

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Tilgen

**In vitro Untersuchungen in humanen Keratinozyten über
mögliche protektive Eigenschaften von 1,25-
Dihydroxyvitamin D₃ gegen UVB- und niedrigdosierte
ionisierende Strahlung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

Vorgelegt von

Léa Louisa Trémezaygues

geboren am 19.04.1984 in Völklingen

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1. Summary	3
2. Einleitung	4
2.1 1, 25-Dihydroxyvitamin D ₃	4
2.1.1 Metabolismus von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	4
2.1.2 Molekulare Eigenschaften von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	5
2.1.3 Stoffwechsel-Wirkungen von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	6
2.1.4 Wirkungen von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Haut.....	7
2.1.5 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Karzinome	8
2.1.6 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Melanome	8
2.2 UV-induzierte Zellschädigung.....	10
2.2.1 UV-Licht	10
2.2.2 UV-induzierte DNA-Schädigung.....	11
2.2.3 Natürlicher Lichtschutz der Haut.....	13
2.2.4 DNA-Reparaturmechanismen.....	14
2.3 IR-induzierte Zellschädigung.....	17
2.3.1 Röntgen-Strahlung.....	17
2.3.2 IR-induzierte DNA-Schädigung	21
2.3.3 DNA-Reparaturmechanismen.....	22
2.4 Ziele der Arbeit	24
3. Material und Methoden	26
3.1 RNA-Isolierung.....	26
3.1.1 Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN	26
3.1.2 RNA-Gelelektrophorese.....	27
3.2 Reverse Transkription: Umschreibung von RNA zu cDNA mit dem Omniscript Kit der Firma QIAGEN ..	28
3.3 Quantitative Real-Time PCR mit dem Light Cycler.....	29
3.3.1 Aufbau und Funktionsprinzip des Light Cyclers.....	30
3.3.2 Detektion der PCR Produkte.....	31
3.3.3 Der CP-Wert.....	32
3.3.4 PCR-Effizienz, Standardkurven und Relative Quantifizierung.....	33
3.3.5 PCR-Bedingungen	34
3.3.6 Beladungsschema für die Quantifizierung.....	35
3.4 Behandlung eukaryontischer Zellen in einer monolayer Zellkultur mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	36
3.5 Bestrahlung eukaryontischer Zellen in einer monolayer Zellkultur nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	37
3.6 Ernten von Zellen in einer monolayer Zellkultur	38
3.7 DNA-Isolierung aus Zellkultur mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche	38
3.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39

3.9	Dot Blot.....	40
3.9.1	Durchführung des Dot Blots	40
3.9.2	Peroxidase-Nachweis über Enhanced Chemiluminescence (ECL)	42
3.9.3	Auswertung des Dot Blots	42
3.9.4	Reagenzien	43
3.10	Colony-Forming-Unit-Culture-Assay (CFUc-Assay)	44
3.10.1	Durchführung des CFUc-Assays.....	44
3.10.2	Auswertung des CFUc-Assays mittels Kristallviolett- Färbung	45
3.11	H2AX-Immunfluoreszenz	46
3.12	WST- Stoffwechselaktivitätstests	48
3.12.1	Prinzip des WST- Stoffwechselaktivitätstests.....	48
3.12.2	Durchführung des WST-Stoffwechselaktivitätstests	49
3.13	Kristallviolett-Proliferationstest	50
3.13.1	Prinzip des Kristallviolett-Proliferationstests	50
3.13.2	Durchführung des Kristallviolett-Proliferationstests.....	51
3.14	Zellkultur.....	51
3.14.1	Ausgewählte Zelllinien	51
3.14.2	Kultivierung eukaryontischer Zellen in einer Monolayer-Zellkultur	52
3.14.3	Passagieren der Zellen.....	52
3.14.4	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer	52
3.14.5	Einfrieren von Zellen	53
3.14.6	Auftauen von Zellen	53
4.	Ergebnisse	54
4.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1).....	54
4.1.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten	55
4.1.1.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im CFUc-Assay.....	55
4.1.1.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1-Assay	56
4.1.1.3	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay.....	57
4.1.1.4	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten.....	57
4.1.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1).....	58
4.1.2.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im CFUc-Assay.....	58
4.1.2.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-1-Assay	59

4.1.2.3	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay	59
4.1.2.4	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	60
4.2	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	60
4.2.1	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten	61
4.2.1.1	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im CFUc-Assay	61
4.2.1.2	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1-Assay	61
4.2.1.3	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay	62
4.2.1.4	Fazit: Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten	62
4.2.2	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	62
4.2.2.1	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im CFUc-Assay	62
4.2.2.2	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-1-Assay	63
4.2.2.3	Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay	63
4.2.2.4	Fazit: Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	64
4.3	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung	64
4.3.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung	64
4.3.1.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung im CFUc-Assay	64
4.3.1.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung im WST-Assay	65
4.3.1.3	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay	65
4.3.1.4	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung	66
4.3.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung	66
4.3.2.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im CFUc-Assay	66
4.3.2.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im WST-1-Assay	67

4.3.2.3	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay	67
4.3.2.4	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung	68
4.4	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	68
4.4.1	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten	68
4.4.1.1	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-Assay	68
4.4.1.2	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay	69
4.4.1.3	Fazit: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten	70
4.4.2	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	70
4.4.2.1	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-Assay	70
4.4.2.2	Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay	71
4.4.2.3	Fazit: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	71
4.5	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung	72
4.5.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung	72
4.5.1.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung im WST-Assay	72
4.5.1.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay	72
4.5.1.3	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung	73
4.5.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung	73
4.5.2.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung im WST-Assay	73
4.5.2.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay	73
4.5.2.3	Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung	74
4.6	Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ -Stoffwechsels (CYP27B1, CYP24) in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Bestrahlung mit UVB	74
4.6.1	Expression der CYP27B1 in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Bestrahlung mit UVB	75

4.6.2	Expression der CYP24 in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Bestrahlung mit UVB	76
4.7	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach strahlungsinduzierten DNS-Schäden.....	77
4.7.1	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach UVB-induzierten DNS-Schäden (Dot Blot)	77
4.7.1.1	Einfluss von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten	77
4.7.1.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Entstehung von Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung.....	78
4.7.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach IR-induzierten DNS-Schäden (γH2AX-Immunfluoreszenz)	79
4.7.2.1	Einfluss von IR-Strahlung auf die Entstehung von phosphoryliertem H2AX (γH2AX) in HaCaT-Keratinocyten.....	80
4.7.2.2	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Entstehung von phosphoryliertem H2AX (γH2AX) in HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung	80
4.8	Tabellen	82
4.9	Diagramme	84
5.	Diskussion	109
5.1	Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf humane Keratinocyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	109
5.2	Wirkung von UVB-Strahlung auf humane Keratinocyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	112
5.3	Wirkung von ionisierender Strahlung auf humane Keratinocyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)	113
5.4	Zytoprotektive Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf HaCaT-Keratinocyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung	114
5.5	Zytoprotektive Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf HaCaT-Keratinocyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung.....	116
5.6	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Entstehung von UVB-induzierten Strahlenschäden	117
5.7	Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ auf die Entstehung von IR-induzierten Strahlenschäden	119
5.8	Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ –Stoffwechsels (CYP27B1,CYP24) in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ und Bestrahlung mit UVB	121
6.	Literaturverzeichnis	123
7.	Abkürzungsverzeichnis	132
8.	Danksagung	134
9.	Lebenslauf	135

1. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit waren Untersuchungen über mögliche protektive Eigenschaften des in der Haut unter UVB-Einfluss gebildeten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung von ultravioletter (UV) und niedrigdosierter ionisierender Strahlung (IR). Hierzu wurden HaCaT-Keratinocyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1, nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, einmalig mit UVB- bzw. niedrigdosierter Röntgen-Strahlung in unterschiedlicher Dosis bestrahlt. Die Proliferation wurde in den entsprechenden Assays (Colony-Forming-Unit-culture-Assay, WST-1-Assay und Kristallviolett-Assay) mit dem Wachstum von Zellen der jeweiligen Zellreihen verglichen, die als Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelt wurden. Weiterhin wurde mit Hilfe des Nachweises von Thymidin-Dimeren (Dot Blot) und γ H2AX-Foci (Immunfluoreszenz) die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Anzahl an Strahlenschäden nach UVB- und IR-Belastung von HaCaT-Keratinocyten untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in vitro in einer Konzentration von 10⁻⁷M sowohl in humanen Keratinocyten als auch in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen einen zytoprotektiven Effekt gegen die schädigende Wirkung von UVB-Strahlung (100J/cm²-1000J/cm²) besitzt. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass in mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten nach der Bestrahlung mit UVB-Licht (100J/cm²-1000J/cm²) weniger Thymidin-Dimere nachweisbar sind als ohne die entsprechende Vorbehandlung. Die Untersuchung von Verlaufskurven spricht dafür, dass in mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten die entstandenen Strahlenschäden schneller beseitigt werden als in den Kontrollen (Ethanol). Bezüglich niedrigdosierter ionisierender Strahlung bis 2Gy zeigen unsere Ergebnisse nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) eine Reduktion der Immunreaktivität für γ H2AX. Dies spricht für einen protektiven Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen durch UV- und IR-induzierte Strahlenschäden.

Da wir die Effekte niedriger IR-Dosen untersuchten (1Gy-5Gy), zeigte sich in den eingesetzten Assays (Colony-Forming-Unit-culture-Assay, WST-1-Assay und Kristallviolett-Assay) erwartungsgemäß keine zytotoxische Strahlenwirkung. Unter Verwendung dieser Assays konnte kein Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Proliferation von HaCaT- oder SCL-1-Zellen nach IR-Bestrahlung nachgewiesen werden.

Ein weiterer Ansatz galt der Klärung der Frage, ob UVB-Licht und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Expression von Schlüsselenzymen des Vitamin D-Stoffwechsels in kultivierten Keratinocyten modulieren. Diese Fragestellung wurde unter Einsatz der Real-Time PCR (Light Cycler) beantwortet.

Unsere Ergebnisse zeigen nach 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung einen dosisabhängigen Effekt der UVB-Strahlung auf die Expression der CYP27B1 (1 α -Hydroxylase) und der CYP24 (24-Hydroxylase) in HaCaT-Keratinocyten.

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse in kultivierten humanen Keratinocyten für einen protektiven Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung von UVB- und niedrigdosierter Röntgenstrahlung.

1. Summary

The aim of the present work was to investigate the capacity of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, produced in the skin after exposure to UVB-light, to protect human keratinocytes (HaCaT) and squamous cell carcinoma cell lines (SCL-1) against the hazardous effects of UVB- and ionizing radiation. Therefore, human keratinocytes (HaCaT) and squamous cell carcinoma cell lines (SCL-1) were pretreated with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ over 48 hours and then irradiated once with UVB- or low-dose ionizing radiation. We evaluated the results of several assays (CFUc, WST-1, and CV), comparing proliferation of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-pretreated cells with development of the same cell lines, pretreated with the carrier substance ethanol. Additionally, we analyzed the effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on induction and removal of UV- and IR-induced DNA-damage by detection of cyclobutane pyrimidine dimers (Dot Blot) and γH2AX-Foci (immunofluorescence) in HaCaT-keratinocytes.

It has been shown that 1, 25-dihydroxyvitamin D₃, in a concentration of 10⁻⁷M, protects human keratinocytes (HaCaT) as well as squamous cell carcinoma cell lines (SCL-1) against the hazardous effects of UVB-radiation (100J/cm²-1000J/cm²) in vitro. Moreover, it could be demonstrated that the number of cyclobutane pyrimidine dimers induced in HaCaT-keratinocytes after irradiation with UVB (100J/cm²-1000J/cm²) was decreased after pretreatment with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. Following the evaluation of time dependent progress diagrams, the elimination of UVB-induced DNA-damage in HaCaT-keratinocytes occurs quicker when cells are pretreated with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (compared to ethanol-controls). Concerning low-dose ionizing radiation up to 2Gy, our findings point to the fact that pretreatment of HaCaT-keratinocytes with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) for 48 hours reduces the formation of γH2AX-Foci. Taken together, this speaks in favour of a photoprotective effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ against UVB- and IR-induced DNA-damage.

Due to fact that we used low-dose ionizing radiation (1Gy-5Gy), the proliferation-assays (CFUc, WST-1, and CV) did not show any hazardous effect on keratinocytes. As expected, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ did not change proliferation of HaCaT-keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines (SCL-1) after irradiation with low-dose ionizing radiation.

A further approach was dedicated to the question, whether UVB-light and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ modulate the expression of key enzymes in vitamin D metabolism in cultured human keratinocytes or not. Using the real-time PCR (Light Cycler), we observed a dose-dependent effect of UVB-radiation on the expression of CYP27B1 (1α-hydroxylase) and CYP24 (24-hydroxylase) in HaCaT-keratinocytes after pretreatment with 1, 25-dihydroxyvitamin D₃.

To put it in a nutshell, our data support the hypothesis that 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ protects cultured human keratinocytes against the hazardous effects of UVB- and ionizing radiation.

2. Einleitung

2.1 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃

2.1.1 Metabolismus von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Die Vorstufen des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ können mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper aus Cholesterin gebildet werden, z.B. aus Ergosterol oder 7-Dehydrocholesterol. In der Haut wird aus diesen Prä-Vitamin D Formen unter dem Einfluss von UVB-Strahlung (290-320 nm) Vitamin D synthetisiert, respektive Ergocalciferol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃). Das in der Haut gebildete Vitamin D gelangt über die Blutbahn zur Leber, wo es durch ein Zytochrom P450 Enzym, die 25-Hydroxylase (CYP27A1), in C-25 Position ein erstes Mal hydroxyliert wird. 25-Hydroxycalciferol ist der Hauptmetabolit des Vitamin D₃ im Blutplasma. Im Tubulusapparat der Niere erfolgt eine weitere Hydroxylierung in C-1 Position durch die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1), weiteres Zytochrom P450 Enzym (s. Abb. 2.1).

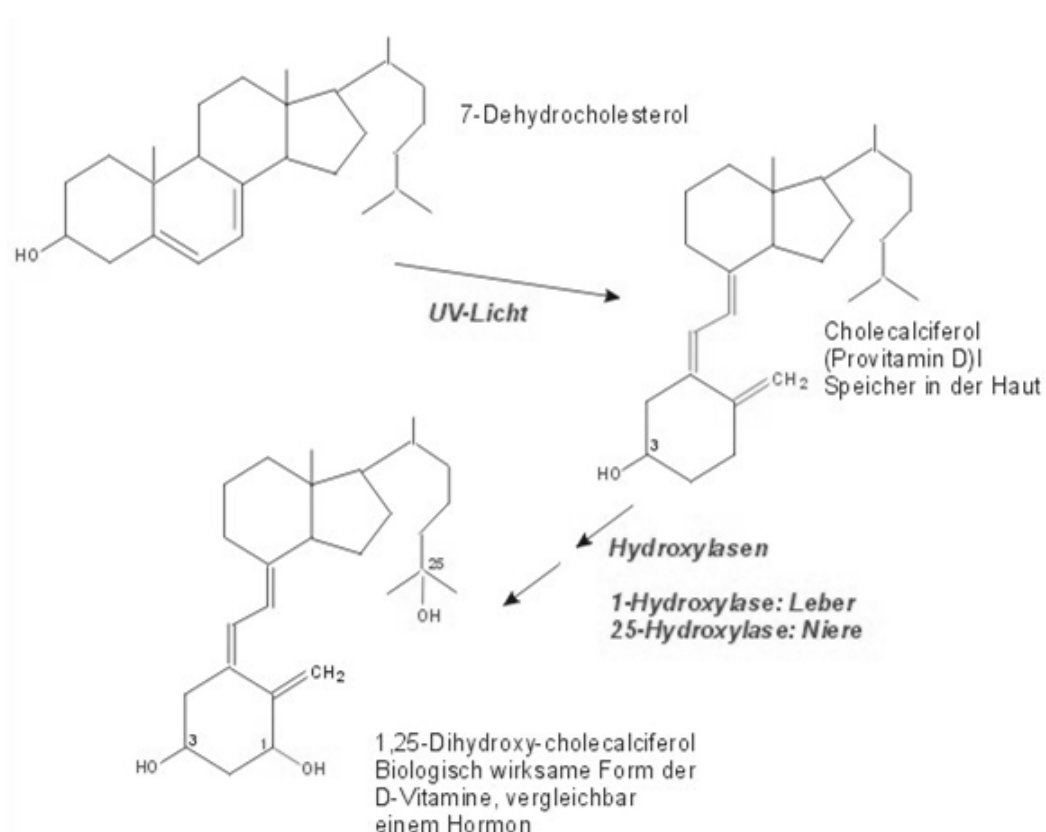


Abb. 2.1. Stoffwechsel von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Quelle: Universität München)

Die Produktion des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, d.h. die Produktion der aktiven Form des Vitamin D₃, wird über einen Rückkopplungsmechanismus von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ selbst, sowie über das Parathyroidhormon (PTH), Calcium und Zytokine wie Interferon γ (IFN γ) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) reguliert (Bikle et al., 1986). Lange Zeit wurde angenommen, dass nur die Niere in der Lage ist, 25-Hydroxyvitamin D₃ in die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ umzuwandeln. In vitro-Versuche und Studien an nephrektomierten Patienten zeigten jedoch, dass auch extrarenale Zellen, u.a. Keratinozyten, Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Prostata- und Dickdarm-Zellen durch die Expression der 1 α -Hydroxylase befähigt sind, 25-Hydroxyvitamin D₃ in die aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu verwandeln (Bektas, 1999; Holick, 2003). In Keratinozyten konnte sowohl die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) als auch die 25-Hydroxylase (CYP27A1) nachgewiesen werden (Fu et al., 1997; Lehmann et al., 1999). Damit besitzen Keratinozyten die enzymatischen Voraussetzungen zur Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterol.

Der Abbau von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ erfolgt in den Zielzellen und in den Nierentubuluszellen durch eine dritte Hydroxylierung in C-24 Position durch ein weiteres Zytochrom P450 Enzym, die 24-Hydroxylase (CYP24). Es entsteht 24,25-Dihydroxycholecalciferol, welches biologisch nur schwach wirksam ist (Heine, 2001). Nach heutigem Kenntnisstand hat 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine 100-1000fach höhere biologische Aktivität als alle anderen bekannten natürlichen Vitamin D Metaboliten (Bikle et al., 1994).

2.1.2 Molekulare Eigenschaften von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Das biologisch aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ basiert auf einem Steroidgerüst mit einer Seitenkette, die die spezifischen Eigenschaften vermittelt. Von seinen biologisch nur schwach wirksamen Vorstufen unterscheidet es sich durch die Hydroxylierungen am C1- und am C25-Atom (s. Abb. 2.2).

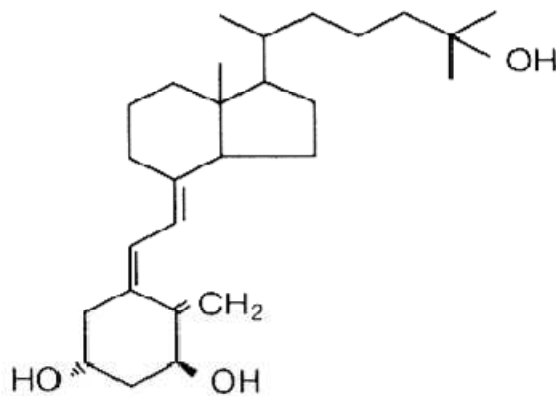


Abb. 2.2. Strukturformel von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ liegt im Plasma als lipophiler Stoff fast vollständig an ein Plasmaprotein gebunden vor, dem Vitamin D bindenden Protein (DBP). Dieses transportiert 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ aus den Speichern zu den Zielzellen. Dort wird das DBP-gebundene 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über einen DBP-Rezeptor per Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Nach Ablösung von dem Protein, kann 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch seine lipophilen Eigenschaften in den Zellkern diffundieren. Dort bindet es an den spezifischen Vitamin D Rezeptor, den VDR.

Der VDR ist ein Molekül aus 427 Aminosäuren mit einem spezifischen Gewicht von 50-60 kDa. Er gehört zur Gruppe der intranukleären Steroidhormonrezeptoren und bindet 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ mit hoher Affinität (Dissoziationskonstante $1-50 \times 10^{-11}$). Der Ligand-gebundene VDR bindet an spezifischen Bindungsstellen in der Promotor-Region von Zielgenen, den VDRE's (*Vitamin D Response Elements*) und reguliert auf diese Weise deren Transkription. Nach Bindung an ein VDRE können durch den VDR hemmende und fördernde Effekte auf die Transkription ausgeführt werden. Für eine effiziente Anbindung an die Promotor-Region der entsprechenden Gene sind nukleäre Co-Faktoren erforderlich, insbesondere der Retinoid-X-Rezeptor, mit dem der VDR einen heterodimeren Steroidrezeptor bildet (Yu et al., 1991).

2.1.3 Stoffwechsel-Wirkungen von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Die Funktion des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wurde bis vor einigen Jahren ausschließlich der Regulation der Kalzium- und Phosphathomöostase im Organismus zugeschrieben (zusammen mit Parathormon und Kalzitinin). Hauptzielorgane des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ sind der Darm, die Nieren, das Skelettsystem und die Nebenschilddrüsen. Es bewirkt eine verstärkte Aufnahme bzw. Retention von Kalzium und Phosphat. Im Darm wird die Kalzium-Resorption gesteigert und über die Nieren weniger Kalzium ausgeschieden. Durch Anregung der Osteoklastenbildung erfolgt eine gesteigerte Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen. Zusätzlich kann 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ seine eigenen Rezeptoren über eine hochregulieren (Pausner, 2000).

In den letzten Jahren haben sich die Kenntnisse über die biologische Funktion des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ deutlich verbessert: neben der großen Rolle in der Regulation des Kalzium- und Phosphat-Haushaltes wird dem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ heute auch eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Apoptose und der Immunsuppression zugeschrieben. Von weitaus größerer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist jedoch die Funktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der menschlichen Haut: Die Haut ist sowohl Syntheseort als auch Zielorgan des potentesten natürlich vorkommenden Vitamin D₃ Metaboliten, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

2.1.4 Wirkungen von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Haut

Es ist seit langem bekannt, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Proliferation von Keratinozyten hemmt und gleichzeitig deren Differenzierung anregt (Smith et al., 1986). Die Epidermis besteht aus vier Schichten (Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum), die 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in unterschiedlichen Mengen synthetisieren und auch differenziert darauf reagieren. Die beiden proliferativen unteren Schichten, Stratum basale und Stratum spinosum, besitzen die höchste Konzentration an 7-Dehydrocholesterol und produzieren bei UVB-Bestrahlung das meiste Prävitamin D₃. Diese Schichten sind der Dermis am nächsten und können 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bei Bedarf auf einer kürzeren Strecke an die Blutbahn abgeben. Die basalen Keratinozyten sind das primäre Ziel von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der Epidermis (Bektas, 1999). Intrazellulär produziertes 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ trägt unter normalen Bedingungen kaum zur zirkulierenden Konzentration an 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bei (Bikle et al., 1993). Es ist vielmehr wichtig für den Effekt auf lokaler Ebene und verantwortlich für die Modulation von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten selbst. Die intrazelluläre Biosynthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ verändert sich innerhalb der Epidermisschichten, d.h. mit dem Differenzierungsgrad. In Proliferierenden Zellen ist die Produktion gering, in den frühen Stufen der Differenzierung zu- und bei terminaler Differenzierung wieder abnehmend. Die Expression des VDR verhält sich dazu proportional, worüber die Ansprechbarkeit der Zellen auf 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reguliert wird (Solvsten et al., 1997). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ unterdrückt außerdem seine eigene Synthese über die Hemmung der CYP27B1 und erhöht über die Stimulation der CYP24 seinen Abbau (Wu et al., 1996). Es wirkt auf diese Weise seiner Akkumulation in den Zellen entgegen.

Nachdem 1985 bei einem Patienten mit Alters-Osteoporose nach oraler Gabe von 1 α -Hdroxycalciferol ein dramatischer Rückgang der Psoriasis-Plaques beobachtet wurde (Morimoto et al., 1985), wurden erstmals Untersuchungen der Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Haut eingeleitet. Der Nachweis des VDR in zahlreichen Zellpopulationen der humanen Haut wie Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten, Langerhans Zellen, Endothelzellen und aktivierten Lymphozyten bildete dabei die theoretische Grundlage für den therapeutischen Einsatz von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bei den unterschiedlichsten Dermatosen. Zwischenzeitlich wurden auch Vitamin D₃-Analoge wie Calcipotriol synthetisiert, die bei ähnlicher therapeutischer Wirkung wie 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ mit weniger Nebenwirkungen behaftet sind (Binderup et al., 1988; Reichrath und Holick, 1999). In der Therapie dermatologischer Krankheiten spielen 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und seine Analoga heute vor Allem eine Rolle in der Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen, wie z.B. der Psoriasis vulgaris, aber auch der Morphaea.

2.1.5 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Karzinome

1936 postulierte Peller erstmals, dass Sonnenexposition zwar das Risiko für die Entstehung eines Hauttumors erhöhte, dafür aber das Risiko für die Entstehung vieler anderer Tumore reduzierte. Diese Theorie wurde 1941 durch Apperly bestärkt, der eine inverse Beziehung zwischen Breitenengrad und Tumormortalität in Nordamerika feststellte. Es folgten mehrere epidemiologische Studien durch Garland 1989, sowie durch Hanchette und Schwartz 1992, die in Nordamerika eine erhöhte Mortalität an Tumoren der Mamma, des Ovars, der Prostata und des Kolons nachwiesen. In einer prospektiven Studie beobachtete Garland außerdem, dass das Risiko an einem Kolon-Karzinom zu erkranken um 50% reduziert war, wenn die Probanden im Blut eine 25-Hydroxyvitamin D₃-Konzentration aufwiesen, die größer war als 20ng/ml. Obwohl sowohl die antiproliferative Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bekannt war, als auch die Tatsache, dass unter vielen anderen auch Mamma-, Prostata- und Kolonzellen einen VDR besitzen, blieb der genaue Zusammenhang zwischen der erhöhten Sonneneinstrahlung und dem verminderten Risiko, an einem der häufigsten Malignome zu erkranken, lange unklar. Da nämlich die Produktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der Niere streng durch das Serum-Kalzium, -Phosphat und durch das Parathyroidhormon reguliert wird (Holick, 2001), kommt es trotz Sonneneinstrahlung nicht zu einer erheblichen Erhöhung des im Blut zirkulierenden 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Jacobus et al., 1992). Einen Lösungsansatz erbrachte Schwartz 1998 mit der Erkenntnis, dass Prostata-Karzinom Zellen die Fähigkeit besitzen, 25-Hydroxyvitamin D₃ in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu konvertieren. Es ist heute nachgewiesen, dass eine Vielfalt an Geweben, u.a. Mamma, Prostata und Kolon, eine 1 α -Hydroxylase-Aktivität besitzen. Menschen, die in niedrigeren Breitengraden leben, haben demnach eine höhere Konzentration an 25-Hydroxyvitamin D₃ im Blut. Dieses wirkt als Substrat für die extrarenale 1 α -Hydroxylase in Prostata, Kolon, Mamma, etc. Die lokale Produktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reguliert somit das Zellwachstum und reduziert das Risiko dieser Zellen, autonom zu werden bzw. zu entarten. Man spricht in diesem Zusammenhang von der nicht-klassischen, Tumor-protectiven Rolle von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Sie kann sich nur entfalten, wenn im Blut genügend 25-Hydroxyvitamin D₃ vorhanden ist, das in die Zellen aufgenommen werden kann.

2.1.6 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Melanome

Die Mechanismen der Krebsentstehung für natürliche (Sonnenlicht) und künstliche UV-Strahlung (z.B. Solarien) sind identisch. Eine Veränderung des Freizeit- und Sozialverhaltens seit den 50er Jahren führte zu einer erhöhten UV-Exposition und wird für die kontinuierliche Zunahme an

Hautkreberkrankungen verantwortlich gemacht. Solarien, die seit ca. 30 Jahren in steigendem Maße genutzt werden, haben zu der beschriebenen Entwicklung beigetragen (Jung, 1992).

Die Entstehung unterschiedlicher Hautkreberkrankungen ist vom UV-Expositionsmuster abhängig. Beim Plattenepithelkarzinom (SCC) ist die über die gesamte Lebenszeit aufsummierte UV-Dosis im exponierten Hautareal für seine Entstehung verantwortlich. Für die Entstehung des Basalzellkarzinoms (BCC) werden sowohl die aufsummierte UV-Lebenszeit-Dosis als auch intermittierende UV-Expositionen verantwortlich gemacht. Für die Entstehung des malignen Melanoms sind wiederkehrende intermittierende UV-Expositionen im frühen Kindesalter (0-6 Jahre) verantwortlich. Dazu zählen bereits vereinzelte suberythemale Expositionen und erst recht milde und schwere Sonnenbrände. Sie führen zum Auftreten von multiplen zusätzlichen melanozytären Nävi und/oder zu atypischen Nävi, welche als Risikofaktor für die Entstehung eines malignen Melanoms im Erwachsenenalter bekannt sind. Eine Kombination mehrerer Risikofaktoren, wie z.B. Hauttyp, Sonnenbrandflecken (Lentigines), Sommersprossen, Anzahl erworbener Nävi und atypischer Nävi, Hautkrebs in der Familie sowie Anzahl der Sonnenbrände, erhöhen das Risiko für eine Melanomerkrankung auf das bis zu 600fache.

2007 untersuchten Reichrath et al. die Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstum verschiedener Melanom-Zelllinien (Reichrath et al., 2007). Während 3 der Zelllinien (MeWo, SK-Mel-28, SM) ein Ansprechen auf die antiproliferative Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zeigten, waren die anderen Zellen (SK-Mel-5, Sk-Mel-25, IGR, MelJuso) resistent. Eine starke Induktion (7000-fach) der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-sensitiven Zelllinien konnte gezeigt werden, was auf eine funktionelle Integrität der VDR-vermittelten Transkription in diesen Zellen schließen lässt. Im Gegensatz dazu war die Induktion der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-resistenten Zelllinien weitaus geringer (70-fach). VDR-mRNA wurde sowohl in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-sensitiven Zelllinien als auch in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-resistenten Zelllinien nach Behandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bis zu 3-fach stärker exprimiert. Die Expression der CYP27B1 und CYP27A1 wurde in allen Zelllinien nur unwesentlich beeinflusst. Die Proliferation der Melanomzellen wurde durch die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nicht inhibiert, was gegen eine signifikante antiproliferative Wirkung des Hormons auf diese Zellen spricht. Im Gegensatz zu vielen soliden Tumoren ist also die Mehrheit der Melanom-Zelllinien resistent gegen die antiproliferative Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, was einen palliativen Therapieansatz bei Melanompatienten schwierig gestaltet.

2.2 UV-induzierte Zellschädigung

2.2.1 UV-Licht

Die Ultraviolette Strahlung bildet den kurzwelligen, nichtsichtbaren Bereich der optischen Strahlung und wird in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der biologischen Wirkung in 3 Gruppen unterteilt (Meisser, 2007):

Bereich	Wellenlänge (nm)	Biologische Wirkung
UVA	320-400	photosensibilisierend
UVB	290-320	erythemwirksam
UVC	200-290	keimtötend

Tab. 2.1. Abgrenzung der 3 Teilbereiche der UV-Strahlung

Die Sonnenstrahlung besteht zu etwa 6 % aus UV-Licht. Die Zusammensetzung kann je nach Höhenlage, Breitengrad und Umweltfaktoren variieren. Der größte Teil des UVC wird in der Atmosphäre absorbiert, sodass bodennahe Sonnenstrahlung hauptsächlich UVA und UVB enthält.

UVA-Strahlung wird von der Ozonschicht kaum absorbiert. Sie dringt tief in die menschliche Haut ein (30-50 % in die Subkutis). In Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität und vom jeweiligen Hauttyp kann es direkt während der Sonnenexposition oder kurz danach zu einer Sofortbräunung der Haut kommen. Dabei wird nicht das bräunende Melanin selbst gebildet, sondern nur Vorstufen davon. Die gebildeten Produkte führen im Vergleich zu Melanin zu einer schwächeren Färbung, die zudem kürzer anhält und innerhalb weniger Stunden wieder nachlässt. Desweiteren führt chronische UVA-Belastung zu einer vorzeitigen Hautalterung und Faltenbildung. Hierzu ist eine jahrelange UV-Akkumulation notwendig, woraus sich eine Latenzzeit von 20-30 Jahren ergibt. Kanzerogene und mutagene Schäden treten selten auf. Sie entstehen indirekt durch die Aktivierung von Photosensibilisatoren (Porphyrine, Flavine) (Schultze et al., 1992). Zunächst wird das Licht von einem Zellulären Molekül (Chromophor) absorbiert (Schöneborn, 2002). Jeder Chromophor besitzt ein eigenes Absorptionsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei einer bestimmten Wellenlänge. Nach der Absorption eines Photons (Lichtteilchen mit der Masse null) werden die Elektronen für eine sehr kurze Zeit auf eine höhere Elektronenschale angehoben. Bei der Rückkehr auf die ursprüngliche Elektronenschale wird Energie freigesetzt. Durch diesen Elektronentransfer und daran gekoppelte Oxidationsvorgänge können sekundäre DNA-Schäden entstehen.

Der Großteil der UVB-Strahlung wird von der Ozonschicht absorbiert. Nur 10 % gelangen bis zur Erdoberfläche, der Großteil davon dringt nur bis in die Epidermis ein, davon erreicht wiederum nur 10 % die Subkutis. Bei dieser Wellenlänge kommt es – in Abhängigkeit von der Belastung und vom

Hauttyp – zu einer verzögerten Bräunung, welche sich langsamer entwickelt (erst nach 72 Stunden), dafür aber länger anhält und einen besseren Schutz vor Sonnenbrand bietet. Grund ist die gesteigerte Melaninbildung. Bei wiederholter Exposition nimmt auch die Proliferation der Melanozyten zu und der Transfer von Melanin in die Keratinozyten wird gesteigert. Kommt es zu Zellschäden, z.B. im Rahmen eines Sonnenbrandes, so ist hauptsächlich die Epidermis betroffen. UVB-Licht ist stärker mutagen und kanzerogen als UVA-Licht, weil es direkt von den Basen der DNA absorbiert wird. Chronische Belastung kann zur Entstehung verschiedener Hauttumoren führen.

Um einen objektiven Wert für die individuelle Empfindlichkeit gegenüber natürlicher oder künstlicher UV-Strahlung zu erhalten, wurde die sogenannte minimale Erythem-wirksame Dosis (MED) eingeführt (Gottschalk, 2004). Unter der minimalen Erythem-wirksamen Dosis versteht man die Dosis, die 24 Stunden nach Exposition auf nicht vorbestrahlter kaukasischer Haut des Typs II gerade noch eine erkennbare Rötung auszulösen vermag (Meffert et al., 1998; Piazena et al., 1994). Im UVB-Bereich liegt die MED bei etwa $0,038-0,053 \text{ J/cm}^2$, im UVA-Bereich werden wesentlich höhere Werte benötigt, sie liegt dort zwischen 20 und 50 J/cm^2 . Im UVC-Bereich benötigt man hingegen nur etwa $0,02 \text{ J/cm}^2$ (Braun-Falco et al., 1984).

2.2.2 UV-induzierte DNA-Schädigung

Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei 260 nm. Bei Beleuchtung durch UV-Licht entsprechender Wellenlänge wird die Strahlung von Pyrimidinen und Purinen absorbiert. Wie bereits unter 2.2.1 erwähnt, ist die UV-Strahlung eine kurzwellige, energiereiche, elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm. Die Entstehung der DNA-Schäden sowie das Ausmaß und Verhältnis der verschiedenen DNA-Basenmodifikationen ist von der Wellenlänge der induzierenden Strahlung abhängig (Ananthaswamy et al., 1990; Tyrell et al., 1990). Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten der DNA-Schädigung durch UV-Licht:

1. Direkte Schädigung durch Anregung der DNA zu DNA-Modifikationen
2. Indirekte Schädigung durch Bildung reaktiver Radikale

UVB-Licht schädigt zelluläre DNA hauptsächlich direkt, während die Effekte von UVA-Licht weitestgehend auf indirekten Mechanismen beruhen.

Kurzwellige UV-Strahlung im Bereich bis etwa 320 nm (UVB- und UVC-Strahlung) induziert DNA-Schäden durch direkte Anregung der DNA. Vorherrschende Produkte sind Cyclobutanpyrimidindimere (meist zwischen zwei Thymin-Molekülen, s. Abb. 2.3) (Mitchell et al., 1991), die durch [2+2]-Cycloaddition der photochemisch reaktiven 5,6-Doppelbindung der

benachbarten Pyrimidinbasen entstehen (Friedberg, 1985) und einige wenige Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (Lippke et al., 1981; Sancar et al., 1983). Kommt es zur Bildung von Dimeren zwischen zwei benachbarten Basen, so erhöht sich die Gefahr einer Basendeletion.

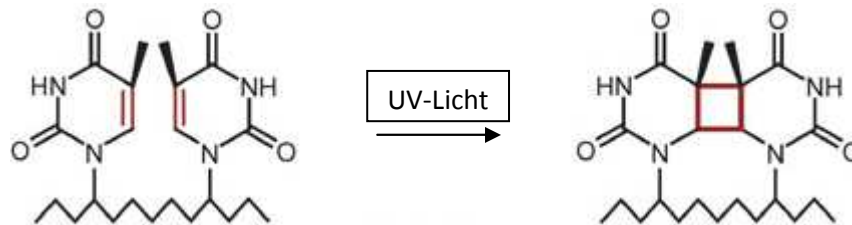


Abb. 2.3. Bildung von Pyrimidin-Dimeren nach Einwirkung von UV-Licht

Darüberhinaus steigt durch UV-Belastung auch das Risiko für DNA-Einzelstrangbrüche. Es kommt zur Ausbildung von Einfachbindungen zwischen benachbarten Pyrimidinen und zum Aufbau von Quervernetzungen zwischen dem DNA-Strang und Proteinen (sogenannte Crosslinks). Die Dimerisierung führt zu einer Knickung oder Krümmung des DNA-Stranges. Die Basen können keine Wasserstoffbrücken mit den Basen des Komplementärstranges bilden, so dass die DNA-Replikation behindert wird. Als UV-spezifisch gelten C→T Mutationen (zwei Drittel aller UV-induzierten Mutationen) und CC→TT Mutationen (etwa 10 % aller UV-induzierten Mutationen) (Dumaz et al., 1997). CC→TT Mutationen sind fast ausschließlich UV-induziert. Wenn diese Mutation in bestimmten Genen entsteht, wird die Karzinogenese in Gang gesetzt. Besonders wichtig sind dabei Tumorsuppressorgene als Proliferationshemmer und Protoonkogene. Im langwelligen UVA-Bereich absorbiert die DNA nur schwach. Die Modifizierung der DNA-Basen erfolgt hier vermutlich unter Beteiligung endogener Photosensibilisatoren wie Porphyrine und Flavine. Im sichtbaren Bereich des Lichts (oberhalb 400 nm) können keine Cyclobutanpyrimidindimere nachgewiesen werden.

Unter UV-Bestrahlung besteht neben der Gefahr der Dimerisierung die Möglichkeit, dass es zur Bildung von Radikalen kommt. Es handelt sich hierbei um reaktive Moleküle mit unpaarer Elektronenzahl, die zu Schäden von Nukleinsäuren und folglich zu DNA-Schäden führen können. Die Entstehung von Radikalen ist besonders gefährlich, weil diese eine indirekte schädigende Wirkung auf das genetische Material haben. Durch Energie- oder Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff und Superoxid tragen zur Entstehung oxidativer Basenmodifikationen bei. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können somit zu chemischen Modifikationen der DNA (DNA-Schäden) führen (Mahler, 1999). Zu den über 100 verschiedenen Modifikationen, die unter zellfreien Bedingungen identifiziert werden konnten (Dizdaroglu, 1992), gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche (Sies, 1986; Epe et al., 1988), basenfreie Stellen (AP-Läsionen, apurinische und apyrimidinische Läsionen)

bzw. alkalilabile Läsionen (Piette et al., 1981; OhUigin et al., 1987) und oxidierte Basen (Floyd et al., 1990; Schneider et al., 1990; Epe et al., 1994; Boiteux et al., 1992; Epe et al., 1993).

2.2.3 Natürlicher Lichtschutz der Haut

Je nach Phänotyp und Reaktion auf Sonnenlicht teilt man die Bevölkerung in 4 Hauttypen ein:

Hauttyp	Phänotyp	Sonnenbrand (nach UV-Exposition)	Bräunung (nach UV-Exposition)
I	hell	immer	nie
II	hell	immer	selten
III	hellbraun	selten	wenig
IV	hell- bis mittelbraun	nie	immer

Tab. 2.2. Darstellung der verschiedenen Hauttypen

Die Eindringtiefe ultravioletter Strahlung in die Haut ist im Wesentlichen abhängig von:

- Ihrer Wellenlänge: mit zunehmender Wellenlänge vergrößert sich die Eindringtiefe der UV-Strahlung. Während UVC das Stratum corneum nicht passieren kann, erreicht bei ungebräunter Haut ca. 3% der Strahlung unter 300 nm, 20 % der Strahlung unter 360 nm und 33 % der langwelligen sichtbaren Strahlung die Basalzellschicht.
- Der Hautbeschaffenheit des Individuums: Melanin- und Proteinkonzentration, Dicke und Wassergehalt der Epidermis (Schnauffer, 2003).

Die Haut adaptiert sich bei wiederholter Lichtexposition an die UV- Strahlung. Drei Mechanismen, von denen die ersten beiden zusammen einen natürlichen Lichtschutzfaktor von etwa 40 ergeben, sind hier von wesentlicher Bedeutung:

1. Melaninsynthese

Das Melanin der Haut ist ein komplexes Tyrosin-Polymer, das als Filter mit breitem Absorptionsspektrum im UVB-Bereich wirkt. Man unterscheidet die Sofortpigmentierung, eine wenige Stunden nach UVA-Exposition stattfindende Photooxidation von in der Epidermis bereits vorhandenen farblosen Melaninvorstufen zu Melanin (Schultze et al, 1992), von der indirekten Pigmentierung durch UVB-Strahlung. Letztere beginnt nach 3-5 Tagen durch Melanozytenwachstum und -stimulation mit vermehrter Melaninsynthese und erreicht ihr Maximum nach 5-7 Tagen. Die Hautbräunung infolge Pigmentierung erhöht den natürlichen Lichtschutzfaktor der Haut maximal um das Zehnfache.

2. Ausbildung der sogenannten Lichtschwiele

UVB-Licht stimuliert die Proliferation epidermaler Basalzellen, was zu einer Hyperplasie des Stratum corneum führt. Hier wird ein Teil des Lichtes resorbiert mit der Folge, dass ein geringerer Anteil der Strahlen die Dermis erreichen kann und somit diese tiefer gelegenen Hautschichten geschützt werden. Diesem Prozess wird ein maximaler Lichtschutzfaktor von 4 zugeschrieben (Proksch et al, 1994; Wiskemann, 1992).

3. DNA-Reparaturmechanismen

Sobald ein Schaden eingetreten ist, beginnt die Zelle mit Reparaturvorgängen auf DNA-, RNA-, und Proteinebene. Am wichtigsten sind dabei die DNA-Reparaturmechanismen, die sich in mehrere Gruppen unterteilen lassen. Eine besondere Rolle spielen die direkte Reparatur, das Mismatch-Reparatur System, die Basen- Exzision-Reparatur und die Nukleotid-Exzisions-Reparatur.

2.2.4 DNA-Reparaturmechanismen

Für eine Zelle gibt es nach Schädigung ihrer DNA prinzipiell 3 Möglichkeiten zu reagieren:

1. Der DNA-Schaden ist so schwerwiegend, dass er durch vorhandene Reparaturmechanismen nicht behoben werden kann. Es kommt zum Absterben der Zelle entweder durch Apoptose oder durch Nekrose.
2. Der DNA-Schaden wird unvollständig erkannt oder nicht fehlerfrei repariert. Bei der nächsten Replikation der DNA führt dies zu einer Mutation.
3. Der DNA-Schaden kann durch die vorhandenen Reparaturmechanismen erkannt und vollständig und fehlerfrei behoben werden. Die Integrität der DNA bleibt erhalten.

Nach heutigem Kenntnisstand kann man die DNA-Reparaturmechanismen in mehrere Gruppen einteilen, von denen die wichtigsten hier näher besprochen werden sollen.

Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Zu den Mechanismen der Schadensreversion werden die enzymatische Photoreaktivierung der DNA, die Reparatur bestimmter alkylierter Basen und die direkte Ligation von Einzelstrangbrüchen gezählt (Friedberg et al., 1995). Zu den Enzymen, die in der Lage sind, DNA-Schäden direkt zu beheben, gehört die Photolyase. Durch UV-Strahlung entstandene Cyclobutanpyrimidin-Dimere werden hierbei durch Spaltung des Cyclobutanringes unter Beteiligung von FADH₂ wieder in ihre Monomeren überführt. Bakterien, Pflanzen und einige Säuger können durch DNA-Photolyasen lichtabhängig Pyrimidindimere wieder in zwei Pyrimidinnukleotide spalten.

Mismatch-Reparatur-System (MMR)

Die Aufgabe der MMR besteht darin, Basenfehlpaarungen und Insertionsschleifen, die durch die Replikation entstanden sind, zu entfernen (Kolodner et al., 1999; Hsieh, 2001; Marti et al., 2002; Peltomäki, 2003). Sowohl Pro- als auch Eukaryonten verfügen über eine postreplikative Reparatur. Abbildung 4 zeigt ein vereinfachtes Schema des generellen MMR-Mechanismus in eukaryonten Zellen. Nachdem hMutS den Fehler erkannt und gebunden hat nimmt es Kontakt zum hMutL Dimer auf. Der entstandene MutS-MutL Komplex steuert nun den Verdau des fehlerhaften Stranges der DNA-Doppelhelix durch die Exonuklease I, welche auf den Abbau von einzelnen DNA-Strängen spezialisiert ist. Der verbleibende DNA-Einzelstrang, der die korrekte Erbinformation enthält, dient der DNA-Polymerase δ als Matrize zur Resynthese einer korrekt gepaarten DNA-Doppelhelix. Eine derzeit noch nicht genau charakterisierte Ligase sorgt anschließend dafür, dass das neusynthetisierte DNA-Teilstück in den übrigen DNA-Strang integriert wird.

