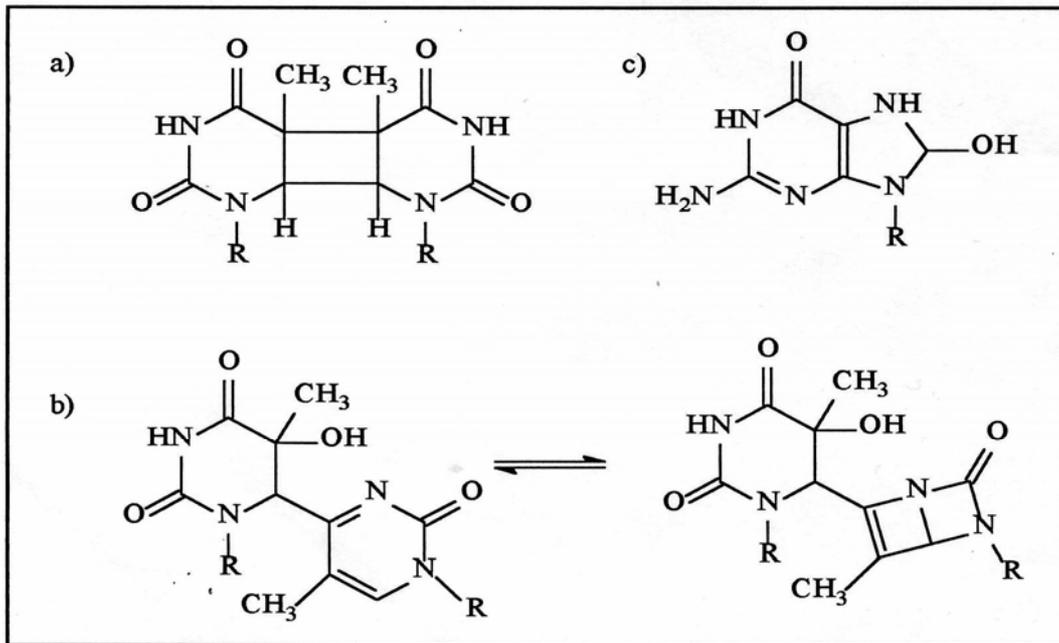


Abb. 3: Darstellung typischer UV-induzierter DNA-Basen Veränderungen. a) Cyclobutan-Pyrimidindimer b) (6-4)-Photoproduct und Dewar Isomer c) 8-Hydroxyguanin.

Die relativen Raten der Bildung von Cyclobutan-Dimeren und (6-4)-Photoprodukten variieren stark und hängen weitgehend von dem (A-T) / (G-C) -Verhältnis in der DNS, der eingestrahlten Energie und deren Wellenlänge ab. So werden bevorzugt (6-4)-Photoprodukte nach UVC-Bestrahlung an T-C Sequenzen gebildet (Lippke et al., 1981; Bourre et al., 1987; Douki et al., 1997), während Cyclobutan-Pyrimidindimere sowohl nach UVC als auch nach UVB-Bestrahlung primär an T-T Sequenzen entstehen (Sage, 1993). Die Dimere bewirken eine Konformationsänderung der DNS-Doppelhelix, die bei unzureichender Reparatur zur Transformation der Zelle führen kann. Mit zunehmender Wellenlänge kommt es unter Einwirkung von UV-Strahlung auch zu Strangbrüchen und Veränderungen einzelner Basen. Bei einer Wellenlänge von 254 nm werden hauptsächlich Pyrimidin-Dimere vermerkt, bei 365 nm sind beide Effekte etwa im Gleichgewicht und zwischen 340 und 500 nm überwiegen Einzelstrangbrüche (Peak et al., 1987).

Die **UVA**-Strahlung wirkt auf einem indirekten Weg auf die DNS ein. Sie wird von endogenen Chromophoren, wie z.B. Flavinen, NADH, 2-Thiouracil oder Porphyrinen absorbiert (Cunningham et al., 1985), wodurch es zur Bildung freier Radikaler und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt, die durch

2 Grundlagen

Energietransfer an die DNS zu Strangbrüchen, oxidativen Basenschäden und DNS-Protein-crosslinks führen (Hönigsmann et al., 1996).

Besonders Guanin ist eine empfindliche Base für photochemische Reaktionen. Unter Einwirkung von UVA-Strahlung entsteht 8-Hydroxyguanin, das mit Cytosin und fehlerhaft mit Adenin gleich gut paart, ohne, im Gegensatz zu Thyminglycol, die DNS-Polymerase zu beeinflussen. Es kommt zu einer G-T Transversion, die als prämutagener DNS-Schaden anzusehen ist. (Cheng et al., 1992; Le Page et al., 1998). 8-Hydroxyguanin ist das häufigste Produkt eines UVA-induzierten DNS-Schadens (Zhang et al., 1997). Auch der UV-induzierten Modifikation von Proteinen kommt eine wichtige Rolle in Bezug auf die Regulation zellulärer Prozesse zu. So können sie Signale für andere Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren darstellen und damit Signaltransduktionsprozesse und die Genexpression entscheidend beeinflussen (Abts et al., 1997; Ryter und Tyrrel, 1998).

2.2.3 Endogene Schutz- und Reparaturmechanismen vor UV-Strahlung

Die Haut verfügt über verschiedene Mechanismen, um sich vor einwirkenden UV-Strahlen zu schützen und die Integrität der Zellen zu gewährleisten. Es kommt nach UV-Bestrahlung zu verstärkter **Pigmentierung** der Haut, sowie zu **Akanthose** und **Hyperkeratose** der Epidermis (s. Kap. 2.2.1, *Ultraviolette Strahlung und ihre biologische Wirkung auf die Haut*).

Einen weiteren Schutzmechanismus bilden **antioxidative Enzyme**, wie z.B. Superoxiddismutase, Katalase und Gluthation-Peroxidase, die reaktive Sauerstoffspezies zu unschädlichen Metaboliten reduzieren. Auch endogene **nicht-enzymatische Antioxidantien** vermögen freie Radikale abzufangen. Genannt seien hier Gluthation, Ascorbat, α -Tocopherol, β -Carotin, Ubichinol und Urokaninsäure. Letztere wird nach UV-Einwirkung vermehrt aus Histidin im Stratum corneum synthetisiert und nachfolgend isomerisiert (Abeck und Stüb, 1996). Urokaninsäure wirkt somit als UV-Absorber. Ob allerdings die natürlicherweise in der Haut vorkommende Menge einen wirksamen UV-Schutz bietet, ist derzeit noch nicht geklärt. Weiterhin wird vermutet, dass cis-Urokaninsäure sowohl ein Signalmolekül für die Auslösung der UV-induzierten

2 Grundlagen

Immunsuppression darstellt (Noonan und de Fabo, 1992; Beisert et al., 1997) als auch Singulett-Sauerstoff fangende Eigenschaften besitzt (Morrison, 1985).

Bereits entstandene DNS-Schäden führen zur Aktivierung eines umfassenden Reparatur-Systems, bestehend aus verschiedenen Mechanismen und einer Vielzahl von Enzymen.

Die **Nukleotid-Exzisionsreparatur** stellt einen komplexen Mechanismus von ineinandergreifenden Enzymsystemen zur Beseitigung dimerer Photoprodukte dar. UV-Licht induzierte Pyrimidin-Dimere werden zusammen mit einigen benachbarten Nukleotiden des gleichen Strangs durch neu synthetisierte intakte Sequenzen ersetzt, denen der komplementäre DNS-Strang als Vorlage dient. Im Gegensatz zur semikonservativen Replikation bezeichnet man diese Wiederherstellung einer intakten DNS als unprogrammierte Synthese. Sie findet in der G₁- und G₂-Phase des Zellzyklus statt. Defekte in diesem Enzym-System führen zu exzessiver Entwicklung UV-induzierter Hautkarzinome, wie man sie bei Xeroderma pigmentosum, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung mit einem Defekt der UV-spezifischen Endonuklease sieht. Die Nukleotid-Exzisionsreparatur greift jedoch nicht nur spezifisch bei UV-Licht induzierten Veränderungen, sondern tritt auch bei verschiedenen chemischen oder strahlungsbedingten DNS-Schäden in Aktion.

Bei der **Basen-Exzisionsreparatur** werden dagegen nur spezifisch einzeln modifizierte Basen aus dem DNS-Strang durch spezielle DNS-Glykosylasen eliminiert und die entstandene Lücke durch eine korrekte Base mittels einer DNS-Polymerase ersetzt (Griffiths et al., 1998).

Bei der **Photoreaktivierung** handelt es sich um eine „light repair“-Reaktion. Kommt es nach einer UV-Exposition zu einer weiteren Bestrahlung mit Wellenlängen zwischen 300 und 600 nm, können entstandene Cyclobutan-Dimere und (6-4)-Photoprodukte mittels spezifischer Photolyasen eliminiert werden (Macher et al., 1993).

Durch UVB-Bestrahlung, insbesondere Wellenlängen zwischen 295 und 305 nm, kommt es zu einem **Zell-Zyklus-Arrest** in der S und G₂/ M Phase, der vermutlich durch die Entstehung von Pyrimidin-Dimeren ausgelöst wird und so dem Fortschreiten der Replikation vorbeugt (Weller et al., 1996). Auch das Tumorsuppressorgen p53 wird nach einer intensiven UVB Bestrahlung verstärkt exprimiert. Es induziert einen G₁-Arrest und gewährleistet auf diese Weise die

2 Grundlagen

Möglichkeit für eine Schadensbehebung, bevor die Replikation der DNS in der S-Phase stattfindet (Smith et al., 1995; Wang et al., 1998). Hat eine irreversible Schädigung der DNS stattgefunden führt die Aktivierung von p53 zur Apoptose der modifizierten Zelle (Henseleit et al., 1997) und damit zum Schutz des Organismus vor maligner Entartung.

2.3. Nachweisverfahren für UV-vermittelte DNS-Schäden

Zum Nachweis von UV-vermittelten DNS-Schäden wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die im folgenden kurz skizziert werden sollen:

- Antikörpermarkierung

Mit Hilfe der Antikörpermarkierung ist der Nachweis von DNS-Photoprodukten möglich. Gezielte histologische Schnitte erlauben die Lokalisierung von DNS-Schäden in verschiedenen Hautarealen und Zelltypen. Es besteht die Möglichkeit mit dieser Methode topische Wirkungsmechanismen zu untersuchen (Mitchell und Karentz, 1993).

- Comet-Assay

Der Comet-Assay ist eine Methode zum Nachweis von Doppel- und Einzelstrangbrüchen, sowie alkalilabilen Stellen. Die jeweiligen Zellen werden in ein Agarosegel eingebettet und fixiert, anschließend durch ein Detergenz lysiert, so dass der Zellkern vom Cytoplasma befreit wird. Durch die Inkubation in einem alkalischen Puffer erfolgt die partielle Entwindung der DNS unter Auftrennung in die Einzelstränge. Die im Anschluss folgende Elektrophorese lässt die DNS-Fragmente aus dem Zellkern wandern. Dies ergibt ein kometenähnliches Bild. Die jeweilige Schweiflänge entspricht hierbei dem Schadensumfang der DNS (Ostling et al., 1984; Singh et al., 1988; Lehmann et al., 1998).

- Unscheduled DNS Synthesis (UDS)

Im Gegensatz zum Comet-Assay, der auf radioaktive Substanzen verzichtet, basiert die UDS-Methode auf einer autoradiographischen Bestimmung. Durch

2 Grundlagen

den Einbau von Tritium-Thymidin in die DNS während der Reparatur lassen sich Reparaturprozesse detektieren und somit verfolgen (Tice et al., 1990).

- Alkalische Elution

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis von Einzelstrangbrüchen ist die alkalische Elution. Mit Hilfe eines Membranfilters werden DNS-Fragmente getrennt. Die Geschwindigkeit hängt hierbei von der Größe der DNS-Fragmente ab, kleinere können schneller eluiert werden als größere DNS-Fragmente. Auf diese Weise kommt es zu einer Trennung in verschiedene Fraktionen (Singh et al., 1989).

- Chromatographische Methoden

Auch chromatographische Verfahren erlauben die Detektion von Photoprodukten, wie z.B. dem 8-Hydroxyguanin (Stewart et al., 1996).

- Mikronukleustest

Der Mikronukleustest spielt bei der Beurteilung von toxischen Agenzien *in vivo* und *in vitro* eine wichtige Rolle. Die Induktion von Mikronuklei korreliert mit dem genotoxischen Potential des jeweiligen Agens (Romagna, 1993). Für die Erfassung genotoxischer Effekte von UV-Strahlung wurde er bisher nur selten angewandt (Weller et al., 1996; Keulers et al., 1998).

2.4 Mikronukleustest

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mikronukleustest handelt es sich um einen Zelltest zum Nachweis von chromosomalen Schädigungen. Ein Mikronukleus ist eine aus Chromatin aufgebaute intrazelluläre Struktur, die nur einen Bruchteil der normalen Größe eines Zellkerns aufweist und wie dieser eine eigenständige Zellmembran besitzt. Er wird in der Regel in Zellen gebildet, die sich in der Mitose befinden und enthält ganze Chromosomen oder auch nur Fragmente, die bei der Zellteilung nicht in eine der beiden Tochterzellen integriert wurden. In der darauffolgenden Interphase kondensieren die zurückgebliebenen Chromosomenstrukturen zu einem oder mehreren Mikrokernen, die sich mit DNS-Farbstoffen

2 Grundlagen

nachweislich anfärben lassen. Nach abgeschlossener Mitose können beide oder nur eine Zelle mikronukleushaltig sein. Eine derartige Zelle hat ihren biologischen Endpunkt erreicht und ist nicht länger teilungsfähig.

Zur Bildung von Mikronuklei kommt es durch eine irreparable zygotenetische Schädigung. Diese kann sowohl von außen induziert als auch durch eine spontane Mutation hervorgerufen sein. Diese spontan entstandenen Mikronuklei werden im Rahmen des Mikronukleustests als Spontanrate in unbehandelten Kontrollgruppen erfasst. Die Spontanrate ist ein Maß für die Empfindlichkeit und genetische Stabilität einer Zellkultur. Durch sie erhält man einen Ausgangswert, anhand dessen die Ergebnisse des Mikronukleustests beurteilt werden können. Ähnliche Strukturen können auch während der Apoptose, dem programmierten Zelltod einer Zelle entstehen. Hier zeigt sich zu Beginn eine Auflösung der Kernstruktur in viele kleinere Fragmente, die mikroskopisch betrachtet an Mikronuklei denken lassen, jedoch Ausdruck des fortschreitenden Zellerfalls sind (Romagna, 1993; Boone et al., 1994; Stopper et al., 1997).

Evans und Mitarbeiter unternahmen 1959 erstmals Versuche, die Mikronukleusbildung für den Nachweis mutagener Wirkungen einzusetzen (Evans et al., 1959). Die Anfänge des Mikronukleustests (MNT) reichen in die 70er Jahre zurück, als die Korrelation zwischen Induktion von Mikronuklei und dem genotoxischen Potential von Agenzien erkannt wurde (Schmid, 1975; Fritzenschaf et al., 1993). Unabhängig voneinander erkannten Schmid (1975) und Heddel (1973) die Auszählung von Mikronuklei, auch bekannt als Howell-Jolly Körperchen in der Hämatologie, als einfache Alternative, um chromosomale Schäden zu erfassen. Im Laufe der Jahre wurde der Mikronukleustest in vieler Hinsicht modifiziert und an verschiedenen Zellen durchgeführt, wobei häufig Lymphozyten aufgrund ihrer Empfindlichkeit und schnellen Kultivierbarkeit verwendet werden (Tsai et al., 2001; Venkatachalam et al., 1999; Keulers et al., 1998; Fenech et al., 1985). Der Test ist sehr variabel in seinen Versuchsparametern und kann mit unterschiedlichsten Zellarten durchgeführt werden. Fenech und Morley untersuchten an humanen Lymphozyten die Mikronukleusentstehung in Abhängigkeit vom Alter der Probanden und in weiteren Versuchen von der Bestrahlungsdosis bei Röntgenstrahlen (Fenech und Morley, 1986). Dabei beobachteten sie eine Zunahme von Mikronuklei in Abhängigkeit von beiden Parametern. Weiterhin erforschte Fenech auf diesem Wege die Korrelation

2 Grundlagen

zwischen einer Mikronukleusentstehung und verschiedenen Parametern, wie z.B. den Blutplasmawerten von Vitamin C, E, B12 und Folsäure (Fenech et al., 1994), der Abhängigkeit von vegetarischer Ernährung (Fenech et al., 1995), den Blutplasmawerten von Homocystein (Fenech et al., 1998) und nutzte den Mikronukleustest zur Aufdeckung von chromosomalen Schäden (Umegaki und Fenech, 2000). Somit werden immer weitere Bereiche für diesen Test erschlossen und seine Reproduzierbarkeit durch Anwendung in unabhängigen Laboratorien erwiesen. Der Mikronukleustest besticht durch seine einfache Durchführbarkeit und den niedrigen Kostenaufwand. Er kann *in vivo* und *in vitro* angewendet werden und ermöglicht die quantitative Beurteilung genotoxischer Schäden. Heute gehört er im Rahmen der Mutagenitätsforschung zu den am häufigsten eingesetzten Nachweismethoden und ist essentieller Bestandteil der genetischen Toxikologie.

2.4.1 Zytokinese-Block-Technik

Die Zytokinese-Block-Technik stellt eine Weiterentwicklung des Mikronukleustests dar. Mit der herkömmlichen Technik wurden alle entstandenen Mikronuklei erfasst, also auch solche, die nicht durch eine genotoxische Behandlung, sondern durch ein vorheriges Ereignis hervorgerufen wurden. Eine Differenzierung der Mikronuklei bezüglich ihrer Entstehungsursache war nicht durchführbar. Mit der von Fenech und Morley entwickelten Zytokinese-Block-Technik wurde es möglich, nur die Mikronuklei zu erfassen, die durch eine genotoxische Einwirkung verursacht wurden (Fenech, 1996). Damit konnte eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit des Mikronukleustests erreicht werden. Die Zytokinese-Block-Technik basiert auf einer Modulation der Zellteilung. Im Anschluss an eine genotoxische Behandlung werden die Zellkulturen mit Cytochalasin-B versetzt (s. *Abb. 4 und 5*), einer Substanz, die die Zytoplasmateilung einer Zelle während der Mitose hemmt.

2 Grundlagen

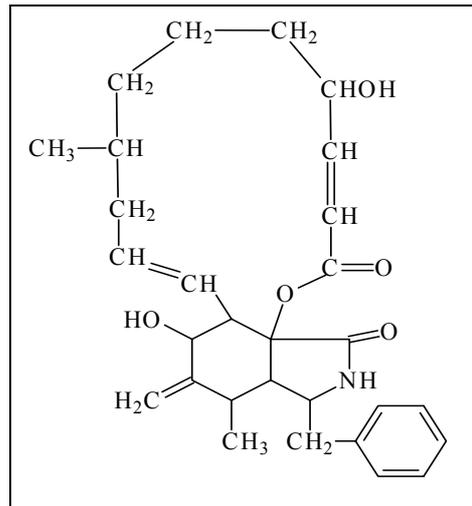


Abbildung 4.: Strukturformel Cytochalasin-B

Anschließend kann lediglich noch eine Endomitose ablaufen, bei welcher Zellen mit zwei Zellkernen resultieren, sogenannte binukleate Zellen. Auf diese Weise können alle Zellen, die post expositionell eine Mitose vollenden, sichtbar gemacht werden und die in ihnen entstandenen Mikronuklei zur Auswertung kommen.

