

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken**

**Viabilität von Cockayne Syndrom Zellen
im Vergleich zu Wildtypkontrollen
nach repetitiver UVA-Bestrahlung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Georg Johannes Schüle
aus Freudenstadt**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Berneburg

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. M. Rohrbach

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 UV-Strahlung	7
1.1.1 Wirkung von UV-Strahlung auf DNA	7
1.1.2 Wirkung von UV-Strahlung auf Lipide	8
1.1.3 Wirkung von UV-Strahlung auf Proteine.....	8
1.1.4 Wirkung von UV-Strahlung auf zelluläre Signalwege und Mediatoren	9
1.1.5 Wirkung von UV-Strahlung auf Transkriptionsfaktoren.....	10
1.1.6 Apoptose.....	11
1.1.7 Vitamin D-Synthese.....	12
1.1.8 Melanozyten.....	12
1.1.9 Akute und chronische Effekte von UV-Strahlung auf die Haut	13
1.2 DNA-Reparatur	14
1.2.1 Direkte Reparatur/Photoreaktivierung und Alkylguanin-Transferase	15
1.2.2 Mismatch-Reparatur.....	15
1.2.3 Doppelstrangbruchreparatur	16
1.2.4 Basen-Exzisions-Reparatur BER	17
1.2.5 Nukleotid-Exzisions-Reparatur NER	17
1.2.6 Transläsionssynthese.....	19
1.2.7 Reparatur nukleärer DNA versus mitochondrialer DNA	19
1.3 NER-Defizienzsyndrome	20
1.3.1 Xeroderma pigmentosum	20
1.3.2 Trichothiodystrophie	21
1.3.3 Cockayne Syndrom.....	22
1.4 Mitochondriale Mutationen bei Zellalterung und Photoalterung	24
1.5 Fragestellung der Arbeit	24

2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	26
2.1.3 Chemikalien	27
2.1.4 Zellen	27
2.1.5 Kulturmedium	28
2.1.6 MTT-Vorratsreagenz	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Auftauen der Zellen	28
2.2.2 Mediumwechsel	29
2.2.3 Splitten der Zellen	29
2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	29
2.2.5 Aussäen der Zellen	30
2.2.6 Aufbau der Versuchsreihen	30
2.2.7 Bestrahlung der Zellen	31
2.2.8 MTT-Assay	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Versuchsreihen	33
3.2 Ergebnisse der Zelllinien	35
3.2.1 CS4BR	35
3.2.2 GM739	35
3.2.3 GM1856	36
3.2.4 F92	37
3.3 Tabellen und Diagramme der MTT-Assays	38
3.3.1 Tabellen und Diagramme zur Bestrahlung mit 4 J/cm ² :	38
3.3.2 Tabellen und Diagramme zur Bestrahlung mit 6 J/cm ² :	49
3.3.3 Tabellen und Diagramme bei 4 und 6 J/cm ² im Vergleich	60
3.4 Tabellen und Diagramme zur Zellzahlbestimmung	65

4. Diskussion	71
4.1 Aussage der Ergebnisse.....	71
4.2 Diskussion der Methoden, Qualität, Zellzahl und MTT	71
4.2.1 Trypanblaumethode	71
4.2.2 MTT-Assay.....	72
4.3 Möglichkeiten zur Verbesserung der Aussagekraft.....	72
4.4 Zelluläre Charakterisierung von CS-Zellen.....	73
4.5 Viabilität/Sensibilität von CS-Zellen bei UVB/C-Bestrahlung.....	75
4.6 Viabilität/Sensibilität von CS-Zellen bei UVA1-Bestrahlung	76
4.7 Zusammenfassung	77
5. Literatur	78
6. Abkürzungen	82
7. Danksagung	84
8. Curriculum Vitae.....	85

1. Einleitung

1.1 UV-Strahlung

Ultraviolette (UV)-Strahlung ist Energie in Form elektromagnetischer Wellen mit einem Spektrum zwischen 1 nm und 400 nm Wellenlänge. Die Strahlung der Sonne wird vor Erreichen der Erdoberfläche durch die Ozonschicht gefiltert. Die energiereiche kurzwellige UV-Strahlung wird hierbei absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht. Die biologisch wirksame Sonnenstrahlung, die die Erdoberfläche erreicht, hat ein Wellenlängenspektrum von ca. 280 nm bis 400 nm und wird in UVB (280 - 320 nm) und UVA (320 - 400 nm) unterteilt. (Garmyn 2007)

Um biologisch aktiv zu werden, muss ein Photon der UV-Strahlung von einem Molekül im Organismus absorbiert werden.

Strahlung kürzerer Wellenlänge wird in der Haut schon oberflächlich (hauptsächlich in der Epidermis) absorbiert, während längerwellige UV-Strahlung tiefer in die Haut eindringt und die Dermis erreicht. (Garmyn 2007, Yoon 2000)

1.1.1 Wirkung von UV-Strahlung auf DNA

Ein biologisch wichtiger Chromophor (griech. Farbträger) der Hautzellen ist deren Desoxynukleinsäure (DNA). DNA absorbiert UV-Licht aller Wellenlängen und hat ein Absorptionsmaximum für Strahlung im Bereich von um die 260 nm. Um jedoch die DNA in Hautzellen zu erreichen, muss die UV-Strahlung zuerst die äußeren Hautschichten durchdringen, die die kurzwellige Strahlung besonders gut streuen und absorbieren.

Innerhalb der DNA absorbiert die 5'-6'-Doppelbindung der Pyrimidin-Basen die Photonen des UV-Lichtes am effektivsten. Wenn ein oder zwei benachbarte Pyrimidine ein Photon absorbieren, ist das häufigste Ergebnis die Bildung eines Cyclobutan-Pyrimidin Dimeres (CPD). Hierbei werden die beiden Pyrimidine an Position fünf und sechs verbunden. Selten findet auch eine 6'-4'-Bindung statt, die zu einem Pyrimidin-Pyrimidon Photoprodukt führt. Es wird angenommen,

dass die Bildung von CPD nach Bestrahlung mit Sonnenlicht 20 - 40-mal häufiger auftritt als die Bildung anderer Photoprodukte. (Garmyn 2007)

Neben den direkten Effekten der UV-Strahlung auf die DNA können auch indirekte Effekte die DNA schädigen. Hierbei steht die oxidative Schädigung im Vordergrund. In der Haut absorbierte UV-Strahlung führt zur Bildung von Sauerstoffradikalen, die mit der DNA reagieren können. Eine der anfälligsten Stellen ist die Position acht am Guanin. Es entsteht 8-oxo-Guanin (8oxoG). Eine weitere oxidierte Base ist Thymin-Glycol. Mutationen von Basen in Schlüsselgenen, wie Onkogenen und Tumor-Suppressorgenen, können zu der Entartung einer Zelle, und somit zur Krebsentstehung beitragen. (Garmyn 2007, Courdavault 2004)

1.1.2 Wirkung von UV-Strahlung auf Lipide

Das biologisch wirksame Spektrum der UV-Strahlung korreliert nicht mit dem Absorptionsspektrum von Lipiden. Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) können Lipide jedoch oxidiert werden. Dies kann zum einen durch direkte Oxidation von Doppelbindungen geschehen, zum anderen kann eine Kettenreaktion angestoßen werden, bei der ein oxidiertes Lipid mit dem nächsten reagiert. (Garmyn 2007)

1.1.3 Wirkung von UV-Strahlung auf Proteine

Proteine können durch ROS oxidiert werden. Enzyme der Methionin-Sulfoxid-Reduktase-Familie halten den Level an oxidierten Proteinen niedrig indem sie diese auch bei chronischer UV-Exposition abbauen.

