

Aus dem Institut für  
umweltmedizinische Forschung (IUF)  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

**Infrarot-A Strahlung moduliert  
Ultraviolett-B induzierte  
DNS Schäden und  
deren Reparatur in humanen  
Hautfibroblasten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Katharina Beutelmann

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit  
Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

*Für meine Eltern, Markus  
und Victoria*

# **Infrarot-A Strahlung moduliert Ultraviolett-B induzierte DNS Schäden und deren Reparatur in humanen Fibroblasten**

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Sonnenspektrum.....	1
1.2 Die menschliche Haut.....	5
1.2.2 Gliederung.....	5
1.2.3 Epidermis.....	6
1.2.4 Dermis.....	8
1.2.5 Unterhaut, Subcutis.....	10
1.2.6 Hautalterung.....	10
1.3 Die Bedeutung von Infrarotstrahlung.....	11
1.4 Ultraviolettstrahlung und der Zusammenhang mit der Karzinogenese der Haut.....	13
1.4.1 Epidemiologische Erkenntnisse.....	13
1.4.2 UV-Strahlung und ihre Auswirkungen auf die DNS.....	14
2 Wissenschaftliche Fragestellung.....	19
3 Materialien und Methoden.....	21
3.1 Materialien.....	21
3.1.1 Beschreibung der verwendeten Zellen und des pUC Plasmides.....	21
3.1.2 Zusammensetzung von Zellkultur-Medien.....	21
3.1.3 Zellkultur-Zusätze und Reagenzien.....	22
3.1.4 Kit-Systeme.....	23
3.1.5 Verwendete Geräte.....	23
3.1.6 Verwendete Software zur Datenauswertung .....	24
3.1.7 Sonstige Materialien.....	24

## Inhaltsverzeichnis

3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Kultivierung dermalen Fibroblasten im Monolayer.....	24
3.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung .....	25
3.2.3 Zellbestrahlung .....	26
3.2.4 Zentrifugation von Zellen.....	27
3.2.5 Alkalischer Comet Assay.....	27
3.2.5.1 Detektion von DNS Strangbrüchen mit Hilfe des Alkalischen Comet Assay.....	27
3.2.5.2 Durchführung.....	29
3.2.5.3 Auswertung und Analyse.....	30
3.2.6 Durchflusszytometrie.....	31
3.2.6.1 Messung der Zellvitalität mit Hilfe von Annexin V-PI .....	32
3.2.6.2 Quantifizierung der H2A.X Phosphorylierung .....	32
3.2.6.3 Messung der Zellproliferation mit Hilfe von BrdU Färbung.....	34
3.2.7 Plasmid DNS Assay (Detektion von direkten DNS-Schäden).....	35
3.2.8 Trypan Blau Test (Messung der Zellvitalität).....	36
3.2.9 Statistische Analyse.....	36
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Die Kombination von IRA und UVB wirkt anders auf die Integrität der DNS als die Summe der Einzelbestrahlungen.....	38
4.2 Sequenzabhängigkeit des IRA-Effektes .....	39
4.3 Dosisabhängigkeit des IRA-Effektes.....	40
4.4 Zeitabhängigkeit des IRA-Effektes.....	42
4.5 Spezifität des IRA-Effektes.....	43
4.6 Terminierung des IRA-Effektes.....	45
4.6.1 Wirkung auf die DNS Neusynthese.....	45
4.6.2 Wirkung auf reine Plasmid DNS.....	47
4.6.3 Die Rolle von Doppelstrangbrüchen.....	48
4.6.4 Wirkung auf die NER.....	50

## Inhaltsverzeichnis

5 Diskussion.....	52
6 Zusammenfassung.....	62
7 Literaturverzeichnis.....	64
8 Abkürzungsverzeichnis.....	72
9 Anhang.....	75
9.1 Danksagung.....	75
9.2 Lebenslauf.....	78
9.3 Erklärung.....	80

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Sonnenspektrum

Die Sonne ist mit einer Entfernung von 149,6 Millionen Kilometern der unserer Erde am nächsten gelegene Stern und der Zentralkörper unseres Sonnensystems. Sie besitzt etwa die 333000 fache Masse der Erde. Wie alle Sterne ist sie ein glühender Gasball. Sie setzt sich zu ca. 72 % aus Wasserstoff und zu etwa 26 % aus Helium zusammen. Der restliche Anteil besteht aus verschiedenen Elementen wie Sauerstoff, Kohlenstoff, Neon, Stickstoff, Magnesium und Metallen.

Im Sonnenkern beträgt die Temperatur etwa 15 Millionen Kelvin. Unter dieser Temperatur und dem herrschenden Druck von 2 Milliarden Bar finden Kernfusionen statt bei der aus Wasserstoff Helium entsteht. Dabei wird ein verschwindend geringer Teil der ursprünglich vorhandenen Materie in Energie umgewandelt. Dennoch decken die Kernprozesse noch auf mehrere Milliarden Jahre hinaus den Energiebedarf der Sonne. Die so erzeugte Energie wird zunächst, indem sie ständig von den Atomen der Sonne absorbiert und wieder emittiert wird, an die Oberfläche der Sonne transportiert (Wasner S, 2001). Dort liegt die Temperatur bei ca. 5700 Kelvin. Die abgestrahlte Strahlung kann nach dem Planckschen Strahlungsgesetz bestimmt werden, indem die Sonne als Schwarzkörper betrachtet wird, da die Oberflächentemperatur der Sonne nahezu homogen ist.

Folgende Funktion gibt die Bestrahlungsstärke einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit der Temperatur:

$$I(\lambda, T) = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1}$$

wobei:

I = Spektrale Bestrahlungsstärke [W m<sup>-2</sup> nm<sup>-1</sup>]

λ = Wellenlänge [m]

T = Schwarzkörpertemperatur [K]

## Einleitung

$h$  = Planck Konstante [ $6,626 \times 10^{-34}$  J s]

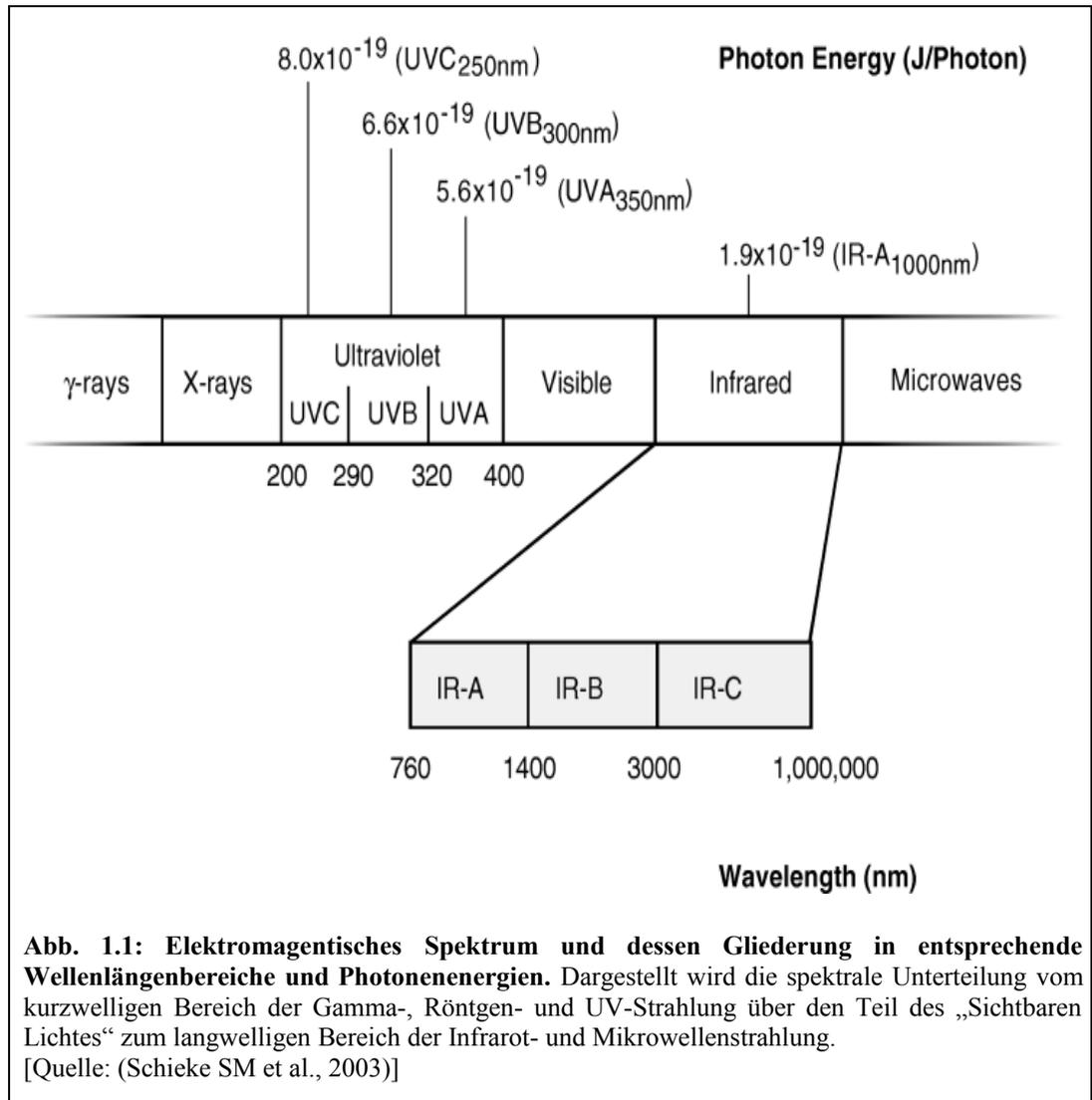
$c$  = Lichtgeschwindigkeit [ $299 \times 10^6$  m/s]

$k$  = Boltzmann Konstante [ $1,38$  J K<sup>-1</sup> ]

Diese Gesamtstrahlung kann in das Sonnenspektrum zerlegt, das im kurzwelligen Bereich Röntgenstrahlen enthält und bis in den langwelligen Bereich (Infrarot-Spektrum) zu den längsten elektromagnetischen Wellen reicht. Das Sonnenspektrum umfasst dabei einen Wellenlängenbereich von mehr als neun Zehnerpotenzen.

Einige Bereiche des Sonnenspektrums lassen sich an der Erdoberfläche gar nicht oder nur abgeschwächt beobachten, da sie in der Erdatmosphäre absorbiert werden, so zum Beispiel der UVC-Bereich und der Röntgenanteil. Eine Erforschung dieser Anteile war daher erst mit der Entwicklung der Raketen- und Satellitentechnik möglich. Das am Erdboden empfangene Sonnenspektrum wird als terrestrisches Sonnenspektrum bezeichnet, das extraterrestrische Sonnenspektrum misst man oberhalb der Erdatmosphäre (Wasner S, 2001).

Das terrestrische Sonnenspektrum enthält den Wellenlängenbereich von 290 bis 10000 nm und beinhaltet Ultraviolettstrahlung (UV) (UVB 290-320 nm, UVA 320-400 nm), sichtbares Licht (400-700 nm) und Infrarotstrahlung (IR) (IRA 760-1440 nm, IRB 1440-3000 nm, IRC 3000-10000 nm) (Endres & Breit, 2001). Die Prozentanteile an Energie, die auf der Erde in Form von Strahlung auftreten, betragen für UV-Licht 6,8 %, bei sichtbarem Licht 38,9 % und für IR-Strahlung 54,3 % (Schieke SM et al., 2003).



In Abbildung 1.2 ist das theoretisch berechnete Schwarzkörperspektrum bei einer Temperatur von 5700 K, ein gemessenes extraterrestrisches und ein gemessenes interterrestrisches Spektrum zu sehen. Die Differenz zwischen der theoretischen Strahlung und der Sonnenstrahlung außerhalb der Atmosphäre entsteht durch Inhomogenität der Sonnenoberfläche. Diese Inhomogenitäten können Sonnenflecken, Sonnenfackeln oder Protuberanzen sein, wodurch die Oberflächenenergie der Sonne lokal schwankt. Dennoch ist die Gesamtstrahlung (Solarkonstante) mit  $1366 \text{ W/m}^2 \pm 2,4 \%$  nahezu konstant (Wallace und Hobbs, 2006).

## Einleitung

Die Differenz zwischen terrestrischer und extraterrestrischer Strahlung ergibt sich aus der Albedo (Reflexion an der Atmosphäre) oder durch Absorptionsbanden verschiedener Gase, wie zum Beispiel Ozon eine Absorptionsbande bei einer Wellenlänge kleiner 300 nm besitzt, wodurch fast kein hochenergetisches UVC zum Erdboden gelangt. Ein Teil von solarem UVB wird vom Ozon der oberen Stratosphäre absorbiert. Ein Teil erreicht jedoch die Erdoberfläche und ist unter anderem für die Entstehung von Erythemen, Hautalterung und Photokarzinogenese verantwortlich (Drolet BA & Connor MJ, 1992).

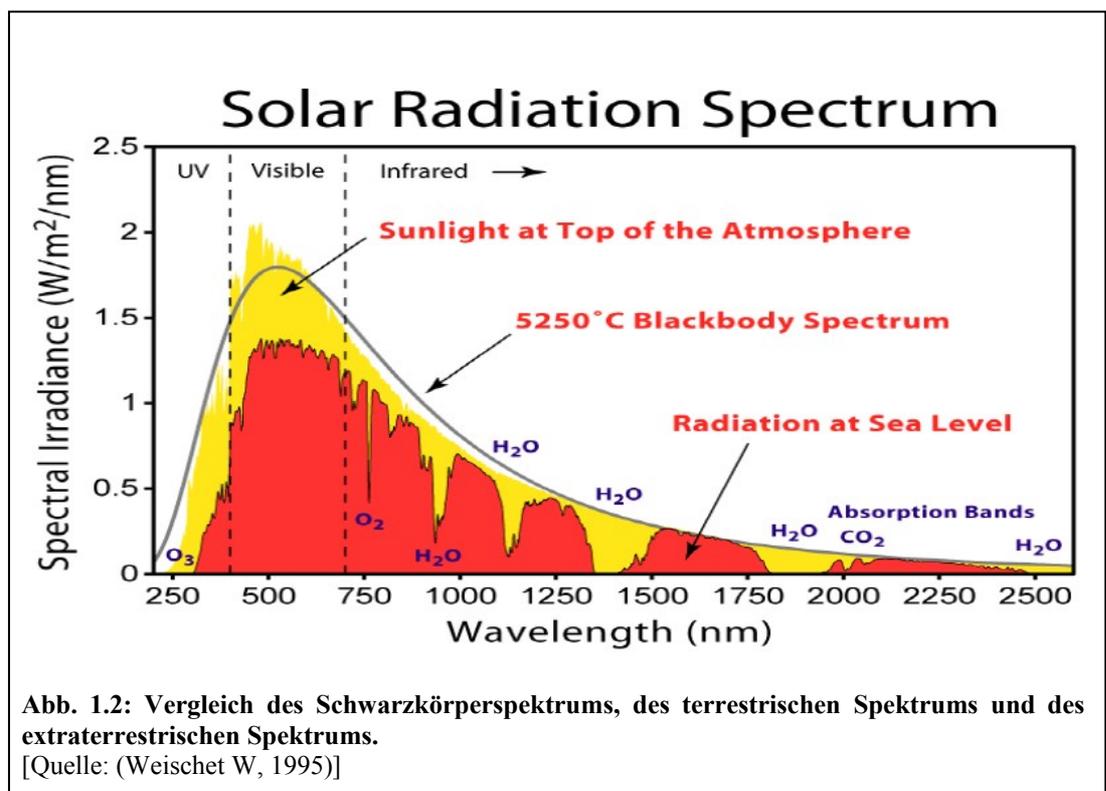


Abb. 1.2: Vergleich des Schwarzkörperspektrums, des terrestrischen Spektrums und des extraterrestrischen Spektrums.  
[Quelle: (Weischet W, 1995)]

## **1.2 Die menschliche Haut**

### **1.2.1 Funktionen**

Die Haut (Cutis = Integumentum commune = Körperdecke) ist das größte Organ des Menschen und bedeckt die äußere Körperoberfläche. Sie ist 1,5-1,8 m<sup>2</sup> groß und ihr Gewicht beträgt etwa 3 kg (Jung EG, 1998). Die Haut schützt den Körper vor chemischen, mechanischen und thermischen Schäden sowie vor zahlreichen Krankheitserregern und bestimmten Strahlungsarten. Sie ist beim Menschen die wichtigste periphere Einrichtung zur Temperaturregulation, indem sie bei übermäßiger Erhitzung des Körpers durch Absonderung von Schweiß den Körper abkühlt, andererseits den Körper vor Austrocknung schützt (Schiebler TH & Schmidt W, 2003). Mit Hilfe nervöser Strukturen können an der Haut Druck, Schmerz und Temperatur wahrgenommen werden. Die Haut ist ein lebenswichtiges Organ. Bei Verbrennungen von mehr als 20 % der Hautoberfläche (etwa eines Arms) kann ein lebensbedrohlicher Zustand entstehen, der unter anderem durch Salz- und Wasserverlust verursacht wird (Schiebler TH & Schmidt W, 2003; Moll KJ & Moll M, 2003).

### **1.2.2 Gliederung**

Die Haut besteht aus zwei Hauptschichten:

- Cutis. Sie wird unterteilt in:
  - Epidermis (Oberhaut)
  - Corium, Dermis (Lederhaut)
  
- Subcutis (Unterhaut)

Epidermis und Dermis bestehen ihrerseits aus mehreren Schichten, die lichtmikroskopisch gut voneinander zu unterscheiden sind. Beide Schichten sind

fest verzahnt. Funktionell - aber nicht entwicklungsgeschichtlich - gehört die Unterhaut, Subcutis, zur Haut. Hierbei handelt es sich um eine lockere Bindegewebeschicht, die die Haut mit tiefer gelegenen Schichten (z.B. Faszien von Muskelgewebe) verbindet (Moll KJ & Moll M, 2003; Schiebler TH & Schmidt W, 2003).

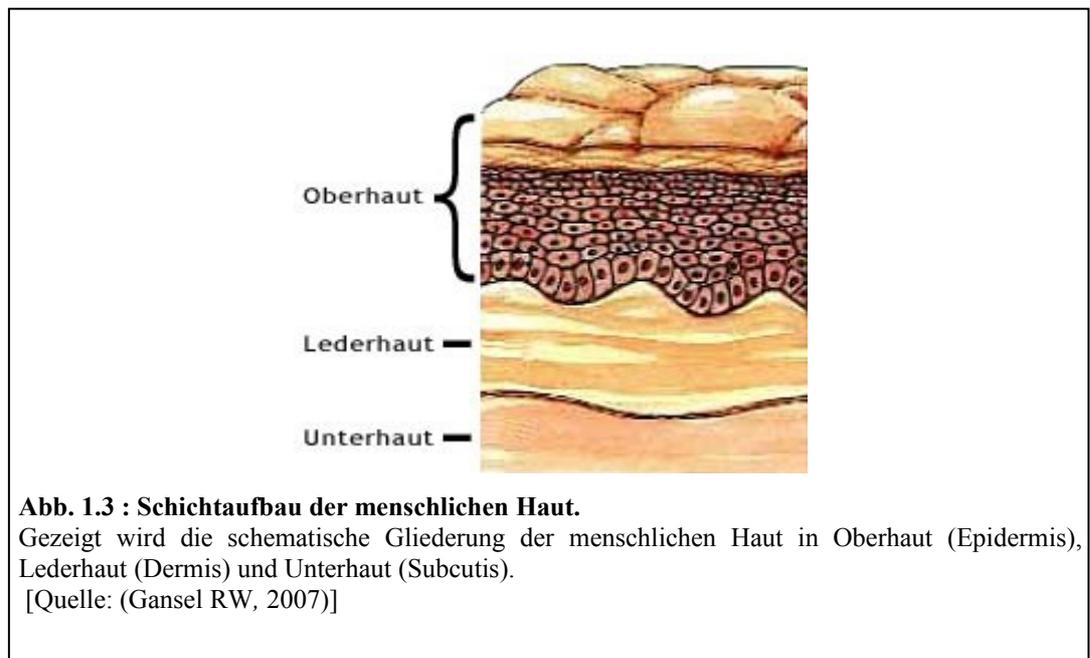
### 1.2.3 Epidermis

Die Epidermis ist durchschnittlich 50 µm dick. Im Bereich der Fußsohlen und Handflächen kann sie bis zu 1 mm dick werden. Sie besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel, dessen oberste Hornschichten täglich abgestoßen werden. Somit hat die Haut ein großes Regenerationsvermögen. Die Neubildung von Epithelzellen erfolgt in den untersten Zellschichten, dem Stratum germinativum (Keimschicht). Diese Keimschicht wird in das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und das Stratum basale (Basalschicht) unterteilt (Schiebler TH & Schmidt W, 2003).