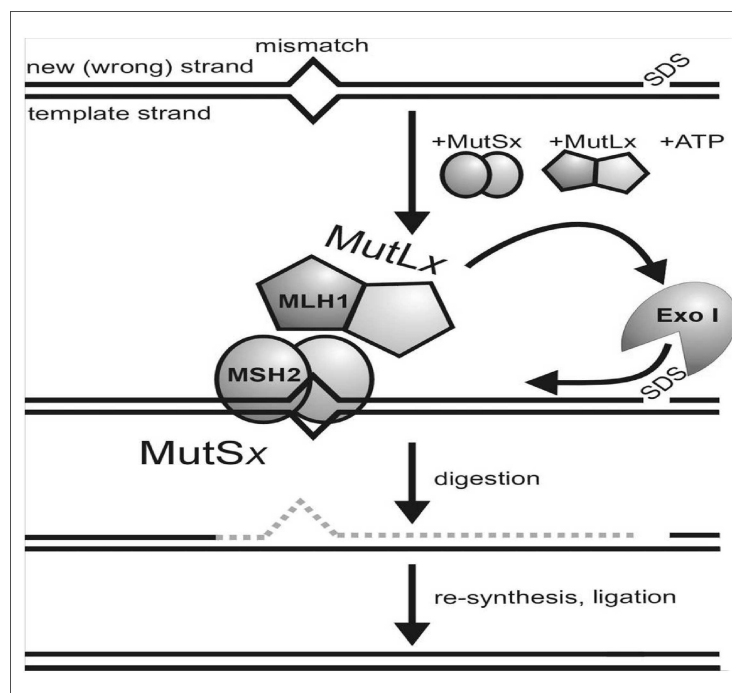


Abb. 2.4. Mismatch-Reparatur

Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Die Basen-Exzisions-Reparatur korrigiert in einem mehrstufigen Prozess den spezifischen Schaden an einer Base. Sie entfernt v.a. Basen mit leichten chemischen Veränderungen wie Oxidationen, Reduktionen, Desaminierungen und Alkylierungen.

Der erste Schritt wird durch eine spezifische DNA-Glykosylase vermittelt. Diese entfernt den DNA-Schaden durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose. Es gibt zwei Arten von Glykosylasen, mono- und bifunktionelle. Monofunktionelle Glykosylasen lösen die N-glykosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose, so dass die modifizierte Base freigesetzt wird und dadurch als Endprodukt eine AP-

Läsion entsteht. Diese AP-Läsion wird dann von einer 5'-AP-Endonuklease erkannt und prozessiert (Laval, 1977). Bifunktionelle Glykosylasen trennen ebenfalls die N-glykosidische Bindung und setzen die modifizierte Base frei. Im Anschluss daran lösen sie die Phosphodiesterbindung, die 3' von der gebildeten AP-Läsion liegt, durch β - bzw. β - δ -Elimination (β -Lyase-Aktivität). Es bleibt ein Einzelstrangbruch mit einem durch einen Zuckerphosphatrest blockierten 3'-Ende und 5'-Phosphatrest zurück. Als nächstes wird der Zuckerphosphatrest durch eine AP-Endonuklease entfernt, damit eine DNA-Polymerase die entstandene Lücke (3'-Hydroxylrest und 5'-Phosphatrest) mit der komplementären, intakten Base auffüllen kann, bevor die DNA-Ligase die DNA wieder schließt.

Man unterscheidet zwei Arten der BER:

1. Die „short-patch“-Reparatur, bei der nur ein Nukleotid ersetzt wird

Bei der „short-patch“-BER wird der verbliebene 5'-Phosphatrest durch die dRP-Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase β entfernt und die Ein-Nukleotid-Lücke aufgefüllt. Der DNA-Strang wird dann durch den DNA-Ligase III/XRCC1-Komplex verschlossen. XRCC1 stellt dabei die Verbindung zwischen der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase III her.

2. Die „long-patch“-Reparatur, bei der die Lücke mehrerer Nukleotide aufgefüllt wird

Dieser Reparaturweg wird meist dann genutzt, wenn das entstandene 5'-Ende durch einen Zuckerrest blockiert ist und die DNA-Polymerase β deshalb nicht einschneiden kann (Nilsen et al., 2001; Gary et al., 1999). Unter Verdrängung des alten Stranges erfolgt dann eine Neusynthese von zwei bis acht Nukleotiden entweder durch die DNA-Polymerase β oder, wesentlich häufiger, durch die DNA-Polymerase δ und ϵ . Zumindest im letzteren Fall sind als zusätzliche Faktoren Replikationsfaktor C (RFC) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) beteiligt (Stucki et al., 1995). Letzterer aktiviert die *flap*-Endonuklease, was ein Abschneiden des verdrängten alten Stranges bewirkt (Matsumoto et al., 1999; Pascucci et al., 1999; Klungland et al., 1997) und somit erlaubt, dass die DNA-Ligase I, die ebenfalls mit PCNA interagiert, die Reparatur durch Verschließen des verbliebenen Strangbruchs beenden kann (Flohr, 2003).

Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur repariert überwiegend DNA-Schäden, die durch ihre Größe die Helixstruktur der DNA stören und damit die Replikation und die Transkription blockieren. Die von NER prozessierten DNA-Schäden reichen von den nur eine geringe Änderung in der helikalen Struktur der DNA verursachenden Läsionen bis zu stark Helix-verändernden und destabilisierenden Läsionen. Die NER erkennt somit ein breites Spektrum strukturell nicht verwandter bulky-lesions, wie durch

UV-Strahlung induzierte Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte, chemische Addukte aber auch modifizierte Basen und entfernt sie.

Der Prozess der NER ist hoch konserviert und verläuft prinzipiell in 6 Schritten:

- 1) Schadenserkennung
- 2) Konformationsänderung
- 3) Inzision
- 4) Exzision
- 5) DNA-Synthese
- 6) Rejoining

Zunächst muss der DNA-Schaden von der Zelle erkannt werden. Das Protein Xeroderma Pigmentosum (Schadenserkennungsprotein) spürt den Schaden auf und bindet mit Hilfe des Einzelstrang-Bindeproteins spezifisch an der geschädigten DNA-Stelle. Die Enzyme der NER wirken in einem Komplex: der XPC-hHRAD23-Komplex erkennt und bindet die geschädigte Base, was zu einer Konformationsänderung der DNA führt (Janicijevic et al., 2003; Wood, 1999). Als nächstes binden XPA und RPA (Batty et al., 2000). Dieser Schadenserkennung folgt eine schrittweise Anordnung weiterer Proteine der NER, darunter THIIH, bestehend aus sechs Untereinheiten inklusive der ATP-abhängigen DNA-Helikasen XPB und XPD, die zu einer Entspiralisierung des DNA-Stranges führen. Dieser liegt jetzt in Einzelstrangform vor. Weiter Teil des Enzymkomplexes sind die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF, die die einzelsträngige DNA 3' bzw. 5' neben dem Schaden einschneiden. Der Schnitt erfolgt in einer konstanten Entfernung: acht Nukleotide vom 5'-Ende und fünf Nukleotide vom 3'-Ende des DNA-Schadens. Im nächsten Schritt wird der Schaden durch die Helikase ausgeschnitten, so dass ein Oligonukleotid mit einer Länge zwischen 24 und 32 Nukleotiden entsteht (Winkler et al., 2001). Anschließend findet komplementär zum Gegenstrang die Reparatursynthese durch den DNA-Polymerase- δ/ϵ -RPA-RFC-Komplex statt. Zum Schluss wird die Lücke durch DNA-Ligase I verschlossen (Friedberg, 2001) (Flohr, 2003).

2.3 IR-induzierte Zellschädigung

2.3.1 Röntgen-Strahlung

1895 entdeckte Wilhelm C. Röntgen in Würzburg die Strahlen, die zu jener Zeit Physik und Medizin revolutionierten. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen, die in einem Wellenlängenbereich von ca. 10^{-9} m bis 10^{-11} m liegen. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung

befindet sich also zwischen dem Bereich des ultravioletten Lichts und der Gammastrahlung. Röntgenstrahlen werden in einer hochevakuierten Röhre erzeugt. Dabei werden Elektronen aus der Glühkathode herausgelöst und mittels einer anliegenden Spannung zwischen Kathode und Anode in Richtung der positiven Elektrode beschleunigt. Nach dem Durchlauf der angelegten Hochspannung U_A (ca. 10kV-100kV) besitzen die Elektronen am Ende eine kinetische Energie:

$$E_{\text{kin}} = e \times U$$

e: Ladung des Elektrons [e] = $1,6 \times 10^{-19}$ C

E_{kin} : kinetische Energie [E_{kin}] = 1 eV

U: Beschleunigungsspannung [U] = 1 V

Diese kinetische Energie wird beim Auftreffen auf die Anode hauptsächlich in Wärmeenergie umgewandelt und nur ein kleiner Rest wird als Röntgenstrahlung emittiert.

Um einen Atomkern kreist eine Anzahl von Elektronen auf ihren jeweiligen Bahnen. Die Anzahl der Elektronen entspricht der Ordnungszahl (=Kernladungszahl=Anzahl der Protonen im Kern) des jeweiligen Elementes. Aufgrund gleicher physikalischer Eigenschaften lassen sich bestimmte Bahnen zu einzelnen Gruppen, zu sogenannten Schalen, zusammenfassen. Diese werden von Innen nach Außen mit Elektronen aufgefüllt (Pauli-Prinzip) und dementsprechend in diese Richtung durch Großbuchstaben gekennzeichnet (K, L, M, N, usw.). Die Schalen sind Energieniveaus, die die Energie der Elektronen der Schale charakterisieren. Die Höhe der Energie der Energieniveaus ist zunehmend von innen nach außen. Ist die kinetische Energie der beschleunigten Elektronen groß genug, um ein Elektron beim Auftreffen aus der Atomhülle zu schlagen (ionisieren), dann kann ein Elektron aus einer weiter außen befindlichen Schale in die entstandene Lücke überspringen. Dabei sind nicht alle Übergänge erlaubt, sondern nur solche welche bestimmte Auswahlregeln erfüllen. Dies ist abhängig von der Energie der beteiligten Energieniveaus. Die Differenzenergie ($E_{\text{außen}} - E_{\text{innen}}$) wird in Form elektromagnetischer Strahlung im Wellenlängenbereich der Röntgenstrahlung abgegeben. Dieses Röntgenquant (=Photon) hat eine feste Energie:

$$E_{\text{ph}} = E_{\text{außen}} - E_{\text{innen}} = h \times \nu = h \times c : \lambda$$

Hierbei ist eine große Zahl von Übergängen möglich. Es entsteht ein sogenanntes Linienspektrum, welches nur von der Atomaren Zusammensetzung des Anodenmaterials abhängt. Die so entstandene Röntgenstrahlung wird deswegen charakteristische Strahlung genannt.

Zwei Prozesse werden bei der Wechselwirkung von Röntgenstrahlen mit Materie unterschieden:

- Vollständige Absorption: die gesamte Energie des Photons wird von den beteiligten Atomen aufgenommen, dies führt im Allgemeinen zur Ionisierung der Atome
- Streuung: die Richtung der Photonen ändert sich, eventuell geht ein Teil der Energie verloren

Die Wechselwirkung mit Materie umfasst:

- Klassische Streuung: sie findet ohne Energieänderung, jedoch mit Richtungsänderung statt. Zu beachten ist ihre dadurch auftretende Streustrahlung im Rahmen von Strahlenschutzmaßnahmen.
- Photo-Effekt: der Photo-Effekt ist eine Absorption der Röntgenstrahlen, wobei die gesamte Energie der Photonen auf die Elektronen übertragen wird. Es entsteht ein freies Elektron, wenn beim Energieübertrag ein gewisser Schwellenwert, die Bindungsenergie E_B des Elektrons im Atom überschritten wird. Zurück bleibt ein positiv geladenes Atom (Ion) und das freie Elektron mit der kinetischen Energie $E_{\text{kin}} = h\nu - E_B$
- Compton-Effekt: darunter versteht man die Streuung eines Photons an den vergleichsweise schwach gebundenen Elektronen der äußeren Atomhülle (N, O Schale). Das Photon gibt dabei nur einen Teil seiner Energie ($E_\nu = h\nu$) an ein Elektron ab. Das Photon fliegt mit verringerter Energie ($E_\nu' = h\nu'$), d.h. mit größerer Wellenlänge und veränderter Richtung weiter. Das Elektron hat die Energiedifferenz $E_e = E_\nu - E_\nu'$ übernommen und wird mit der kinetischen Energie $E_{\text{kin}} = E_\nu - E_\nu' - E_B$ emittiert. Zurück bleibt ein ionisiertes Atom.
- Paarbildung: bei der Paarbildung werden ein Elektron und ein Positron erzeugt. Voraussetzung für diesen Prozess der Paarbildung ist, dass das Photon eine Mindestenergie von 1,022 MeV besitzt. Das gebildete Positron vereinigt sich wieder mit einem Elektron, wobei eine sogenannte Vernichtungsstrahlung erzeugt wird. Diese Vernichtungsstrahlung ist energieärmer als die einfallende, primäre Röntgenstrahlung, da eine Teil der kinetischen Energie der erzeugten Elektronen und Positronen durch deren unelastische Streuung mit Materie in Wärmeenergie umgewandelt wird.

Alle vorher erwähnten Effekte führen zu einer Schwächung bzw. zu einer Absorption der ionisierenden elektromagnetischen Strahlung. Wird die Intensität vor dem Eintritt in die Materie

gemessen (I_0) und nach dem Durchgang (I), so lässt sich die Schwächung durch das sogenannte Schwächungsgesetz beschreiben. Die Intensität nimmt dabei exponentiell mit der Dicke des durchstrahlten Materials ab.

$$I = I_0 \times e^{-\kappa d}$$

I: Intensität nach dem Materiedurchgang	[I] = willkürliche Einheit
I_0 : Intensität vor dem Materiedurchgang	[I_0] = willkürliche Einheit
κ : Extinktionskoeffizient	[κ] = 1/m
d: Dicke der absorbierenden Schicht	[d] = m

Die Schwächung der Intensität der in Einfallrichtung durch die Materie tretenden Strahlung wird dabei verursacht durch Absorption und Streuung.

Das Maß für die primäre Schädigung von biologischem Gewebe wird über die zugeführte Strahlen- oder Energiedosis definiert. Sie wird in Gray [Gy] gemessen, wobei ein Gray diejenige Strahlungsmenge darstellt, die in einer Körpermasse von einem Kilogramm die Energie von einem Joule absorbiert. Die Einheit Gray stellt dabei eine SI-Einheit dar und hat die frühere Einheit Rad abgelöst. Die Aktivität oder die Anzahl der Zerfälle eines Strahlers pro Sekunde wird in Becquerel [Bq] angegeben, wobei 1 Bq einem Zerfall pro Sekunde entspricht. Die Einheit Becquerel ist ebenfalls eine SI-Einheit und hat die ältere Einheit Curie [Ci] abgelöst. Bei den dosimetrischen Messungen werden demnach verschiedene Parameter erfasst und unterschieden (Raschke, 2007). Die drei wichtigsten Parameter sind:

Energiedosis: die Energiedosis gibt die Energie an, die von der Strahlung auf die bestrahlte Materie übertragen wird

$$\text{Energiedosis} = \frac{\text{absorbierte Energie}}{\text{durchstrahlte Masse}}$$

$$[\text{Energiedosis}] = 1 \text{ Gray} = 1 \text{ Gy} = 1 \text{ Ws/kg (früher rad)}$$

$$[\text{absorbierte Energie}] = 1 \text{ Ws}$$

$$[\text{durchstrahlte Masse}] = 1 \text{ kg}$$

Ionendosis: die Ionendosis ist die Einheit, die sich auf die durch Ionisation entstandene Ladung der Ionenpaare bezieht.

$$\text{Ionendosis} = \frac{\text{Ladung der Ionenpaare}}{\text{durchstrahlte Masse}}$$

$$[\text{Ionendosis}] = 1 \text{ C/kg (früher 1 R, Röntgen)}$$

$$[\text{Ladung der Ionenpaare}] = 1 \text{ C}$$

$$[\text{durchstrahlte Masse}] = 1 \text{ kg}$$

Mit einem Umrechnungsfaktor, der von der durchstrahlten Materie abhängt, lassen sich Ionen- und Energiedosis ineinander umrechnen. Ein materialspezifischer Umrechnungsfaktor kommt durch die unterschiedliche Energieaufnahme des Materials zustande.

Ionendosisleistung: die Ionendosisleistung ist definiert als:

$$\text{Ionendosisleistung} = \frac{\text{Ionendosis}}{\text{Zeit}}$$

$$[\text{Ionendosisleistung}] = 1 \text{ C/kg x s}$$

$$[\text{Ionendosis}] = 1 \text{ C/kg}$$

$$[\text{Zeit}] = 1 \text{ s}$$

2.3.2 IR-induzierte DNA-Schädigung

Die Schädigende Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen, Gewebe und Organismen resultiert vor Allem aus den Schädigungen des genetischen Materials, der DNA. Generell kann die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung in ihren vielfältigen Erscheinungsformen als Resultat eines rein physikalisch beschreibbaren Prozesses angesehen werden. Bei der Strahlungsionisation wird die Energie der ionisierenden Photonen oder Teilchen von der Elektronenhülle eines neutralen Atoms absorbiert, wobei bei diesem Prozess ein Elektron abgespalten werden kann (Raschke, 2007). Die direkte Folge der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit den Zellmolekülen stellt zunächst die Veränderung der Elektronenhülle der einzelnen Atome dar, wobei diese in reaktive und instabile Zustände übergehen. Bei radiochemischen Reaktionen ionisierender Strahlung kommt es als indirekte Wirkung zur Bildung von Hydroxylradikalen als Reaktionsprodukte des Wassers des Zytoplasmas, die aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit zelluläre Biomoleküle oxidieren können und binnen kurzer Zeit biochemisch nachweisbare Veränderungen von Makromolekülen wie der DNA induzieren (Hüttermann et al., 1984). Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNA kann also entweder auf direktem Wege erfolgen (die Energieabsorption findet dort statt, wo der Schaden

entsteht), oder auf indirektem Wege über einen oder mehrere Zwischenschritte (durch die Strahlung werden zunächst chemische Radikale erzeugt, die dann zur Schädigung der DNA führen).

Ionisierende Strahlung kann auf direktem oder auch indirektem Wege Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenschäden und abnorme Verbindungen zwischen Molekülteilen innerhalb der DNA auslösen. Doppelstrangbrüche werden als die kritischsten Schäden ionisierender Strahlung angesehen. In Experimenten mit Fibroblasten-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung von Röntgenstrahlung zu 30-40 DSB/Gray und pro Zelle führen kann (Dikomey et al., 1998, 2000; El-Awady et al., 2003).

2.3.3 DNA-Reparaturmechanismen

Der Doppelstrangbruch wird heute allgemein als der häufigste DNA-Schaden nach IR-Exposition angesehen. Es konnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung des H2AX-Proteins, einer Subklasse eukaryontischer Histonproteine, einen der frühesten Schritte in der zellulären Antwort auf Doppelstrangbrüche darstellt. DNA-Doppelstrangbrüche werden anschließend entweder durch die homologe Rekombinations-Reparatur (HR) oder durch die nicht-homologe Endverknüpfung, nonhomologous end-joining (NHEJ) repariert.

Histonproteine sind gewebsunspezifische niedermolekulare Eiweißkörperchen des Zellkernplasmas, die mit der DNA irreversible Komplexe bilden. Sie sind Teil der Nukleoproteinstruktur der DNA, die allgemein als Chromatin bezeichnet wird. Das Histon H2AX wird als Antwort auf einen DNA-Doppelstrangbruch am Carboxyterminus in Position 139 an der Aminosäure Serin phosphoryliert – es entsteht phosphoryliertes γ H2AX. H2AX wird durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. Die beiden wichtigsten sind ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated Protein) und die DNA-abhängige Protein-Kinase (DNA-PK), wobei ATM mit bis zu 95% den Löwenanteil trägt (McManus et al.). Beide Kinasen sind funktionell komplementär und können auch interagieren. In Abwesenheit von DNA-PK und ATM ist immer noch eine „Grundphosphorylierung“ von H2AX zu beobachten. Diese wird vermittelt durch Kinasen der Phosphatidylinositol-3'-Kinase-Familie. Während ATM neben H2AX auch andere Schlüsselproteine des Zellzyklus (Checkpoint-Kontrolle) wie z.B. Rad17, BRCA-1 und p53 phosphoryliert, besitzt die DNA-PK als weitere Substrate neben dem H2AX noch den RAD50/MRE11/NSB1-Komplex, das Artemis-Protein, das WRN-Protein und das XRCC4-Protein. Im Falle beider Kinasen führt die Phosphorylierung des H2AX zu γ H2AX zu einer Retention der Proteine für die DNA-DSB-Reparatur am Restriktionspunkt des Zellzyklus. Im Gegensatz zur Retention dieser Proteine am Ort des Doppelstrangbruchs ist ihre Rekrutierung nicht γ H2AX-abhängig (Stiff et al.,

2004). Zur Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche konkurrieren nach der Phosphorylierung des H2AX 2 Reparatursysteme um dieselbe DNA-DSB-Stelle:

1. Die homologe Rekombinations-Reparatur (HR):

Für die HR ist eine Homologie zwischen den rekombinierenden Sequenzen erforderlich. Diese kann über mehrere hundert Basen reichen (Büttner, 2004). Bei der homologen Rekombination entsteht durch exonukleolytischen Abbau an der Stelle des Doppelstrangbruchs ein freies 3'OH-Ende der DNA. Der intakte Strang wird nach Finden der homologen Kopie des geschädigten DNA-Abschnittes aus der Doppelhelix verdrängt. Nach komplementärer Bindung wird der geschädigte DNA-Strang durch Polymerasen verlängert, wobei der intakte Strang als Matrize genutzt wird. Die so entstandene „Holiday-Struktur“ bewegt sich nach rechts oder links entlang des Doppelstranges („branch migration“). Dies geht mit Drehung der beiden DNA-Moleküle und ständigem Öffnen und Schließen von Wasserstoffbrücken einher, ohne dass sich die Geometrie der DNA auffällig verändert. So werden größere Teile des intakten und des zu reparierenden Stranges ausgetauscht. Die Auflösung der „Holiday-Struktur“ erfolgt durch Enzyme, die die Überkreuzungsstellen erkennen und Einzelstrangsnitte einführen. Dabei kann es zum „Crossing over“, dem Austausch von DNA-Abschnitten zwischen den Schwesterchromatiden kommen. Abschließend erfolgt die Ligation der nun reparierten DNA-Moleküle (Röske, 2005).

2. Die nicht-homologe Endverknüpfung, nonhomologous end-joining (NHEJ):

Im Gegensatz zur homologen Rekombination braucht die NHEJ keine oder nur sehr kleine DNA-Homologien (Mikrohomologien) für die Reparatur des Doppelstrangbruchs (Hofman-Hüther, 2002). Es gibt zumindest 2 Arten der NHEJ-Reparatur: DNA-PK-abhängige und DNA-PK-unabhängige Reparatur (Pfeiffer, 1998; Pfeiffer et al., 2000). Am besten ist die DNA-PK-abhängige NHEJ-Reparatur untersucht. Sie soll hier deshalb genauer beschrieben werden. Das Ku-Heterodimer, das sich aus Ku 70- und Ku 86-Protein zusammensetzt, hat eine hohe Affinität zu den freien DNA-Enden und bindet zuerst an die DNA-Enden. Durch diese Bindung wird die exonukleotische Degradation der DNA-Enden verhindert und gleichzeitig wird die katalytische Untereinheit (DNA-PK_{CS}) der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) rekrutiert. Nachdem sich das Ku-Heterodimer von den freien DNA-Enden etwa eine Umdrehung nach Innen transloziert hat, bindet die DNA-PK_{CS} direkt an die freien Enden der DNA (Yoo et al, 1999). Komplexe aus Ku-Heterodimeren und DNA-PK_{CS}-Molekülen bilden an Stellen der Doppelstrangbrüche sogenannte Cluster, die man mit Hilfe Fluoreszenzmarkierter Antikörper visualisieren kann. Diese Bindung der Ku-Heterodimere und der DNA-PK_{CS}-Moleküle an die freien DNA-Enden erfolgt sehr früh, etwa 5-30 min nach Bestrahlung (Wang et al., 2001). Jeweils zwei DNA-PK_{CS}-Moleküle bringen die zwei DNA-Enden näher zusammen. Dabei phosphoryliert die DNA-PK_{CS} mehrere Moleküle, u.a. auch den RAD50/MRE11/NSB1-Komplex, das Artemis-Protein und das WRN-Protein, die alle auch eine 3'-5'- bzw. 5'-3'-Exonuklease-Aktivität

haben, und die wahrscheinlich bei der Prozessierung der DNA-Enden eine wichtige Rolle spielen (Paull et al., 1999, 2000; Trujillo et al., 1998; Ma et al., 2002). Zu einem späteren Zeitpunkt phosphoryliert die DNA-PK_{CS} das XRCC4-Protein und stimuliert damit die Ligations-Aktivität des XRCC4/Ligase IV-Komplexes (Leber et al., 1998). Gleichzeitig phosphoryliert die DNA-PK_{CS} die Ku-Proteine und sich selbst und dissoziiert anschließend von der DNA (Chan et al., 1996). Die Ligation wird von dem XRCC4/Ligase IV-Komplex durchgeführt (Kanaar et al., 1998; Khanna et al., 2002). Die NHEJ ist ein fehleranfälliger Mechanismus, bei dem oft kleinere Deletionen der DNA-Sequenz entstehen (Hofman-Hüther, 2002).

Nach einem Strahlenschaden versucht die Zelle durch Interaktion von HR und NHEJ die DNA zu reparieren. NHEJ und HR sind nebeneinander aktiv, zeigen aber meist keine direkten Interaktionen. Die NHEJ ist prädominant und während des ganzen Zellzyklus aktiv, vor allem aber in der G₁-Phase und in der frühen S-Phase. Die HR hingegen wird erst in der späten S-Phase und in der G₂-Phase des Zellzyklus eingesetzt. Co-Aktivierung von NHEJ und HR auf demselben DSB ist eine Antwort der Zelle in S- oder G₂-Phase, wenn beide Systeme verfügbar sind.

2.4 Ziele der Arbeit

Die Haut ist mit 1,5-2 m² Oberfläche und 10-20 kg Gewicht das größte und zugleich eines der vielfältigsten menschlichen Organe. Sie ist zugleich mechanisches, physikalisches, chemisches und immunologisches Schutzorgan, Sinnesorgan (Kälte-, Wärme-, Schmerz- und Tastempfindung), Wärmeregulationsorgan und Kommunikationsorgan. Im Laufe der Zeit hat sich das Schönheitsideal des Menschen stark gewandelt, was sich anhand der Zitate zweier berühmter Persönlichkeiten sehr schön veranschaulichen lässt:

„Dein Leib ist weiß wie der Schnee auf den Bergen Judäas.“ (Salome über den Propheten Johannes)

„Wer im Leben erfolgreich sein will, muss täglich früher aufstehen und das ganze Jahr über braun sein“ (Aristoteles Onassis)

Getreu diesem Motto hat in der heutigen Zeit die UV-Licht-Exposition in der Bevölkerung sehr stark zugenommen. Auch die Ausdünnung der Ozonschicht mit konsekutiver Zunahme der Strahlenbelastung für die menschliche Haut spielt in diesem Zusammenhang eine nicht unerhebliche Rolle.

Eine weitere, unsichtbare Gefahrenquelle für die Haut stellt neben der UV-Strahlung auch die IR-Strahlung dar. Sie kommt neben der medizinischen Diagnostik und Therapie auch bei vielen anderen

wissenschaftlichen und technischen Prozessen vor. Hauptlieferant natürlicher Infrarot-Strahlung auf der Erde ist die Sonne, da über 40% der gesamten auf die Erde treffenden Sonnenstrahlen IR-Strahlen sind.

Experimentelle Arbeiten der letzten Jahre zeigen dass Vitamin D einen nicht unerheblichen Effekt auf die Differenzierung und Proliferation der humanen Keratinozyten ausübt. Vor dem Hintergrund, dass durch die zunehmende Belastung der Haut durch Strahlenschäden die Anzahl der malignen und nicht-malignen Hauterkrankungen stetig zunimmt, ist diese Erkenntnis von großem Interesse. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die protektiven Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nach Bestrahlung mit UV- und IR-Strahlung in gesunden, humanen Keratinozyten sowie in Plattenepithelkarzinomzellen zu untersuchen. Im Einzelnen werden hierfür der Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten, die Stoffwechselaktivität und die Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Stoffwechsels in HaCaT-Keratinozyten und in humanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UV-Bestrahlung sowie der Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Funktion von DNA-Reparatur-Systemen nach IR- und UV-induzierter Strahlenschädigung untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 RNA-Isolierung

RNA ist ebenso wie DNA eine Nukleinsäure. Die wichtigste Funktion der RNA ist die Kopie der in der Basenabfolge der DNA enthaltenen genetischen Information (Transkription) und deren anschließende Übersetzung zum Protein (Translation). Die Isolierung von RNA aus Zellen ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden, in diesem Moment als DNA vorliegen. Dies macht man sich in einer Reihe von molekularbiologischen Methoden zur Analyse der Genexpression zu Nutze. Da die RNA im Vergleich zur DNA leichter von RNasen angegriffen wird, muss beim Arbeiten mit RNA zügig und präzise auf Eis gearbeitet werden (Sambrook et al., 1989).

3.1.1 Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN

Die Methode der Firma QIAGEN beruht auf der Verbindung zweier Techniken, der spezifischen Bindungsfähigkeit von RNA an einer Silicamembran und der Microspinttechnologie. Nach der Bindung der RNA an der Membran, wird die gebundene RNA mit den mitgelieferten Puffern gewaschen und mit den Elutionspuffern von der Membran eluiert.

Die Isolierung von Total-RNA aus Zellkulturen wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die kultivierten Zellen nach Abziehen des Mediums und Waschen mit 1 x PBS durch Zugabe von Trypsin vom Boden der Petri-Schalen gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde erneut Medium mit 10% FCS (für die Inaktivierung des Trypsins ist hierbei das Antitrypsin im Serum verantwortlich) zugegeben und das Pellet anschließend in einem Zentrifugenröhrchen bei 400U/min für 5min zentrifugiert. Pro Pellet wurden danach jeweils 350µl RLT-Puffer zugegeben und 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 350µl 70%-igen Ethanol vermischt. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben, die auf einem Zentrifugenröhrchen saß, und für 15s bei 10.000U/min zentrifugiert. Hierbei wurde die RNA an der Silikon-Gel-Membran der Säule absorbiert, und die durch die Membran in das Zentrifugenröhrchen durchgetretene Flüssigkeit wurde verworfen. In einem ersten Waschschrift

wurden 350µl QIAGEN RWI-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15s bei 10.000U/min zentrifugiert. Um eventuelle DNA-Rückstände aus den Proben zu entfernen wurden anschließend pro Ansatz 80µl eines DNase-Puffers auf die Silicamembranen der Säulen gegeben und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Waschschrift wurden erneut je 350µl QIAGEN RWI-Puffer auf die Säulen gegeben und bei 10.000U/min für 15s zentrifugiert. Im dritten Waschschrift wurden 500µl QIAGEN RPE-Puffer auf die Säulen aufgetragen und für 15s bei 10.000U/min zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde mit einer Zentrifugationsdauer von 2min wiederholt, um die Silikon-Gel-Membran zu trocknen. Die Säule wurde dann von dem Zentrifugenröhrchen abgenommen und auf einem neuen Gefäß angebracht. Schließlich wurden 30µl RNase-freies Wasser aufgetragen und 1min lang bei 10.000U zentrifugiert, um die absorbierte RNA von der Membran zu lösen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und das RNA-Extrakt auf Eis gekühlt.

3.1.2 RNA-Gelelektrophorese

Prinzip:

Mit der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren apparativ wenig aufwendig getrennt werden. Hierbei wandern die DNA- oder RNA-Fragmente gemäß ihrer Ladung und Konformation im elektrischen Feld von Kathode zu Anode. Als Träger der Fragmente dient das pflanzliche Polysaccharid Agarose, welches im Gel netzähnliche Strukturen ausbildet (Löffler und Petrides, 1998).

Einzelsträngige RNA-Moleküle werden zumeist unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, weil sie durch intra- bzw. intermolekulare Basenpaarungen Sekundärstrukturen ausbilden können. Als Denaturierungsmittel kommt z. B. Formaldehyd zum Einsatz, das sowohl dem Gel wie auch dem Gelpuffer zugesetzt wird. Seine denaturierende Wirkung beruht auf der Bildung Schiff'scher Basen mit den Aminogruppen Guanin, Cytosin und Adenin. Dadurch wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen effektiv unterbunden, so dass sich keine Sekundärstrukturen entwickeln können. Die aufgetrennten RNA-Banden können dann mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden, indem sie mit UV-Licht angeregt werden.

Methode:

Der Ladepuffer wird wie unten beschrieben zusammenpipettiert (s. Tab. 3.1) und als letztes die RNA-Probe zugegeben. Das Gemisch wird nun im 65°C heißen Wasserbad für 5min denaturiert. Danach wird die Probe auf Eis gestellt. Die Bestandteile des Gels werden in einem 100ml Erlenmeyerkolben zusammengefügt, in der Mikrowelle aufgeköcht, bis das Gel schlierenfrei ist. Nachdem das Gel auf ungefähr 60°C abgekühlt ist, wird unter einem Abzug das Formaldehyd zugefügt, gemischt und zügig

in einen mit einem Kamm bestückten Gelträger gegossen. Luftblasen werden mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Gel bleibt bei Raumtemperatur so lange stehen, bis es ausgehärtet ist. Dann wird der Kamm entfernt, die Gelkammer mit 1x MOPS als Laufpuffer befüllt, und die Proben vorsichtig in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 100V durchgeführt, bis die blaue Bromphenol-Bande die Hälfte der Gellänge erreicht hat.

Anschließend wird das Gel mit destilliertem Wasser gespült und unter dem UV-Transilluminator ausgewertet.

Agarosegel (1%):

50ml	1x MOPS
0,5g	Agarose
3ml	Formaldehyd

Ladepuffer:

10µl	Formamid
3,5µl	Formaldehyd
2µl	10x MOPS
1µl	Ethidiumbromid (1mg/ml)
2µl	Bromphenolblau
2µl	RNA-Probe

Tab. 3.1 Zusammensetzung der Reagenzien zur RNA-Gelelektrophorese

3.2 Reverse Transkription: Umschreibung von RNA zu cDNA mit dem Omniscript Kit der Firma QIAGEN

Die reverse Transkription ist eine hoch empfindliche Methode, um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen oder mRNA zu quantifizieren. Diese Methode macht die gleichzeitige Analyse einer großen Zahl an mRNAs möglich. Mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers, der an die Poly(A)-Struktur am 3'-Ende der einzelsträngigen mRNA hybridisiert, oder eines spezifischen Primers, kann die Reverse Transkriptase die komplementäre cDNA synthetisieren.

Für die cDNA-Erststrangsynthese aus mRNA wurde der „Omniscript RT Kit“ der Firma QIAGEN verwendet. Die verwendete Omniscript Reverse Transkriptase unterscheidet sich von den üblich benutzten, natürlich vorkommenden reversen Transkriptasen der RNA-enthaltenden Retroviren. Diese im Kit enthaltene Reverse Transkriptase ist ein in *e.coli* exprimiertes, rekombinantes, heterodimeres Enzym, welches sowohl eine RNA-abhängige, als auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerasefunktion, und eine RNaseH-Funktion besitzt. Für die cDNA-Synthese wurden Oligo-dT₍₁₂₋

¹⁸-Primer der Firma Invitrogen verwendet, die spezifisch am Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Durch das freie 3'-Ende der Primer wird es der Reversen Transkriptase ermöglicht, den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren.

Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte gemäß Herstellerangaben. Hierzu wurde zu Beginn des Versuchs ein Aliquot des 10fach konzentrierten RT-Puffers mit dem im Kit befindlichen RNase-freien Wasser zu einem einfach konzentrierten RT-Puffer verdünnt. Mit dem so erhaltenen einfach verdünnten RT-Puffer wurde anschließend die RNase-Inhibitor-Stammlösung auf eine Konzentration von 10Units/ μ l verdünnt. Pro Ansatz wurden ca. 2 μ g isolierte RNA aus kultivierten und behandelten Zellen eingesetzt. Die restlichen Komponenten wurden dann zur RNA zugegeben, so dass sich folgender Reaktionsansatz ergab:

- 2 μ g RNA-Template
- 2 μ l 10x RT-Puffer
- 2 μ l dNTP-Mix (5mM jedes dNTP)
- 2 μ l Primer
- 1 μ l RNase-Inhibitor (10U/ μ l)
- 1 μ l Omniscript Reverse Transkriptase

Der sogenannte Master Mix wurde anschließend mit RNase-freiem Wasser (Sigma) auf 20 μ l aufgefüllt. Die Reverse Transkription erfolgte durch Inkubation für 1h im Wasserbad bei 37°C. Die Reaktion wurde durch 5min Erhitzen auf 93°C gestoppt. Gelagert wurde die entstandene cDNA bei -20°C.

3.3 Quantitative Real-Time PCR mit dem Light Cycler

Die Real-Time PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Die Methode der PCR dient der enzymatischen in vitro Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte zum diagnostischen Nachweis und Analyse (Saiki et al., 1988). Die Voraussetzung zur Amplifikation bilden DNA-Polymerasen, die in Anwesenheit von Nukleotiden (dNTP's) kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) mit einem freien 3'-OH-Ende entsprechend verlängern und somit den gewünschten DNA-Abschnitt vervielfältigen können. Bei der Real-Time PCR kann die Amplifikation des Ausgangsmaterials über einen PC-Monitor in Echtzeit überwacht und die Transkriptmenge eines Gens quantitativ bestimmt werden. Die Methode wurde bereits an anderer Stelle von R. Kindich ausführlich erläutert. Wir

orientierten uns in unseren Beschreibungen daran, verweisen jedoch zwecks spezifischerer Ausführungen auf die Quelle.

3.3.1 Aufbau und Funktionsprinzip des Light Cyclers

Der Light Cycler (Abb. 3.1A) wurde von der Firma Roche Diagnostics entwickelt und besteht aus einem PCR-Cycler sowie einem Fluorimeter (Abb. 3.1B). Zusammen mit einem Computer mit Monitor und Software (Light Cycler-Software Version 3.5.28) wird er z.B. für quantitative Untersuchungen und Mutationsanalysen verwendet.

Der PCR-Cycler dient als Amplifikationseinheit des Gerätes, die den Reaktionsablauf der einzelnen PCR Schritte über einen Luftstrom regelt. Eine Heizspirale und ein Ventilator sorgen hierbei durch gleichmäßige Verteilung und abwechselndes Aufheizen und Abkühlen der Luft für eine optimale Temperatur in der Reaktionskammer.

Das Fluorimeter bildet die Detektionseinheit des Light Cyclers. Es besteht aus einem Anregungs- und drei Detektionskanälen F1, F2, F3 (F1 = grün = 521 nm / F2 = rot = 640 nm / F3 = tiefrot = 705 nm). Die Detektion erfolgt nacheinander durch stufenweise Positionierung der Proben über die optische Einheit des Fluorimeters.

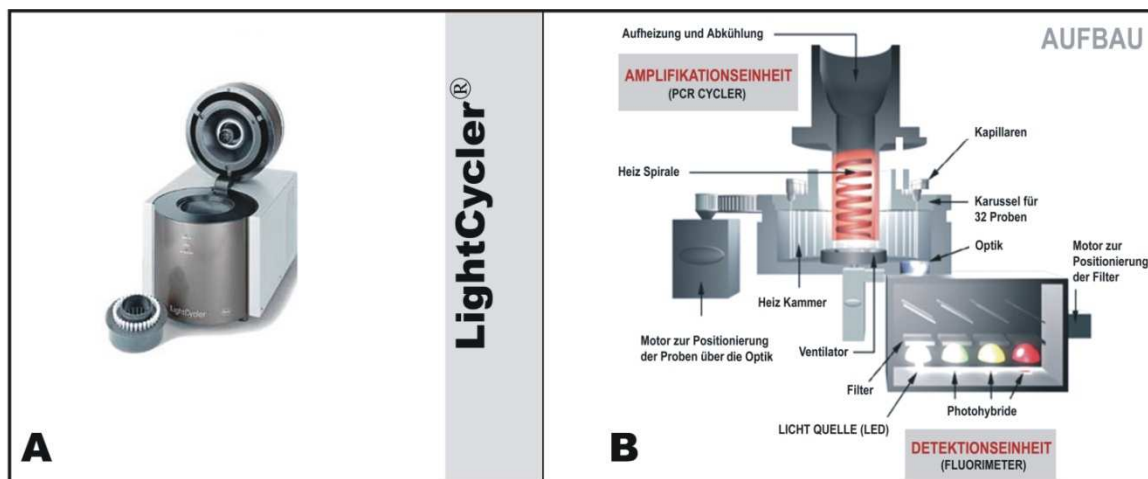


Abb. 3.1 Darstellung des Light Cycler Gerätes (A) und dessen Aufbau (B) (Quelle: Thaiscience)

Das Prinzip des Light Cyclers beruht auf der Bestimmung der Intensität von Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb eines Reaktionsansatzes. Die nach Anregung durch eine Diode (LED) emittierte Fluoreszenz wird durch halbdurchlässige Spiegel und wellenspezifische Filter (530 nm, 640 nm, 710 nm) geleitet und von drei Photohybriden unterschiedlicher Wellenlängen gemessen. Optische Signale werden in

elektrische Signale umgewandelt, an einen Computer weitergeleitet und in Form von Falschfarben als Fluoreszenzkurven auf dem Monitor dargestellt.

Die PCR-Reaktionen finden nicht wie üblich in kleinen Reaktionsgefäßen statt, sondern in Glaskapillaren, die aufgrund ihrer Beschaffenheit eine gleichmäßige und schnelle Verteilung der Temperatur innerhalb des Reaktionsansatzes ermöglichen. Die Glaskapillaren werden nach Fertigstellung des Reaktionsansatzes und Abfüllung in ein Probenkarussell gesteckt, das Platz für 32 Kapillaren hat. Dann wird das Probenkarussell in die Reaktionskammer der Amplifikationseinheit gestellt. Die Emissionsintensität der der Fluoreszenzfarbstoffe wird in jeder Glaskapillare gemessen, nachdem ein Motor die Proben schrittweise über die optische Einheit des Fluorimeters bewegt hat. Unterhalb der Linse befinden sich Sensoren, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge messen.

3.3.2 Detektion der PCR Produkte

Der Nachweis der PCR Produkte erfolgte über die Messung der Fluoreszenz von SYBR Green I, einem DNA-bindenden Fluorochrom.

SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sequenzunabhängig aber spezifisch an die kleine Furche der dsDNA bindet. Er wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 521 nm. Das Prinzip der Detektion mit SYBR Green I beruht auf der Bestimmung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs nach Bindung an die doppelsträngige DNA (Abb. 3.2).

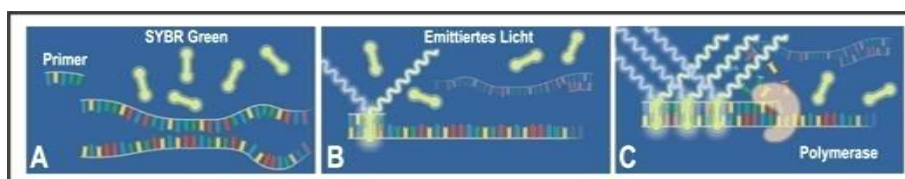


Abb. 3.2 Prinzip der Sequenzunabhängigen Detektion durch SYBR Green I (Quelle: Thaiscience)

Die Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I ist in gelöster Form gering (Abb. 3.2A), erhöht sich aber enorm nach Bindung an die DNA. Während der PCR-Reaktion beginnt die Taq-Polymerase nach Anlagerung der Primer (Abb. 3.2B) mit der Kettenverlängerung, wobei erst wenige und dann immer mehr Fluoreszenzmoleküle in den entstehenden DNA-Doppelstrang eingebaut werden (Abb. 3.2C). Angeregt durch eine Lichtquelle im Real-Time-PCR Gerät beginnen sie zu fluoreszieren. Das von

ihnen abgegebene Licht kann durch die optische Detektionseinheit des Light Cyclers erfasst und der Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß gemessen werden.

Die Fluoreszenzintensität einer Probe ist zur Konzentration des neu gebildeten PCR-Produktes direkt proportional. Mit Hilfe der Light Cycler Software wird dem Fluoreszenzsignal jeder Probe ein bestimmter CP-Wert („crossing point“) zugeordnet, der sich aus der Anzahl der PCR-Zyklen einer PCR-Reaktion ergibt.

3.3.3 Der CP-Wert

Der CP-Wert (crossing point) dient der Bestimmung der Konzentration eines PCR Produktes in einer Probe und wird aus den Fluoreszenzwerten der PCR-Produkte bestimmt.

Er wird in der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation gemessen, in der eine Quantifizierung der PCR Reaktionen aller Proben unter ähnliche Bedingungen möglich ist. Der gemessene crossing point (Cp) ist der Zyklus, bei dem die PCR-Amplifikation in die exponentielle Phase eintritt und der Punkt, der als zuverlässig proportional zur Ausgangskonzentration angesehen werden kann. Anhand der CP-Werte und der bekannten Konzentrationen der Standards wird eine Standardgerade erstellt. Die Probenkonzentration wird anschließend von der Software anhand der Standardgeraden und der ermittelten CP-Werte bestimmt (Abb. 3.3).

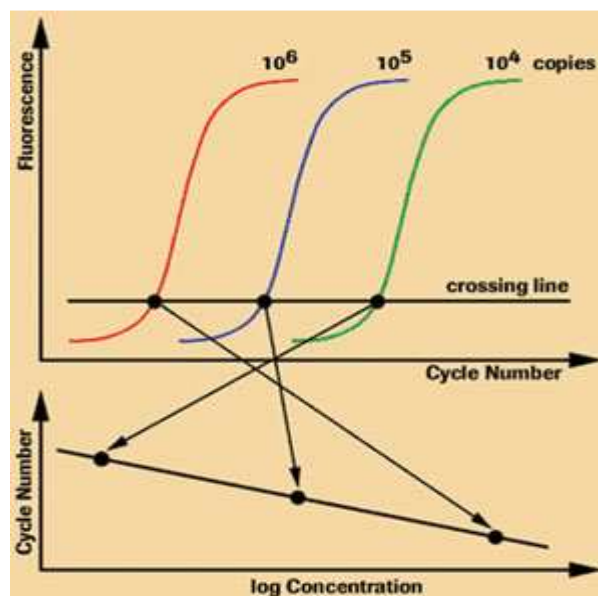


Abb. 3.3 Darstellung der Bestimmung der CP-Werte und der Ermittlung der Probenkonzentration anhand der erstellten Standardgerade (Quelle: Thaiscience)

3.3.4 PCR-Effizienz, Standardkurven und Relative Quantifizierung

Einfluss auf die PCR Effizienz haben unterschiedliche Faktoren wie Ausgangskonzentration des Templates, Qualität der Nukleinsäure, Dauer einer PCR Reaktion, Effizienz der Polymerase, Nukleotid- und $MgCl_2$ -Konzentration, Primersequenz und Primerlänge, Endkonzentration des PCR Produktes sowie Pipettierfehler.