UV-Strahlung kann über Induktion so genannter Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) in Fibroblasten zum Abbau von Interzellulärschubstanz führen. Diese MMPs sind in der Lage, das umliegende Kollagen und Elastin zu verdauen. (Garmyn 2007, Ziegler 1994)

1.1.4 Wirkung von UV-Strahlung auf zelluläre Signalwege und Mediatoren

Es wird angenommen, dass UV-Strahlung dazu führt, dass Rezeptoren der Zellmembran sich auch ohne Ligandenbindung gruppieren können. Diese Gruppierung ist ein gut untersuchter Mechanismus zur Übertragung extrazellulärer Signale in zelluläre Aktivierung. So führt die Gruppierung von Cluster of Differentiation (CD)95-Rezeptoren zur Aktivierung von Apoptose unabhängig von DNA-Mutationen im Zellkern. Auch viele andere Rezeptoren können über den beschriebenen Vorgang durch UV-Licht aktiviert werden, unter anderem wird dies für den Tumornekrosefaktor α (TNF α)-Rezeptor, den Interleukin (IL)1-Rezeptor, den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, den Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGF-Rezeptor), den Insulin-Rezeptor und den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF)-Rezeptor angenommen.

UV-Bestrahlung führt zu einer Änderung in der Zytokinproduktion in der Epidermis. Es ist bekannt, dass Keratinozyten ein weites Spektrum an pro-inflammatorischen Zytokinen nach UV-Bestrahlung sezernieren können. Darunter befinden sich die Interleukine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, der Granulozyten-Kolonie-stimulierende-Faktor (G-CSF), Interferon γ (INF- γ), der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α), TGF β und der Tumornekrosefaktor α (TNF α).

Außerdem konnte die Induktion von Stickoxid (NO) in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. NO reagiert unter anderem mit Wasserstoffperoxid unter Bildung von Peroxinitrit, das wiederum einen Aktivator verschiedener Signalwege darstellt. Außerdem ist NO auch an der Entzündungsreaktion, der Gefäßerweiterung, der Erythembildung und dem Bräunungsvorgang der Haut beteiligt. Die Umwandlung des trans-Isomeres der Urokainsäure zum cis-Isomer nach UV-Bestrahlung kann zu Immunsuppression führen. UV-Licht kann auch die Freisetzung von Mediatoren aus dem Bereich der Lipide bewirken, wie zum Beispiel von Prostaglandin E₂ (PGE₂).

(Garmyn 2007)

1.1.5 Wirkung von UV-Strahlung auf Transkriptionsfaktoren

Die durch UV-induzierte Gruppierung von Zellrezeptoren stößt Signalwege an, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Dies wird auch als UV-Antwort der Zelle bezeichnet. Hierbei spielt die Phosphorylierung durch Proteinkinasen eine besondere Rolle. Man nimmt an, dass zwei wichtige Gruppen von Kinasen an der UV-Antwort der Zelle beteiligt sind. Zum einen die Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAKP-Familie) und zum anderen eine Gruppe, die an der Kontrolle der Integrität des Genoms beteiligt ist [„Ataxia teleangiectasia and Rad3 related Kinase“ (ATR), Checkpoint homologe Proteinkinase (Chk2) und DNA-Proteinkinase]. Die MAKP-Familie reagiert auf zellulären Stress wie Membranschädigung oder oxidativen Stress, während ATR ein primärer DNA-Sensor und wichtig für die Phosphorylierung verschiedener Gap(G)1/Synthese(S)-Kontrollpunktproteine ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass ATR UVB-geschädigte DNA bindet und seine Kinaseaktivität dem Tumorsuppressorprotein (p)53 gegenüber erhöht.

Das aktivierte p53 ist an vielen Reaktionen auf DNA-Schädigung beteiligt, unter anderem beim Stoppen des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist die häufigste Zielstruktur für Mutationen in Krebszellen. Neben dem Transkriptionsfaktor p53 sind auch Aktivator Protein 1 (AP-1) und „Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NFkB) an der UV-Antwort beteiligt. NFkB ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene reguliert, die an der Entzündungsreaktion, der Immunität, dem Fortschreiten des Zellzyklus, der Apoptose und der Krebsentstehung beteiligt sind. AP-1 beinhaltet mehrere dimere Komplexe aus Proteinen und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei dem durch UV-Licht induzierten Alterungsprozess. Es ist an der Regulation verschiedener extrazellulärer Proteine beteiligt, z.B. der Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und des Typ I Prokollagen.

Eine Reaktion auf UVB-induzierten DNA-Schaden ist ein Stopp des Zellzyklus in der G1-oder G2-Phase. Der cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21/WAF1 stellt eine direkte Zielstruktur für p53 dar und vermittelt den Zellzyklusstopp in der G1-Phase. Beim Stopp in der G2-Phase spielen andere p53-abhängige

Faktoren wie 14-3-3 sigma und GADD45 („growth arrest and DNA damage inducible gene“) eine Rolle. (Garmyn 2007, Rittie 2002)

1.1.6 Apoptose

Die Apoptose ist ein energieabhängiger, genau regulierter Zelltod, der sicherstellt, dass überflüssige, infizierte, irreparabel geschädigte oder veränderte Zellen eliminiert werden. Apoptose kann von verschiedensten Stressoren, wie UVB induziert werden. Die apoptotische Zelle ist durch spezifische Veränderungen wie Zellschrumpfung, Bläschenbildung der Membran, Kondensation von Chromatin und DNA-Fragmentierung gekennzeichnet. Dies führt zur Bildung eines pyknotischen Kerns und schließlich zu Apoptosekörperchen. Nach Bestrahlung mit hohen UVB-Dosen findet man Zellen mit eosinophilem Cytoplasma und apoptosetypischer Morphologie in der Epidermis, welche als „Sonnenbrandzellen“ bezeichnet werden. Zellbiologisch spielt bei der Apoptose die Familie der Cysteinproteasen (Caspasen) eine wichtige Rolle. Es gibt zwei Hauptwege, die zur Apoptose führen:

Der intrinsische Weg wird an den Mitochondrien aktiviert. Zelltod induzierende Signale wie DNA-Schaden führen zur Bax („B-cell lymphoma 2 assoziiertes X Protein“)-abhängigen Freisetzung von Cytochrom C, das zusammen mit dem Apaf-1 („apoptotic peptidase activator factor 1“) zur Bildung des Apoptosekörperchens und zur Aktivierung von Procaspase 9 führt.

Der extrinsische Weg wird an der Zelloberfläche durch Zelltod-induzierende-Rezeptoren (CD95/fas, TNF α -Rezeptor) angestoßen. Anschließend wird die Initiator-Caspase 8 aktiviert.

Beide Wege führen zur Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspasen -3, -6, und -7), die direkt für den Abbau zellulärer Proteine und für die apoptosetypische Zellmorphologie verantwortlich sind.