Die Zellen des Stratum germinativum teilen sich ständig und schieben sich dabei zwischen die Zellen der drei oberen Epidermisschichten. Sie werden auch Keratinozyten genannt, weil sie sich auf dem Weg an die Oberfläche keratinisieren (Verhornung). In den mittleren Epithellagen, der Verhornungsschicht, enthalten die Zellen basophile Granula, die man auch Keratohyalinkörper nennt. Bei den Granula handelt es sich um amorphes, elektronendichtes Material, das innerhalb von Filamentbündeln liegt und nicht membranumschlossen ist. Die Granula enthalten u.a. das basische Protein Filaggrin, das durch die Verklumpung intermediärer Filamente die Keratinisierung (Verhornung) der Zellen bewirkt (Moll KJ & Moll M 2003).

Durch die Verhornung sterben die kurzlebigen Keratinozyten ab. Sie werden platt und kernlos und sind vollständig mit Keratin gefüllt. Schließlich bilden sich oberflächlich Hornschuppen, die abgestoßen werden. Die gute Regenerationsfähigkeit der Epidermis zeigt sich darin, dass sie unter normalen Verhältnissen innerhalb von 30 Tagen vollkommen erneuert wird (Jung EG, 1998).

Das Epithel der Haut ist normalerweise gefäßlos. Das Stratum basale besteht aus einer hochprismatischen Zellreihe, die mit der darunter liegenden Basalmembran über Wurzelfüßchen fest verbunden ist. Die Basalmembran besteht aus Epithelzellen, sie verbindet die Epidermis fest mit der darunter liegenden Dermis. Im Stratum basale kommen neben den Keratinozyten noch Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen vor. Das Melanin der Melanozyten schützt die Haut vor ultravioletten Strahlen. Langerhans-Zellen gehören zu den akzessorischen Zellen des Immunsystems und die Merkel-Zellen dienen als Mechanorezeptoren dem Tastsinn (Moll KJ & Moll M, 2003; Schiebler TH & Schmidt W, 2003).



### 1.2.4 Dermis

Die Dermis liegt zwischen der Basalmembran und der Subcutis. Aus der Dermis von Tieren wird Leder gewonnen, was die große Reißfestigkeit der Dermis widerspiegelt (Moll KJ & Moll M 2003). Sie besteht aus Bindegewebe und gliedert sich in zwei nach Dichte und Anordnung der Fasern unterscheidbare Schichten:

- Stratum papillare
- Stratum reticulare

Das Stratum Papillare (Papillarschicht) liegt unmittelbar unterhalb der Epidermis. Es besteht aus lockerem Bindegewebe sowie aus Kollagenfasern, die die Dermis fest mit der Basalmembran verbinden und deshalb auch Ankerfasern genannt werden. Zwischen dem Bindegewebe liegen viele der Abwehr dienenden Zellen wie Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen. Es ragen Zapfen des Stratum papillare senkrecht in Vertiefungen der Epidermis hinein. Sie dienen der Befestigung von Epidermis und Dermis und der Ernährung der Epidermis. In den Bindegewebspapillen liegen neben Kapillarschlingen, die der Wärmeregulierung dienen, Rezeptororgane wie die Meissner-Tastkörperchen.

Das Stratum reticulare enthält viele kollagene Fasern sowie elastische Fasern. Sie sorgen für die Elastizität der Haut. Die Kollagenfasern sind zu einem scherengitterartigen Geflecht angeordnet, das der Haut ihre große Reißfestigkeit verleiht und eine begrenzte Dehnbarkeit der Haut zulässt. Die Kollagenfasern sind in Richtung der Hautspannung angeordnet, das heißt sie haben in Abhängigkeit von der jeweiligen Region unterschiedliche Verlaufsrichtungen.

Die Hauptzellpopulation der Dermis bilden die langlebigen Fibroblasten, die sich in der extrazellulären Matrix befinden (Chu DH et al., 2003). Die Hauptaufgabe

## Einleitung

dieser Zellen ist die Synthese, Organisation und Degradation der extrazellulären Matrix. Sie synthetisieren sowohl Strukturproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin als auch Grundsubstanzen wie z.B. Proteoglykane (Heckmann M, 1999). Die von den Fibroblasten synthetisierten Kollagene sind die wichtigsten Strukturproteine in der extrazellulären Matrix (Heckmann M, 1999) und bilden mit ca. 75 % die Hauptkomponente der Dermis. Nach Sekretion der Kollagene in den extrazellulären Raum orientieren sich die Moleküle in verschiedenen Mustern. Eine Quervernetzung zwischen den Kollagenfasern bietet die nötige Stabilität der extrazellulären Matrix.

Für eine regulierte Produktion, Organisation und Degradation der extrazellulären Matrix kommunizieren die Fibroblasten sowohl untereinander und mit anderen Zell-Typen der Haut (z.B. mit Keratinozyten aus der Epidermis) als auch mit der extrazellulären Matrix. Der Abbau der extrazellulären Matrix erfolgt durch spezifische Proteasen für deren Synthese ebenfalls die Fibroblasten verantwortlich sind. Diese Proteasen werden aufgrund ihrer Abhängigkeit von Metall-Ionen auch als Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bezeichnet (Heckmann M, 1999).

Biologisch spielt die Dermis für die Regulierung des Hautturgors und der Elastizität eine wichtige Rolle. Sie besitzt durch reichlich vorhandene Interzellulärsubstanz (z.B. Proteoglykane) ein hohes Wasserbindungsvermögen. Darüber hinaus ist sie im Alter für den Abbau von extrazellulärer Matrix und über die Kommunikation mit der Epidermis für Faltenbildung verantwortlich (Schiebler TH & Schmidt W, 2003).

### **1.2.5 Unterhaut, Subcutis**

Die Unterhaut, Subcutis ist eine Schicht meist lockeren Bindegewebes. Sie verbindet die Haut durch bindegewebige Scheidewände, Retinacula, mit den unter ihr liegenden Strukturen (Faszien, Knochenhaut). Die Unterhaut dient als Verschiebeschicht sowie an vielen Stellen als Fettspeicher. Sie wirkt deshalb auch als Wärmeisolator. In der Subcutis verlaufen die zur Haut ziehenden Nerven und Gefäße, in ihr liegen Drüsen und Haarwurzeln sowie stellenweise glatte Muskelzellen (Moll KJ & Moll M, 2003; Schiebler TH & Schmidt W, 2003).

### **1.2.6 Hautalterung**

Die Haut ist ein Spiegel des menschlichen Körpers. Bei zahlreichen Erkrankungen (z.B. Infektionen, Herz-Kreislaufkrankungen, hormonelle Störungen), nicht nur bei speziellen Hauterkrankungen, spielt unsere Haut eine große Rolle. Die Veränderungen von Farbe, Tonus und Turgor sind häufig erste Symptome.

Die Haut birgt auch Informationen über das Alter des Menschen. Je älter ein Mensch ist, desto mehr nimmt die Elastizität ab und es kommt zur Faltenbildung. Das Bindegewebe wird atrophisch und verarmt durch Abnahme der Proteoglykane an Flüssigkeit. Die Papillarkörper werden flacher und die Epidermis bekommt ein „papierartiges“ Aussehen. Ferner kommt es zu unregelmäßigen Pigmentierungen. Beschleunigt werden diese Prozesse, insbesondere der Verlust an Elastizität, durch jahrelange Sonnenbestrahlung (Schiebler TH & Schmidt W, 2003).

Heute ist bekannt, dass sowohl UVB (290-320 nm) als auch UVA (320-400 nm) Bestrahlung zur Lichtalterung der Haut beitragen (Berneburg M et al., 2000). Infrarotstrahlung, die einen Großteil des Sonnenspektrums einnimmt, trägt nach

neuesten Erkenntnissen ebenso zur Hautalterung bei (Schieke SM et al., 2003; Schieke S et al., 2002; Burri N et al., 2004; Kim HH, 2005; Ju Hee Lee et al., 2006).

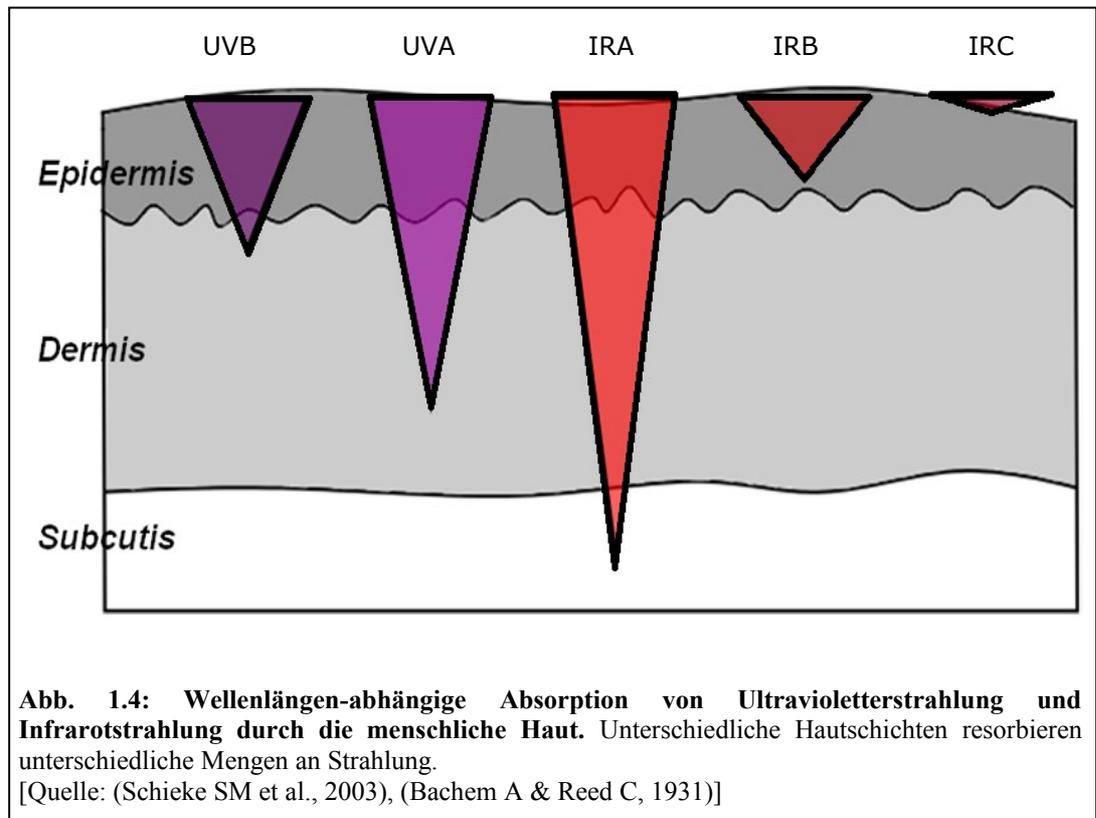
### **1.3 Die Bedeutung von Infrarotstrahlung**

Infrarotstrahlung ist energieärmer als sichtbares Licht und UV-Strahlung. Trotzdem liegen über 50 % der Sonnenstrahlung im 760 nm-1 mm Bereich. Innerhalb dieses Bereiches nimmt IRA 30 % der Sonnenenergie ein. Bis jetzt sind die molekularen Konsequenzen nach Exposition dieser Strahlungsquelle noch nicht ausreichend erforscht. IR-Strahlung ist in der Lage, die Eigenschwingung von Molekülen mehr oder weniger stark anzuregen. Die Zunahme der molekularen Schwingungsenergie wird makroskopisch als Erwärmung des bestrahlten „Körpers“ wahrgenommen.

Bei komplex zusammengesetzten Materien, wie tierischen oder menschlichen Geweben, werden nicht alle Molekülarten gleichmäßig erwärmt. Voraussetzung für eine Temperaturerhöhung ist, dass die Strahlung von den Molekülen absorbiert werden muss. Aufgrund molekulspezifischer Absorptionsbanden absorbieren Moleküle nur Strahlung mit bestimmten Wellenlängen, die die Materie unterschiedlich stark erwärmen lässt (Vaupel P & Krüger W, 1995).

Mit dieser Grundlage lässt sich verstehen, warum unterschiedliche Wellenlängenbereiche des Sonnenspektrums unterschiedliche Penetrationstiefen in der menschlichen Haut erreichen.

Im Fall von IRA werden ca. 50 % in der Dermis absorbiert und ein Teil gelangt sogar in das subkutane Bindegewebe. IRB erreicht nur die Epidermis und IRC wird vollständig von der Epidermis reflektiert (Bachem A & Reed C, 1931).



Im Vergleich zum Anteil an UV-Strahlung, wird damit IR-Strahlung zu einem sehr großen Teil von der menschlichen Haut absorbiert. UVA hingegen erreicht nur die Mitte der Dermis und UVB sogar hauptsächlich nur die Epidermis aber ebenfalls geringe Anteile der Dermis (Gilchrest BA & Krutmann J, 2006).

Der größte Lieferant an IR-Strahlung ist die Sonne. Allerdings nimmt der Einsatz an künstlichen IR-Lichtquellen für therapeutische Zwecke oder sogenannte „Wellness“ Bestrahlungen, wie z.B. Verjüngungen konstant zu. Dies scheint paradox, da bereits bekannt ist, dass es durch IRA zu schnellerer Hautalterung über eine Induktion von Matrix-Metalloproteinase-1 kommt (Schieke SM et al., 2003; Schieke S et al., 2002). Zusätzlich wurde nach IRA Bestrahlung eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet (Schroeder P et al., 2004). Eine koreanische Arbeitsgruppe berichtete, dass nach einem halben Jahr bei

täglicher IR-Bestrahlung vermehrte Hautalterung und Pigmentierung auftraten (Ju Hee Lee et al., 2006).

### **1.4 Ultraviolettstrahlung und der Zusammenhang mit der Karzinogenese der Haut**

#### **1.4.1 Epidemiologische Erkenntnisse**

Obwohl es bisher nicht möglich war direkt zu beweisen, dass v.a. UVB Strahlen im Sonnenlicht Hautkrebs beim Menschen verursachen, ist der Zusammenhang doch sehr naheliegend. Unzählige experimentelle Studien mit Labortieren zeigen nach wiederholter Exposition der Tiere durch UV-Bestrahlung eine erhöhte Inzidenz von hauptsächlich spinozellulären Karzinomen, Basalzellkarzinomen und Melanomen.

Als ein entscheidendes Argument für die positive Korrelation von UV-Bestrahlungen und der Inzidenz von Hautkrebs gilt die Tatsache, dass diese Karzinome an Körperstellen erscheinen, die die meiste Exposition von Sonnenlicht aufweisen, wie z.B. Gesicht, Kopf, Nacken und Arme (Fears TR et al., 1977). Außerdem scheint dieser Zusammenhang dosisabhängig zu sein, denn je mehr Menschen draußen arbeiten und damit mehr exponiert sind, desto häufiger entwickeln sie maligne Entartungen der Haut (Vitasa BC et al., 1990).

Geografisch gibt es eine direkte Assoziation zwischen umweltbedingter Sonnenbestrahlung und der Inzidenz an Hautkrebs. Denn je näher Kaukasier am Äquator wohnen, desto öfter entwickeln sie v.a. spinozelluläre Karzinome (Urbach F, 1969). Dabei erscheint vermehrte Pigmentierung nicht nur als Schutz vor Sonnenbränden, sondern auch vor Hautkrebs (Krickler et al., 1994).

Xeroderma pigmentosum ist eine Erkrankung, die es den betroffenen Patienten durch einen genetischen Defekt erschwert UV-induzierte DNS Läsionen zu reparieren. Die Folge ist eine frühe Entwicklung von zahlreichen malignen Entartungen der Haut in jungen Jahren. Diese Verbindung zwischen defekter DNS Reparatur und Hautkrebsentstehung zeigt deutlich, dass UV-Strahlen im Sonnenlicht für diesen karzinogenen Effekt verantwortlich sein müssen.

Wellenlängenabhängige Studien haben gezeigt, dass UVB Strahlung mehr als 1000 mal effizienter als UVA Strahlung Hautkrebs bei Mäusen induziert. Aber auch UVA ist in der Lage Hautkrebs zu verursachen oder etwa als ko-Karzinogen nach UVB Bestrahlung zu dienen (Sternborg HJ & v.d. Leund JC, 1990; Cole C, 1986).

### **1.4.2 UV-Strahlung und ihre Auswirkungen auf die DNS**

Sonnenlicht, das auf die Haut trifft, kann Erytheme, Hautalterung und auch Hautkrebs verursachen. Eine zentrale Rolle nimmt in dieser Hinsicht die menschliche DNS ein. Sie ist zuständig für den Zellmetabolismus und die Zellteilung. Genau aus diesem Grund sind DNS Schäden für die Induktion biologischer Schäden verantwortlich.

Die UVB (280-320 nm) Komponenten des Sonnenlichtes produzieren die meisten Veränderungen des DNS und induzieren Reparaturmechanismen. UVA Strahlung (320-400 nm), die von der DNS viel schwächer absorbiert wird, penetriert die Haut tiefer als UVB und wirkt hauptsächlich über reaktive Sauerstoffspezies und toxische Photoprodukte (Stoien JD & Wang RS, 1974). Bei solchen photo-induzierten DNS Modifikationen wurden Einzelstrangbrüche, DNS-Protein Verbindungen, alkalisch labile Stellen und 8-Oxo-7, 8-dihydro-2-desoxyguanosin (8-OxoGuo) beobachtet (Sage E, 1993). Einige Studien weisen daraufhin, dass

sichtbares Licht ebenfalls zur Karzinogenese beitragen kann (Setlow RB et al., 1993).

Da UVB Strahlung, wie oben beschrieben, hauptsächlich für direkte DNS Schäden verantwortlich gemacht wird und die Inzidenz von malignen Prozessen der Haut maßgeblich beeinflusst, wird in dieser Arbeit und im kommenden Abschnitt ein Schwerpunkt auf diese UV-Komponente gesetzt.

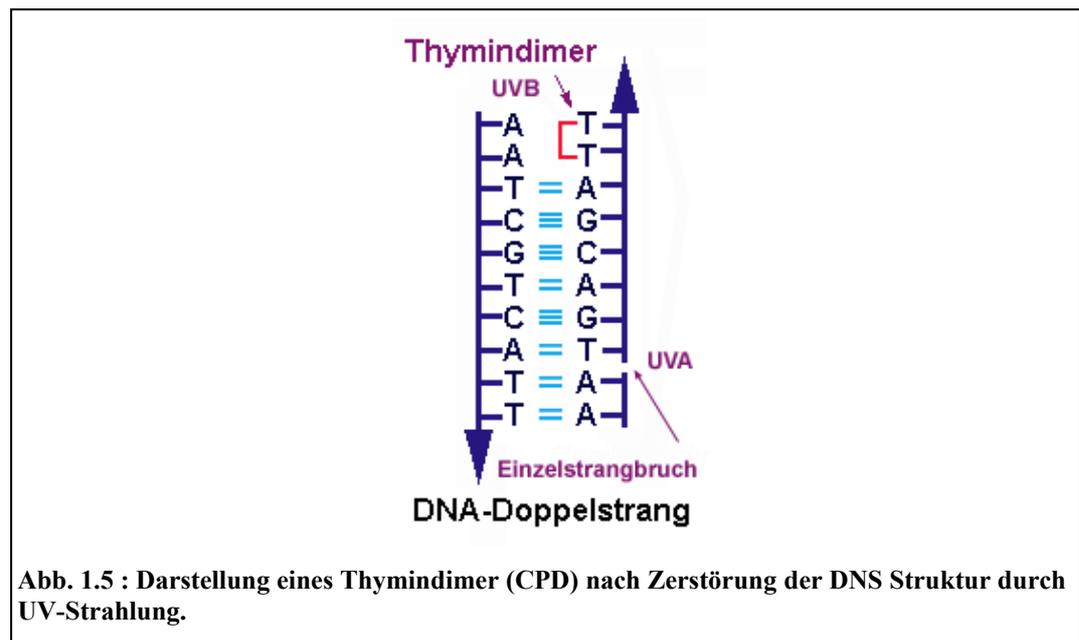
Die DNS der Zelle ist die Trägerin der Erbinformation. Sie enthält unter anderem Gene, die für Ribonukleinsäuren (RNA) und Proteine kodieren, welche für die biologische Entwicklung eines Organismus und den Stoffwechsel in der Zelle notwendig sind. Im Normalzustand ist die DNS in Form einer Doppelhelix mit zwei gegenüberliegenden Polynukleotidsträngen organisiert. Chemisch gesehen handelt es sich um eine Nukleinsäure, ein langes Kettenmolekül (Polymer) aus Einzelstücken, sogenannten Nukleotiden.