Die experimentelle Bestimmung der PCR-Effizienz wird in der Real-Time PCR mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt, die aus einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen einer Standard-Probe erstellt wird. Die Standard-Probe kann dabei eine Nukleinsäure (DNA, RNA) unterschiedlichen Gewebetyps sein, in der das zu untersuchende Gen eine hohe Ausgangskonzentration aufweist.

Die Standardkurve wird mathematisch als Regressionsgerade über die einzelnen Verdünnungsstufen (CP-Werte) der Standard-Probe dargestellt, wobei der y-Achsenabschnitt der PCR-Zyklenzahl und der x-Achsenabschnitt der logarithmischen Auftragung der Konzentration der einzelnen Proben entspricht (Abb. 3.3).

Die eingesetzte Software (RelQuant 1.01) nimmt eine Effizienz-korrigierte Berechnung vor, so dass eine Reproduzierbarkeit, sowie Kontrolle der die Quantifizierung beeinflussenden Faktoren gewährleistet ist. Die Daten wurden mittels Kalibrator normierter relativer Quantifizierung bearbeitet. Hierfür wurden bei den Standardkurven die gemessenen Werte zwecks Nachweises der Reproduzierbarkeit dreifach bestimmt und anschließend in ein Coefficient File exportiert (s. Abb. 3.4).

Für die Erstellung der Standardkurven der beiden Primerpaare für die 1α -Hydroxylase und für die 24-Hydroxylase wurde cDNA aus 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 vorbehandelten HaCaT-Keratinocyten und SCL-1-Zellen verwendet. Das Amplifikat dieser Primerpaare für die einzelnen Gene wird für die Quantifizierung als Zielgen bezeichnet. Die gleichen cDNAs wurden ebenso für die Herstellung des Kalibrators eingesetzt. Dieser wurde 1:50 verdünnt. Die quantifizierten Proben wurden je nach Konzentration der cDNA in Verdünnungsstufen von 1:5 bis 1:20 eingesetzt. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen $\beta 2$ -Mikroglobulin (Schneider-Stock et al., 2003) ausgewählt.

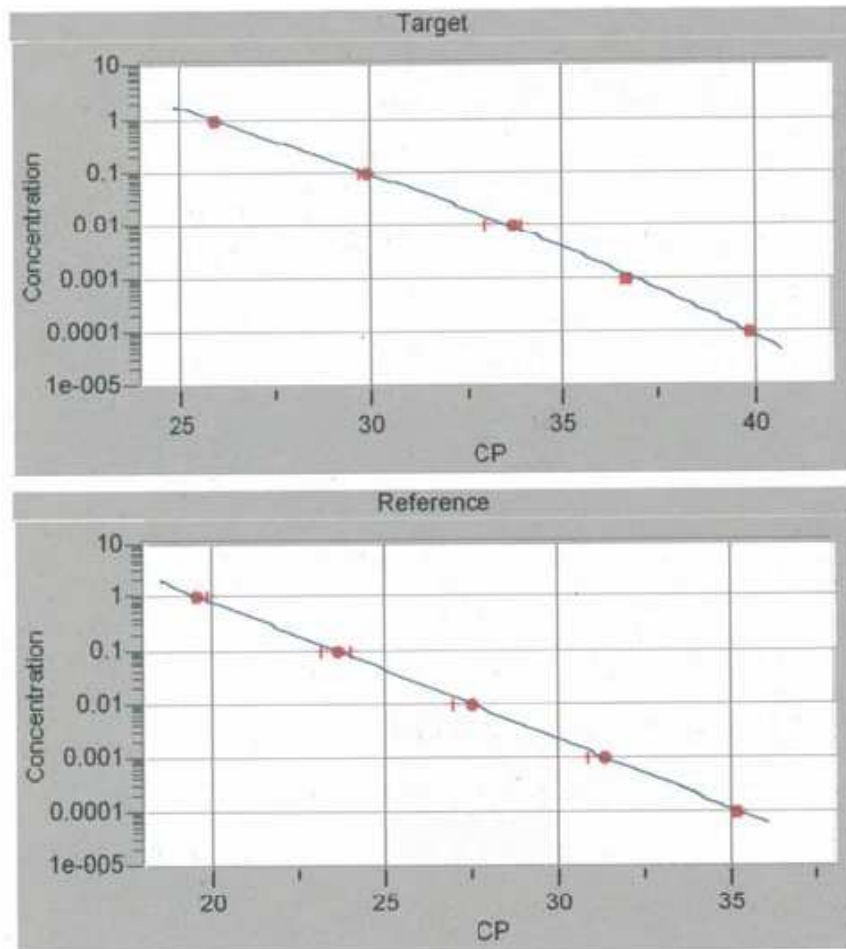


Abb. 3.4 Coefficient File der Standardkurve der 24-Hydroxylase im Abgleich mit der Standardkurve des Haushaltsgenes (β 2-Mikroglobulin) (Quelle: Kindich).

3.3.5 PCR-Bedingungen

Für die PCR-Reaktionen wurde der „Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit“ der Firma Roche benutzt. Es handelt sich hierbei um eine „Hot Start“ Taq DNA Polymerase, die eine erhöhte Spezifität und Sensitivität für PCR-Anwendungen hat. Nicht-spezifische Amplifikationsprodukte werden minimiert. Die FastStart Taq DNA Polymerase ist wegen ihrer hitzelabilen Gruppen, die an einigen ihrer Aminosäuren hängen, bei Raumtemperatur inaktiv. Um sie zu aktivieren, muss die Polymerase für 10min bei 95°C denaturiert werden.

<u>Ablauf der PCR:</u>	40-50 Zyklen	
Aktivierung	95°C	15min
Denaturierung	94°C	15s
Annealing	60°C	20s

Synthese	72°C	15s
Schmelzkurvenanalyse	70°C	15s
	70-99°C	0,1°C/s (bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung)

<u>Reaktionsvolumen:</u>	20µl	
Primer1	2µl	(0,5µM)
Primer2	2µl	(0,5µM)
MgCl ₂ (25mM)	var.	(3mM)
SybrGreenI (2x)	10µl	(1x)
H ₂ O	var.	
cDNA (1:20)	2µl	

Die Primerpaare wurden in einer Endkonzentration von 3mM MgCl₂ eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten mit je einem 20µl Reaktionsvolumen und 10µl QuantiTect SYBRGreen PCR Master Mix (2x), 0,5µM Primer und 2µl cDNA durchgeführt.

3.3.6 Beladungsschema für die Quantifizierung

Um die zu quantifizierenden Proben in der Real-Time PCR einzusetzen, muss ein bestimmtes Pipettierschema eingehalten werden, damit die Software die Daten auslesen kann. Es wurde eine Doppelbestimmung jedes Wertes pro Lauf durchgeführt. Daraus ergab sich folgendes Pipettierschema:

Rotorposition	Probenname
1	Zielgen Kalibrator
2	Replikat Zielgen Kalibrator
3	Referenzgen Kalibrator
4	Replikat Referenzgen Kalibrator
5	Zielgen Probe 1
6	Replikat von Zielgen Probe 1
7	Referenzgen Probe 1
8	Replikat von Referenzgen Probe 1

9	Zielgen Probe 2
10	Replikat von Zielgen Probe 2
11	Referenzgen Probe 2
12	Replikat von Referenzgen Probe 2
13	Zielgen Proben
14	Replikat von Zielgen Probe n
15	Referenzgen Probe n
16	Replikat von Referenzgen Probe n

Nach Einsatz der Proben in der Real-Time PCR wurden die ermittelten Daten mithilfe der Software in einer Textdatei exportiert und in die Quantifizierungssoftware (RelQuant) eingelesen. Anschließend wurden die Dateien in Bezug zu der Standardkurve gesetzt, indem man die exportierte Datei mit dem schon gesicherten Coefficient File verglich. Man erhält eine normalisierte Ratio als Endresultat.

3.4 Behandlung eukaryontischer Zellen in einer monolayer Zellkultur mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Für diesen Versuch wurde die „Ein-Punkt-Behandlung“ ausgewählt. Dazu wurden sowohl die humanen Keratinozyten der Zelllinie HaCaT, als auch die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SCL-1 subkonfluent (5×10^5 (HaCaT) bzw. $7,5 \times 10^5$ (SCL-1) in 10 cm Zellkulturschalen) in 5ml Nährmedium ausgesät und bei 37°C inkubiert. Das Nährmedium bestand aus RPMI 1640 + 1% L-Glutamin (PAA Laboratories). Dem Medium wurden 10% FCS zugefügt, welches neben den erforderlichen Wachstumsfaktoren auch Metabolite für die in Kultur gehaltenen Zellen enthält und somit ein schnelleres Wachstum der Zellen zur Folge hat. Nachdem die Zellen unter diesen Kulturbedingungen an den 10cm Zellkulturschalen angewachsen waren, wurde nach ca. 24h mit der Behandlung begonnen.

Für die Behandlung der Zellen wurde statt des zuvor verwendeten RPMI-Mediums ein BSA-Medium verwendet. Hierbei handelt es sich um ein RPMI-Medium mit 10% FCS- und 1% BSA-Zusatz. Durch die Supplementierung von bovinem Serum-Albumin im Zellkulturmedium kommt es zu einer Amplifikation der Konversion von Vitamin D₃ in die biologisch aktive Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Der maximale Umsatz dieser Reaktion findet bei einer Konzentration von 1% BSA im Kulturmedium statt (Lehmann et al., 2000). Durch den Zusatz von BSA im Medium wird während des Versuchs die maximale Entfaltung der Vitamin D-Wirkung angestrebt. Außerdem verhindert das BSA eine Haftung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ am Plastik der Zellkulturschalen. Zusätzlich wurde dem Nährmedium ein Antibiotikumgemisch aus Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Die Ein-Punkt-Behandlung der Zellen erfolgte mit 1×10^{-7} M 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Das verwendete 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

war in 100%-igem Ethanol zu einer Konzentration von 1×10^{-4} verdünnt. Durch eine weitere Verdünnung um den Faktor 1000 im Kulturmedium ergibt sich eine Endkonzentration von 1×10^{-7} 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Da das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in 100%-igem Ethanol gelöst war, wurde eine Kontrolle durchgeführt. Bei der Kontrolle wurde statt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reines Ethanol zugegeben. So konnte untersucht werden, ob das Ethanol einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen oder die Expression der untersuchten Gene zeigt. Desweiteren erfolgte eine Medium-Kontrolle ohne 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und ohne Ethanol.

Daraus ergibt sich pro 10cm Zellkulturschale folgendes Pipettierschema:

<u>Vitamin D Behandlung:</u>	<u>Ethanol-Kontrolle:</u>	<u>Medium-Kontrolle:</u>
5ml BSA-Medium	5ml BSA-Medium	5ml BSA-Medium
5µl 1×10^{-7} 1,25 (OH) ₂ D ₃	5µl 100 %-iges Ethanol	5µl BSA Medium
50µl P/S	50µl P/S	50µl P/S

Die Ansätze wurden in Glas-Flacons zusammenpipettiert und die Plastikspitzen der Pipetten vor Aufnahme von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ mit BSA gespült, um eine Haftung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ am Plastik zu verhindern. Die Zellen wurden nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C mit unterschiedlichen UVB-Dosen bestrahlt und anschließend geerntet. Bis zur Isolierung der DNA wurden die Zellen bei -70°C gelagert.

3.5 Bestrahlung eukaryontischer Zellen in einer monolayer Zellkultur nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

Um die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf humane Keratinozyten und Plattenepithelkarzinom-Zellen nach UVB-Bestrahlung zu untersuchen, wurden beide Zelllinien nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ mit unterschiedlichen UVB-Dosen bestrahlt.

Hierfür wurde zunächst von den zu bestrahlenden 10cm Zellkulturschalen das Nährmedium abgezogen und die Schalen anschließend 1 x mit ca. 700µl PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und Reste verbrauchten Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden dann unter der Sterilbank mit einer UV-Lampe der Firma Waldmann bestrahlt. Als UVB-Bestrahlungsintensitäten wurden ausgewählt: 0J/cm², 100J/cm², 1000J/cm². Für die 1000J/cm²-Bestrahlung wurde der Versuch

verdoppelt, um trotz des starken Zellzerfalls unter der hohen UVB-Belastung genügend Material für die folgenden Versuche zur Verfügung zu haben. Die gewünschte Bestrahlungszeit ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Bestrahlungszeit}[s] = \frac{\text{Bestrahlungsdosis}[\frac{\text{J}}{\text{cm}^2}] \times 1000}{\text{Intensität}[\frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}]}$$

Die Bestrahlungsdosis wurde anhand eines Dosimeters der Firma Waldmann ermittelt. Unter Berücksichtigung der gewünschten Bestrahlungsintensität, wurde mithilfe oben genannter Formel die nötige Bestrahlungszeit ermittelt. Es empfiehlt sich ein schnelles Arbeiten, um während des Bestrahlungsvorganges ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Nach der UVB-Bestrahlung wurde jeder 10 cm-Zellkulturschale wieder das adäquate Medium zugeführt (Medium + Vitamin D / Medium + Ethanol / reines Medium). Die Zellen wurden anschließend bis zum Ernten bei 37°C inkubiert.

3.6 Ernten von Zellen in einer monolayer Zellkultur

Nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wurden die zu untersuchenden Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet, um den zeitlichen Verlauf der Vitamin D-Wirkung auf die Zellen nach Bestrahlung zu untersuchen. Gewählt wurden folgende Zeitpunkte: 0h (=direkt nach der Bestrahlung), 1h, 3h und 24h nach Bestrahlung der Zellen. Zur Ernte wurde das Zellkulturmedium mit einer Vakuum-Saug-Pumpe vorsichtig entfernt und verworfen. Die Zellen wurden anschließend unter Zuhilfenahme eines Schabers von den 10cm Zellkulturschalen abgelöst und mit 2ml PBS von den Schalen gespült. Die Zellsuspension wurde in 15ml Flacons aufgefangen und 5min bei 1.200U/min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde dann mittels Vakuum-Saug-Pumpe vorsichtig abgezogen. Die Zellen wurden anschließend in 1ml PBS resuspendiert und wiederum für 5min bei 1.200U/min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde auch hier wieder mit der Vakuum-Saug-Pumpe abgezogen. Die Zellen wurden bis zum weiteren Verfahren bei -20°C gelagert.

3.7 DNA-Isolierung aus Zellkultur mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche

Die notwendige DNA wurde mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits zur Isolierung von DNA der Firma Roche gewonnen. Nach der Bindung der DNA an einer Silikon-Gel-Membran, wird die

gebundene DNA mit den mitgelieferten Puffern gewaschen und mit den Elutionspuffern von der Membran eluiert.

Der Versuch wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Das Zellpellet wurde zunächst in 200µl PBS resuspendiert. 200µl „Binding“- Puffer sowie 40µl Proteinase K wurden hinzugefügt. Dieses Gemisch dient der Lyse der Zell- und Kernmembran und ermöglicht so die Freisetzung zellulärer DNA. Nach leichtem Vortexen erfolgte für 10min eine Inkubation bei 70°C auf einem Heizblock. Danach wurden 100µl reines Isopropanol hinzugefügt, die Lösung kurz per Hand geschüttelt und in eine spezielle DNA-Isoliersäule aus dem Kit pipettiert. Die beladene Säule wurde dann für 1min bei 8.000U/min zentrifugiert. Hierbei wurde die DNA an der Silikon-Gel-Membran der Säule absorbiert, und die durch die Membran in das Zentrifugenröhrchen durchgetretene Flüssigkeit wurde verworfen. Im ersten Waschschrift wurden 500µl „Inhibitor Removal“- Puffer auf die Säule pipettiert und diese dann für 1min bei 8.000U/min zentrifugiert. Der Durchsatz wurde wieder verworfen. Nach Zufügen von 500µl der zweiten Waschlösung „Wash“- Puffer wurde erneut für 1min bei 8.000U/min zentrifugiert und anschließend das Auffanggefäß gewechselt. Durch die darauffolgende 10-sekündige Zentrifugierung bei 13.000U/min wurde der restliche Alkohol aus der DNA entfernt. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säule anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Letztlich wurden zur Elution der DNA 200µl des auf 70°C vorgewärmten „Elution“- Puffers in die Säule pipettiert. Durch eine anschließende 1-minütige Zentrifugierung wurde das erste DNA-Eluat gewonnen. Der Durchsatz wurde dann erneut auf die Säule gegeben und die Probe nochmals bei 8.000U/min für 1min zentrifugiert und so das zweite DNA-Eluat gewonnen, welches in der Regel einen geringeren DNA-Gehalt als das erste Eluat besitzt. Die Säule wurde nach der Elution verworfen.

3.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mittels Absorptionsspektroskopie lassen sich die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren bestimmen. Nukleinsäuren besitzen in Lösung ein Absorptionsmaximum im ultravioletten Licht bei 260nm. Dies ist auf die Spektraleigenschaften der in den Nukleinsäuren enthaltenen Basen zurückzuführen. Für dsDNA entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260nm einer Konzentration von 50µg/ml. Für RNA oder ssDNA entspricht eine optische Dichte von 1 bei 260nm einer Konzentration von 37µg/ml und für kurzkettige Oligonukleotide entspricht dieser Wert 20µg/ml. Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäureproben lässt sich am Quotient der Absorptionswerte bei 260nm und 280nm erkennen. Bei sauberen DNA-Lösungen liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 1,95. Bei sauberen RNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte lassen auf

Verunreinigungen durch Phenol oder Proteine schließen. Werte über 2,0 erhält man bei denaturierter DNA oder DNA, die mit RNA verunreinigt ist.

Die hier durchgeführten Konzentrationsbestimmungen der DNA wurden mit dem Photometer Ultrospec 1000 der Firma Biotech durchgeführt. Die Proben wurden hierzu in destilliertem Wasser 1:50 verdünnt.

3.9 Dot Blot

3.9.1 Durchführung des Dot Blots

Kurzwelliges UV-Licht induziert DNA- Intrastrang -Vernetzungen zwischen benachbarten Pyrimidin-Basen. Die typischen UVB-induzierten DNA-Schäden sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und 4-6 Photoprodukte (4-6PP). Diese Art von DNA-Schäden werden durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben (Moné et al., 2001). Die Anzahl an CPDs in der DNA steigt unmittelbar nach UVB-Bestrahlung an, nimmt allerdings innerhalb von 24h wieder konstant ab, da die Schäden durch NER behoben werden (Yarosh et al., 2005).

Mit der Dot-Blot-Analyse kann man schnell und einfach ein Antigen an eine Nitrozellulose-Membran absorbieren und nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Dot-Blot zum Nachweis von Thymidin-Dimer-Antigenen verwendet. Um mittels Dot-Blot-Analyse das Ausmaß der DNA-Schädigung nach UVB-Bestrahlung zu erfassen, d.h. in diesem Fall den Anteil an Thymidin-Dimeren in der DNA zu quantifizieren, wurden je 2 µl der isolierten DNA auf die Dot-Blot-Apparatur aufgetragen. Mit Hilfe eines anti-Thymidin-Dimer-Antikörpers (Kamiya Biomedical Company) wurde anschließend der Anteil an Thymidin-Dimeren wie bei einem Western-Blot detektiert. Mit Hilfe der photometrisch bestimmten Extinktionen der isolierten Nukleinsäuren wurde vor Durchführung des Versuchs anhand folgender Formel der DNA-Gehalt der einzelnen Proben ausgerechnet:

$$DNA - \text{Gehalt der Probe } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{Extinktion bei } 260\text{nm} \times \text{VF} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml})/1000$$

Hieraus wurde die benötigte Menge an Probe abgeleitet, in der genau 2µg DNA enthalten sind. Das berechnete Volumen an Probe wurde mit autoklaviertem Wasser auf 10µl aufgefüllt, 30µl Denaturierungspuffer zugefügt und durch Auf- und Abziehen in der Pipettenspitze gemischt. Nach

leichtem Vortexen wurde der Probenmix auf die Dot Blot-Apparatur aufgetragen. Abbildung 3.5 zeigt den schematischen Aufbau des Dot Blot-Geräts.

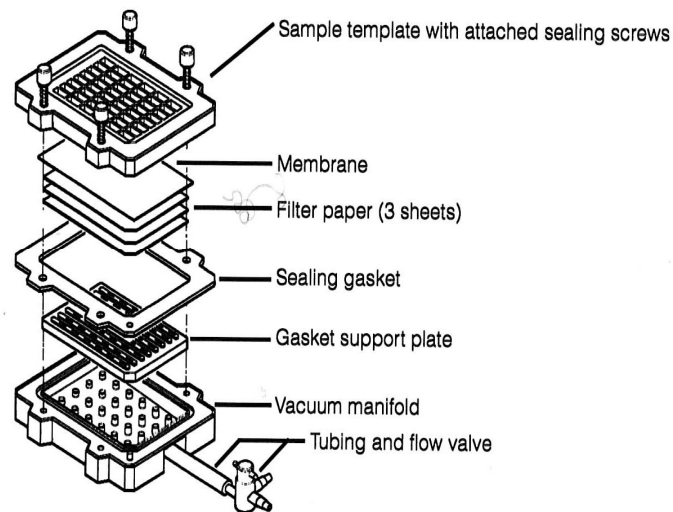


Abb.3.5 Aufbau der Dot Blot Apparatur (Quelle: Bio Rad)

Der Dichtungsring wurde vor Durchführung des Versuchs angefeuchtet und die Apparatur vor dem Auftragen der Proben mit Wasser gespült. Durch Anlegen von Unterdruck mittels Vakuumsaugpumpe wurde die DNA an eine Nitrozellulose-Membran (Roche) adsorbiert. Nachdem die Proben auf diese Weise durch die Membran durchgezogen waren, wurden auf jeden Dot 100µl Neutralisationspuffer pipettiert und ebenfalls mittels Unterdruck durch die Membran gezogen. Die Membran wurde anschließend vorsichtig mit einer Pinzette aus der Dot-Blot-Apparatur entfernt und im Ofen (Heraeus) 15min bei 80°C gebacken. Da die normalerweise durchgeführte Quervernetzung der DNA auf der Membran mit UVB-Licht durchgeführt würde und wir dies aufgrund unseres Versuchsaufbaus vermeiden wollten, wurde die Nitrozellulose-Membran in unserem Fall gebacken. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten für 1h in 2% Blocking Reagenz in TBST inkubiert. Danach wurden 10µl Erstantikörper (=Antithymidindimer-AK) in 5ml 2%-igem Blocking Reagenz in TBST gelöst (Verdünnung 1:500) und die Membran eingeschweißt über Nacht auf dem Rollschüttler darin inkubiert. Dann wurde 3 x 5min mit TBST gewaschen. Ein Nachweis des gebundenen Antikörpers erfolgte durch anti-Maus IgG-Peroxidase-Konjugat (Sekundäntikörper), welches den anti-Thymidin-Dimer-AK erkennt. Der Sekundäntikörper (goat-anti-mouse IgG, Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 2%-igem Blocking Reagenz in TBST für 1h auf dem Rollschüttler inkubiert und anschließend erneut 3 x 5min mit TBST gewaschen. Die Bindung des Sekundäntikörpers wurde mit der Methode der „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) nachgewiesen.

3.9.2 Peroxidase-Nachweis über Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Die „Enhanced Chemiluminescence“ wurde als sehr sensitiver Nachweis der an Antikörper gekoppelten Peroxidase entwickelt. Unter alkalischen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol durch H_2O_2 , wodurch Luminol kurzzeitig zur Lichtemission (Chemilumineszenz) veranlasst wird. Die Lichtemission wird durch Phenole verstärkt und erreicht 5-20min nach Reaktionsstart ihr Maximum. Die Halbwertszeit beträgt etwa 1h.

Die Nitrozellulose-Membran wurde in einer Lösung aus 1:1 ECL Western blotting detection Reagenz 1 und 2 luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und 5min inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in einer Dunkelkammer auf einen photographischen Film gelegt (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche) und dieser für zunächst 30s, 1min, dann 5min und wenn nötig nochmal für eine halbe oder eine ganze Stunde exponiert und die Filme entwickelt (Entwickler und Fixierer, Kodak).

3.9.3 Auswertung des Dot Blots

Zur Auswertung wurden die Blots mit einem Scanner eingelesen. Die Quantifizierung der einzelnen Dots erfolgte densidometrisch über die *Image J analysis software 1.36*. Zunächst wurden die Dots durch möglichst genaues Umranden markiert. Ausgewertet wird jeweils eine ganze Spalte des Blots. Das Programm überführt die Dots unterschiedlicher Dichte in eine zweidimensionale Graphik (s. Abb. 3.6). Diese repräsentiert die Pixelstärke der Dots. Der x-Achsenabschnitt entspricht dem Durchmesser des Dots und der y-Achsenabschnitt steht für dessen Pixelstärke. Die Zahlen geben die jeweilige Größe des Dots als prozentualen Anteil an der Gesamtgröße aller Dots an.

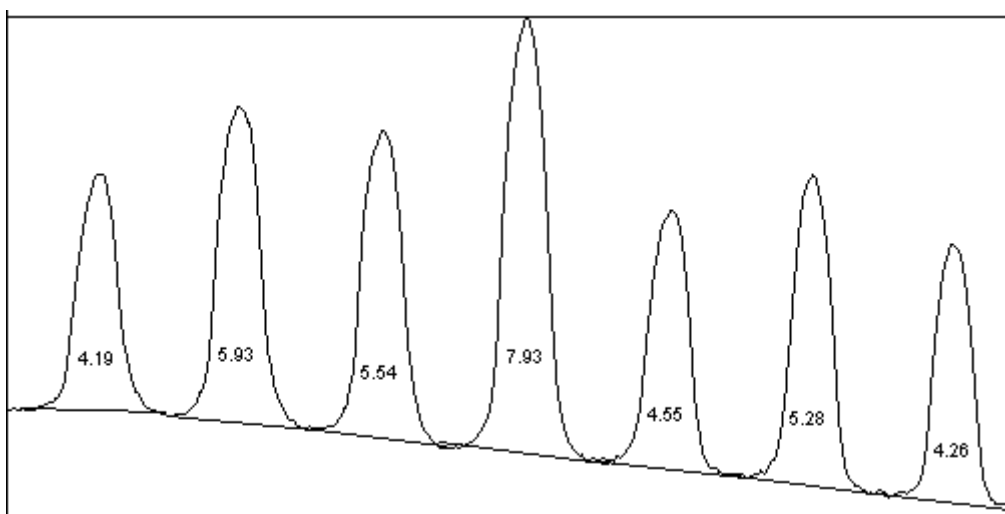


Abb.3.6 Auswertung des Dot Blots mittels *Image J analysis software* (Quelle: *Image J analysis software*)

Die *Image J analysis software* berechnet anschließend das Integral (AUC = Area Under the Curve) jeder einzelnen Kurve. Diese Werte wurden in das Programm Microsoft Excel überführt. Da die AUC proportional zur Anzahl an Thymidindimeren ist, lässt sich auf diese Weise die Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die bestrahlten Zellen quantifizieren. Wichtig ist, vor der Bestimmung der AUC eine Nulllinie zu definieren, indem man manuell die Ursprünge der Kurven verbindet (s. Abb. 3.6). Auf diese Weise wird eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Hintergrunddichte minimiert.

3.9.4 Reagenzien

Denaturierungs-puffer:

1,5M NaCl 21,9g

0,5M NaOH 5,0 g

Mit destilliertem Wasser auf 250ml auffüllen

Neutrlisations-Puffer:

1,0M Tris 30,275g

2,0M NaCl 29,0g

Mit destilliertem Wasser auf 250ml auffüllen

pH = 5,0

Blocking Reagenz:

50g

Art.- Nr.: 1.096.176

Firma: Roche

TBST:

TBS 20x, pH = 8,0

0,05% Tween

Nitrozellulosemembranen, positiv geladen:

30cm x 3m, 1 Rolle

Art.- Nr.: 1209299

Firma: Roche

Anti-Thymidin-Dimer-AK:

100µg

Art.- Nr.: MC-062

Firma: Kamiya Biomedical Company

Goat-anti –Maus IgG-Peroxidase-Konjugat:

20µl

Art.-Nr.: A3682

Firma: Sigma

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate:

500ml/Kit

Art.-Nr.: 34080

Firma: Pierce (über Perbio Science Deutschland GmbH)

3.10 Colony-Forming-Unit-Culture-Assay (CFUc-Assay)

3.10.1 Durchführung des CFUc-Assays

Es ist seit langer Zeit bekannt und durch viele wissenschaftliche Arbeiten bewiesen, dass der aktive Metabolit des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, durch seine Interaktion mit dem Vitamin D Rezeptor (VDR) die Differenzierung humaner epithelialer Keratinozyten fördert, ihre Proliferation jedoch hemmt (Hawker et al., 2007). Desweiteren wird postuliert, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nach UVB-Bestrahlung die Ausbildung von CPDs hemmt und somit den DNA-Schaden reduziert (De Haes et al., 2005). Um herauszufinden, inwieweit der antiproliferative Effekt des Vitamin D seinem protektiven Effekt gegen UV-induzierte DNA-Schäden unterliegt, wurde sowohl mit humanen

Keratinocyten der Zelllinie HaCaT als auch mit Plattenepithelkarzinom-Zellen der Zelllinie SCL-1, nach 48-stündiger Vorbehandlung mit Vitamin D und nach UVB-Bestrahlung, ein CFUc-Assay durchgeführt.

Zur Durchführung des Versuchs wurden HaCaT- und SCL-1-Zellen in 10cm Zellkulturschalen ausgesät. Von der HaCaT-Linie wurden je 2000 Zellen/Schale in 5ml Medium ausgesät, während die langsamer proliferierenden SCL-1-Zellen in einer Anzahl von 5000/Schale in das Medium der Zellkulturschalen pipettiert wurden. Die Zellen wurden wie oben beschrieben 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelt (s. Abschnitt 3.4) und anschließend bestrahlt (s. Abschnitt 3.5). Als Bestrahlungsintensitäten wurden hier ausgewählt: 0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm². Auch hier erfolgten pro Bestrahlungswert je eine Ethanol- und eine Medium-Kontrolle. Die einzelnen Versuche wurden als Doppelbestimmung vorbereitet und jeweils 2mal durchgeführt (d.h. 2mal CFUc- Assay mit HaCaT als Doppelbestimmung angesetzt und 2mal CFUc- Assay mit SCL-1 als Doppelbestimmung angesetzt, insgesamt 4 Versuche jeweils mit Doppelbestimmung). Nach der Bestrahlung der Zellen wurden diese bei 37°C und 5% CO₂ für 7 Tage im Brutschrank inkubiert. Das Nährmedium in den Zellkulturschalen wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

3.10.2 Auswertung des CFUc-Assays mittels Kristallviolett- Färbung

Nach 7 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die auf den 10cm Zellkulturschalen gewachsenen Kolonien mittels Kristallviolett-Färbung sichtbar gemacht und mit bloßem Auge unter einer Vergrößerungs-Lampe ausgezählt.

Zur Färbung der an den 10cm Zellkulturschalen festgewachsenen Zellen, wurde in einem ersten Schritt das Nährmedium abgezogen und die Petrischalen 2mal mit 3ml kaltem PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden anschließend 5ml 70%-igen Ethanols in die Zellkulturschalen gegeben und für mindestens 30min (möglich sind aber auch 24-48h) bei 4°C inkubiert. Nach Abziehen des Ethanols wurden die Zellen für 30min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in Kristallviolett- Lösung inkubiert. Bei der verwendeten Kristallviolett-Lösung handelt es sich um eine in 20%-igem Ethanol 10x verdünnte Stammlösung. Die Stammlösung selbst besteht aus 1% Kristallviolett, 20% Ethanol und Wasser mit einem Endvolumen von 100ml. Die Färbelösung wurde anschließend mit Wasser von den Zellkulturschalen abgewaschen, bis das Wasser seine klare Farbe wiedererlangt hatte. Wichtig ist, die Schalen danach gut zu trocknen, z.B. über Nacht kopfüber auf Zellstoff. Anschließend ist ein Auszählen der gefärbten Kolonien unter der Vergrößerungs-Lampe möglich. Hierzu wurden die 10cm-Schalen in Quadranten eingeteilt und jeder Quadrant einzeln ausgezählt, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten.

3.11 H2AX-Immunfluoreszenz

Auf zellulärer Ebene gilt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) als entscheidende Läsion nach ionisierender Strahlung. Nach Entstehung eines DSBs werden zu beiden Seiten der Bruchstelle H2AX-Histone im C-Terminus phosphoryliert ($\Rightarrow \gamma\text{-H2AX}$), die sich immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisen lassen (Kühne et al., 2005). Hierbei werden auftretende DNA-Schäden mit fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen, wodurch einzelne DSBs sichtbar gemacht werden. Dies erfolgt, indem man diese Histonphosphorylierungen mit $\gamma\text{-H2AX}$ -spezifischen Antikörpern anfärbt. Man erhält für jeden DSB einen grünen Punkt (Focus), so dass die Induktion und Reparatur von DSBs über das „Abzählen“ dieser Foci gemessen werden kann.

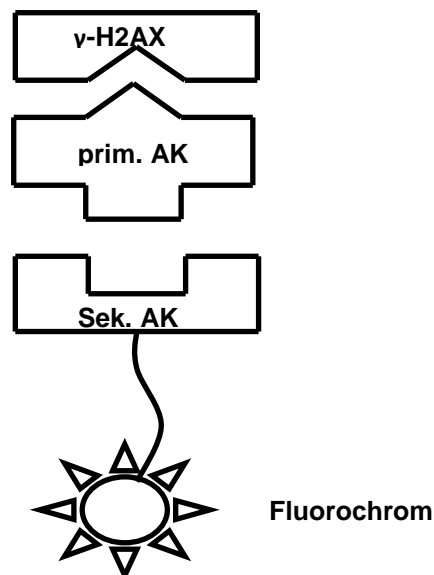


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von DSBs.

Auf diese Weise können strahleninduziert DSBs nach Applikation unterschiedlicher Strahlendosen in vivo quantifiziert werden. Mit diesem Verfahren lässt sich somit der individuelle, zeitliche Verlauf der Reparatur von DSBs nach Strahlenexposition ermitteln (Kühne et al., 2005).

In diesem Versuch wurden die Effekte des biologisch aktiven Vitamin D Metaboliten, 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 , auf die Phosphorylierung von $\gamma\text{-H2AX}$ untersucht, d.h. die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 im Rahmen von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung. Der Versuch wurde an nicht-malignen humanen Keratinozyten durchgeführt (HaCaT). Als Bestrahlungseinheiten wurden ausgewählt: 0Gy (=unbestrahlt), 1Gy, 2Gy und 5Gy. Die Markierung der $\gamma\text{-H2AX}$ -Foci mittels Fluoreszenzfarbstoff erfolgte jeweils 30min, 2h, 6h und 12h nach Bestrahlung der Zellen. Es erfolgte jeweils eine Ethanol- und eine Medium-Kontrolle.

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden je 70.000 Zellen in 2ml RPMI-Medium ausgesät. Zur Zellkultur wurden 3cm Zellkulturschalen ausgewählt, in die jeweils ein Deckgläschen hineingelegt wurde. Um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen auf dem Deckglas zu erreichen, wurde die Zellsuspension erst mit dem Medium vermischt, bevor das Gemisch dann in die mit Deckgläschen bestückten Zellkulturschalen gegeben wurde. Nachdem die Zellen unter diesen Kulturbedingungen angewachsen waren (nach ca. 24h) wurde das RPMI-Medium durch ein RPMI + 1% BSA-Medium ersetzt und die Zellen wie oben beschrieben mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt (s. Abschnitt 3.4). Die Bestrahlung der Zellen erfolgte nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nach dem gleichen Prinzip wie die oben beschriebene UVB-Bestrahlung (s. Abschnitt 3.5), mit dem Unterschied, dass anstelle der UV-Lampe zur Bestrahlung ein Röntgenbestrahlungsgerät eingesetzt wurde.

Nach der Bestrahlung erfolgte nach den oben ausgewählten Zeitpunkten die Markierung der γ -H2AX-Foci mittels Fluoreszenzfarbstoff. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Medium von den 3cm Zellkulturschalen abgesaugt und anschließend, zur Fixierung der Zellen auf dem Deckglas, nach Zugabe von 1ml Formaldehyd + PBS für 15min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung mit der Pipette abgenommen, 1ml PBS zugegeben, und für 10min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3mal durchgeführt. Die auf den Objektträgern immobilisierten und fixierten Zellen wurden dann durch Zugabe von 1ml auf Eis vorgekühlten Triton-X-PBS durch 5-minütige Inkubation auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurde nochmals 3fach gewaschen, diesmal mit 1ml PBS-FCS. Pro Waschschrift wurde auch hier wieder 10min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen innerhalb der Zellen bzw. Zellkerne abzusättigen, wurden die Präparate anschließend mit einer Block-Lösung, bestehend aus PBS + 5% FCS + 0,02% Triton-X-100 (insgesamt 1ml pro Schälchen) 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken wurde der primäre Antikörper (anti- γ -H2AX-AK) 1:200 in PBS-FCS verdünnt, je 20 μ l auf die Deckgläschen pipettiert, und bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtekammer für 1h inkubiert. Die Objektträger wurden nachfolgend 3 x 10min bei Raumtemperatur mit je 1ml PBS-FCS gewaschen, bevor die Präparate mit dem Sekundäantikörper (Alexa Fluor® 488 goat-anti-mouse IgG, Invitrogen), 1:500 in PBS-FCS verdünnt, eine Stunde bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtekammer inkubiert wurden. Es wurden pro Deckglas 25 μ l Sekundäantikörper verwendet. Anschließend wurden die Präparate erneut 3 x 10min bei Raumtemperatur mit je 1ml PBS-FCS gewaschen. Es schloss sich eine Kernfärbung mit DAPI an (3 μ l DAPI (Konzentration 500 μ g/ml) in 1ml Mounting Medium). Die Deckgläser wurden mit je 3 μ l Eindeckmedium (Mounting Medium + DAPI-Zusatz) auf den Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C getrocknet und die Ränder der Deckgläschen wurden am nächsten Tag mit handelsüblichem, farblosem Nagellack versiegelt, um ein seitliches Austreten des Eindeckmediums zu verhindern. Anschließend wurden die Präparate unter einem

Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=493$ nm (für γ -H2AX) und $\lambda=352$ nm (für DAPI) und im Durchlicht, sowie unter einem konfokalen Lasermikroskop betrachtet und fotografiert. Die einzelnen Foci wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (s. Abbildung 3.8).

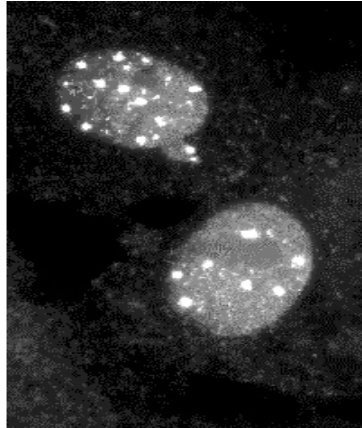


Abb. 3.8 Nachweis von DSBs durch IF-Mikroskopie mit γ -H2AX-spezifischen Antikörpern. Die hellen Punkte (Foci) stellen hierbei die DSBs dar (Quelle: Löbrich).

Lösungen:

2% Formaldehyd in PBS:

0,2% Triton-X-100 in PBS:

1% FCS in PBS:

RPMI-Medium

1,6ml 37% Formaldehyd + 28,4ml PBS

60 μ l Triton-X-100 in 300ml PBS-FCS

5ml FCS 495ml PBS

RPMI + 10% FCS + 1% Glutamin

3.12 WST- Stoffwechselaktivitätstests

3.12.1 Prinzip des WST- Stoffwechselaktivitätstests

Der WST-Stoffwechselaktivitätstest beruht auf der Umwandlung des extern zugeführten Tetrazoliumsalzes WST-1 zu einer Formazan-Verbindung. Diese Reaktion wird durch die mitochondriale Dehydrogenase stoffwechselaktiver Zellen vermittelt. WST-1 wird durch das „Succinat Tetrazolium Reduktase“- System, das zur Atmungskette von Mitochondrien gehört, umgesetzt. Dieses System ist nur in lebenden Zellen aktiv. Im Gegensatz zum Tetrazolium-Salz absorbiert die Formazan-Verbindung kurzwelliges Licht im Bereich von 350nm bis 500nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 450nm liegt. Durch die Umwandlung von WST-1 zu Formazan kommt es daher zu einer Farbänderung von rot zu gelb. Je mehr lebende Zellen vorhanden sind, desto stärker ist die Gelbfärbung, da mehr WST-1 verstoffwechselt wird. Die Farbstoffmenge kann daher direkt mit

der Zahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen korreliert werden. Das Ausmaß der Umwandlung von WST-1 zu Formazan wird durch Absorptionsbestimmung im Elisa-Reader erfasst.

3.12.2 Durchführung des WST-Stoffwechselaktivitätstests

Aussäen der Zellen:

HaCaT- und SCL-1-Zellen wurden zunächst in 96well-Platten ausgesät (3×10^3 Zellen in $100\mu\text{l}$ RPMI + 10% FCS-Medium/Well) und 24h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Belegung der 96well-Platte erfolgte nach folgender Schablone:

Die jeweils äußeren Wells jeder Platte wurden mit PBS gefüllt, ebenso die Wells, welche nicht mit Zellen bestückt wurden. Dies garantiert ein gleichmäßiges Klima in der 96well-Platte. Jeder Versuch wurde in Triplets angesetzt, d.h. jeweils 3 Wells der gleichen Farbe wurden mit dem gleichen Reagenz behandelt. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten wurden 6fach-Bestimmungen durchgeführt.

Behandlung:

Nachdem die Zellen am Boden der 96well-Platten angewachsen waren, erfolgte nach oben beschriebenem Schema (s. Abschnitt 3.4) die Vitamin D-Behandlung. Das in reinem Ethanol zu einer Konzentration von 10^{-4} verdünnte 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 , sowie das reine Ethanol selbst (Kontrolle), wurden in BSA -Medium (=RPMI + 10%FCS + 1%BSA) 1:1000 verdünnt und jeweils ein Volumen von $100\mu\text{l}$ in die Wells pipettiert. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen beschrieben, erfolgte auch hier eine Medium-Kontrolle ohne 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 und ohne Ethanol-Zugabe.

Bestrahlung:

Nach 48-stündiger Vorbehandlung mit Vitamin D wurden die 96well-Platten wie zuvor beschrieben sowohl mittels UV-Lampe (s. Abschnitt 3.5) als auch mittels Röntgenbestrahlungsgerät (Abschnitt

3.11) bestrahlt. Als UVB-Bestrahlungsintensitäten wurden ausgewählt: $0\text{J}/\text{cm}^2$, $100\text{J}/\text{cm}^2$, $500\text{J}/\text{cm}^2$, $800\text{J}/\text{cm}^2$ und $1000\text{J}/\text{cm}^2$. Die IR-Dosen betragen: 0Gy , 1Gy , 2Gy und 5Gy . Nach den jeweiligen Versuchszeiträumen (hier 0h , 6h , 12h , 24h und 48h nach Bestrahlung) wurde die Absorption der einzelnen Proben auf den 96well-Platten bei 450nm im Elisa-Reader gemessen.

Messung im Elisa-Reader:

Pro Well wurden $10\mu\text{l}$ WST-1-Reagenz auf $100\mu\text{l}$ Medium gegeben. Die erste Messung erfolgte nach einer Minute Schütteln bei mittlerer Intensität bei 450nm im Elisa-Reader (0h -Wert). Die weiteren Messungen erfolgten, für jede 96well-Platte und für jeden Versuchszeitpunkt nach Bestrahlung, jeweils 1h , 2h , 3h und 4h nach Zugabe des WST-1-Reagenz. Die Auswertung erfolgte im Microsoft Excel-Programm.

3.13 Kristallviolett-Proliferationstest

3.13.1 Prinzip des Kristallviolett-Proliferationstests

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Testmodell wurde von Gillies et al. 1986 zum ersten Mal beschreiben. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen Zellkulturtest, bei dem die antiproliferative Wirkung einer Substanz über die veränderte Zellmasse, die der Zellmenge proportional ist, in Monolayer-Kulturen mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt wird. Kristallviolett bindet v.a. an DNA-assoziierte Nukleoproteine, so dass mittels Spektrometer die Anzahl der gefärbten Zellen einer Monolayer-Schicht bestimmt werden kann. Gemessen wird die optische Dichte bei 550nm bzw. das chromatingebundene Kristallviolett, das sich mit 70% -igem Ethanol extrahieren lässt.

In diesem Versuch wurden sowohl maligne als auch nicht maligne humane Keratinozyten (SCL-1- und HaCaT-Zellen) 48h mit $1,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ vorbehandelt und anschließend mit $0\text{J}/\text{cm}^2$, $100\text{J}/\text{cm}^2$, $500\text{J}/\text{cm}^2$, $800\text{J}/\text{cm}^2$, oder $1000\text{J}/\text{cm}^2$ unter einer UVB-Lampe bestrahlt. Die IR-Bestrahlungsdosen betragen 0Gy , 1Gy , 2Gy und 5Gy . Zellen, die durch Behandlung mit $1,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$, IR oder UVB-Bestrahlung sterben, lösen sich von der Platte ab, während Zellen, die noch leben, sich mit Kristallviolett anfärben lassen. Der Kristallviolett-Assay erlaubt also Aussagen über die Vitalität und die Proliferation einer Zellkultur, denn nur lebensfähige Zellen nehmen den Farbstoff an.

3.13.2 Durchführung des Kristallviolett-Proliferationstests

Aussäen, Behandeln und Bestrahlen der Zellen erfolgte auf die gleiche Art wie im WST-Assay (s. Abschnitt 3.12.2).

Kristallviolett-Färbung:

Hierzu wurden die Zellen, nach Abkippen des Mediums von den 96well-Zellkulturplatten, 2mal mit 200µl kaltem PBS/well gewaschen. Auf diese Weise wurden abgestorbene Zellen und Mediumreste entfernt. Anschließend wurden zur Fixierung der angewachsenen Zellen je 150µl 70 %-igen Ethanol in die Wells pipettiert. Die Platten konnten nun für 30min (möglich sind aber auch 24-48h) bei 4°C gelagert werden. Zur Färbung wurde das Ethanol gegen 100µl einer 0,1%-igen Kristallviolettlösung ausgetauscht und 30min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach genau 30min wurde die Farblösung abgeschüttet, es folgten mehrere Waschschrte mit entionisiertem Wasser zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Platten über Nacht kopfüber auf Zellstoff getrocknet. Um bei der nachfolgenden photometrischen Messung Streulichteffekte zu vermeiden, wurde das v.a. an Nukleoproteine bindende Kristallviolett durch Zugabe von 200µl 70%-igen Ethanol und anschließende Inkubation für mind. 30min auf dem Schüttler wieder in Lösung gebracht. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 550nm in einem Plattenlesegerät (Titertek Multiskan Plus) und die Auswertung durch das Microsoft Excel-Programm.