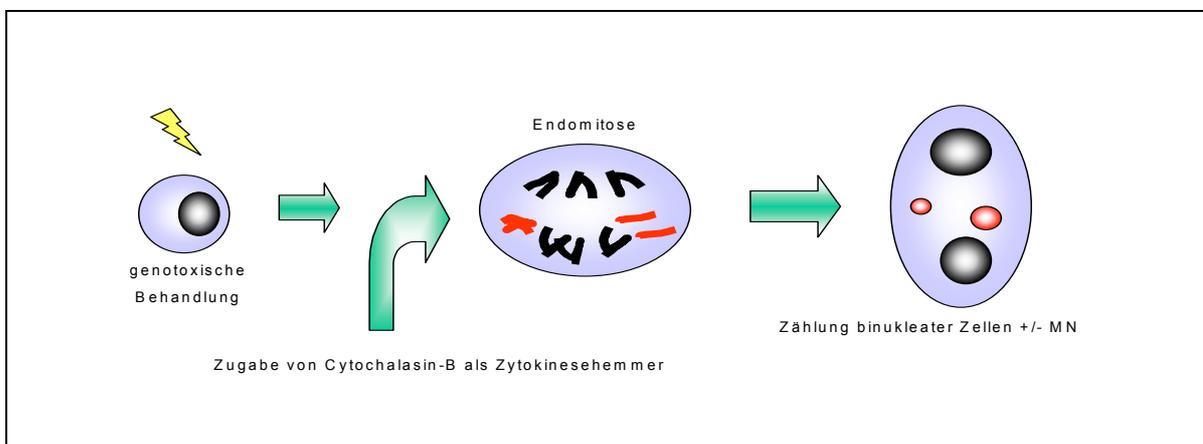


Abbildung 5: Endomitose unter Cytochalasin-B Einwirkung

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass die optimale Konzentration von Cytochalasin-B stark vom jeweiligen Zelltyp abhängt. So konnte für humane Lymphozyten eine optimale Cytochalasin-B Konzentration von 3 bis 3,5 µg/ml (Fenech und Morley, 1985 a; Vral et al., 1994), für Maus-Splenozyten 4,5 µg/ml (Dreosti et al., 1990) und für HaCaT Keratinozyten 4 µg/ml (Strodtholz, 1997) ermittelt werden. Daher besteht die Notwendigkeit der Bestimmung der optimalen Cytochalasin-B Konzentration für den jeweils angewendeten Zelltyp.

2 Grundlagen

Die Zytokinese-Block-Technik gewährleistet weiterhin Einblick in die mitotische Aktivität einer Zellkultur und erlaubt die Berechnung des NDI (Nuclear Division Index). Er lässt sich durch den Anteil der durch Endomitose entstandenen binukleaten Zellen an der Gesamtzellzahl ermitteln.

$$\text{NDI} = \frac{M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)}{N}$$

*Abb. 6: Formel zur Berechnung des NDI
M1-4 : Anzahl der Zellen mit 1-4 Zellkernen
N : Anzahl der insgesamt ausgewerteten Zellen*

Sein Wert liegt üblicherweise im Bereich von $1 \leq \text{NDI} \leq 2$, unter der Berücksichtigung, dass die Inkubationszeit von Cytochalasin-B ungefähr der Populationsverdopplungszeit entspricht. Durch die Bestimmung des NDI ist es möglich, die Vitalität einer Zellkultur unter genotoxischer Behandlung zu eruieren und sicherzustellen (Fenech, 1996).

2.4.2 Kriterien zur Identifizierung von Mikronuklei

Um eine einheitliche und reproduzierbare Auswertung des Mikronukleustests zu gewährleisten, seien im folgenden einige Kriterien aufgeführt, die allgemeine Anwendung bei verschiedenen Forschungsgruppen fanden (Countryman und Heddle, 1976; Fenech, 1996):

Kriterien zur Erfassung von Mikronuklei:

- Der Durchmesser eines MN beträgt ca. 1/3 bis 1/16 des Zellkerns
- Der MN ist nicht fragmentiert und kann so sicher von Artefakten und freien Partikeln unterschieden werden

2 Grundlagen

- MN müssen separat ohne Verbindung zum Zellkern im Zytoplasma vorliegen, dürfen diesen jedoch überlappen
- MN müssen in ihrer Farbintensität der des Zellkerns gleichen oder sogar heller sein
- MN werden nur in binukleaten Zellen erfasst
- Die zwei Kerne einer binukleaten Zelle müssen in etwa die gleiche Größe besitzen
- Nur einwandfrei gefärbte und vollständig von Zytosol umgebene Zellen werden ausgewertet
- Es werden lediglich Zellen mit zwei MN berücksichtigt (andernfalls könnte sie mit einer apoptotischen Zelle verwechselt werden)

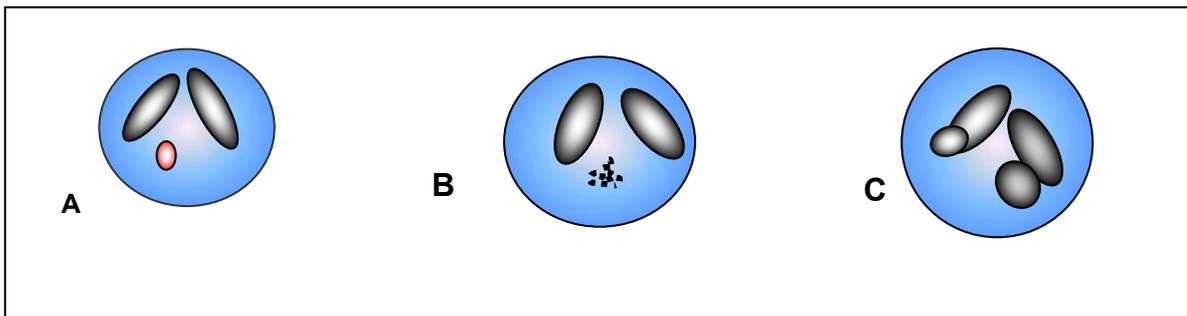


Abb. 7: Beispiele für binukleate Zellen, die nicht die Kriterien für auswertbare Zellen für die Zytokinese-Block-Technik erfüllen. (A) Trinukleate Zelle. Roter Kern ist für einen MN zu groß. (B) Region mit zu kleinen und zu vielen Objekten. (C) Kernausstülpungen (nuclear blebs). Die Objekte liegen nicht separat.

3 Material und Methoden

3.1 Zellen

Die Studien dieser Arbeit wurden an primär isolierten humanen Keratinozyten durchgeführt, kurz NHEK-Zellen genannt. Sie konnten aus Hautresten von spindelförmigen Exzidaten, denen für eine dermatohistopathologische Aufarbeitung keine Bedeutung zukam, gewonnen und erfolgreich bis zur dritten Passage kultiviert werden (s. Kap. 3.2.1, *Isolierung von primären Keratinozyten aus Hautbiopsien*). Bei höheren Passagen sinkt die mitotische Aktivität der Zellen. Unter diesem Gesichtspunkt fanden nur Zellen der ersten bis dritten Passage Verwendung für die Versuchsreihen.

Zur Gewährleistung der korrekten Zuordnung von Spenderzellen zu Versuchsergebnissen und deren Auswertbarkeit bekam jede Kultur ihren eigenen Code, den Probandenschlüssel. Dieser gibt Aufschluss über den Tag der Entnahme der Zellen im Jahre 1999, das Alter des jeweiligen Spenders und sein Geschlecht.

Beispiel: P 1711-25w

P	(Proband/Spender)
1711	(Datum: 17.11.1999)
25	(Alter: 25)
w	(Geschlecht: weiblich)

3.2 Zellkulturtechnik

Die Zellkulturen wurden in 30 mm durchmessenden Petrischalen (Greiner) im Brutschrank (Heraeus) kultiviert. Die optimale Temperatur für Keratinozyten beträgt 37 °C bei einer CO₂ - Konzentration von 7,5 %. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden sämtliche Arbeitsschritte, die die Zellkultur betrafen, in einer sterilen Sicherheitsbank (Heraeus, Sicherheitsklasse II) durchgeführt. Dazu gehörte die Isolierung der Keratinozyten aus Hautexzidaten, die Passage und Einsaat von Zellkulturen, die Cytochalasin-B Behandlung sowie das Ansetzen von Nährmedium und allen weiteren in dieser Studie verwendeten Substanzen.

3 Material und Methoden

Für die Zellkultur benötigte Zellkulturmedien:

- Zellkulturmedium für HaCaT-Zellen:

500 ml DMEM (Gibco BRL, 41966-029)

10 ml L-Glutamin, 200 mM (Sigma, G 7513) (in Lsg. = 4 mM)

55 ml fötales Kälberserum (FCS)

(Boehringer Mannheim, 210471) (in Lsg.= 10 %)

3 ml Gentamycin, 10 mg/ml (Gibco BRL, 15710-049) (in Lsg. = 1:190)

- Zellkulturmedium (KGM-2) für primäre Keratinozyten (NHEK):

500 ml KBM-2, 0,15 mM Ca⁺⁺ (Clonetics CC-4131)

2 ml BPE, 100 ng/ml (Clonetics CC-4002)

500 µl EGF, 0,1 µg/ml (Clonetics CC-4015)

500 µl bovines Insulin, 5 mg/ml (Clonetics CC-4021)

500 µl Hydrocortison, 0,5 mg/ml (Clonetics CC-4031)

500 µl Gentamycin (Clonetics CC-4081)

3.2.1 Isolierung von primären Keratinozyten aus Hautbiopsien und Bestimmung der Spontanraten

Im folgenden wird die dermo-epidermale Trennung und die Isolierung von primären Keratinozyten beschrieben. Im Rahmen des Mikronukleustests schließt sich an die Isolierung und Einsaat der Keratinozyten die Bestimmung der Spontanrate an. Jede Keratinozyten Kultur wurde ohne vorherige Kultivierung vor Beginn der Testreihen auf vorhandene Mikronuklei untersucht. Von 30 Probanden gehörten 17 dem männlichen und 13 dem weiblichen Geschlecht an. Bei beiden Gruppen war jedes Lebensjahrzehnt bis zum Alter von 70 Jahren erfasst.

3 Material und Methoden

Arbeitslösungen für die Isolierung von primären Keratinozyten und Bestimmung der Spontanrate:

- Gentamycin / PBS⁻ Waschlösung

Für die Waschlösung wurde Gentamycin (Gibco, 15710-049) in PBS⁻ im Verhältnis 1:100 verdünnt

- Dispase

Die Dispase-Lösung (30 U/mg, Boehringer Mannheim, 1284908) wurde ali-quotiert und bei - 20 °C gelagert. 5 mg Dispase wurden in 1 ml H₂O gelöst und mit 11,5 ml PBS⁻ verdünnt (2,4 U/ml)

- FCS-haltiges Zellkulturmedium (HaCaT-Zellkulturmedium, s. Kap. 3.2, Zellkulturtechnik)

- KGM-2 Medium (s. Kap. 3.2, Zellkulturtechnik)

- 0,1 % ige Na₂ (EDTA)-Lösung (s. Kap. 3.2.2, Passage von Zellkulturen)

- 0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA- Lösung (s. Kap. 3.2.2, Passage von Zellkulturen)

- DAPI-Färbelösung (s. Kap. 3.3, Mikronukleustest)

- Mowiol Eindeckmedium (s. Kap. 3.3, Mikronukleustest)

Arbeitsgänge für die dermo-epidermale Isolierung und Bestimmung der Spontanrate:

- Aufbereitung der Hautproben

Aus Randbereichen von spindelförmig entnommenen melanozytären Naevi wurden die für die histopathologische Aufarbeitung bedeutungslosen Hautanteile direkt im Operationssaal mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und in ein Greiner Röhrchen mit 5 ml HaCaT-Medium überführt. Es erfolgte ein sofortiger Transport der Hautproben vom Operationssaal ins Labor. Hier fand unter der

3 Material und Methoden

Sicherheitsbank mit Hilfe steriler Instrumente zunächst eine Abpräparation der Subkutis statt. Größere Proben wurden in Fragmente von ca. 0,5 cm geschnitten. Anschließend erfolgte eine Überführung in ein mit 5 ml Gentamycin / PBS⁻-Lösung gefülltes Greiner Röhrchen.

- Waschvorgang

Die aufbereiteten Hautproben wurden dreimal für jeweils 10 min in Gentamycin / PBS⁻-Lösung gewaschen und so von Blutresten und Verunreinigungen befreit. Gentamycin wurde der Waschlösung zum Schutz vor Kontamination zugegeben.

- Enzymatische dermo-epidermale Trennung

Die enzymatische Trennung von Epidermis und Dermis wurde durch Einwirkung von Dispase erreicht. In eine 24-Napf-Platte (Greiner) wurde pro Napf 200 µl kalte Dispase-Lösung pipettiert und jeweils ein Hautstück in einen gefüllten Napf überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Hautproben mit dem epidermalen Anteil in die Dispase eintauchten, um eine kontinuierliche Einwirkung an der dermo-epidermalen Junctionszone zu gewährleisten. Die Inkubation betrug in der Regel ca. 20 h bei einer Temperatur von 4 °C. Nach erfolgter Einwirkungszeit der Dispase konnte die Epidermis vorsichtig mit sterilen Pinzetten von der Dermis getrennt werden.

- EDTA-Behandlung

Jedes einzelne Epidermisfragment wurde separat in ein Greiner-Röhrchen überführt und mit 2 ml Na₂(EDTA)-Lösung für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (Heraeus, Megafuge 1,0 R) bei 1200 U / min für 10 min. Anschließend konnte die EDTA-Lösung vorsichtig dekantiert werden.

- Trypsin Behandlung

Die Trypsin Behandlung führte zur enzymatischen Separierung der Keratinozyten aus ihrem Zellverband. In das Greiner-Röhrchen wurde 1 ml Trypsin / EDTA-

3 Material und Methoden

Lösung pipettiert und eine kurze Durchmischung auf dem Vortexer (Heidolph, Reax top) vorgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 10 min. Nach 5 und 8 min wurde das Röhrchen erneut kurz kräftig geschüttelt. Anhand des Trübungsgrades ließ sich die Vereinzelnung der Zellen ablesen. Die enzymatische Wirkung des Trypsins wurde durch die 5 -fache Menge FCS-haltigen HaCaT-Mediums gestoppt. Zellfreie, teilweise noch vorhandene Epidermisreste wurden vor der Abzentrifugation des Greiner-Röhrchens bei 1200 U / min entfernt.

- Einsatz und Kultivierung

Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml frischem KGM-2-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Zählkammer (Neubauer) unter dem Elektronenmikroskop ausgezählt und etwa in einer Konzentration von 8×10^4 Keratinozyten in eine 30 mm durchmessenden Napf (Greiner) mit 2 ml KGM-2-Medium eingesät. Für eine erfolgreiche Kultivierung benötigten die Zellen eine Temperatur von 37 °C im Brutschrank und für die ersten zwei Tage absolute Ruhe. Der erste Mediumwechsel erfolgte frühestens nach 2 Tagen und die erste Passage nicht bevor eine Konfluenz von 40 - 50 % erreicht wurde.

- Bestimmung der Spontanrate

Nach der oben beschriebenen Zentrifugation und Resuspension mit KGM-2 Medium kann an Stelle der Einsaat der Zellen in eine Kultur ebenso die Ermittlung der Spontanrate erfolgen. Hierzu wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension in einen speziellen Zytospin-Einsatz pipettiert. Eine 10 minütige Zentrifugation bei 1800 U/min führte zu einer Aufspreitung der Keratinozyten auf einen Objekt-träger. Die nachfolgenden Arbeitsschritte, beginnend mit der Färbung der Zellkerne, sind identisch mit denen des Mikronukleustest (s. Kap. 3.3, Mikronukleustest, ab "Färbung der Zellkerne"). Für die Bestimmung der Spontanrate wurden ebenfalls 2000 binukleate Keratinozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein von Mikronuklei geprüft.

3 Material und Methoden

3.2.2. Passage von Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden täglich bzw. zwei Tage nach der Isolierung und Ersteinisat mikroskopisch auf ihr Wachstum hin kontrolliert. Der Zeitpunkt der Passage richtete sich nach der Konfluenz der Zellkultur. Bei NHEK-Zellen sollte sie 50 – 60 % nicht überschritten haben, da es bei zunehmender Konfluenz zu einer Abnahme der Proliferationsrate kam. Für die erfolgreiche Durchführung des Mikronukleustests war eine stark proliferierende Zellkultur eine entscheidende Voraussetzung. Die erste Passage einer Zellkultur konnte im Durchschnitt nach zehn bis zwölf Tagen durchgeführt werden. Weitere folgten in einem Rhythmus von ca. drei bis vier Tagen.

Arbeitslösung für die Passage:

- 0,1 % ige Na₂(EDTA)-Lösung (Sigma, E5134) in PBS⁻ (phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca⁺⁺/ Mg⁺⁺, PAA H15-001) angesetzt und mit Hilfe eines 0,22 µm Filters (Millipore, SCGS 10012) steril filtriert. Diese Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- 0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA-Lösung (Gibco, 35400-027) wird mit PBS⁻ 1:5 verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.
- FCS-haltiges Zellkulturmedium (HaCaT-Zellkulturmedium, s. *Kap. 3.2, Zellkulturtechnik*)

Arbeitsgänge für die Passage von Zellkulturen:

Die genannten Mengenangaben sind auf 25 cm² Kulturflaschen zu beziehen. Für 75 cm² Kulturflaschen wurde die Doppelte und für 30 mm durchmessende Petrischalen die Hälfte der angegebenen Menge benutzt.

- Abpipettieren des Zellkulturmediums

3 Material und Methoden

- Zugabe von 2 ml vorgewärmter Na₂(EDTA)-Lösung und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 8 min

Die EDTA-Behandlung labilisierte und löste die Zell-Zellkontakte der Keratinozyten durch Chelatbildung, bei welcher zweiwertige Ionen, wie z.B. Ca⁺⁺, abgefangen wurden. Im Lichtmikroskop ließ sich dieser Vorgang anhand der zunehmend lichtbrechenden Zellränder verfolgen und kontrollieren. Nach einer Inkubationszeit von 8 min wurde die EDTA-Lösung abpipettiert.

- Zugabe von 1 ml Trypsin / EDTA-Lösung

Die Trypsin/EDTA-Lösung führte zur Lösung der Keratinozyten vom Kulturflaschenboden. Die Inkubationszeit wurde hierbei durch die Geschwindigkeit der kompletten Ablösung der Zellen bestimmt und konnte mit bloßem Auge anhand einer zunehmenden Trübung der Flüssigkeit beobachtet werden. Zusätzlich wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. In der Regel betrug die Dauer dieses Prozesses 2 - 3 min unterstützt durch ein vorsichtiges seitliches Beklopfen der Kulturflasche.

- Zugabe von 5 ml FCS-haltigem HaCaT-Medium

Um die enzymatische Wirkung des Trypsins zu beenden, wurden 5 ml des FCS-haltigen HaCaT-Mediums zur Zellsuspension zugegeben. FCS konkurrierte mit Trypsin im Sinne einer kompetitiven Hemmung. Durch Resuspension mittels einer Pipette erfolgte eine vollständige Lösung der Zell-Zellkontakte.