Es wird angenommen, dass der durch UV-Licht ausgelöste Zelltod durch drei unabhängige Prozesse die intrinsische und extrinsische Apoptose starten kann: Durch DNA-Schäden, durch die Gruppenbildung von Membranrezeptoren und durch die Bildung von Sauerstoffradikalen. (Garmyn 2007, Matsumura 2002))

1.1.7 Vitamin D-Synthese

Die Synthese von Vitamin D₃ (Vit D₃) in der Haut ist die Hauptquelle des Vitamins im menschlichen Körper. Es wird durch UV-Licht aus 7-Dehydrocholesterol (DHC) gebildet, welches in großen Mengen in der Membran von Keratinozyten der basalen und spinözellulären Schicht der Epidermis vorkommt. Durch UV-Licht wird der B-Ring von 7-DHC unter Bildung von Provitamin D₃ aufgebrochen. Provitamin D₃ hat eine sehr niedrige Affinität zu dem Vitamin-D-bindenden-Protein (DBP), so dass der Übertritt in den Blutkreislauf erschwert wird. In der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen wird das instabile Provitamin durch Wärmeenergie weiter zu Vit D₃ isomerisiert. Die Umwandlung zu Vit D₃ ermöglicht den Übergang in die Blutbahn, wo es von dem DBP aufgenommen und in Leber und Nieren zu 1,25-D₃ verstoffwechselt wird. Epidermale Keratinozyten können nicht nur Vit D₃ produzieren, sondern es auch durch die Enzyme Cytochrom P27A1 (CYP27A1), CYP2R1 und CYP27B1 über 25-D₃ zu 1,25-D₃ umwandeln. Vit D wirkt dort als Antioxidanz, und spielt des Weiteren im Kalziumstoffwechsel eine wichtige Rolle. (Garmyn 2007, Lehmann 1999)

1.1.8 Melanozyten

Melanozyten produzieren Pigmente und liegen in der basalen Epidermis. Sie verteilen Melanosomen, welche Melanin enthalten, an die Keratinozyten in der Umgebung. Die Melanosomen beinhalten zwei Pigmentklassen: das braun bis schwarze Eumelanin und das braun-rötliche Pheomelanin. Die relative Menge dieser Pigmente, sowie die Größe und Dichte der Melanosomen, ist für die unterschiedlichen Hautfarben des Menschen verantwortlich. Die Hautfarbe hat großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Hautkrebsentstehung, da das zusammengesetzte Melanin einen großen Teil des UV-Spektrums absorbiert und reflektiert.

Die Haut reagiert auf UV-Licht mit einer Erhöhung der Pigmentproduktion, welche durch Bräunung der Haut auffällig wird. Leider hat gebräunte Haut nur einen Lichtschutzfaktor von 2 - 3, was daran liegt, dass das zusätzlich produzierte Melanin diffus in der Epidermis verteilt ist und nicht wie das

konstitutionelle Melanin als Kappen über den Zellkernen der Keratinozyten vorliegt. (Garmyn 2007)

1.1.9 Akute und chronische Effekte von UV-Strahlung auf die Haut

Der Sonnenbrand ist eine akute Reaktion auf UV-Licht. Die UV-Dosis, die nötig ist, um ein Erythem auszulösen, hängt stark von der Wellenlänge der UV-Strahlung ab. So ist für UVA eine ca. 1000-fach höhere Dosis nötig als für UVB. Aufgrund der ähnlichen Wirkung von kurzwelligem UVA und UVB wurde das UVA-Spektrum weiter in UVA1 (340 - 400 nm) und UVA2 (320 - 340 nm) unterteilt.

An der Entstehung des Sonnenbrands sind verschiedene Mediatoren beteiligt:

- ROS
- Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1
- Vasoaktive Mediatoren wie NO und PGE2
- Proinflammatorische Zytokine (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12)
- Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1) und E-Selektin

UVB-Licht induziert eine Verdickung der Epidermis, was zur Folge hat, dass durch UVB ausgelöste Bräunung einen höheren Lichtschutzfaktor hat, als die durch UVA ausgelöste Bräunung. Hauttypen drei und vier haben eine wesentlich höhere Tendenz zu bräunen als Hauttypen eins und zwei.

(Rhodes 2007)

Für den zellulären Alterungsprozess durch UV-Licht wird neben den zellschädigenden Effekten der ROS an den Zellmembranen und der Erbsubstanz auch die über AP-1-induzierten MMPs sowie die Schädigung von Mitochondrien und die UV-induzierte Kürzung von Telomeren verantwortlich gemacht.

(Yaar 2007)

Zusammenfassend kann man sagen, dass UV-Strahlung im Organismus des Menschen, insbesondere in der DNA der Hautzellen schädigende Effekte hat. Die UV-Antwort der Zelle führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Apoptose. Vitamin D und Melanosomen sind Schutzfaktoren gegen die Zellschädigung durch UV-Strahlung.

1.2 DNA-Reparatur

Zellen von Säugetieren sind mit verschiedenen DNA-Reparatursystemen ausgestattet, die Schäden finden und sie beheben. Je nach Art der Schädigung werden ein oder mehrere Reparatursysteme aktiv: Photoreaktivierung, Basen-Exzisions-Reparatur (BER), Mismatch-Reparatur (MMR), Doppelstrangbruch-Reparatur und die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).

DNA mit modifizierten Basen (wie 8oxoG) wird durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) repariert, die nur die veränderte Base und wenige benachbarte Basen ersetzt.

DNA mit sperrigen Schäden oder Schäden, die die Struktur ändern (wie CPD), werden von der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) behoben, die ca. 29 Basen ersetzen kann. In beiden Fällen wird der unbeschädigte Strang als Vorlage für das Ersetzen der beschädigten DNA-Sequenz verwendet. Innerhalb der NER unterscheidet man zwischen der Globalen-Genom-Reparatur (GGR) und der Transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR). Während die GGR nahezu überall stattfindet, können lokalisierte Defekte transkribierter DNA schneller durch einen Komplex behoben werden, der die (TCR) vollzieht.

Wenn diese Reparatursysteme versagen und zuviel Schaden an der DNA zurückbleibt, kann die Zelle einen Stoffwechselweg einleiten, der zum Selbstmord der Zelle (Apoptose) führt.

Während der Reparatur und Replikation von beschädigter DNA werden fehlerhafte Basen, Deletionen oder andere Fehler mit einer Häufigkeit von circa eins zu einer Million eingebaut. Bei der in der Translasionssynthese verwendeten Polymerase zeta kann es auch zu einer höheren Fehlerfrequenz kommen. Im Folgenden soll ein Überblick über die DNA-Reparatur bei Pro- und Eukaryonten dargestellt werden. Allgemein können alle Reparaturmechanismen in drei Schritte eingeteilt werden:

1. Schadenerkennung
2. Schadenprozessierung
3. Wiederherstellung der DNA-Integrität

(Larsen 2005, Knippers 2006, 247-294)

1.2.1 Direkte Reparatur/Photoreaktivierung und Alkylguanin-Transferase

Mit Hilfe des Enzymes Photolyase können Bakterien UV-Schäden korrigieren. Die Photolyase bindet an Pyrimidindimere und kann durch Nutzung sichtbaren Lichtes mit der Wellenlänge 340 - 400 nm die Cyclobutanringe spalten. Hierfür sind zwei Chromophore erforderlich. 5,10-Methylentetrahydrofolat sammelt die Lichtenergie und überträgt sie auf das Flavinadenin-Dinukleotid (FAD). Die reduzierte Form FADH₂ liefert die beiden für die Spaltung nötigen Elektronen. Eine Photolyase findet sich auch bei einigen Eukaryonten, allerdings nicht in Säugetierzellen. (Knippers 2006, 275-276)