3.14 Zellkultur

3.14.1 Ausgewählte Zelllinien

HaCaT:

Die HaCaT-Zelllinie stammt aus humanen, nicht malignen Keratinozyten (=Normalhaut, spontan immortalisiert). Sie unterliegt einer festen Zellteilung mit einem konstanten Teilungszyklus nach 7 Tagen. Diese unsterbliche Zelllinie ist gut charakterisiert und wird auf Grund ihrer erhaltenen Differenzierungsfähigkeit regelmäßig in wissenschaftlichen Versuchen als ein Modell der humanen Keratinozyten in vitro verwendet. Im Gegensatz zu normalen Keratinozyten wachsen die HaCaT-Zellen in konventioneller Kultur, d.h. ohne organotypische Co-Kulturbedingungen mit z.B. Fibroblasten. Aus dem Ursprung der Zellen und den ursprünglichen Kulturbedingungen leitet sich der Name ab: *Human adult skin keratinocytes, low Calcium (0,2mM), high Temperature (38,5°C)*.

SCL-1:

SCL-1 sind wenig differenzierte Zellen eines humanen Plattenepithelkarzinoms (Boukamp et al., 1982).

3.14.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen in einer Monolayer-Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt (Heraeus Laminair). Die Zellkulturen wurden in einem CO₂-begasteten Brutschrank (5% CO₂) bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und kultiviert. Zur Aufzucht der Zellen wurden 10 cm Zellkulturschalen gewählt (Greiner Bio-one). Als Nährmedium diente RPMI 1640 (PAA Laboratories). Zur normalen Kultivierung der Zellen wurde dem Medium 10% hitzeinaktiviertes FCS (foetal calf serum, Firma PAA) zugesetzt. Die Inaktivierung des FCS erfolgte durch 20-minütige Inkubation bei 55°C. Zur Vitamin D₃-Behandlung wurde ein anderes Medium ausgewählt (s. Abschnitt 3.4). Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel alle 2-3 Tage.

3.14.3 Passagieren der Zellen

Eine Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90%. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit 5ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. 700µl Trypsin zugegeben. Dieses meist aus dem Verdauungstrakt von Rindern gewonnene Enzym spaltet ohne besondere Spezifität alle Proteine, darunter auch jene, mit denen die Zelle an ihr Substrat bindet. Mit fortschreitender Verdauung verliert die Zelle deshalb ihre Adhäsion, rundet sich ab, bis sie schließlich durch Klopfen an die Zellkultur-Platte in Suspension übergeht. Die Zellkulturschalen wurden bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Unterlage gelöst hatten. Die abgelösten Zellen erscheinen im Hellfeldmikroskop kugelförmig. In neuen 10cm Zellkulturschalen wurde jeweils 5ml frisches Medium gegeben und die abgelösten Zellen wurden auf diese verteilt. Durch das im Medium zugesetzte FCS und die Inkubation bei 37°C wird das Trypsin inaktiviert.

3.14.4 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurden die Zellen zunächst wie unter 3.14.3 beschrieben in Einzelzellsuspension gebracht. 50µl Zellsuspension wurden mit 50µl einer Trypanblau-Lösung versetzt (Trypanblau: NaCl im Verhältnis 4:1) und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (0,1mm x 0,0025mm pro Kleinstquadrat) durch Auszählen von mindestens vier Großquadranten bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Anzahl der Zellen/Quadrat x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴

3.14.5 Einfrieren von Zellen

90% konfluente Zellen wurden zum Einfrieren wie unter 3.14.3. beschrieben trypsinisiert. Nach Aufnahme in 10ml Medium wurden die Zellen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugieren für 5min bei 3.000U/min pelletiert. Das Pellet wurde in 90% Kulturmedium + 10% DMSO resuspendiert und in ein für das Einfrieren von Zellen spezielles Gefäß (Kryogefäß) überführt. DMSO verhindert, dass sich bei -70°C Eiskristalle bilden, welche die Zellen schädigen würden. Zur stufenlosen Reduktion der Temperatur beim Einfrieren dient ein mit Isopropanol gefüllter Einfrierbehälter, in den die Kryogefäße gestellt wurden. Das Einfrieren erfolgte über Nacht bei -70°C. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und bei -196°C gelagert.

3.14.6 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 20ml Vollmedium aufgenommen und resuspendiert. Da DMSO nicht nur als Frostschutzmittel dient, sondern bei Raumtemperatur auch ein wirksames Zellgift darstellt, muss bei diesem Schritt schnell gearbeitet werden, damit die Zelle hierbei keinen Schaden nimmt. Zur Entfernung des DMSO-haltigen Einfriermediums wurden die Zellen 5min bei 1.200U/min zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden in 4ml Vollmedium resuspendiert und je 2ml in eine 10cm Zellkulturschale gegeben. Nach einer Inkubation von 24h erfolgte ein Mediumwechsel.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 Zellproliferationsassays durchgeführt.

Es wurden sowohl die Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als auch die Wirkung von UVB- und ionisierender Strahlung untersucht. Aus didaktischen Gründen werden die Ergebnisse im Folgenden nacheinander dargestellt. Zu beachten ist, dass die angegebenen Zeitwerte sich auf den jeweiligen Zeitpunkt nach Bestrahlung beziehen und dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (bzw. Ethanol) vorbehandelt sind. Die unbestrahlten Kontrollen wurden zu den angegebenen Bestrahlungszeitpunkten genauso wie die zu bestrahlenden Zellen aus dem Brutschrank entfernt und das Medium wurde gewechselt, es erfolgte jedoch keine Bestrahlung („simulierte Bestrahlung“).

Im Colony-Forming-Unit-culture-Assay (CFUc-Assay) wurden 2 Zelllinien (spontan immortalisierte HaCaT-Keratinocyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen SCL-1) in 10cm Zellkulturschalen über 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelt und anschließend mit UVB folgender Bestrahlungsintensitäten bestrahlt: 0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm². Um einen Zusammenhang zwischen dem Wachstumsverhalten der Zellen und der Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu untersuchen, wurden je 2x2 (die Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt) mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelte 10 cm Zellkulturschalen mit jeweils der gleichen Anzahl an Ethanol- bzw. Medium-behandelten Zellen verglichen (Material und Methoden, Kapitel 3.10).

Im WST-1-Assay wurden humane Keratinocyten (HaCaT) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) 48h vor Bestrahlung mit UVB oder ionisierender Strahlung (IR) mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelt. Die Effekte auf das Wachstumsverhalten bzw. auf die Zellvitalität wurden mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays (WST-1-Assay) analysiert, in dessen Rahmen die Stoffwechselaktivität über die Bestimmung des NADH-Gehaltes der Zellen untersucht wurde (Material und Methoden, Kapitel 3.12).

Im Rahmen des Kristallviolett-Assays wurden humane Keratinozyten (HaCaT) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) 48h vor Bestrahlung mit UVB oder ionisierender Strahlung (IR) mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelt. Die Effekte auf das Wachstumsverhalten wurden mit Hilfe einer photometrisch semiquantitativ auszuwertenden Vitalfärbung (Kristallviolett-Färbung, CV) analysiert, die mit der Zahl vitaler Zellen korreliert (Material und Methoden, Kapitel 3.13).

4.1.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinozyten

4.1.1.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinozyten im CFUc-Assay

Nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen wurden die wie oben beschrieben behandelten und mit UVB bestrahlten Zellen mittels Kristallviolett-Färbung fixiert und die einzelnen Kolonien auf den 10 cm Zellkulturschalen ausgezählt. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse aus Versuch 1, Abbildung 4.1 das zugehörige Balkendiagramm. Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² UVB ist auf keiner der Zellkulturschalen mehr eine Kolonie nachzuweisen, sodass nur die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 0 J/cm² bzw. 100 J/cm² aufgeführt sind. Die Ergebnisse waren im 2. Versuch reproduzierbar.

Im Rahmen des Colony-Forming-Unit-culture-Assays (CFUc-Assay) der Zelllinie HaCaT wurden zu Beginn des Versuches pro 10 cm Zellkulturschale 2000 Zellen ausgesät. Neben einem mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelten Ansatz, wurden zur Kontrolle jeweils die gleiche Anzahl 10 cm Zellkulturschalen mit Ethanol (da das verwendete 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Ethanol gelöst ist) sowie mit reinem Medium ohne Zusatz behandelt. Nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) (bzw. mit Ethanol oder Medium) und einer anschließenden Wachstumsphase von 7 Tagen wurden die Zellkolonien mittels Kristallviolett gefärbt und ausgezählt (Material und Methoden, Kapitel 3.10.). Aus Abbildung 4.1 wird deutlich, dass bereits in den unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansätzen, mehr Kolonien vorhanden sind als in den Kontrollen. Vergleicht man die unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansätze, mit den Ethanolkontrollen, so zeigt sich, dass in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansätzen signifikant mehr Kolonien vorhanden sind (Abb. 4.1, p= 0,00086864). Die Kolonienzahl in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Kulturen beträgt 137,4% des unter Ethanol erreichten Wertes. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach in der verwendeten Konzentration (10⁻⁷M) einen positiven Effekt auf das Wachstumsverhalten von humanen HaCaT-Keratinozyten im Colony-Forming-Unit-culture-Assay.

4.1.1.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1-Assay

HaCaT-Keratinocyten wurden nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) mit unterschiedlichen Dosen UVB (0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm²) bestrahlt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde das Wachstumsverhalten der Zellen anhand der Messung des NADH-Gehaltes bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.12).

Abbildung 4.2 dient der Darstellung der Ergebnisse des WST-1-Assays der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) bzw. mit den Kontrollsubstanzen Ethanol oder reinem Nährmedium.

Bis 6h nach simulierter Bestrahlung der Zellen mit 0J/cm² zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten der mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen im Vergleich zu den zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen. Der NADH-Gehalt ist in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen höher als in der Ethanolkontrolle, die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 4.2.a: p= 0,06764205, Abb. 4.2.b: p= 0,39188717). Nach 12h und 24h hat 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der gewählten Konzentration jedoch einen deutlich positiven Effekt auf das Wachstum von HaCaT-Keratinocyten im WST-1 Assay: der im ELISA-Reader bestimmte NADH-Gehalt der Zellen, der hier mit der Stoffwechselaktivität und somit mit dem Wachstumsverhalten der Zellen korreliert, ist in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Kolonien signifikant höher als in den Ethanolkontrollen (Abb. 4.2.c: p= 0,03784678, Abb. 4.2.d: p= 2,74126E-05). Der gemessene NADH-Gehalt in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen steigt im Vergleich zu den Ethanolkontrollen auf 117,6% (12h-Wert) bzw. 115,2% (24h-Wert) an. Nach 48h ist der NADH-Gehalt in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen jedoch wieder signifikant niedriger als der in den Ethanolkontrollen (Abb. 4.2.e: p= 5,119E-05). Er macht hier nur noch 80,5% des NADH-Gehaltes in den Ethanolkontrollen aus. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ entwickelt demnach in der gewählten Konzentration im WST-1-Assay nach 12h einen positiven, wachstumsfördernden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten. Nach 48h überwiegt die antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

4.1.1.3 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay

HaCaT-Keratinocyten wurden nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) mit unterschiedlichen Dosen UVB (0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm²) bestrahlt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme vitaler Zellen (die hier mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.13).

Abbildung 4.3 dient der Darstellung der Ergebnisse des Kristallviolett-Assays der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) bzw. mit den Kontrollsubstanzen Ethanol oder reinem Nährmedium.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass 0h nach der Bestrahlung mit 0J/cm² die Farbstoffaufnahme in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen signifikant höher ist als in der Ethanolkontrolle (Abb. 4.3.a: p= 0,00047072). Die Ergebnisse nach 6h, 12h, 24h und 48h sind mit einem p-Wert von respektive 0,105388, 0,96807065, 0,05635462 und 0,71797088 statistisch nicht signifikant (Abb. 4.3.b-e). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ scheint dennoch in den unbestrahlten Kontrollen bis zu 12h in der gewählten Konzentration einen positiven Effekt auf das Wachstum von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay zu haben: die im ELISA-Reader bestimmte Farbstoffaufnahme der Zellen, die hier mit der Anzahl vitaler Zellen und somit mit dem Wachstumsverhalten der Zellen korreliert, ist in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Kolonien höher (wenn auch nicht signifikant höher) als in den Ethanolkontrollen. Nach 24h und 48 ist die Farbstoffaufnahme in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen jedoch wieder niedriger als der in den Ethanolkontrollen. Auch diese Ergebnisse sind jedoch, wie oben beschrieben, statistisch nicht signifikant. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ entwickelt demnach in der gewählten Konzentration im Kristallviolett-Assay nach 0h einen positiven, wachstumsfördernden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten. Nach 24h überwiegt die antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Die Ergebnisse sind nicht alle statistisch signifikant, bestätigen jedoch die Ergebnisse des WST-1-Assays (s. Abschnitt 4.1.1.2).

4.1.1.4 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten

Im Colony-Forming-Unit-culture-Assay sprechen die Ergebnisse für 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der verwendeten Konzentration (10⁻⁷M) nach 7 Tagen für einen positiven Effekt auf das

Wachstumsverhalten von humanen HaCaT-Keratinocyten. Im WST-1- und Kristallviolett-Assay sind die dargestellten Ergebnisse uneinheitlich, zeigen jedoch in den frühen Zeitpunkten ebenfalls einen positiven, wachstumsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) auf humane HaCaT-Keratinocyten. Nach 24-48h überwog jedoch in beiden Assays die antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

4.1.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

4.1.2.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im CFUc-Assay

Zellen der Zelllinie SCL-1 (kutane Plattenepithelkarzinomzellen) wurden, genau wie die humanen Keratinocyten der Zelllinie HaCaT, wie unter 4.1 beschrieben behandelt und bestrahlt. Nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen post-Bestrahlung wurden auch diese Zellen mittels Kristallviolett gefärbt und die einzelnen Kolonien auf den 10 cm Zellkulturschalen ausgezählt. Tabelle 4.2 zeigt die Ergebnisse aus Versuch 1, Abbildung 4.4 das zugehörige Balkendiagramm. Ab einer Bestrahlungsintensität von 500 J/cm² ist auch für die Zelllinie SCL-1 (genau wie für HaCaT) auf keiner der Zellkulturschalen mehr eine Kolonie nachzuweisen, sodass auch hier nur die Ergebnisse nach Bestrahlung mit 0 J/cm² bzw. 100 J/cm² aufgeführt sind. Die Ergebnisse waren im 2. Versuch reproduzierbar.

Im Rahmen des Colony-Forming-Unit-Culture-Assays (CFUc-Assay) der Zelllinie SCL-1 wurden zu Beginn des Versuches pro 10 cm Zellkulturschale 5000 Zellen ausgesät. Neben einem mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansatz wurden zur Kontrolle jeweils die gleiche Anzahl 10cm Zellkulturschalen mit Ethanol (da das verwendete 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Ethanol gelöst ist) sowie mit reinem Medium ohne Zusatz behandelt. Nach 48-stündiger Vorbehandlung wurden die ersten Zellkolonien mittels Kristallviolett gefärbt und ausgezählt (Material und Methoden, Kapitel 3.10.). In Abbildung 4.4 ist sehr deutlich zu sehen, dass in den unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellkulturschalen, signifikant weniger Kolonien nachgewiesen werden können als in den Kontrollen. Vergleicht man die Ethanolkontrolle mit den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen, so ergibt sich ein p-Wert von 0,01335568. Das Ergebnis ist damit statistisch signifikant. Die Kolonienzahl in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Kulturen beträgt 42,3% des unter Ethanol erreichten Wertes. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ übt somit in der gewählten Konzentration (10⁻⁷M) im Colony-Forming-Unit-culture-Assay einen antiproliferativen Effekt auf das Wachstum von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen aus.

4.1.2.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-1-Assay

Kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie SCL-1 wurden nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) mit unterschiedlichen Dosen UVB (0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm²) bestrahlt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde das Wachstumsverhalten der Zellen anhand der Messung des NADH-Gehaltes bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3. 12).

Abbildung 4.5 dient der Darstellung der Ergebnisse des WST-1 Assays der Zelllinie SCL-1 nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) bzw. mit den Kontrollsubstanzen Ethanol oder reinem Nährmedium.

Aus Abbildung 4.5 wird ersichtlich, dass sich ab 12h nach Bestrahlung der Zellen mit 0J/cm² signifikante Unterschiede im Wachstumsverhalten der mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen im Vergleich zu den zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen ergeben. Der NADH-Gehalt, der in diesem Versuch mit der Stoffwechselaktivität und somit auch mit dem Wachstumsverhalten der Zellen korreliert, ist in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelten Zellen signifikant niedriger als in den mit Ethanol behandelten Zellen (Abb. 4.5.c: p= 0,01050856). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat im WST-1-Assay in der gewählten Konzentration (10⁻⁷M) einen antiproliferativen Effekt auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1.

4.1.2.3 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay

Kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie SCL-1 wurden nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) mit unterschiedlichen Dosen UVB (0J/cm², 100J/cm², 500J/cm², 800J/cm² und 1000J/cm²) bestrahlt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme vitaler Zellen (die hier mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.13).

Abbildung 4.6 stellt die Ergebnisse des Kristallviolett-Assays der Zelllinie SCL-1 nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, Ethanol oder Medium und anschließender

Bestrahlung mit UVB-Licht ($0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$) dar. Die Ergebnisse waren zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten vergleichbar (0h, 6h, 12h, 24h), weshalb hier nur die 48h-Werte dargestellt sind.

In den unbestrahlten Zellkulturen ($0\text{J}/\text{cm}^2$) weisen die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 behandelten Zellen eine niedrigere Farbstoffaufnahme auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen. Die Farbstoffaufnahme korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen und ist ein Parameter für die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der SCL-1 Zellen. Mit einem p-Wert von 0,605440908 ist dieses Ergebnis zwar statistisch nicht signifikant, deutet jedoch auf einen antiproliferativen Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (10^{-7}M) auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett Assay, was die Resultate des WST-1-Assays bestätigt (s. Abschnitt 4.1.2.2).

4.1.2.4 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

1,25-Dihydroxyvitamin D_3 übt in der gewählten Konzentration (10^{-7}M) im Colony-Forming-Unit-culture-Assay, im WST-1-Assay und im Kristallviolett-Assay einen antiproliferativen Effekt auf das Wachstum von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen aus.

4.2 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Zur Beantwortung dieser Frage stützen wir uns auf die Ergebnisse der drei bereits im Abschnitt 4.1 beschriebenen Zellproliferationsassays: Colony-Forming-Unit-culture-Assays (CFUc-Assay), WST-1-Assay und Kristallviolett-Assay.

4.2.1 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten

4.2.1.1 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im CFUc-Assay

Betrachtet man Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1 erkennt man folgendes: im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen ($0\text{J}/\text{cm}^2$) zeigt sich unter Einfluss von UVB ($100\text{J}/\text{cm}^2$) nach 7 Tagen eine deutliche Abnahme der Kolonienzahl auf den 10cm Zellkulturschalen. Die Anzahl der Kolonien verringert sich in der Mediumkontrolle um durchschnittlich 416,5 Kolonien, in der Ethanolkontrolle um 369,5 Kolonien. Es kommt somit zu einem Abfall der Kolonienzahl auf 62,3% (Medium) bzw. 56,8% (Ethanol) des Ausgangswertes (Abb. 4.7). Diese Ergebnisse sind mit einem p-Wert von respektive 0,02281649 und 0,00066225 statistisch signifikant (Abb. 4.1). UVB-Licht hat somit in einer Dosis von $100\text{J}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten. Ab einer Bestrahlungsdosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ ist dieser Effekt so ausgeprägt, dass nach 7 Tagen weder in den mit Ethanol noch in den mit Medium behandelten Zellen Kolonien nachweisbar sind (Abb. 4.1).

4.2.1.2 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1-Assay

Während 6h nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen (Abb. 4.2.b) keine merklichen Unterschiede in der Stoffwechselaktivität und somit im Wachstumsverhalten der Zellen zu erkennen sind, beginnt der NADH-Gehalt in der Kultur 12h (Abb. 4.2.c) nach Bestrahlung dosisabhängig mit steigender UVB-Dosis abzufallen. Dieser Effekt wird im weiteren Zeitverlauf immer deutlicher (24h, 48h, s. Abbildung 4.2.d+e). 48h nach der Bestrahlung ist der NADH-Gehalt in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen nach einer Bestrahlung mit $500\text{J}/\text{cm}^2$ signifikant niedriger als in den unbestrahlten Keratinocyten (Abb. 4.2.e: $p_{\text{Medium}} = 8,7589\text{E}-12$; $p_{\text{Ethanol}} = 3,6728\text{E}-10$).

Aus Abbildung 4.8 wird ersichtlich, dass der NADH-Gehalt in den HaCaT- Zellkulturen ab einer Bestrahlungsdosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ kontinuierlich abnimmt. UVB-Licht hat somit in steigender Dosis von $0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten. Dieser wird 12h nach der Bestrahlung erstmals erkennbar (Abb. 4.2) und ab einer UVB-Dosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ besonders deutlich (Abb. 4.8).

4.2.1.3 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay

In der HaCaT-Zellkultur beginnt die Anzahl vitaler, mit Kristallviolett gefärbter Zellen, nach 24h dosisabhängig mit steigender UVB-Dosis abzufallen (Abb. 4.3). Während die Anzahl vitaler Zellen unter einer Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ weitestgehend unverändert bleibt, kommt es durch die Wirkung der UVB-Strahlung zu einer Abnahme der Zellproliferation ab einer Bestrahlungsdosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ (Abbildung 4.9). 48h nach der Bestrahlung ist der Farbstoff-Gehalt in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen nach einer Bestrahlung mit $500\text{J}/\text{cm}^2$ signifikant niedriger als in den unbestrahlten Keratinocyten (Abb. 4.3.e: $p_{\text{Medium}} = 0,00755662$; $p_{\text{Ethanol}} = 7,57489\text{E-}06$).

UVB-Licht hat also im Kristallviolett Assay eine zytotoxische, proliferationshemmende Wirkung auf HaCaT-Keratinocyten, die 24h nach der Bestrahlung erstmals ersichtlich (Abb. 4.3) und ab einer UVB-Dosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ besonders deutlich ist (Abb. 4.9).

4.2.1.4 Fazit: Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten

UVB-Licht hat in den von uns durchgeführten Proliferationsassays (CFUc, WST-1, Kristallviolett) in steigender Dosis von $0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten.

4.2.2 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

4.2.2.1 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im CFUc-Assay

Betrachtet man Tabelle 4.2 und Abbildung 4.4 erkennt man folgendes: im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen ($0\text{J}/\text{cm}^2$), zeigt sich unter Einfluss von UVB ($100\text{J}/\text{cm}^2$) eine deutliche Abnahme der Kolonienzahl auf den 10cm Zellkulturschalen. Die Anzahl der Kolonien sinkt in der Mediumkontrolle um durchschnittlich 1124 Kolonien, in der Ethanolkontrolle um 1065,5 Kolonien. Es kommt somit zu einem Abfall der Kolonienzahl auf 57,91% (Medium) bzw. 56,75% (Ethanol) des Ausgangswertes (Abb. 4.10). UVB-Licht hat somit in einer Dosis von $100\text{J}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen

Effekt auf SCL-1 Zellen. Diese Ergebnisse sind mit einem p-Wert von respektive 0,05850103 und 0,10417647 jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 4.4). Ab einer Bestrahlungsdosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ sind (genau wie es bei den humanen Keratinozyten der Zellreihe HaCaT der Fall ist, 4.2.1.1) weder in den Medium- noch in den Ethanolkontrollen nach 7 Tagen in den 10cm Zellkulturschalen Kolonien nachweisbar. Der zytotoxische Effekt der UVB-Strahlung auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 steigt somit mit steigender UVB-Dosis.

4.2.2.2 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-1-Assay

Unter dem Einfluss von UVB-Strahlung kommt es in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1, genauso wie in humanen Keratinozyten der Zellreihe HaCaT (s. Abschnitt 4.2.1.2) zu einer dosisabhängigen Abnahme des NADH-Gehaltes in den Zellen mit steigender UVB-Dosis. SCL-1 Zellen reagieren jedoch generell weniger sensitiv auf UVB-Strahlung. Der dosisabhängige Abfall des NADH-Gehaltes in der Kultur wird erst nach 24h deutlich (Abbildung 4.5). 48h nach der Bestrahlung ist der NADH-Gehalt in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen nach einer Bestrahlung mit $500\text{J}/\text{cm}^2$ signifikant niedriger als in den unbestrahlten Plattenepithelkarzinomzellen (Abb. 4.5.e: $p_{\text{Medium}}=6,18253\text{E}-14$; $p_{\text{Ethanol}}=3,23685\text{E}-20$).

Aus Abbildung 4.11 wird ersichtlich, dass der NADH-Gehalt in den SCL-1- Zellkulturen ab einer Bestrahlungsdosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ kontinuierlich abnimmt. UVB-Licht hat somit in steigender Dosis von $0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf SCL-1-Zellen. Dieser wird 24h nach der Bestrahlung erstmals ersichtlich (Abb. 4.5) und ab einer UVB-Dosis von $500\text{J}/\text{cm}^2$ besonders deutlich (Abb. 4.11).

4.2.2.3 Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay

SCL-1 Zellen reagieren im Kristallviolett-Assay (genauso wie im WST-1 Assay) weniger sensitiv auf UVB-Strahlung als HaCaT-Keratinozyten. Abbildung 4.6 zeigt, dass in diesem Versuch bis 48h nach der Bestrahlung kein deutlicher dosisabhängiger Abfall der Farbstoffaufnahme im Kristallviolett-Assay feststellbar ist. Während die Farbstoffaufnahme nach Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle abnimmt, steigen die Werte unter Bestrahlung mit $500\text{J}/\text{cm}^2$ wieder an, um anschließend wieder abzufallen (Abb. 4.6). Vergleicht man jedoch die unbestrahlten Kontrollen

(0J/cm²) mit den Zellen, die einer UVB-Dosis von 1000J/cm² ausgesetzt waren, so stellt man fest, dass es insgesamt zu einer signifikanten Abnahme der Farbstoffaufnahme nach Bestrahlung mit UVB-Licht kommt. Für die mit Ethanol behandelten Zellen ergibt der Vergleich 0J/cm² zu 1000 J/cm² einen p-Wert von 1,25753E-06, für die mit Medium ohne Zusatz behandelten Zellen ergibt sich ein p-Wert von 0,000104424. Im Kristallviolett Assay der Zelllinie SCL-1 ist somit zwar kein dosisabhängiger Abfall der Farbstoffaufnahme nach UVB-Bestrahlung nachweisbar, dennoch zeigt sich in diesem Versuch ein signifikanter zytotoxischer, wachstumshemmender Effekt der UVB-Strahlung auf SCL-1 Zellen.

4.2.2.4 Fazit: Einfluss von UVB-Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

UVB-Licht hat in den von uns durchgeführten Proliferationsassays (CFUc, WST-1, Kristallviolett) in steigender Dosis von 100J/cm²-1000J/cm² einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf kutane Plattenepithelzellen der Zellreihe SCL-1.

4.3 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung

Zur Beantwortung dieser Frage stützen wir uns auf die Ergebnisse der drei bereits im Abschnitt 4.1 beschriebenen Zellproliferationsassays: Colony-Forming-Unit-culture-Assays (CFUc-Assay), WST-1-Assay und Kristallviolett-Assay.

4.3.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung

4.3.1.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung im CFUc-Assay

Aus Abschnitt 4.1 und 4.2 wird deutlich, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) einen positiven Effekt auf das Wachstumsverhalten humaner Keratinocyten (HaCaT) hat. UVB-Licht dagegen übt einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten aus. Um den Einfluss von

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf UVB-bestrahlte Keratinozyten der Zellreihe HaCaT zu untersuchen, betrachten wir nun in Abbildung 4.1 die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über 48h vorbehandelten und anschließend mit UVB-Licht in einer Dosis von 100J/cm² bestrahlten Keratinozyten. In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellkulturschalen beobachtet man im Gegensatz zur Medium- und Ethanolkontrolle (s. Abschnitt 4.2.1.1) nur eine leichte, statistisch nicht signifikante, Abnahme der Kolonienzahl gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 4.1, p= 0,09098301). Die nach Bestrahlung mit UVB in einer Dosis von 100J/cm² gezählten Kolonien fallen im Gegensatz zu den Kontrollen lediglich auf 90,36% des Ausgangswertes ab (von durchschnittlich 1161,5 auf durchschnittlich 1049,5 Kolonien), was für einen zytoprotektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung (100J/cm²) spricht (Abb. 4.7). Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² scheint jedoch die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung zu überwiegen. Ebenso wie in der Medium- und Ethanolkontrolle, sind auch in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellkulturschalen ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² nach 7 Tagen keine Zellkolonien mehr auf den 10cm Zellkulturschalen nachweisbar.

4.3.1.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung im WST-Assay

In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinozyten kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes in den Kulturen. 48h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² ist der NADH-Gehalt in den bestrahlten Keratinozyten signifikant niedriger als in den unbestrahlten Keratinozyten (Abb. 4.2.e: p= 1,64195E-15).

Die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und anschließend mit UVB-Licht bestrahlten Zellen weisen in diesem Versuch jedoch eine höhere Stoffwechselaktivität (gemessen am NADH-Gehalt der Zellen) und somit eine höhere Wachstumsrate auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen (Abb. 4.2.e: p_{1000J/cm²}= 8,84032E-06). Obwohl 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in den meisten unbestrahlten Kontrollen eine proliferationsfördernde Wirkung auf HaCaT-Keratinozyten ausübt, sprechen die Ergebnisse für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung.

4.3.1.3 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay

In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der Farbstoffaufnahme (die mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) in den Kulturen. 48h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² ist die Farbstoffaufnahme in den bestrahlten Keratinocyten signifikant niedriger als in den unbestrahlten Keratinocyten (Abb. 4.3.e: p= 2,86383E-06).

Die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und anschließend mit UVB-Licht bestrahlten Zellen weisen in diesem Versuch jedoch eine höhere Farbstoffaufnahme und somit eine höhere Wachstumsrate auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen (Abb. 4.3; p_{1000J/cm2}= 0,004908958). Die Ergebnisse sind uneinheitlich und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ übt teilweise bereits in den unbestrahlten Kontrollen eine proliferationsfördernde Wirkung auf HaCaT-Keratinocyten aus. Die Ergebnisse des CV-Assays sprechen jedoch für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung..

4.3.1.4 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung

In den durchgeführten Proliferationsassays (CFUc, WST-1, Kristallviolett) sprechen die Ergebnisse für eine zytoprotektive Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die toxischen Effekte der UVB-Strahlung in HaCaT-Keratinocyten.

4.3.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung

4.3.2.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im CFUc-Assay

Aus Abschnitt 4.1 und 4.2 wird deutlich, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) einen antiproliferativen Effekt auf das Wachstumsverhalten kutaner Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) hat. UVB-Licht übt einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf SCL-1 Zellen aus. Um den Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf UVB-bestrahlte Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 zu untersuchen, betrachten wir nun in Abbildung 4.4 die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über 48h vorbehandelten und anschließend mit UVB-Licht in einer Dosis von 100J/cm² bestrahlten

Plattenepithelkarzinomzellen. In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellkulturschalen beobachtet man im Gegensatz zur Medium- und Ethanolkontrolle (s. Abschnitt 4.2.2.1) eine Zunahme der Anzahl an Zellkolonien auf den 10cm Zellkulturschalen, was in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 für einen protektiven Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung spricht. Auch hier ist das Ergebnis mit einem p-Wert von 0,31181633 statistisch nicht signifikant. Die Anzahl der Zellkolonien unter Bestrahlung mit 100J/cm² steigt hier um durchschnittlich 244,5 Kolonien an (128,18% des Ausgangswertes) (Abb. 4.10). Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² scheint jedoch die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung zu überwiegen. Ebenso wie in der Medium- und Ethanolkontrolle sind auch in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellkulturschalen ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² nach 7 Tagen keine Zellkolonien mehr auf den 10cm Zellkulturschalen nachweisbar.

4.3.2.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im WST-1-Assay

In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie SCL-1 kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes in den Kulturen. 48h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² ist der NADH-Gehalt in den bestrahlten Plattenepithelkarzinomzellen signifikant niedriger als in den unbestrahlten Zellen (Abb. 4.5.e: p= 1,64792E-07).

Die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und anschließend mit UVB-Licht bestrahlten Zellen weisen in diesem Versuch jedoch eine höhere Stoffwechselaktivität (gemessen am NADH-Gehalt der Zellen) und somit eine höhere Wachstumsrate auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen (Abb. 4.5.e: p_{100J/cm²}= 7,67071E-08). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach im WST-1 Assay einen protektiven Effekt auf SCL-1-Zellen gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung.

4.3.2.3 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay

In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie SCL-1 kommt es mit steigender UVB-Dosis (zw. 0J/cm² und 1000J/cm²) zu einem signifikanten Abfall der Farbstoffaufnahme in den Kulturen (Abb. 4.6, p= 7,14538E-09). Diese Farbstoffaufnahme korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen und ist somit ein Maß für das Wachstumsverhalten der SCL-1 Zellen.

Die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und anschließend mit UVB-Licht bestrahlten Zellen weisen in diesem Versuch jedoch eine höhere Farbstoffaufnahme und somit eine höhere Wachstumsrate auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen (Abb. 4.6: p_{500J/cm²}= 0,00444255). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach im Kristallviolett Assay einen protektiven Effekt auf SCL-1-Zellen gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung.

4.3.2.4 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat in den von uns durchgeführten Proliferationsassays (CFUc, WST-1, Kristallviolett) einen protektiven Effekt gegen die zytotoxische Wirkung von UVB-Strahlung in SCL-1-Zellen.

4.4 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Zur Beantwortung dieser Frage stützen wir uns auf die Ergebnisse der zwei bereits im Abschnitt 4.1 beschriebenen Zellproliferationsassays: WST-1-Assay und Kristallviolett-Assay.

4.4.1 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten

4.4.1.1 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-Assay

HaCaT-Keratinocyten wurden mit ionisierender Strahlung bestrahlt (0Gy, 1Gy, 2Gy und 5Gy). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde das Wachstumsverhalten der Zellen anhand der Messung des NADH-Gehaltes bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3. 12).

Abbildung 4.12 veranschaulicht die Ergebnisse des WST-1-Assays der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen (0Gy-5Gy).

Während es nach UVB-Bestrahlung mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes in kultivierten HaCaT-Zellen kommt (s. Abschnitt 4.2.1.2), bleibt dieser Effekt nach Bestrahlung der Zellkulturen mit ionisierender Strahlung unterschiedlicher Intensitäten (0Gy-5Gy) aus (Abb. 4.12). Zwischen den unbestrahlten Kontrollen (0Gy) und den mit 5Gy bestrahlten Zellkulturen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im gemessenen NADH-Gehalt. Vergleicht man die nach Bestrahlung mit 5Gy gemessenen Absorptionen in den mit Medium bzw. Ethanol behandelten Zellen mit den zugehörigen unbestrahlten Kontrollen, so ergeben sich p-Werte von 0,78703955 (Medium) bzw. 0,80310345 (Ethanol). Niedrigdosierte ionisierende Strahlung hat demnach keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1 Assay.

4.4.1.2 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay

HaCaT-Keratinocyten wurden in diesem Versuch mit ionisierender Strahlung bestrahlt (0Gy, 1Gy, 2Gy und 5Gy). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung die Farbstoffaufnahme vitaler Zellen (die hier mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.13).

Abbildung 4.13 veranschaulicht die Ergebnisse des Kristallviolett-Assays der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen (0Gy-5Gy).

Während es nach UVB-Bestrahlung mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der Farbstoffaufnahme und somit der Zellproliferation in kultivierten HaCaT-Zellen kommt (s. Abschnitt 4.2.1.3), bleibt dieser Effekt nach Bestrahlung der Zellkulturen mit ionisierender Strahlung

unterschiedlicher Intensitäten (0Gy-5Gy) aus (Abb. 4.14). Zwischen den unbestrahlten Kontrollen (0Gy) und den mit 5Gy bestrahlten Zellkulturen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der gemessenen Farbstoffaufnahme. Vergleicht man die nach Bestrahlung mit 5Gy gemessenen Absorptionen in den mit Medium bzw. Ethanol behandelten Zellen mit den zugehörigen unbestrahlten Kontrollen, so ergeben sich p-Werte von 0,10318227 (Medium) bzw. 0,77749812(Ethanol). Niedrigdosierte ionisierende Strahlung hat demnach unter diesen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett Assay.

4.4.1.3 Fazit: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten

Niedrigdosierte ionisierende Strahlung hat in den von uns durchgeführten Proliferationsassays (WST-1-, Kristallviolett-Assay) keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten.

4.4.2 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

4.4.2.1 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im WST-Assay

Kutane Plattenepithelzellen der Zelllinie SCL-1 wurden mit ionisierender Strahlung bestrahlt (0Gy, 1Gy, 2Gy und 5Gy). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) nach der Bestrahlung wurde das Wachstumsverhalten der Zellen anhand der Messung des NADH-Gehaltes bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.12).

Abbildung 4.14 veranschaulicht die Ergebnisse des WST-1-Assays der Zelllinie SCL-1 nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen (0Gy-5Gy).

In Abbildung 4.14 ist zu erkennen, dass es augenscheinlich nicht zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes mit steigender IR-Bestrahlung (0Gy-5Gy) in kultivierten SCL-1 Zellen kommt. Zwischen den unbestrahlten Kontrollen (0Gy) und den mit 5Gy bestrahlten Zellkulturen ergeben sich

keine signifikanten Unterschiede im gemessenen NADH-Gehalt. Vergleicht man die nach Bestrahlung mit 5Gy gemessenen Absorptionen in den mit Medium bzw. Ethanol behandelten Zellen mit den zugehörigen unbestrahlten Kontrollen, so ergeben sich p-Werte von 0,1706466 (Medium) bzw. 0,5198655 (Ethanol). Niedrigdosierte ionisierende Strahlung hat unter diesen Versuchsbedingungen demnach keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 im WST-1 Assay.

4.4.2.2 Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) im Kristallviolett-Assay

Kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie SCL-1 wurden mit niedrigdosierter ionisierender Strahlung bestrahlt (0Gy, 1Gy, 2Gy und 5Gy). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 6h, 12h, 24h und 48h) wurde nach der Bestrahlung die Farbstoffaufnahme vitaler Zellen (die hier mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte anhand der im ELISA-Reader bestimmten Absorptionen (Material und Methoden, Kapitel 3.13).

Abbildung 4.15 veranschaulicht die Ergebnisse des Kristallviolett-Assays der Zelllinie SCL-1 nach 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit niedrigdosierten ionisierenden Strahlen (0Gy-5Gy).

In Abbildung 4.15 ist zu erkennen, dass es nicht zu einem dosisabhängigen Abfall der Farbstoffaufnahme mit steigender IR-Bestrahlung (0Gy-5Gy) in kultivierten SCL-1 Zellen kommt. Zwischen den unbestrahlten Kontrollen (0Gy) und den mit 5Gy bestrahlten Zellkulturen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der gemessenen Farbstoffaufnahme. Vergleicht man die nach Bestrahlung mit 5Gy gemessenen Absorptionen in den mit Medium bzw. Ethanol behandelten Zellen mit den zugehörigen unbestrahlten Kontrollen, so ergeben sich p-Werte von 0,00518691 (Medium) bzw. 0,95255634 (Ethanol). Ionisierende Strahlung hat demnach keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 im Kristallviolett Assay.

4.4.2.3 Fazit: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Niedrigdosierte ionisierende Strahlung hat in den von uns durchgeführten Proliferationsassays (WST-1-, Kristallviolett-Assay) keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1.

4.5 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung

Auch zur Beantwortung dieser Fragestellung stützen wir uns auf die Ergebnisse des WST-1 und des Kristallviolett-Assays.

4.5.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung

4.5.1.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung im WST-Assay

Der NADH-Gehalt der Zellen ist in diesem Versuch ein Parameter für die Beurteilung der Stoffwechselaktivität und somit des Wachstumsverhaltens der HaCaT-Keratinocyten. Vergleicht man nun die unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Zellen, mit denen, die mit 5Gy bestrahlt wurden, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied im gemessenen NADH-Gehalt ($p=0,34750156$). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat unseren Ergebnissen zufolge keinen signifikanten Einfluss auf die Wirkung der ionisierenden Strahlung in der HaCaT-Zellkultur.

4.5.1.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay

Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (5Gy), zeigt sich in Abb. 4.13 kein signifikanter Unterschied in der Farbstoffaufnahme in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten im Vergleich zur Ethanolkontrolle ($p= 0,98674331$). Die Farbstoffaufnahme der Zellen korreliert in diesem Versuch mit der Anzahl vitaler Zellen und somit mit dem Wachstumsverhalten der HaCaT-Keratinocyten. Vergleicht man nun die unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten mit denen, die mit 5Gy bestrahlt wurden, so ergibt sich auch hier

kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Farbstoffaufnahme ($p= 0,83935515$). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach im Kristallviolett-Assay keine nachweisbare Wirkung auf das Wachstumsverhalten humaner Keratinozyten der Zellreihe HaCaT, was sich auch nach Bestrahlung mit niedrigdosierter ionisierender Strahlung nicht ändert.

4.5.1.3 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinozyten nach IR-Bestrahlung

In den von uns durchgeführten Zellproliferationsassays zeigte sich für 1,25-Dihydroxyvitamin kein signifikanter Einfluss auf die Wirkung der ionisierenden Strahlung in der HaCaT-Zellkultur.

4.5.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung

4.5.2.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung im WST-Assay

Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (5Gy) zeigt sich in Abb. 4.14 ein signifikant geringerer NADH-Gehalt in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten SCL-1 Zellen im Vergleich zur Ethanolkontrolle ($p= 0,00033575$). Der NADH-Gehalt der Zellen ist in diesem Versuch ein Parameter für die Beurteilung der Stoffwechselaktivität und somit des Wachstumsverhaltens der SCL-1 Zellen. Vergleicht man nun die unbestrahlten, mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten SCL-1 Zellen mit denen, die mit 5Gy bestrahlt wurden, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied im gemessenen NADH-Gehalt ($p= 0,12906347$). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach im WST-1 Assay eine antiproliferative Wirkung auf Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1, die jedoch durch die niedrigdosierte ionisierende Strahlung nicht beeinflusst wird.

4.5.2.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung im Kristallviolett-Assay

Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (5Gy), zeigen sich in Abb. 4.15 keine signifikanten Unterschiede in der Farbstoffaufnahme (Kristallviolett) zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten SCL-1 Zellen und den zum Vergleich mit Ethanol behandelten SCL-1 Zellen ($p=0,40512471$). Die Farbstoffaufnahme in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten SCL-1 Zellen ist dennoch geringer als in der Ethanolkontrolle. Die Unterschiede sind nach Bestrahlung mit 1Gy und mit 2Gy statistisch signifikant ($p=0,02957051$ bzw. $p=0,001098747$). Auch hier ist die Farbstoffaufnahme in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten SCL-1-Zellen geringer als in den Ethanolkontrollen. Die Kristallviolett-Aufnahme der Zellen ist in diesem Versuch ein Maß für die Anzahl vitaler Zellen und somit für das Wachstumsverhalten der SCL-1 Plattenepithelkarzinom-Zellen. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hat demnach im Kristallviolett Assay eine antiproliferative Wirkung auf Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1, die jedoch durch niedrigdosierte ionisierende Strahlung nicht beeinflusst wird.

4.5.2.3 Fazit: Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung

In dem von uns durchgeführten WST-1-Assay zeigte sich für 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine antiproliferative Wirkung auf Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1, die jedoch durch die ionisierende Strahlung nicht beeinflusst wurde.

4.6 Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ –Stoffwechsels (CYP27B1,CYP24) in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Bestrahlung mit UVB

Wie bereits in mehreren Arbeiten diskutiert wurde, kommt es unter dem Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Modulation der Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Systems in der Haut. Ziel dieses Versuches ist es deshalb, den Einfluss von UVB-Strahlung auf die 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induzierte Modulation der Expression der CYP27B1 und der CYP24 in der Haut zu untersuchen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden humane Keratinocyten (HaCaT) und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) 48h vor der Bestrahlung mit UVB mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

(10^{-7} M) behandelt. Die Effekte auf die Expression wurden mit Hilfe einer quantitativen „real time“ PCR und anschließender Kalibrator normalisierter relativer Quantifizierung mit der RelQuant Software (Roche) bestimmt (Material und Methoden, Kapitel 3.3).

Zu den Hauptkomponenten des Vitamin D Systems der humanen Haut gehören 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Rezeptor (VDR), Vitamin D₃-25-Hydroxylase (CYP27A1), 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase (CYP24). Da neuere Forschungsergebnisse eine wichtige Rolle von 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase belegen, konzentrierten wir unsere Untersuchungen auf die Analyse der Regulation der RNA Expression dieser beiden Enzyme.

4.6.1 Expression der CYP27B1 in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Bestrahlung mit UVB

Die von uns ermittelten Daten zeigen eine dosisabhängige Verringerung der 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) mit steigender UVB-Dosis 24h nach Bestrahlung. Während nach 3h (Abb. 4.16.a) ein leichter Anstieg in der Expression der CYP27B1 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle feststellbar ist (Anstieg auf 145,2% des Ausgangswertes nach Bestrahlung mit 500J/cm²), sinkt die Expression des Enzyms in humanen Keratinocyten der Zelllinie HaCaT 24h nach Bestrahlung (Abb. 4.16b) mit steigender UVB-Dosis dosisabhängig ab (s. Abb. 4.16 und 4.17). Die „normalized ratio“ fällt 24h nach der Bestrahlung mit 800J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf 20,5% ab (Abb. 4.16.b: p= 0,02767422).

In 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen in HaCaT-Keratinocyten, wenn auch etwas weniger deutlich. Aus Abbildung 4.18 und 4.19 wird ersichtlich, dass die Expression der CYP27B1 3h nach Bestrahlung mit UVB-Licht genau wie in HaCaT-Keratinocyten leicht ansteigt (Anstieg auf 114,9% des Ausgangswertes nach Bestrahlung mit 500J/cm²) und 24h nach Bestrahlung mit einer UVB-Dosis von 100-1000J/cm² dosisabhängig abfällt. Die „normalized ratio“ sinkt 24h nach der Bestrahlung mit 800 J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf 59,8% ab (Abb. 4.18.b: p= 0,00010541).

UVB-Strahlung in einer Dosis von 100J/cm² bis 800J/cm² führt somit 3h nach der Bestrahlung zu einer Erhöhung der Expression der CYP27B1 in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten und SCL-1-Plattenepithelkarzinomzellen. 24h nach der Bestrahlung kommt es in diesen Zellen mit steigender UVB-Dosis zu einer Abnahme der Expression der CYP27B1.