- Bestimmung der Zellanzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der Zellsuspension mit einer Eppendorf Pipette abgenommen und in einer Zählkammer (Fuchs-Rosenthal) durch mikroskopische Auszählung bestimmt. In eine 25 cm² Kulturflasche erfolgte die Einsaat von ca. $2,5 \times 10^5$ Zellen.

3 Material und Methoden

- Zentrifugation

Die restliche Zellsuspension wurde in ein Greiner Röhrchen überführt und 10 min bei 1200 U / min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der berechneten Verdünnung mit frischem Medium aufgefüllt und resuspendiert.

- Einsaat

Abschließend wurde die berechnete Menge der neu erstellten Zellsuspension in eine sterile Zellkulturflasche pipettiert und mit Medium aufgefüllt (in einer 25 cm² Zellkulturflasche befanden sich schließlich 5 ml, in einer 75 cm² Zellkulturflasche 15 ml und in einer 35 mm Petrischale 2 ml).

3.3 Mikronukleustest

Der Mikronukleustest ermöglicht den Nachweis von DNA Schädigungen in Form von Mikronuklei, die durch Färbung sichtbar und mikroskopisch auswertbar gemacht wurden. Um den Mikronukleustest in seiner erweiterten Form als Zytokinese-Block-Technik an humanen Keratinozyten zu etablieren, erfolgte zu Beginn die Ermittlung der optimalen Konzentration von Cytochalasin-B. Die Zytokinese-Block-Technik gewährleistete weiterhin Einblick in die Proliferationsrate der Zellkultur und erlaubte die Berechnung des NDI (Nuclear Division Index).

Arbeitslösung für den Mikronukleustest:

- FCS-haltiges Zellkulturmedium (HaCaT-Zellkulturmedium, s. Kap. 3.2.2, *Passage von Zellkulturen*)
- KGM-2 Medium
- 0,1 % ige Na₂(EDTA)-Lösung (s. Kap. 3.2.2, *Passage von Zellkulturen*)

3 Material und Methoden

- 0,5 % ige Trypsin / 0,2% ige EDTA-Lösung (s. Kap. 3.2.2)
- Cytochalasin-B Stammlösung:
1 mg Cytochalasin-B (Cyt-B) (Sigma C6762)
500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck 2950.0500)

Aufgrund der hohen Toxizität von Cytochalasin-B wurde das Dimethylsulfoxid durch eine Einwegspritze zugegeben. Die Lösung wurde steril in Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf, 3810) aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

- DAPI-Färbelösung:
50 mg DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydro-chlorid) (Sigma, D9542)
100 ml PBS⁻ (Gibco BRL, 14040-091)

Die so entstandene 0,5 mg / ml DAPI-Stammlösung wurde aliquotiert und bei 4 °C gelagert.

- Mowiol Eindeckmedium:

1g Mowiol (Aldrich, 32,459) wurde in 3 ml PBS⁻ unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung wurde die Lösung auf 0,02 % NaN₃ (Merck, 6688) zur Konservierung eingestellt und zur Entfernung von Luftblasen einige Stunden bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Arbeitsgänge für den Mikronukleustest mit Zytokinese-Block-Technik:

- Einsatz der Zellen

Für den Mikronukleustest wurden in der Regel 35 mm durchmessende Petrischalen mit ca. 5 - 8 x 10⁴ Zellen / Schale eingesät. Erreichten die Keratinozyten eine Konfluenz von etwa 50 - 60 % konnte mit dem Test begonnen werden.

3 Material und Methoden

- UV-Bestrahlung

Die UV-Bestrahlung der Keratinozyten erfolgte in 35 mm durchmessenden Petrischalen. Zuvor wurde das Zellkulturmedium abpipettiert und durch 2 ml EBSS⁻ ersetzt. Die Kulturschalen wurden ohne Deckel nach einem definierten Protokoll (s. *Kap. 3.4, Dosiometrie und Bestrahlung*) in bzw. unter der jeweiligen Bestrahlungseinheit positioniert und bestrahlt.

- Inkubation mit Cytochalasin-B

Nach der Bestrahlung wurde EBSS⁻ abpipettiert und durch 2 ml KGM-2-Medium mit einem Zusatz von 2 µg/ml Cytochalasin-B ersetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 37 °C im Brutschrank.

Die optimale Konzentration von 2 µg / ml Cytochalasin-B wurde zuvor in einer Verdünnungsreihe ermittelt. Für die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve bei humanen Keratinozyten wurden diese für 24 h mit unterschiedlichen Cytochalasin-B Konzentrationen (0; 1; 2; 3; 4; 6 und 8 µg/ml) inkubiert. Nach anschließender Aufarbeitung und Anfärbung mit DAPI-Lösung wurden jeweils 1000 Zellen auf das Verhältnis mono- zu binukleat hin überprüft.

- Abtrypsinierung der Keratinozyten

Die enzymatische Vereinzelung erfolgte wie beschrieben (s. *Kap. 3.2.2, Passage von Zellkulturen*). Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und mit HaCaT-Medium bis auf 15 ml aufgefüllt. So erhielten die Zellen bei der nachfolgenden Zentrifugation von 10 min bei 1200 U/min bereits eine Vorwaschung.

- Konzentrationseinstellung und Aufspaltung der Zellen auf Objektträger

Nach der Zentrifugation erfolgte die Konzentrationseinstellung mit KGM-2 Medium (s. *Kap. 3.2.2*). Als optimal erwies sich hierbei eine Zellzahl von 4×10^4 Zellen in 100 µl pro Objektträger. Die Aufspaltung der Keratinozyten auf den Objektträger erfolgte in der Zentrifuge mit speziellen Zytospin Einsätzen für 10 min bei 1800 U/min. Die Einsätze ermöglichten pro Objektträger zwei Aufspaltungspools. Nach

3 Material und Methoden

dem abpipetieren des Flüssigkeitsüberstandes wurde die Dichte der Zellen mikroskopisch überprüft.

- Färbung der Zellkerne

Zunächst wurde der Objektträger an der Luft getrocknet. Die aufgespreitete Zellpopulation wurde dann mit einem Silikonstift (Dako-Pen, S2002) auf dem Objektträger umrandet, um eine Ausbreitung der Färbung auf dem gesamten Objektträger zu verhindern. Pro Zellareal wurden 200 µl DAPI Färbelösung mit einer Eppendorf Pipette aufgebracht. Die DAPI-Färbung benötigte eine Inkubationszeit von 20 min und sollte im abgedunkelten Raum erfolgen, um eine vorzeitige Anregung der Fluoreszenz zu vermeiden. Sie färbt nur spezifisch die DNA der Zellen an, so dass nur der Zellkern und die entstandenen Mikronuklei sichtbar wurden.

- Waschvorgang

Nach 20 min Einwirkungszeit der Färbung wurde die DAPI-Lösung schwingvoll abgeworfen. Es folgte ein Waschvorgang der Objektträger in einem Wasserbad (Leitungswasser) für ca. 10 min, um überschüssige Anteile der DAPI-Lösung zu entfernen. Auch dieser Vorgang fand im abgedunkelten Raum statt.

- Eindecken mit Mowiol-Lösung

Im trockenen Zustand konnten die Objektträger nun mit Mowiol eingedeckt werden. Dazu wurde mit einer Einmalpipette aus Kunststoff ca. 0,5 - 1 ml Mowiol Lösung auf den zuvor markierten Bereich des Objektträgers pipettiert und anschließend ein Deckglas aufgebracht. Die fertigen Objektträger wurden entweder sofort ausgewertet oder dunkel gelagert.

- Auswertung des Mikronukleustests

Die Zellkerne der Keratinozyten und die entstandenen Mikronuklei waren bei 400 - facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar. DAPI emittiert hellblaues Licht (480 - 490 nm) bei einer Fluoreszenzanregung von 360 nm. Die

3 Material und Methoden

Auswertung erfolgte durch Zählen von 2000 binukleaten Zellen, die auf das Vorhandensein von Mikronuklei anhand der beschriebenen Kriterien zur Identifizierung von Mikronuklei (s. Kap. 2.4.2, *Kriterien zur Identifizierung von Mikronuklei*) geprüft wurden.

Für die Bestimmung des Kernteilungsindex (NDI) wurden 200 Gesamtzellen gezählt und zwischen mono- und binukleat differenziert (s Kap. 2.4.1, *Zytokinese-Block Technik*).

3.4 Dosiometrie und Bestrahlung

Für die Bestrahlung der Keratinozyten mit UVB-Licht wurde ein genauer Bestrahlungsplan festgelegt. Um die unterschiedlichen Effekte der Breitband-UVB (280-320nm) gegenüber der Schmalspektrum-UVB (311nm) Bestrahlung zu untersuchen, wurden humane Keratinozytenkulturen von 15 verschiedenen Probanden, 7 weibliche und 8 männliche, des Hauttyps II und III ausgewählt und jeweils pro Proband in fünf 35 mm durchmessenden Petrischalen kultiviert. Jede Petrischale eines Probanden wurde je nur einmalig bestrahlt, mit nur einer der beiden UV-Strahler und nur einer bestimmten Dosis. So konnte jeder Proband mit unterschiedlichen Dosierungen der zwei Spektralbereiche exponiert werden und sowohl eine individuelle als auch untereinander vergleichende Auswertung der Ergebnisse gewährleistet werden. Die untersuchten Bestrahlungsdosen wurden unter dem Gesichtspunkt der minimalen erythemalen Dosis (MED), die bei Hauttyp II ca. 20 - 40 mJ / cm² liegt (Fitzpatrick, 1997), ausgewählt. Die Energiedosen im Schmalspektrum-UVB Bereich liegen dabei jeweils um eine Zehnerpotenz über denen der Breitband-UVB-Bestrahlung, wie es in der klinisch-therapeutischen Anwendung beider Wellenlängenbereiche in der Dermatologie der Fall ist.

Die Kontrolle der Lampenleistung und die Bestimmung der Bestrahlungsdosen erfolgte mit einem IL-1700 Radiometer, welches mit einer UVA und einer UVB Sonde ausgestattet ist. Die verschiedenen Bestrahlungsdosen wurden jeweils durch Veränderungen der Expositionszeiten erzielt. Um einen zeitlich konstanten Strahlenfluß zu gewährleisten wurde die Bestrahlungseinheit 30 min vor Testbeginn eingeschaltet.

3 Material und Methoden

Für die Berechnung der Dosis ergibt sich folgende Formel:

$$\text{Dosis (J / cm}^2\text{)} = \text{Leistungsfluss (W / cm}^2\text{)} \times \text{Zeit (s)}$$

3.4.1 Breitband-UVB-Bestrahlung

Die Testungen im Breitband-UVB Bereich wurden unter einem Sonnensimulator (SOL 500 S, Dr. Höhle) mit einem UVC Sperrfilter (H2 Kantenfilter) bei einem Strahlungsfluss von $0,128 \text{ mW/cm}^2$ in der Probenebene durchgeführt.

Die Emission beginnt bei 290 nm und reicht in den UVA Bereich hinein. Aufgrund der kurzen Expositionszeiten wurden die Keratinozyten nur einer vernachlässigbar geringen UVA Dosis ausgesetzt. Die Leistung wurde mit einer UV-Sonde (Dr. Höhle) bestimmt und durch den Abstand zwischen der Zellkultur und den Röhren des UV-Strahlers festgelegt. Dieser Abstand betrug bei der angegebenen Leistung 30 cm.

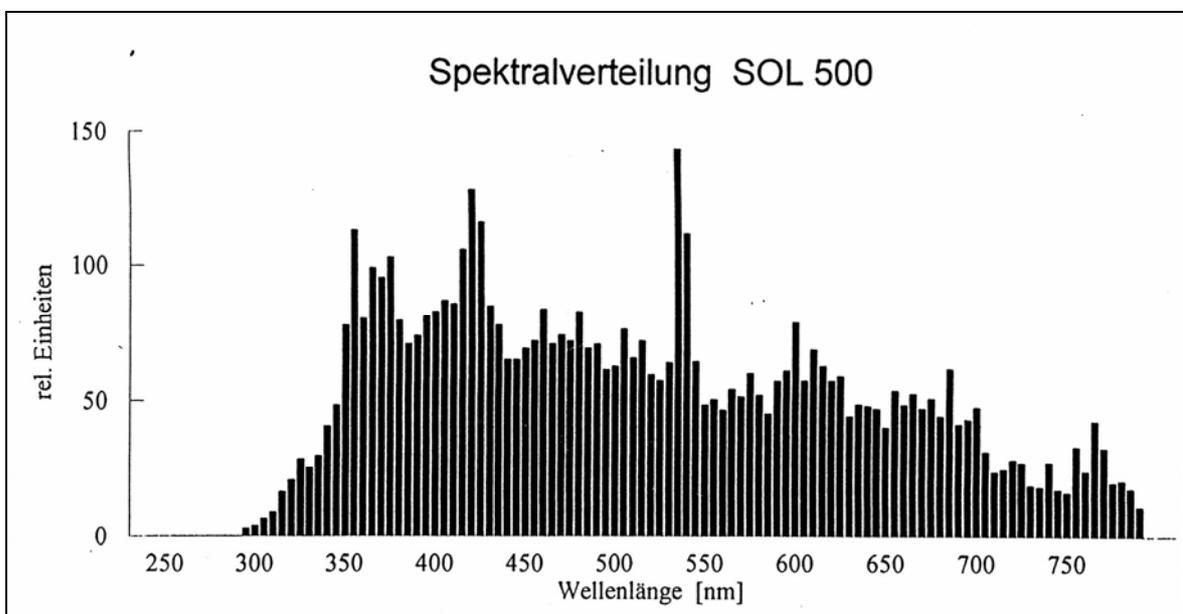


Abb. 8: Spektrale Leistungsverteilung der Breitband-UVB-Quelle

Die Keratinozytenkulturen von 15 verschiedenen Probanden wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Dosierungen von 15 und 25 mJ/cm^2 UVB-Strahlung behandelt, was einer Expositionszeit im Minutenbereich entsprach. Gleichzeitig

3 Material und Methoden

wurde zu jeder Zellkultur eine unbestrahlte Null-Kontrolle geführt, um Aufschluss über spontan entstehende Mikronuklei zu gewinnen.

UVB-Dosis (mJ/cm ²)	Expositionszeit (t)
15	2 min
25	3 min

Tab. 3: Expositionszeiten für Breitband-UVB-Bestrahlung bei einem UVB-Strahlenfluss von 0,128 mW/cm² in der Bestrahlungsebene

3.4.2 Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung

Die Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung erfolgte durch eine Ganzkörperbestrahlungskabine der Firma Waldmann (Waldmann F85 /100W-01), die in der dermatologischen Lichttherapie Anwendung findet. Es handelt sich hierbei um eine Stehkabine. Der Strahlenfluss betrug in der Probenebene in der Mitte der Kabine in 40 cm Höhe 9,58 x 0,94 mW/cm². Die Probanden Schalen wurden dazu auf einen mit schwarzer Fläche versehenen Sockel in der angegebenen Höhe in der Kabinenmitte zentriert.

Die Emission beginnt bei 305 nm und reicht bis 330 nm mit einem deutlichen Maximum bei 311 nm. Die sehr geringe Emission im UVA-Bereich konnte aufgrund der kurzen Expositionszeiten vernachlässigt werden.

3 Material und Methoden

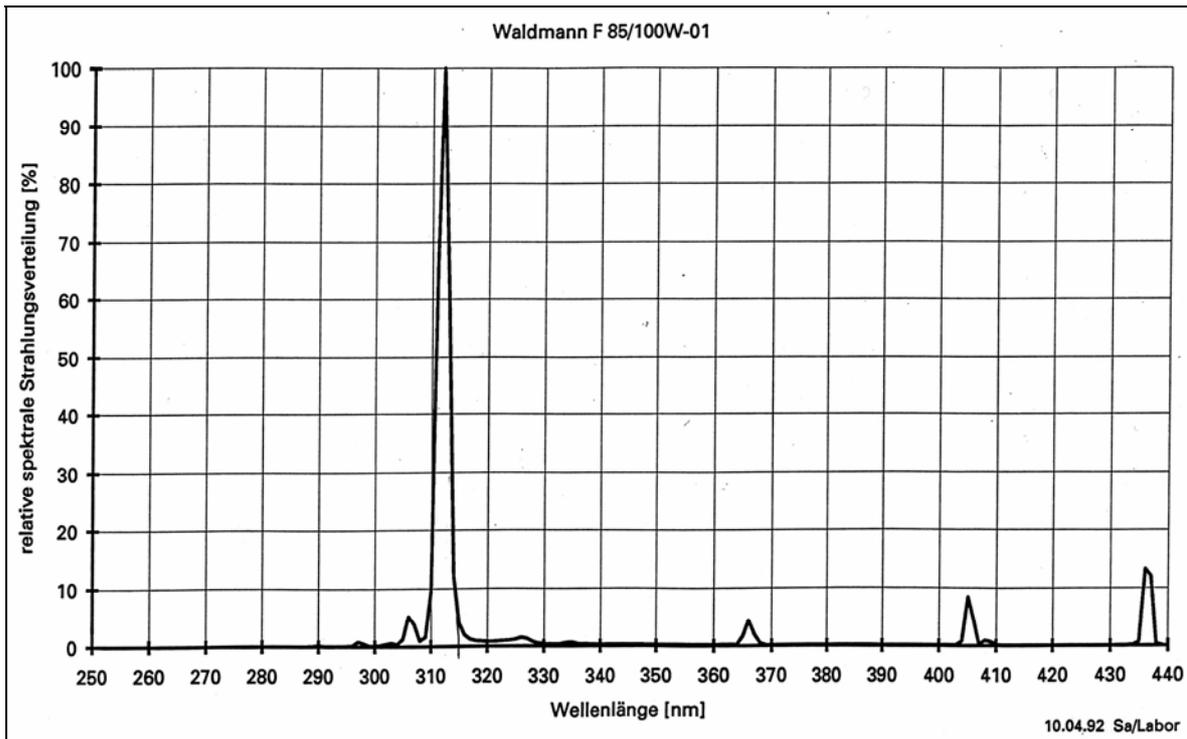


Abb. 9: Spektrale Leistungsverteilung der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlungsquelle

Auch mit Schmalspektrum-UVB wurden Keratinozytenkulturen von 15 verschiedenen Probanden unabhängig voneinander bestrahlt. Hierzu wurden UV-Dosen von 120, 240 und 590 mJ/cm² gewählt. Die Expositionszeiten lagen im Sekundenbereich. Jede Versuchsreihe enthält eine unbestrahlte Null-Kontrolle um die Anzahl spontan entstandener Mikronuklei zu bestimmen.

UVB Dosis (mJ/cm ²)	Expositionszeiten (t)
120	12 sec
240	24 sec
590	59 sec

Tab. 4: Expositionszeiten für Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung bei einem UVB-Strahlenfluss von 9,58 x 0,94 mW/cm² in der Bestrahlungsebene

3 Material und Methoden

3.4.3 Bestrahlung von Zellkulturen

Die Bestrahlung der Keratinozyten erfolgte in 35 mm Petrischalen. Um Photoreaktionen einzelner Mediumsbestandteile zu vermeiden, wurde das Kulturmedium vor der Bestrahlung unter der Sicherheitsbank abgezogen und durch 2 ml einer phosphatfreien Salzlösung (EBSS) ersetzt. Für die Dauer der UV-Lichteinwirkung wurde jeweils der Deckel der Petrischale entfernt, um so die spektrale Leistungsverteilung der Strahlenquelle zu erhöhen. Nach der Bestrahlung wurde die EBSS-Lösung ebenfalls unter der Sicherheitsbank abpipettiert und die Petrischale mit 2 ml der KGM-2 / Cytochalasin-B Lösung aufgefüllt. Es folgte mit einer 24 -ständigen Inkubation der Zellkulturen bei 37 °C im Brutschrank, der Beginn des Mikronukleustests (s. Kap. 3.3, *Mikronukleustest*).