Jedes Nukleotid besteht aus einem Phosphorsäure-Rest, einer Furanose und einer der vier organischen Basen: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Sie werden in Purinbasen (Adenin, Guanin) und Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin) unterteilt und bilden komplementär zueinander zwei bzw. drei Wasserstoffbrücken. Dabei liegen sich immer ein Purin und ein Pyrimidin gegenüber.

Innerhalb der Protein-kodierenden Gene legt die Reihenfolge der Basen die Abfolge der Aminosäuren des zu synthetisierenden Proteins fest. Bei den Zellen von Pflanzen, Tieren, und Pilzen, den sogenannten Eukaryoten, liegt die DNS im Zellkern.

## Einleitung

Kommt es nun zur UVB Exposition der Zelle und damit auch der DNS, entstehen sogenannte Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD), die zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen des gleichen DNS Stranges gebildet werden. Diese DNS Schäden werden direkt durch UV-Photonen verursacht, die von der DNS absorbiert werden. Hierbei handelt es sich um einen direkten photochemischen Schaden.

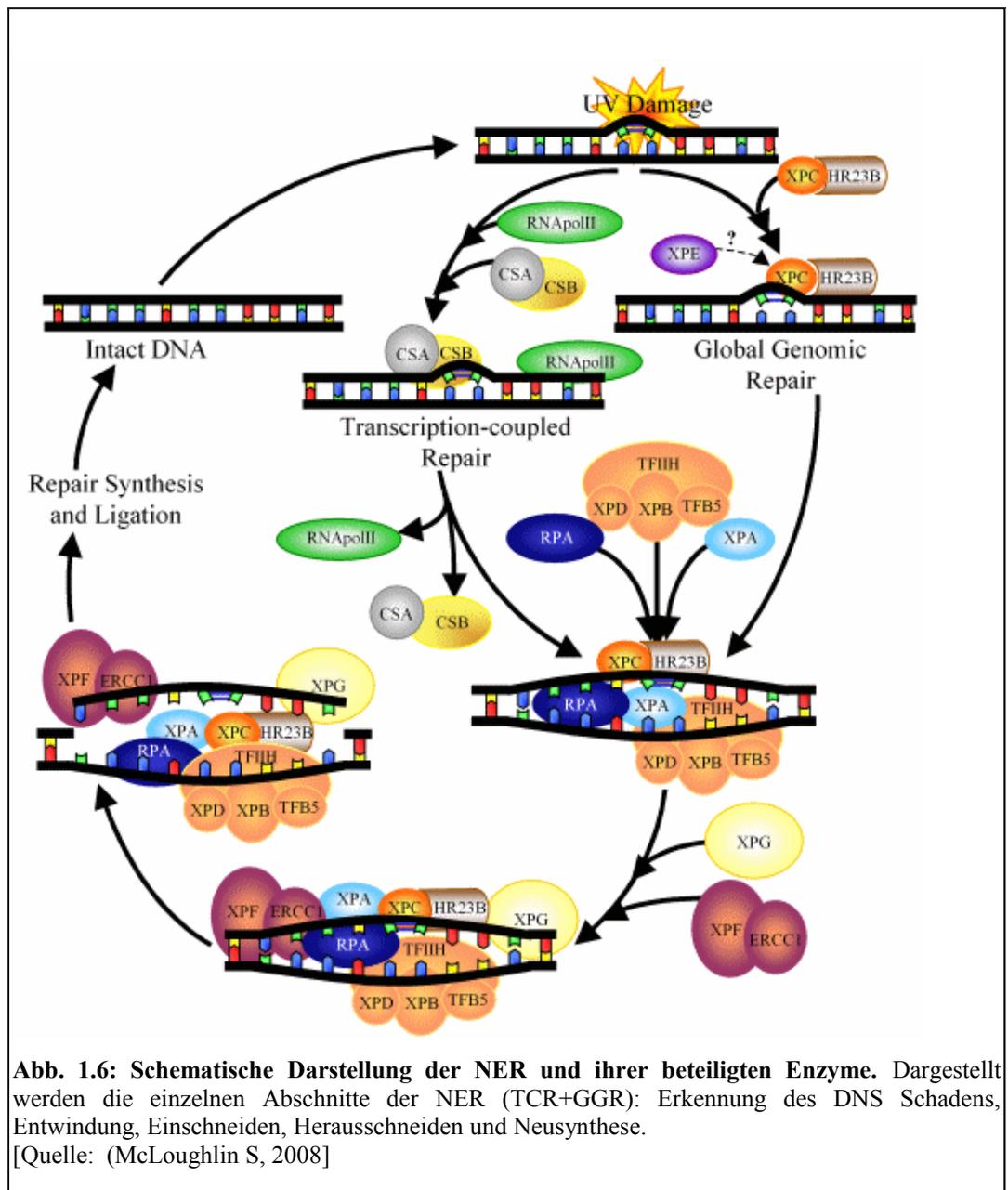


Ein weiterer typischer DNS Schaden durch UVB ist das Pyrimidin Pyrimidon Photoprodukt ((6-4)PP). Hierbei handelt es sich allerdings um einen indirekten biologischen DNS Schaden. Indirekte DNS Schäden entstehen, wenn ein Molekül (nicht DNS) ein Photon absorbiert und der angeregte Zustand dieser Chromophore dann eine photochemische Reaktion in Gang setzt und in dessen Verlauf die DNS durch Oxidation (oder durch freie Radikale) beschädigt wird.

Sowohl UVA als auch UVB Strahlung können diese indirekten Schäden hervorrufen (Davies H et al., 2002).

Falls diese Defekte nicht schnellstens repariert werden können, kommt es zu Mutationen und fälschlicher Synthese von Proteinen, die langfristig zu einer

Entartung der Zelle führen können. In menschlichen Zellen werden deshalb UV-induzierte CPD und andere Photoprodukte durch die Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) beseitigt und zwar entweder durch Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR) oder Global-genomische Reparatur (GGR) (Friedberg EC et al., 1995).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der NER und ihrer beteiligten Enzyme.** Dargestellt werden die einzelnen Abschnitte der NER (TCR+GGR): Erkennung des DNS Schadens, Entwindung, Einschneiden, Herausschneiden und Neusynthese. [Quelle: (McLoughlin S, 2008)]

## Einleitung

Die Hauptaufgaben der NER sind die Erkennung von beschädigten DNS Abschnitten und deren Reparatur bzw. Ersetzung. Ca. 30 Proteine sind an der NER beteiligt: XPC-hHR23B, die neun Untereinheiten von TFIIH, XPA, das „ssDNA-binding protein“ RPA und XPG sind an der Erkennung und DNS Entwindung beteiligt.

Die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF schneiden den beschädigten Teil heraus und die DNS Polymerase, PCN A, RF-C und die DNS Ligase sorgen für die Reparatursynthese und Ligation. Dies entspricht der GGR, während in aktiv transkribierten Genen DNS Schäden effektiver von der TCR repariert werden. Bis auf XPC-hHR23B sind alle Proteine der NER an der TCR beteiligt. Die TCR benötigt zusätzlich CSA, CSB und die RNA Polymerase II für die Erkennung des Schadens (Scharer OD, 2003).

Drei seltene autosomal rezessiv vererbte Krankheiten sind mit einem Defekt der NER vergesellschaftet: Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und Trichothiodystrophie (TTD) (Bootsma D et al., 1998). Alle Patienten leiden unter extremer Sensitivität gegenüber Sonnenlicht. XP Patienten haben einen partiellen oder totalen Defekt in GGR und teilweise auch TCR, während CS Patienten nur eine TCR Defizienz vorweisen. TTD Patienten zeigen viele Symptome von CS Patienten und leiden zusätzlich noch an Haarausfall. Diese Symptome werden niedrigeren Spiegeln von TFIIH zugeschrieben.

XP Patienten zeigen deutliche Zeichen für einen Defekt in der Reparatur von UV-induzierten DNS Schäden. Sie haben eine 1000 fach höhere Prädisposition für Hautkrebs jeglicher Art und leiden zusätzlich an einer progressiven Degeneration von Haut und Augen. Durch das Auftreten dieser erblichen Krankheit und durch den Nachweis der NER in menschlichen Zellen kann folglich der Kausalzusammenhang für UV-induzierte DNS Schäden und deren Reparaturmechanismus erklärt werden (Scharer OD, 2003).

## 2 Wissenschaftliche Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der bislang unverstandenen Wirkung von Infrarot-A Strahlung auf die DNS Integrität humaner Hautfibroblasten. Dabei soll neben IRA auch die Wirkung von Ultraviolett-B Strahlung und deren Kombination untersucht werden. Dies ist deshalb interessant, da unser Sonnenspektrum aus mehreren Komponenten (UV-Bereich, sichtbares Licht, IR-Bereich etc.) besteht und alle diese Teile gleichzeitig auf die Erde und damit auch auf unserer Haut treffen. Allerdings ändert sich die quantitative Zusammensetzung der Sonnenstrahlung nicht nur mit der Höhe und Position zum Äquator, sondern auch im Tagesverlauf.

Die einzelnen Anteile des Sonnenspektrums werden zu verschiedenen Tageszeiten unterschiedlich repräsentiert, sodass z.B. morgens und abends der IR-Anteil überwiegt, während mittags der UV-Anteil stärker ist. Es stellt sich also die Frage, ob dieses Phänomen auch eine Bedeutung auf molekularer Ebene hat. Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass die Inzidenz von Hautkrebs in menschlichen Populationen, die häufig starker Sonnenstrahlung ausgesetzt sind, niedriger ist als erwartet. Das gilt vor allen Dingen im Hinblick auf beobachtete zelluläre DNS Schäden und Reparatur-Kapazitäten nach UV-Bestrahlung (Sutherland BM, 1996).

Obwohl das Sonnenlicht polychromatisch ist, sind die endgültigen Wirkungen nicht nur jeder Wellenlänge individuell zuzuschreiben, sondern auch den Interaktionen zwischen ihnen. Bis heute gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Infrarot-A und Ultraviolett-B beschäftigt haben. Die Ergebnisse sind von unterschiedlicher Natur.

## Einleitung

Zum einen wird IRA ein schützender Effekt vor UVB induzierter Apoptose zugesprochen (Frank S et al., 2005; Menezes S et al., 1998), auf der anderen Seite wurde auch eine Verstärkung von Hautschäden und Alterung, sowohl mit und ohne Ultraviolett-B Bestrahlung beobachtet, (Kligmann LH, 1982; Schroeder P et al., 2004; Schieke S et al., 2002; Burri N et al., 2004; Kim HH et al., 2005; Ju Hee Lee et al., 2006).

In dieser Arbeit sollen deshalb vier Aspekte analysiert und untersucht werden:

1. Die Wirkung von UVB und IRA und ihrer Kombinationen auf die Integrität menschlicher DNS von Hautfibroblasten.
2. Der Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen und der zeitliche Verlauf auftretender Effekte.
3. Mögliche Konsequenzen für die Zelle: Stichwort Zellvitalität und Zellteilung.
4. Die Rolle der Reparaturenzyme.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Beschreibung der verwendeten Zellen und des pUC Plasmides

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um humane Vorhautfibroblasten von Kindern im Alter zwischen 5 und 10 Jahren (F 120, F 121 Passagen 4-14), die das Institut für Umweltmedizinische Forschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von der Diakonie Kaiserswerth (Düsseldorf) erhalten hat. Es wurde ebenfalls mit embryonalen Mausfibroblasten [XPA Knock-out (F 17, F 3 Passage 18-20) / zugehöriger Wildtyp] experimentiert, die durch die Arbeitsgruppe von Dr. Roel Schins vom Institut für Umweltmedizin der Universität Düsseldorf bereit gestellt wurden. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Boege der Universität Düsseldorf stellte freundlicher Weise das aufgereinigte pUC 18 Plasmid (über 99 % „superspiralisiert“) zur Verfügung.

##### 3.1.2 Zusammensetzung von Zellkultur-Medien

Nährmedium für humane Fibroblasten	500 ml MEM 1 % Antibiotika/Antimykotika 1 % L-Glutamin 10 % hitzeaktiviertes FCS
Nährmedium für embryonale Mausfibroblasten	500 ml DMEM + FC 10 Ham 1 % Antibiotika/Antimykotika 1 % L-Glutamin 10 % hitzeaktiviertes FCS

### 3.1.3 Zellkultur-Zusätze und Reagenzien

Antibiotika/Antimykotika	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
DMEM High Glucose + FC 10 Ham	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)
DPBS (-CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
LMP-Agarose	Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
MEM	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Neocarcinostatin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Uridin	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Soweit nicht anders ausgewiesen, handelt es sich bei allen weiteren verwendeten Substanzen, Flüssigkeiten und Lösungen um handelsübliche Chemikalien, welche bei Sigma-Aldrich (Steinheim), bei Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) oder Invitrogen (Karlsruhe) erworben wurden.

### 3.1.4 Kit-Systeme

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	BD Pharmingen™ (Heidelberg)
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen™ (Heidelberg)
H2A.X Phosphorylation Assay Kit (Flow Cytometry)	Upstate (CA,USA)

### 3.1.5 Verwendete Geräte

CCD-Kamera MCA OLYMPUS BXC-Mount 0.45x	Olympus Optical Co. (Hamburg)
FACSCalibur E3255	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop OLYMPUS BX60F5	Olympus Optical Co. (Hamburg)
Fluorchem™ INS-8900	Alpha Innotech Corp. (San Leandro, USA)
Gelelektrophoresekammer Elektrophoresis Sub System 70 Model E-0310	Labnet International, Inc. (Taiwan)
Horizontale Elektrophoresekammer SL-COMET	England
IRA Lampe Hydrosun Stativ Profi	Hydrosun Medizintechnik GmbH (Mühlheim)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Deutschland)
UVB Lampe Phillips Ultraviolet B TL20W/12 RS	Phillips GmbH (Mönchengladbach)
Zentrifuge Megafuge R 1.0	Heraeus Holding GmbH (Osterode)

### 3.1.6 Verwendete Software zur Datenauswertung

ABI Prism 7000 SDS Software Version 1.1	Applied Biosystems (USA)
Alpha Ease FC™ Software Version 3.2.3	Alpha Innotech Corp. (USA)
CELLquest™ und WinMDI™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Comet Assay 2 Version 2.11 Mai 1999	Perceptive Instruments Ltd. (England)

### 3.1.7 Sonstige Materialien

Plastikmaterial für die Zellkultur kam von Greinerbio-one (Frickenhausen, Deutschland) und von Becton Dickinson Labware Europe (Frankreich). Die beschichteten Objektträger und Deckgläser für den Comet Assay wurden bei Menzel - Gläser (Braunschweig, Deutschland) gekauft.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung dermalen Fibroblasten im Monolayer

Die Zellen wuchsen in Gewebekulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) als Monolayer in 25 ml Nährmedium in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Als Nährmedium wurde für die Fibroblasten MEM mit seinen in 3.1.2 beschriebenen Supplementen verwendet. Die embryonalen Mausfibroblasten erhielten das DMEM-Medium und FC 10 Ham-Medium im Verhältnis 1:1 ebenfalls mit seinen oben genannten Supplementen.

Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Unter diesen Bedingungen verdoppelte sich die Zellzahl alle ein bis zwei Tage. Waren die Fibroblasten zu

einem konfluenten dichten Monolayer gewachsen, erfolgte eine Passagierung. Dabei wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung ca. 5 min vom Boden der Gewebekulturflaschen abgelöst. Die Aktivität des Trypsins wurde mit 6 ml Nährmedium beendet und gleichzeitig die Zellsuspension verdünnt. Anschließend wurden je 3 ml in eine neue Gewebekulturflasche pipettiert und somit die Zellen im Verhältnis 1:3 neu ausgesät. So wurden die in der nächst höheren Passagenzahl gekennzeichneten Fibroblasten weiterkultiviert.

Zur weiteren Verwendung für Bestrahlungen erfolgte wieder eine Ablösung der Monolayer mittels Trypsin-EDTA-Lösung. Danach wurde die Zellsuspension jedoch mit 100 ml Nährmedium resuspendiert und je 5 ml dieser Suspension wurden in eine Gewebekulturplatte (6 cm Durchmesser) gegeben. Die Zellen wuchsen erneut bis zur Konfluenz und wurden dann für die Bestrahlung vorbereitet.

### **3.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung**

Für eine Langzeitlagerung der erwähnten Zellen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zunächst bis zur Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Gewebekulturflasche abgelöst (s. 3.2.1). Danach wurden die abgelösten Fibroblasten bei 200 g für 5 min pelletiert, in jeweils 1 ml Einfriermedium (Nährmedium + 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt.

Die speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierdosen wurden bei -80 °C eingefroren und nach ca. 24 h zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen auf Raumtemperatur erwärmt, in 30 ml frischem Nährmedium resuspendiert und in

eine Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte nach Absetzung der Zellen nach 16 h zur Entfernung des toxischen DMSO.

### 3.2.3 Zellbestrahlung

Zur Bestrahlung wurden die Zellen auf Gewebekulturplatten (Durchmesser 6 cm) ausgesät und wuchsen dort bis zur Konfluenz. 24 h vor der Behandlung wurden die Zellen zum Zellzyklusarrest auf ein MEM-Medium/DMEM-Medium ohne FCS gesetzt. Kurz vor und während der Bestrahlung wurde das jeweilige Medium durch DPBS ersetzt, um zu verhindern, dass es während der Bestrahlung zu Signalkaskaden in den Zellen durch photochemische Produkte des Mediums kommt.

Falls nicht anders gesondert ausgewiesen, wurden die Fibroblasten 15 s UVB (100 J/m<sup>2</sup>) und 15 min (306 J/cm<sup>2</sup>) IRA bestrahlt. Die ausschließlich UVB bestrahlten Proben wurden nach der Behandlung 15 min abgedeckt auf die Wärmeplatte gestellt. So ließ sich gewährleisten, dass alle Proben gleich lang DPBS ausgesetzt waren und nach der gleichen Zeit fixiert wurden.

Die Kombinationsbestrahlungen (IRA+UVB/UVB+IRA) erfolgten sofort hintereinander. Gemessen wurden die Bestrahlungsstärken mit Hydrosun HBM1 Bestahlungsmessgerät (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Müllheim, Deutschland). Sie lagen bei 300 mW/cm<sup>2</sup> für die IRA Lampen und bei 0,41 mW/cm<sup>2</sup> für die UVB Lampe. Dabei wurden die Gewebekulturplatten bei der IRA Bestrahlung von kaltem Wasser unterspült, um Wärmeeffekte auszuschließen und die Temperatur bei 37 °C konstant zu halten. Die Kontrollproben lagerten abgedeckt 15 min auf einer Wärmeplatte bei 37 °C.

### **3.2.4 Zentrifugation von Zellen**

Die Zellen wurden bei 1000 rpm (200 g) in einer Megafuge R 1.0 (Heraeus, Osterode) für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und das Zellpellet aufgelockert.

### **3.2.5 Alkalischer Comet Assay**

#### **3.2.5.1 Detektion von DNS Strangbrüchen mit Hilfe des Alkalischen Comet Assay**

Mit Hilfe des Comet Assay (*deutsch: Einzelzellgelelektrophorese*) können DNS Strangbrüche in Säugetierzellen nachgewiesen werden. Verglichen mit den wesentlich längeren DNS Strängen der Chromosomen weisen DNS Bruchstücke, bedingt durch ihre wesentlich kleineren Molmassen, eine deutlich erhöhte Mobilität in den engen Poren des Agarosegels auf. Sie lassen sich deshalb durch Elektrophorese von der intakten DNS trennen und sehen aus wie ein Kometenschweif hinter der ungeschädigten DNS. Das entstandene Bild der DNS ähnelt dann einem Kometenbild.