4.6.2 Expression der CYP24 in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Bestrahlung mit UVB

Auch die Expression der 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase (CYP24) wird in humanen Keratinocyten reguliert. Aus Abbildung 4.20.a und 4.21 wird deutlich, dass die Expression der CYP24 in HaCaT-Zellen 3h nach UVB-Bestrahlung deutlich stärker abfällt als die Expression der CYP27B1 zum gleichen Zeitpunkt. Es handelt sich hierbei um einen dosisabhängigen Abfall nach UVB-Bestrahlung unterschiedlicher Dosis. Die „normalized ratio“ fällt 3h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf 26.9% ab (Abb. 4.20.a: p= 0,01478532). UVB-Licht in einer Dosis von 800J/cm² hat einen so starken zytotoxischen Effekt auf die Zellen, dass nach der Bestrahlung mit 800J/cm² keine CYP24-mRNA mehr nachweisbar ist. 24h nach der Bestrahlung kommt es zu einem Anstieg der Expression der CYP24-mRNA im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle: die „normalized ratio“ steigt 24h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf 112.8% an, ist mit einem p-Wert von 0,48699034 jedoch statistisch nicht signifikant verändert (Abb. 4.20.b).

Auch in SCL-1 Zellen kommt es nach Bestrahlung mit UVB zu einem stärkeren dosisabhängigen Abfall der CYP24-Expression im Vergleich zur CYP27B1. Sowohl 3h als auch 24h nach UVB-Bestrahlung beobachtet man einen dosisabhängigen Abfall der Expression des Enzyms mit steigender UVB-Dosis (Abb.4.22 und 4.23). Die „normalized ratio“ sinkt 3h nach der Bestrahlung mit 500 J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle auf 52,4% ab (Abb. 4.22.a: p= 0,03745029). UVB-Licht in einer Dosis von 800J/cm² hat einen so starken zytotoxischen Effekt auf die Zellen, dass nach der Bestrahlung mit 800J/cm² keine CYP24-mRNA mehr nachweisbar ist. Im Gegensatz zur Expression der CYP24 in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten kommt es in SCL-1-Zellen nach 24h nicht zu einem Anstieg der CYP24-mRNA (Abb. 4.22.b): die „normalized ratio“ ist auch 24h nach der Bestrahlung mit 500J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle signifikant niedriger (Abb. 4.22.b: p= 0,02799301): die Expression der CYP24-mRNA sinkt nach der Bestrahlung mit 500J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle bis auf 33,3% des Ausgangswertes ab.

UVB-Strahlung in einer Dosis von 100J/cm² bis 800J/cm² führt somit 3h nach der Bestrahlung mit steigender UVB-Dosis zu einer Reduktion der Expression der CYP24 in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten und SCL-1-Plattenepithelkarzinomzellen. Während es 24h nach der Bestrahlung in HaCaT-Keratinocyten zu einem erneuten Anstieg der CYP24-mRNA kommt, bleibt dieser Effekt in SCL-1-Zellen aus.

4.7 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach strahlungsinduzierten DNS-Schäden

4.7.1 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach UVB-induzierten DNS-Schäden (Dot Blot)

Charakteristische DNA-Schäden nach Bestrahlung mit UVB sind DNA-Intrastrang-Vernetzungen zwischen benachbarten Pyrimidin-Basen. In dieser Arbeit wurden diese sogenannten Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) mittels Dot-Blot-Analyse detektiert. Um das genaue Ausmaß der DNA-Schädigung nach UVB-Bestrahlung zu erfassen, d.h. in diesem Fall den Anteil an Thymidin-Dimeren in der DNA zu quantifizieren, wurden Thymidin-Dimer-Antigene an eine Nitrozellulose-Membran gebunden und die Thymidin-Dimere mittels South-Western Blot detektiert. Die Quantifizierung der einzelnen Dots erfolgte nach Chemilumineszenz Detektion auf einem photographischen Film densitometrisch über die *Image J analysis software* (Material und Methoden, Kapitel 3.9). Um herauszufinden, welchen Einfluss 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung UVB-induzierter DNA-Schäden besitzt, wurden humane Keratinozyten (HaCaT) 48h vor der Bestrahlung mit UVB-Licht (0J/cm², 100J/cm², 1000J/cm²) mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen mit der Trägersubstanz Ethanol bzw. mit reinem Nährmedium ohne Zusatz behandelt. Da wir uns vor allem für den photogenen Effekt der UVB-Strahlung auf nicht-maligne Keratinozyten interessieren, wurde dieser Versuch nur mit HaCaT-Keratinozyten und nicht mit Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL- durchgeführt.

4.7.1.1 Einfluss von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinozyten

Abbildung 4.24 dient der Darstellung der Ergebnisse des Dot Blots der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung mit der Trägersubstanz Ethanol bzw. mit reinem Medium (ohne Zusatz) und anschließender Bestrahlung mit UVB-Licht (0J/cm²-1000J/cm²).

Aus Abbildung 4.24 geht hervor, dass die Anzahl an Thymidin-Dimeren mit der Bestrahlungsdosis zunimmt. Während in den unbestrahlten Kontrollen kaum Thymidin-Dimere vorhanden sind, steigt die Anzahl an Thymidin-Dimeren bis zu einer Bestrahlungsdosis von 1000J/cm² immer weiter an. In den mit Medium behandelten Zellen kommt es zu einer Zunahme der Anzahl an Thymidin-Dimere auf 1605% des Ausgangswertes (0J/cm²), der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (Abb.

4.24: $p=0,34833158$). Die Thymidin-Dimere, die in den mit Ethanol behandelten Zellen nachweisbar sind, erhöhen sich unter Bestrahlung mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$ auf 2821% des Ausgangswertes ($0\text{J}/\text{cm}^2$). Der Unterschied ist hier statistisch signifikant (Abb. 4.24: $p=0,0299433$). Unter Bestrahlung mit UVB kommt es demnach mit steigender UVB-Dosis zu einer Zunahme strahleninduzierter DNA-Schäden und somit zu einem Anstieg der Anzahl an Pyrimidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten.

4.7.1.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung von Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung

Abbildung 4.25 dient der Darstellung der Ergebnisse des Dot Blots der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung mit der Trägersubstanz Ethanol bzw. mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit UVB-Licht ($0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$).

Aus Abbildung 4.25 geht hervor, dass die Anzahl an Thymidin-Dimeren in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen (genauso wie in den mit Medium oder Ethanol behandelten Zellen, s. Abb. 4.24) mit der Bestrahlungsdosis zunimmt. In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen kommt es nach einer Bestrahlung mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$ zu einem Anstieg der Anzahl an Thymidin-Dimere auf 2861,6% des Ausgangswertes ($0\text{J}/\text{cm}^2$); der Unterschied ist statistisch signifikant (Abb. 4.25: $p=0,02362091$). Während in den unbestrahlten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Thymidin-Dimeren zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und den zur Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen vorhanden sind (Abb. 4.25: $p=0,86998656$), ist die Zunahme der Anzahl an Thymidin-Dimeren unter einer Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ bzw. mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$ in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen geringer als in den jeweiligen Ethanolkontrollen (Abb. 4.25: $p=0,04980113$ für die Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ und $p=0,58183813$ für die Bestrahlung mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ führt demnach zu einer Verringerung der Anzahl von Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung.

In Abbildung 4.26 ist der Zeitverlauf der Anzahl von Thymidin-Dimeren nach Bestrahlung der HaCaT-Zellen mit UVB-Licht dargestellt. Sowohl nach Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ (a) als auch nach Bestrahlung mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$ (b), kommt es innerhalb von 24h zu einer Abnahme der Anzahl an Thymidin-Dimeren. Zwischen 0h und 24h nach Bestrahlung mit UVB-Licht in einer Dosis von $100\text{J}/\text{cm}^2$ (a), kommt es unter Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Abnahme um durchschnittlich 13189,38 Pixel ($p=0,12747324$). In den mit Ethanol behandelten Zellen handelt es sich um eine Reduktion von durchschnittlich 50230,27 Pixel ($p=0,00630658$). Unter einer Bestrahlung mit UVB-Licht der Dosis $1000\text{J}/\text{cm}^2$ (b) reduziert sich die Pixelstärke, die mit der Anzahl an Thymidin-Dimeren korreliert, in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen im Verlauf der ersten 24h um

durchschnittlich 44089,17 Pixel ($p= 0,21380227$), in den mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen um durchschnittlich 13008,49 Pixel ($p= 0,30765645$). Im Verlauf der ersten 24h kommt es somit in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten genauso wie in den mit Ethanol behandelten HaCaT-Keratinocyten zu einer Abnahme der Anzahl an Thymidin-Dimeren.

Tabelle 4.3 dient der Veranschaulichung der Ergebnisse. Es wird deutlich, dass im Verlauf der ersten 24h nach Bestrahlung mit UVB-Licht die Anzahl an entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimeren (CPD) abnimmt. Aus Tabelle 4.3 geht weiterhin hervor, dass die Anzahl an Thymidin-Dimeren in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelten Zellen zwar geringer ist als in den mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen, die Reduktion der CPD im Verlauf der ersten 24h jedoch in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelten Zellen größer ist als in den Ethanolkontrollen. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ schützt somit zum einen die DNA vor UVB-induzierten Schäden.

4.7.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Funktion von DNS-Reparatursystemen nach IR-induzierten DNS-Schäden (γ H2AX-Immunfluoreszenz)

Neuere Forschungsergebnisse belegen eine große Bedeutung des H2AX als Nachweissystem für IR-induzierte Doppelstrangbrüche (DSB). Nach Entstehung eines DSBs werden zu beiden Seiten der Bruchstelle H2AX-Histone im C-Terminus phosphoryliert ($\Rightarrow \gamma$ -H2AX). Die einzelnen DSB wurden in diesem Versuch immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen, nachdem das γ -H2AX als Marker für die aufgetretenen DNA-Schäden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde (Material und Methoden, Kapitel 3.11). Die Fluoreszenzmarkierung und der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis des γ -H2AX erfolgten jeweils 30 min, 2h, 6h und 12h nach der Bestrahlung mit niedrigdosierter ionisierender Strahlung. Um herauszufinden, welchen Einfluss 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Funktion von DNA-Reparatursystemen zur Beseitigung strahlungsinduzierter DNA-Schäden besitzt, wurden humane Keratinocyten (HaCaT) 48h vor der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10^{-7} M) behandelt. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen mit der Trägersubstanz Ethanol behandelt. Da wir uns vor allem für den photogenen Effekt der ionisierenden Strahlung auf nicht-maligne Keratinocyten interessieren, wurde dieser Versuch nur mit HaCaT-Keratinocyten und nicht mit Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL- durchgeführt.

4.7.2.1 Einfluss von IR-Strahlung auf die Entstehung von phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) in HaCaT-Keratinocyten

Abbildung 4.27 zeigt, dass die Anzahl an γ H2AX-Foci in den HaCaT-Keratinocyten mit steigender Bestrahlungsdosis (0Gy-5Gy) zunimmt. Während in den unbestrahlten Kontrollen kaum γ H2AX-Foci vorhanden sind, steigt deren Anzahl bis zu einer Bestrahlungsdosis von 5Gy immer weiter an. In den mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl an γ H2AX-Foci von durchschnittlich 1,53 Foci/Zellkern (0Gy) auf durchschnittlich 66,25 Foci/Zellkern (5Gy), was gegenüber des Ausgangswertes (0Gy) einen Anstieg um 4330% bedeutet. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von $3,924E-29$ statistisch signifikant (Abb. 4.27). Unter Bestrahlung mit niedrigdosierter ionisierender Strahlung kommt es demnach mit steigender IR-Dosis zu einer Zunahme strahleninduzierter DNA-Schäden und somit zu einem Anstieg der Anzahl an γ H2AX-Foci in HaCaT-Keratinocyten.

4.7.2.2 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung von phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) in HaCaT-Keratinocyten nach IR-Bestrahlung

Abbildung 4.28 dient der Darstellung der Ergebnisse der γ H2AX-Immunfluoreszenz der Zelllinie HaCaT nach 48-stündiger Vorbehandlung mit der Trägersubstanz Ethanol bzw. mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung mit ionisierender Strahlung (0Gy-5Gy).

Aus Abbildung 4.28 geht hervor, dass die Anzahl an γ H2AX-Foci in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen (genauso wie in den Ethanol behandelten Zellen, s. Abb. 4.27) mit der Bestrahlungsdosis zunimmt. In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen kommt es zu einem Anstieg der Anzahl an γ H2AX-Foci von durchschnittlich 1,14 Foci/Zellkern (0Gy) auf durchschnittlich 83,84 Foci/Zellkern (5Gy), was gegenüber des Ausgangswertes (0Gy) einer Zunahme um 7354,4% bedeutet. Der Unterschied ist im Vergleich zur Ethanolkontrolle statistisch signifikant (Abb. 4.28: $p= 1,05849E-29$).

Während in den unbestrahlten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an γ H2AX-Foci zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und den zur Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen vorhanden sind (Abb. 4.28: $p= 0,212235888$), ist der Anstieg der Anzahl an γ H2AX-Foci unter einer Bestrahlung mit 1Gy in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen signifikant geringer als in den jeweiligen Ethanolkontrollen (Abb. 4.28: $p= 0,001433681$). Die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ verringert demnach die Anzahl von γ H2AX-Foci in HaCaT-Keratinocyten nach Bestrahlung mit 1Gy. Bei einer Bestrahlung mit 5 Gray zeigt sich jedoch genau

das Gegenteil: es werden unter Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ signifikant mehr γ -H2AX-Foci gezählt als unter der Behandlung mit der Trägersubstanz Ethanol (Abb.4.28, p= 9,67272E-05). Nach einer Bestrahlung mit 5Gy hat 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ demnach keine protektive Wirkung gegen die Entstehung von γ H2AX-Foci in HaCaT-Keratinocyten. Es führt ganz im Gegenteil zu einer verstärkten Entstehung von phosphoryliertem H2AX in den Zellkernen der HaCaT-Keratinocyten. Dies zeigt auch Abbildung 4.29: bis zu einer Bestrahlung mit 2 Gray zeigen die Ergebnisse aus Abbildung 4.29 eine Reduktion der Immunreaktivität für γ -H2AX nach Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Abb. 4.29.a+b). Bei einer Bestrahlung mit 5 Gray werden unter Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ mehr γ -H2AX-Foci gezählt als unter der Behandlung mit der Trägersubstanz Ethanol (Abb. 4.29.c).

In Abbildung 4.29 ist der Zeitverlauf der Anzahl der DNA-Schäden (gemessen an der Anzahl detektierter γ -H2AX-Foci) nach Bestrahlung der HaCaT-Zellen mit ionisierender Strahlung dargestellt. Während sich 30min nach der Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen immunzytochemisch nur wenige γ -H2AX-Foci detektieren lassen, steigt die Anzahl der Foci bis 6h nach Bestrahlung kontinuierlich an. Danach fällt die Anzahl der detektierten γ -H2AX-Foci wieder ab (siehe 12h-Werte). 6h nach der Bestrahlung mit ionisierender Strahlung kommt es somit in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten genauso wie in den mit Ethanol behandelten HaCaT-Keratinocyten zu einer Abnahme der Anzahl an γ -H2AX-Foci.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit liefert Tabelle 4.4.

4.8 Tabellen

	Anzahl der Kolonien			
	Versuch 1 / Ansatz 1	Versuch 1 / Ansatz 2	Mittelwert	Standard- Abweichung
0J/cm² Medium	1124	1089	1106,5	24,7487373
0J/cm² Ethanol	850	862	856	8,48528137
0J/cm² 1,25(OH)₂D₃	1168	1155	1161,5	9,19238816
100J/cm² Medium	693	687	690	4,24264069
100J/cm² Ethanol	482	491	486,5	6,36396103
100J/cm² 1,25(OH)₂D₃	1070	1029	1049,5	28,991378

Tab. 4.1. Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und UVB auf das Wachstum von HaCaT-Keratinocyten (CFUc-Assay). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen einen wachstumsfördernden Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinocyten (s. Abschnitt 4.1.1.1) und einen deutlichen zytotoxischen Effekt der UVB-Strahlung (s. Abschnitt 4.2.1.1). Sie sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.1.1).

	Anzahl der Kolonien			
	Versuch 1/ Ansatz 1	Versuch 1/ Ansatz 2	Mittelwert	Standard- Abweichung
0J/cm² Medium	2656	2685	2670,5	20,5060967
0J/cm² Ethanol	2363	2564	2463,5	142,128463
0J/cm² 1,25(OH)₂D₃	1000	735	867,5	187,383297
100J/cm² Medium	1436	1657	1546,5	156,270599
100J/cm² Ethanol	1156	1640	1398	342,239682
100J/cm² 1,25(OH)₂D₃	1094	1130	1112	25,4558441

Tab. 4.2. Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und UVB auf das Wachstum von SCL-1-Zellen (CFUc-Assay). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen einen wachstumshemmenden Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.1.2.1) und einen deutlichen zytotoxischen Effekt der UVB-Strahlung (s. Abschnitt 4.2.2.1). Sie sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.2.1).

a)		100 J/cm ²		Reduktion um:	
Mittelwerte Pyrimidin-Dimere		0h	24h	CPD	%
1,25(OH)sD3		20090,51	6901,13	13189,38	65,65
Ethanol		52493,29	22263,02	50230,27	57,59
b)		1000 J/cm ²		Reduktion um:	
Mittelwerte Pyrimidin-Dimere		0h	24h	CPD	%
1,25(OH)sD3		81712,44	37623,27	44089,17	53,96
Ethanol		85350,11	72341,62	13008,49	15,24

Tab. 4.3. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduziert bis 24h nach UVB-Bestrahlung die Anzahl an Thymidin-Dimeren in HaCaT-Zellen (Dot Blot). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB-Licht bestrahlt (100J/cm²(a) 1000J/cm²(b)). Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der UV-Exposition erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die DNA der Zellen isoliert: 0h, 24h. Die entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) wurden anschließend mit Hilfe von Dot Blot und „Enhanced Chemiluminescence“ quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen in mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten eine geringere Anzahl dieser Strahlenschäden als in den Kontrollen (s. Abschnitt 4.7.1.2).

CFUc-Assay	1,25(OH)2D3 (10 ⁻⁷ M)	UVB (100J)	1,25(OH)2D3 + UVB		
HaCaT	↑	↓	↑		
SCL-1	↓	↓	↑		
WST-1-Assay	1,25(OH)2D3 (10 ⁻⁷ M)	UVB (100-1000J)	1,25(OH)2D3 + UVB	IR (1-5Gy)	1,25(OH)2D3 + IR
HaCaT	↑	↓	↑	↔	↔
SCL-1	↓	↓	↑	↔	↓
CV-Assay	1,25(OH)2D3 (10 ⁻⁷ M)	UVB (100-1000J)	1,25(OH)2D3 + UVB	IR (1-5Gy)	1,25(OH)2D3 + IR
HaCaT	↑	↓	↑	↔	↔
SCL-1	↓	↓	↑	↔	↓
Dot Blot (CPD)	UVB (100-1000J)	1,25(OH)2D3 + UVB			
HaCaT	↑↑	↓↓			
γH2AX-Immunfluoreszenz	IR (1-5Gy)	1,25(OH)2D3 + UVB			
HaCaT	↑↑	↓↓			

Tab. 4.4 Überblick über die zytoprotektiven Eigenschaften von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nach Röntgen- und UV-Strahlung (↑proliferationsfördernde Wirkung, ↓antiproliferative Wirkung, ↔keine erkennbare Wirkung, ↑↑Erhöhung der Strahlenschäden, ↓↓Reduktion der Strahlenschäden). Genauere Angaben zu Versuchsaufbau und Ergebnissen finden sich im Rahmen der Erläuterung der einzelnen Versuche.

4.9 Diagramme

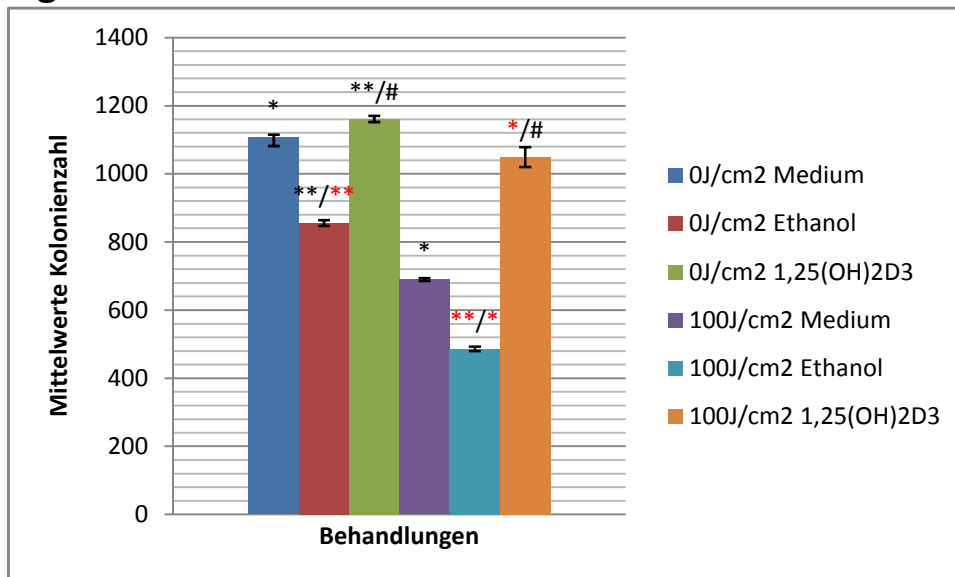
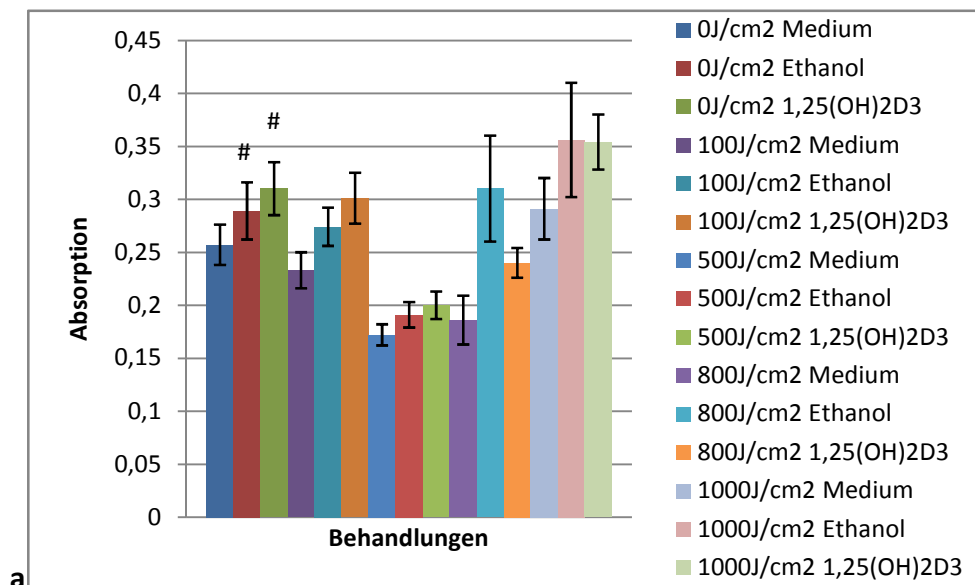
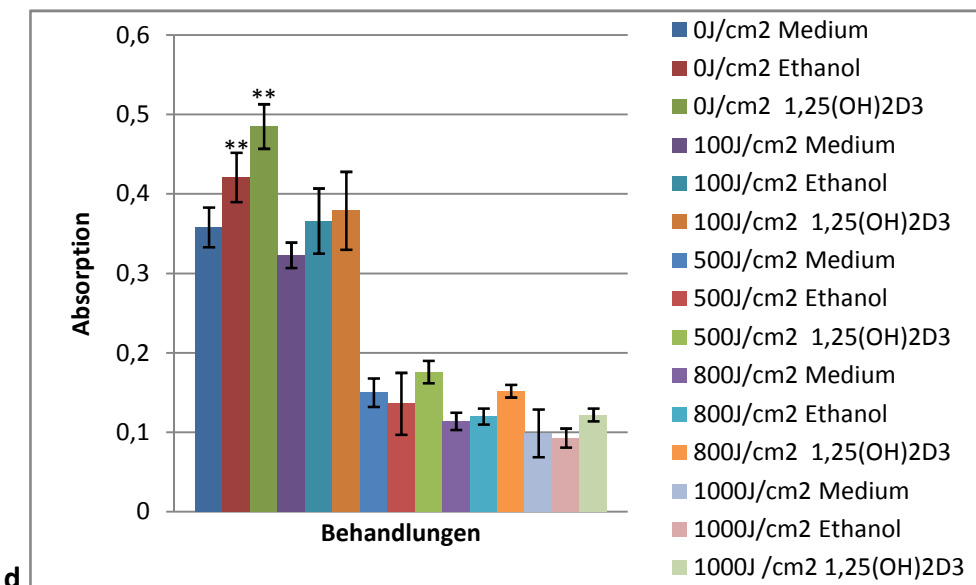
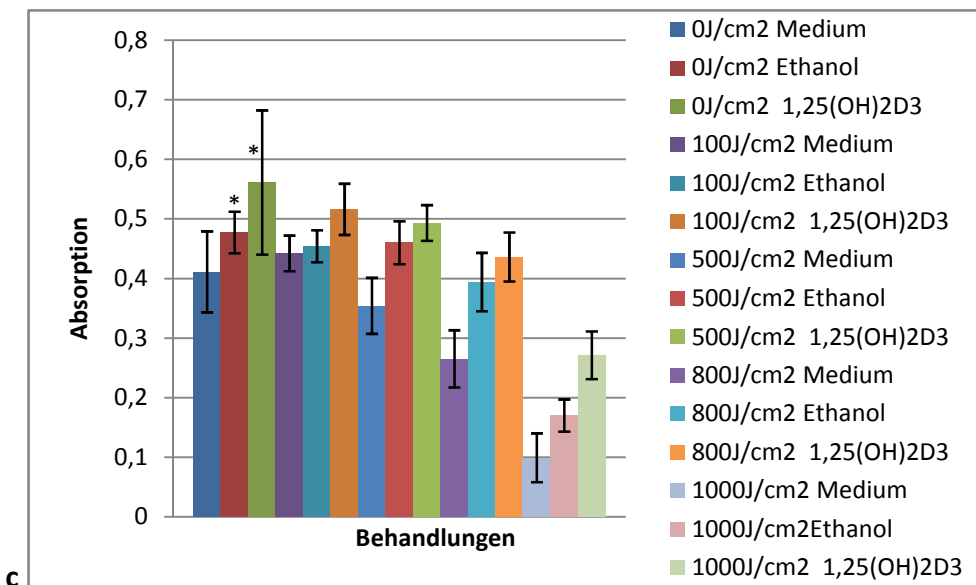
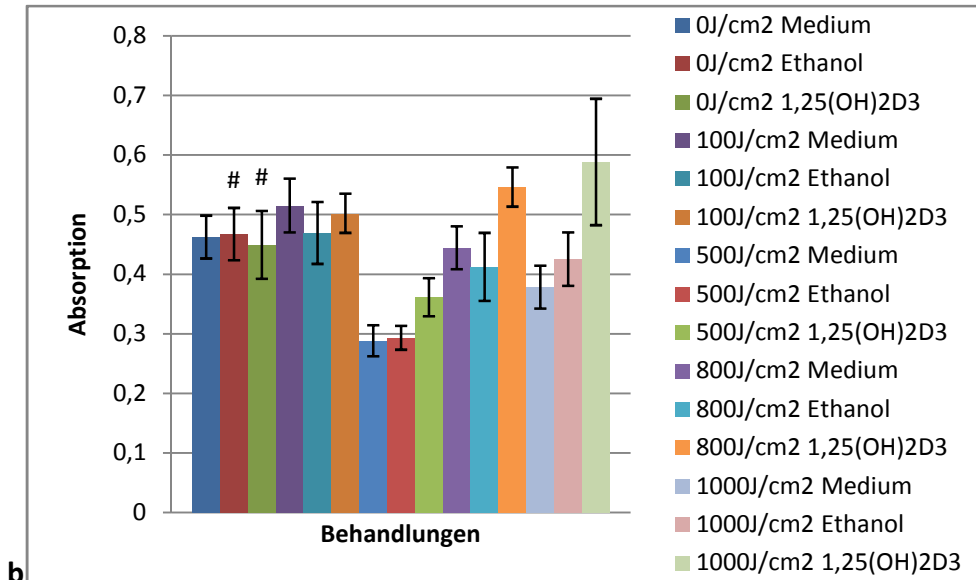


Abb. 4.1. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im CFUc-Assay proliferationsfördernd auf HaCaT-Keratinocyten und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen wachstumsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinocyten (s. Abschnitt 4.1.1.1) und sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.1.1 und 4.2.1.1). Ab einer Dosis von 500J/cm² überwiegt der zytotoxische Effekt der UVB-Strahlung. (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)





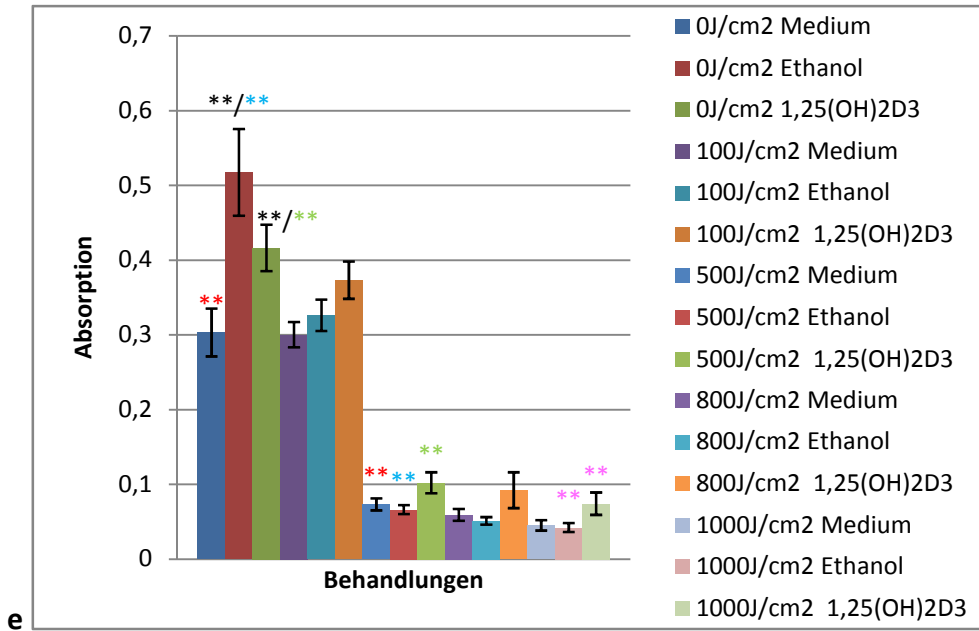
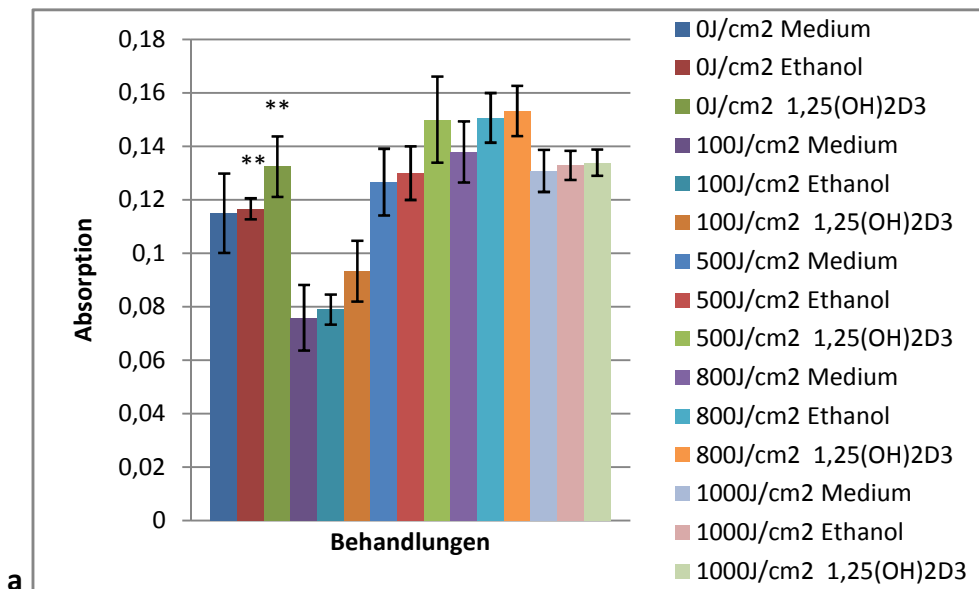
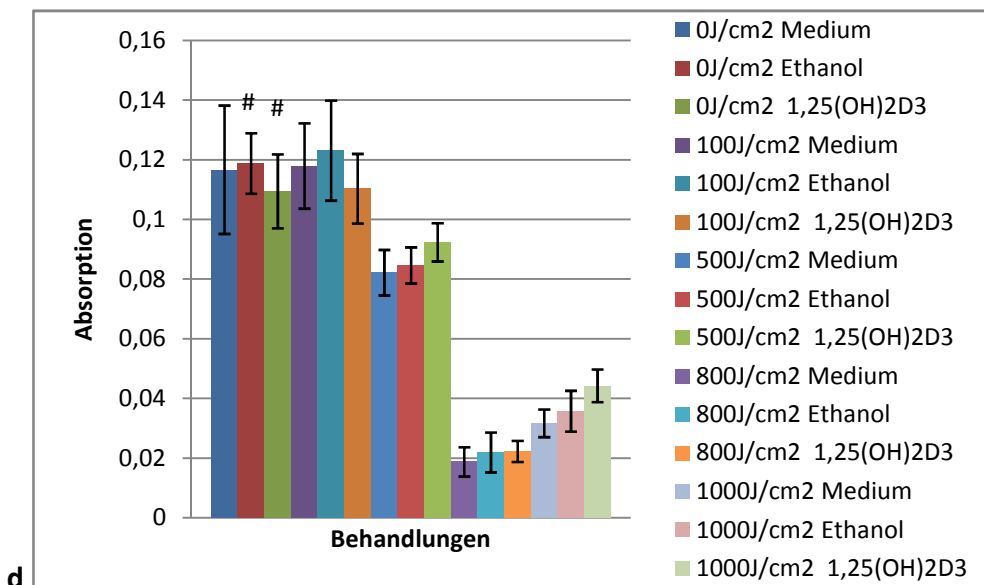
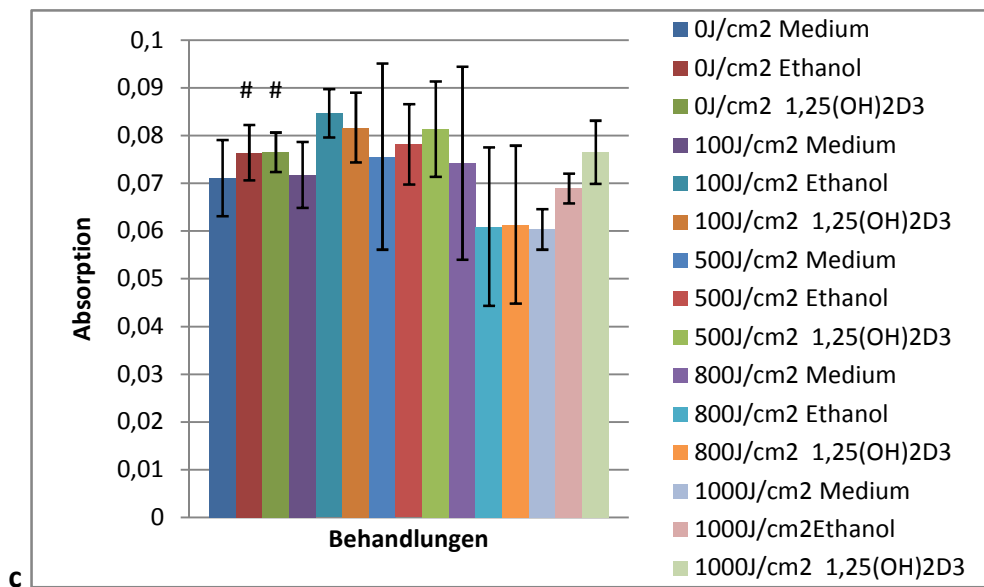
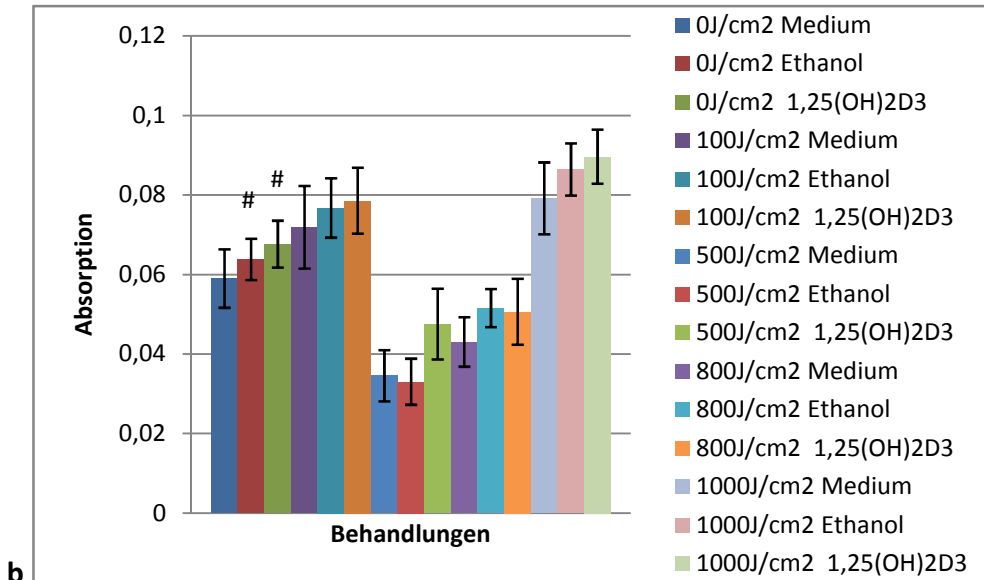


Abb. 4.2. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im WST-1-Assay proliferationsfördernd auf HaCaT-Keratinocyten und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen wachstumsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinocyten (s. Abschnitt 4.1.1.2) und sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm²-1000J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.1.2). 12h nach der Bestrahlung beginnt der NADH-Gehalt der Zellen dosisabhängig ab einer UVB-Dosis von 500J/cm² abzunehmen (s. Abschnitt 4.2.1.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)





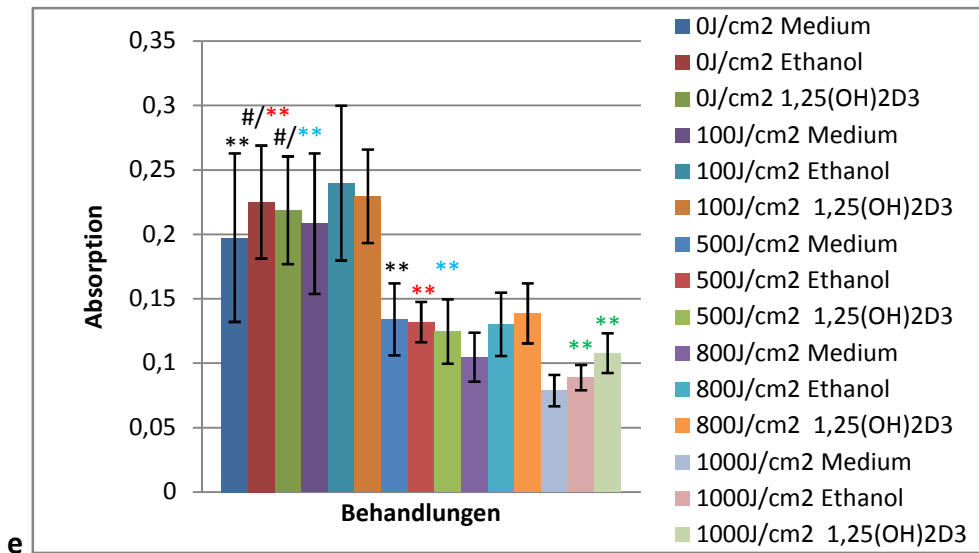


Abb. 4.3. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im Kristallviolett-Assay proliferationsfördernd auf HaCaT-Keratinocyten und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b,) 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Die Ergebnisse sind uneinheitlich, zeigen jedoch 0h nach der Bestrahlung einen signifikanten wachstumsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinocyten (s. Abschnitt 4.1.1.3) und sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm²-1000J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.1.3). 24h nach der Bestrahlung beginnt die Farbstoffaufnahme der Zellen dosisabhängig ab einer UVB-Dosis von 500J/cm² abzunehmen (s. Abschnitt 4.2.1.3). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

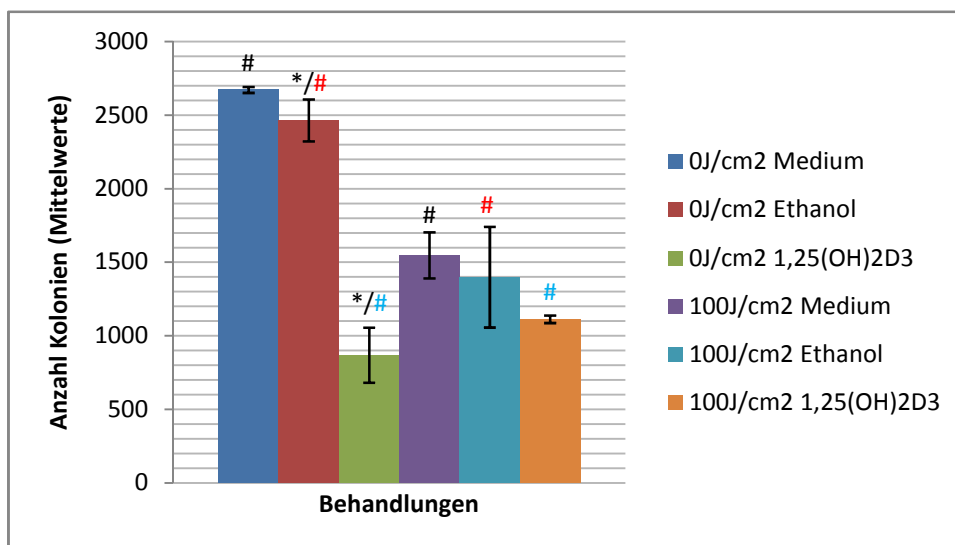
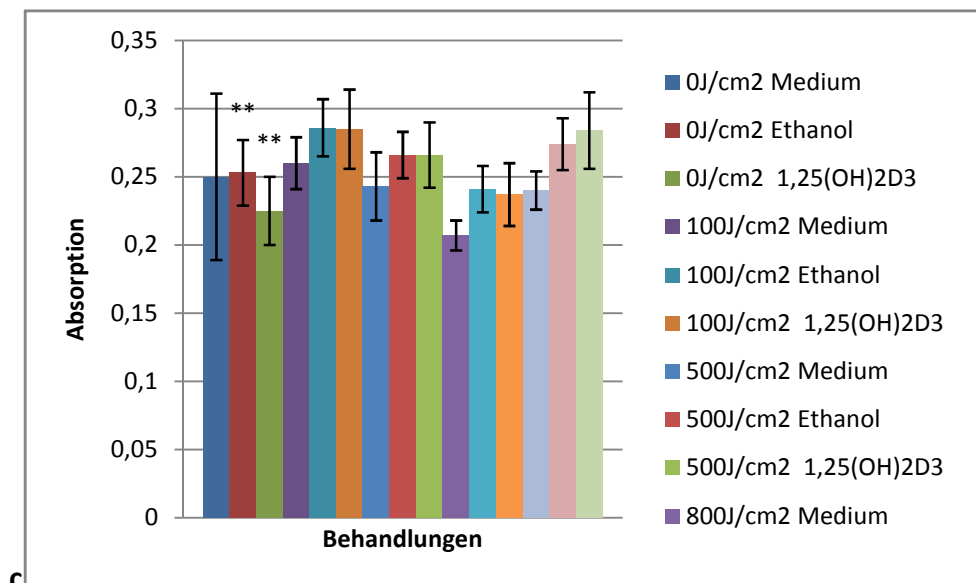
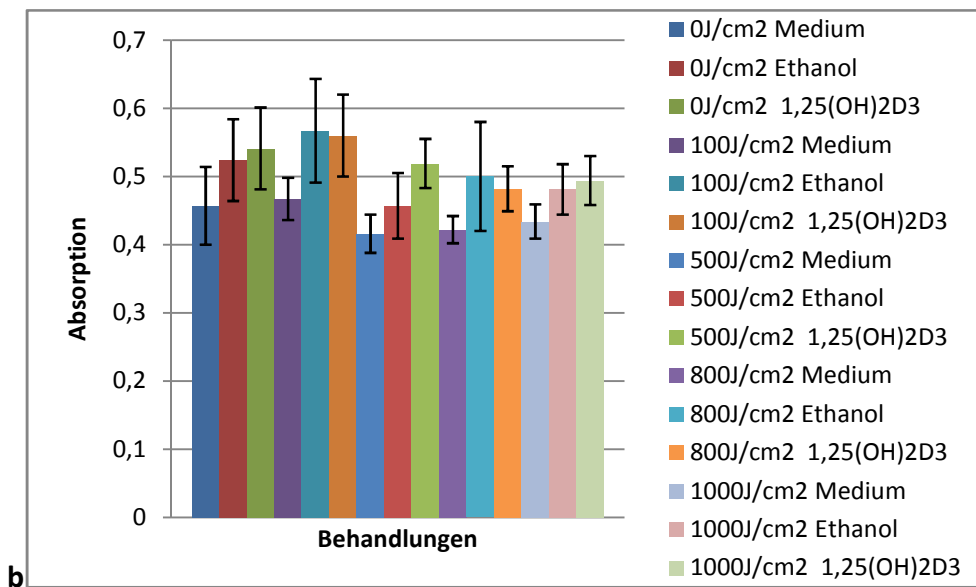
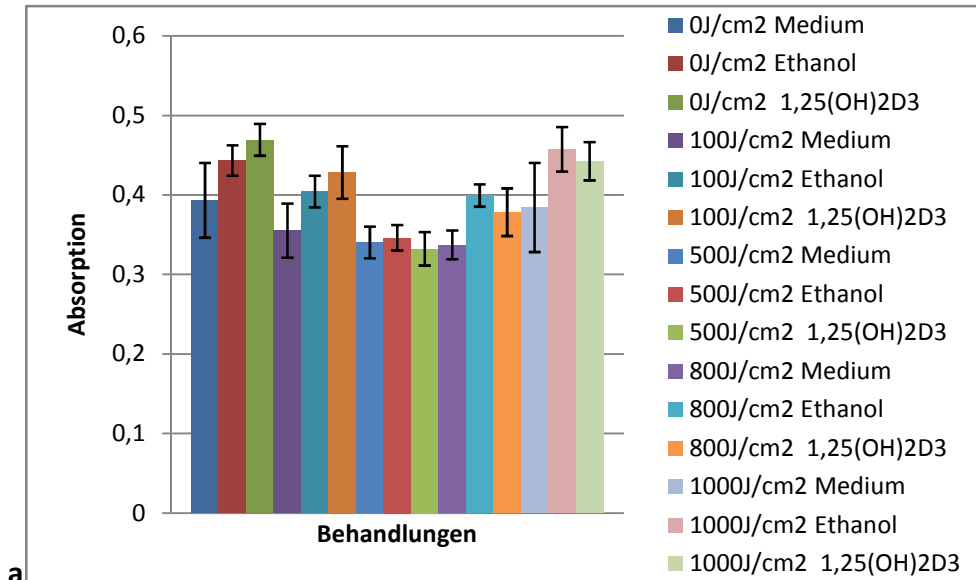