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der optimalen Cytochalasin-B Konzentration für humane Keratinozyten

Die Bestimmung der optimalen Cytochalasin-B Konzentration ist die Basis für die folgenden Versuchsreihen. Humane Keratinozyten wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cytochalasin-B (0; 1; 2; 3; 4; 6; und 8 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und im Anschluss die Anzahl binukleater Zellen geprüft.

Es zeigte sich eine Zunahme des Anteils binukleater Zellen mit zunehmender Cytochalasin-B Konzentration bis zu einem Optimum von 2 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin-B. Hier lagen 55 % der Keratinozyten in binukleatem Zustand vor. Jede weitere Konzentrationssteigerung führte zu einer Verminderung des prozentualen Anteils binukleater Zellen.

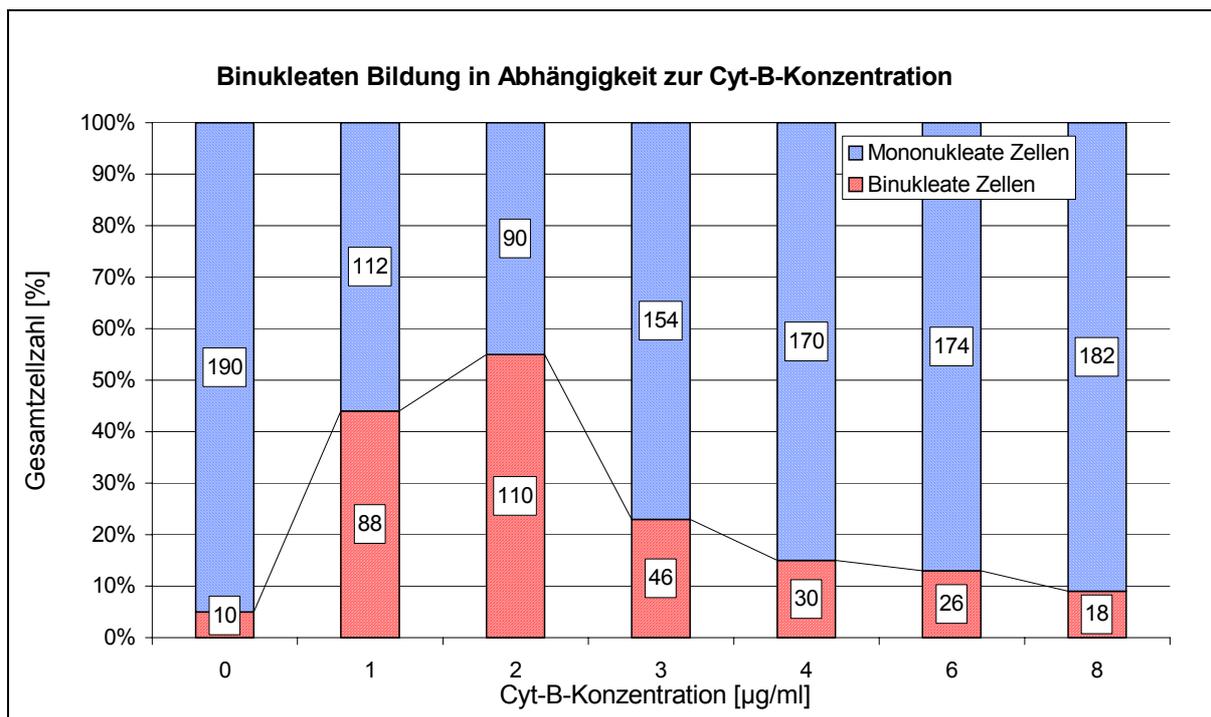


Abb. 10: Binukleate Zellen (%) in Abhängigkeit von der Cytochalasin-B Konzentration. NHEK-Zellen wurden mit Cyt-B für 24 h inkubiert. Es zeigte sich ein Anstieg der binukleaten Zellen bis zu einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ Cyt-B. Bei höheren Cyt-B Konzentrationen war keine weitere Zunahme zu beobachten. Die optimale Konzentration lag bei 2 $\mu\text{g/ml}$.

4 Ergebnisse

4.2 Die Frequenz spontan entstandener Mikronuklei in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Probanden

Mikronuklei entstehen auch ohne induzierte genotoxische Behandlung „spontan“ durch natürliche Faktoren. Dies wird als Spontanrate bezeichnet. Ihre Erfassung erfolgte an unbehandelten, mononukleaten humanen Keratinozyten direkt nach deren Isolierung aus dem Zellverband der Haut.

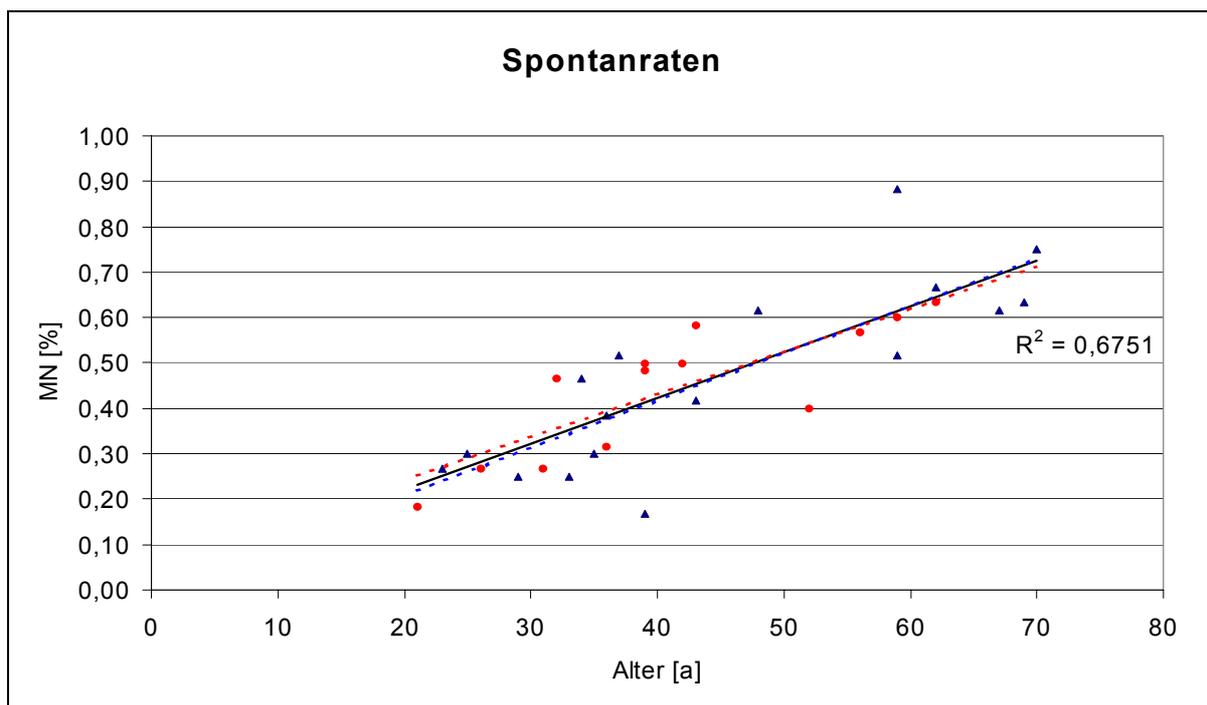


Abb. 11: Spontanrate (Mikronuklei in %) in Bezug zum Alter und Geschlecht (n= 30; w= 13 rot, m= 17 blau). Humane Keratinozyten wurden direkt nach ihrer Isolierung aus Vollhaut auf einen Objektträger aufgebracht und nach Anfärbung mit DAPI-Lösung auf das Vorhandensein von Mikronuklei hin untersucht. Hierzu wurden jeweils 2000 Keratinozyten beurteilt. Mit steigendem Alter lässt sich bei Männern und Frauen eine gleichsinnige Tendenz der Mikronukleuszunahme feststellen ($R^2 = 0,6751$).

Abbildung 11 zeigt die Spontanraten in Bezug zum Alter und Geschlecht der Probanden. Es ließ sich tendenziell eine Zunahme der Anzahl spontan entstandener Mikronuklei mit steigendem Lebensalter bei beiden Geschlechtern ermitteln.

Eine signifikante Abhängigkeit der Spontanrate vom Geschlecht der Probanden konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,69$). Bei Frauen zeigte sich ein Mittelwert von 0,44 % spontan entstandener Mikronuklei und bei Männern ein minimal höherer Wert von 0,47 %. Unabhängig vom Alter und Geschlecht der Probanden ließ sich für die Spontan-rate von humanen Keratinozyten ein Mittelwert von 0,46 % ($\pm 0,18$) ermitteln.

4 Ergebnisse

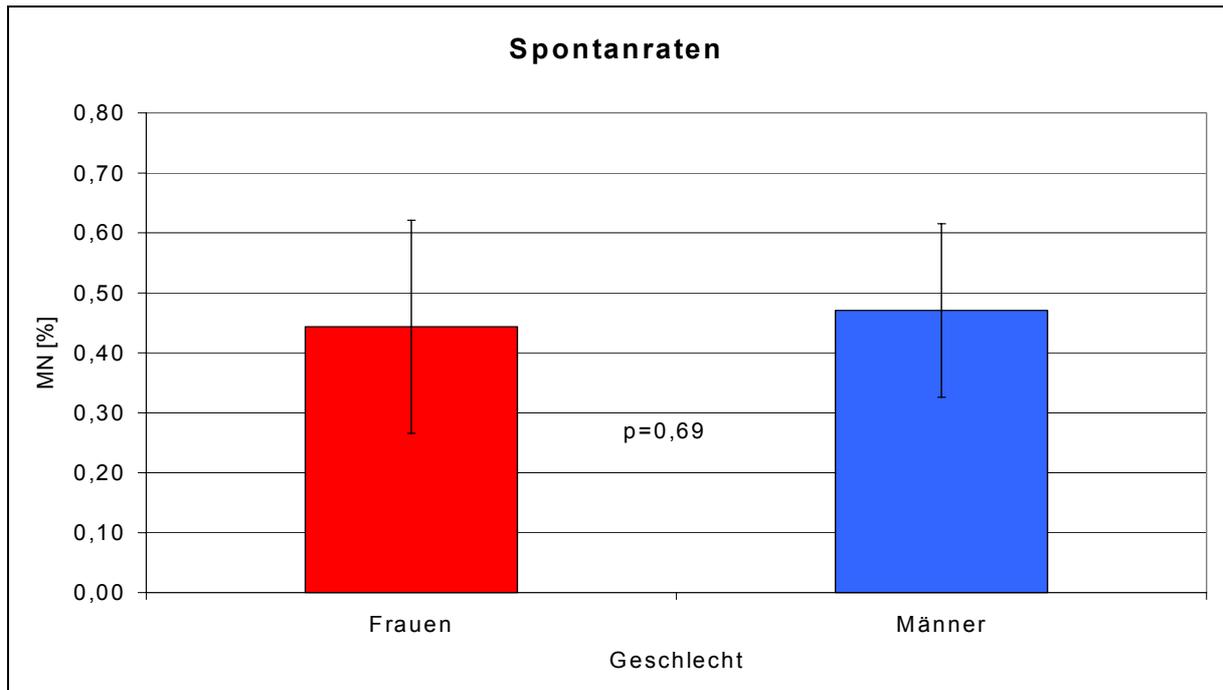


Abb. 12: Spontanraten (Mikronuklei in %) in Abhängigkeit vom Geschlecht. Von 30 Probanden wurden die Mittelwerte der spontan entstandenen Mikronuklei in Abhängigkeit vom Geschlecht berechnet. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der Mikronukleushäufigkeit zwischen Männern und Frauen feststellen ($p=0,69$).

4.3 Phototoxizitätsprüfung mit Breitband-UVB-Bestrahlung

Humane Keratinozyten wurden mit zwei verschiedenen UVB-Breitband Dosen von 15 und 25 mJ/cm^2 bestrahlt und im Anschluss dem Mikronukleustest unterzogen. Es wurde jeweils eine unbestrahlte Null-Kontrolle mitgeführt um den Einfluss der UV-Strahlung auf die Mikronukleusbildung bewerten zu können. Mit steigender UVB-Bestrahlungsdosis zeigte sich ein Anstieg der Mikronukleusanzahl (s. Abb. 13). In der unbestrahlten Null-Kontrolle betrug der prozentuale Anteil an Mikronuklei 0,36 %. Nach erfolgter UVB-Bestrahlung mit 15 mJ/cm^2 lag der prozentuale Anteil an Mikronuklei bei 0,67 % und stieg nach einer Dosis von 25 mJ/cm^2 auf 1,04 %. Der Anstieg der Mikronukleusanzahl mit zunehmender Bestrahlungsdosis konnte auch in Bezug auf das Alter der Probanden nachgewiesen werden. In jedem erfassten Lebensalter erfolgte eine dosisabhängige Zunahme der Mikronukleusbildung. Diese fiel jedoch bei der höheren Bestrahlungsdosis von 25 mJ/cm^2 bei den jüngeren Probanden tendenziell höher aus als bei den älteren Probanden. Mit steigendem Alter der Probanden wurde tendenziell eine zunehmend geringere Anzahl an Mikronuklei gebildet (s. Abb. 14).

4 Ergebnisse

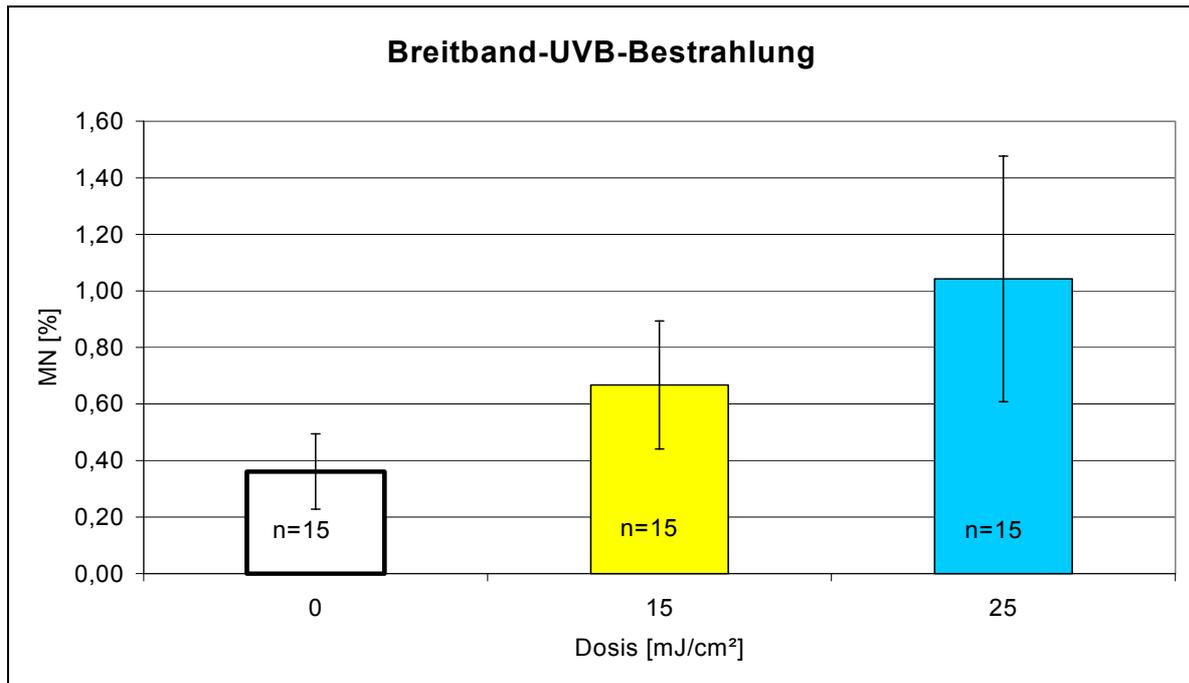


Abb. 13: Mikronukleusbildung in Abhängigkeit von der Breitband-UVB-Bestrahlung. Humane Keratinozyten wurden mit zwei verschiedenen Energiedosen bestrahlt und anschließend dem Mikronukleustest unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MN-haltiger Zellen. In allen Versuchen wurden jeweils 2000 binukleate Zellen pro Behandlungsgruppe und 200 Zellen für die NDI-Bestimmung ausgezählt.

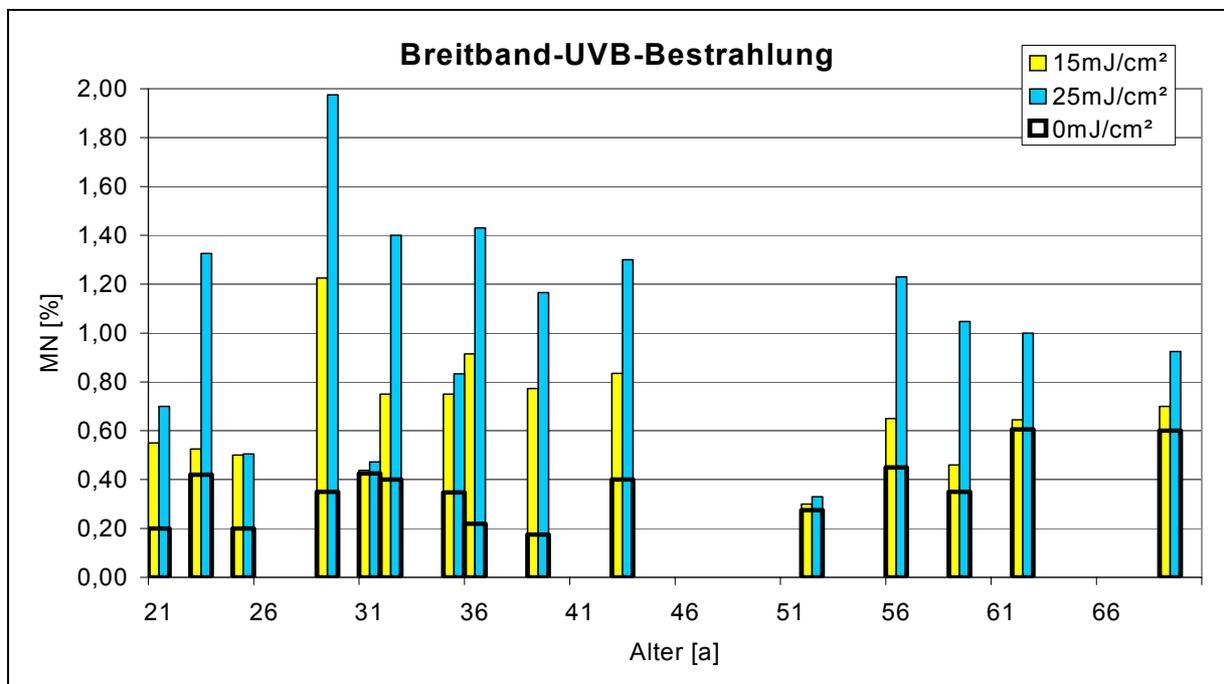


Abb. 14: Mikronukleusbildung in Abhängigkeit von der UVB-Bestrahlungsdosis. Primäre Keratinozyten wurden mit zwei verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt und der Cytokinese-Block-Technik unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MN-haltiger Zellen in den unterschiedlichen Einzelversuchen (Balken). In allen unabhängigen Versuchen wurden jeweils 2000 binukleate Zellen pro Einzelversuch und Behandlungsgruppe und 200 Zellen für die NDI-Bestimmung ausgezählt.