Nach der Elektrophorese wird die DNS durch Behandlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht, der sich in die DNS Doppelhelix einlagert. Hierfür ist es nötig, dass die DNS wieder als Doppelstrang vorliegt. Es wird also ein Renaturierungsschritt durchgeführt, bei dem der alkalische gegen einen neutralen Puffer ausgetauscht wird. Unter diesen Bedingungen finden sich die Einzelstränge zu mehr oder weniger gut passenden Doppelsträngen zusammen. Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung der

Objekte erkennt man ein starkes, kreisförmiges Leuchten mit einem schwächer leuchtenden Kometenschweif.

Da die meisten Substanzen vorwiegend Einzelstrangbrüche induzieren, weist der unter alkalischen Bedingungen durchgeführte Comet Assay, bei dem die DNS in Einzelsträngen denaturiert wird, eine deutlich höhere Sensitivität für DNS Schäden auf als der unter neutralen Bedingungen durchgeführte Comet Assay. Beim alkalischen Comet Assay nach *Singh et al., 1988* werden

Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und „Alkalisch labile Stellen“ der DNS mobilisiert. Darunter versteht man DNS Schäden, die in der Zelle zwar nicht als Strangbrüche vorliegen, jedoch unter alkalischen Versuchsbedingungen zu solchen umgesetzt werden. Solche „Alkalisch labile Stellen“ entstehen z.B. durch spontane oder enzymatische Abspaltung geschädigter Basen im Rahmen von Reparaturprozessen.

Eine Quantifizierung der DNS Strangbrüche wird unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich, welches mit einer CCD-Kamera verbunden ist. Diese ist mit einem PC verbunden und projiziert das Bild auf einen Bildschirm. Nun kann zur Bestimmung der Schweiflänge und der Schweifintensität mit Hilfe einer Software (s.o.) ein Histogramm über jeden einzelnen Kometen gelegt werden. Die Einheit für das Produkt aus Schweiflänge und Schweifintensität bildet das Tail Moment, welches bei allen Experimenten mit dem Comet Assay als Maßeinheit des DNS Schadens verwendet wurde.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität zum Nachweis für DNS Schäden und einer Erfassung von Daten auf Einzelzellniveau. Wie sich jedoch aus der Vielzahl der Möglichkeiten zur Erzeugung von DNS Strangbrüchen ergibt, ist

der Comet Assay nicht geeignet, zwischen genotoxischen oder zytotoxischen Substanzen bzw. Strahlen zu unterscheiden.

### 3.2.5.2 Durchführung

Der alkalische Comet Assay nach *Singh et al., 1988* kombiniert die Einfachheit biochemischer Techniken zum Nachweis von DNS Strangbrüchen und/oder „Alkalisch labilen Stellen“ mit der Analyse von Einzelzellen, die in zygoten Tests angewandt wird.

Nach der jeweiligen Bestrahlung wurden die behandelten Zellen mit Hilfe von 1 ml Trypsin-EDTA Lösung von den Gewebeplatten (Durchmesser 6 cm) abgelöst und die Reaktion mit 1 ml Medium beendet. Danach wurden 40 µl der Zellsuspension mit 120 µl der LMP-Agarose gemischt und auf die beschichteten (1,5 % Agarose) Objektträger pipettiert, welche anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt und auf Eis gelegt wurde, um die Agarose schnell erhitzen zu lassen. Nach Polymerisierung der Agarose innerhalb weniger Minuten wurden die Deckgläser wieder abgenommen.

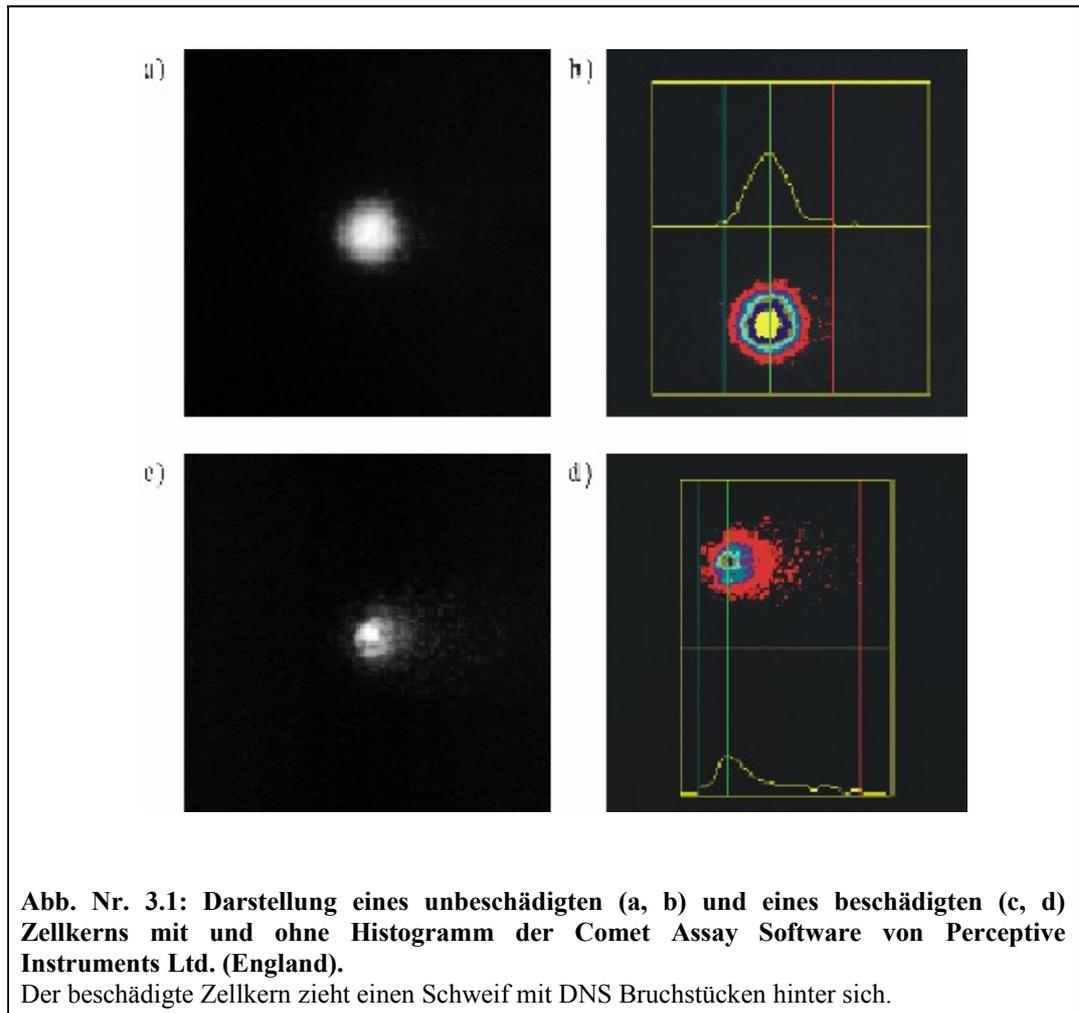
Zur Zelllyse gelangten die beschichteten Objektträger über Nacht bei 4°C in den eiskalten Lysepuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, supplementiert mit 10 % DMSO und 1 % Triton X-100). Weniger als 10 min lagen zwischen Bestrahlung der Zellen und Zugabe des Lysepuffers, um zwischenzeitliche DNA Reparatur zu verhindern. Anschließend kamen die Objektträger in die horizontale Elektrophoresekammer und wurden mit kaltem Elektrophoresepuffer (4 °C, 0,3 NaOH und 1 mM EDTA) bedeckt. Zur Alkalidenaturierung der DNA inkubierten die Objektträger 25 min bei Raumtemperatur. Es folgte die 10 minütige Elektrophorese im selben Puffer bei 24 V und 300 mA. In einem weiteren Schritt wurden die Objektträger wieder

neutralisiert (0,4 M Tris, pH 7,5) und in 100 %-iges Ethanol getaucht. Zum Schluss erfolgte eine Trocknung der Proben.

### **3.2.5.3 Auswertung und Analyse**

Zur Auswertung wurde jeder Objektträger mit 40 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) beträufelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Die gefärbten Präparate wurden nun bei 400 facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop angesehen. Das Mikroskop verfügte über einen Anregungsfilter von 515-560 nm und einem Barrierefilter von 590 nm. Pro Probe wurden 50 Zellen ausgewertet.

Mit Hilfe eines Bildanalyseystems, das über eine CCD-Kamera an das Mikroskop angeschlossen war, konnten die DNS Kometen quantifiziert werden. Die verwendete Messgröße war das Tail Moment (s. 3.2.5.1).



### 3.2.6 Durchflusszytometrie

Bei der durchflusszytometrischen Analyse können Zellen mit einem Fluorchrom markiert und anschließend mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 488nm bestrahlt werden. Dadurch werden die Fluorchrome zur Emission angeregt, die messbar ist. Über Quantifizierung von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können auch Informationen über Zellgröße und Zellgranularität gesammelt werden. Die Datenanalyse wurde durch die Programme CELLquest™ und WinMDI™ möglich.

### **3.2.6.1 Messung der Zellvitalität mit Hilfe von Annexin V-PI**

Bei diesem Testverfahren werden apoptotische Zellen mittels Annexin V, einem Phospholipidbindeprotein, markiert. Dies ist allerdings nur möglich, wenn das Phospholipid Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Membranseite transloziert wird. Dieses Phänomen tritt in der Regel recht früh im Prozess der Apoptose auf. Deshalb kann diese Methode im Gegensatz zum Trypan Blau Test nach kurzer Zeit apoptotische Zellen erkennen.

Eine Kopplung von Annexin V an das Fluorochrom FITC ermöglicht daher die Erfassung dieser Zellen mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse. Gleichzeitig kann eine Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI) eine Unterscheidung von früh- und spätapoptotischen Zellen ermöglichen. Es wurden Annexin- bzw. Propidiumiodid-gefärbte Zellen, sowie ungefärbte Zellen in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen, und somit die Prozentzahl an vitalen Zellen von der Grundgesamtheit ermittelt.

Die Fibroblasten wurden mit IRA und UVB bestrahlt und 4 h postinkubiert. Es folgte die Ablösung der Zellen mittels Trypsin, Zentrifugierung (5 min bei 200 g) und eines Waschvorgangs mit PBS bevor alle weiteren Vorgänge dem Annexin V-FITC Staining Protocol aus dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit von BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) entsprachen.

### **3.2.6.2 Quantifizierung der H2A.X Phosphorylierung**

In einem eukaryoten Zellkern liegt das Genom als Chromatin vor. Zwei Moleküle der Kernhistone (H2A, H2B, H3 und H4) bilden ein Histon-Oktamer. Um dieses Oktamer sind 146 Basenpaare der DNS gewickelt, die zusammen das Nukleosom bilden, die Basiseinheit des Chromatins. Die Histone erlauben der DNS sich so

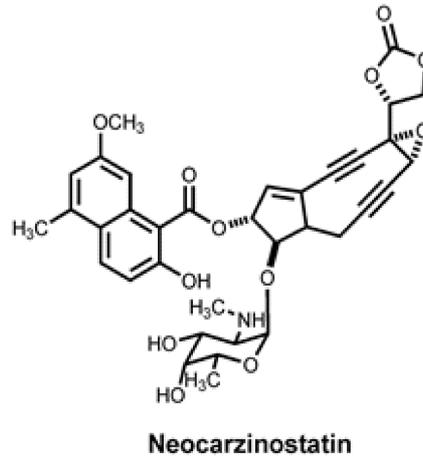
eng zu wickeln, um möglichst auf kleinem Raum die höchst mögliche Anzahl an Basenpaaren im Zellkern zu verstauen. Post-translationale Modifikationen der Histone sind sehr wichtig im Rahmen ihrer zusätzlichen Funktion als Wächter der Genomverfügbarkeit, da sie schnelle und reversible Zugänge der DNS durch zelluläre Signale erlauben.

Substanzen oder andere Noxen wie z.B. Bestrahlung durch UVB, die Doppelstrangbrüche in der DNS induzieren, führen über Signalkaskaden zu einer Phosphorylierung des Histons H2A.X. H2A.X ist eine Isoform des Histons H2A. H2A.X besitzt ein Serin (Serin139), welches im Zuge von Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird (Rogakou EP et al., 1998; Burma S et al., 2001). Diese Phosphorylierung ist entscheidend für die Rekrutierung der DNS Reparaturmaschinerie zu dieser Stelle des Bruchs (Paull TT et al., 2000).

Wenn der DNS Schaden zu stark ist, kommt es zur Apoptose. Apoptose führt zu einer Zerschneidung des Genoms in kleine Fragmente, was zu weiteren Doppelstrangbrüchen führt (Rogakou EP et al., 2000). Daher kann H2A.X auch als Marker für Apoptose genutzt werden. H2A.X Phosphorylierung an Serin 139 tritt sehr früh im Rahmen der Apoptose auf und ist damit einer der frühesten Indikatoren für Apoptose, die erhältlich sind.

Die Zellen wurden auf wie in 3.2.3 beschrieben bestrahlt und 1 h im Brutschrank postinkubiert. Danach folgte die Ablösung der Zellen mit Hilfe von 1 ml Trypsin - EDTA Lösung. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 1 ml Kulturmedium beendet und die Zellsuspension in 15 ml Röhrchen überführt. Danach folgte eine Zentrifugierung (5 min bei 200 g) und drei weitere Waschvorgänge mittels DPBS, um das Trypsin vollständig zu entfernen. Alle weiteren Vorgänge zur Vorbereitung der flusszytometrischen Analyse wurden nach dem Protokoll des „H2A.X Phosphorylation Assay Kit (Flow Cytometry)“ von der Firma Upstate (CA, USA) durchgeführt. Alle zugehörigen Reagenzien stammten ebenfalls von

dieser Firma. Als Positivkontrolle dienten 200 ng/ml Neocarzinostatin, welches 60 min vor Fixierung der Zellen inkubierte. Neocarzinostatin wurde 1963 erstmals aus dem Kulturmedium von *Streptomyces carzinostaticus* isoliert und kann Wechselwirkungen mit der DNS eingehen und diese spalten. Es wird unter anderem auch in der Onkologie als Chemotherapeutikum eingesetzt.



**Abb. Nr. 3.2: Strukturformel von Neocarzinostatin.**  
[Quelle: (Liu W et al., 2007)]

Als Negativkontrolle diente anstatt der Färbung mittels Anti-phospho H2A.X FITC Antikörper, ein normaler Maus IgG FITC Antikörper.

### 3.2.6.3 Messung der Zellproliferation mit Hilfe von BrdU Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbung von eingebautem Bromodesoxyuridin (BrdU) und dessen flusszytometrischer Analyse dienen zur Messung von DNS Synthese in proliferierenden und synthetisierenden Zellen (S Phase). Dabei wird BrdU, welches ein Analog von Thymidin ist, in neu synthetisierte DNS aufgenommen und mit Hilfe eines spezifischen anti-BrdU Fluoreszenz Antikörpers sichtbar gemacht. Der Gehalt an BrdU kann dann im Flusszytometer gemessen werden.

Eine Färbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), welche an die gesamte DNS bindet, ist mit der BrdU Immunfluoreszenzfärbung gekoppelt. Mit dieser Verbindung ist es möglich eine Charakterisierung der Zellen im Hinblick auf ihre Zellzyklusposition und damit auch ihrer DNS Neusynthese (S Phase) anzufertigen (z.B. G0/1 Phase, S Phase oder G2/M Phase). Die Zellzyklusposition wird durch die Intensität der 7-AAD Färbung bestimmt. Mit dieser Untersuchung wurde der BrdU Gehalt 4 h nach Bestrahlung von nicht proliferierenden bestrahlten Fibroblasten gemessen.

Zur Positivkontrolle wurde 10 µl/ml Medium BrdU bei proliferierenden Fibroblasten in das Serum enthaltende Medium gegeben. Als Negativkontrolle diente eine ungefärbte Probe. Allen bestrahlten Proben wurde 24 h vor Bestrahlung das Kälberserum im Medium entzogen um zwischen normaler Zellteilung und Proliferation im Rahmen der Bestrahlung zu unterscheiden. Die Zellen wurden dann auf DPBS, wie in 3.2.3 beschrieben, bestrahlt und erhielten danach wieder ihr serumfreies Medium für die Postinkubationszeit von 4 h, welches nun aber ebenfalls 10 µl 1 mM BrdU pro ml Medium enthielt. Nach 4 h wurden die Zellen von den Gewebekulturschalen abgelöst, zentrifugiert und mit DPBS gewaschen. Das weitere Prozedere entsprach dem BrdU Flow Kit Staining Protocol aus dem FITC BrdU Flow Kit von BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland).

### **3.2.7 Plasmid DNS Assay (Detektion von direkten DNS-Schäden)**

Um die Wirkung von UVB bzw. IRA Strahlung auf reine DNS ohne weitere Zellkomponenten zu untersuchen, wurden 0,5 µg pUC 18-DNS den jeweiligen Bestrahlungseinheiten unterzogen. Die DNS wurde in 200 µl NaCl (50 mM, pH 7,5) gelöst, um eine Konzentration von 0,25 µg/µl DNS zu erhalten. Jeweils 2 µl dieser Lösung wurden mit 18 µl NaCl (50 mM) auf eine Gewebekulturplatte pipettiert und bestrahlt. Nach der Behandlung wurden die Proben auf ein 1,2 %

Agarosegel aufgetragen, welches 2 µl Etbr enthielt. Anschließend wurde die DNS mittels Elektrophorese bei 70 V ca. 2 Stunden aufgetrennt.

Bei einer direkten Schädigung der DNS, die mit einer Relaxation des Plasmides einherging, zeigte sich mindestens eine weitere Bande mit DNS oberhalb der Bande der „supercoiled DNS“. Als Positivkontrolle wurde erneut Neocarzinostatin verwendet. Die Detektion der Banden mittels UV-Licht wurde mit Fluorchem<sup>TM</sup> INS-8900 der Firma Alpha Innotech durchgeführt.

### **3.2.8 Trypan Blau Test (Messung der Zellvitalität)**

Die Zellen, die für diesen Test benutzt wurden, wuchsen, wie oben beschrieben, bis zur Konfluenz und wurden 24 h vor Bestrahlung und während der Postinkubationszeit von 24 h mit Medium ohne FCS behandelt. Anschließend wurden die Zellen von den Petrischalen abtrypsiniert, in DPBS resuspendiert und mit Trypan Blau Farbstoff gefärbt. Nach 5 min Inkubationszeit wurden die Fibroblasten in einer Neubauer Zählkammer gezählt und der blau gefärbte Teil an Zellen von der Grundgesamtheit in Prozent berechnet. Eine Blaufärbung der Zellen geht mit einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran einher, welche für einen apoptotischen Prozess typisch ist. Abschließend wurden die Ergebnisse als Prozentsatz vom Ergebnis der unbehandelten Probe dargestellt.