Abb. 4.4. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im CFUc-Assay antiproliferativ auf SCL-1-Zellen und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen einen wachstumshemmenden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.1.2.1) und sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.2.1 und 4.2.2.1). Ab einer Dosis von 500J/cm² überwiegt der zytotoxische Effekt der UVB-Strahlung. (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)



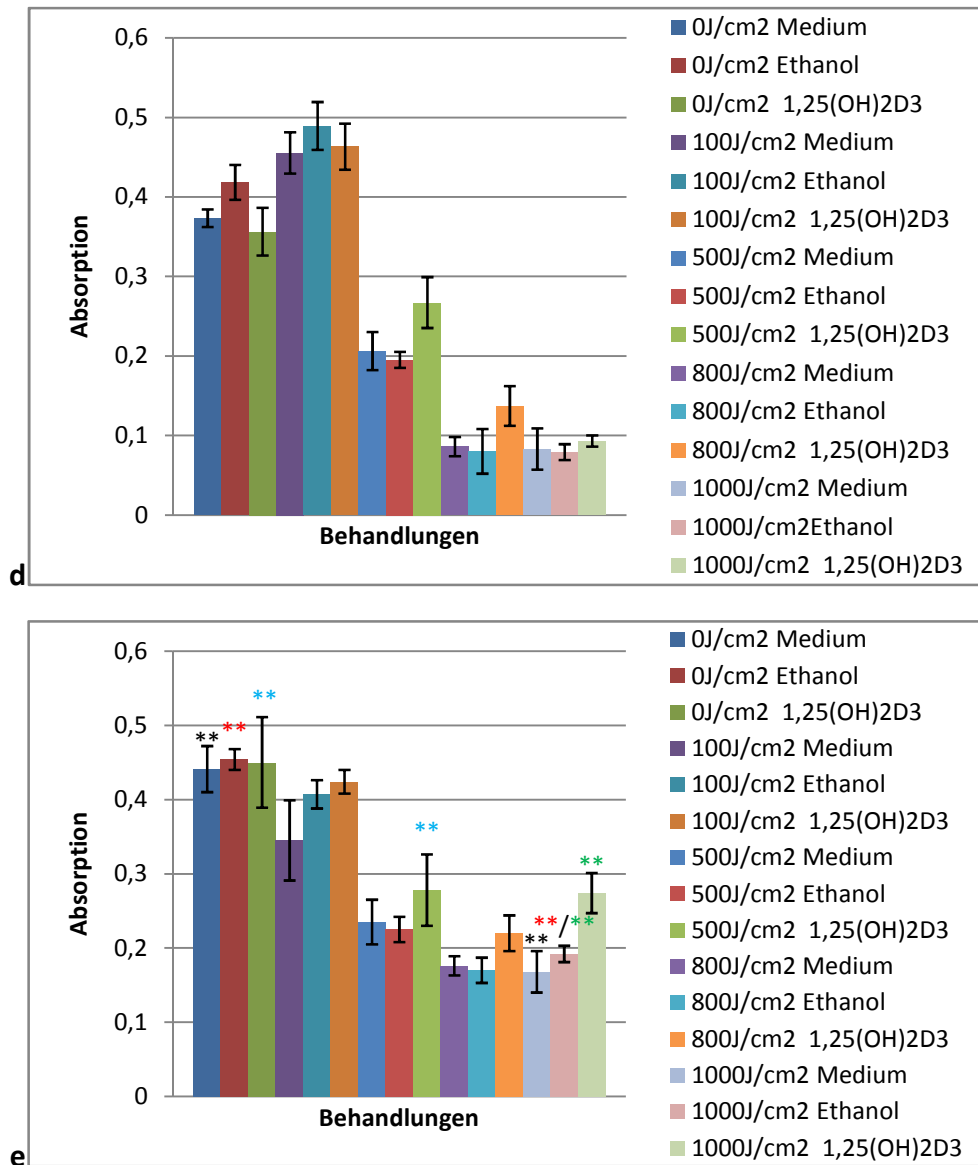


Abb. 4.5. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im WST-1-Assay antiproliferativ auf SCL-1-Zellen und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigen einen wachstumshemmenden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.1.2.2) und sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm²-1000J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.2.2). 24h nach der Bestrahlung beginnt der NADH-Gehalt der Zellen dosisabhängig ab einer UVB-Dosis von 500J/cm² abzunehmen (s. Abschnitt 4.2.2.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

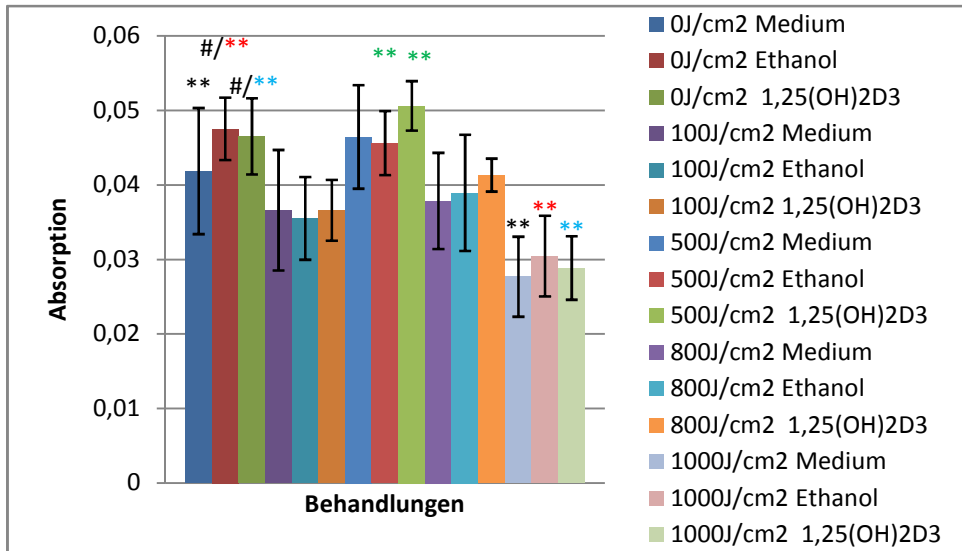
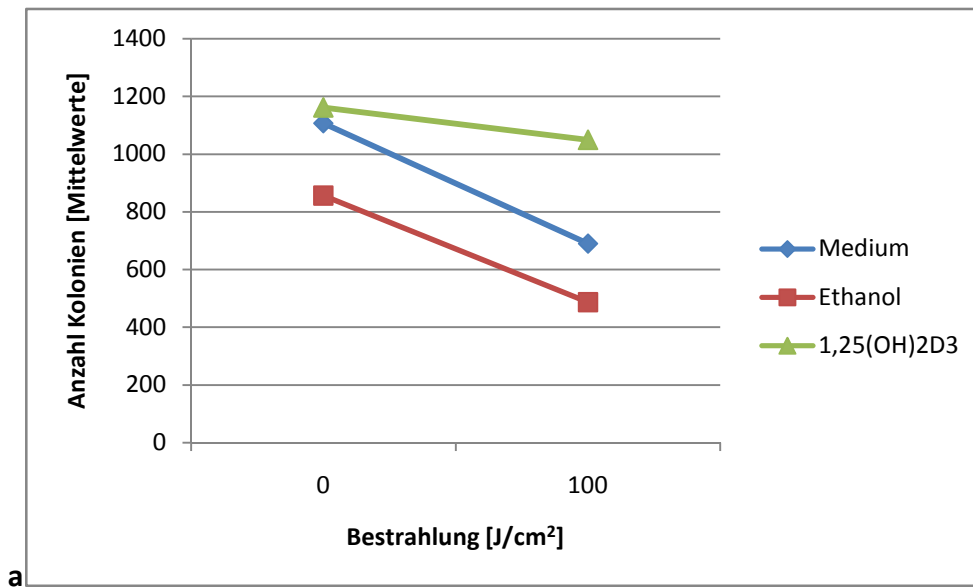


Abb. 4.6. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wirkt im Kristallviolett-Assay antiproliferativ auf SCL-1-Zellen und protektiv gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Hier dargestellt: 48h-Wert. Die Ergebnisse sind uneinheitlich, sprechen jedoch für einen wachstumshemmenden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.1.2.3) und bei einer Bestrahlung mit 100J/cm²-1000J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die Wirkung des UVB-Lichtes (s. Abschnitt 4.3.2.3). Nach Bestrahlung der Zellen mit 1000J/cm² ist im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ein zytotoxischer Effekt des UVB-Lichtes zu erkennen (s. Abschnitt 4.2.2.3). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)



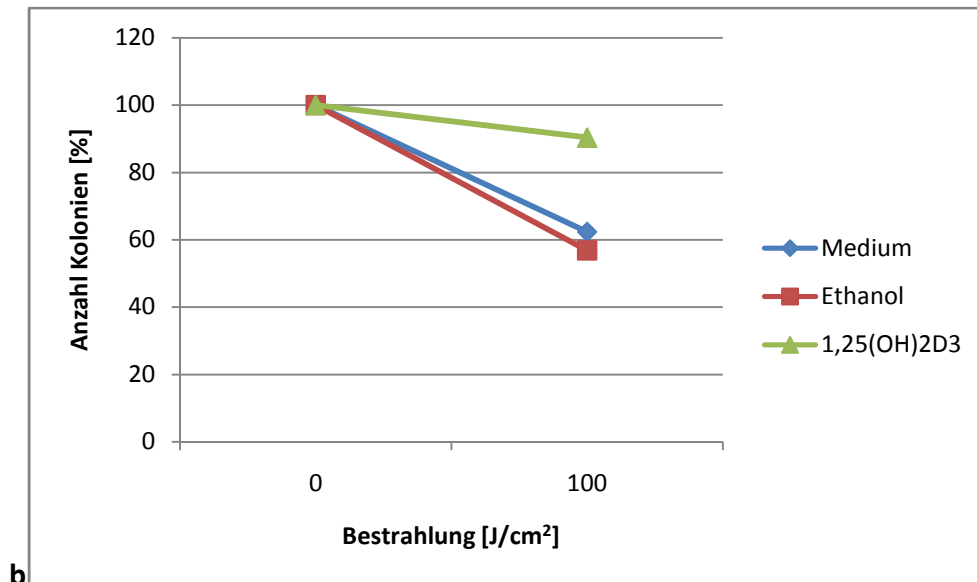
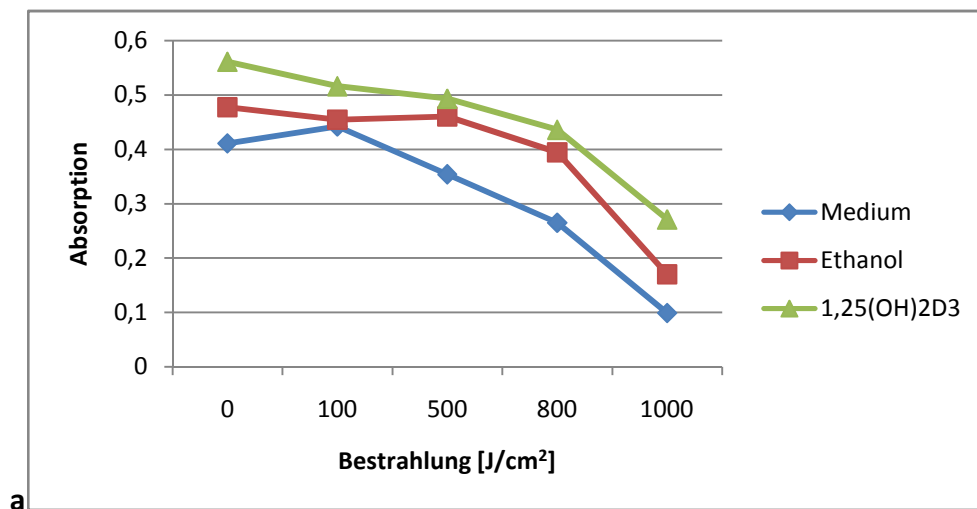


Abb. 4.7. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hemmt den UVB-bedingten, dosisabhängigen Abfall der Kolonienzahl in HaCaT-Zellen im CFUc-Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte (a) sowie der prozentuale Abfall der Kolonienzahl im Vergleich zum Ausgangswert (b). Die Ergebnisse sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung (s. Abschnitt 4.2.1.1 und 4.3.1.1). Ab einer Dosis von 500J/cm² überwiegt der zytotoxische Effekt der UVB-Strahlung.



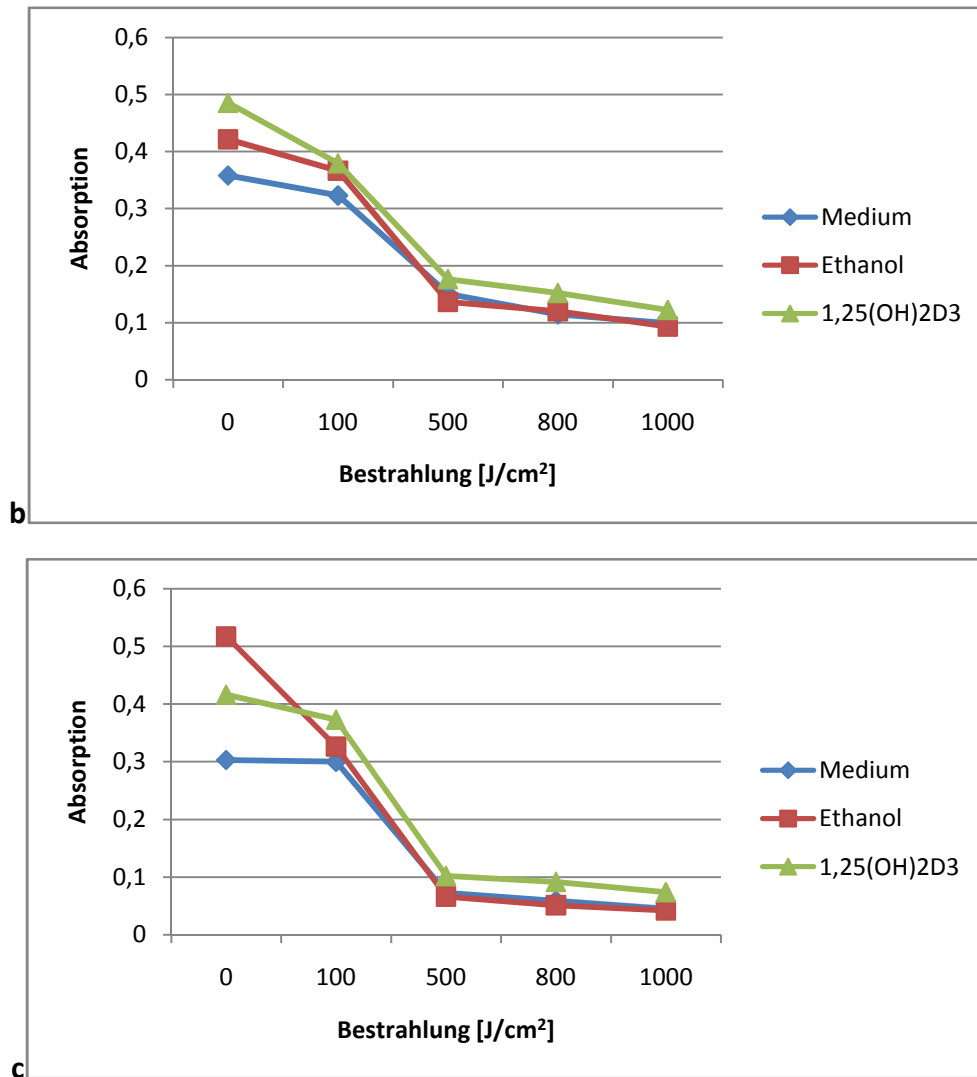


Abb. 4.8. UVB-Licht steigender Dosis führt zu einem dosisabhängigen Abfall der Stoffwechselaktivität im WST-1-Assay der Zelllinie HaCaT. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 12h(a), 24h(b), 48h(c) nach Bestrahlung. UVB-Licht übt in steigender Dosis von 0J/cm²-1000J/cm² einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten aus. Dieser wird 12h nach der Bestrahlung erstmals ersichtlich und ist ab einer UVB-Dosis von 500 J/cm² besonders deutlich (s. Abschnitt 4.2.1.2).

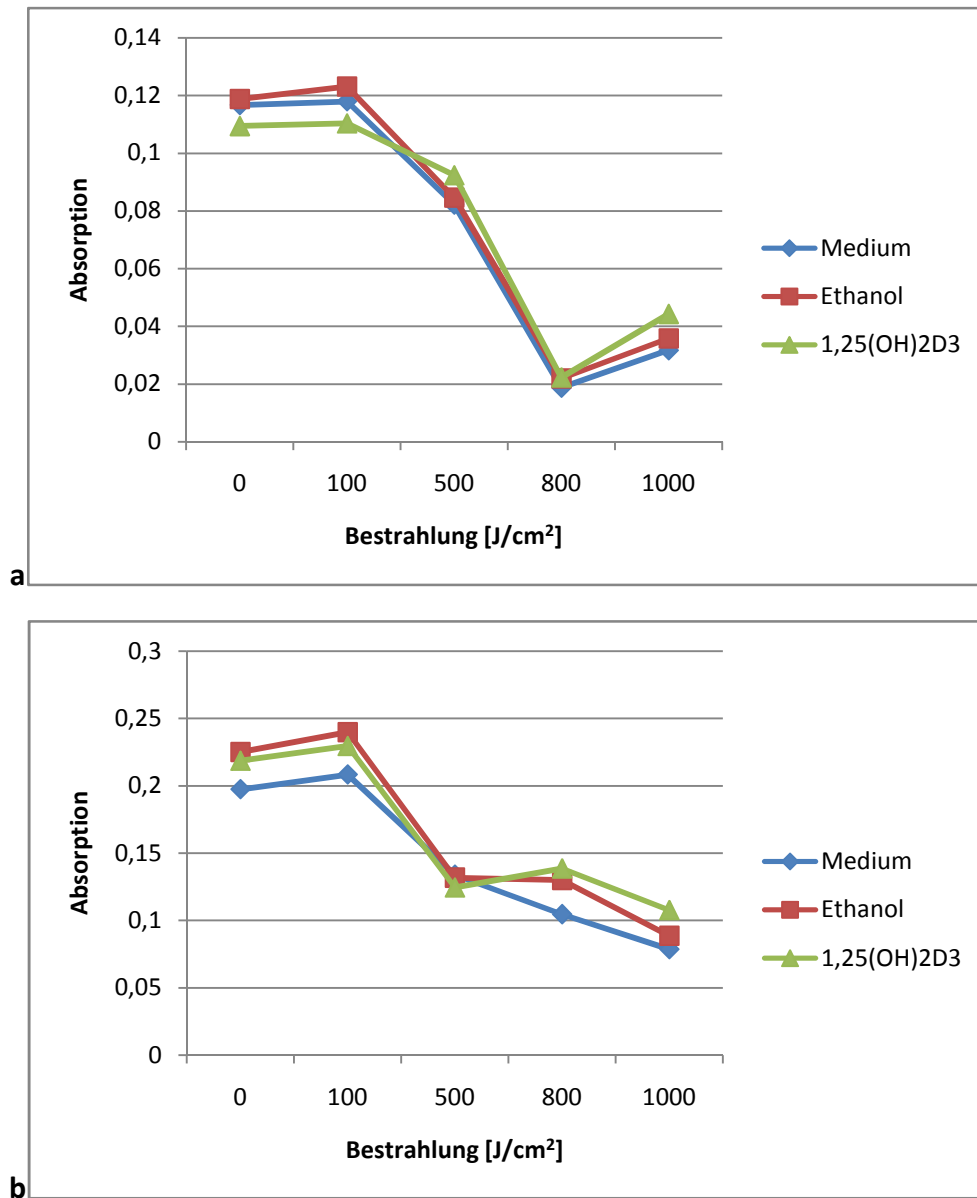


Abb. 4.9. UVB-Licht steigender Dosis führt zu einem dosisabhängigen Abfall der Farbstoffaufnahme im Kristallviolett-Assay der Zelllinie HaCaT. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 24h(a), 48h(b) nach Bestrahlung. UVB-Licht übt in steigender Dosis von 0J/cm²-1000J/cm² einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf HaCaT-Keratinocyten aus. Dieser wird 24h nach der Bestrahlung erstmals ersichtlich und ist ab einer UVB-Dosis von 500 J/cm² besonders deutlich (s. Abschnitt 4.2.1.3).

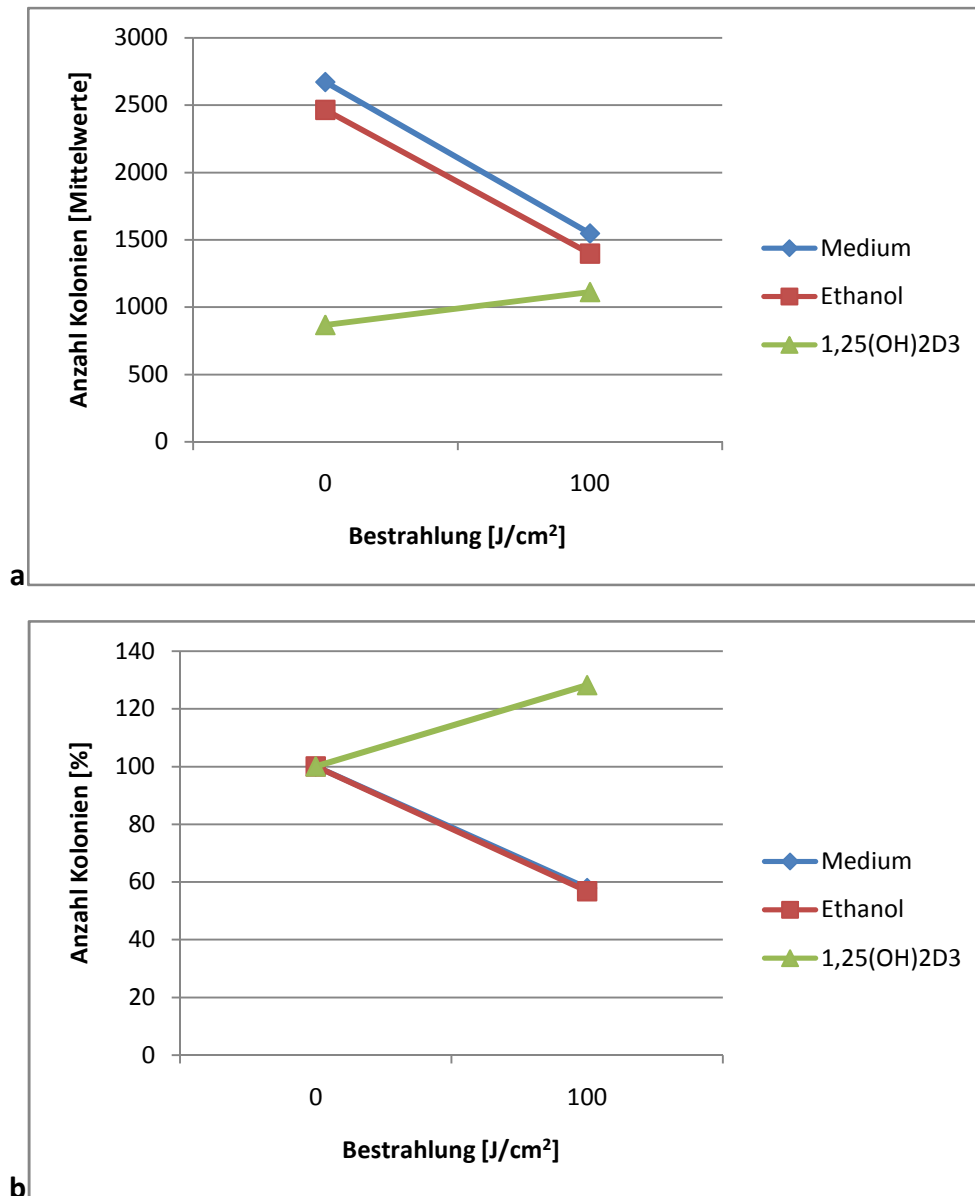


Abb. 4.10. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hemmt den UVB-bedingten, dosisabhängigen Abfall der Kolonienzahl in SCL-1-Zellen im CFUc-Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Die Kolonien wurden nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (post-Bestrahlung) mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte (a) sowie der prozentuale Abfall der Kolonienzahl im Vergleich zum Ausgangswert (b). Die dargestellten Ergebnisse sprechen bei einer Bestrahlung mit 100J/cm² für einen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung (s. Abschnitt 4.2.2.1 und 4.3.2.1). Ab einer Dosis von 500J/cm² überwiegt der zytotoxische Effekt der UVB-Strahlung.

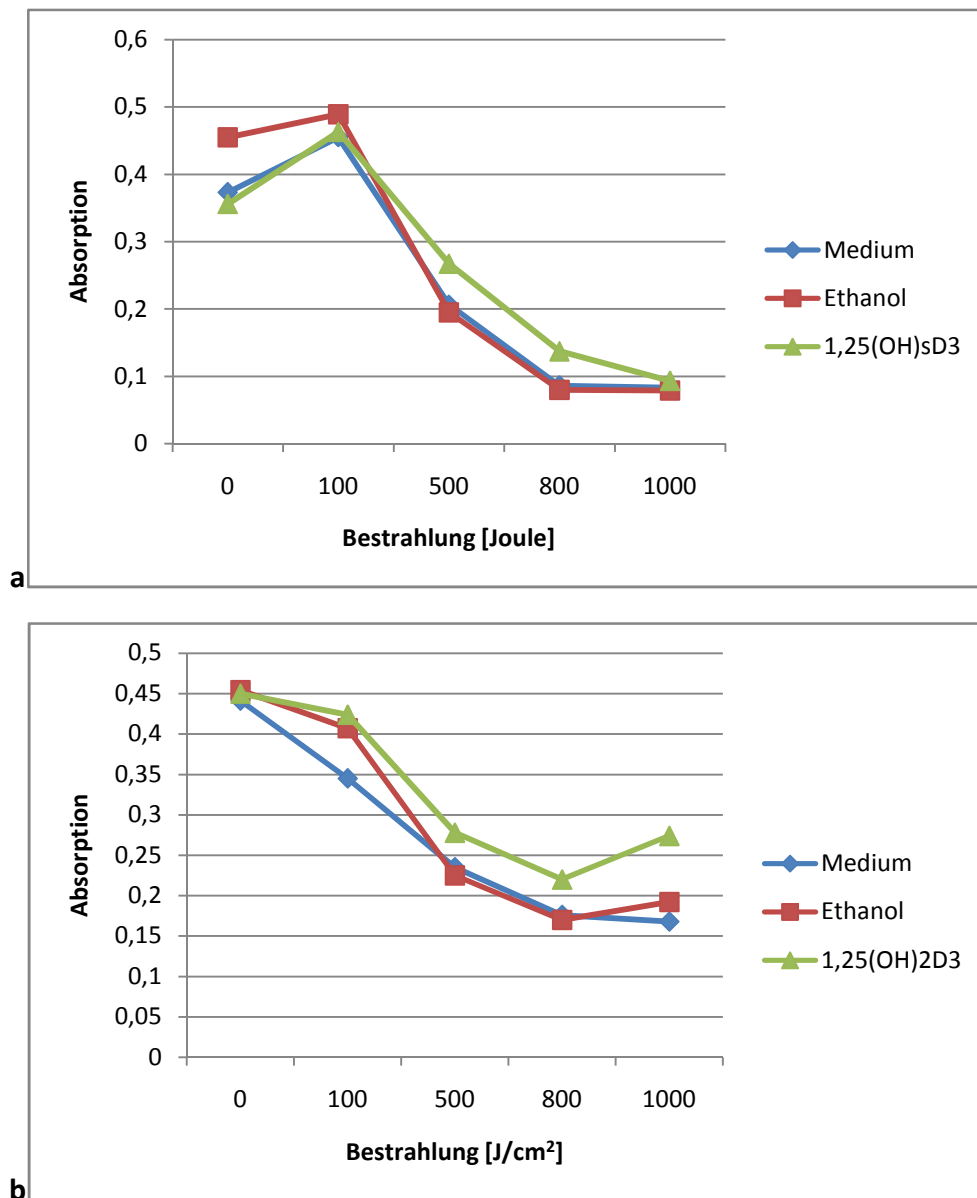


Abb. 4.11. UVB-Licht steigender Dosis führt zu einem dosisabhängigen Abfall der Stoffwechselaktivität im WST-1-Assay der Zelllinie SCL-1. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 24h(a), 48h(b) nach Bestrahlung. UVB-Licht übt in steigender Dosis von 0J/cm²-1000J/cm² einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt auf SCL-1-Zellen aus. Dieser wird 24h nach der Bestrahlung erstmals ersichtlich und ist ab einer UVB-Dosis von 500 J/cm² besonders deutlich (s. Abschnitt 4.2.2.2).

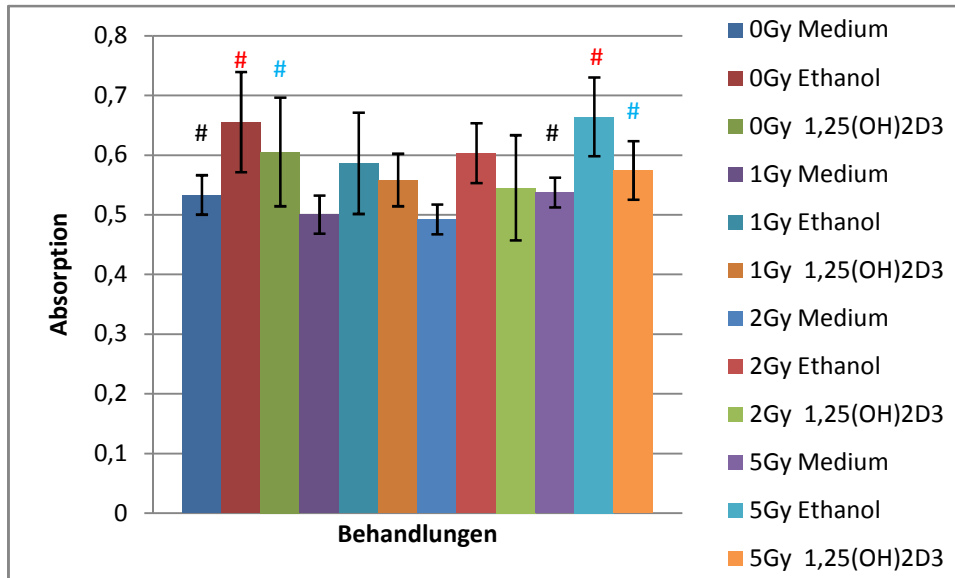


Abb. 4.12. Niedrig-dosierte ionisierende Strahlung hat keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im WST-1 Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit IR (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Hier dargestellt: 48h-Wert. Die Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der ionisierenden Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten. Folglich kann auch kein protektiver Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der IR-Strahlung nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.4.1.1 und 4.5.1.1). (*p<0.05 / **p<0.01/#p>0.05)

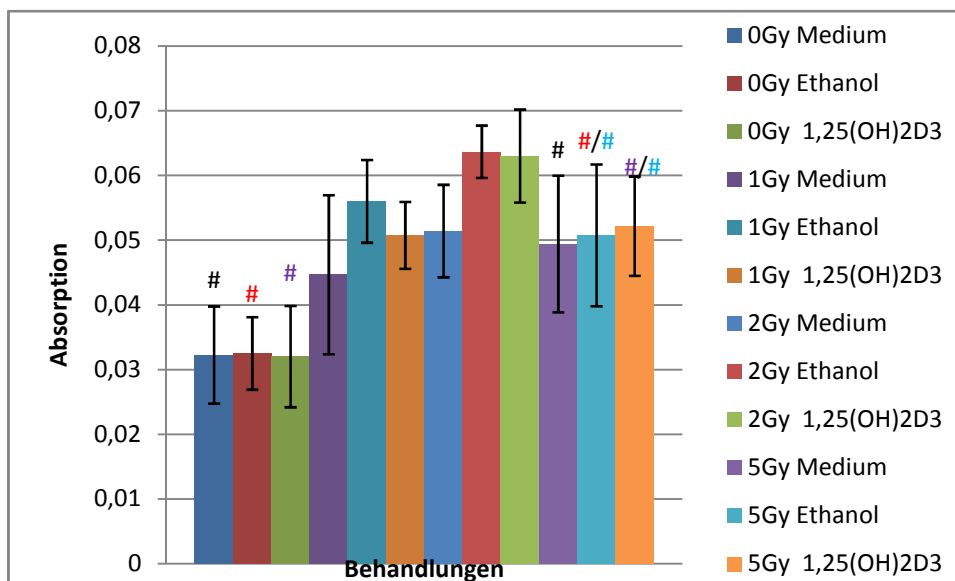


Abb. 4.13. Niedrig-dosierte ionisierende Strahlung hat keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten im Kristallviolett-Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit IR (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Hier dargestellt: 48h-Wert. Die Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der ionisierenden Strahlung auf das Wachstumsverhalten von HaCaT-Keratinocyten. Folglich kann auch kein protektiver Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der IR-Strahlung nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.4.1.2 und 4.5.1.2). (*p<0.05 / **p<0.01/#p>0.05)

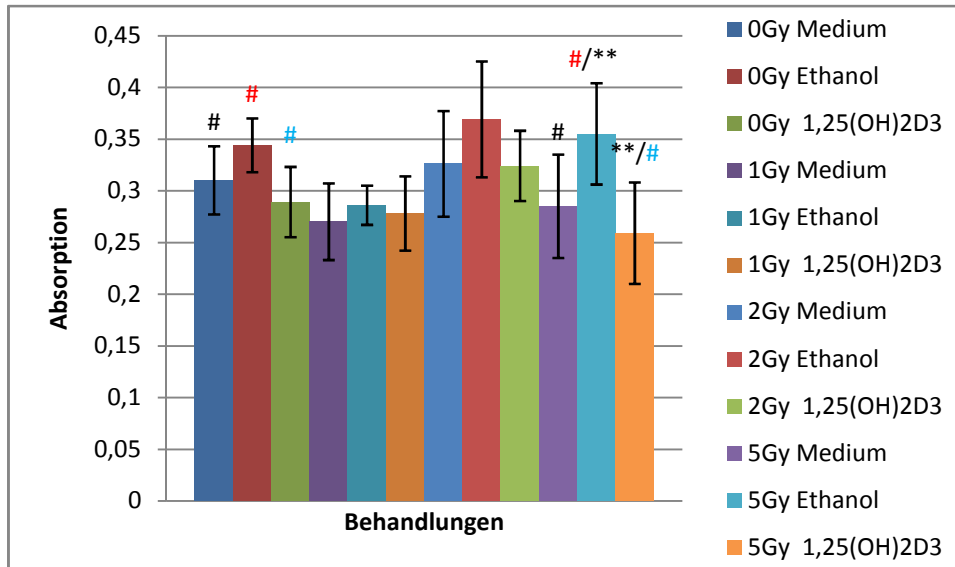


Abb. 4.14. Niedrig-dosierte ionisierende Strahlung hat keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von SCL-1-Zellen im WST-1 Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit IR (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde der NADH-Gehalt der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Hier dargestellt: 48h-Wert. Die Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der ionisierenden Strahlung auf das Wachstumsverhalten SCL-1-Zellen. Folglich kann auch kein protektiver Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der IR-Strahlung nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.4.2.1 und 4.5.2.1). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

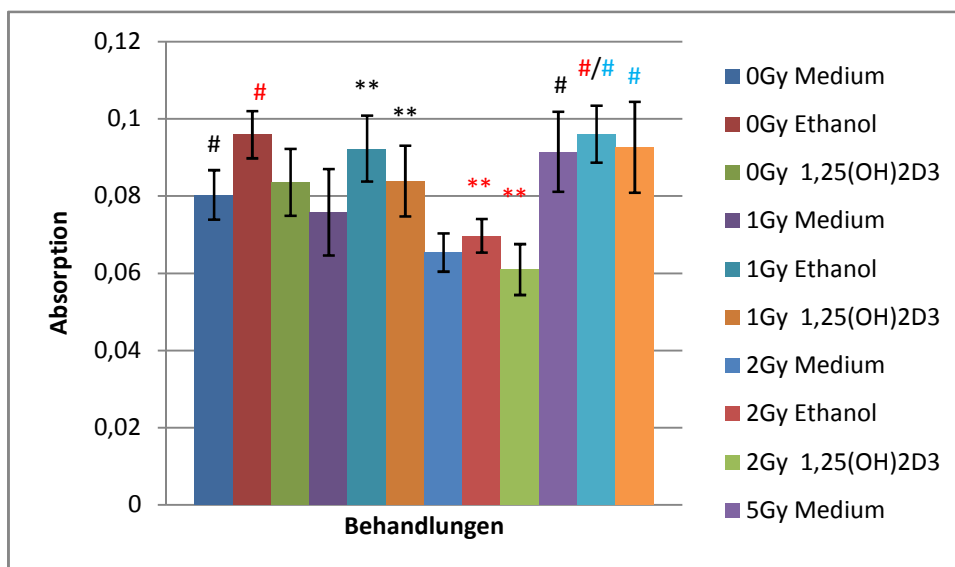


Abb. 4.15. Niedrig-dosierte ionisierende Strahlung hat keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von SCL-1-Zellen im Kristallviolett-Assay. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M), Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit IR (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die Farbstoffaufnahme der Zellen im ELISA-Reader bestimmt: 0h(a), 6h(b), 12h(c), 24h(d) und 48h(e) nach Bestrahlung. Hier dargestellt: 48h-Wert. Die Ergebnisse zeigen keinen Einfluss der ionisierenden Strahlung auf das Wachstumsverhalten SCL-1-Zellen. Folglich kann auch kein protektiver Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der IR-Strahlung nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.4.2.2 und 4.5.2.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

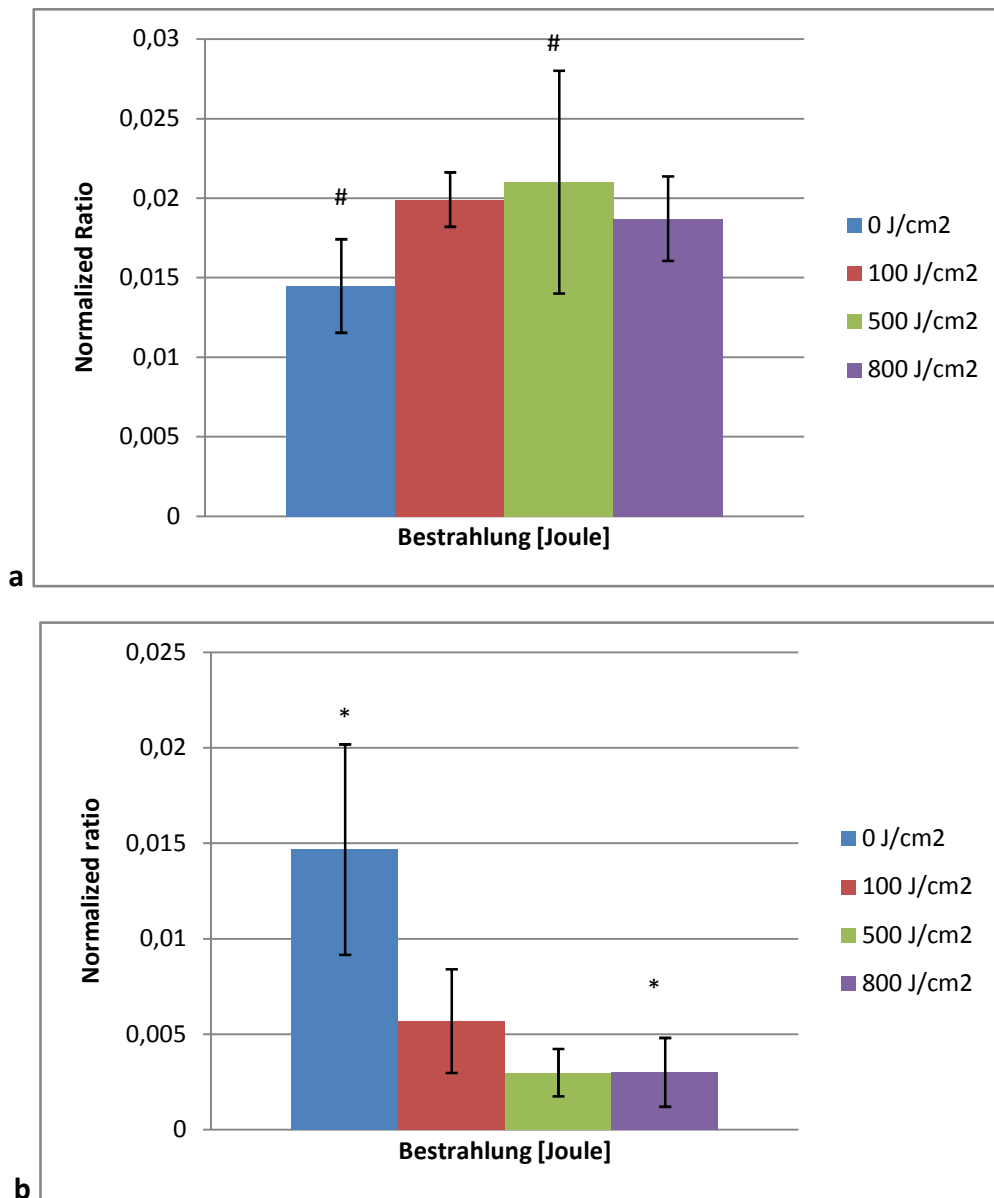


Abb. 4.16. UVB-Licht steigender Dosis führt 24h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die CYP27B1-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt: 3h(**a**) 24h(**b**) nach Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigen 3h nach Bestrahlung einen Anstieg der Expression der CYP27B1-mRNA in HaCaT-Keratinocyten. 24h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA-Expression (s. Abschnitt 4.6.1). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

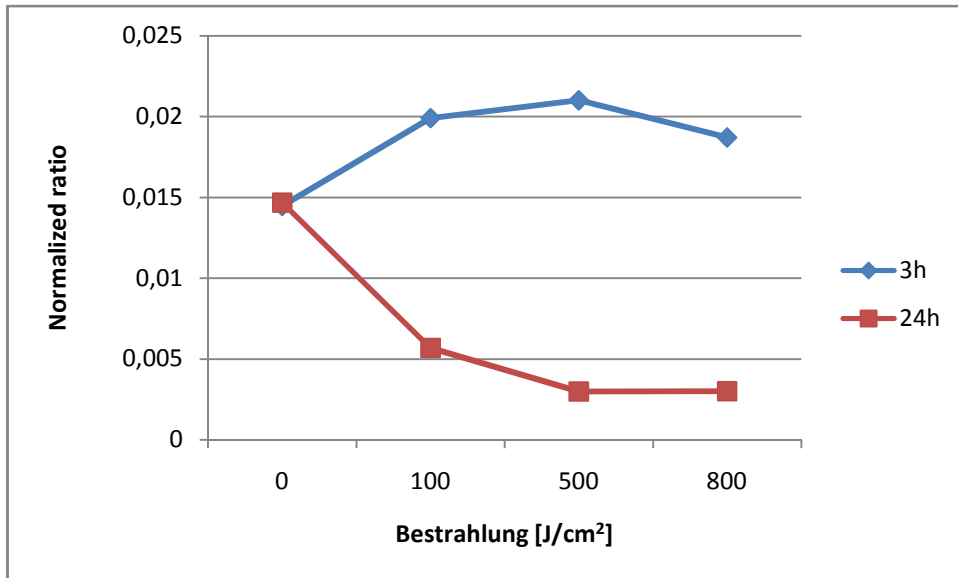
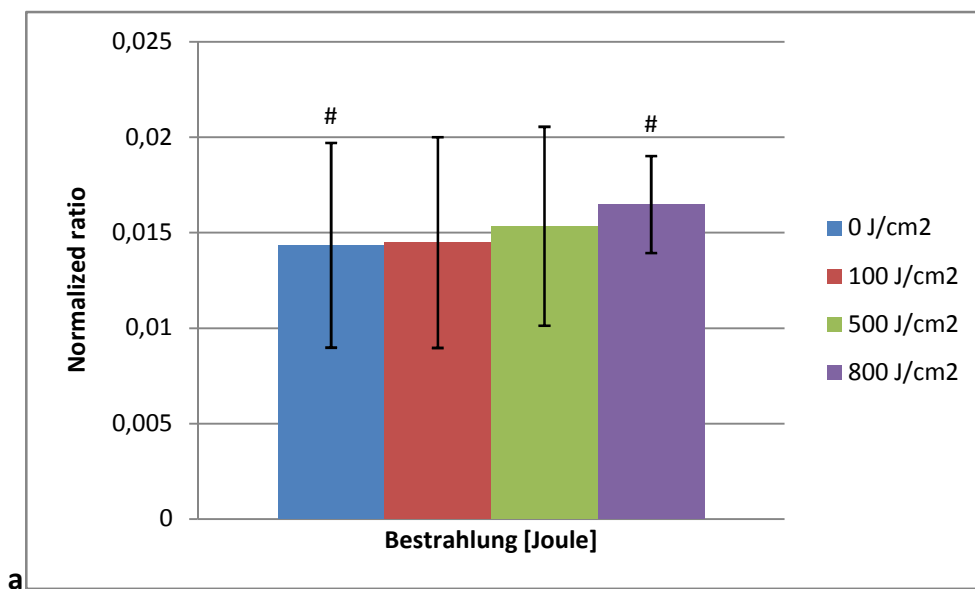


Abb. 4.17. UVB-Licht steigender Dosis führt 24h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. 3h und 24h nach der Bestrahlung wurde die CYP27B1-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt. Die Ergebnisse zeigen 3h nach Bestrahlung einen Anstieg der Expression der CYP27B1-mRNA in HaCaT-Keratinocyten. 24h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA-Expression (s. Abschnitt 4.6.1).