4 Ergebnisse

4.3.1 Bestimmung des NDI nach Breitband-UVB-Bestrahlung

Im Anschluss an die Breitband-UVB-Bestrahlung wurde zur Beurteilung der Vitalität der Keratinozytenkulturen der Nuclear division index (NDI) bestimmt. Es zeigte sich mit steigender UVB-Bestrahlungsdosis eine kontinuierliche Abnahme des NDI. Die nicht bestrahlte Kontrolle zeigte einen mittleren NDI Wert von 1,56. Nach einer Breitband-UVB-Bestrahlung mit 15 mJ/cm² fiel der NDI auf 1,32 und weiter auf einen mittleren NDI Wert von 1,19 nach einer Breitband-UVB Dosis von 25mJ/cm² (s. Abb. 15). Die mit zunehmender Bestrahlungsdosis sinkenden NDI Werte zeigten keine Altersabhängigkeit (s. Abb. 16).

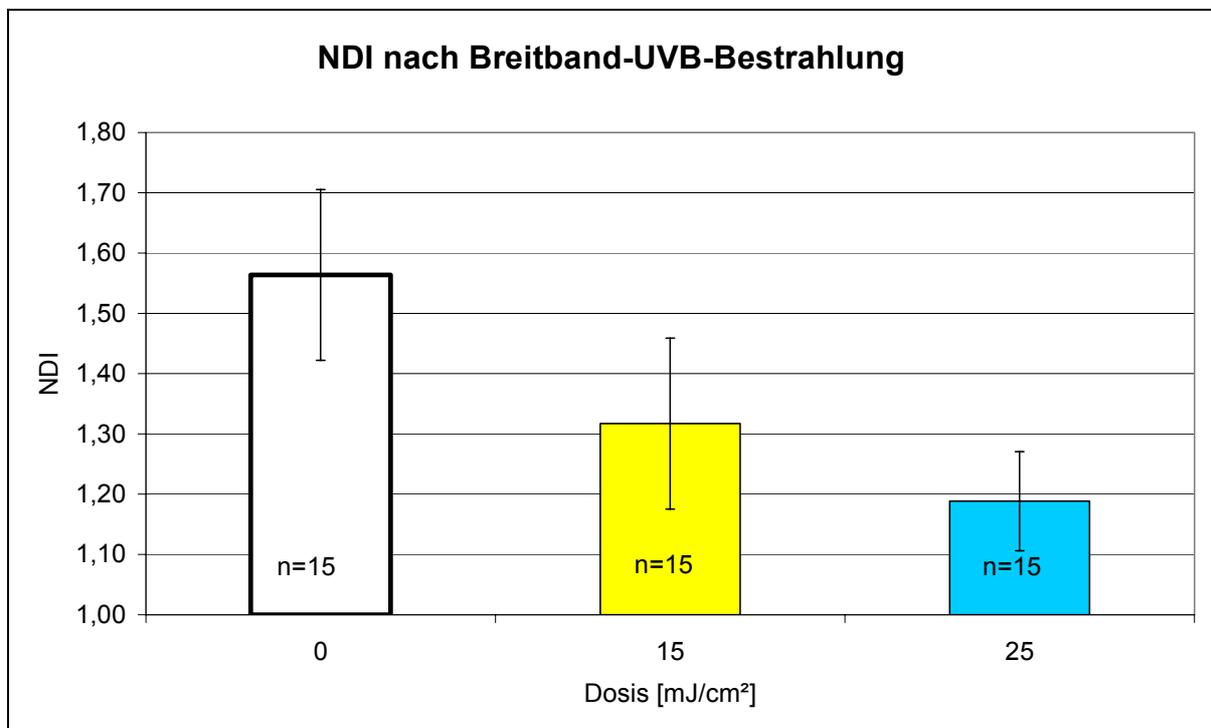


Abb. 15: Nuclear division index im Verlauf der Breitband-UVB-Bestrahlung, Mittelwerte. Jeweils 200 behandelte Keratinozyten wurden bezüglich mono- / binukleater Zellkernstruktur untersucht und der Durchschnitt der ermittelten Ergebnisse für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen berechnet. Mit ansteigender Dosierung der Breitband-UVB Behandlung sinkt der NDI-Wert.

4 Ergebnisse

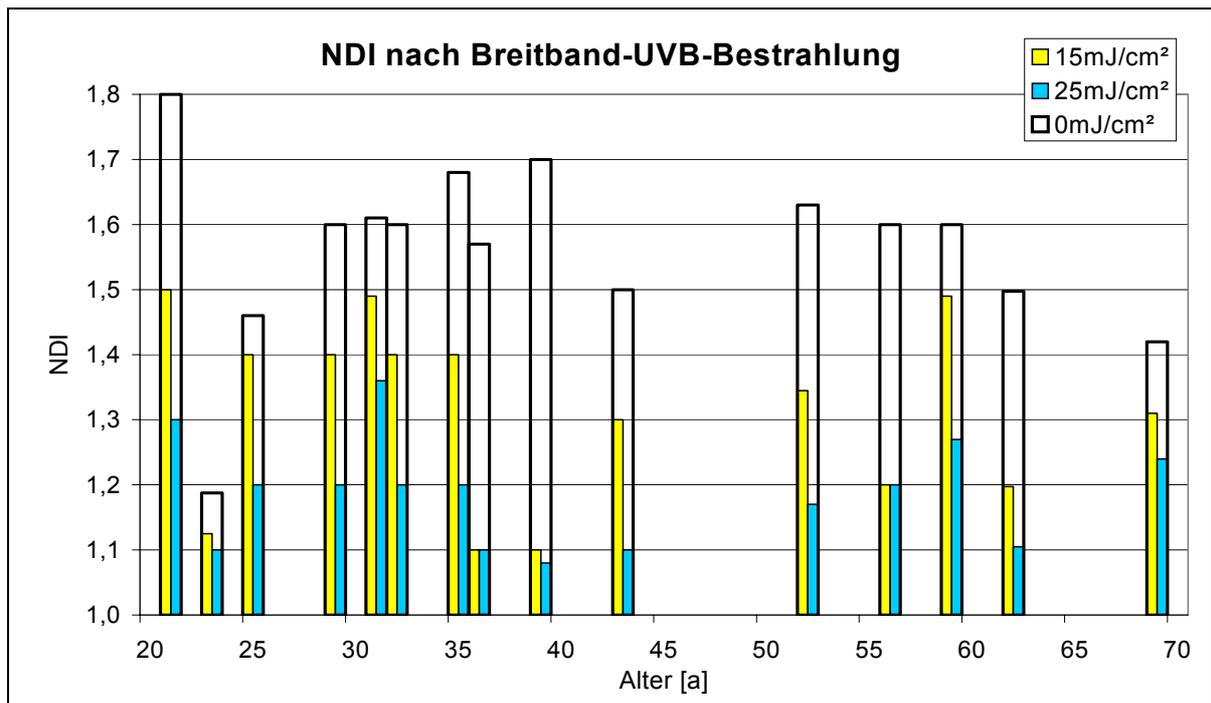


Abb. 16: Nuclear division index im Verlauf der Breitband-UVB-Bestrahlung, Einzelwerte. Nach der UV-Behandlung der Keratinozyten mit Breitband-UVB wurden jeweils 200 Keratinozyten für die NDI Bestimmung ausgezählt und die Struktur ihres Zellkerns, mono- bzw. binukleat, untersucht. Tendenziell erkennt man eine Abnahme der Kernteilung bei steigender Bestrahlungsdosis.

4.4 Phototoxizitätsprüfung mit Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung

Analog zur Phototoxizitätsprüfung mit der Breitband-UVB-Bestrahlung wurden humane Keratinozyten mit drei unterschiedlichen Dosen einer Schmalspektrum-UVB Lampe bestrahlt und direkt im Anschluss dem Mikronukleustest unterzogen. Es zeigte sich mit steigender Dosis der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung eine Zunahme der Mikronukleusanzahl. In der unbehandelten Null-Kontrolle betrug der prozentuale Anteil an Mikronuklei 0,36 %. Bei einer Schmalspektrum-UVB Dosis von 120 mJ/cm² betrug die Anzahl 0,54 %, stieg bei der doppelten Schmalspektrum-UVB Dosis von 240 mJ/cm² auf 0,76 % und lag bei der höchsten getesteten Schmalspektrum-UVB Dosis von 590 mJ/cm² bei 1,11 % Mikronuklei (s. Abb. 17). Analog zu den Ergebnissen der Breitband-UVB-Bestrahlung konnte eine dosisabhängige Zunahme der Mikronukleusbildung bis auf eine Ausnahme in jedem erfassten Alter nachgewiesen werden (s. Abb. 18).

4 Ergebnisse

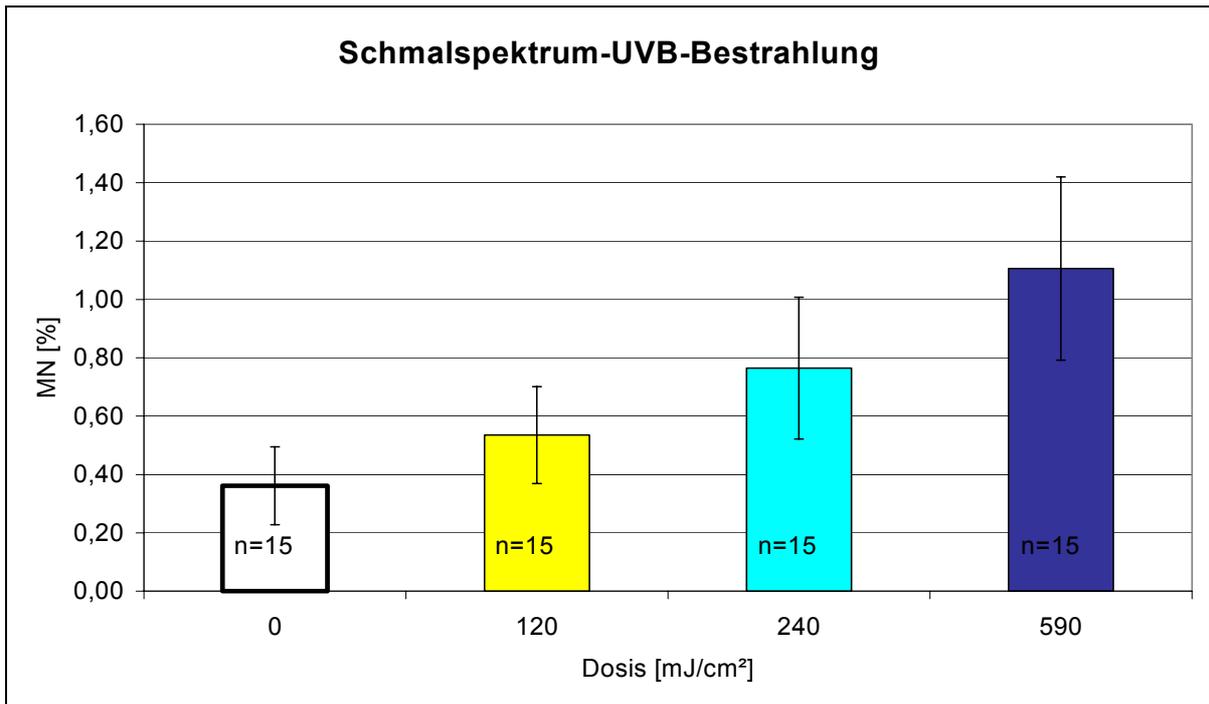


Abb. 17: Mikronukleusbildung in Abhängigkeit von einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung, Mittelwerte. Humane Keratinozyten wurden mit drei verschiedenen Energiedosen in einer Schmalspektrum-UVB Kabine bestrahlt und anschließend dem Mikronukleustest unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MN-haltiger Zellen. In allen Versuchen wurden jeweils 2000 binukleate Zellen pro Behandlungsgruppe und 200 Zellen für die NDI-Bestimmung ausgezählt.

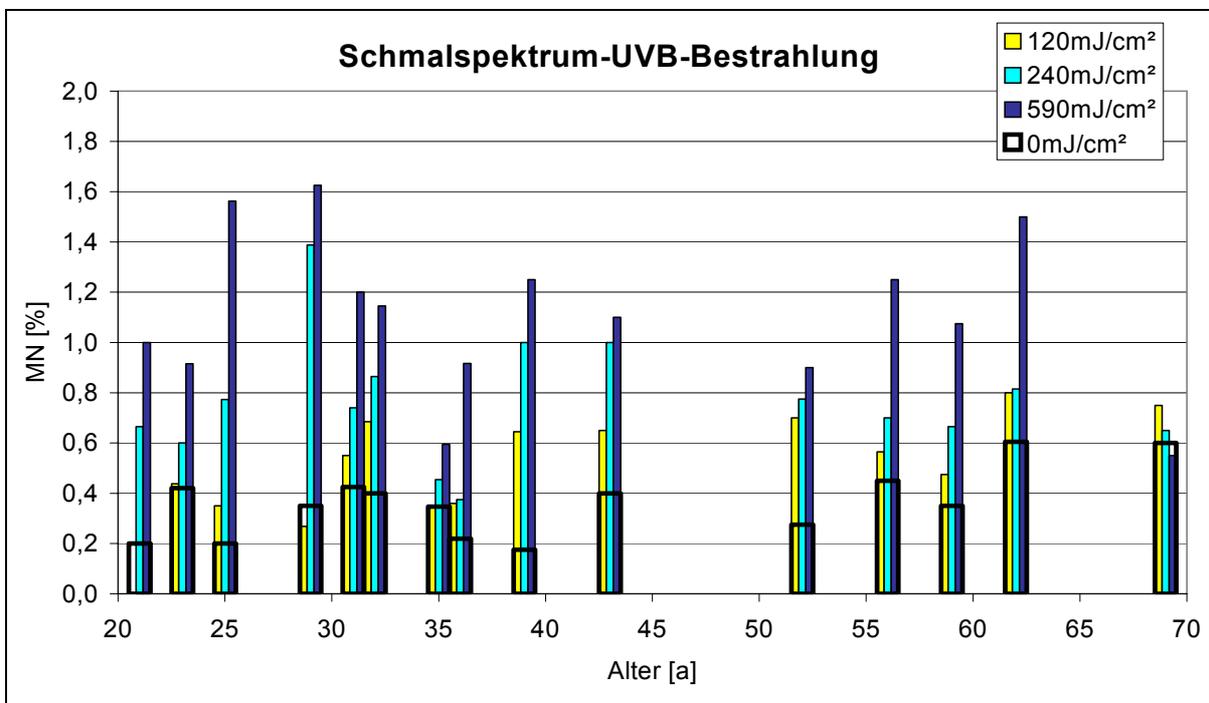


Abb. 18: Mikronukleusbildung in Abhängigkeit von der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlungsdosis, Einzelwerte. Humane Keratinozyten wurden mit drei verschiedenen Energiedosen bestrahlt und anschließend dem Mikronukleustest unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MN-haltiger Zellen der Einzelversuche. In allen Versuchen wurden jeweils 2000 binukleate Zellen pro Behandlungsgruppe und 200 Zellen für die NDI-Bestimmung ausgezählt.

4 Ergebnisse

4.4.1 Bestimmung des NDI nach Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung

Analog zur Auswertung nach der Breitband-UVB-Bestrahlung wurde der NDI durch Betrachtung von jeweils 200 Zellen bezüglich ihrer Kernstruktur, mono- bzw. binukleat, bestimmt. In Abb. 19 sieht man die Einzelergebnisse in Bezug zum Alter der Probanden und der Bestrahlungsdosis. Es zeigte sich unabhängig vom Alter der Probanden eine Abnahme des NDI Wertes mit ansteigender Schmalspektrum-UVB-Bestrahlungsdosis. In Abb. 20 sind die Mittelwerte des NDI in Bezug zu den verschiedenen Bestrahlungsdosen wiedergegeben. Hier sieht man deutlich die kontinuierliche Abnahme des NDI Wertes. In der nicht bestrahlten Kontrolle zeigte der NDI einen Mittelwert von 1,58. Nach einer Bestrahlung mit 120 mJ/cm² Schmalspektrum-UVB sank der NDI auf einen mittleren Wert von 1,42. Bei der doppelten Bestrahlungsdosis von 240 mJ/cm² fiel sein Mittelwert auf 1,25 ab und erreichte bei einer weiteren Dosissteigerung auf 590 mJ/cm² nur noch einen mittleren Wert von 1,13.

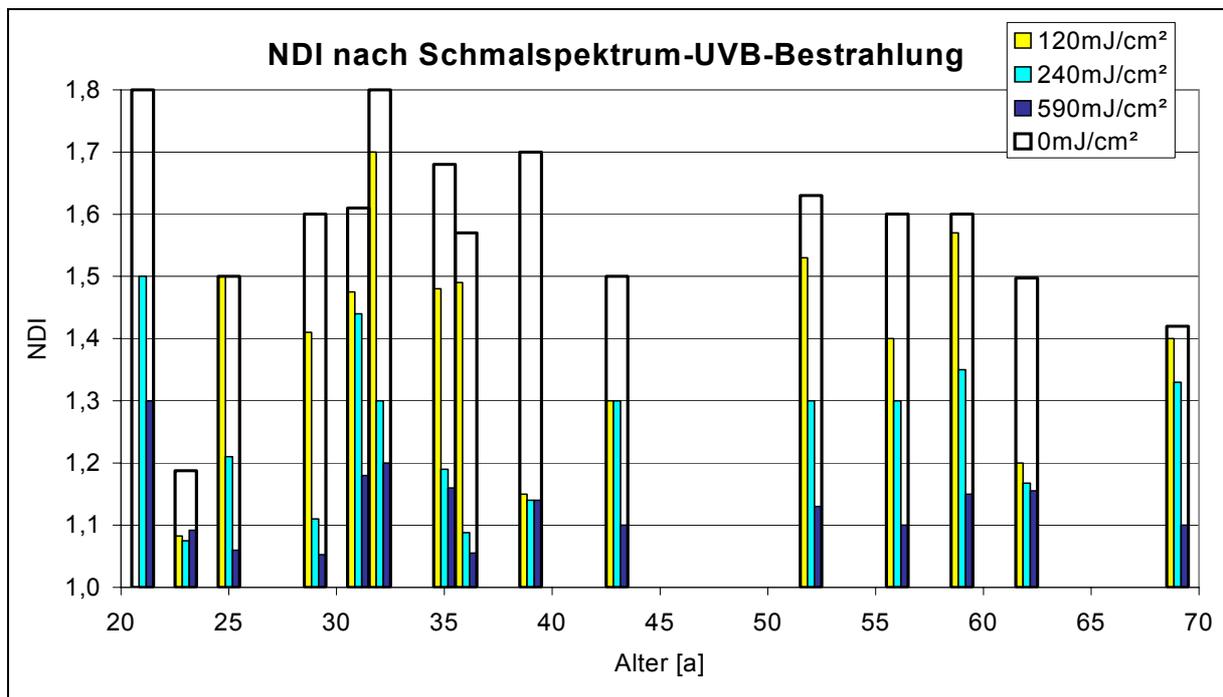


Abb. 19: Nuclear division index im Verlauf der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung und in Bezug zum Alter der Probanden, Einzelwerte. Nach der UV-Behandlung der Keratinozyten mit Schmalspektrum-UVB wurden jeweils 200 Keratinozyten für die NDI Bestimmung ausgezählt und die Struktur ihres Zellkerns, mono- bzw. binukleat, untersucht. Es zeigte sich eine Abnahme der Kernteilung bei steigender Bestrahlungsdosis in jeder Altersgruppe.