### **3.2.9 Statistische Analyse**

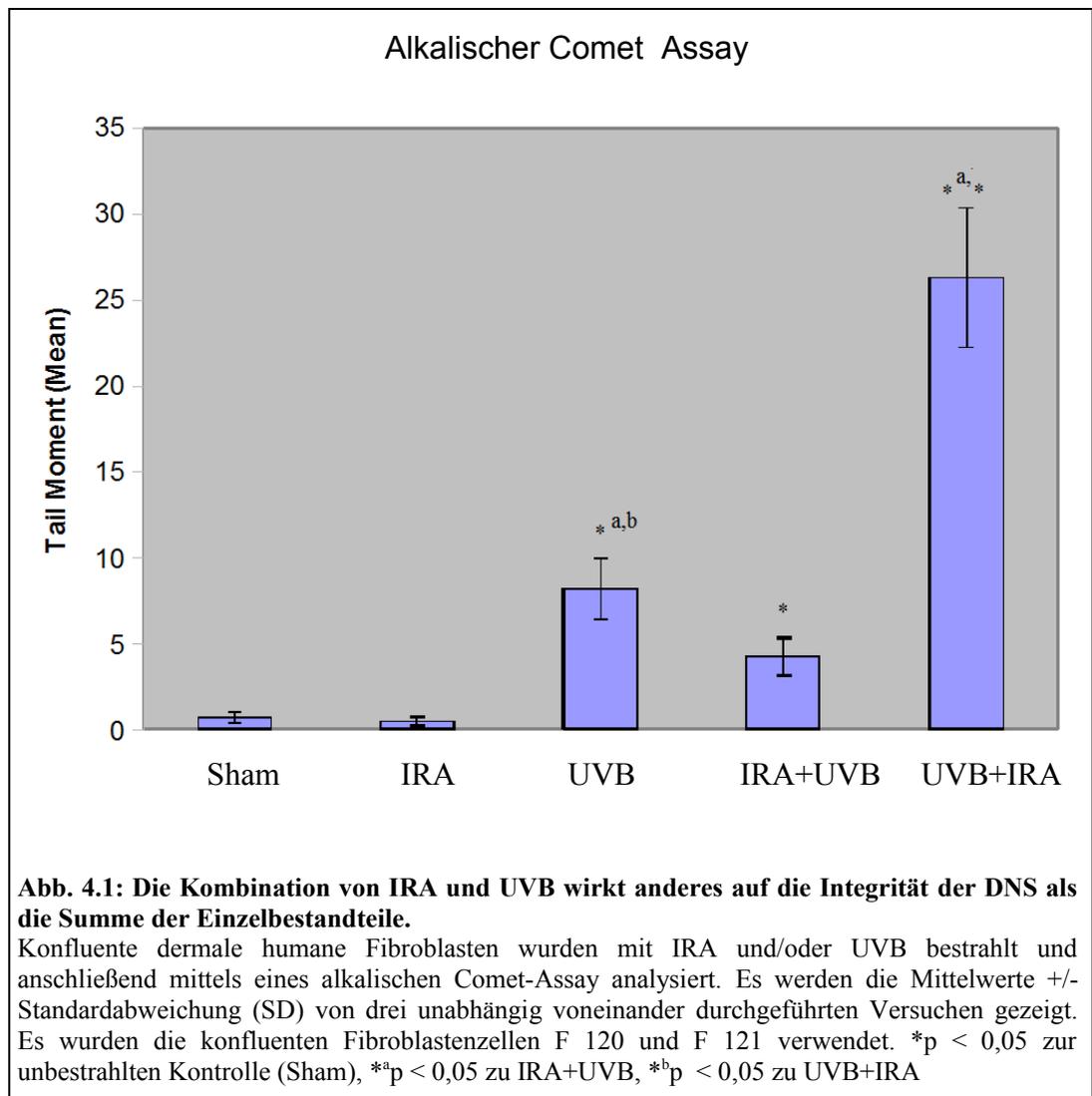
Um anhand vorliegender Beobachtungen eine begründete Entscheidung über die Gültigkeit oder Ungültigkeit einer Hypothese zu treffen, wurden die vorliegenden Daten einer statistischen Analyse unterworfen. Dabei wurde der Studentische T-Test verwendet. Der T-Test testet die Differenz der Mittelwerte von zwei

Stichproben. Ein p-Wert unter 0,05 gibt einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Stichproben an. Jeder Wert über 0,05 ergibt keinen statistischen Unterschied in zwei Stichproben. In den folgenden Abbildungen wurden relevante signifikante Unterschiede mit einem \* oberhalb der Säulen in einem Diagramm gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Kombination von IRA und UVB wirkt anders auf die Integrität der DNS als die Summe der Einzelbestrahlungen

Bei der Untersuchung der Wirkung von IRA, UVB und ihrer Kombination auf die DNS von humanen, dermalen Fibroblasten diente der alkalische Comet Assay als Screeningmethode.

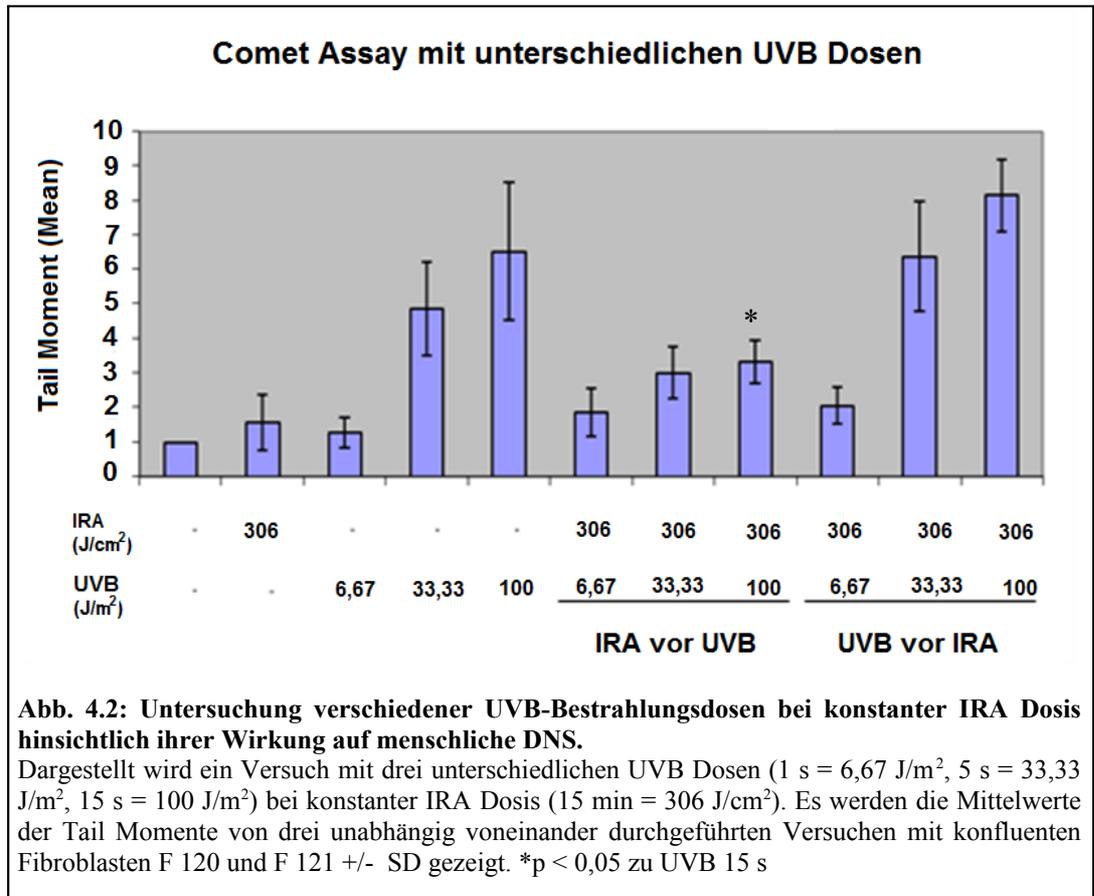


Die Abb. 4.1 zeigt die unterschiedlichen Tail Momente nach den Einzel - und Kombinationsbestrahlungen bei sofortiger Fixierung der Zellen nach Behandlung. IRA alleine erzeugt dabei genauso wenig DNS Strangbrüche, wie eine fehlende Bestrahlung (Sham). UVB alleine hingegen weist einen deutlichen Anstieg des Tail Momente auf.

Bei der Betrachtung der Kombinationsbestrahlungen, ist bei der Kombination IRA+UVB (IRA Bestrahlung zeitlich vor UVB) eine leichte Erniedrigung der DNS Strangbrüche im Vergleich zu UVB alleine zu erkennen. UVB+IRA (UVB Bestrahlung zeitlich vor IRA) zeigt hingegen einen mehr als doppelt so hohen Anstieg des Tail Momente im Vergleich zu UVB alleine.

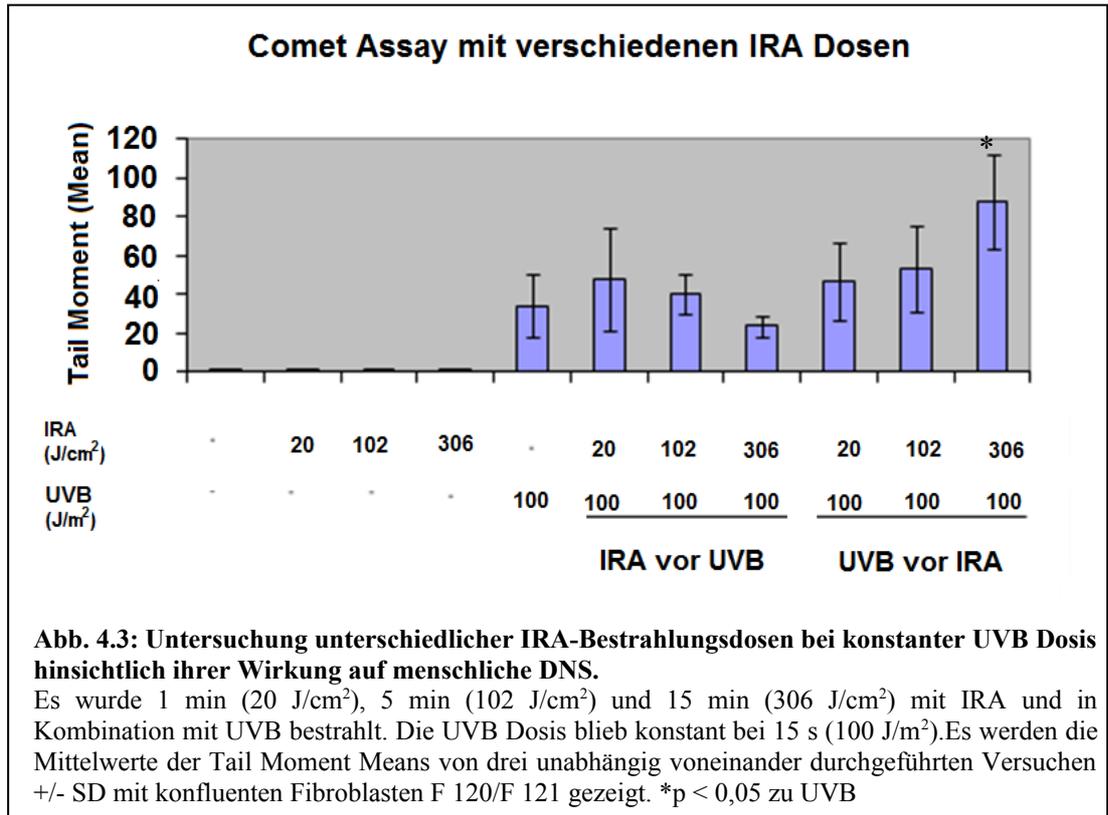
### **4.2 Sequenzabhängigkeit des IRA-Effektes**

Im Folgenden soll eine mögliche Dosisabhängigkeit von der vorangegangenen UVB Bestrahlung bei den o.g. (4.1) deutlich erhöhten Tail Momente bei UVB+IRA untersucht werden. Dazu wurden drei verschiedene UVB Bestrahlungsdosen [0,15 J/m<sup>2</sup> (1 s), 33,34 J/m<sup>2</sup> (5 s) und 100 J/m<sup>2</sup>(15 s)] ausgewählt und die IRA Bestrahlungsdauer bei 15 min konstant gehalten. Die IRA Dosis lag unverändert bei 306 J/cm<sup>2</sup>.



### 4.3 Dosisabhängigkeit des IRA-Effektes

Für die IRA Kinetik wurden ähnlich wie bei der UVB Dosis Kinetik drei unterschiedliche Bestrahlungszeiträume für IRA ausgewählt (1 min, 5 min, 15 min) und die UVB Bestrahlungsdauer konstant gehalten (15 s). Das entsprach für IRA 20 J/cm<sup>2</sup> (1 min), 102 J/cm<sup>2</sup> (5 min) und 306 J/cm<sup>2</sup> (15 min). Die UVB Dosis lag bei 100 J/m<sup>2</sup>.



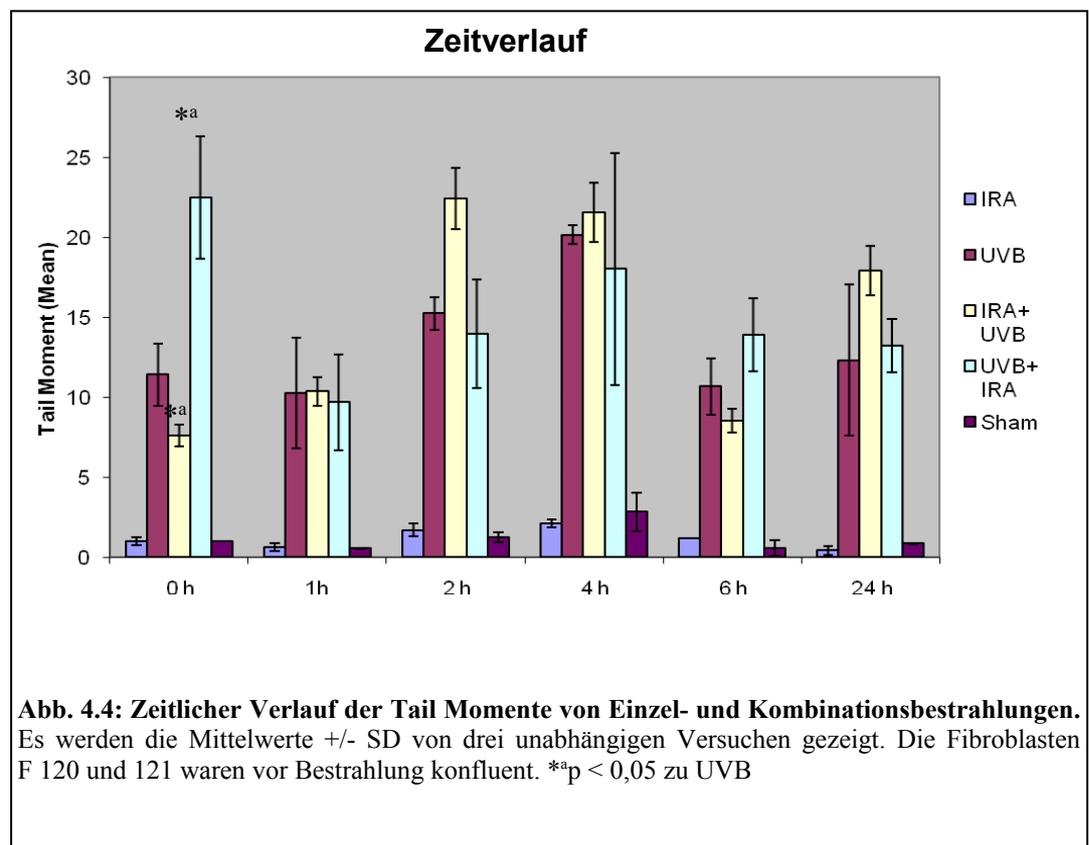
Das Experiment zeigte, dass alleinige IRA Bestrahlung bei allen angewendeten Dosen keinen Effekt hatte. UVB ließ das Tail Moment wie auch zuvor beobachtet ansteigen. Je höher die IRA Dosis vor der UVB Bestrahlung war, desto mehr zeigte sich, wie zuvor schon beobachtet, eine absinkende Tendenz im Hinblick auf DNS Strangbrüche. Im Gegensatz dazu konnte man bei UVB+IRA erneut eine erhöhte DNS Schädigung beobachten und zwar je höher die IRA Dosis nach der UVB Bestrahlung war. Dabei führten aber erst 15 min IRA Bestrahlung zu einem signifikanten Unterschied zwischen UVB alleine und UVB+IRA.

Beide Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit weisen darauf hin, dass sowohl UVB als auch IRA Dosis einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Tail Momente haben.

Ein weiterer Faktor, der möglicherweise die Ätiologie der DNS Strangbrüche erklären kann, ist die Entwicklung der DNS Strangbrüche über die Zeit. Dies soll im Folgenden gezeigt werden.

#### 4.4 Zeitabhängigkeit des IRA-Effektes

Zur weiteren Charakterisierung der Effekte von IRA und UVB auf die menschliche DNS wurde der Zeitverlauf der DNS Schädigung untersucht. Dabei wurden nach sechs (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h) verschiedenen Zeitpunkten die Proben abtrypsiniert und in Agarose fixiert.

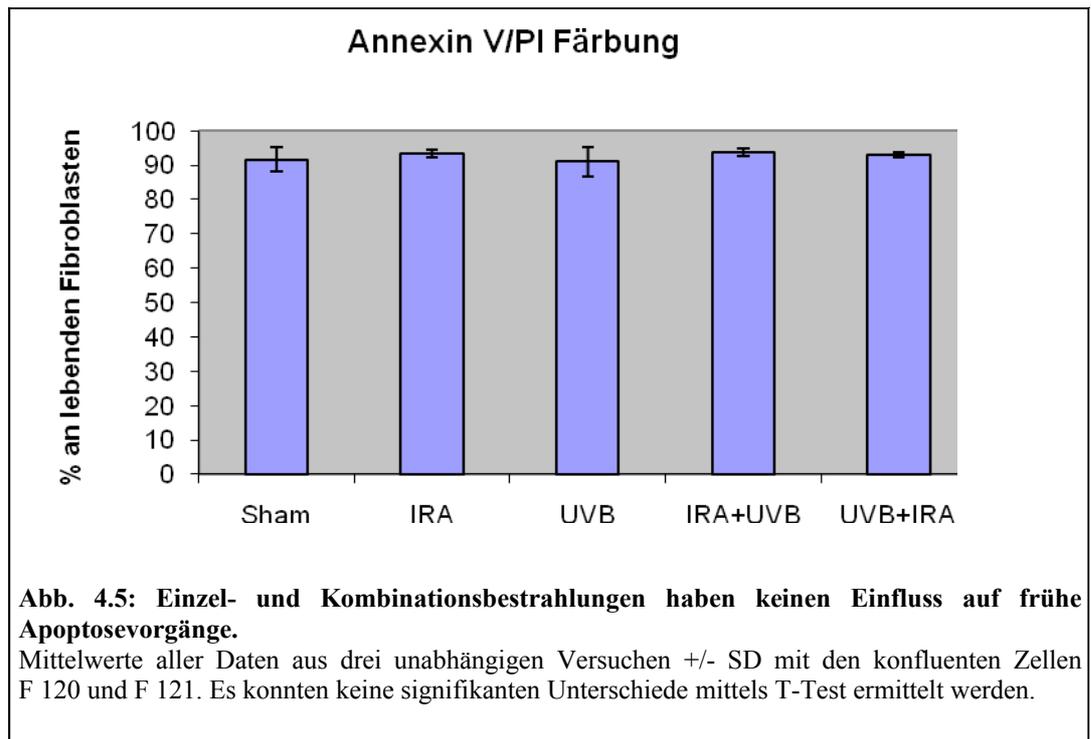


Bei sofortiger Fixierung der Zellen nach Behandlung (0 h) zeigte sich erneut der deutliche Anstieg von UVB+IRA im Vergleich zu UVB alleine. IRA+UVB senkte das Tail Moment hingegen geringfügig. Man sieht auch, dass bei IRA+UVB das Maximum des Tail Moments schon bei zwei Stunden lag, während bei UVB und UVB+IRA nach 4 h das höchste Tail Moment detektiert werden konnte. Im Zeitverlauf betrachtet wird deutlich, dass es zu einem wellenartigen Verlauf aller Tail Momente der UVB behandelten Proben kommt.

Als Fazit aus diesem Experiment ergibt sich, dass der in 4.1 beschriebene Effekt durch IRA von einer Erhöhung des Tail Moments nach UVB+IRA nur nach sofortiger Fixierung der Fibroblasten zu beobachten ist. Dies gilt ebenfalls für die leichte Erniedrigung der Tail Momente nach IRA+UVB.