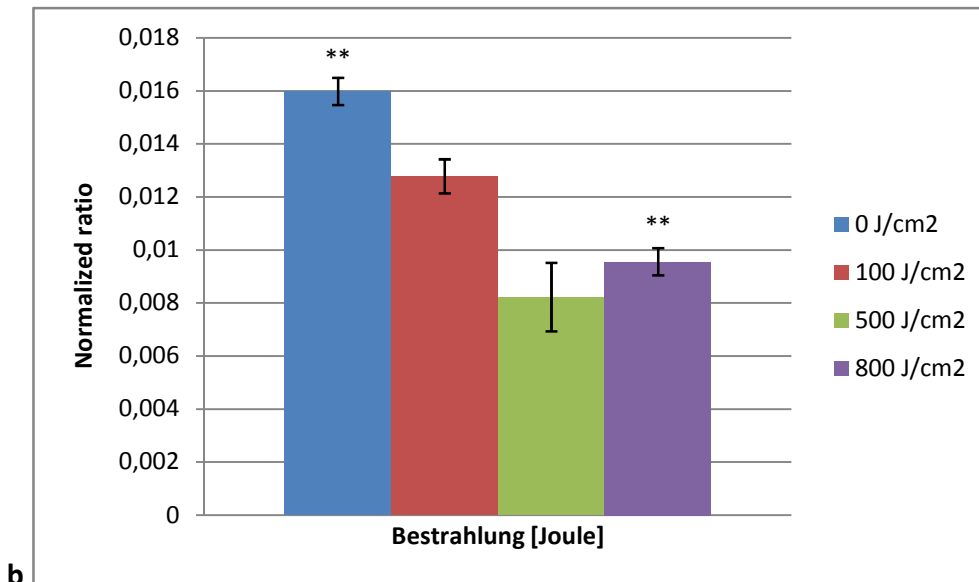


Abb. 4.18. UVB-Licht steigender Dosis führt 24h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die CYP27B1-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt: 3h(a) und 24h(b) nach Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigen 3h nach Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss von UVB-Licht auf die Expression der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. 24h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA-Expression (s. Abschnitt 4.6.1). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

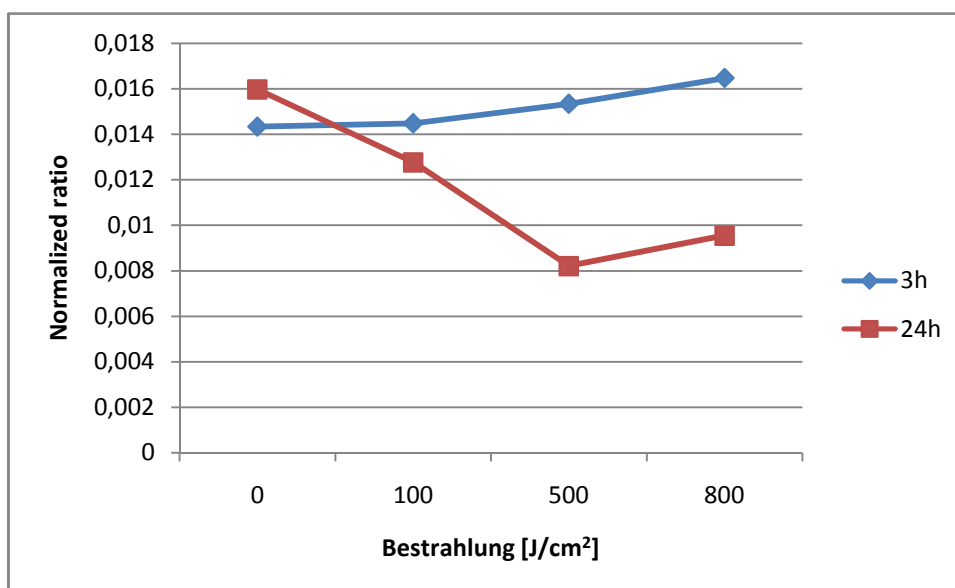


Abb. 4.19. UVB-Licht steigender Dosis führt 24h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. 3h und 24h nach der Bestrahlung wurde die CYP27B1-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt. Die Ergebnisse zeigen 3h nach Bestrahlung keinen signifikanten Einfluss von UVB-Licht auf die Expression der CYP27B1-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. 24h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP27B1-mRNA-Expression (s. Abschnitt 4.6.1).

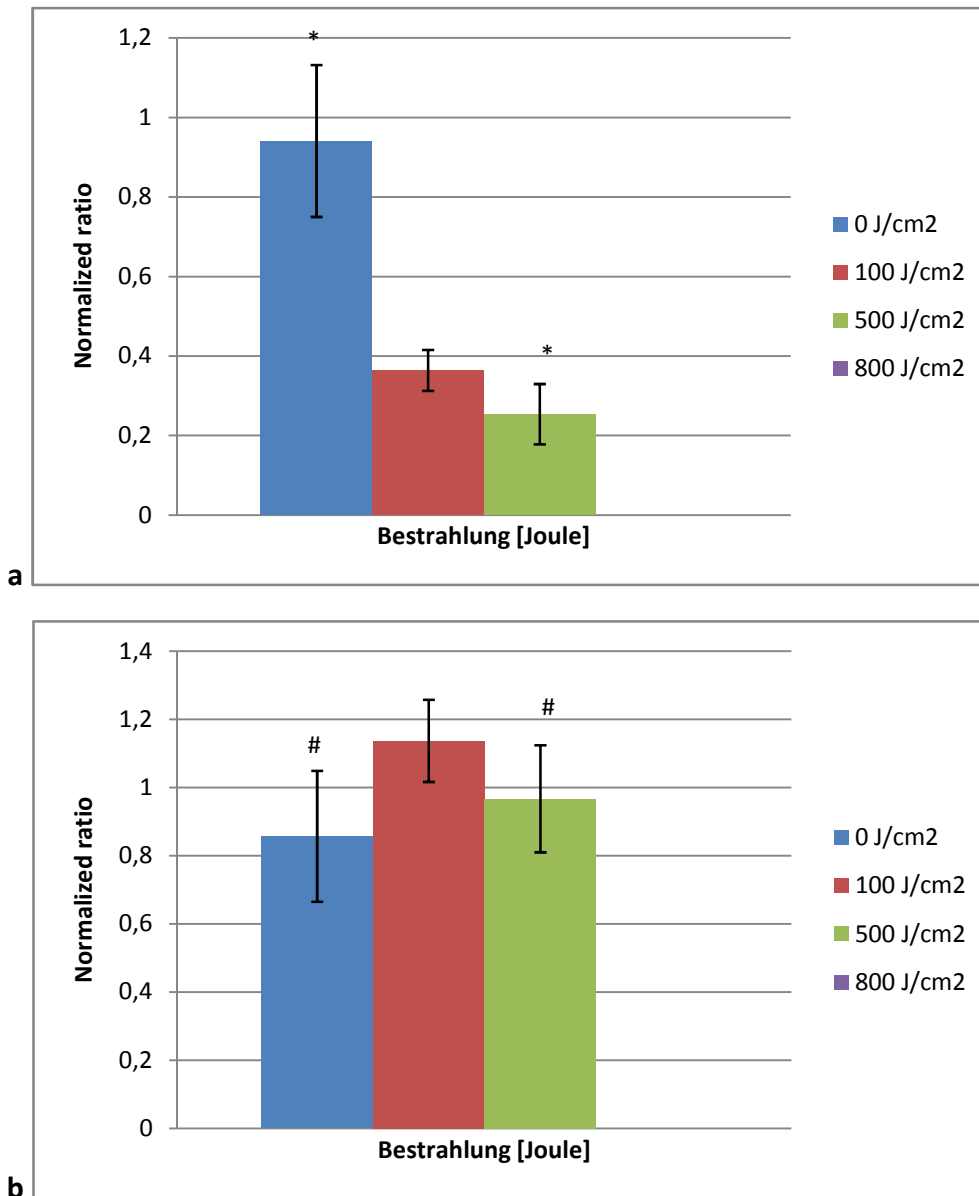


Abb. 4.20. UVB-Licht steigender Dosis führt 3h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die CYP24-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt: 3h(**a**) und 24h(**b**) nach Bestrahlung. 3h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA-Expression. 24h nach der Bestrahlung steigt die CYP24-mRNA-Expression in den HaCaT-Keratinocyten wieder auf den Ausgangswert an (s. Abschnitt 4.6.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

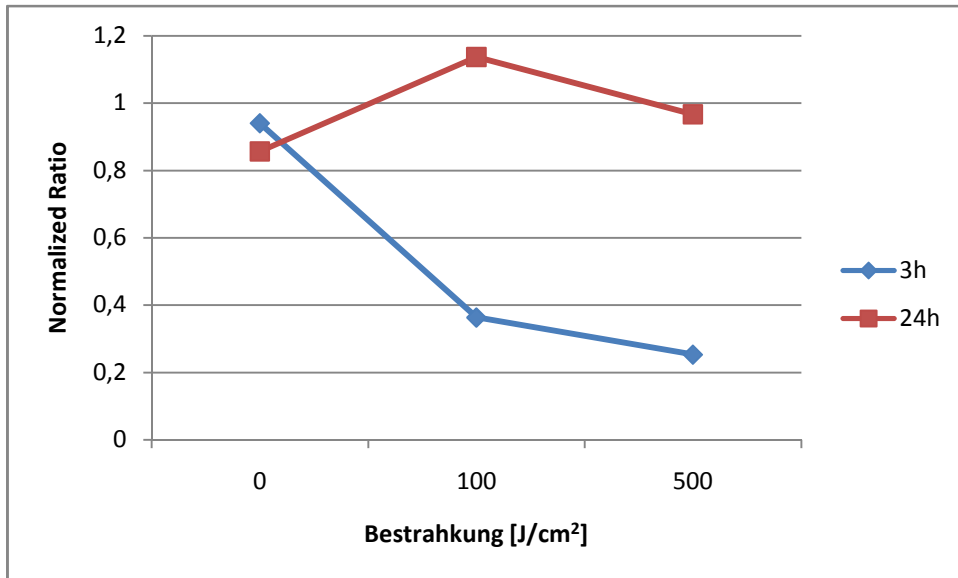
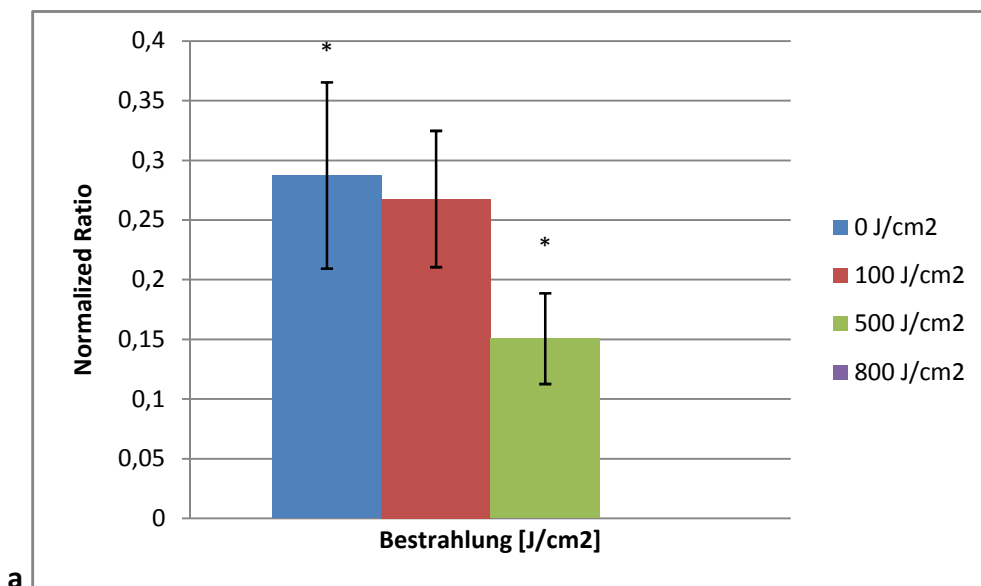


Abb. 4.21. UVB-Licht steigender Dosis führt 3h nach Bestrahlung zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten HaCaT-Keratinocyten. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. 3h und 24h nach der Bestrahlung wurde die CYP24-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt. 3h nach der Bestrahlung kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA-Expression. 24h nach der Bestrahlung steigt die CYP24-mRNA-Expression in den HaCaT-Keratinocyten wieder auf den Ausgangswert an (s. Abschnitt 4.6.2).



a

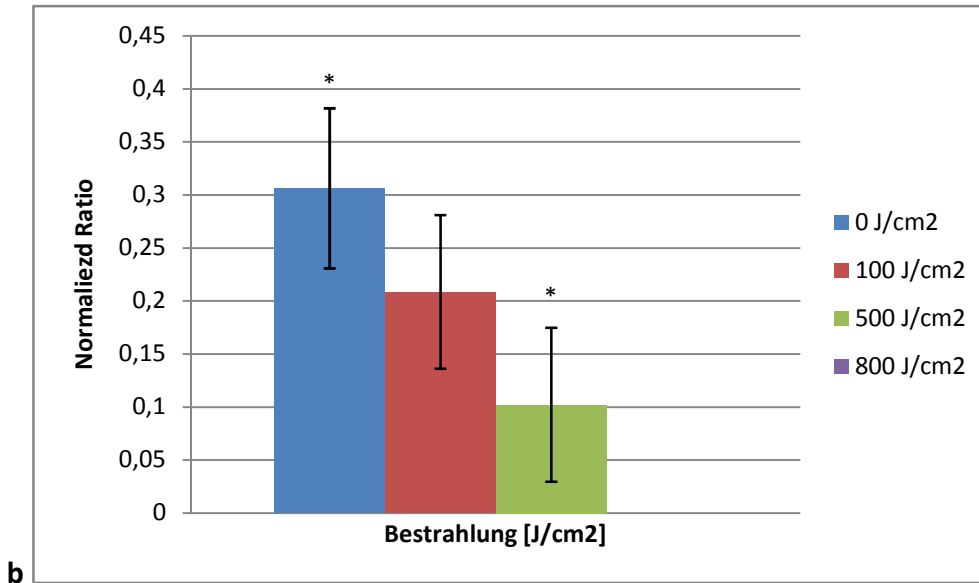


Abb. 4.22. UVB-Licht steigender Dosis führt zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die CYP24-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt: 3h(a) und 24h(b) nach Bestrahlung. Die Ergebnisse zeigen sowohl 3h als auch 24h nach UVB-Bestrahlung eine dosisabhängige Abnahme der CYP24-mRNA-Expression in SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.6.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

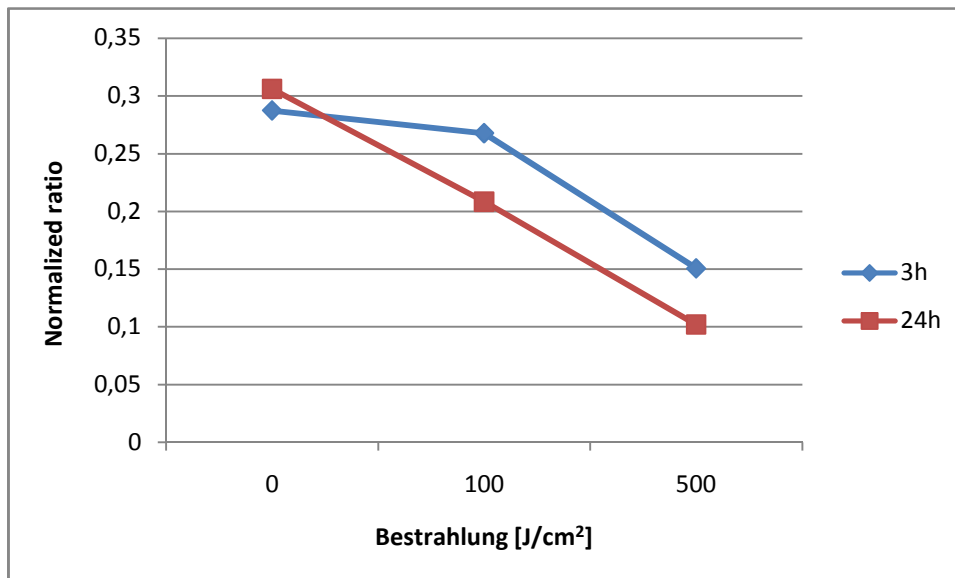


Abb. 4.23. UVB-Licht steigender Dosis führt zu einem dosisabhängigen Abfall der CYP24-mRNA in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen. Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-800J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃) wurde nach der Bestrahlung erneuert. 3h und 24h nach der Bestrahlung wurde die CYP24-mRNA der Zellen im Light Cycler bestimmt. Die Ergebnisse zeigen sowohl 3h als auch 24h nach UVB-Bestrahlung eine dosisabhängige Abnahme der CYP24-mRNA-Expression in SCL-1-Zellen (s. Abschnitt 4.6.2).

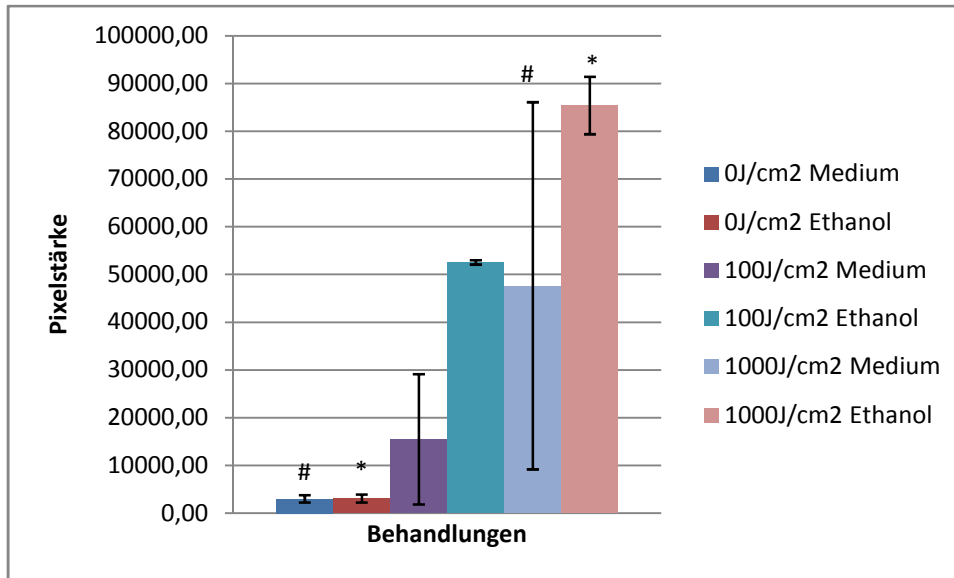


Abb. 4.24. UVB-Bestrahlung führt dosisabhängig zu einer Zunahme der Anzahl an Thymidin-Dimeren in HaCaT-Zellen (Dot Blot). Die Zellen wurden 48h mit Ethanol oder reinem Medium vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich Ethanol) wurde nach der UV-Exposition erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die DNA der Zellen isoliert: 0h, 1h, 3h und 24h. Die entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) wurden anschließend mit Hilfe von Dot Blot und „Enhanced Chemiluminescence“ quantifiziert. Hier dargestellt: 0h-Wert. Die Ergebnisse zeigen eine mit steigender UVB-Dosis zunehmende Anzahl an Thymidin-Dimeren (s. Abschnitt 4.7.1.1). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

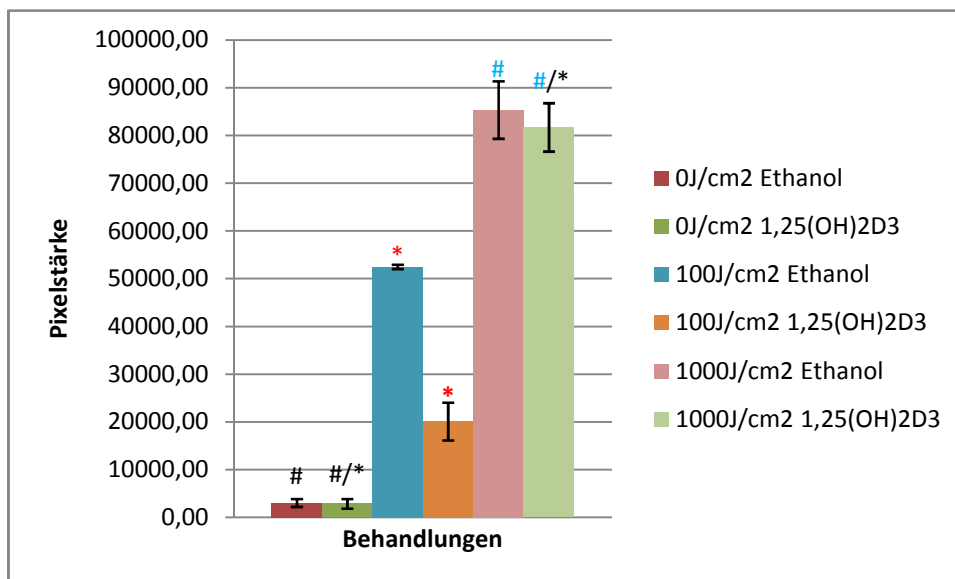


Abb. 4.25. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduziert die Anzahl an UVB-induzierten Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten (Dot Blot). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB (0J/cm²-1000J/cm²) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der UV-Exposition erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die DNA der Zellen isoliert: 0h, 1h, 3h, 24h. Die entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) wurden anschließend mit Hilfe von Dot Blot und „Enhanced Chemiluminescence“ quantifiziert. Hier dargestellt: 0h-Wert. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Anzahl an UVB-bedingt entstanden CPDs nach Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (s. Abschnitt 4.7.1.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

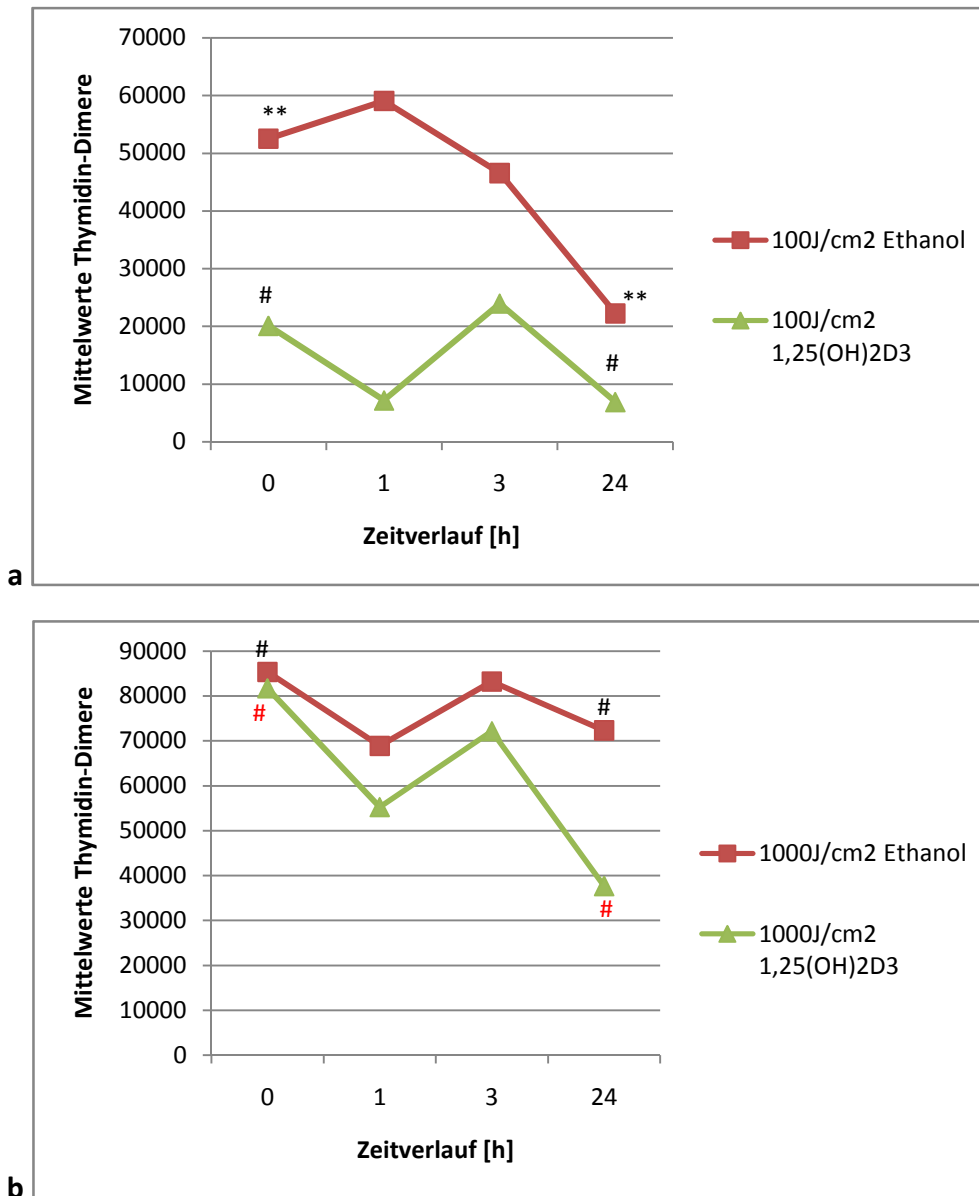


Abb. 4.26. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduziert 24h nach UVB-Bestrahlung die Anzahl an Thymidin-Dimeren in HaCaT-Zellen (Dot Blot). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit UVB-Licht bestrahlt (a)100J/cm² b)1000J/cm²). Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der UV-Exposition erneuert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurde die DNA der Zellen isoliert: 0h, 1h, 3h, 24h. Die entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) wurden anschließend mit Hilfe von Dot Blot und „Enhanced Chemiluminescence“ quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass in mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten weniger Strahlenschäden vorliegen als in den Kontrollen (s. Abschnitt 4.7.1.2). (*p<0.05 / **p<0.01/#p>0.05)

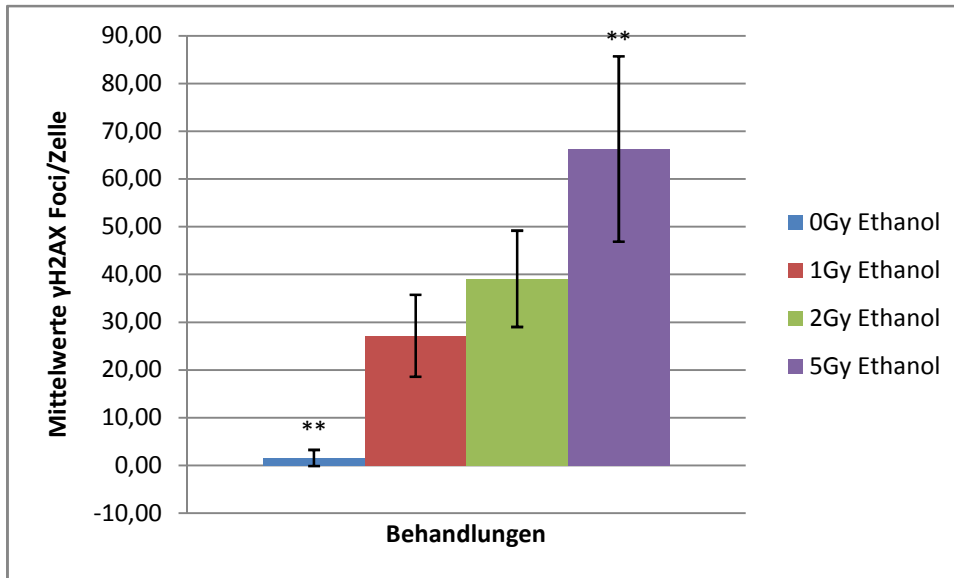


Abb. 4.27. IR-Bestrahlung führt dosisabhängig zu einer Zunahme der Anzahl an γ H2AX-Foci in HaCaT-Zellen (Immunfluoreszenz). Die Zellen wurden 48h mit Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit ionisierender Strahlung (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich Ethanol) wurde nach der IR-Exposition ausgetauscht. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurden die entstandenen γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz markiert und ausgezählt: 30min, 2h, 6h und 12h. Hier dargestellt: 2h-Wert. Die Ergebnisse zeigen eine mit steigender IR-Dosis zunehmende Anzahl an γ H2AX-Foci (s. Abschnitt 4.7.2.1). (* $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / # $p > 0,05$)

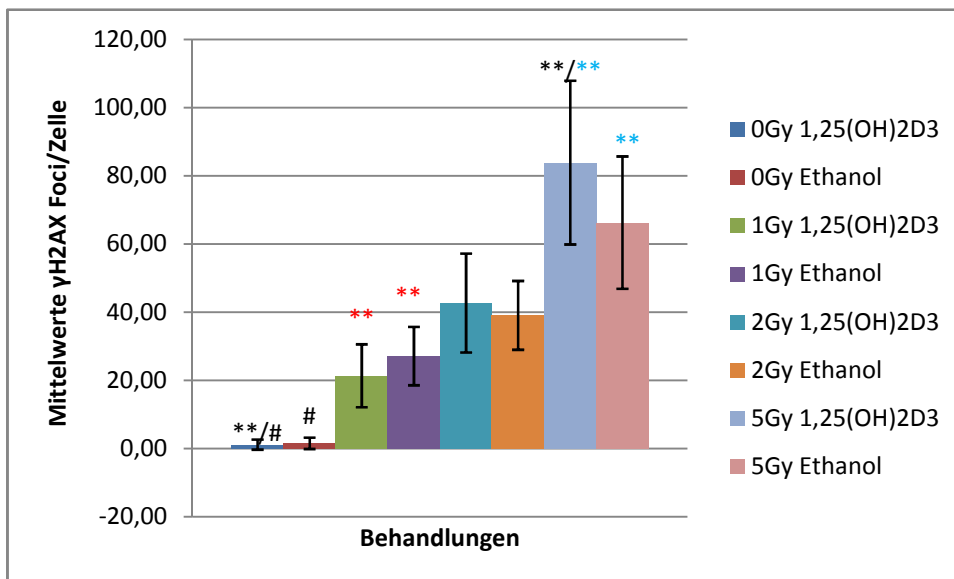


Abb. 4.28. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduziert die Anzahl von IR-induzierten γ H2AX-Foci in HaCaT-Keratinocyten (Immunfluoreszenz). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit ionisierender Strahlung (0Gy-5Gy) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der IR-Exposition ausgetauscht. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurden die entstandenen γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz markiert und ausgezählt: 30min, 2h, 6h und 12h. Hier dargestellt: 2h-Wert. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Anzahl an IR-bedingt entstanden γ H2AX-Foci nach Vorbehandlung der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (s. Abschnitt 4.7.2.2). (* $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$ / # $p > 0,05$)

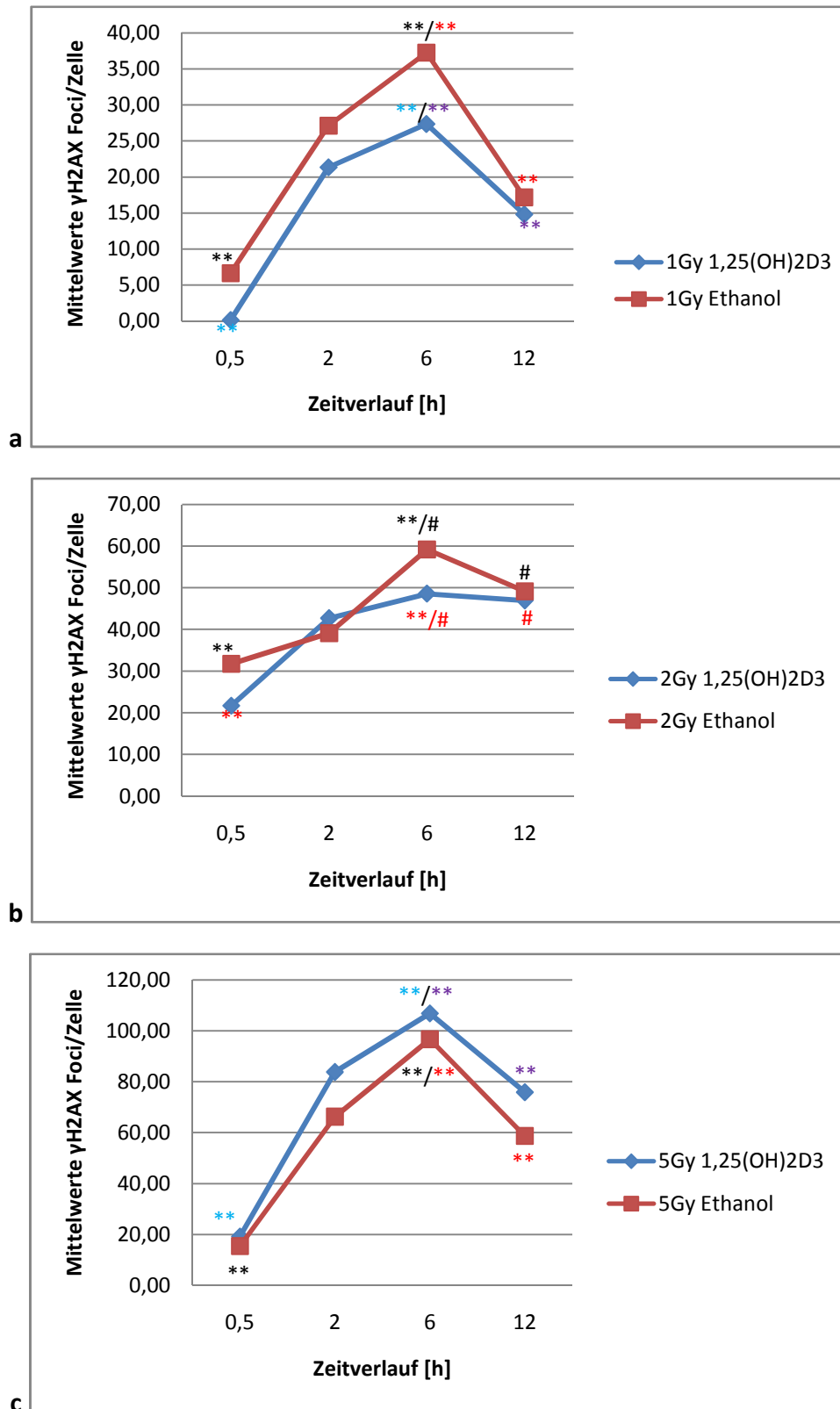


Abb. 4.29. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduziert 12h nach IR-Bestrahlung die Anzahl von γH2AX-Foci in HaCaT-Zellen (Immunfluoreszenz). Die Zellen wurden 48h mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder Ethanol vorbehandelt und anschließend einmalig mit ionisierender Strahlung (1Gy(a), 2Gy(b) und 5Gy(c)) bestrahlt. Das Medium (einschließlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ bzw. Ethanol) wurde nach der IR-Exposition ausgetauscht. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung wurden die entstandenen γH2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz markiert und ausgezählt: 30min, 2h, 6h und 12h. Die Ergebnisse zeigen, dass in mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten weniger Strahlenschäden nachweisbar sind als in den Kontrollen (s. Abschnitt 4.7.2.2). (*p<0.05 /**p<0.01/#p>0.05)

5. Diskussion

UVB-Licht mit einer Wellenlänge zw. 290 und 320 nm führt zur Induktion von DNA-Photoprodukten und ist damit der größte Risikofaktor in der Entstehung von Hauttumoren (Bikle, 2008; De Gruijl et al., 2001). Gleichzeitig ist dies jedoch das UV-Spektrum, welches für die Bildung von Vitamin D₃ in der Haut benötigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es festzustellen, ob 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ protektiv gegen die zytotoxischen Effekte der UVB-Strahlung wirkt und es sich bei der UVB-induzierten kutanen Vitamin D-Synthese somit auch um einen natürlichen Schutzmechanismus der menschlichen Haut gegen die negativen Effekte der UVB-Strahlung handelt. Zeitgleich untersuchten wir, ob 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ möglicherweise auch gegen niedrigdosierte Röntgen-Bestrahlung einen protektiven Effekt besitzt.

Experimente, die unter diesem Aspekt durchgeführt wurden, fanden sowohl an humanen Keratinozyten der Zelllinie HaCaT als auch an malignen, kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 statt. So konnten im Bezug auf die Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, der UVB-Strahlung und der ionisierenden Strahlung sowohl Parallelen als auch Differenzen zwischen beiden Zelllinien eruiert werden.

5.1 Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf humane Keratinozyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen proliferationsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) auf HaCaT-Keratinozyten. Im Colony-Forming-Unit-Culture-Assay konnten in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelten HaCaT-Zellen nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen (die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wurde bereits 2 Tage zuvor begonnen) signifikant mehr Kolonien nachgewiesen werden als in den zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten 10cm Zellkulturschalen. Auch im WST-1- und im Kristallviolett-Assay zeigen unsere Ergebnisse eine proliferationsfördernde Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der gewählten Konzentration (10⁻⁷M). Diese ist im WST-1 Assay bis 24h nach simulierter Bestrahlung signifikant. Der in diesem Versuch gemessene NADH-Gehalt in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen steigt im Vergleich zu den Ethanolkontrollen auf 117,6% (12h-Wert) bzw. 115,2% (24h-Wert) an. Im Kristallviolett-Assay zeichnet sich bis 12h nach simulierter Bestrahlung eine proliferationsfördernde Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) ab. Die im ELISA-Reader bestimmte

Farbstoffaufnahme der Zellen, die hier mit der Anzahl vitaler Zellen und somit mit dem Wachstumsverhalten der Zellen korreliert, steigt im Vergleich zu den Ethanolkontrollen auf 113,5% (0h-Wert) bzw. 106% (6h-Wert) und 100,1% (12h-Wert) an.

In der Literatur sind sowohl proliferationsfördernde als auch proliferationshemmende Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf humane Keratinozyten beschrieben.

In einigen Versuchen an Hautäquivalenten konnte gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ antiproliferativ und prodifferenzierend auf humane Keratinozyten wirkt (Hosomi et al., 1983; Smith et al., 1986). Aufgrund dieser Wirkung wurden Ende der 1980er/ Anfang der 1990er Jahre verschiedene Vitamin D₃ Metabolite, u.a. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, Calcipotrien und 1,24-Dihydroxyvitamin D₃ in der Therapie der Psoriasis vulgaris erprobt (Perez et al., 1996). Heute gehören Vitamin D₃ und seine Analoga zur „first line“ Therapie der Psoriasis vulgaris.

Die Forschergruppe um Daniel D. Bikle untersuchte 2003 die Mechanismen, die für die antiproliferative und prodifferenzierende Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf Keratinozyten verantwortlich sind (Bikle et al., 2003). Sie fanden heraus, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ seine Wirkung zum einen über die Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR) und zum anderen über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels in Keratinozyten entfaltet.

Andere Studien wiederum demonstrierten einen stimulierenden Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf humane Keratinozyten (Itin et al., 1994; Bollag et al., 1995; Gniadecki, 1996; Svendsen et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Richtung und das Ausmaß des Effektes von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Keratinozyten-Proliferation von den vorhandenen Wachstumsfaktoren, der Zelldichte und der Konzentration des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ abhängig ist. Garach-Jehoshua et al. zeigten 1999, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) in Abwesenheit von exogenen Wachstumsfaktoren der EGF-Familie (epidermal growth factor) einen proliferationsfördernden Effekt auf HaCaT-Keratinozyten ausübt. Als Grund für die gesteigerte Keratinozyten-Proliferation wurde eine Erhöhung der Konzentration an EGF-Rezeptor Liganden (ErbB1-ErbB3 Proteine) in den Keratinozyten durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ angegeben. Der Signalweg über diese Heterodimere scheint effizienter zu sein als derjenige, der über den exogenen, löslichen EGFR (epidermal growth factor receptor) abläuft. Auch Lyakhovich et al. konnten einen proliferationsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nachweisen. Sie postulierten eine Hochregulation des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (KGF) unter 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als Ursache für dessen wachstumssteigernde Wirkung (Lyakhovich et al., 2000).

In Erweiterung zu den Erkenntnissen von Garach-Jehoshua et al. und Lyakhovich et al. zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen proliferationsfördernden Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) auf subkonfluent in RPMI-Medium + 10% FCS + 1% BSA wachsende HaCaT-Keratinozyten.

Weiterhin konnte im Rahmen der Experimente festgestellt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) einen antiproliferativen Effekt auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) ausübt. Im Colony-Forming-Unit-Culture-Assay konnten in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) behandelten SCL-1-Zellen nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen signifikant weniger Kolonien nachgewiesen werden als in den zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten 10cm Zellkulturschalen. Auch im WST-1- und im Kristallviolett-Assay zeigen unsere Ergebnisse eine antiproliferative Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der gewählten Konzentration (10⁻⁷M): der NADH-Gehalt, der im WST-1 Assay mit der Stoffwechselaktivität und somit auch mit dem Wachstumsverhalten der Zellen korreliert, ist in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelten Zellen signifikant niedriger als in den mit Ethanol behandelten Zellen. Die Unterschiede sind im Kristallviolett-Assay statistisch nicht signifikant, zeigen jedoch in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen eine niedrigere Farbstoffaufnahme als in den zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen. Die Farbstoffaufnahme korreliert in diesem Versuch mit der Anzahl vitaler Zellen und ist ein Parameter für die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der SCL-1 Zellen.

Diese antiproliferative Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen entspricht den Ergebnissen von Hager et al., die gezeigt hatten, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Proliferation von Plattenepithelkarzinomzellen (Larynx und Zunge) inhibiert und deren Differenzierung induziert. Sie führten diesen Effekt auf einen durch p21 und p27 induzierten Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus zurück. Nach Hager et al. kommt es durch eine 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-vermittelte Aktivierung des VDR zu einer Transkriptionsregulation der mRNA der G1-Phase-regulierenden Proteine p21 und p27 und nachfolgend zu einem Zellzyklus-Arrest (Hager et al., 2001). Reichrath et al. publizierten 2004 vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1. Hier ergab sich aus den Experimenten, dass die Immunreaktivität des VDR in Plattenepithelkarzinomzellen im Vergleich zu normaler menschlicher Haut um ein vielfaches erhöht war. Eine Inkubation der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ resultierte in einer dosisabhängigen Suppression der Zellproliferation (Reichrath et al., 2004).

Es wurde experimentell bestätigt, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) eine antiproliferative Wirkung auf kutane Plattenepithelkarzinomzellen hat. Während SCL-1-Zellen sehr gut auf die antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ansprechen, zeigte sich für die untersuchten Keratinozyten nur zu bestimmten Zeitpunkten eine antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (im WST-1-Assay nach 48h und im CV-Assay nach 24h). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) hatte in unseren Versuchen auf HaCaT-Keratinozyten sogar eine überwiegend proliferationsfördernde Wirkung. Mögliche Gründe für den hier festgestellten

proliferationsfördernden Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf humane Keratinozyten liegen in den vorliegenden Kulturbedingungen.

5.2 Wirkung von UVB-Strahlung auf humane Keratinozyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen sowohl für HaCaT-Keratinozyten als auch für kutane Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 einen zytotoxischen, wachstumshemmenden Effekt der UVB-Strahlung.

Im Colony-Forming-Unit-Culture Assay zeigen unsere Ergebnisse nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen eine signifikante Abnahme der Kolonienzahl in den mit UVB-Licht bestrahlten HaCaT-Kulturen. Nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 100J/cm² kommt es in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen zu einem Abfall der Kolonienzahl auf respektive 62,3% (Medium) bzw. 56,8% (Ethanol) des Ausgangswertes (0J/cm²). In den mit SCL-1 besäten 10cm Zellkulturschalen sind die Ergebnisse vergleichbar: unter Einfluss von UVB ist ein Abfall der Kolonienzahl auf 57,91 % (Medium) bzw. 56,75 % (Ethanol) des Ausgangswertes (0J/cm²) zu beobachten. Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² ist sowohl in den HaCaT- als auch in den SCL-1-Kulturen die Toxizität der UVB-Strahlung so hoch, dass keine lebenden Zellen mehr auf den 10cm Schalen nachweisbar sind.

Der WST-1 und der Kristallviolett-Assay bestätigten die Ergebnisse aus dem Colony-Forming-Unit-Culture Assay: ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² konnte sowohl für HaCaT- als auch für SCL-1-Zellen eine dosisabhängige Abnahme des NADH-Gehaltes (WST-1: der NADH-Gehalt korreliert in diesem Versuch mit der Stoffwechselaktivität der Zellen und dient als Maßstab für das Wachstumsverhalten und die Vitalität der Zellen) bzw. der Farbstoffaufnahme (Kristallviolett-Assay: die Kristallviolett-Aufnahme korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen) der Zellen verzeichnet werden. Diese dosisabhängige, zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung zeigte sich in den HaCaT-Keratinozyten bereits 12-24 Stunden nach der Bestrahlung und wurde in den Plattenepithelzellen der Zellreihe SCL-1 erst nach 24-48 Stunden beobachtet. Im Kristallviolett-Assay der Zellreihe SCL-1 ist selbst 48 Stunden nach der UVB-Bestrahlung trotz signifikanter Abnahme der Farbstoffaufnahme der Zellen (1000J/cm² im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle) kein dosisabhängiger Verlauf erkennbar. Eine mögliche Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten von SCL-1 und HaCaT-Zellen ist eine geringere Sensitivität der kutanen Plattenepithelkarzinomzellen gegenüber UVB-Strahlung. Dass die Zellen im WST-1- und im CV-Assay bis zu einer Bestrahlungsdosis von 1000J/cm² überleben, während im Colony-Forming-Unit-culture Assay (CFUc) ab einer UVB-Dosis keine vitalen Zellen mehr nachweisbar sind, erklärt sich aus der Dauer der jeweiligen Versuche: WST-1- und CV-

Assay wurden bis 48h nach Bestrahlung im ELISA-Reader gemessen, während der CFUc erst nach 7 Tagen ausgewertet wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse entsprechen den Ergebnissen von De Haes et al., die bereits ab einer UVB-Dosis von $32\text{mJ}/\text{cm}^2$ einen zytotoxischen Effekt der UVB-Strahlung auf humane Keratinozyten nachweisen konnten. Ihrer Studie zufolge sind hauptsächlich zwei biologische Effekte von UVB-Strahlung für diese Wirkung verantwortlich: die Induktion der Apoptose in Keratinozyten sowie die Produktion von Interleukin 6 (IL-6) (De Haes et al., 2003, 2004). Die Apoptose als sogenannter „programmierter Zelltod“ spiegelt hier das Ausmaß der Zellschädigung nach UVB-Bestrahlung wider. Während de Haes et al. lediglich den zytotoxischen Effekt der UVB-Strahlung nach einer Exposition der Zellen mit $32\text{mJ}/\text{cm}^2$ untersuchte, konnte in der vorliegenden Studie ergänzend auch die Wirkung von höheren UVB-Dosen beschrieben werden und im Besonderen der dosisabhängige Effekt der UVB-Strahlung hervorgehoben werden.

5.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf humane Keratinozyten (HaCaT) und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1)

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in der vorliegenden Arbeit HaCaT-Keratinozyten im Rahmen des WST-1- und des Kristallviolett-Assays ionisierender Strahlung unterschiedlicher Dosis ausgesetzt (0Gy-5Gy). Es wurde gezielt niedrig-dosierte Röntgen-Strahlung eingesetzt, da es uns in dieser Studie in erster Linie um die strahlenbedingten Veränderungen in der Phosphorylierung des Histonproteins H2AX ging (s. Abschnitt 5.7). Um eine Korrelation mit der Proliferation der Zellen herstellen zu können, wählten wir für die Proliferationsassays die gleichen IR-Dosen (0Gy-5Gy). In vorliegender Arbeit zeigten sich aufgrund der niedrigen IR-Dosen in den Ethanol- bzw. Medium-behandelten Ansätzen 48h nach Bestrahlung wie erwartet keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbestrahlten (0Gy) und den mit 5Gy bestrahlten Keratinozyten. Weder der NADH-Gehalt (als Maß für die Stoffwechselaktivität und das Wachstumsverhalten der Zellen im WST-1 Assay) noch die Aufnahme des Farbstoffes Kristallviolett (die im Kristallviolett-Assay direkt mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert) nahmen unter steigender Bestrahlungsdosis ab.