4 Ergebnisse

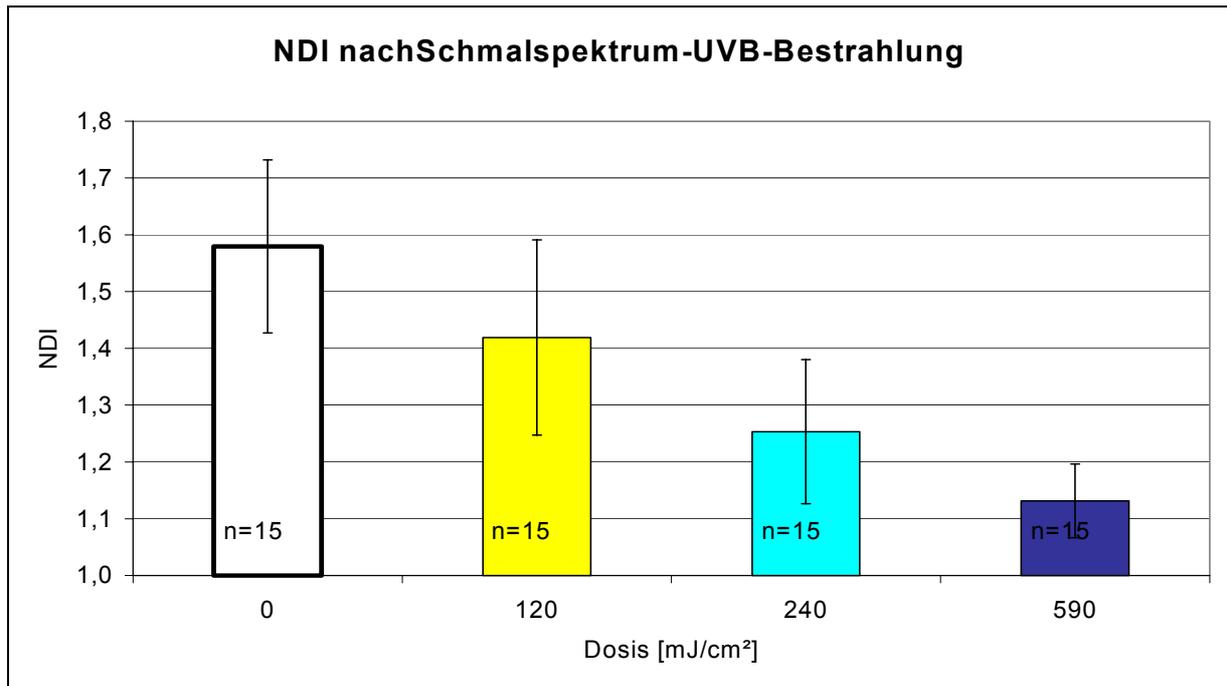


Abb. 20: Nuclear division index im Verlauf der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung, Mittelwerte. Jeweils 200 behandelte Keratinozyten wurden bezüglich mono- / binukleater Zellkernstruktur untersucht und der Durchschnitt der ermittelten Ergebnisse für die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen berechnet. Mit ansteigender Dosierung der Schmalspektrum-UVB-Behandlung sank der NDI-Wert.

4.5 Vergleich der Phototoxizität von Breitband-UVB und Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung

Wie bereits im Vorfeld erwähnt, lag zwischen den Bestrahlungsdosen von Breitband-UVB und Schmalspektrum-UVB jeweils eine Zehnerpotenz, da sie in dieser Form in der Therapie von dermatologischen Erkrankungen Anwendung finden. Somit bestand die Möglichkeit, einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der 15 mJ/cm² und 25 mJ/cm² Breitband-UVB und denen der 120 mJ/cm² und 240 mJ/cm² Schmalspektrum-UVB-Bestrahlungen zu erstellen. Im Vergleich der beiden UVB Spektren zeigte sich, dass mit zunehmender UV-Dosis der prozentuale Anteil mikronukleushaltiger Zellen nach der Breitband-UVB-Bestrahlung höher lag als nach vergleichbaren UV-Dosen der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung. Bei einer Bestrahlung mit 15 mJ/cm² Breitband-UVB konnte ein Mittelwert von 0,67 % Mikronuklei festgestellt werden. Bei der therapie-äquivalenten Dosierung im Schmalspektrum-UVB Bereich, 120 mJ/cm², waren es dagegen 0,54 % Mikronuklei. Hier war zwischen beiden Testreihen ein Unterschied von 0,13 % Mikronuklei zu erkennen. Eine höhere Mikronukleusrate zeigte sich bei der Gegenüberstellung von

4 Ergebnisse

25 mJ/cm² Breitband-UVB und der ca. zehnfach höheren Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung von 240 mJ/cm². Die prozentualen Mittelwerte lagen bei 1,04 % im Breitband bzw. 0,76 % im Schmalspektrum Bereich. Hier ergab sich eine Differenz von 0,28 % Mikronuklei.

Die höchste getestete Schmalspektrum-UVB Dosis von 590 mJ/cm² entsprach bei therapeutisch äquivalenter Dosierung etwas mehr als dem Doppelten der höchsten getesteten Breitband-UVB-Bestrahlung von 25 mJ/cm². Im Vergleich dieser beiden Dosierungen zeigte sich lediglich eine Differenz von 0,07 % in der Anzahl entstandener Mikronuklei.

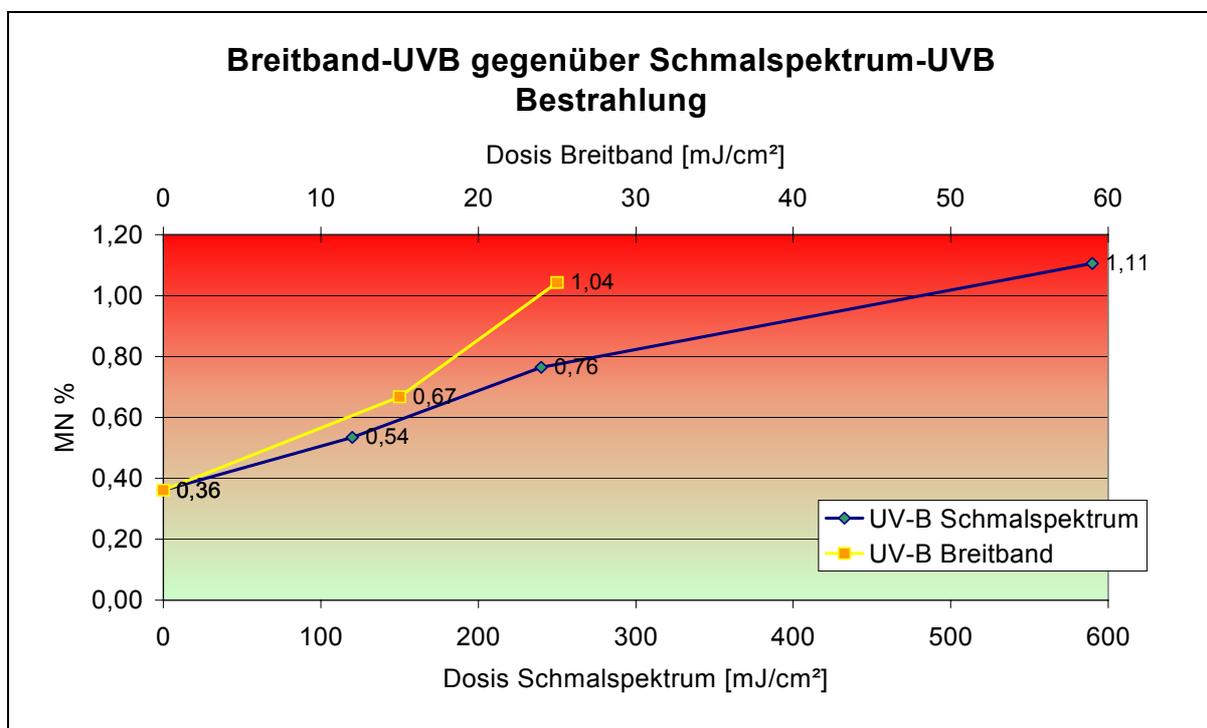


Abb. 21: Vergleich der in Abhängigkeit von Breitband-UVB und Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung entstandenen Mikronuklei (%), Mittelwerte. Humane Keratinozyten wurden mit Breitband-UVB oder Schmalspektrum-UVB in aufsteigender Dosierung bestrahlt und anschließend dem Mikronukleustest unterzogen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil entstandener Mikronuklei. In allen unabhängigen Versuchen wurden jeweils 2000 binukleate Zellen pro Einzelversuch und Behandlungsgruppe ausgezählt.

In Abb. 22 sind die NDI Mittelwerte der Schmalspektrum-UVB und Breitband-UVB-Bestrahlung einander gegenübergestellt. Bei einer Bestrahlung mit 15 mJ/cm² Breitband-UVB zeigte sich ein mittlerer NDI Wert von 1,32. Der Vergleichswert im Schmalspektrum-UVB Bereich lag bei 1,42. Die Bestrahlung mit 25 mJ/cm² Breitband-UVB senkte den NDI auf 1,19, während eine fast zehnfach höhere Dosis

4 Ergebnisse

im Schmalspektrum-UVB Bereich von 240 mJ/cm^2 lediglich zu einer Absenkung auf einen Wert von 1,25 führte. Erst eine Schmalspektrum-UVB Dosis von 590 mJ/cm^2 , die mehr als dem Doppelten der 25 mJ/cm^2 Breitband-UVB entspricht, führte zu einer Senkung des NDI auf 1,13. Der kleine Referenzbereich des NDI von $1 \leq \text{NDI} \leq 2$ verdeutlicht, dass die ermittelten Werte durchaus eine deutliche Reduktion des Kernteilungsindex aufzeigen, insbesondere durch die Breitband-UVB-Bestrahlung.

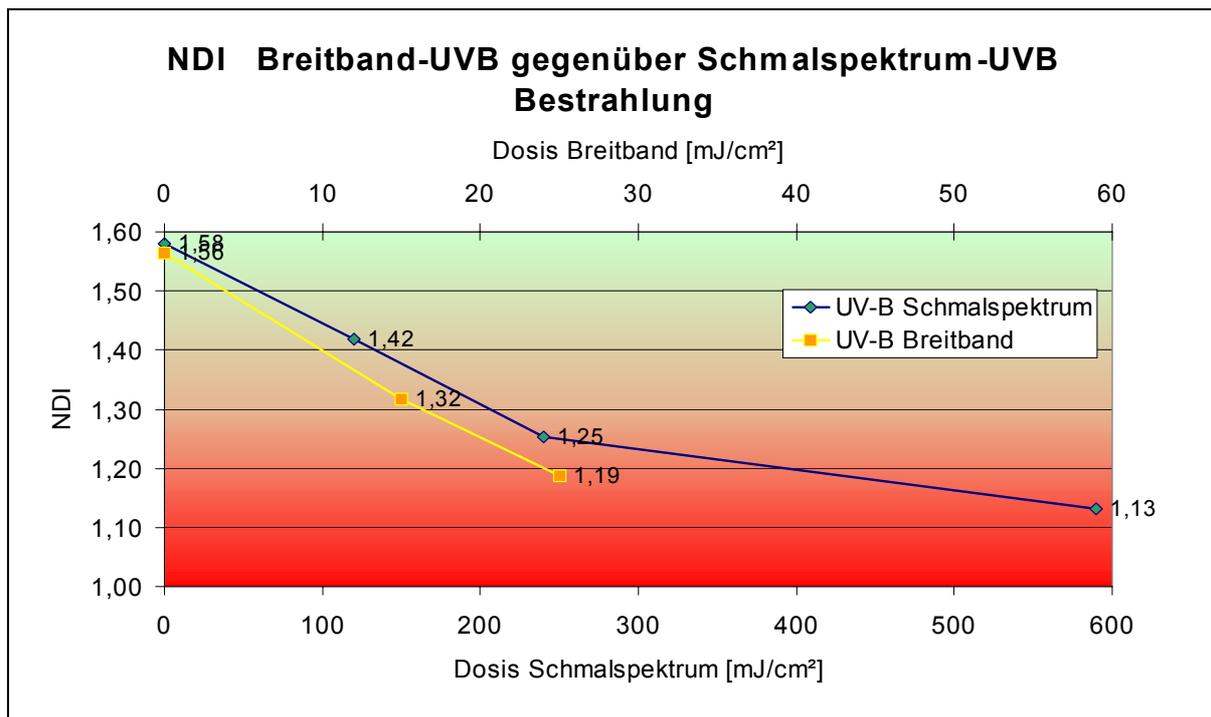


Abb. 22: Vergleich der NDI Veränderungen unter Breitband-UVB und Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung; Mittelwerte. Humane Keratinozyten wurden mit Breitband-UVB oder Schmalspektrum-UVB in aufsteigender Dosierung bestrahlt und anschließend dem Mikronukleustest unterzogen. Dargestellt ist der Nuclear division index, NDI. In allen unabhängigen Versuchen wurden jeweils 200 Zellen pro Einzelversuch und Behandlungsgruppe ausgezählt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte das genotoxische Potential von UVB-Strahlung unterschiedlicher Wellenlängenbereiche an humanen Keratinozyten untersucht werden. Ziel war es, eine mögliche Dosis-Wirkungsabhängigkeit zwischen dem ausgewählten UV-Spektrum und der Entstehung von DNS-Schäden aufzudecken. Als Nachweisverfahren wurde der Mikronukleustest mit der erweiterten Form der Zytokinese-Block Technik eingesetzt und an humanen Keratinozyten etabliert.

Für die Interpretation der Ergebnisse des Mikronukleustests sind Kenntnisse über die Spontanraten einer Zellpopulation und deren Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht oder Life style Faktoren von Bedeutung. Spontan entstandene Mikronuklei bilden einen Ausgangswert, der ein Maß für die Empfindlichkeit und die genetische Stabilität einer Zellkultur ist. Bei humanen Keratinozyten konnte in dieser Arbeit *in vitro* eine Abhängigkeit des Alters von der Anzahl spontan entstandener Mikronuklei festgestellt werden. Mit zunehmendem Lebensalter zeigte sich ein Anstieg der Spontanrate. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der Forschungsgruppen um Fenech und Venkatachalam an Lymphozyten (1998). Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit der spontanen Mikronukleusentstehung vom Geschlecht der Probanden untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der MN-Frequenz zwischen weiblichen und männlichen Probanden festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem Fenechs, dessen Resultate allerdings auf einem weitaus repräsentativeren Kollektiv von 1000 Probanden basiert. Es gibt jedoch auch Forschungsgruppen, die ebenfalls keinerlei Bezug zwischen beiden Parametern belegen konnten (Berg-Drewniok et al., 1997; Tsai et al., 2001). Unterschiedliche Ergebnisse lassen sich eventuell zum Teil auf die verschiedenen Zelltypen, Keratinozyten und Lymphozyten, die für diese Versuchsreihen Verwendung fanden, zurückführen. Tabelle 6 zeigt eine Auflistung von Spontanraten von verschiedenen humanen Zelltypen und eine mögliche Abhängigkeit der spontan entstehenden Mikronuklei von der Art der Zelle. Die höchsten Spontanraten zeigten hier Lymphozyten aus dem peripheren Blut (Vral et al., 1994). Bei Fibroblasten, die von Angehörigen von Hautkrebspatienten stammten, ist eine ca. 3-4 -fach höhere Rate an spontanen Mikronuklei zu verzeichnen, als bei Fibroblasten von Patienten ohne positive Familienanamnese. Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei verschiedenen Keratinozytenkulturen nachweisen. So zeigten HaCaT- und SCL-2 Zelllinien ebenfalls eine höhere Spontanrate als Primärkulturen von humanen Keratinozyten in dieser Arbeit. Die

5 Diskussion

Ergebnisse deuten darauf hin, dass HaCaT- und SCL-2 Zelllinien aufgrund ihrer genetischen Veränderung möglicherweise empfindlicher geworden sind. So konnten Berg-Drewniok et al. (1997) in einer Arbeit über „Melanomfamilien“ an Fibroblasten von Verwandten ersten Grades zeigen, dass bei diesen die Spontanrate an Mikronuklei gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht war. Ähnliche Ergebnisse erhielten Venkatachalam et al. (1998), die die Frequenz von spontan entstandenen Mikronuklei bei Lymphozyten von Krebspatienten untersuchten und feststellten, dass diese ebenfalls höhere Werte aufwiesen als die Kontrollgruppen. Beide Forschungsgruppen konnten so mit Hilfe des Mikronukleustests eine chromosomale Instabilität bei bestimmten Risikogruppen belegen. Der Mikronukleustest kann somit eventuell eine wichtige Rolle im Rahmen eines Bio-Monitoring zur Erfassung endogener und exogener Einflüsse auf das Genom der Zelle einnehmen (Fenech, 1992).

humaner Zelltyp	MN-Spontane ± SD (%)	Literatur
Fibroblasten von Angehörigen von Patienten mit malignen Hauttumoren	16,13 ± 6,11	Drewniok et al., 1997
Fibroblasten	4,43 ± 0,64	Drewniok et al., 1997
Fibroblasten von Angehörigen von Patienten mit malignen Hauttumoren	13,00 ± 9,90	Roser et al., 1989
HaCaT-Keratinocytenlinie	3,50 ± 0,25	Strodholz, 1997
NHEK	0,46 ± 0,18	Ergebnisse dieser Arbeit
PBL (Lymphozyten aus dem peripheren Blut)	9,93 ± 5,88	Keulers et al., 1998
PBL (Lymphozyten aus dem peripheren Blut)	4,90 ± 1,65	Fenech, 1986
venöse Lymphozyten	20,00 ± 6,00	Vral et al., 1994
SCL-2-Keratinocytenlinie	8,07 ± 2,86	Weller et al., 1996