Die Photoreaktivierung ist ein Beispiel für eine direkte Reparatur, bei der das veränderte Nukleotid nicht aus dem DNA-Strang entfernt, sondern an Ort und Stelle repariert wird. Ein weiteres Beispiel für eine direkte Reparatur ist das Enzym Methylguanin-Methyltransferase, auch Alkylguanin-Transferase (AGT) genannt, welches verschiedene Alkylgruppen von der O6-Position an Guanin entfernen kann. Es übernimmt die Alkylgruppe aus der DNA und überträgt sie auf einen Cysteinrest. Diese Reparatur kommt vermutlich in allen Organismen vor, sowohl in Bakterien als auch in Eukaryonten. (Knippers 2006, 268-269, Larsen 2005)

1.2.2 Mismatch-Reparatur

Die Mismatch-Reparatur dient der Korrektur falscher Basenpaarungen. Bei Prokaryonten erkennen die Proteine MutH (methylgerichtetes mismatch-Reparaturprotein), MutL und MutS die Falschpaarung und schneiden den neuen, noch nicht methylierten Basenstrang auf der 3'- oder 5'-Seite des falschen Basenpaars heraus. Die DNA-Helikase II entwindet den geschnittenen Strang und Exonukleasen (Typ I oder VII) bauen den Strang ab. Die entstandene Lücke wird durch Neusynthese geschlossen indem die DNA-Polymerase III Nukleotide an das freie Ende anheftet und die DNA-Ligase die letzte Phosphodiesterbindung schließt.

Auch Eukaryonten besitzen Mismatch-Reparatursysteme, die mit den bakteriellen verwandt sind. Daher lautet die Bezeichnung der betreffenden eukaryontischen Proteine MSH (MutS-Homolog) und MLH (MutL-Homolog).

Diese Proteine sind an der Reparatur aller möglichen Fehlpaarungen beteiligt, wobei nicht DNA-Methylierungen wie bei Prokaryonten, sondern die freien Enden wachsender DNA-Stränge als Erkennungssignal dienen. Ein Kennzeichen eukaryontischer Mismatch-Reparatur ist die Fähigkeit auch längere Insertionen mit bis zu 12 oder 16 Nukleotiden zu entfernen. Bei *E. coli* ist nur die Entfernung von Insertionen von 1, 2 oder 3 Nukleotiden möglich.

Die Bedeutung der Mismatch-Reparatur für den Menschen wurde bei Patienten mit dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) entdeckt. Bei ihnen finden sich Mutationen in den Genen MLH2 oder MSH3 oder selten in anderen Genen, die für MutL- und MutS-Homologe kodieren. (Knippers 2006, 258-259)

1.2.3 Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche haben meist schwerwiegende Folgen für die Struktur und Funktion des Genoms, aber auch sie können repariert werden.

Bakterien, die rasch proliferieren, haben zwei oder mehrere DNA-Stränge. Die Enden eines gebrochenen DNA-Stranges können daher auf homologe Abschnitte eines intakten DNA-Stranges geleitet werden. Bei der allgemeinen homologen Rekombination bilden sie eine sogenannte „Hollidaystruktur“ als Zwischenform. Dieser Mechanismus findet sich auch bei Hefen und anderen Eukaryonten. In Eukaryonten stammt die intakte DNA vom homologen Chromosom oder vom Schwesterchromatid.

Ein anderer Weg, die Doppelstrangbrüche zu reparieren, ist die nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung. An diesem komplexen Prozess sind verschiedene Proteine beteiligt. Zu Anfang lagert sich ein Proteindimer (Ku70/Ku80) an die DNA-Enden an. Das Dimer zieht eine DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) an, die vermutlich für die Aktivierung der Ligasereaktion verantwortlich ist. Nun werden die Enden durch Exo- und Endonukleasen zurechtgeschnitten. Für die anschließende Ligation ist ein Komplex aus Protein XRCC4 („x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4“) und Ligase IV zuständig. (Knippers 2006, 281-284)

1.2.4 Basen-Exzisions-Reparatur BER

Bei der BER schneidet eine Glykosylase die beschädigte Base heraus. Hierdurch entsteht eine Apurin- bzw. Apyrimidinstelle (AP-Stelle). Nun schneidet eine AP-Endonuklease das Deoxyribosephosphatband auf. Der Deoxyribosephosphatrest wird durch eine Deoxyphosphodiesterase (dRPase) entfernt und die entstandene Lücke durch eine DNA-Polymerase β (bei Eukaryonten) gefüllt. Im letzten Schritt verschließt die DNA-Ligase zusammen mit dem Protein XRCC1 das Deoxyribosephosphatband wieder.

Die BER dient der Reparatur von DNA-Schäden, die z.B. durch Hydrolyse, Hydroxylradikale oder Methylierungen entstanden sind.

Die am besten untersuchte oxidative Veränderung ist 8oxoG, welches eine Fehlpaarung mit Adenin eingehen kann. 8oxoG entsteht meist durch ROS und wird mit Hilfe der 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase (OGG) entfernt. Die OGG gehört zu einer Gruppe von Glycosylasen, die ohne das Vorliegen einer AP-Stelle, den DNA-Strang durch eine Lyasereaktion spalten können. (Larsen 2005, Knippers 2006, 270-272)

1.2.5 Nukleotid-Exzisions-Reparatur NER

Wenn die DNA-Schäden zu größeren Verzerrungen der DNA-Helix führen, wie es zum Beispiel bei CPD oder (6-4)-Photoprodukten der Fall ist, tritt ein weiterer Reparaturmechanismus in Aktion: Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur.

Bei der bakteriellen NER bilden ein UvrA-Protein (Teil der UvrABC Endonuklease) und ein UvrB-Protein in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) einen Dreierkomplex, der spezifisch an DNS-Schäden bindet. Der UvrAB-Komplex erkennt neben Thymindimeren und (6-4)-Photoprodukten auch andere unförmige Basenmodifikationen. Nach der Bindung an die DNA wird das UvrA-Protein durch ein UvrC-Protein ersetzt. Der UvrBC-Komplex schneidet die DNA acht Nukleotide 5'- und fünf Nukleotide 3'-wärts des Schadens. Jetzt tritt die UvrD-Helikase in Aktion und entfernt das geschädigte DNA-Stück. Es folgt eine Reparatursynthese durch die bakterielle DNA-Polymerase I und eine Versiegelung des Phosphodiesterbandes durch die DNA-Ligase.

Eine weitere Komponente der NER stellt das ‚mutation frequency declining Protein‘ (Mfd) dar. Es ist auch unter dem Namen ‚transcription repair coupling factor‘ (TRCF) bekannt und vermittelt bevorzugt die Reparatur von DNA-Schäden im transkribierten Strang aktiver Gene. Die RNA-Polymerase kommt an Stellen geschädigter DNA zum Halten. Das Mfd-Protein verdrängt die RNA-Polymerase und vermittelt die Bindung des UvrA-Proteins, das dann die Reparatur nach dem beschriebenen Schema einleitet.

In Eukaryonten spielen die Xeroderma pigmentosum (XP)-Proteine bei der NER die hervorragende Rolle. Man unterscheidet, wie bereits beschrieben, zwei Arten der NER: die ‚transkriptionsgekoppelte Reparatur‘ (TCR) und die ‚Globale Genom Reparatur‘ (GGR), die sich im ersten Schritt voneinander unterscheiden.