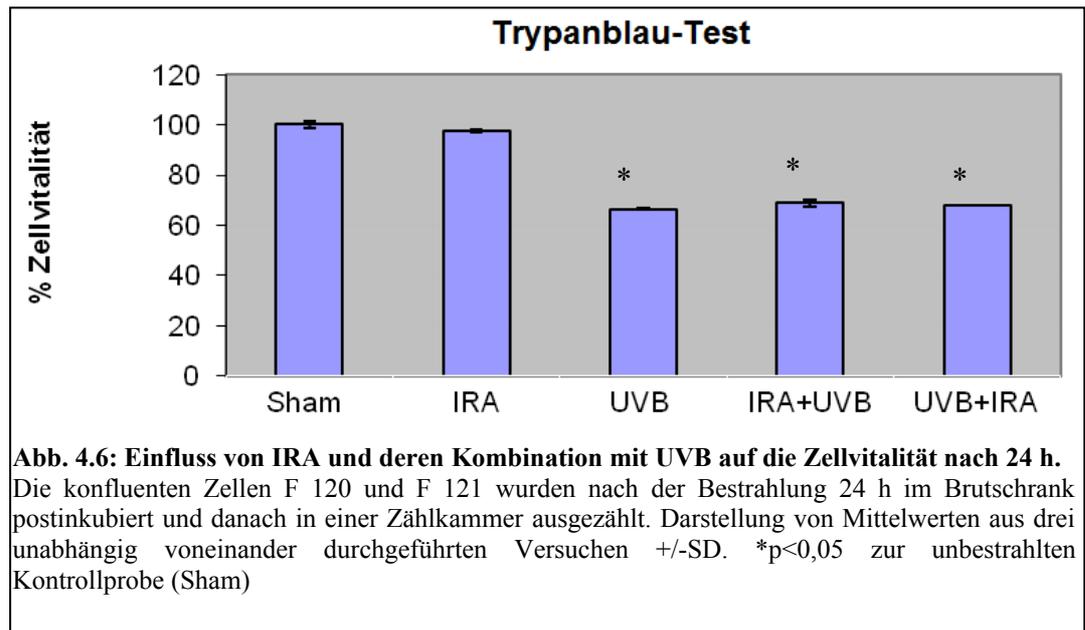
### **4.5 Spezifität des IRA-Effektes**

Zur Messung der Zellvitalität wurde eine Annexin-V/PI Färbung und Trypan Blau Tests angefertigt. Die flusszytometrische Analyse der Annexin-V/PI Färbung diente zur Untersuchung von frühzeitigen Apoptosevorgängen (1 h), während der Trypanblau-Test zur Detektion des Zellüberlebens nach 24 h, also der abgeschlossenen Apoptose benutzt wurde



Die Abbildung 4.5 zeigt sehr deutlich, dass Behandlungen mit den verschiedenen Bestrahlungsarten und deren Kombinationen zu keinem signifikanten Unterschied hinsichtlich früher Apoptosevorgänge führen.

Um jedoch evtl. später einsetzende Apoptosevorgänge nicht zu übersehen, wurde mit Hilfe des Trypanblau-Test das Zellüberleben nach 24 h gemessen.

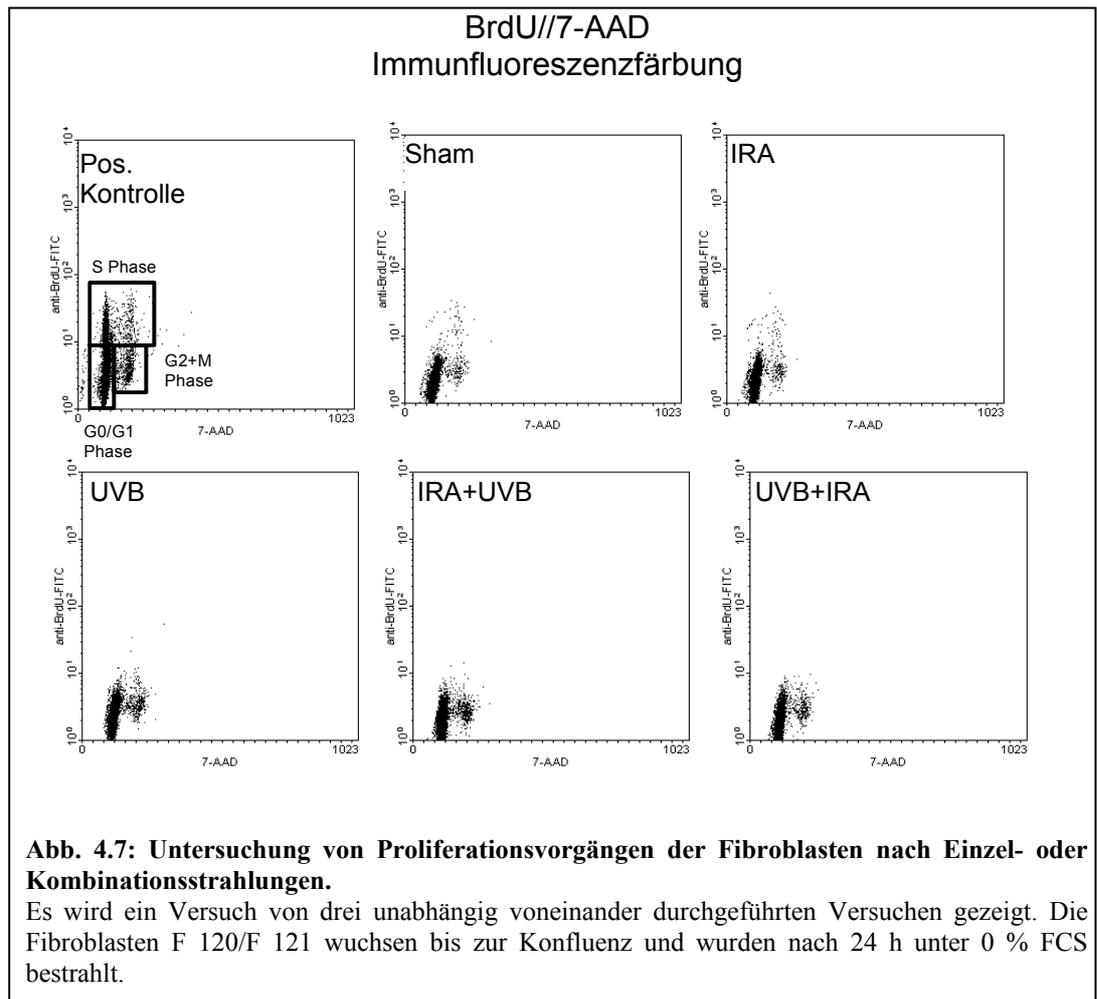


Anhand der Abb. 4.6 lässt sich schlussfolgern, dass die Einzel- und Kombinationsbestrahlung der Zellen mit IRA keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf Apoptosevorgänge bewirkt. Die Bestrahlung von UVB hat im Trypanblau-Test jedoch eine Zellvitalitätsminderung von 30 % ergeben. Die Kombinationsbestrahlungen mit IRA+UVB und UVB+IRA zeigten keinen weiteren Einfluss durch IRA.

## 4.6 Terminierung des IRA-Effektes

### 4.6.1 Wirkung auf die DNS Neusynthese

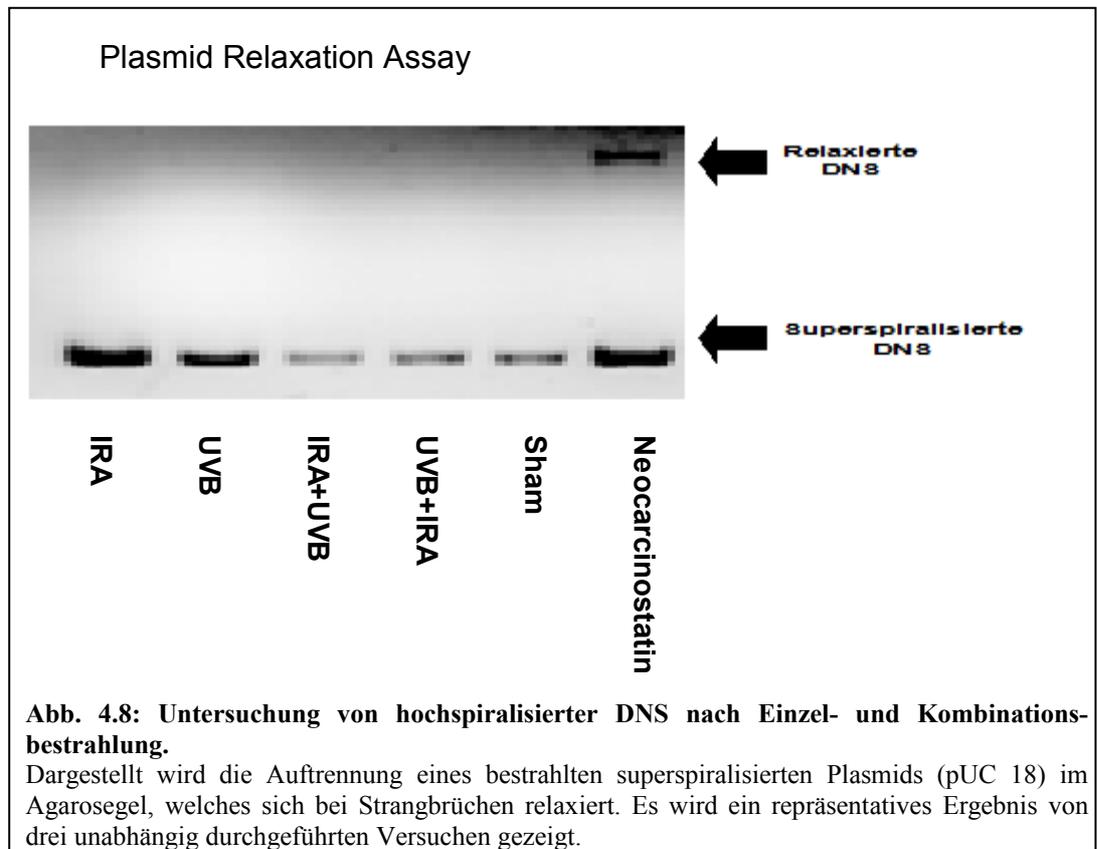
Die BrdU Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht es, DNS Neusynthese und den Zellzyklus mit Hilfe der Durchflusszytometrie von proliferierenden Zellen zu untersuchen. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob Proliferationsvorgänge der Fibroblasten nach der Bestrahlung Einfluss auf die vorher gezeigten Ergebnisse haben.



Es zeigt sich, dass nur die Zellen der Positivkontrolle proliferieren. Einzeln und in Kombination bestrahlte Proben zeigen keine DNS Neusynthese sondern zwei homogene Populationen in der G0/G1 Phase oder G2/M Phase. Im Vergleich zeigt die Positivkontrolle deutliche BrdU Anreicherung und eine Zellpopulation in der Synthesephase (S Phase) nach 24 h Inkubation mit FCS ohne Bestrahlung.

#### 4.6.2 Wirkung auf reine Plasmid DNS

Um zu ermitteln, ob der oben beschriebene Effekt (4.1) auf einem biologischen Mechanismus beruht, oder rein photophysikalisch/photochemische Prozesse hierfür verantwortlich sind, wurde nackte hochspiralisierte Plasmid DNS bestrahlt. Die DNS wurde, wie in 3.2.7 beschrieben, behandelt und bestrahlt und danach durch ein Agarosegel aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente Neocarzinostatin, welches der 6. Bande der Abb. 4.8 entspricht. Geschädigte DNS entspiralisiert sich und läuft dementsprechend langsamer in einem Trenngel. In der Positivkontrolle zeigt sich eine weitere Bande oberhalb der Bande der superspiralisierten DNS. In den aufgetragenen Proben der Einzel- und Kombinationsbestrahlungen erkennt man keine weitere Bande.

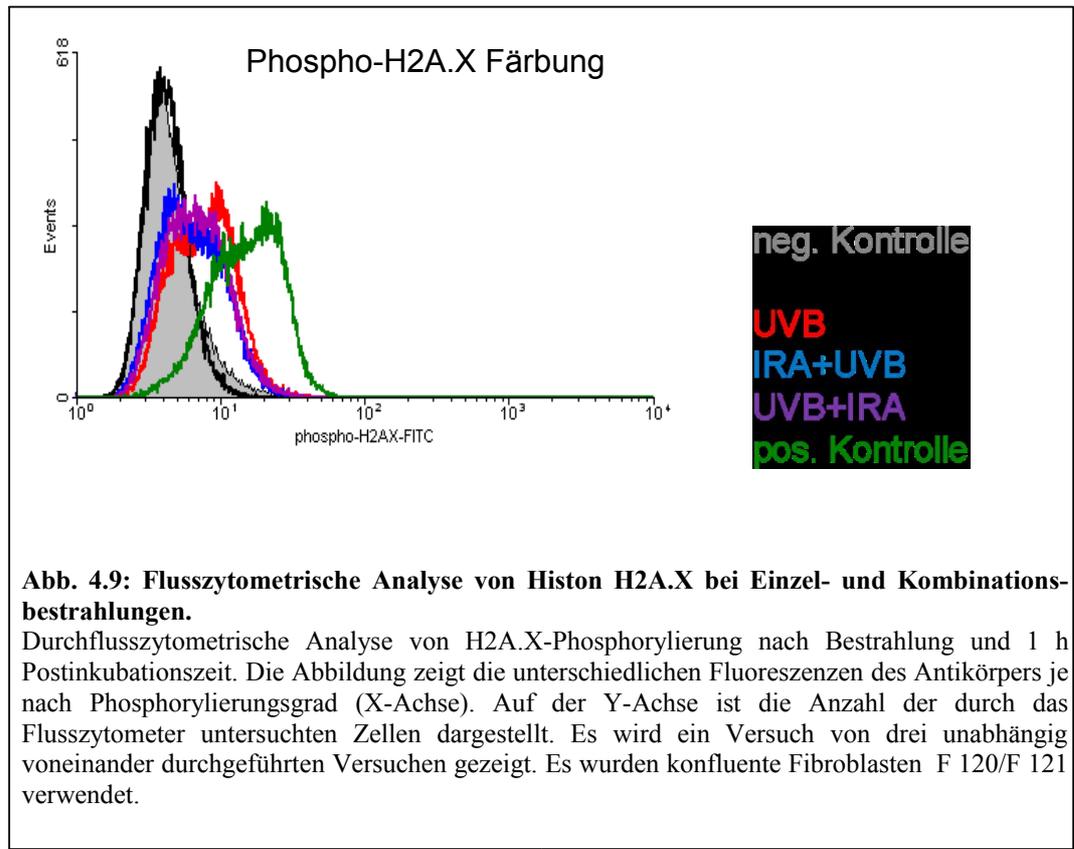


Innerhalb dieser Versuchsreihe ergibt sich kein direkter DNS Schaden durch eine der Bestrahlungen, sondern nur durch das Karzinogen Neocarzinostatin. Damit erhärtet sich der Verdacht, dass die im Comet Assay detektierten Strangbrüche durch IRA und UVB und deren Kombinationen nicht durch direkte Schädigung der DNS zu erklären sind. Nachdem eine direkte photochemische und/oder photophysikalische Ursache ausgeschlossen werden konnte, stellte sich die Frage, welche biologischen Prozesse den beobachteten Effekt vermitteln. Hilfreich erscheint dabei eine Charakterisierung der DNS Strangbrüche und eine Untersuchung von Reparaturenzymen aus der NER.

### **4.6.3 Die Rolle von Doppelstrangbrüchen**

Wie schon sehr ausführlich in 3.2.6.2 beschrieben, ist H2A.X wichtig in der Rekrutierung der Reparaturenzyme der DNS zu Bruchstellen innerhalb des Genoms. Kommt es aus verschiedenen Gründen zu Doppelstrangbrüchen, wird das Histon H2A.X an Serin 139 phosphoryliert (Rogakou EP et al., 1998). Es gehört damit zu den ersten Markern für DNS Doppelstrangbrüche, die verfügbar sind. Im Verlauf wird es auch noch zu einem Marker für Apoptose, wenn der DNS Schaden für die Zelle nicht mehr reparierbar ist. Im Rahmen der Apoptose kommt es dann zu weiterer Fragmentierung des Genoms und Phosphorylierung von H2A.X.

Zur weiteren Charakterisierung der DNS Strangbrüche wurde die H2A.X Phosphorylierung untersucht, um die Ergebnisse der schon beschriebenen Analysen hinsichtlich der Apoptose nochmals zu bestätigen und einen Aufschluss über den Anteil an Doppelstrangbrüchen zu gewinnen. Zur Erinnerung, in den oben gezeigten Ergebnissen der Comet Assays wurden Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen.



In dieser Untersuchung hat alleinige IRA Bestrahlung keinen Einfluss hinsichtlich H2A.X Phosphorylierung, wie man im Vergleich zur unbestrahlten Probe (Neg. Kontrolle) erkennen kann. Die Positivkontrolle mit Neocarzinostatin zeigt eine starke Phosphorylierung, so dass Sicherheit besteht, dass die Färbung gut funktioniert hat.

UVB alleine weist schon einen gewissen Grad an Phosphorylierung auf, was auf induzierte Doppelstrangbrüche in der DNS hindeutet. Die Kombinationen mit IRA zeigten jedoch keinen deutlichen Unterschied zu UVB wie beim Comet Assay.

#### 4.6.4 Wirkung auf die NER

Um diese Fragestellung zu untersuchen wurden Mausfibroblasten vom Wildtyp und embryonale XPA Knock-out Mausfibroblasten mit den verschiedenen Bestrahlungssequenzen behandelt und danach im Alkalischen Comet Assay untersucht. XPA gehört mit zu den ersten Enzymen, die in der NER DNS Schäden erkennen und diese für die Zerschneidung markieren. Dabei ist es besonders verantwortlich für UV induzierte DNS Schäden.

Es gibt mehrere Enzyme, die zu diesen XP Enzymen gehören und sie alle sind in unterschiedlichem Maße in der Reparaturmaschinerie von UV-induzierten DNS Schäden beteiligt. Menschen, bei denen eins oder mehrere dieser Proteine fehlen oder mutiert sind, leiden unter der Erkrankung Xeroderma Pigmentosum. Nach diesem Krankheitsbild ist die Enzymgruppe auch benannt. Xeroderma Pigmentosum wird umgangssprachlich als „Mondkrankheit“ bezeichnet, da die betroffenen Menschen keine Sonne vertragen. Sie sind durch den Defekt nicht oder nur unvollständig in der Lage UV-induzierte DNS Schäden zu reparieren. Es kommt zu Akkumulation von CPD und weiteren Mutationen, die schon in jungen Jahren zu malignen Entartungen wie z.B. dem spinozellulären Karzinom oder Melanomen führen.

Falls also die Reparatur der UVB induzierten Schäden durch IRA beeinflusst wird, müsste sich bei den XPA Knock-out Fibroblasten eine Hemmung bzw. ein niedrigeres Tail Moment als beim Wildtyp bei der Kombination UVB+IRA zeigen.

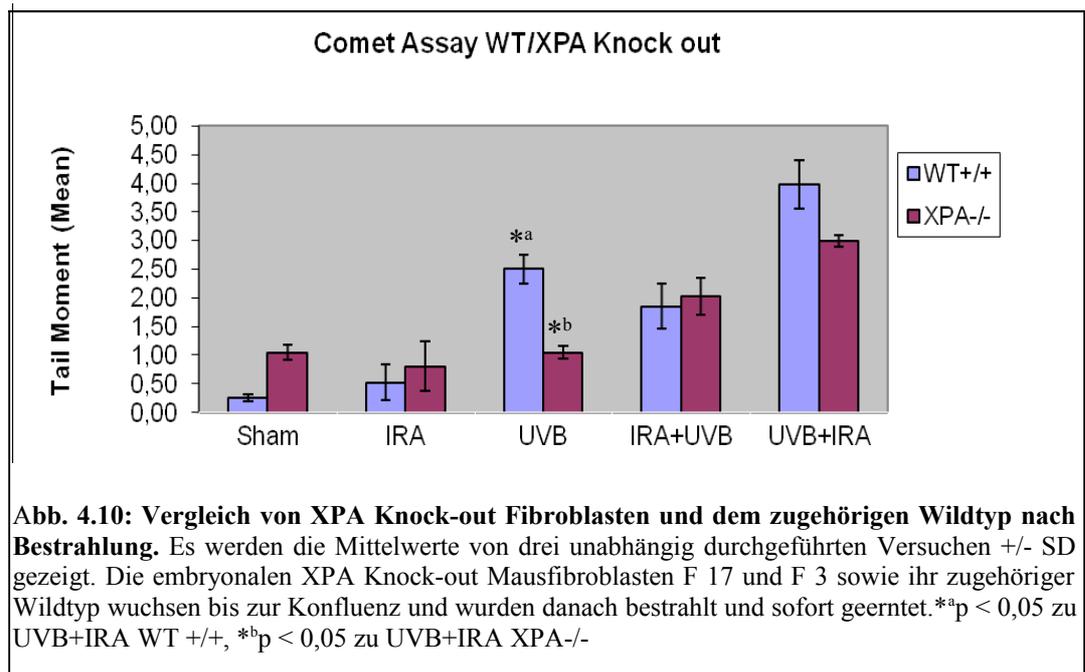


Abb. 4.10 zeigt, dass der beobachtete erhöhte Tail Moment für UVB+IRA bei den XPA Knock-out Zellen geringer ausfällt. Allerdings gleicht sich das Tail Moment nicht an das UVB XPA -/- Tail Moment an.