Tab. 6: Auflistung von Spontanraten von verschiedenen humanen Zelltypen

5 Diskussion

In den in dieser Arbeit durchgeführten UV-Licht Testungen wurde die Mikronukleus-Entstehung in Abhängigkeit von verschiedenen UVB-Bestrahlungsdosen und Wellenlängenbereichen an humanen Keratinozyten untersucht. Sowohl nach Schmalspektrum-UVB (311 nm) als auch nach Breitspektrum-UVB Bestrahlung war ein dosisabhängiger und signifikanter Anstieg der Mikronukleushäufigkeit zu beobachten. Die Dosis- Wirkungs-Beziehung konnte bei jedem einzelnen Probanden altersunabhängig festgestellt werden. Die direkte Einwirkung der UVB-Strahlung auf die DNS mit der Entstehung von Pyrimidin-Dimeren und weiteren Photoprodukten ist bereits hinreichend beschrieben (Griffiths et al., 1998; Bohnert E., 1993). Eine dosisabhängige Einflussnahme durch UVB-Bestrahlung konnte ebenfalls an peripheren Blutlymphozyten, Melanozyten und Fibroblasten in Form von vermehrter Mikronukleusbildung (Keulers et al., Emri et al., 2000), sowie auch an HaCaT-Zellen, als Anstieg von DNS-Einzelstrangbrüchen (Lehmann et al., 1998) festgestellt werden. In dieser Arbeit ging es um die Beurteilung des genotoxischen Potentials von Schmalspektrum-UVB gegenüber Breitband-UVB-Bestrahlung. Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigten sich mit der Fragestellung der Effektivität und dem karzinogenen Potential einer UVB 311 nm Therapie im Vergleich zu der herkömmlichen Breitband-UVB und PUVA-Therapie (Tanew et al., 1999; Gupta et al., 1998; Scherschun et al., 2001), da sie sowohl in der Behandlung der Psoriasis als auch der Vitiligo zunehmend erfolgreich eingesetzt wird. In der Therapie mit Schmalspektrum-UVB werden 10-15 –fach höhere Dosierungen angewandt. Tzung et al. (1998) konnten zunächst in einer Arbeit mit dem Comet assay, einem Nachweisverfahren für DNS-Schäden, an Keratinozyten und Lymphozyten belegen, dass bei einer Bestrahlung mit Schmalspektrum-UVB im Vergleich zu gleichen Dosen einer Breitspektrum-UVB Bestrahlung sich deutlich weniger DNS-Schäden bei der Bestrahlung mit nur einer Wellenlänge des UVB-Spektrums (311 nm) ergeben. Das stärker DNS-schädigende Potential der Breitband-UVB-Bestrahlung erklärt sich durch sein größeres Spektrum, dass an den kurzwelligen Bereich des UVC und die ionisierende Strahlung anschließt. Wellenlängen zwischen 296-302 nm sind das biologisch aktivste Aktionsspektrum für die Entstehung von Pyrimidin-Dimeren (Freeman et al., 1989). Anhand des Mikronukleustests an humanen Keratinozyten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch bei therapeutisch gleichwertigen Dosierungen (10-fach höhere Schmalspektrum-UVB Dosis als Breitband Dosis) eine Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung (311 nm) in geringerem Maße als eine Breitband-

5 Diskussion

UVB-Bestrahlung zur Entstehung von DNS-Schäden führt. Es kam zu einer deutlich geringeren Bildung von Mikronuklei bei therapie-äquivalenter Dosierung nach erfolgter Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung (s. Abb. 21, Kap. Ergebnisse). Nach einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlungsdosis, die mehr als dem Doppelten der höchsten getesteten Breitband-UVB Dosis entsprach, entstanden geringfügig mehr Mikronuklei. Gleiche Ergebnisse zeigten sich bei der Bewertung des NDI unter UVB Bestrahlung. Die Proliferationsrate der Keratinozyten nahm bei ansteigenden Bestrahlungsdosen ab. Es zeigte sich jedoch insgesamt eine geringere dosisabhängige Senkung des NDI durch die Schmalspektrum-UVB als durch die Breitband-UVB-Bestrahlung. Verschiedene Forschungsgruppen, die an Mauszellen das karzinogene Potential von therapie-äquivalenten Dosierungen einer Breitband-UVB im Vergleich zu einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung untersuchten, erhielten ähnliche Ergebnisse (van Weelden et al., 1988; Flindt-Hansen et al., 1991; Wulf et al., 1994; Gibbs et al., 1995). Sie konnten im Vergleich ebenfalls ein geringeres Schadenspotential nach einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung nachweisen.

Weiterhin zeigte sich in den UVB-Testungen an Keratinozyten in dieser Arbeit bei der Bestrahlung mit Breitband-UVB mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine tendenzielle Abnahme der Mikronukleusbildung mit zunehmendem Lebensalter. Ursächlich denkbar wäre eine altersabhängig verzögert stattfindende Reparatur der durch UVB-Strahlung induzierten DNS-Schäden. Weller et al. (1996) konnte an humanen SCL-2 Keratinozyten *in vitro* zeigen, dass UVB-Strahlung dosisabhängig, insbesondere im Bereich von 295-305 nm einen Zell-Zyklus Arrest auslöst. Hieraus resultiert eine verlangsamte DNS-Synthese zur Behebung von DNS-Schäden vor der nächsten Zellteilung und ebenso bei höheren Bestrahlungsdosen eine Apoptose der Zellen. Weller observierte zwar nicht das Alter der Probanden, aber es wäre denkbar, dass ein durch UVB-Schaden ausgelöster Zell-Zyklus Arrest mit zunehmendem Alter der Probanden länger anhält. Verschiedene Forschungsgruppen konnten ebenfalls zeigen, dass mit zunehmendem Lebensalter die DNS-Reparatur- und Proliferationskapazität der Zellen nachlässt (Anisimov, 2002; Wei, 1998; Rattan, 1996), so dass auch ein altersabhängig eingeschränktes Enzymsystem eine mögliche Erklärung für die in den vorliegenden Daten festgestellte verringerte Bildung von Mikronuklei nach höherer Breitband-UVB-Bestrahlung sein könnte.

6. Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde *in vitro* an humanen Keratinozyten das genotoxische Potential von therapeutisch äquivalenten Dosen einer Schmalspektrum-UVB gegenüber einer Breitspektrum-UVB Bestrahlung getestet. Dieses erfolgte mit der Etablierung des Mikronukleustests in der erweiterten Form der Zytokinese-Block Technik an humanen Keratinozyten.

Hintergrund ist der zunehmende Einsatz, der in den achtziger Jahren entwickelten Schmalspektrum-UVB Therapie (311 nm). Sie ist heute eine feste Säule der Phototherapie und verdrängt zunehmend die herkömmliche Anwendung von Breitspektrum-UVB. Da zum Erreichen vergleichender Effekte mit der Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung 10 -fach höhere Bestrahlungsdosen als bei einer Breitband-UVB-Bestrahlung benötigt werden, stellte sich die Frage, ob auch UV-induzierte DNS-Schäden in erhöhtem Maße zu erwarten sind.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei beiden UVB-Bestrahlungsspektren ein dosisabhängiger und signifikanter Anstieg der DNS-Schäden in Form von Mikronuklei zu beobachten war. Dieser zeigte sich jedoch ausgeprägter bei der Breitband-UVB-Bestrahlung. Weiterhin konnte eine deutliche dosisabhängige Reduktion der Proliferationsrate der Keratinozyten bei beiden UVB Bestrahlungen gezeigt werden. Auch hier zeigt die Breitband-UVB-Bestrahlung ein stärker DNS schädigendes Potential als die Schmalspektrum-UVB Bestrahlung. Da die kürzeren Wellenlängen des breiten UVB-Spektrums, von 280-302 nm, insbesondere für die Induktion von Pyrimidin-Dimeren verantwortlich sind und dem Absorptionsspektrum der DNS (230-300 nm) entsprechen, scheinen diese im Schmalspektrum-UVB fehlenden Wellenlängen dafür verantwortlich zu sein, dass es trotz einer 10 -fach höheren Dosierung alters-unabhängig zu einem geringeren DNS-Schadenspotential nach einer Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung kommt.

Bei der Breitband-UVB-Bestrahlung fiel weiterhin nach der Exposition mit höheren UV-Bestrahlungsdosen eine mit zunehmendem Alter tendenzielle Abnahme der Mikronukleusbildung auf. Da speziell Wellenlängen von 295-305 nm durch die vermehrte Induktion von Photoprodukten auch zu einem Zell-Zyklus Arrest führen können, ist es denkbar, dass diese Reparaturphase altersabhängig verzögert stattfindet und somit eine verminderte Anzahl an Mikronuklei und an Kernteilungen (NDI) beobachtet werden konnten. Weiterhin ist die Abnahme der

6. Zusammenfassung

Mikronukleusanzahl durch eine altersabhängig verminderte DNS-Reparatur und Proliferationskapazität denkbar. Diese würde ebenfalls einen Rückgang der Mikronukleus- und der Kernteilungsrate (NDI) erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung der Breitband-UVB-Behandlung nicht nur therapeutisch überlegen ist, sondern auch das geringere DNS-Schadenspotential einen zunehmenden Einsatz dieser Phototherapieform rechtfertigt. Im Bezug auf den Mikronukleustest lässt sich abschließend sagen, dass sich dieser problemlos auch an weiteren Zelllinien wie Keratinozyten etablieren lässt. Durch die Möglichkeit der Bestimmung von spontan entstandenen DNS-Schäden kann der Mikronukleustest eventuell eine wichtige Rolle im Rahmen eines Bio-Monitoring zur Erfassung endogener und exogener Einflüsse auf das Genom der Zelle einnehmen.

7 Anhang

Rohdaten Spontanrate:

Spontanrate	Probanden	Geschl.	Alter	n von MN pro 2000 Zellen			Mittelwert	MN [%]
				Objekt. 1	Objekt. 2	Objekt. 3		
P0305-31w	w	31	5	4	7	5	0,27	
P0305-59m	m	59	21	19	13	18	0,88	
P0405-52w	w	52	12	8	4	8	0,40	
P0604-21w	w	21	4	1	6	4	0,18	
P0605-59w	w	59	16	11	9	12	0,60	
P0804-42w	w	42	13	5	12	10	0,50	
P0804-43w	w	43	12	11	12	12	0,58	
P0804-67m	m	67	15	9	13	12	0,62	
P0806-59m	m	59	12	10	9	10	0,52	
P1006-23m	m	23	9	2	5	5	0,27	
P1006-25m	m	25	9	4	5	6	0,30	
P1006-62m	m	62	12	13	15	13	0,67	
P1102-56w	w	56	7	12	15	11	0,57	
P1102-62w	w	62	8	13	17	13	0,63	
P1204-39m	m	39	5	4	1	3	0,17	
P1304-70m	m	70	16	10	19	15	0,75	
P1507-29m	m	29	4	9	2	5	0,25	
P1603-32w	w	32	8	11	9	9	0,47	
P1606-39w	w	39	9	12	9	10	0,50	
P1606-39w	w	39	11	10	8	10	0,48	
P1607-34m	m	34	9	8	11	9	0,47	
P1607-35m	m	35	5	7	6	6	0,30	
P1706-48m	m	48	13	10	14	12	0,62	
P2207-33m	m	33	4	6	5	5	0,25	
P2406-36m	m	36	5	9	9	8	0,38	
P2604-37m	m	37	8	13	10	10	0,52	
P2704-26w	w	26	5	9	2	5	0,27	
P2904-36w	w	36	3	6	10	6	0,32	
P2904-69m	m	69	11	13	14	13	0,63	
P2907-43m	m	43	8	2	15	8	0,42	
Anzahl		30	30	30	30	30	30,00	
Mittelwert		43,5	9,3	8,7	9,5	9,2	0,46	
SD		14,5	4,4	4,0	4,7	3,6	0,18	

7 Anhang

Rohdaten Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung:

Probanden	n an MN pro 2000 Zellen			
	0 mJ/cm ²	120 mJ/cm ²	240 mJ/cm ²	590 mJ/cm ²
P0305-31w	8,5	11,0	14,8	24,0
P0305-59m	7,0	9,5	13,3	21,5
P0405-52w	10,0	14,0	10,4	18,0
P0604-21w	4,0	8,8	13,3	20,0
P0605-59w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-42w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-43w	8,0	13,0	20,0	22,0
P0804-67m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0806-59m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1006-23m	8,4	8,8	12,0	18,3
P1006-25m	4,0	7,0	15,5	31,3
P1006-62m	12,1	16,0	16,3	30,0
P1102-56w	9,0	11,3	14,0	25,0
P1102-62w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1204-39m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1304-70m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1507-29m	7,0	5,4	27,8	32,5
P1603-32w	8,0	13,7	17,3	22,9
P1606-39w	3,5	12,9	20,0	25,0
P1606-39w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-34m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-35m	6,9	7,0	9,1	11,9
P1706-48m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2207-33m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2406-36m	4,4	7,2	7,5	18,3
P2604-37m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2704-26w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-36w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-69m	12,0	15,0	13,0	11,0
P2907-43m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Anzahl	15	15	15	15
Mittelwert	7,5	10,7	14,9	22,1
SD	2,7	3,3	5,0	6,3

7 Anhang

Rohdaten Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung:

Probanden	MN %			
	0 mJ/cm ²	120 mJ/cm ²	240 mJ/cm ²	590 mJ/cm ²
P0305-31w	0,4	0,6	0,7	1,2
P0305-59m	0,4	0,5	0,7	1,1
P0405-52w	0,5	0,7	0,5	0,9
P0604-21w	0,2	0,4	0,7	1,0
P0605-59w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-42w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-43w	0,4	0,7	1,0	1,1
P0804-67m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0806-59m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1006-23m	0,4	0,4	0,6	0,9
P1006-25m	0,2	0,4	0,8	1,6
P1006-62m	0,6	0,8	0,8	1,5
P1102-56w	0,5	0,6	0,7	1,3
P1102-62w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1204-39m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1304-70m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1507-29m	0,4	0,3	1,4	1,6
P1603-32w	0,4	0,7	0,9	1,1
P1606-39w	0,2	0,6	1,0	1,3
P1606-39w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-34m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-35m	0,3	0,4	0,5	0,6
P1706-48m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2207-33m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2406-36m	0,2	0,4	0,4	0,9
P2604-37m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2704-26w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-36w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-69m	0,6	0,8	0,7	0,6
P2907-43m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Anzahl	15	15	15	15
Mittelwert	0,36	0,54	0,76	1,11
SD	0,1	0,2	0,3	0,3

7 Anhang

Rohdaten Schmalspektrum-UVB-Bestrahlung:

Probanden	NDI			
	0 mJ/cm ²	120 mJ/cm ²	240 mJ/cm ²	590 mJ/cm ²
P0305-31w	1,6	1,5	1,4	1,2
P0305-59m	1,6	1,6	1,4	1,2
P0405-52w	1,6	1,5	1,3	1,1
P0604-21w	1,8	1,6	1,5	1,3
P0605-59w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-42w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-43w	1,5	1,3	1,3	1,1
P0804-67m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0806-59m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1006-23m	1,2	1,1	1,1	1,1
P1006-25m	1,5	1,5	1,2	1,1
P1006-62m	1,5	1,2	1,2	1,2
P1102-56w	1,6	1,4	1,3	1,1
P1102-62w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1204-39m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1304-70m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1507-29m	1,6	1,4	1,1	1,1
P1603-32w	1,8	1,7	1,3	1,2
P1606-39w	1,7	1,2	1,1	1,1
P1606-39w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-34m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-35m	1,7	1,5	1,2	1,2
P1706-48m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2207-33m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2406-36m	1,6	1,5	1,1	1,1
P2604-37m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2704-26w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-36w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-69m	1,4	1,4	1,3	1,1
P2907-43m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Anzahl	15	15	15	15
Mittelwert	1,58	1,42	1,25	1,13
SD	0,2	0,2	0,1	0,1

7 Anhang

Rohdaten Breitband-UVB-Bestrahlung:

Probanden	n an MN pro 2000			MN [%]		
	0 mJ/cm ²	15 mJ/cm ²	25 mJ/cm ²	0 mJ/cm ²	15 mJ/cm ²	25 mJ/cm ²
P0305-31w	8,5	8,8	9,5	0,4	0,4	0,5
P0305-59m	7,0	9,2	21,0	0,4	0,5	1,0
P0405-52w	10,0	6,0	6,6	0,5	0,3	0,3
P0604-21w	4,0	11,0	14,0	0,2	0,6	0,7
P0605-59w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-42w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-43w	8,0	16,7	26,5	0,4	0,8	1,3
P0804-67m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P0806-59m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1006-23m	8,4	10,5	26,5	0,4	0,5	1,3
P1006-25m	4,0	10,0	10,1	0,2	0,5	0,5
P1006-62m	12,1	12,9	20,0	0,6	0,6	1,0
P1102-56w	9,0	13,0	24,6	0,5	0,7	1,2
P1102-62w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1204-39m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1304-70m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1507-29m	7,0	24,5	39,5	0,4	1,2	2,0
P1603-32w	8,0	15,0	28,0	0,4	0,8	1,4
P1606-39w	3,5	15,5	23,3	0,2	0,8	1,2
P1606-39w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-34m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-35m	6,9	15,0	16,7	0,3	0,8	0,8
P1706-48m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2207-33m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2406-36m	4,4	18,3	28,6	0,2	0,9	1,4
P2604-37m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2704-26w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-36w	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-69m	12,0	14,0	18,5	0,6	0,7	0,9
P2907-43m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Anzahl	15	15	15	15	15	15
Mittelwert	7,5	13,4	20,9	0,36	0,67	1,0
SD	2,7	4,5	8,7	0,1	0,2	0,4

7 Anhang

Rohdaten Breitband-UVB-Bestrahlung:

Probanden	NDI		
	0 mJ/cm ²	15mJ/cm ²	25 mJ/cm ²
P0305-31w	1,6	1,5	1,4
P0305-59m	1,6	1,5	1,3
P0405-52w	1,6	1,3	1,2
P0604-21w	1,8	1,5	1,3
P0605-59w	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-42w	n.d.	n.d.	n.d.
P0804-43w	1,5	1,3	1,1
P0804-67m	n.d.	n.d.	n.d.
P0806-59m	n.d.	n.d.	n.d.
P1006-23m	1,2	1,1	1,1
P1006-25m	1,5	1,4	1,2
P1006-62m	1,5	1,2	1,1
P1102-56w	1,6	1,2	1,2
P1102-62w	n.d.	n.d.	n.d.
P1204-39m	n.d.	n.d.	n.d.
P1304-70m	n.d.	n.d.	n.d.
P1507-29m	1,6	1,4	1,2
P1603-32w	1,6	1,4	1,2
P1606-39w	1,7	1,1	1,1
P1606-39w	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-34m	n.d.	n.d.	n.d.
P1607-35m	1,7	1,4	1,2
P1706-48m	n.d.	n.d.	n.d.
P2207-33m	n.d.	n.d.	n.d.
P2406-36m	1,6	1,1	1,1
P2604-37m	n.d.	n.d.	n.d.
P2704-26w	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-36w	n.d.	n.d.	n.d.
P2904-69m	1,4	1,3	1,2
P2907-43m	n.d.	n.d.	n.d.
Anzahl	15	15	15
Mittelwert	1,56	1,32	1,19
SD	0,1	0,1	0,1

7 Anhang

Rohdaten zur Bestimmung der optimalen Cytochalasin-B Bestimmung:

Konzentration von Cyt-B							
	0 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	6 µg/ml	8 µg/ml
Mono-nukleat	190	112	90	154	170	174	182
Binukleat	10	88	110	46	30	26	18

T-Test ; Variable 1= Spontanrate weiblich, Variable 2=Spontanrate männlich:

Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen		
	Variable 1	Variable 2
Mittelwert	0,44358974	0,47058824
Varianz	0,02099715	0,04126838
Beobachtungen	13	17
Gepoolte Varianz	0,03258071	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	28	
t-Statistik	-0,40597074	
P(T<=t) einseitig	0,34392501	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,70113026	
P(T<=t) zweiseitig	0,68785002	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,04840944	

8 Literaturverzeichnis

Abeck D., Stüb F. (1996): Urokainsäure – eine essentielle multifunktionelle Komponente der menschlichen Haut.
Akt. Dermatol., 22: 123-128

Abts H. F., Breuhahn K., Michel G., Köhrer K., Esser P., Ruzicka T. (1997): Analysis of UVB-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction.
Photochem. Photobiol., 66: 363-367

Anisimov V. N. (2002): Aging and carcinogenesis.
Adv. Gerontol., 10: 99-125

Bais B. A., Zerefos C. S., Meleti C., Ziomas I. C., Tourpali K. (1993): Spectral measurements of solar UVB radiation and its relations to total ozone, SO₂ and clouds.
Journal of Geophysical Research, 98: 5199-5204

Beissert S., Mohammad T., Torri H., Lonati A., Yan Z., Morrison H., Granstein R. D. (1997): Regulation of tumor antigen presentation by urocanic acid.
J. Immunol., 159: 92-96

Berg-Drewniok B., Weichenthal M., Ehlert U., Rümmelein B., Breitbart E. W., Rüdiger H. W. (1997): Increased spontaneous formation of micronuclei in cultured fibroblasts of first-degree relatives of familial melanoma patients.
Cancer Genet. Cytogenet., 97: 106-110

Bohnert E. (1993): Zur Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf die Haut.
Jahrbuch der Dermatologie 1992/ 93, Licht und Haut: 41-46, Biermann Verlag FRG

Bojkov R. D., Zerefos C. S., Balis D. S., Ziomas I. C., Bais A. F. (1993): Record low total ozone during northern winters of 1992 and 1993.
Geophysical Res. Letters, 20: 1351-1354

Boone C. W., Kellhoff G. J. (1994): Development of surrogate endpoint biomarkers for clinical cancer chemopreventive agents: Relationship to fundamental properties of preinvasive (intraepithelial) neoplasia.
J. Cell. Biochem., 19: 10-22

Bourre F., Renault G., Sarasin A. (1987): Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiation SV 40 DNA.
Nucleic Acids Res., 15: 8861-8875

Brash D. E., Rudolph J. A., Simon J. A., Lin A., McKenna G. J., Baden H. P., Halperin A. J., Ponten J. (1991): A role of sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 10124-10128

Cheng K. C., Cahill D. S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L. A. (1992): 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitution.
J. Biol. Chem., 267: 166-172

8 Literaturverzeichnis

Countryman P. I., Heddle J. A. (1976): The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mut. Res.*, 41: 321-332

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

Degitz K., Messer G., Plewig G., Röcken M. (1998): Schmalspektrum-UVB 311 nm versus Breitspektrum-UVB, Neue Entwicklungen in der Phototherapie. *Hautarzt*, 49: 795-806

Douki T., Zaluzniak T., Cadet J. (1997): Far UV-induced dimeric photoproducts in short oligonucleotides: sequence effects. *Photochem. Photobiol.*, 66: 171-179

Dreosti I. E., Baghurst P. A., Patrick E. J., Turner J. (1990): Induction of micronuclei in cultured murine splenocytes exposed to elevated levels of ferrous ions, hydrogen peroxide and ultraviolet irradiation. *Mut. Res.*, 244: 337-343

Emri G., Wenczl E., van Erp P., Jans J., Roza L., Horkay I., Schothorst A. A. (2000): Low dose of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol.*, 3: 435-440

Evans H. J., Neary G. J., Williamson F. S. (1959): The relative biological effectiveness of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen, part II chromosome damage: the production of micronuclei *Intern. J. Radiation Biol.*, 1: 216-229

Freeman S. E., Gangel R. W., Matzinger E. A., Sutherland B. M. (1986): Higher pyrimidine dimer yields in skin of normal humans with higher UVB sensitivity.