In unseren Versuchen mit kutanen Plattenepithelzellen der Zelllinie SCL-1 wurde analog zu den mit HaCaT durchgeführten Proliferationsassays niedrig-dosierte Röntgen-Strahlung verwendet. Auch hier zeigte sich wie erwartet 48h nach einer Bestrahlung mit 5 Gray kein signifikanter Effekt der ionisierenden Strahlung auf das Wachstumsverhalten von kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0Gy). In den Ethanol- bzw. Medium-

Kontrollen nahmen weder der NADH-Gehalt (WST-1 Assay) noch die Aufnahme des Farbstoffes Kristallviolett (Kristallviolett-Assay) unter steigender Bestrahlungsdosis ab.

Aus der Literatur lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Exposition von humanen Keratinozyten mit ionisierender Strahlung und der Apoptose dieser Zellen herstellen. Die Forschergruppe um den Franzosen Gault konnte 2004 zeigen, dass 76% der mit ionisierender Strahlung einer Dosis von 20 Gray bestrahlten HaCaT-Keratinozyten nach 48h apoptotisch waren. Mittels Infrarot-Mikrospektroskopie demonstrierte das Team, dass der Mechanismus der Apoptose hier in erster Linie über eine Konformationsänderung der DNA abläuft. Die Konsequenz war eine Abnahme der Menge an detektierbarer DNA. Zusätzlich zeigten sich Veränderungen der Sekundärstruktur von Proteinen und eine Zunahme der Anzahl an Lipiden in den apoptotischen Keratinozyten (Gault et al., 2004). Da in den von uns durchgeführten Versuchen IR-Dosen von 1-5Gy verwendet wurden, waren nach aktueller Studienlage keinerlei zytotoxische, apoptotische Effekte auf humane Keratinozyten zu erwarten.

Folglich konnten wir experimentell verifizieren, dass weder für SCL-1-Zellen noch für HaCaT-Keratinozyten eine IR-Dosis von bis zu 5 Gray ausreicht, um eine zytotoxische, wachstumshemmende bzw. apoptotische Wirkung zu entfalten.

5.4 Zytoprotektive Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinozyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach UVB-Bestrahlung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in einer Konzentration von 10⁻⁷M in HaCaT-Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung einen protektiven Effekt gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung besitzt. Während im Colony-Forming-Unit-culture Assay nach einer Bestrahlung mit 100J/cm² die Anzahl der Kolonien in der anschließenden Wachstumsphase von 7 Tagen in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen auf 62,3% (Medium) bzw. 56,8% (Ethanol) des Ausgangswertes (0J/cm²) abfällt, kommt es in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inkubierten 10cm Zellkulturschalen lediglich zu einem Abfall der Kolonienzahl auf 90,36% des Ausgangswertes. Die in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansätzen nach Bestrahlung mit 100J/cm² gezählten Kolonien entsprechen ca. 2x der Menge an Kolonien, die in der Ethanolkontrolle gezählt werden konnte. Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² überwiegt im CFUc-Assay jedoch der zytotoxische, apoptotische Effekt der UVB-Strahlung, und es sind auf keiner der 10cm Zellkulturschalen mehr vitale HaCaT-Keratinozyten nachweisbar.

Desweiteren konnten wir nachweisen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) im WST-1- und im Kristallviolett-Assay nach der Bestrahlung mit UVB-Licht steigender Dosis (100J/cm²-1000J/cm²) einen protektiven Effekt gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung besitzt. Zwar kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes (WST-1-Assay) bzw. der Kristallviolett-Aufnahme (Kristallviolett-Assay) in den HaCaT-Keratinocyten, die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten weisen in unseren Versuchen jedoch einen höheren NADH-Gehalt und eine höhere Farbstoffaufnahme auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen. Da der NADH-Gehalt und die Farbstoffaufnahme ein Maß für die Stoffwechselaktivität bzw. für die Zellvitalität darstellen, bestätigen unsere Ergebnisse eine zytoprotektive Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen den toxischen Effekt von UVB-Licht in HaCaT-Keratinocyten.

Neben der Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf UVB-bestrahlte humane HaCaT-Keratinocyten, gilt unser Interesse im Rahmen dieser Arbeit auch den Effekten von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf maligne transformierte, kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1). Wirkt 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auch in Plattenepithelkarzinomzellen protektiv gegen den zytotoxischen Effekt der UVB-Strahlung?

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in einer Konzentration von 10⁻⁷M in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 nach UVB-Bestrahlung einen protektiven Effekt gegen die zytotoxische Wirkung des UVB-Lichtes besitzt. Während im Colony-Forming-Unit-culture Assay nach einer Bestrahlung mit 100J/cm² die Anzahl der Kolonien in der anschließenden Wachstumsphase von 7 Tagen in den Medium- bzw. Ethanolkontrollen auf 57,91 % (Medium) bzw. 56,75 % (Ethanol) des Ausgangswertes (0J/cm²) abfällt, kommt es in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten 10cm Zellkulturschalen zu einer Zunahme der Kolonienzahl auf 128,18% des Ausgangswertes. Ab einer Bestrahlungsdosis von 500J/cm² überwiegt im CFUc-Assay jedoch der zytotoxische, pro-apoptotische Effekt der UVB-Strahlung und es sind auf keiner der 10cm Zellkulturschalen mehr vitale SCL-1-Plattenepithelkarzinomzellen nachweisbar.

Außerdem konnten wir nachweisen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) im WST-1- und im Kristallviolett-Assay nach der Bestrahlung mit UVB-Licht steigender Dosis (100J/cm²-1000J/cm²) einen protektiven Effekt gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung besitzt. Zwar kommt es mit steigender UVB-Dosis zu einem dosisabhängigen Abfall des NADH-Gehaltes (WST-1-Assay) bzw. der Kristallviolett-Aufnahme (Kristallviolett-Assay) in den SCL-1-Zellen, die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Plattenepithelkarzinomzellen weisen in unseren Versuchen jedoch einen höheren NADH-Gehalt und eine höhere Farbstoffaufnahme auf als die zur Kontrolle mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen. Da der NADH-Gehalt und die Farbstoffaufnahme ein Maß für die Stoffwechselaktivität bzw. für die Zellvitalität darstellen, bestätigen unsere Ergebnisse eine

zytoprotektive Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen den toxischen Effekt von UVB-Licht in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen.

In der Haut wird unter dem Einfluss von UVB-Strahlung Vitamin D₃ gebildet, das mit Hilfe der in den Keratinozyten vorhandenen 25-Hydroxylase und 1 α -Hydroxylase in die aktive Form, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, umgewandelt wird. Wir untersuchten die Hypothese, ob 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als natürlicher Schutzfaktor gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung wirkt. Durch mehrere Studien der letzten Jahre konnte bereits gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ humane Keratinozyten vor UVB-induzierter Zellschädigung schützt (Lee et al., 1998; De Haes et al., 2003, 2004; Gupta et al., 2006). Die Mechanismen sind vielfältig und vorwiegend mit der Suppression der UVB-induzierten Apoptose assoziiert (Reduktion der Zytocrom c-Freisetzung, verminderte Spaltung des PARP, De Haes et al., 2003). Die Forschergruppe um De Haes et al. konnte 2004 zeigen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Dosen von 10⁻⁶M bzw. 10⁻⁷M notwendig sind, um einen klaren protektiven Effekt zu erhalten. Ein signifikanter zytoprotektiver Effekt ergab sich ab einer 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Konzentration von 10⁻⁸M und ab einer mindestens 8-stündigen Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (De Haes et al., 2003). Analog dazu zeigen unsere Ergebnisse eine protektive Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in einer Konzentration von 10⁻⁷M und nach einer Vorbehandlungszeit von 48h. Auch Gupta et al. konnten 2006 in ihrer Studie zeigen, dass die Überlebensrate von Keratinozyten, die 24h vor der Bestrahlung mit UVB-Licht mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vorbehandelt wurden, mit steigender 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Dosis (10⁻¹¹ bis 10⁻⁷M) dosisabhängig zunahm. Was die Bestrahlungsdosis angeht, so konnten Lee et al. unter Bestrahlung mit 30 mJ/cm² und 40 mJ/cm² einen protektiven Effekt der Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nachweisen. Ab 50 mJ/cm² zeigte sich unabhängig von der gewählten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Konzentration (0,12-12 nM) eine Abnahme der Keratinozyten-Überlebensrate (Lee et al., 1998). In unserer Studie konnte auch bei Exposition der Zellen mit höheren UVB-Dosen (100J/cm²-1000J/cm²) eine protektive Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxischen Effekte der UVB-Strahlung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen unserer Versuche festzustellen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in vitro in einer Konzentration von 10⁻⁷M sowohl in humanen Keratinozyten als auch in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen einen zytoprotektiven Effekt gegen die schädigende Wirkung von UVB-Strahlung steigender Dosis (100J/cm²-1000J/cm²) besitzt.

5.5 Zytoprotektive Effekte von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT-Keratinozyten und kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach IR-Bestrahlung

Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung in HaCaT-Keratinocyten nach Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einer Herabregulierung verschiedener Apoptose-relevanter Gene (u.a. p53) führt (Meinecke et al., 2003). Daraus kann man schließen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in IR-bestrahlten HaCaT-Keratinocyten möglicherweise einen anti-apoptotischen Effekt hat.

Da in unseren Experimenten die gewählte IR-Dosis (0Gy, 1Gy, 2Gy, 5Gy) erwartungsgemäß zu gering war, um eine zytotoxische, antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung auf die humanen Keratinocyten auszuüben (s. Abschnitt 5.3), konnten im Rahmen der Proliferationsassays keine protektiven Effekte des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die ionisierende Strahlung festgestellt werden. Sowohl im WST-1- als auch im Kristallviolett-Assay ergaben sich 48h nach der Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede im NADH-Gehalt bzw. in der Farbstoffaufnahme der mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inkubierten und mit 5Gy bestrahlten HaCaT-Keratinocyten im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (0Gy).

Auch in den mit kutanen Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 durchgeführten Versuchen war eine Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen in einer Dosis bis 5Gy wie erwartet nicht ausreichend, um die wachstumshemmende bzw. apoptotische Wirkung der IR-Strahlung nachzuweisen. Aus diesem Grund konnten wir im Rahmen des WST-1- und CV-Assays in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Ansätzen zwar die bereits unter 5.1 beschriebene, antiproliferative Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nachweisen, es ergaben sich jedoch 48h nach der IR-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede im NADH-Gehalt bzw. in der Farbstoffaufnahme der mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inkubierten und mit 5Gy bestrahlten SCL-1-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (0Gy).

Da im Rahmen der Experimente aufgrund einer zu niedrigen IR-Bestrahlungsdosis (0-5Gy) wie erwartet keine zytotoxische, apoptotische Wirkung der ionisierenden Strahlung nachgewiesen werden konnte, konnten im Rahmen der Versuche auch keine protektiven Effekte des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf HaCaT- und SCL-1 Zellen gegen die ionisierende Strahlung festgestellt werden.

5.6 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung von UVB-induzierten Strahlenschäden

In einem weiteren Ansatz wurde die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf UVB-induzierte Strahlenschäden untersucht. Dass UVB-Licht direkt mit der DNA interagiert und zur Entstehung von Thymidin-Dimeren führt, beschrieb Setlow bereits 1966 (Setlow, 1966).

In dieser Arbeit wurden diese sogenannten Cyclo-Pyrimidin-Dimere (CPD) mittels Dot-Blot-Analyse detektiert, um das genaue Ausmaß und den Verlauf der DNA-Schädigung nach UVB-Bestrahlung ($0\text{J}/\text{cm}^2$ - $1000\text{J}/\text{cm}^2$) zu erfassen. Wichtig war es uns v. a., einen möglichen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10^{-7}M) gegen UVB-induzierte Strahlenschäden in HaCaT-Keratinocyten darzustellen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die Anzahl an Thymidin-Dimeren in HaCaT-Keratinocyten mit der Bestrahlungsdosis zunimmt, was auf die zunehmende DNA-Schädigung bei steigender UVB-Dosis zurückzuführen ist.

In den von uns durchgeführten Versuchen wird zudem deutlich, dass eine 48-stündige Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10^{-7}M) in HaCaT-Keratinocyten zu einer verringerten Anzahl von CPD nach UVB-Bestrahlung führt. Während in den unbestrahlten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Thymidin-Dimeren zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und den zur Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen vorhanden sind ($p=0,86998656$), ist die Anzahl an CPDs in den Ethanolkontrollen sowohl nach einer Bestrahlung mit $100\text{J}/\text{cm}^2$ als auch nach einer Bestrahlung mit $1000\text{J}/\text{cm}^2$ höher als in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten.

Diese protektive Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in humanen Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung wurde bereits 2005 von De Haes et al. beschrieben (De Haes et al., 2005). In der Arbeit von De Haes et al. wurden vergleichbare Konzentrationen von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ verwendet, wie wir sie in unserer Arbeit angewendet haben. Die Vorbehandlungszeit betrug allerdings nur 8h vor Bestrahlung. Eine aktuelle Studie von Gupta et al. beschreibt ebenfalls einen Abfall der Anzahl an CPDs nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 10^{-9}M 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anschließender Bestrahlung der Zellen mit UVB-Licht in einer Dosis von $200\text{mJ}/\text{cm}^2$. Ergänzend zu diesen Ergebnissen, können wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachweisen, dass eine 48-stündige Vorbehandlung mit 10^{-7}M 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auch nach einer Bestrahlung mit UVB-Licht höherer Dosis ($100\text{J}/\text{cm}^2$ und $1000\text{J}/\text{cm}^2$) protektiv wirkt.

Im Zeitverlauf sprechen unsere Ergebnisse ebenfalls für eine protektive Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die Bildung von CPDs. Zusätzlich zu den bisher von De Haes und Gupta erbrachten Erkenntnissen konnten wir nachweisen, dass unter 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung nicht nur weniger CPDs entstehen, sondern auch, dass die entstandenen CPDs in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten schneller beseitigt werden als in den Kontrollen (Ethanol). Es wird deutlich, dass im Verlauf der ersten 24h nach Bestrahlung mit UVB-Licht die Anzahl an entstandenen Cyclo-Pyrimidin-Dimeren (CPD) abnimmt. Diese Feststellung deutet auf eine Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden im Verlauf der Zeit. Während die Anzahl an CPDs nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 24h nach der Bestrahlung mit

100J/cm² bzw. mit 1000J/cm² im Vergleich zum 0h-Wert (direkt nach Bestrahlung gemessen) um 65,65% (100J/cm²) bzw. 53,96% (1000J/cm²) abnimmt, sinkt die Anzahl an CPDs in den Ethanolkontrollen lediglich um 57,59% (100J/cm²) bzw. 15,24% (1000J/cm²).

Die vorliegende Arbeit bestätigt einen protektiven Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) gegen die DNA-schädigende Wirkung von UVB-Strahlung (100J/cm²-1000J/cm²) in HaCaT-Keratinocyten in vitro. Zum einen entstehen in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen nach Bestrahlung weniger CPDs als in den Ethanolkontrollen und zum anderen konnten wir nachweisen, dass die entstandenen CPDs in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten HaCaT-Keratinocyten schneller beseitigt werden als in den Kontrollen (Ethanol).

5.7 Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung von IR-induzierten Strahlenschäden

Zusätzlich zum Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Entstehung von UVB-induzierten Strahlenschäden, galt unser Interesse im Rahmen dieser Arbeit der Entstehung von IR-induzierten Strahlenschäden. Der häufigste DNA-Schaden nach Einwirkung von ionisierender Strahlung ist der Doppelstrangbruch (DSB). Rothkamm und Löbrich beschrieben 2003 die γ H2AX-Immunfluoreszenz als zuverlässige Methode zur Quantifizierung von DSB nach einer IR-Bestrahlung mit 1,2mGy bis 2Gy (Rothkamm und Löbrich, 2003). Um den Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) auf die Entstehung bzw. die Beseitigung von DSB nach IR-Bestrahlung zu untersuchen, wählten wir aus diesem Grunde niedrige IR-Dosen von 1Gy, 2Gy und 5Gy. Da uns im Besonderen die Geschehnisse in der normalen menschlichen Haut interessieren, führten wir die γ H2AX-Immunfluoreszenz lediglich an HaCaT-Keratinocyten durch.

Bezüglich ionisierender Strahlung zeigen unsere Ergebnisse 2h nach der Bestrahlung eine Zunahme der Immunreaktivität für γ H2AX. Die Anzahl an γ H2AX-Foci nimmt 2h nach der Bestrahlung sowohl in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen als auch in den Ethanolkontrollen mit steigender Bestrahlungsdosis zu. In den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen kommt es zu einem Anstieg der Anzahl an γ H2AX-Foci von durchschnittlich 1,14 Foci/Zellkern (0Gy) auf durchschnittlich 21,33 Foci/Zellkern (1Gy) bzw. 42,67 Foci/Zellkern (2Gy). Nach einer IR-Bestrahlung mit 5Gy steigt die Anzahl der γ H2AX-Foci schließlich auf 83,84 Foci/Zellkern, was gegenüber dem Ausgangswert (0Gy) einen Anstieg auf 7354,4 % bedeutet. In den Ethanolkontrollen sind die Ergebnisse vergleichbar: die Anzahl an γ H2AX-Foci nimmt von 1,53 Foci/Zellkern (0Gy) auf durchschnittlich 27,12 Foci/Zellkern (1Gy) bzw. 39,06 Foci/Zellkern (2Gy) zu. Nach einer IR-Bestrahlung mit 5Gy steigt die Anzahl der γ H2AX-Foci auf 66,25 Foci/Zellkern, was gegenüber dem

Ausgangswert (0Gy) einen Anstieg auf 4330,1% bedeutet. Dies bestätigt die Ergebnisse von Rothkamm und Löbrich, die ein lineares Verhältnis zwischen der IR-Dosis und den dadurch entstehenden DSB festgestellt hatten (Rothkamm und Löbrich, 2003). Die These der Forschungsgruppen um Dikomey und El-Awady, die besagt, dass die Einwirkung von Röntgenstrahlung zu 30-40 DSB/Gray und pro Zelle führen kann, wurde von uns experimentell nur zum Teil bestätigt (Dikomey et al., 1998, 2000; El-Awady et al., 2003): im Rahmen unserer Versuche kam es zu einem durchschnittlichen Anstieg um 10-25 DSB/Gray und pro Zelle (d.h. durchschnittlich 10-25 Gezählte γ H2AX-Foci/Zellkern).

Eine weitere neue Erkenntnis, die wir im Rahmen unserer Untersuchungen erbracht haben, ist eine Reduktion der Immunreaktivität für γ H2AX nach Vorbehandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Während in den unbestrahlten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an γ H2AX-Foci zwischen den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten und den zur Kontrolle mit Ethanol behandelten Zellen vorhanden sind ($p= 0,212235888$), ist der Anstieg der Anzahl an γ H2AX-Foci unter einer Bestrahlung mit 1Gy und 2Gy in den mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelten Zellen geringer als in den jeweiligen Ethanolkontrollen. Bei einer Bestrahlung mit 5Gy zeigt sich genau das Gegenteil: es werden unter Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ signifikant mehr γ -H2AX-Foci gezählt als unter der Behandlung mit der Trägersubstanz Ethanol ($p= 9,67272E-05$). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die DNA-schädigende Wirkung der IR-Strahlung ab einer Strahlendosis von 5Gy stärker ist als die protektive Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

Im Zeitverlauf lassen sich im Rahmen unserer Experimente, unabhängig von der Bestrahlungsdosis, 30min nach der IR-Bestrahlung immunzytochemisch nur wenige γ -H2AX-Foci detektieren. Bis 6h nach Bestrahlung steigt die Anzahl der Foci kontinuierlich um ca. 30-100/Zelle an, um nach 12h wieder um ca.10-35 Foci/Zelle abzufallen. Es wird aktuell kontrovers diskutiert, ob γ -H2AX einen Doppelstrangbruch anzeigt oder eher als Marker für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu sehen ist. Nachgewiesen ist, dass H2AX als Antwort auf einen DNA-Doppelstrangbruch am Carboxyterminus in Position 139 an der Aminosäure Serin phosphoryliert wird– es entsteht phosphoryliertes γ H2AX (McManus et al., 2005). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass γ H2AX für die Rekrutierung der Schlüsselproteine für die Reparatur des DSB am Ort des DNA-Schadens unabdingbar ist (Stiff et al., 2004). Die Tatsache, dass im Rahmen unserer Versuche die Anzahl an γ -H2AX-Foci bis 6h nach der Bestrahlung noch ansteigt, spricht gegen γ -H2AX als reinen DSB-Marker und für eine Beteiligung an der DSB-Reparatur. Die Anzahl an γ -H2AX-Foci steigt reparaturbedingt bis 6h nach der IR-Bestrahlung an und nimmt danach im Laufe der Reparaturphase der Strahlenschäden wieder ab.

Bezüglich ionisierender Strahlung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell gezeigt werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) in vitro in HaCaT-Keratinocyten bis zu einer Strahlendosis von 2Gy einen Schutz vor der Entstehung von IR-induzierten Strahlenschäden bietet.

5.8 Expression der Hauptkomponenten des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ –Stoffwechsels (CYP27B1,CYP24) in HaCaT-Keratinocyten und Plattenepithelkarzinomzellen (SCL-1) nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Bestrahlung mit UVB

Neben einer möglichen protektiven Wirkung des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gegen die zytotoxische Wirkung der UVB-Strahlung gilt unser Interesse in dieser Arbeit auch der Wirkung der UVB-Strahlung auf die Expression von Hauptkomponenten des kutanen Vitamin D Stoffwechsels. Da neuere Forschungsergebnisse eine wichtige Rolle von 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase belegen, konzentrierten wir unsere Untersuchungen auf die Analyse der Regulation der RNA Expression dieser beiden Enzyme in humanen Keratinocyten und kutanen Plattenepithelkarzinomzellen.

Die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) und die 25-Hydroxylase (CYP27A1) als wichtige Enzyme im Vitamin D-Stoffwechsel konnten neben der Leber bzw. der Niere auch in Keratinocyten nachgewiesen werden (Fu et al., 1997; Lehmann et al., 1999). Damit besitzen auch Keratinocyten die enzymatischen Voraussetzungen zur Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterol (Bikle et al., 1994; Lehmann et al., 1998). Wie bereits in mehreren Arbeiten diskutiert wurde, kommt es unter dem Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als Folge einer negativen Rückkopplung zu einer Modulation der Expression der Hauptkomponenten des Vitamin D-Systems in der Haut. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Einfluss von UVB-Strahlung und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Expression der CYP27B1 und der CYP24 in der Haut zu untersuchen.

Die von uns ermittelten Daten zeigen eine dosisabhängige Verringerung der Expression der 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase (CYP27B1) mit steigender UVB-Dosis (0J/cm²-800J/cm²) 24h nach Bestrahlung. Während nach 3h ein leichter Anstieg in der Expression der CYP27B1 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle feststellbar ist, sinkt die Expression des Enzyms in humanen Keratinocyten der Zelllinie HaCaT 24h nach Bestrahlung mit steigender UVB-Dosis dosisabhängig ab. In 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-behandelten SCL-1-Zellen sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen in HaCaT-Keratinocyten, wenn auch etwas weniger deutlich.

Eine Herabregulierung der CYP27B1 erscheint biologisch sinnvoll. Da Vitamin D₃ in der Haut UVB-abhängig aus der Vorläufersubstanz 7-Dehydrocholesterol entsteht, würde ein funktionsfähiges

Enzymsystem zur Herstellung des aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ das in der Haut generierte Substrat nutzen und hydroxylieren. Eine verminderte Expression der CYP27B1 verhindert eine solche lichtabhängige Generierung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in der Epidermis.

Desweiteren geht aus unseren Untersuchungen hervor, dass die Expression der CYP24 in HaCaT-Zellen 3h nach UVB-Bestrahlung, im Gegensatz zur Expression der CYP27B1 zum gleichen Zeitpunkt, abfällt. Es handelt sich um einen dosisabhängigen Abfall nach UVB-Bestrahlung zw. 100J/cm²-800J/cm². 24h nach der Bestrahlung kommt es zu einem erneuten Anstieg der Expression der CYP24-mRNA im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Auch zu diesem Zeitpunkt verhält sich die Expression der CYP24-mRNA in HaCaT-Keratinocyten demnach gegensätzlich zur Expression der CYP27B1. Auch die Expression der CYP24 in SCL-1 Zellen fällt, den Ergebnissen unserer Experimente zufolge, 3h nach UVB-Bestrahlung ab. 24h nach der Bestrahlung kommt es hier jedoch, im Gegensatz zur Expression der CYP24 in Keratinocyten, nicht zu einem Anstieg sondern zu einem weiteren Abfall der Expression der CYP24-mRNA im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Die von der CYP24 durchgeführte Hydroxylierung führt zum Abbau von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Untersuchungen zur Substratspezifität der CYP24 zeigten jedoch, dass auch anders hydroxylierte Formen des Vitamin D₃ als Substrat genutzt werden können, wodurch Metabolite entstehen deren genaue Funktion noch nicht geklärt ist. Dies könnte erklären, weshalb die Expression der CYP24-mRNA in HaCaT-Keratinocyten nach 24h wieder auf den Ausgangswert ansteigt.

Unsere Ergebnisse belegen die UVB-induzierte, dosisabhängige Modulation der Expression der Hauptkomponenten des Vitamin D-Systems in der Haut. Diese Modulation bewirkt voraussichtlich Veränderungen in der intrazellulären Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, welche für das Wachstumsverhalten der Zellen von erheblicher Bedeutung sind. Plattenepithelkarzinomzellen der Zellreihe SCL-1 reagieren generell weniger sensitiv auf die UVB-induzierte Veränderung der Expression von CYP27B1 und CYP24.

6. Literaturverzeichnis

- Ananthaswamy HN, Perceall WE (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 52. 1119-1136.
- Apperly (1941). The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Research* 1. 191-195.
- Batty DP, Wood RD (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241. 193-204.
- Bektas M (1999). Mechanism of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ induced apoptosis in human keratinocytes.
- Bikle DD, Neumanic MK, Gee E, Elias P (1986). 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes. *J Clinical Invest.* 78. 557-566.
- Bikle DD, Pillai S (1993). Vitamin D, calcium and epidermal differentiation. *Endoc. Rev.* 14. 3-19.
- Bikle DD, Halloran BP, Riviere JE. Production of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ by perfused pig skin (1994). *J Clinical Invest.* 102. 796-798.
- Bikle DD, Xie Z, Ng D, Tu CL, Oda Y (2003). Squamous cell carcinomas fail to respond to the prodifferentiating actions of 1, 25 (OH)₂D₃: Why? *Cancer Research* 164
- Bikle DD (2008). Vitamin D receptor, UVR, and skin cancer: a potential protective mechanism. *J Invest. Dermatol.* 128: 2357-2361.
- Binderup L, Bramm E (1988). Effects of a novel vitamin D analogue MC 903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 37. 889-895.
- Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu (1992). Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31. 106-110.
- Bollag WB, Ducote J, Harmon CS (1995). Biphasic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary mouse epidermal keratinocyte proliferation. *J Cell. Physiol.* 163:248-256.
- Boukamp P, Tilgen W, Dzarlieva RT, Breitkreutz D, Haag D, Riehl RK, Bohnert A, Fusenig NE (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from squamous cell carcinoma of human skin.
- Büttner K (2004). Effekt des Knockdowns von Rad51 mittels RNA-Interferenz auf die Homologie-vermittelte DNA-Reparatur.
- Chan DW, Lees-Miller SP (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol. Chem.* 271(15). 8936-8941.

- De Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem. Photobiol. B.* 63: 19-27.
- De Haes P, Garmyn M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2003). 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits ultraviolet B induced apoptosis, jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *J Cell. Biochem.* 89: 663-673.
- De Haes P, Garmyn M, Verstuyf A, De Clercq P, Vandewalle M, Vantieghem K, Degreef H, Bouillon R, Segaert S (2004). Two 14-epi analogues of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ protect human keratinocytes against the effects of UVB. *Arch. Dermatol. Res.* 295: 527-534.
- De Haes P, Garmyn M, Verstuyf A, De Clercq P, Vandewalle M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2005). 1, 25(OH)₂D₃ and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage.
- Dhar SK, Delmolino L, Dutta A (2001). Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol. Chemistry* 276. 29067-29071.
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat. Biol.* 73(3).269-78.
- Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J (2000). Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 46(2).481-90.
- Dizdaroglu M (1992). Oxidative DNA damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Res.* 275. 331-342.
- Dumaz N, Van Kranen HJ, De Vries A, Berg RJ, Wester PW, Van Keijl CF, Sarasin A, Daja-Grosjean L, De Gruijl FR (1997). The role of UV-B-light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice. *Carcinogenesis* 18. 897-904.
- El-Awady RA, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2003). Radiosensitivity of human tumor cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *Br. J Cancer.* 89(3).593-601.
- Epe B, Mützel P, Adam W (1988). DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vivo. *Chem.-Biol. Interactions* 67. 149-165.
- Epe B, Henzl H, Adam W, Saha-Möller CR (1993). Endonuclease-sensitive DNA induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucl. Acids Res.* 21. 863-869.
- Epe B, Hegler J (1994). Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.* 234. 122-131.
- Flohr C (2003). Untersuchung zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuclease I und das Xeroderma pigmentosum A Protein.
- Floyd RA, West MS, Schneider JE, Watson JJ, Maitt ML (1990). Hematoporphyrin D plus light mediates 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and RNA. *Free Radicals Biol. Med.* 9.76.

- Friedberg EC (1985). In: Freeman WG, *DNA repair*, New York.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995). DNA repair and mutagenesis. *ASM Press*, Washington DC, USA.
- Friedberg EC (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature* 1. 22-31.
- Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA (1997). Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol. Endocrinol.* 11: 1961-1970.
- Garach-Jehoshua O, Ravid A, Liberman UA, Koren R (1999). 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the growth-promoting activity of autocrine epidermal growth factor receptor ligand in keratinocytes. *Endocrinology* 140:713-721.
- Garland WT, Schnaper HW, Freis ED, Friedman RG, Hall WD, Hollifield J, Jain AK, Jenkins P, Marks A, McMahon FG (1989). Potassium restoration in hypertensive patients made hypocalcemic by hydrochlorothiazide. *Arch. Intern. Med.* 149(12).2677-2681.
- Gary K, Kim K, Cornelius HL, Park SM, Matsumoto Y (1999). Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol. Chem.* 274. 4354-4364.
- Gault N, Poncy JL, Lefaix JL (2004). Radiation-induced apoptosis: a new approach using infrared microspectroscopy. *Can J Physiol. Pharmacol.* 82: 38-49.
- Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986). Determination of cell number in monolayer cultures.
- Gniadecki R (1996). Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: dependence on cell culture conditions. *J Invest. Dermatol.* 106:510–516.
- Gottschalk A (2004). Klinisch unveränderte Haut vor und nach UVB-Bestrahlung : Veränderungen der Epidermisdicke und der Keratinozyten/Melanozyten Ratio.
- Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Holliday CJ, Slater M, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS (2006). Photoprotection by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ is associated by an increase in p53 and a decrease in nitric oxide products. *J Invest. Dermatol.* 127: 707-715.
- Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J (2001). 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 121: 103-109.
- Hanchette CL, Schwartz GG (1992). Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 70(12). 2861-2869.
- Hawker NP, Pennypacker SD, Chang SM, Bikle DD (2007). Regulation of human epidermal keratinocyte differentiation by the vitamin D receptor and its coactivators DRIP205, SRC2 and SRC3.
- Heine AG (2001). Der Einfluss von 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Aktivierung humaner B-Lymphozyten.
- Hofman-Hüther H (2002). Wirkung schwerer Ionen auf strahlenresistente und strahlensensitive Tumorzellen.

Holick MF, Whitlatch LW, Young MV, Schwartz GG, Flanagan JN, Burnstein KL, Lokeshwar BL, Rich ES, Chen TC (2002). 25-Hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase activity is diminished in human prostate cancer cells and is enhanced by gene transfer. *J Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 81(2):135-140.

Holick MF (2003). Evolution and function of Vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 164.

Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T (1983). Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 113: 1950-1957.

Hsieh P (2001). Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat. Res.* 486. 71-87.

Hüttermann J, Voit K, Oloff H, Kohnlein W, Graslund A, Rupprecht A (1984). Specific formation of electron gain and loss centres in X-irradiated oriented fibres of DNA at low temperatures. *Faraday Discuss Chem Soc.* 78. 135-49

Itin PH, Pittelkow MR, Kumar R (1994). Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology* 135:1793–1798.

Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, Chen TC, Holm IA, Kolodny JM, El-Hajj Fuleihan G, Seel E (1992). Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Engl. J Med.* 326. 1173-1177.

Janicijevic A, Sugasawa K, Shimizu Y, Hanaoka F, Wijgers N, Djurica M, Hoeijmakers JH, Wyman C (2003). DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair* (Amst.) 2. 325-336.

Jung EG (1992). Sonne, Pigment und Melanome. *Dt. Ärzteblatt* 89. B648-B655.

Kamradt J, Rafi L, Mitschele T, Meineke V, Gärtner BC, Wolfgang T, Holick MF, Reichrath J (2003). Analysis of the vitamin D system in cutaneous malignancies. *Recent Results Cancer Res.* 164. 259-269.

Kanaar R, Hoeijmakers JH, Van Gent DC (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell. Biol.* 8. 483-489.

Khanna KK, Jackson SP (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27. 247-254.

Kindich R (2005). Charakterisierung einer neuen Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q27 beim Prostatakazinom mit Hilfe molekular-zytogenetischer und quantitativer Methoden.

Klungland A, Lindahl T (1997). Second pathway for completion of human base excision repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 16. 3341-3348.

Kolodner RD, Marsischky GT (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9. 89-96.

Kühne M, Grudzenski S, Oelmann J, Dong X, Jiang P, Rief N, Löbrich M, Rube C (2005). γ -H2AX als Gewebsspezifischer Biomarker für die Strahlenempfindlichkeit.

Laval J (1977). Two enzymes are required from strand incision in repair of alkylated DNA. *Nature* 269. 829-832.

- Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA- dependent protein kinase. *J Biol. Chem.* 273. 1794-1801.
- Lee JH, Youn JI (1998). The photoprotective effect of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ on ultraviolet B-induced damage in keratinocyte and its mechanisms of action. *J Dermatol. Sci.* 18: 11-18.
- Lehmann B, Pietzsch J, Kampf A, Meurer M (1998). Human keratinocyte line HaCaT metabolizes 1alpha-hydroxyvitamin D₃ and vitamin D₃ to 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J. Dermatol. Sci.* 18: 118-127.
- Lehmann B, Tiebel O, Meurer M (1999). Expression of vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D₃ or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents-a preliminary study. *Arch. Dermatol. Res.* 291: 507-510.
- Lehmann B, Rudolph T, Pietsch J, Meurer M (2000). Conversion of Vitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in human skin equivalents.
- Lippke JA, Gordon LK, Brash DE, Hanawalt DA (1981). Distribution of UV light-induced damage in a specified sequence of human DNA: detection of alkaline sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78. 3388-3392.
- Löffler G, Petrides P (1998). Biochemie und Pathobiochemie
- Lyakhovich A, Aksenov N, Pennanen P, Miettinen S, Ahonen MH, Syvala H, Ylikomi T, Tuohimaa P (2000). Vitamin D induced up-regulation of keratinocyte growth factor (FGF-7/KGF) in MCF-7 human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 675-680.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108. 781-794.
- Mahler HC (1999). Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden.
- Marti TM, Kunz C, Fleck O (2002). DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell. Physiol.* 191. 28-41.
- Matsumoto Y, Kim K, Hurwitz J, Gary K, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol. Chem.* 274. 33703-33708.
- McManus KJ, Hendzel MJ (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells.
- Meffert H, Piazena H, Schmollak KP, Sterry W (1998). Erythemgewichtete UV-Therapie. *Z Hautkr.* 73. 474-478.
- Meinecke V, Pfaffendorf C, Schinn M, Tilgen W, Mayerhofer A, Dimitrijevic N, van Beuningen D, Reichrath J (2003). Modulation of X-ray-induced apoptosis in human keatinocytes (HaCaT) by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Research* 164

Meisser P, Reichrath J (2007). Immunhistochemische Detektion des hMSH-2-Proteins im Merkelzellkarzinom in situ und UV-B-induzierte Modulation der Expression von hMSH-2 in Merkelzellkarzinom-Zelllinien in vitro.

Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE (1991). Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem. Photobiol.* 54. 741-746.

Moné MJ, Volker M, Nikaido O, Mullenders L, van Zeeland AA, Verschure PJ, Manders EMM, van Driel R(2001). Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition.

Morimoto S, Kumahara Y (1985). A patient with psoriasis cured by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃. *Med. J Osaka Univ.* 35. 3-4, 51-54.

Nilsen H, Krokan HE (2001). Base excision repair in a network of defense and tolerance. *Carcinogenesis* 22. 987-998.

OhUigin C, McDonnell DJ, Kelly JM, Von der Putten JM (1987). Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucl. Acids Res.* 15. 7411-7127.

Pascucci B, Stucki M, Jonsson ZO, Hübscher U, Dogliotti E (1999). Long patch base excision repair with purified human proteins. *J Biol. Chem.* 274. 33696-33702.

Paull TT, Gellert M (1999). Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13. 1276-1288.

Paull TT, Gellert M (2000). A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97. 6409-6414.

Pausner N (2000). Pyridinium-Crosslinks; Knochenstoffwechsel und Peritonealdialyse.

Peltomäki P (2003). Role of DNA mismatch repair defects in pathogenesis of human cancer. *J Clin. Oncol.* 21. 1174-1179.

Perez A, Chen TC, Turner A, Raab R, Bhawan J, Poche P, Holick MF (1996). Efficacy and safety of topical calcitriol (1, 25-dihydroxyvitamin D₃) for the treatment of psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 134: 238-246.

Pfeiffer P. (1998). The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol. Lett.* 96-97. 119-129.

Pfeiffer P, Goedecke W, Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15. 289-302.

Piazana H, Meffert H (1994). Humanbiologische und medizinische Wirkungen ultravioletter Strahlung. *Bundesgesundheitsbl. Sonderheft Oktober.* 11-26.

Piette J, Calberg-Bacq CM, Van de Vorst A (1981). Alteration of guanine residues during proflavine mediated photosensitization of DNA. *Photochem. Photobiol.* 33. 325-333.

Proksch E, Hauschild A (1994). Risiken der Sonnenexposition. *Dtsch. Med. Wschr.* 119. 1047-1052.

- Raschke S (2007). Mechanismen der Zytotoxizität durch Alpha-Strahlung in humanen normalen und malignen hämatopoetischen Zellen.
- Reichrath J, Holick MF (1999). Clinical utility of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ and its analogs for the treatment of psoriasis and other skin diseases. In: MF Holick (editor). *Physiology, molecular biology and clinical applications*. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 357-373.
- Reichrath J, Rafi L, Rech M, Mitschele T, Meinecke V, Gärtner BC, Tilgen W, Holick MF (2004). Analysis of the vitamin D system in cutaneous squamous cell carcinomas. *J Cutan. Pathol.* 31: 224-231.
- Reichrath J, Rech M, Moeini M, Meese E, Tilgen W, Seifert M (2007). In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)₂D₃-responsive and -resistant melanoma cells. *Cancer biology and therapy* 6(1). 48-55.
- Röske M (2005). Der Rekombinationsfaktor Rad51 in Tumoren der Haut: eine immunhistochemische Studie.
- Rothkamm K, Löbrich M (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* 100: 5057-5062.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239. 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor
- Sancar A, Rupp WD (1983). A novel repair enzyme: uvrABC excision nuclease of Escherichia coli cuts in a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* 33. 249-260.
- Scheider JE, Price S, Maitt L, Gutteridge JMC, Floyd RA (1990). Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucl. Acids Res.* 18. 631-635.
- Schnauffer HP (2003). Der Einfluss serieller UV-Therapie auf arteriellen Blutdruck, Herzfrequenz und Kalziumstoffwechsel bei Patienten mit milder Hypertonie.
- Schneider-Stock R, Giers A, Motsch C, Boltze C, Evert M, Freigang B, Roessner A (2003). Hereditary p16-Leiden mutation in a patient with multiple head and neck tumors. *Am. J Hum. Genet.* 72 (1). 216-218.
- Schofield M, Nayak S, Scott TH, Du C, Hsieh P (2001). Interactions of Escherichia coli MutS and MutL at a DNA mismatch. *J Biol. Chem.* 276. 28291-28299.
- Schöneborn PW (2002). Effekte der UVA₁-und UVB-Strahlung: Apoptose- und Nekroseinduktion humaner T-Lymphozyten in vitro und Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung.
- Schultze EG, Jungmann H (1992). Praxis der Heliotherapie. In: Bühring M, Jung EG (Hrsg.): *UV-Biologie und Heliotherapie*; Hippokrates-Verlag. 73-84.

- Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF (1998). Human prostate cells synthesize 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ from 25-Dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7. 391-395.
- Setlow RB (1966). Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science* 153: 379-386.
- Sies H (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* 98. 1061-1075.
- Smith EL, Walworth SB, Holick MF (1986). Effect of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J. Invest. Dermatol.* 86. 709-714.
- Solvsten H, Svendsen ML, Fogh K, Kragballe K (1997). Upregulation of vitamin D receptor levels by 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ in cultured human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 289. 367-372.
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64: 2390-2396.
- Stucki M, Pascucci B, Parlanti E, Fortini P, Wilson SH, Hübscher U, Dogliotti E (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerase δ and ϵ . *Oncogene* 17. 835-843.
- Svendsen ML, Daneels G, Geysen J, Binderup L, Kragballe K (1997). Proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes is modulated by 1,25(OH)2D₃ and synthetic vitamin D₃ analogues in a cell density-, calcium and Serum-dependent manner. *Pharmacol. Toxicol.* 80:49-56.
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee SY, Sung P (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol. Chem.* 273. 21447-21450.
- Tyrrell RM, Keyse SM (1990). The interaction of UV-A radiation with cultured cells. *J Photochem. Photobiol.* 4. 349-361.
- Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G (2001). Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 20. 2212-2224.
- Winkler GS, Sugawara K, Eher AP, De Laat WL, Hoeijmakers JH (2001). Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry* 40. 160-165.
- Wiskemann A (1992). Zum Hautkrebsrisiko durch UV-Strahlung. In: Bühring M, Jung EG (Hrsg.): *UV-Biologie und Heliotherapie*; Hippokrates-Verlag. 13-18.
- Wittwer CT, Hermann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22. 130-131.
- Wood RD (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81. 39-44.
- Wu S, Geilen CC, Tebbe B, Orfanos CE (1996). 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃: its role for homeostasis of keratinocytes. *J Nutr. Biochem.* 7. 642-649.

Yarosh Daniel B., Arely V. Pena, Stephanie L. Nay, Matthew T. Canning, David A. Brown (2005). Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following UVB-irradiation.

Yoo S, Kimzey A, Dynan WS (1999). Photocross-linking of an oriented DNA repair complex. Ku bound at a single DNA end. *J. Biol. Chem.* 274. 20034-20039.

Yu VC, Deisert C, Andersen B, Holloway JM, Davary OV, Näär AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991). RXR β : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67. 1251-1266.

7. Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Calcitriol
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated protein</i> (Proteinkinase)
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BSA	Bovines Serum-Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFUc-Assay	<i>Colony Forming Unit culture Assay</i>
Cp	<i>Crossing point</i> (Kreuzungspunkt)
CPD	Cyclo-Pyrimidin-Dimere
Cu	Kupfer
CV	Kristallviolett-Assay
CYP24	24-Hydroxylase
CYP27A1	25-Hydroxylase
CYP27B1	1α-Hydroxylase
D.h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fe	Eisen
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HR	Homologe Rekombination
IR	<i>ionizing radiation</i> (ionisierende Strahlung)
kDa	Kilodaltons
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
Max.	Maximum

min	Minute(n)
Min.	Minimum
mind.	mindestens
MMR	Mismatch Reparatur
MOPS	<i>3-(n-Morpholino)Propanesulfonic Acid</i>
mRNA	<i>messenger RNA (Boten-RNA)</i>
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
Nm	Nanometer
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RFC	Replikations-Faktor C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, das am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde. Es dient zur Kultivierung normaler und neoplastischer Leukozyten sowie für Knochenmarks- und Hybridomazellen.
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (Plattenepithelkarzinom)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase, die aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> isoliert wurde
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
U/ μ l	<i>units/μl</i> (Einheiten/ μ l)
U/min	Umdrehung(en)/min
Usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>Vitamin D-Responsive Element</i>

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner Mutter, meiner Schwester Célie und David für ihre grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung. Sie haben mir die Kraft und die Ausgeglichenheit gegeben das Medizinstudium, die Dissertationsarbeit und so manch andere Lebenssituation zu meistern;

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Tilgen, Direktor der Universitäts-Hautklinik Homburg/Saar, für die Möglichkeit, meine Arbeit an seiner Klinik durchführen zu können;

Herrn Prof. Dr. Jörg Reichrath, meinem Doktorvater, der mir mit sehr viel Geduld, regelmäßigen, motivierenden Gesprächen und wissenschaftlichen Anregungen eine wertvolle, kontinuierliche Unterstützung war;

Herrn Dr. rer. nat. Markus Seifert, Leiter des Forschungslabors, für seine Geduld und seine Hilfe auf dem Gebiet der Molekularbiologie;

Frau Heike Palm, Frau Annett Weinhold, Frau Alexandra Stark, Frau Anne Kerber und Frau Sonja Dauskardt, Medizinisch-Technische Assistentinnen an der Universitäts-Hautklinik Homburg/Saar, für die Einarbeitung, die freundliche Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente und das herzliche Arbeitsklima im Labor;

Meinen Mitdoktoranden Pit Serznig, Kristian Dujic, Hedwig Stanisz und Batool Shannan für die nette, freundschaftliche Atmosphäre im Labor

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum/Ort: 19.04.1984 in Völklingen
Staatsangehörigkeit: deutsch und französisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

06/2002 Abitur am Deutsch-Französischen Gymnasium in Saarbrücken

Studium

seit 10/2002 Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
02.09.2004 Physikum: Note 1,6
02/2007-06/2007 Auslandsaufenthalt auf Teneriffa im Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes
08/2007-06/2008 Praktisches Jahr
1. Terial: Dermatologie an der Universitätsklinik des Saarlandes
2. Terial: Innere Medizin im Knappschaftskrankenhaus Püttlingen
3. Terial: Chirurgie im Knappschaftskrankenhaus Püttlingen
11.11.2008 Abschluss des Studiums mit dem Staatsexamen: Note 2,0

Promotion

07/2005-02/2009 im Forschungslabor der Dermatologie, Standort: Universitätsklinik des Saarlandes

11/2006 Publikation in der Zeitschrift *Anticancer Research* (Cutaneous photosynthesis of vitamin D: An evolutionary highly-conserved endocrine system that protects against environmental hazards including UV-radiation and microbial infections)