Bei der GGR werden im ersten Schritt DNA-Schäden durch den Komplex XPC–HR23B erkannt. Dieser veranlasst die Anlagerung von XPA (mit dem Einzelstrang-bindenden-Protein RPA) und dem TFIIH-Komplex (basaler Transkriptionsfaktor). Der TFIIH-Komplex entwindet die DNA auf einer Strecke von ca. 25 Basenpaaren. XPA bestätigt das Vorhandensein einer chemisch-veränderten Base. Die beiden Proteine XPF und XPG sind Endonukleasen und schneiden die DNA, und zwar in Abständen von 20 ± 5 Basenpaaren auf der 5`-Seite beziehungsweise 6 ± 3 Basenpaare auf der 3`-Seite des Schadens. Nach der Entfernung des Bereichs zwischen den Schnitten bleibt eine Einzelstrang-Lücke zurück. Es folgt das Schließen der Lücke durch Reparatursynthese. Der Faktor RF-C bringt das Ringklemmen-Protein PCNA in Position, woran sich die DNA-Polymerase δ (oder ϵ) anlagert und die Lücke schließt. Im letzten Schritt wird das Phosphodiesterband durch die DNA-Ligase I wieder verschlossen.

Bei der TCR hingegen kommt die transkribierende RNA-Polymerase an der Stelle des Schadens zum Stoppen. Die beiden Cockayne Syndrom (CS) Proteine CSA und CSB können an diese Polymerase binden. Die so entstandene Einzelstrang-Lücke wird analog zur GGR durch Reparatursynthese geschlossen. Bei der schnellen TCR sind innerhalb von 8h bis zu 50% der vorhandenen CPDs aus den aktiv transkribierten Genen entfernt.

In den letzten Jahren haben Ergebnisse gezeigt, dass Bestandteile der NER auch an der Reparatur oxidativer Schäden (XP-G, CS), an der basalen Transkription, sowie an der transkriptionellen Regulation wichtiger Stoffwechselwege beteiligt sind. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die NER auch bei immunologischen Prozessen von Bedeutung ist. (Knippers 2006, 276-279, Larsen 2005, Berneburg 2003, de Boer 2000, Matsumura 2002)

1.2.6 Transläsionssynthese

Die Replikation von DNA mittels Polymerasen ist durch eine hohe Genauigkeit gekennzeichnet, die unter anderem dadurch erreicht wird, dass einige DNA-Polymerasen eine reparierende Exonukleaseaktivität aufweisen. Diese ist allerdings nicht bei allen Enzymen vorhanden. Die Entdeckung einer neuen Klasse von Polymerasen (Pol η , Pol κ , Pol ζ , Pol ι), denen eine Nukleaseuntereinheit fehlt, die aber die Fähigkeit haben über veränderte DNS-Bereiche hinweg DNS zu synthetisieren, hat dazu geführt, dass die Transläsionsreparatur als alternative Reparaturmethode propagiert wurde. Es wird angenommen, dass durch sie Fehler erkannt werden, die sonst durch BER, NER und MMR korrigiert werden. Möglicherweise ist die Transläsionsreparatur eine schnelle aber auch fehlerhaftere Alternative. Besonders in der S-Phase könnte die TLS dabei helfen, den Zusammenbruch der Replikationsgabel durch CPD- und AP-Stellen zu verhindern, und somit Doppelstrangbrüche zu vermeiden. (Larsen 2005)

1.2.7 Reparatur nukleärer DNA versus mitochondrialer DNA

In der nukleären (n)DNA-Reparatur sind alle sechs oben beschriebenen Haupt-Reparaturwege vertreten. Sie liegen in verschiedenen Variationen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor.

In Mitochondrien dagegen scheint eine mit der nukleären NER vergleichbare Maschinerie nicht zu existieren. So bleiben in Säugerzellen Thymindimere und CPD in den Mitochondrien unrepariert, während sie im Kern der Zelle ein typisches Substrat der nukleären NER sind. Dies bedeutet jedoch nicht, dass Mitochondrien keine Möglichkeit haben diese Schäden zu beheben.

Es konnten zum Beispiel die an der BER beteiligten Enzyme 8-oxoG-Glykosylase, Thyminglycosylase und eine AP-Endonuklease in Mitochondrien nachgewiesen werden. In letzter Zeit gibt es immer mehr Hinweise, dass auch NER Proteine an der Reparatur oxidativer DNS-Schäden in den Mitochondrien beteiligt sind. (Larsen 2005, Berneburg 2006, Kamenisch 2010)

1.3 NER-Defizienzsyndrome

Die Folgen eines Defekts in einem der an der NER beteiligten Proteine wird an den drei photosensiblen Syndromen Xeroderma pigmentosum (XP), Trichothiodystrophie (TTD) und Cockayne Syndrome (CS) deutlich. Alle drei Syndrome werden autosomal rezessiv vererbt. Xeroderma pigmentosum hat 8 Komplementationsgruppen (XP-A bis XP-G plus Variante), Trichothiodystrophie drei (XP-B, XP-D und TTD-A) und das Cockayne Syndrome zwei (CS-A und CS-B). Jede dieser Gruppen zeichnet sich durch einen Defekt in einem bestimmten Gen aus. Zusätzlich gibt es noch drei Kategorien von kombinierten Syndromen: CS mit XP-B, XP-D oder XP-G. Obwohl bei allen Syndromen Defekte in der NER vorliegen, ist nur XP mit einem stark erhöhten Krebsrisiko verbunden.

Manche Patienten haben ab Geburt schwerste Symptome, wie bei dem Zerebro-okulo-fazio-skelettalen-Syndrom (COFS), andere haben eine wesentlich mildere und spätere Manifestation.

Es existieren verschiedene Labor-Testverfahren für die Diagnostik der jeweiligen NER-Defizienzsyndrome. Dazu gehören zum Beispiel die sogenannte Unscheduled DNA-Synthesis (UDS) für XP sowie die Erholung von RNA- und DNA- Synthese nach UV-Bestrahlung für CS. (Kleijer 2008, Berneburg 2007, de Boer 2000)

1.3.1 Xeroderma pigmentosum

XP kommt in der europäischen Bevölkerung mit einer Prävalenz von $1:10^6$ vor und in der japanischen Bevölkerung mit einer Prävalenz von $1:10^5$.

Trockene, pergamentartige Haut mit vielen Flecken, die auf die sonnenexponierten Areale beschränkt sind, kennzeichnet einen Patienten mit XP. Zusätzlich führt Sonnenexposition bei XP-Patienten zu progredienten, degenerativen Veränderungen an Haut und Augen, die sich ab dem ersten Lebensjahr einstellen können.

XP ist mit einem mehr als 1000-fach erhöhten Risiko für Hautkrebs vergesellschaftet. XP-Patienten entwickeln hauptsächlich Basalzellkarzinome und spinözelluläre Karzinome, seltener Melanome. Hauttumore zeigen sich ca. 50 Jahre früher als im Bevölkerungsdurchschnitt. Die Lebenserwartung ist deutlich um Jahrzehnte verringert und viele Patienten sterben an den Neoplasien.

Zusätzlich haben XP-Patienten unter 20 Jahren ein 10 - 20-fach erhöhtes Risiko internistische Tumore zu entwickeln. Auch Tumore des Nervensystems kommen häufiger vor (Astrozytome im Gehirn und Rückenmark sowie Schwannome des Nervus facialis). Es wird angenommen, dass hierfür DNS-Schäden verantwortlich sind, die chemisch oder durch den zelleigenen Metabolismus verursacht werden.