## 5 Diskussion

Eine Beeinflussung von UV-induzierten DNS Schäden muss aufgrund von möglichen morphologischen, funktionalen und biochemischen Veränderungen auf Zell- und Organebene kritisch betrachtet werden. Ob und inwieweit IRA zu einem möglichen Schutz oder Schaden beiträgt ist bisher ungeklärt. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von IRA auf UV-induzierte Schäden in der menschlichen DNS.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die zeitliche Abfolge der UVB bzw. IRA Bestrahlung und ihre Dosis eine entscheidende Rolle spielt. Wurde die IRA Strahlung vor der UVB Bestrahlung appliziert, kam es zu niedrigeren Tail Momenten an DNS Strangbrüchen. Bestrahlte man die Zellen jedoch zuerst mit UVB und danach mit IRA, stieg die Anzahl der DNS Strangbrüche dosisabhängig an. Ein Beleg dafür, dass es sich hier um strahlungsinduzierte DNS Schäden handelt. Bei der Untersuchung der Tail Momente über die Zeit, konnte nur bei 0 h das deutlich erhöhte Tail Moment bei UVB+IRA nachgewiesen werden. Bei der Induktion der DNS Fragmentierung handelt es sich also um einen schnell ablaufenden Prozess, der möglicherweise schon während oder sofort nach der IRA Bestrahlung beginnt. Der wellenförmige Verlauf der Tail Momente aller mit UVB behandelten Proben kann durch die beginnende Reparatur der UVB Schäden erklärt werden. Es ist bekannt, dass UV-induzierte Schäden hauptsächlich zwischen 2 h - und 4 h nach Bestrahlung repariert werden und durch die Reparaturmechanismen mehr DNS Fragmente entstehen (Cooke MS et al., 2003). Weiterhin können diese zelleigenen Vorgänge bis zu 48 h dauern (Sauveigo S et al., 1998), welches die noch relativ hohen Tail Momente nach 24 h erklärt.

**Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zeitliche Abfolge und die Dosis der IRA Bestrahlung in Bezug auf UVB Bestrahlung (IRA+UVB oder UVB+IRA) eine entscheidende Rolle spielt. Die vorliegenden Daten liefern somit wichtige Hinweise dafür, dass die über den Tag variierende Zusammensetzung unseres polychromatischen Sonnenlichtes unterschiedliche Auswirkungen auf die Integrität und Reparaturkapazität der menschlichen DNS entfaltet.**

Die Ergebnisse bestätigen Studien, in denen IRA vor UVB appliziert und IRA als ein Schutzmechanismus für UVB induzierte DNS Schäden beschrieben wurde (Danno K et al., 1992; Menezes S et al., 1998). Wobei bei diesen Studien nur über einen Schutz vor UV-induzierter Apoptose berichtet wird. Darüber hinaus können Studien bestätigt werden, in denen UVB und danach IRA bestrahlt und zusätzliche Schäden detektiert wurden (Kligmann LH, 1982).

Bei den in Kapitel 4 präsentierten Daten, konnte trotz deutlich messbarer DNS Fragmentierung überraschenderweise kein signifikanter Anstieg oder Abfall an Zelltod nach IRA Behandlung gemessen werden. Dies steht in Dissonanz zu Studien, wo gezeigt werden konnte, dass IRA zumindestens einen protektiven Effekt auf Zellüberleben vor UVB oder UVA Bestrahlung hat (Frank S et al., 2005; Menezes S et al., 1998). Diese Daten müssen jedoch kritisch im Vergleich betrachtet werden, da unterschiedliche Bestrahlungsdosen, Bestrahlungszeiten und Postinkubationszeiten verwendet wurden. Vielmehr wurden die Zellen bei den genannten Autoren an verschiedenen Tagen mit IRA und UVB bestrahlt, sodass ein direkter zeitlicher Zusammenhang der Bestrahlungsarten, wie er an einem Sonnentag gegeben ist, kaum nachzuvollziehen ist.

Desweiteren wurden die Daten nur mithilfe des Trypanblau-Tests gewonnen und nicht wie in dieser Studie durch die Durchflusszytometrie reevaluiert. Da der Trypanblau-Test ein durch subjektive Bewerter anfälliges Testverfahren ist, sind die Ergebnisse dieser beiden Studien recht vorsichtig hinsichtlich Ihrer Aussagefähigkeit gegenüber IRA Protektivität einzuordnen. Desweiteren ist der verwendete Farbstoff Trypanblau selbst zytotoxisch und kann die Testergebnisse je nach Einwirkzeit massiv beeinflussen. Es wurden von den Autoren zwar Kontrollen durchgeführt, aber eine Normierung aller Proben zum Ausschluss dieses Problems wurde nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass einmalige IRA Bestrahlung unabhängig der zeitlichen Abfolge zu UVB keinen Einfluss auf Apoptoseinduktion in menschlichen Fibroblasten hat. Bei den mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten zeigte sich sogar kaum Zelltod durch UVB alleine, welches durch die niedrige aber durchaus physiologische Dosis erklärbar ist (Krutmann J et al., 2006).

Bei den vorliegenden Daten wurde ebenfalls kein Einfluss von einzelnen oder kombinierten Behandlungen auf nackte Plasmid-DNS beobachtet. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass es sich bei der beobachteten DNS Fragmentierung nicht um einen direkten physikalischen oder chemischen Effekt handelt, sondern ein intakter Zellorganismus mit funktionierender NER Voraussetzung für das beobachtete Phänomen ist. Dies führt zu der Hypothese, dass IRA nicht die DNS selber, sondern zelleigene Reparaturmechanismen im Rahmen der NER beeinflusst, die durch UV-induzierte DNS Schäden aktiviert werden. Durch vermehrte Aktivität dieser Reparaturenzyme kommt es dann möglicherweise auch zu erhöhter Fragmentierung der DNS, die allerdings transient ist (Cooke MS, 2003). Dies konnte in der Analyse der DNS Strangbrüche im Zeitverlauf auch gezeigt werden.

Desweiteren könnte aber auch der UV-Schaden die DNS für IRA induzierten oxidativen Stress sensibler machen (Zastrow L et al., 2009). Um die detektierten DNS Fragmente näher zu charakterisieren und dadurch Aufschluss über ihre Bedeutung für den Zellorganismus zu bekommen, wurden weitere Untersuchungen gemacht.

Flusszytometrische Messungen von H2A.X Phosphorylierung, welche als eine der frühesten Marker für DNS Schäden und folgender Apoptose gilt, ergaben einen Anstieg der Phosphorylierung für alle UVB behandelten Proben. Zusätzliche IRA Bestrahlungen vor oder nach UVB hatten jedoch keine stärkere Phosphorylierung zur Folge. Dass es nach UVB zu einer vermehrten Phosphorylierung von H2A.X kommt, scheint durch vermehrte DNS Läsionen begründbar, die unter anderem durch die Bildung von Thymindimeren entstehen (Paul TT et al., 2000).

Die DNS kann diese Läsionen jedoch abhängig von ihrer Anzahl reparieren und induziert nicht sofort eine Apoptose, was an den erhobenen Daten dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte. Die Daten zur untersuchten H2A.X Phosphorylierung untermauern also ebenfalls, dass IRA nicht zu einem direkten Schaden der DNS führt, sondern nur in Kombination mit UVB Einfluss auf den Prozess der zelleigenen DNS Reparatur nimmt.

Eine Interpretation hinsichtlich einer Beeinflussung des Zellzyklus kann nicht getätigt werden, da die Zellen nicht im Zellzyklus synchronisiert wurden. Mögliche Proliferationsvorgänge als Ursache für die detektierten DNS Strangbrüche konnten ausgeschlossen werden.

Wenn IRA also einen Einfluss auf UVB induzierte DNS Fragmentierung besitzt, jedoch keine Apoptose, keine DNS Neusynthese und keine zusätzlichen DNS Läsionen entstehen, muss IRA indirekt über DNS zugehörige Proteine und Enzyme oder über andere Zellmetabolite, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, die menschliche DNS Integrität beeinflussen.

Um diese Theorie zu untermauern kommt man an einer Analyse der Enzyme der Nukleotid Exzisions Reparatur der menschlichen DNS nicht vorbei. Schließlich handelt es sich hierbei um Enzyme, die die DNS aktiv einschneiden und wieder zusammenfügen können (Friedberg EC et al., 1995). Da man bereits weiß, dass H2A.X bei Doppelstrangbrüchen, Apoptose und anderen UVB induzierten Läsionen phosphoryliert wird (Rogakou EP et al., 1998; Marti TM et al., 2006) und bei den Kombinationsbestrahlungen kein Unterschied zu UVB allein detektiert werden konnte, liegt der Verdacht nahe, dass eine erhöhte Bildung von DNS Strangbrüchen nach UVB+IRA durch eine veränderte Aktivität der Reparaturenzyme (NER) zu begründen ist.

Die Hauptaufgaben der NER sind die Erkennung von beschädigten DNS Abschnitten und deren Reparatur bzw. Ersetzung. Ca. 30 Proteine sind an der NER beteiligt: XPC-hHR23B, die neun Untereinheiten von TFIIH, XPA, das „ssDNA-binding protein“ RPA und XPG sind an der Erkennung und DNS Entwindung beteiligt.

Die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF schneiden den beschädigten Teil heraus und die DNS Polymerase, PCN A, RF-C und die DNS Ligase sorgen für die Reparatursynthese und Ligation. Dies entspricht der Global Genomic Repair (GGR), während in aktiv transkribierten Genen DNS Schäden effektiver von der Transcription-coupled Repair (TCR) repariert werden. Bis auf XPC-hHR23B sind alle Proteine der NER an der TCR beteiligt. Die TCR benötigt zusätzlich CSA,

CSB und die RNA Polymerase II für die Erkennung des Schadens (Scharer OD, 2003).

Die vorliegenden Daten mit XPA Knock-out Fibroblasten zeigten, dass XPA ein mögliches Target von IRA sein könnte. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Reparaturmechanismen für UV-induzierte DNS Schäden komplex sind und keineswegs von nur einigen wenigen Enzymen ausgeführt werden. Die Daten liefern mögliche Hinweise dafür, dass noch weitere Enzyme der NER durch IRA beeinflusst werden könnten. Um diesen Mechanismus hinsichtlich seiner Sensibilität auf IRA Bestrahlung zu untersuchen, müsste man zunächst funktionelle Gruppen und im Anschluss einzelne Proteine ausschalten.

Erste Versuche einer Arbeitsgruppe aus Kiel (Jantschitsch et al., 2009) zeigten bei einer Gen-Analyse eine deutlich erhöhte Expression der Cyclin-abhängigen Kinase 8 (CdK8) nach IRA Bestrahlung, welche ihrerseits mit CdK 7, Cyclin H und Mat1 interagieren. Dies sind essentielle Komponenten des Transkriptionsfaktors TFIID, welcher in Transkriptionsinitiierung und DNS Reparatur involviert ist.

Einzelfaktoranalysen der NER auf Genebene nach IRA und IRA+UVB Bestrahlung zeigten keine eindeutigen Hinweise auf IRA induzierte Reparaturenzyme. Desweiteren beobachtete die gleiche Arbeitsgruppe in *in vivo* Studien an Mäusen, dass IRA alleine keine Hauttumore verursachte, jedoch in Kombination mit UVB zu einem aggressiveren Wachstum der UV-induzierten Hauttumore führte. Die Daten von *Jantschitsch et al.* bestätigen also durchaus die Hypothese, dass IRA alleine keinen Einfluss auf Phototoxizität und Photokarzinogenese hat, jedoch in Kombination mit UVB die DNS Reparatur beeinflusst.

Ein andere Erklärung der Modulation von DNS Reparatur durch IRA ergibt sich dadurch, dass IRA die Reparaturmaschinerie über die Modifikation von Vibration, Rotation und damit durch erhöhten Energiestatus von Molekülen ankurbelt bzw. sie möglicherweise nach ihrem Arbeitsbeginn über die Bildung von oxidativem Stress behindert (Schroeder P et al., 2004).

So konnte 1999 nachgewiesen werden, dass IRA von Komponenten der Atmungskette im Mitochondrium absorbiert wird (Karu TI, 1999). Dabei scheint die Cytochromoxidase C eine entscheidende Rolle zu spielen (Karu TI, 2008). Dieses Enzym ist sehr aktiv und hält den Sauerstoffpartialdruck im Mitochondrium tief, um eine optimale Elektronenübertragung zu gewährleisten. Eine Beeinflussung dieses Enzyms durch IRA würde zu einer Veränderung des Elektronenflusses führen. Das Resultat ist eine vermehrte Produktion von mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies, wie z.B.  $O_2$  und  $H_2O_2$ .

Reaktive Sauerstoffspezies greifen zunächst nahe ihres Entstehungsortes an (rel. kurze Lebensdauer). Da das Mitochondrium der Hauptentstehungsort ist, werden in den meisten Fällen zuerst die mitochondriale Membran, ihre Proteine und ihre DNS angegriffen. Die mitochondriale DNS ist sehr viel anfälliger gegenüber Mutationen, da sie keine Intronsequenzen und Histone besitzt. Mutationen der mitochondrialen DNS stehen in Verbindung mit einer Vielzahl von degenerativen Krankheiten, wie z. B. Kearns-Sayre Syndrom, Myopathien, Enzephalopathien, Herzkrankheiten, Diabetes, Parkinson, Chorea Huntington und Alzheimer. Zur Zeit gibt es allerdings noch keine Daten zu IRA und ihrer Wirkung auf mitochondriale DNS.

Bei steigender Halbwertszeit können auch der Halbwertszeitradius bzw. die Diffusionsdistanz von reaktiven Sauerstoffspezies zum potentiellen Wirkort zunehmen. Damit können auch cytoplasmatische Proteine bzw. DNS außerhalb des Mitochondriums zum Angriffsziel werden (Oberdanner CB, 2004).

Dabei sind reaktive Sauerstoffspezies in der Lage DNS Einzel- und Doppelstrangbrüche, sowie Apoptose zu induzieren. Desweiteren gibt es Studien, die eine Beeinflussung der DNS Topoisomerasen und der DNS-abhängigen Protein Kinase durch reaktive Sauerstoffspezies nachgewiesen haben. Einige Chemotherapeutika wirken über diesen Mechanismus und induzieren in Tumorzellen Apoptose (Lu HR et al., 2005).

Desweiteren bedeutet eine veränderte mitochondriale Funktion eine Beeinflussung retrograder Singnalkaskaden zum Nukleus. Das Ergebnis ist eine Modulation von nukleärer Genexpression (Butow RA und Avadhani NG, 2004). Studien, die eine vermehrte Expression bestimmter Matrixmetalloproteinasen (verantwortlich für die Dystrophie von Kollagen und Elastin im Rahmen der Hautalterung) nach IRA Bestrahlung nachweisen konnten, scheinen diese Theorie nur zu untermauern (Schröder et al. 2007).

Auch UVB führt zu vermehrter Produktion von denselben reaktiven Sauerstoffspezies (Zastrow L et al., 2009). So beschreiben Studien, dass Antioxidantien, wie Vitamin C und K hinsichtlich UVB induzierter DNS Schäden einen protektiven Effekt haben. Dabei wurde nach drei Monaten oraler Verabreichung von Antioxidantien eine signifikante Senkung an CPD nach UVB Bestrahlung beobachtet (Placzek M et al., 2005; Dekker P et al., 2005).

Auch eine topische Anwendung von Antioxidantien in Sonnencremes reduzierte die Inzidenz von Sonnenbränden und CPD Formationen. Diese Tatsache verdeutlicht ebenfalls, dass reaktive Sauerstoffspezies durchaus verantwortlich für bestrahlungsabhängige DNS Schäden sein können. Schon 1995 wurde über die Rolle von photochemisch produzierten reaktiven Sauerstoffspezies als initialer Trigger für die molekulare UV-Antwort berichtet (Wlaschek M et al., 1995).

Können UVB und zusätzlich IRA induzierte Sauerstoffspezies sich also gegenseitig potenzieren und so die Reparaturmechanismen behindern oder sogar vielleicht direkt zu DNS Schäden führen?

Die vorliegenden Daten untermauern diese Theorie. Die Bestrahlungen der Fibroblasten mit UVB+IRA zeigten signifikant höhere Tail Momente im Vergleich zu UVB alleine. Ein weiteres Indiz für eine möglich erhöhte Produktion von Sauerstoffspezies durch UVB und IRA ist die Potenzierung der detektierten DNS Fragmente initial nach der Bestrahlung, da Sauerstoffspezies eine kurze Lebensdauer in der Zelle haben. Doch auch eine Beeinflussung der NER, wie in Experimenten mit XPA-Knock-out Fibroblasten gezeigt werden konnte, scheint bei dem beobachteten Phänomen eine Rolle zu spielen. Unklar bleibt jedoch der tendenziell niedrigere Schaden bei der Kombination IRA+UVB, welcher jedoch nicht in allen Experimenten reproduziert werden konnte. Diese Frage muss in zukünftigen Untersuchungen weiter geklärt werden. Experimente zur Quantifizierung von intrazellulären Sauerstoffspezies und weitere Forschungsarbeit auf dem Gebiet der NER scheinen unabdingbar.

Die vorliegenden Daten können insofern in die Literatur eingeordnet werden, indem sie erstmals auf molekularer Ebene zeigen, dass IRA durchaus einen indirekten Effekt auf die menschliche DNS entfalten kann. Dieser wird potenziert durch die Kombination mit UVB. Genau diese Tatsache konnte in aktuellen Studien anhand von Mäusen gezeigt werden (Jantschitsch et al., 2009).

Anhand dieses Ergebnisses zeigt sich, dass die Wellenlängenbereiche unseres Sonnenspektrums nicht einzeln für sich, sondern nur in Kombination zu betrachten sind. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte ebenfalls UVA in Kombination mit UVB und IRA sein.

Desweiteren sollte ein großflächiger Einsatz von artifizieller IRA Strahlung in der Kosmetikindustrie, in der photodynamischen Therapie oder bei Wundheilungsstörungen grundsätzlich überdacht und bei jedem Patienten je nach Hautkrebsrisiko reevaluiert werden. Berichte über erhöhte Photokarzinogenese (Kligmann LH, 1982; Bain JA et al. 1943; Jantschitsch et al. 2009), Dermatosen (Findlayson GR et al., 1966) und Sklerosierung (Kligmann LH, 1982) sind nur einige Beispiele dafür, dass IRA Strahlung nicht harmlos ist.

Zukünftig müssen weitere Untersuchungen zur Erforschung photochemischer Mechanismen von IR durchgeführt werden, um eine wissenschaftliche Basis zur Entwicklung von Strategien zu schaffen, die IR induzierte Hautschäden vorbeugt. Es besteht kein Zweifel, dass moderner Lichtschutz menschliche Haut auch vor IRA Strahlung schützen sollte.

## 6 Zusammenfassung

Das emittierte Strahlungsspektrum der Sonne, welches die menschliche Haut erreicht, besteht aus einer großen Anzahl von unterschiedlichen Wellenlängen. Es ist bereits gut belegt, dass UV Licht für eine Vielzahl an schädlichen Effekten auf die menschliche Haut beteiligt ist, wie z. B. Hautkrebs und Faltenbildung. 7 % des Sonnenlichts bestehen aus UV Strahlen (290 - 400 nm) aber mehr als 50 % liegen im 760 nm – 1 mm Bereich, welcher die Infrarot Strahlung enthält. Dieser Teil ist alleine für ein Drittel der solaren Energie verantwortlich.

Epidemiologische Daten und klinische Fallberichte weisen darauf hin, dass IR-Strahlung für die menschliche Haut, ähnlich wie Ultraviolettstrahlung, bei Lichtalterung und Photokarzinogenese involviert ist. Bis jetzt sind die molekularen Konsequenzen für diese Art von Strahlung nicht ausreichend erforscht. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Ultraviolett-B (UVB) und Infrarot-A (IRA) Strahlung und ihrer Kombination auf die DNS von humanen Hautfibroblasten untersucht.