Fenech M., Morley A. A. (1985a): Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mut. Res.*, 147: 29-36

Fenech M., Morley A. A. (1986): Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose x-irradiation. *Mut. Res.*, 161: 193-198

Fenech M. (1992): The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut. Res.*, 285: 35-44

Fenech M., Rinaldi J. (1994): The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis* 15 (7): 1405-1411

8 Literaturverzeichnis

Fenech M., Rinaldi J. (1995): A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians.
Carcinogenesis 16 (2): 223-230

Fenech M., (1996): Chapter 2: The cytokinesis-block micronucleus technique.
In: Pfeifer G. P., Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Plenum Press NY: 25-36

Fenech M., (1998): Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine.
Mut. Res., 428: 299-304

Fenech M., (1998): Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations.
Mut. Res., 404: 155-165

Fenech M., (2000): The in vitro micronucleus technique.
Mut. Res., 455: 81-95

Fischer T. (1976): UV-light treatment of psoriasis.
Acta. Derm. Venerol. (Stockh) 56: 473-479

Fitzpatrick T. B., Johnson R. A., Wolff K., Polano M. K., Suurmond D. (1997): Color atlas and synopsis of clinical dermatology, common and serious diseases.
Mc Graw-Hill, USA 1997, third edition

Flindt-Hansen H., Mc Fadden N., Eeg-Larsen T., Thune P. (1991): Effect of a new narrowband UVB lamp on photocarcinogenesis in mice
Acta. Derm. Venerol., 71: 245-248

Freeman S. E., Hachman H., Gange R. W., Maytum D. J., Sutherland J. C., Sutherland B. M. (1989): Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light.
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86: 5605-5609

Fritzenschaf H., Kohlpoth M., Rusche B., Schiffmann D. (1993): Testing of known carcinogens and noncarcinogens in the syrian hamster embryo (SHE) micronucleus test in vitro; correlations with in vivo micronucleus formation and cell transformation.
Mut. Res., 319: 47-53

Gibbs N. K., Traynor N. J., Mac Kie R. M., Campell I., Johnson B. E., Ferguson J. (1995): The phototumorigenic potential of broad-band (270-350 nm) and narrow-band (311-313 nm) phototherapy sources cannot be predicted by their edematogenic potential in hairless mouse skin.
J. Invest. Dermatol., 104: 359-363

Greinert R., Volkmer B., Wende A., Voss S., Breitbart E. W. (2003): Prävention von Hautkrebs.
Hautarzt, 12: 1152-1163

8 Literaturverzeichnis

Griffiths H. R., Pratibha M., Herbert K. E., Lunec J. (1998): Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity.
Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 35(3): 189-237

Gupta G., Long J., Tillman D. M. (1998): The efficacy of narrowband ultraviolet B phototherapy in psoriasis using objective and subjective outcome measures.
Br. J. Derm., 140: 887-890

Heddle J. A. (1973): A rapid in vivo test for chromosome damage.
Mut. Res., 18: 187-192

Henseleit U., Zhang J., Wanner R., Haase I., Kolde G., Rosenbach T. (1997): Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT-keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. Res., 288: 676-683

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

Hunt G., Kyne S., Ito S., Wakamatsu K., Todd C., Thody A. (1995): Eumelanin and phaeomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes.
Pigment Cell Res., 8: 202: 208

Iqbal M. (1986): An introduction to solar radiation.
New York, Academic Press, 1983

Kaidbey K. H., Agin P. P., Sayre R. M., Kligman A. M. (1979): Photoprotection by melanin – a comparison of black and caucasian skin.
J. Am. Acad. Dermatol., 1: 249-260

Karvonen J., Kokkonen E.-L., Routsalainen E. (1989): 311nm UVB lamps in the treatment of psoriasis with the Ingram regimen.
Acta. Derm. Venerol. (Stockh.), 69: 82-85

Keulers R. A. C., Roon A. R., de Roode S, Tates A. D. (1998): The induction and analysis of micronuclei and cell killing by ultraviolet-B radiation in human peripheral blood lymphocytes.
Photoch. Photobiol., 67 (4): 426-432

Kindl G., Raab W. (1998): Licht und Haut.
Govi Verlag, Frankfurt. 4. neubearbeitete Auflage

Krutmann J. (2003): Vorzeitige Hautalterung durch ultraviolette Strahlung und andere Umwelttoxene.
Hautarzt, 9: 809-817

Lehmann J., Pollet D., Peker S., Steinkraus V., Hoppe U. (1998): Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT-keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay.
Mut. Res., 407: 97-108

8 Literaturverzeichnis

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: 1276-1281

Lippke J. A., Gordon L. K., Brash D. E., Haseltine W. A. (1981): Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkali-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 3388-3392

Macher E., Kolde G., Bröcker E. B. (1992/93): Licht und Haut. *Jahrbuch der Dermatologie 1992/93*, Biermann Verlag FRG

Madronich S., Björn L. O., Ilyas M., Caldwell M. M., (1991): Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *United nations Environment Programme*, chapter 1, nov. 1-4

Menon I. A., Persad S., Ranadive N. S., Habermann H. F. (1983): Effects of ultra violet-visible irradiation in the presence of melanin isolated from human black or red hair upon ehrlich ascites carcinoma cells. *Cancer Res.*, 43: 3165-3169

Miescher, G. (1931): Die Schutzfunktion der Haut gegenüber Lichtstrahlen. *Strahlentherapie* 39 (1931) 601-618

Mitchell D. L., Karentz D. (1993): The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Young A. R., Björn L. O., Moan J., Nultsch W., *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press New York, ISBN 0-306-44443-7: 345-377

Morrison H. (1985): Photochemistry and photobiology of urocanic acid. *Photodermatology* 2: 158-165

Noonan F. P., de Fabo E. C. (1992): Immunosuppression by ultraviolet B irradiation: initiation by urocanic acid. *Immunol. Today*, 13: 250-254

Ostling O., Johanson K. J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Communications*, 1 (123): 291-298

Parrish J. A., Jaenicke K. F. (1981): Action spectrum for phototherapy of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 76 (5): 359-62

Peak M. J., Peak J. G., Canes B. A. (1987): Induction of direct and indirect single strand breaks in human cell DNA by far and near UV radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, 45: 381-7

Rattan S. I.(1996): Cellular and molecular determinants of aging. *Indian. J. Exp. Biol.*, 34 (1): 1-6

8 Literaturverzeichnis

Roelandts R. (2002): The history of phototherapy: something new under the sun?
J. Am. Acad. Dermatol. 2002 Jun; 46 (6): 926-30

Romagna F. (1993): Mikrokerntestsysteme.
Fahrig R. (Hrsg.), Mutationsforschung und genetische Toxikologie. Wissenschaftliche
Buchgesellschaft, Darmstadt, 290-298

Rosenstein B. S., Mitchell D. L. (1987): Action spectra for the induction of
pyrimidine (6-4) pyrimidon photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in
normal human skin fibroblasts.
Photochem. Photobiol., 45: 775-7 80

**Roser M., Frenzer S., Schmidt-Preuss U., Reimers U., Weichenthal M., Breitbart
E. W., Rudiger H. W. (1989):** Chromosome instability in patients with malignant
melanoma of the skin.
Onkol., 12 (6): 286-90

Rünger T. M. (1995): DNA-Schäden in der Haut durch ultraviolette Strahlung.
Medizinische Klinik, 90: 22-26

Rünger T. M., Epe B., Möller K. (1995): Repair of ultraviolet B and singlet
oxygeninduced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells.
J. Invest. Dermatol., 104: 68-73

Ryter S. W., Tyrrell R. M. (1998): Singlet molecular oxygen: a possible effector of
eukaryotic gene expression.
Free Rad. Biol. Med., 2: 15201534

Sage E. (1993): Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic
consequences and the role of sequence context.
Photochem. Photobiol., 57: 163-174

Scherschun L., Kim J. J., Lim H. W. (2001): Narrowband ultraviolet B is a useful
and well-tolerated treatment for Vitiligo.
J. Am. Acad. Dermatol., Vol. 44, (6): 999-1003

Schmid, W. (1975): The micronucleus test.
Mut. Res., 31: 9-15

Schwarz T. (2003): Effekte von ultravioletter Strahlung auf das Immunsystem.
JDDG 2 2003 (Band1), 142-150

Seckmeyer G., Bernhard G. (1993): Cosine error correction of spectral UV
irradiances.
Stamnes K. (Hrsg.) Atmospheric Radiation, Vol. 2049. Bellingham: Europto Series

Seckmeyer G., Mayer B., Erb R., Bernhard G. (1994): UVB in Germany higher in
1993 than in 1992.
Geophys. Res. Lett., 21: 7

8 Literaturverzeichnis

Seckmeyer G., Mayer B., Bernhard G., Albold A., Erb R., Jäger H., Stockwell W. R. (1997): New maximum UV irradiance levels observed in central Europe. Atmospheric Environment, 31: 2971-2976

Singh N. P., Mc Coy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175: 184-191

Singh N. P., Danner D. B., Tice R. R., Mc Coy M. T., Collins G. D., Schneider E. L. (1989): Abundant alkali-sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. Experimental Cell Research, 184: 461-470

Smith M. L., Chen I. T., Zhan Q., O'Connor P. M., Fornace A. J. Jr. (1995): Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of UV-type DNA-damage. Oncogene, 10: 1053-1059

Stewart S. M., Cameron G. S., Pence B. B. (1996): Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. J. Invest. Dermatol., 106: 1086-1089

Stick C., Pielke L. (1998): Die Zusammensetzung der solaren UV-Strahlung im Tagesverlauf. Akt. Dermatol., 24: 1509-16

Stopper H., Müller S. O. (1997): Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. Toxicology in vitro, 11: 661-667

Storbeck K., Holzle E., Lehmann P., Schürer N., Plewig G. (1991): Die Wirksamkeit eines neuen Schmalspektrum-UVB Strahlers (Philips TI01/100 W, 311 nm) im Vergleich zur konventionellen UVB-Phototherapie der Psoriasis. Z. Hautkr., 66: 708-712

Storbeck K., Holzle E., Schurer N., Lehmann P., Plewig G. (1993): Narrow-band UVB (311nm) versus conventional broad-band UVB with and without dithranol in phototherapy for psoriasis. J. Am. Acad. Dermatol. 1993, 28 (2 PT 1): 227-31

Strodtholz I. (1997): In vitro-Untersuchungen zu Schutzwirkungen gegen genotoxische Effekte von UV-Strahlung in humanen Keratinozyten. Diplomarbeit Fachhochschule Lippe, Fachbereich Lebensmitteltechnologie.

Tanew A., Radakovic-Fijin S., Schemper M., Hönigsmann H. (1999): Narrowband UVB phototherapy vs. photochemotherapy in the treatment of chronic plaque-type psoriasis. Arch. Dermatol., Vol.,135: 519-524

Tice R. R., Andrews P. W., Hirai O., Singh N. P. (1990): The single cell gel (SCG) assay: An electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. Biological Reactive Intermediates, 4: 157-164

8 Literaturverzeichnis

- Tsai M.-H., Hwang J.-S., Chen K.-C., Lin Y.-P., Hsieh W. A., Chang W. P. (2001):** Dynamics of changes in micronucleus frequencies in subjects post cessation of chronic low-dose radiation exposure.
Mut. Res., vol. 16 (3): 251-255
- Tzung T. Y., Runger T. M. (1998):** Assessment of DNA damage induced by broadband and narrowband UVB in cultured lymphoblastes and keratinocytes using the comet assay.
Photochem. Photobiol., 67 (6): 647-50
- Umegaki K., Fenech M. (2000):** Cytocinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils.
UK Environmental Mutagen Society/Oxford University Press
- Unna P. G. (1894):** Traumatische Entzündungen aus physikalischen Ursachen.
In: Die Histopathologie der Hautkrankheiten, 80 - 81. Berlin: August Hirschwald
- Van Weelden H., De la Faille H. B., Young E., Van der Leun J. C. (1988):** A new development in UVB phototherapy of psoriasis.
Br. J. Dermatol., 119: 11-19
- Venkatachalam P., Paul S. F. D., Mohankumar M. N., Prabhu B. K., Gajendiran N., Kathiresan A., Jeevanram R. K. (1998):** Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients.
Mut. Res., 425: 1-8
- Vral A., Verhaegen F., Thiersens H., de Ridder L. (1994):** The in vitro cytokinesis-block micronucleus assay. A detailed description of an improved slide preparation technique for the automated detection of micronuclei in human lymphocytes.
Mutagenesis, 5: 439-443
- Walters I. B., Burack L. H., Coven T. R., Gilleaudeau P., Krueger J. G. (1999):** Suberythemogenic narrow-band UVB is markedly more effective than conventional UVB in treatment of psoriasis vulgaris.
J. Acad. Dermatol., 40 (6 PT 1): 893-900
- Wang Y., Rosenstein B., Goldwyn S., Zhang X., Lebwohl M., Wie H. (1998):** Differential regulation of p53 and Bcl-2 expression by ultraviolet A and B.
J. Invest. Dermatol., 111: 380-384
- Wei Q. (1998):** Effect of aging on DNA repair and skin carcinogenesis: a minireview of population-based studies.
J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 3 (1): 19-22
- Weller E. M., Hain J., Jung T., Kinder R., Köfferlein M., Burkart W., Nüsse M. (1996):** UVB-induced cell cycle perturbations, micronucleus induction, and modulation by caffeine in human keratinocytes.
International Journal of Radiation Biology, 69: 371-384

8 Literaturverzeichnis

Wenczl E., Van der Schans G. P., Roza L., Kolb R. M., Timmermann A. J., Smit N. P. M., Pavel S., Schothorst A. A. (1998): (Phaeo)melanin photosensitises UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes.

J. Invest. Dermatol., 111: 678-682

Westerhof W. (2000): Vitiligo management update.

Skin Therapy Lett. 2000, 5 (6): 1-2, 5

Wulf H. C., Hansen A. B., Bech-Thomsen N. (1994): Differences in narrow-band ultraviolet B and broad-spectrum ultraviolet photocarcinogenesis in lightly pigmented hairless mice.

Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 10: 192-197

Zhang X., Rosenstein B. S., Wang Y., Lebwohl M., Mitchell D. M., Wie H. (1997): Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells.

Photochem. Photobiol., 65: 119-124

Ziegler A. M., Leffell D. J., Kunala S., Sharma H. W., Gailani W., Simon J., Halperin A., Baden A. J., Shapiro P. E., Bale A. E., Brash D. E. (1993): Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancer.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 4216-4220

Lebenslauf

Name: Nicola Otte

Geburtsdatum: 17. November 1973

Geburtsort: Bünde

Anschrift: Geibelstr. 47a
22303 Hamburg
Tel.: 040/278 071 79

Internet: nic.otte@gmx.de

Eltern: Mutter Karin Otte, geb. Steinmeier
Ltd. MTA
Vater Norbert Otte
Kaufmann

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulausbildung: 1980 – 1984 Grundschule Bünde - Mitte, Bünde
1984 – 1993 Gymnasium am Markt, Bünde
1993 Abitur, Gymnasium am Markt, Bünde

Studium: 10/1993 Immatrikulation an der Universität
Hamburg
03/1996 ärztliche Vorprüfung
03/1997 1. Staatsexamen
03/2000 2. Staatsexamen
06/2001 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr: 05/2000-08/2000 1.Tertial: Abteilung für Chirurgie
Kreuzspital Chur, Schweiz
09/2000-12/2000 2.Tertial: Abteilung für Innere Medizin
Allgemeines Krankenhaus St. Georg,
Hamburg
12/2000-04/2001 3.Tertial: Abteilung für Dermatologie
Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg

Berufstätigkeit: 08/2002-01/2003 AIP, Praxis Prof. Dr. V. Steinkraus
und Partner, Hamburg
02/2003 Assistenzärztin, Praxis Prof. Dr. V. Steinkraus
und Partner, Hamburg

Danksagung

Nachfolgend möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Herrn Professor Dr. V. Steinkraus, für die Überlassung des Themas im Dermatologikum Hamburg, für die exzellente wissenschaftliche und persönliche Motivation und seine stets anregenden und konstruktiven Ideen.

Herrn Dr. Degwert, für die Möglichkeit, in dem unter seiner Leitung stehenden Institut Skin Investigation and Technology (SIT GmbH Hamburg) im Rahmen der vorliegenden Dissertation zu arbeiten, sowie für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Den **wissenschaftlichen Mitarbeitern** des Dermatologikums Hamburg sowie des SIT Instituts für die gute Betreuung und Zusammenarbeit.

Karin Otte, meiner Mutter, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt hat, mir mit Liebe und Geduld zur Seite stand und deren unermüdliche Motivation eine wesentliche Triebfeder meiner Promotion war.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die 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 entnommenen 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 an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Nicola Otte