Ein Teil der XP-Patienten (18%) zeigt progressive neurologische Defizite wie die neurologische Degeneration mit Verlust von Neuronen, Mikrozephalie oder mentale Retardierung. Circa 20% der XP Patienten weisen eine progressive Neurodegeneration auf. Das früheste Zeichen einer neurologischen Beteiligung ist oft der Verlust von Sehnenreflexen und Hörverlust im Hochfrequenzbereich. (Berneburg 2007, de Boer 2000)

1.3.2 Trichothiodystrophie

Schwefeldefizientes, brüchiges Haar, erhöhte Photosensibilität, Ichthyose sowie psychische und physische Retardierung kennzeichnen einen TTD-Patienten. Das im polarisierten Licht erkennbare quergestreifte Muster der Haare (Tigerschwanzmuster) kann als Diagnosekriterium dienen. Stressfaktoren wie Fieber oder Infektionen können zu Haarausfall führen. In der Regel wachsen die Haare wieder nach. Allgemein haben die Haare zu wenig schwefelhaltige Matrixproteine und ein Defizit im Cysteingehalt der Haarschaftmatrix.

Neben mentaler Retardierung können auch andere neurologische Auffälligkeiten wie Spastik, Hyperreflexie, Tremor, Ataxie und Mikrozephalie vorhanden sein. Mikrozephalie wurde oft vergesellschaftet mit einer Hypomyelinisierung in der weißen Substanz gefunden.

Reduzierte Fruchtbarkeit kann ein weiteres Symptom sein und entsteht bei TTD meist durch Hypogonadismus oder Kryptorchismus.

Die Wachstumsretardierung (kachektischer Zwergenwuchs) kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und reicht von leichter Wachstumsverzögerung bis zu lebensbedrohlicher Kachexie, die den Tod in früher Kindheit zur Folge haben kann.

Skelettanomalien wie Kyphose, ein Vogelkopf ähnliches Gesicht, Osteosklerose und Osteoporose werden bei TTD-Patienten häufig beobachtet.

Obwohl die Hautveränderungen bei TTD einzigartig sind, überlappen die klinischen Symptome (Wachstumsverzögerung, verminderte Fertilität, Skelettanomalien, und Veränderungen in der Neuomyelinisierung) stark mit denen von CS-Patienten. TTD-Patienten haben allerdings kein erhöhtes Hautkrebsrisiko. Ein Grund für das unterschiedliche Hautkrebsrisiko könnte sein, dass Zellen von XP-Patienten Veränderungen in der Immunüberwachung aufweisen, während Zellen von TTD-Patienten diesen Defekt nicht haben. Patienten mit TTD haben außerdem einen niedrigeren Hämoglobinspiegel, sowie einen verminderten Zellhämoglobingehalt und ein vermindertes Erythrozytenvolumen (MCH und MCV). (Berneburg 2007, de Boer 2000)

1.3.3 Cockayne Syndrom

Das Cockayne Syndrom ist durch eine erhöhte Photosensibilität der Haut gekennzeichnet, die allerdings nicht wie bei XP mit einem erhöhten Hautkrebsrisiko einhergeht. Ansonsten kann das Erscheinungsbild von CS-Patienten sehr unterschiedlich durch mentale und körperliche Retardierung geprägt sein. Im Allgemeinen haben CS-Patienten Skelettanomalien, ein vogelkopffartiges Gesicht, Zahnkaries, eine Kyphose der Wirbelsäule, und ältere CS-Patienten eine Osteoporose.

Oft wird ein früher Beginn einer progressiven neurologischen Degeneration festgestellt. Dieser kann sich durch verspätete psychomotorische Entwicklung, Fehler im Gangbild und mentaler Retardierung manifestieren. Mikrozephalie findet man meist bei Kindern über zwei Jahren, wobei Nervenbiopsien Anomalien in der Myelinisierung zeigen. Im Gegensatz zur Demyelinisierung bei CS findet man bei XP-Patienten Neurodegenerationen. Auch eine Kalzifikation der Basalganglien und anderer Bereiche des Gehirns sind bei CS-Patienten beschrieben. Insbesondere CS gilt als Erkrankung mit vorzeitiger Alterung (Progeriesyndrom). Zu deren Symptomen gehören Hörverlust, Retinopathie, Katarakt, eine runzlige Gesichtshaut, dünnes Haar und vor allem der Verlust des subkutanen Fettgewebes.

CS-Patienten zeigen eine Minderung der Fertilität und des Wachstums. Da die Gewichtszunahme stärker betroffen ist als das Längenwachstum, ist der Begriff „kachektischer Zwergenwuchs“ entstanden.

Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei ca. 12,5 Jahren mit einem sehr weiten Spektrum vom Neugeborenenalter bis zu einem Lebensalter von 55 Jahren. Der Tod wird meist durch Pneumonien und den sehr schlechten Allgemeinzustand der Patienten verursacht.

Die Therapie von CS gestaltet sich außerordentlich schwierig. UV-Karenz sowie die Nutzung von Sonnenschutzcremes mit hohem Lichtschutzfaktor im UVA- und UVB-Bereich sind indiziert. Die therapeutische Effektivität von xenogenen Reparaturenzymen in Cremeform ist bei CS im Gegensatz zu XP nicht nachgewiesen.

Die Zellen von CS-Patienten zeigen einen Defekt in der TCR. Neuere Studien legen nahe, dass die Inzidenz für CS höher liegt, als bisher vermutet. So nimmt man an, dass auf eine Million Lebendgeburten in Westeuropa 2,7 CS-, 2,3 XP- und 1,2 TTD-Patienten geboren werden.

(Kleijer 2008, Berneburg 2007, Berneburg 2003, de Boer 2000).

1.4 Mitochondriale Mutationen bei Zellalterung und Photoalterung

Mitochondriale Mutationen spielen sowohl in der normalen als auch in der Licht induzierten Zellalterung eine Rolle. Durch UV-Strahlung induzierter oxidativer Stress wird für eine Zunahme mitochondrialer Mutationen verantwortlich gemacht. Es wurde gezeigt, dass die Zunahme einer Markermutation, die sogenannte ‚Common Deletion‘, durch repetitive UVA-Bestrahlung getriggert werden kann. (Berneburg 1997, 1999, 2004, 2005, Eicker 2003)

1.5 Fragestellung der Arbeit

Bei Wildtypfibroblasten hat repetitive UVA-Bestrahlung mit 2, 4, 6 und 8 Joule/cm² (J/cm²) keine Abnahme der Viabilität zur Folge. (Berneburg 1999)
Da CSA- und CSB-Zellen bekanntermaßen UV-sensibel sind, musste abgeklärt werden, ob repetitive UVA-Bestrahlung von CS-Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen zu vermehrtem Zelltod führt. Hier hat uns insbesondere interessiert, ob der Anteil der viablen Zellen unter 50% absinkt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Zählkammer	Neubauer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Assistent
Sicherheitswerkbank	Hera safe laminar flow workbench	Kendro laboratory products GmbH
Mikroskop	Leitz DM IL	Leica Mikroskope und Systeme GmbH
MTT Messgerät	Original MULTISCAN EX Software: ascent software for multiscan	Thermo Electron Corporation
Pipettierhilfe	Pipettboy acu	IBS Integra Bioscienceas
Pipetten	Eppendorf research Größen: 1000 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf
UVA Lampe	System Dr. Sellmeier Filter: 1. Blaufilter 2. UVA1- Kantenfilter 3. Infrarot- Filter	Sellasol
Brutschrank	Hera cell 2400 Heraeus 37°C, 5% CO ₂	Kendro laboratory products GmbH