Bei den Untersuchungen wurde beobachtet, dass eine IRA Bestrahlung vor UVB zu einer geringen Absenkung des gemessenen DNS Schaden führt. Bei umgekehrter Bestrahlungsreihenfolge führt IRA zu einer signifikanten Verstärkung der UVB induzierten DNS Schäden. Weitere Zeitkinetiken und Versuche zur Dosisabhängigkeit haben gezeigt, dass man den größten Effekt direkt nach der Behandlung detektiert (Zeitpunkt der Zellfixierung 0 h nach UVB+IRA: Tail Moment  $\sim 25$ ; Zeitpunkt der Zellfixierung 1 h nach UVB+IRA: Tail Moment  $\sim 10$ ) und dieser zusätzlich dosisabhängig ist (6,67 J/m<sup>2</sup> UVB+ 306 J/cm<sup>2</sup> IRA: Tail Moment  $\sim 2$ ; 100 J/m<sup>2</sup> UVB+ 306 J/cm<sup>2</sup> IRA: Tail Moment  $\sim 8$ ). Obwohl der alkalische Comet Assay einen Anstieg an DNS Schäden nach UVB und folgender IRA Bestrahlung detektiert, wurde überraschenderweise kein signifikanter Anstieg an Zelltod gemessen.

Weiterhin wurde zum Ausschluss von rein photophysikalisch/photochemischen Prozessen kein Einfluss von einzelnen oder kombinierten Behandlungen auf nackte Plasmid DNS beobachtet. Eine Beeinflussung möglicher zusätzlicher Zellproliferationen bzw. DNS Neusynthese nach Bestrahlung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Flusszytometrische Messungen von H2A.X Phosphorylierung, welche als eine der frühesten Marker für DNS Doppelstrangbrüche und folgender Apoptose gelten, ergaben einen Anstieg der Phosphorylierung für UVB. Zusätzliche IRA Bestrahlung hatte jedoch keine stärkere Phosphorylierung zu Folge.

**In dieser Arbeit konnte erstmals auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, dass IRA indirekt einen Effekt auf die Integrität der menschlichen DNS entfalten kann. Es konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Abfolge und die Dosis der IRA Bestrahlung in Bezug auf UVB Bestrahlung (IRA+UVB oder UVB+IRA) eine entscheidende Rolle spielt. Die vorliegenden Daten liefern somit wichtige Hinweise dafür, dass die über den Tag variierende Zusammensetzung unseres polychromatischen Sonnenlichtes unterschiedliche Auswirkungen auf die Integrität und Reparaturkapazität der menschlichen DNS entfaltet.**

## 7 Literaturverzeichnis

Bachem A, Reed C. The penetration of radiation through human skin. *Am J Physiol* 1931; 97: S. 86-91.

Bain JA, Rusch H, Kline BE. The effect of temperatur upon ultraviolet carcinogenesis with wavelength 2800-3400A. *Cancer Research* 1943; 3: S. 610-612.

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

Blum, HF. Carcinogenesis by ultraviolet light. *Princeton University Press* 1959: S. 185-203.

Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JHJ in *The Genetic Basis of Cancer* (Eds.: Voglestein B, Kinzler KW) New-York 1998: McGraw-Hill. S. 245.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2A.X in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 2001; 276: S. 42462-42467.

Burri N, Gebbers N, Applegate LA. Chronic infrared-A radiation repair: Implications in cellular senescence and extracellular matrix. *Recent. Res. Devel. Photochem. Photobiol.* 2004; 7: S. 219-231.

Butow RA, Advahani NG. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* 2004; 14: S. 1-15

Chu DH, Haake ER, Olbrook K, Loomis CA. The Structure and Development of Skin. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* 2003: S. 58-88.

Cole, C. An action spectrum for UV photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 1986; 43: S. 275-84.

Cooke MS, Podmore ID, Mistry N, Evans MD. Immunochemical DNA damage and repair. *Journal of immunological methods* 2003; 280(1-2): S. 125-133.

Cooke MS, Podmore ID, Mistry N, Evans MD, Herbert KE, Griffiths HR, Lu HR, Zhu H, Huang M, Chen Y, Cai YJ, Miao ZH, Zhang JS, Ding J. Reactive oxygen species elicit apoptosis by concurrently disrupting topoisomerase 2 and DNA-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* 2005; 68(4): S. 983-994.

Lunec J. Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *Journal of Immunological Methods* 2003; 280: S. 125-133.

Danno K, Horio T, Imamura S. Infrared radiation suppresses ultraviolet B-induced sunburn-cell formation. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: S. 92-94.

Davies H, Bignell GR, Cox C. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: S. 949-954.

Dekker P, Parish WE, Green MR. Protection by Food-derived Antioxidants from UV-A1-Induced Photodamage, Measured Using Living Skin Equivalents. *Photochem Photobiol* 2005; 81: S. 837-842.

Dover JS, Phillips TJ, Arndt KA. Cutaneous effects and therapeutic uses of heat with emphasis in infrared radiation. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20(2Pt1): S. 278-286. Review.

Drolet BA, Connor MJ. Sunscreens and the Prevention of Ultraviolet Radiation-Induced Skin Cancer. *J Dermatol Surg Oncol* 1992; 18: S. 571-576.

Endres L, Breit R. UV radiation, irradiation, dosimetry. In: Krutmann J, Hönigsmann H, Elmetts CA, Bergstresser PR, Dermatological Phototherapy and Photodiagnostic Methods. New York 2001: Springer-Verlag. S. 3-53.

Fears TR, Scotto J, Schneiderman MA. Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. *Am J Epidemiol* 1977; 105: S. 420-7.

Findlayson GR, Sams WM Jr, Smith JH. Erythema ab igne. A histopathological study. *J Invest Dermatology* 1966; 46: S.104-108.

Frank S, Menezes S, Lebreton-De Coster C, Oster M, Dubertret L, Coulomb B. Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Experimental Dermatology* 2006; 15: S. 130-7.

Frank S, Oliver L, Lebreton-De Coster C, Moreau C, Lecabellec MT, Michel L, Valette FM, Dubertret L, Coulomb B. Infrared Radiation Affects the Mitochondrial Pathway of Apoptosis in Human Fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2004; 123: S. 823-831.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W 1995: *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington D.C.: ASM Press

Gansel RW.

[http://www.lmz.de/laser\\_medizin\\_zentrum\\_rhein\\_ruhr.php?site=start](http://www.lmz.de/laser_medizin_zentrum_rhein_ruhr.php?site=start).

Abgerufen am 8. Oktober 2007 von [www.lmz.de](http://www.lmz.de)

Gilchrest BA, Krutmann J. *Skin Aging*. Berlin 2006: Springer-Verlag.

Heckmann M 1999. *Taschenlexikon Dermatologie*. Berlin: Springer-Verlag.

Jantschitsch C, Majewski S, Maeda A, Schwarz T, Schwartz A. Infrared radiation confers resistance to UV-induced apoptosis via reduction of DNA damage and upregulation of antiapoptotic proteins. *The Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129 (5): S. 127-129.

Ju Hee Lee, Mi Ryung Roh, and Kwang Hoon Lee. Effects of Infrared Radiation on Skin Photo-Aging and Pigmentation. *Yonsei Medical Journal* 2006; 47: S. 485-490.

Jung EG. Dermatologie. Stuttgart 1998: Hippokrates-Verlag

Kappen LS, Napier MA, Goldberg IH. Roles of chromophore and apo-protein in neocarcinostatin action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 77: S. 1970-1974.

Karu TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Photochem Photobiol* 1999; B49: S.1-17.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol* 2008; 84(5): S. 1091-1099.

Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH: Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech. Ageing. Dev.* 2005; 125:S. 1170-1177.

Kligmann LH. Intensification of Ultraviolet-induced Dermal Damage by Infrared Radiation. *Archives of Dermatological Research* 1982; 272: S. 229-238.

Krutmann J, Gilchrist B. *Skin Aging*. Berlin 2006: Springer Verlag.

Kricker A, Armstrong BK, English DR. Sun exposure and non-melanocytic skin cancer. *Cancer Causes Control* 1994;105: S. 229-38.

Liu W, Nonaka K, Nie L, Zhang J, Christenson SD, Bae J, Van Lanen SG, Zazopoulos E, Farnet CM, Yang CF, Shen B. The neocarcinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases. *Chem Biol* 2005; 12: S. 293-302.

McLoughlin S: [ccr.coriell.org/.../ner\\_pathway.aspx?PgId=256](http://ccr.coriell.org/.../ner_pathway.aspx?PgId=256). Abgerufen am 19. Februar 2008 von [www.coriell.org](http://www.coriell.org)

Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *The National Academy of Sciences of the USA* 2006; 103: S. 9891-9896.

Menezes S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Non-Coherent Near Infrared Radiation Protects Normal Human Dermal Fibroblasts from Solar Ultraviolet Toxicity. *The Journal of Investigative Dermatology* 1998; 111: S. 629-633.

Moll KJ, Moll M. *Anatomie*. München 2003: Urban & Fischer Verlag.

Oberdanner CB. Reactive Oxygen Species (ROS) in biologischen Systemen und ihre Rolle in der Apoptose. *Diplomarbeit*. Salzburg 2004. Institut of Physics and Biophysics.

Paul TT, Rogalou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2A.X in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 2000; 10: S. 886-895.

Peak MJ, Peak JG. Single-Strand Breaks Induced In Bacillus Subtilis DNA By Ultraviolet Light:Action Spectrum And Properties. *Photochem Photobiol* 1982; 35: S. 675-680.

Peak MJ, Peak JG, Carnes BA. Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far-and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem Photobiol* 1987; 45: S. 381-387.

Placzek M, Gaube S, Kerkmann U, Gilbertz KP, Herzinger T, Haen E, Przybilla B. Ultraviolet B-Induced DNA Damage in Human Epidermis Is Modified by the Antioxidants Ascorbic Acid and Tocopherol. *J Invest Dermatol* 2005; 124: S. 304-307.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: S. 5858-5868.

Rogakou EP, Nieves-Neura W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induced phosphorylation of H2A.X histone at serine 139. *J Biol Chem* 2000; 275: S. 9390-9395.

Rosenstein BS. Analysis of a photosensitive lesion induced by sunlamp UV greater than 315nm exposure of 254nm-irradiated human cells. *Photochem Photobiol* 1988; 2: S. 381-387.

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

Schaeffer LM. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* 1994; 13: S. 2388-2392.

Scharer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003; 42: S. 2946-2974.

Sauveigo S, Serres C, Signorini N, Emonet N, Richard MJ, Cadet J. Use of the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay for the Immunofluorescent Detection of Specific DNA Damage. *Analytical Biochemistry* 1998; 259: S. 1-7.

Schiebler TH, Schmidt W. *Anatomie*. Berlin 2003: Springer-Verlag.

Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J. Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002; 119: S. 1323-1329.

Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: S. 228-234.

Schroeder P, Wild S, Schieke SM, Krutmann J. Further analysis of infrared A (IRA) radiation-induced MMP-1 expression: differential effects on epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* 2004; S. 122/2:A140.

Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radical Biology&Medicine* 2007; 43: S.128-135.

Setlow RB, Grist K, Thompson K, Woodhead AD. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: S. 6666-6670.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNS damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988; 175: S. 184-191.

Smith BL, Bauer GB, Povirk LF. DNA damage induced by bleomycin, neocarzinostatin, and melphalan in a precisely positioned nucleosome. *J Biol Chem* 1994; 269: S. 30587-30594.

Sterenborg HJ, v. d. Leund JC. Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source. *Photochem Photobiol* 1990; 51: S. 325- 330.

Stoien JD, Wang RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue cultur medium by blacklight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: S. 3961-3965.

Sutherland BM. Mutagenic lesions in photocarcinogenesis: induction and repair of pyrimidine dimers. *Photochem Photobiol* 1996; 63: S. 375-377. Review.

Unna P. *The Histopathology of the Diseases of the Skin*. Edinburgh 1896: W.F. Clay.

Urbach F. *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation*. Pergamon Verlag 1969.

Vaupel P, Krüger W. *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung*. Stuttgart 1995: Hippokrates Verlag.

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

Wallace JM, Hobbs PV. *Atmospheric Science – An Introduction Survey*. Heidelberg 2006: Elsevier Verlag.

Wasner S. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. <http://home.in.tum.de/~wasner/Archive/diefacharbeit.html> 2001. Abgerufen am 2. Oktober 2007 von [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

Weischet W. *Einführung in die allgemeine Klimatologie - physikalische und meteorologische Grundlagen*. Stuttgart 1995: Teubner Verlag.

Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharfetter-Kochanek K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol* 1995; 104(2): S.194.

Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L. The missing link—light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2009; 22(1): S. 31-34.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
Abb.	Abbildung
BER	Basen Exzisions Reparatur, (engl.: Base-Excision-Repair)
BrdU	Bromodesoxyuridin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil, (engl.: Charged-coupled Device)
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimere
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco`s Phosphate - Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Etbr	Ethidiumbromid
etc.	Et cetera (lat.: für und weiteres)
FACS	Durchflusszytometrie, (engl.: Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum, (engl.: fetal calf serum)
GGR	Global-genomische Reparatur, (engl.: global genome repair)
GRK 1033	Graduiertenkolleg 1033
IR	Infrarot

## Abkürzungsverzeichnis

IRA	Infrarot-A
IRB	Infrarot-B
IRC	Infrarot-C
LMP- Agarose	Low Melting Point Agarose
MEM	Minimal Essential Medium
m. H.	Mit Hilfe
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumlauge
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PI	Propidiumiodid
(6-4)PP	Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukte
SD	Standardabweichung
s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
UVA	Ultraviolett-A
UVB	Ultraviolett-B
UVC	Ultraviolett-C
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, (engl.: reactive oxygen species)

## Abkürzungsverzeichnis

TCR	Transkriptions-gekoppelte Reparatur, (engl.: transcription-coupled repair)
v. a.	Vor allem
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	Xeroderma pigmentosum Typ A
z.B.	Zum Beispiel

## 9 Anhang

### 9.1 Danksagung

And last but not least...Hiermit möchte ich mich bei allen ganz herzlich für die wissenschaftliche, geistige und mentale Unterstützung bedanken, die zu dieser Dissertation beigetragen hat. Dabei ganz besonders bei...

**Peet**, für die tolle Unterstützung und Dateninterpretation im Rahmen meiner Arbeit in deiner Arbeitsgruppe. Weiterhin bedanke ich mich für die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen und Vorträge zu halten. Du warst jeder Zeit mein Ansprechpartner und ich hoffe, die „Medizinerin“ hat deine Nerven nicht zu sehr strapaziert ☺. Außerdem bedanke ich mich für dein immer gefülltes Bonbonglas, die Bereitstellung des Laptops und die netten medizinisch angehauchten Gespräche...ohne dich wäre ich wohl in der Welt der Biologen und Chemiker untergegangen! ☺

**Prof. Dr. J. Krutmann**, für das rege Interesse an neuen Daten und weiterführenden Ideen. Außerdem bedanke ich mich für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen des GRK 1033. Schließlich ist das nicht üblich bei medizinischen Dissertationen. Danke natürlich auch für die Schaffung eines weiteren Zeitfensters für Labortätigkeiten im Rahmen meiner Dissertation im Sommer 2007!

**Kasi**, für die Einführung der „Medizinerin“ in die Laborarbeit und v.a. den Comet Assay.

**Calles, Dr. Blot**, für die hilfreiche Zusammenarbeit am Western Blot Platz und im Büro! Außerdem für das stete Interesse an meinen Daten und ihrer Interpretation, sowie weiteren Arbeitsansätzen. Ich hoffe, du wirst mir meine anfänglichen Missgeschicke im Labor irgendwann verzeihen (Agarose im Siphon sag ich nur!). Hoffentlich habe ich deine Vorurteile gegen Mediziner nicht zu sehr bestätigt. ☺

**Marc**, für die langen Nachmittage am FACS-Gerät und die netten Gespräche. Danke auch für die Dateninterpretation und Auswertung. Ich wäre ohne dich am FACS hilflos verloren gewesen! In diesem Sinne gilt mein Dank auch **Sascha Jakob**, der dich gut ersetzt hat, wenn du dich um deine Mäuse kümmern musstest.

**Tanja und Maren**, für die ständige Hilfe bei Zellkultur, Laborarbeit und Datenauswertung. Außerdem vielen Dank für die nette Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an die **gesamte Arbeitsgruppe Schroeder und Haendeler** für jegliche Hilfe bei meiner Arbeit im Labor und die gute Gemeinschaft.

**Dr. Roel Schins und Arbeitsgruppe**, für die Bereitstellung der XPA-Knockout Fibroblasten, die Hilfe beim Plasmid Relaxtion Assay und Comet Assay. Danke ebenfalls für die eingehenden Beratungen mit Peet und mir hinsichtlich der Ergebnisse und weiterer Experimente.

**Prof. Dr. Fritz Boege und Arbeitsgruppe**, für das Plasmid und die Anleitung zum Assay! Hat alles prima geklappt!

**Markus, Dr. Atmosphere**, für die meisterliche Unterstützung bei der Erweiterung meines physikalischen Wissens über Schwarzkörper, die Formatierung und Korrekturarbeit. Danke natürlich auch für alles andere... ☺.

*Ich freue mich auf ein Leben mit dir. Du bist wunderbar. :)*

**Mama, Papa und Victoria** dass ihr mich immer unterstützt und reges Interesse an meinen Ergebnissen und an dem Fortschritt meiner Arbeit gezeigt habt. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und mir auch in schwierigen Zeiten stets zur Seite steht. Danke, dass ihr mich immer wieder motiviert habt, weiter zu kämpfen, wenn im Labor mal wieder einfach nichts klappen wollte oder ich den Computer am liebsten aus dem Fenster werfen wollte ☺. Danke ebenfalls, für eure tolle Arbeit beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich bin stolz eure Tochter und Schwester zu sein.

## 9.2 Lebenslauf

Name:	Katharina Beutelmann
Geburtsdatum:	04. August 1984
Geburtsort:	Remscheid-Lennep
Eltern:	Vater: Dr. h.c. Josef Beutelmann, Dipl.-Kaufmann Mutter: Mechthild Beutelmann
Geschwister:	Victoria Beutelmann
Schulausbildung:	1990-1994 Grundschule Holthausenstr. Wuppertal-Ronsdorf 1994-2000 Städt. Leibniz-Gymnasium Remscheid-Lüttringhausen 2000-2001 Belmont High School Decatur, IN USA 2001-2003 Städt. Leibniz-Gymnasium Remscheid-Lüttringhausen
Schulabschlüsse:	2001 Honorary Diploma Bellmont High School (Note: 1,0) 2003 Abitur Städt. Leibniz-Gymnasium (Note: 1,2)
Studium:	2003 bis 2009 Humanmedizin Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Universitätsabschlüsse:	2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)  2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  2006 Beginn der Promotion am Institut für Umweltmedizin im Bereich Zellbiologie bei Dr. Peter Schroeder und Prof. Dr. J. Krutmann: Dissertationsthema: „Infrarot-A Strahlung moduliert Ultraviolett-B induzierte DNS Schäden und deren Reparatur in humanen Hautfibroblasten“ Förderung durch das Graduiertenkolleg (GRK) „Molekulare Altersforschung“

## Anhang

2011 Abschluss der Promotion

### Referenzen:

Klausurtagung des GRK 1033, 22.-23.11.2007, Schloss Mickeln, Düsseldorf: Infrarot-A Strahlung moduliert Ultraviolett-B induzierte DNS Schäden in humanen Hautfibroblasten. Katharina Beutelmann, Roel Schins, Jean Krutmann, Peter Schroeder (Vortrag)

Tagung „Tissue aging: from molecular biology to clinical perspectives“, 28.-30.9.2007, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Infrared radiation modulates UVB induced DNA damage and nucleotide excision repair in human dermal fibroblasts. Beutelmann K, Krutmann J, Schröder P (Poster)

Klausurtagung des GRK 1033, 21.-22.11.2006, Bonn-Bad Godesberg: Infrared Radiation modulates UVB induced DNA Damage and Nucleotide Excision Repair in Human Fibroblast Cells (Vortrag)

### Berufl. Tätigkeit:

Seit Januar 2010 Assistenzärztin

Wuppertal, den 08.03.2011

Katharina Beutelmann

### **9.3 Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Wuppertal, den 08.03.2011

Katharina Beutelmann