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsartikel	Spezifikation	Hersteller
Kulturflaschen	CELLSTAR Zellkulturflaschen 75 cm ² , 250 ml, PS, steril	Greiner bio- one
Röhrchen	Safe lock tubes, 1,5 ml	Eppendorf
Pipetten	Stripette, disposable serological pipettesterile Größen: 2 ml, 5 ml, 20 ml	Corning Incorporated Costar
Zellkulturplatten	Multiwell TM , 6-Well Zellkulturplatte, steril	Falcon
Zellkulturplatten	Microtest TM , Zellkulturplatte, 96-Well	Falcon
Petrischalen	Zellkulturschalen, PS, 94x16 mm ² , steril	Greiner bio- one
Teströhrchen	Cellstar, PP- Teströhrchen, steril Größen: 15 ml, 50 ml	Greiner bio- one
Handschuhe	Untersuchungshandschuhe	Derma Clean
Pipettenspitzen	Safe Seal Pipettenspitzen Premium	Biozym
Glaspipetten	Pasteur Glaspipetten, klein, 150 mm	WU Mainz

2.1.3 Chemikalien

Verbrauchsartikel	Spezifikation	Hersteller
Antibiotikum/ Antimykotikum	Antibiotikum/ Antimykotikum P11-002	PAA The cell culture company
Serum	fetales Kälberserum, Forschungsgrad, dreifach 0,1 µm steril	PERBIO
Trypsin	0,5% Trypsin EDTA	Gibco
Farbstoff	Trypanblau, 0,5% in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom AG
Puffer	Dulbeco's PBS, mit Ca & Mg	PAA The cell culture company
DMSO	Dimethyl- Sulphoxid, HYBRI- MAX	Sigma
Sprühdesinfektion	Descosept	Dr. Schumacher GmbH
MTT Farbstoff	MTT 100 mg Sigma Thiazolylblau- Tetrazoliumbromid	Sigma
Medium	MEM (Minimum Essential Medium) mit Earl's Salts, mit L- Glutamin	PAA The cell culture company

2.1.4 Zellen

Bezeichnung	Zelltyp	Komplementation
CS4BR	Fibroblasten	CS-B
GM739	Fibroblasten	CS-B
GM1856	Fibroblasten	CS-A
F92	Fibroblasten	Wildtyp

2.1.5 Kulturmedium

Als Medium für die Zellkulturen wurde MEM (Minimum Essential Medium mit Earl's Salzen, mit L-Glutamin) mit 1% Antibiotikum/Antimykotikum und 10% fetalem Kälberserum (FBS) verwendet.

2.1.6 MTT-Vorratsreagenz

100 mg Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT) wurden in 20 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gelöst. Die Vorratslösung wurde in ein 50 ml Teströhrchen gegeben, zum Lichtschutz mit Aluminiumfolie umwickelt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2 Methoden

2.2.1 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und waren in einem Einfriermedium (60% MEM mit 40% FBS) mit einem Anteil von 10% Dimethyl-Sulphoxid (DMSO) eingebettet. Zum Auftauen wurden sie in einem Wasserbad mit 37°C erwärmt und die Zellsuspension wurde anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren bei 1500 U/min über 5 Minuten wurde der Überstand abgekippt.

In die Kulturflaschen wurden 10 ml Medium vorgelegt. Das Pellet wurde wieder in Medium aufgenommen und die Zellsuspension auf die gewünschte Anzahl an Kulturflaschen verteilt. Anschließend wurden die Flaschen mit Deckeln verschlossen in den Inkubator gelegt.

Für die Zellkulturarbeit wurde eine Sicherheitswerkbank in einem S2 Labor verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator.

2.2.2 Mediumwechsel

Zum Wechsel des Mediums wurden die Kulturflaschen aus dem Inkubator genommen und das Medium unter der Sicherheitswerkbank abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml PBS gespült. Nach Absaugen des PBS wurden 15 ml Medium in die Kulturflaschen gegeben und die Flaschen in den Inkubator zurückgelegt.

2.2.3 Splitten der Zellen

War die Zellpopulation einer Kulturflasche so weit gewachsen, dass die Zellen in einer Schicht nicht mehr genügend Platz hatten, wurde sie gesplittet. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt, mit 2 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin von dem Flaschenboden gelöst. Die Kontrolle des Ablösevorganges erfolgte unter einem Mikroskop. Hatte sich der Großteil der Zellen gelöst, wurde der Rest mit 10 ml Kulturmedium vom Flaschenboden abgewaschen. Die hierbei gewonnene Zellsuspension wurde auf die gewünschte Anzahl an Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Mediumvorlage verteilt.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung aus den Kulturflaschen wurde wie beim Splitten der Zellen vorgegangen.

Von der so gewonnenen Zellsuspension wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt Zellen, deren Membran nicht mehr intakt, beziehungsweise beschädigt ist. Also bleiben lebende Zellen ungefärbt.

Mit der gefärbten Zellsuspension wurde die Neubauer Zählkammer bestückt und die Zahl der lebenden, nicht gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Nach den Bestrahlungsversuchen wurde bei der Bestimmung der Zellzahl von den 6-Well Zellkulturplatten nach dem gleichen Schema vorgegangen.

Mit der gezählten Zellzahl und dem bekannten Volumen der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors durch das Trypanblau bestimmt.

Über das Ausgangsvolumen der Zellsuspension und über die Zellzahl pro Milliliter wurde die Gesamtzellzahl errechnet.

2.2.5 Aussäen der Zellen

Für die Bestrahlungsversuche wurden die Zellen konfluent (ca. 75000/Well) auf 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. In der hierzu verwendeten Zellsuspension wurde zuerst die Zellzahl/ml bestimmt. Die Platten für die Bestrahlung und die Platten für die Kontrolle wurden mit den gleichen Volumina an Zellsuspension bestückt, um eine Vergleichbarkeit (gleiche Zellzahl) zwischen der bestrahlten Platte und der Kontrollplatte zu gewährleisten.

2.2.6 Aufbau der Versuchsreihen

In jeder Versuchsreihe wurden die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM 1856 untersucht (Tabelle 2.1.4). Dafür wurden für jede Zelllinie jeweils drei Wells für die Bestrahlung und auf separaten Platten drei Wells für die Kontrolle angelegt (6-Well Kulturplatten).

Nach der ersten Woche wurde jeweils das erste Well der bestrahlten und der unbestrahlten Kontroll-Wells für den MTT-Assay verwendet, nach der zweiten Woche das zweite und nach der dritten Woche das dritte.

Bei der Durchführung einer Zellzahlbestimmung parallel zum MTT-Assay, wurde ein doppelter Ansatz verwendet, um neben dem MTT-Assay mit der zweiten Hälfte die Anzahl der lebenden Zellen mittels Trypanblaumethode zu bestimmen.

2.2.7 Bestrahlung der Zellen

Die bestrahlten Zellkulturen wurden über drei Wochen, jeweils an fünf aufeinander folgenden Tagen, drei Mal täglich im Abstand von vier Stunden mit 6 beziehungsweise 4 Joule UVA1-Licht bestrahlt. Hierzu wurden zuerst unter der Sicherheitswerkbank das Medium durch PBS ersetzt. Dann wurden die Kulturplatten auf einer Drehscheibe unter einer UVA1-Lampe (System Dr. Sellmeier, Sellasol, Hauptspektrum: 340 - 440 nm) für 5 min 37 s (6 Joule) oder 3 min 45 s (4 Joule) bestrahlt. Zur Bestrahlung wurde der Deckel der Kulturplatten entfernt. Nach der Bestrahlung wurde das PBS abgesaugt und das aufbewahrte Medium wieder auf die Kulturplatten gegeben.

2.2.8 MTT-Assay

Die Beurteilung der Zellvitalität mittels MTT-Assay beruht auf der Reduktion des wasserlöslichen, blassgelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu dem wasserunlöslichen, blauvioletten Formazan. Das Verfahren wurde 1983 von Mosmann erstmals beschrieben. MTT wird, wie heute bekannt, durch verschiedene zelluläre Reduktionsäquivalente umgesetzt:

Anfangs wurde angenommen, dass MTT hauptsächlich durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen reduziert wird. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die Reduktion größtenteils von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Hydrat (NADH) und NADPH abhängig ist. Die Menge an umgesetztem MTT ist daher weniger ein Maß für die Zellatmung, sondern entspricht vielmehr der Glykolyserate der untersuchten Zellen. Die Reduktion von MTT durch NADH und NADPH ist abhängig von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums. Die partielle Reduktion von MTT durch Succinat in den Mitochondrien ist dagegen abhängig von dem Enzym Succinatdehydrogenase im mitochondrialen Komplex II.

Die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für das entstehende Formazan wurde 1987 von Carmichael vorgeschlagen. (Mosmann 1983, Berridge 1996, Berridge 1993, Carmichael 1987)

Durchführung:

Jeweils am Ende jeder der drei Wochen wurde die Viabilität der bestrahlten und der unbestrahlten Zellkulturen mittels MTT-Assay gemessen.

Das MTT-Vorratsreagenz wurde zuerst 1:10 in Medium verdünnt.

Das Medium wurde von der 6-Well Kulturplatte abgesaugt und 2 ml verdünntes MTT-Reagenz in jedes Well pipettiert. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und 1 ml DMSO auf die inzwischen blau gefärbten Zellen gegeben. Nach erneuter 5-minütiger Inkubation wurden aus jedem Well 40 µl der gefärbten Lösung in ein Well einer 96-Well Kulturplatte pipettiert. Dann wurde das Volumen auf 100 µl pro Well mit DMSO ergänzt.

Es wurden auch andere Verdünnungsverhältnisse gewählt, um besser im linearen Bereich der Absorptionskurve zu bleiben (Versuche A und B: 20 µl gefärbte DMSO Lösung und 80 µl DMSO, sowie 40 µl gefärbte DMSO Lösung und 60 µl DMSO).

Die Absorption wurde im MULTISCAN EX Reader bei 540 nm und 595 nm gemessen. Von diesen MTT-Werten wurde anschließend der Leerwert der 96-Well Kulturplatte als Referenzwert abgezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchsreihen

Die Ergebnisse setzen sich aus drei Versuchsreihen zusammen.

Um die MTT Ergebnisse der Vorversuchsreihe (V0) bei 4 und 6 Joule/cm² (J/cm²) zu bestätigen, wurden zwei weitere Versuchsreihen angeschlossen, bei denen zusätzlich zur Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Assay eine parallele Bestimmung der Zellzahl erfolgte.

Die Versuchsreihe VA wurde bei 6 J/cm² und die Versuchsreihe VB bei 4 J/cm² durchgeführt.

In der Vorversuchsreihe (V0) wurden die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 über drei Wochen mit verschiedenen UVA-Dosen bestrahlt.

In die Ergebnisse gehen die Werte von 4 J/cm² und 6 J/cm² ein.

Die Viabilität der Zellen wurde am Ende jeder Woche mittels MTT-Assay bei 595 nm Wellenlänge gemessen.

In der Versuchsreihe A (VA) wurden die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 über drei Wochen mit 6 J/cm² UVA bestrahlt. Um die Viabilität der Zellen zu beurteilen, wurde neben der Messung des MTT-Umsatzes auch die Zahl der lebendigen Zellen mit der Trypanblaumethode bestimmt.

Die MTT-Messung im Reader erfolgte bei zwei verschiedenen Wellenlängen (540 nm und 595 nm), sowie bei zwei verschiedenen Verdünnungen (20 µl der durch Formazan gefärbten DMSO Lösung und 80 µl DMSO, beziehungsweise 40 µl der durch Formazan gefärbten DMSO Lösung und 60 µl DMSO).

In die Berechnung der Viabilitätskurven gingen von dieser Versuchsreihe somit vier gemessene Werte pro untersuchtem Well ein. Die Werte des MTT für die Zelllinie F92 nach Woche zwei und Woche drei wurden nicht verwendet. Die Werte von F92 für Woche zwei waren nicht eindeutig zuzuordnen. In Woche drei war der MTT-Wert der bestrahlten Zellen so niedrig, dass davon ausgegangen werden muss, dass die Zellpopulation größtenteils tot war. (Tabelle 4)

In der Versuchsreihe B (VB) wurden die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 über drei Wochen mit 4 J/cm^2 UVA bestrahlt. Um die Viabilität der Zellen zu beurteilen, wurde wie in Versuchsreihe A neben der Messung des MTT-Umsatzes auch die Zahl der lebendigen Zellen mit der Trypanblaumethode bestimmt.

Die MTT-Messung im Reader erfolgte bei zwei verschiedenen Wellenlängen (540 nm und 595 nm), sowie bei zwei verschiedenen Verdünnungen (20 μl der durch Formazan gefärbten DMSO Lösung und 80 μl DMSO, sowie 40 μl der durch Formazan gefärbten DMSO Lösung und 60 μl DMSO).

In die Berechnung der Viabilitätskurven gingen von dieser Versuchsreihe somit vier gemessene Werte pro untersuchtem Well ein. (Tabelle 1)

Allgemein wurden vom Reader gemessene Werte >2 bei der Berechnung der Viabilitätskurven nicht verwendet, um nicht zu weit außerhalb des linearen Bereiches des Readers zu liegen.

Um die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten abzuschätzen, wurde der MTT-Wert der bestrahlten Zellen „UV“ durch den MTT-Wert der Kontrollzellen „K“ geteilt: MTT UV/K .

Aus den gemessenen Verhältnissen MTT UV/K (ein Wert aus VO und vier Werte aus VA bei 6 Joule bzw. ein Wert aus VO und vier Werte aus VB bei 4 Joule) wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. (Tabellen 2 und 3 für 4 Joule, Tabellen 5 und 6 für 6 Joule)

Zur besseren Darstellung wurde der Mittelwert MTT UV/K anschließend mit 100 multipliziert, um den MTT-Wert der bestrahlten Zellen als Prozentzahl des MTT-Wertes der unbestrahlten Kontrollzellen darzustellen. (Diagramm 5.1 - 5.4)

Um die Zellzahlbestimmung bei den Versuchen VA und VB auszuwerten, wurde ebenfalls das Verhältnis „Zellzahl bestrahlte Zellen/ Zellzahl unbestrahlte Zellen“ gebildet (Zellzahl UV/K). Auch hier wurde anschließend mit 100 multipliziert, um die Ergebnisse Zellzahl UV/K als Prozentzahl anzugeben. (Diagramme 6.1 - 6.4)

3.2 Ergebnisse der Zelllinien

3.2.1 CS4BR

Die vorgestellten Versuche legen nahe, dass die Zelllinie CS4BR die Langzeitbestrahlung mit 4 J/cm^2 und 6 J/cm^2 überlebt.

Im MTT-Assay zeigten die bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten bei 4 J/cm^2 eine Viabilität von $67,3\%$ ($\pm 5,8\%$) nach einer Woche, $86,5\%$ ($\pm 0,6\%$) nach zwei Wochen und $86,7\%$ ($\pm 1,9\%$) nach drei Wochen.

Bei Bestrahlung mit 6 J/cm^2 war die Viabilität nach der ersten Woche im MTT $72,7\%$ ($\pm 1,2\%$), nach der zweiten Woche $64,1\%$ ($\pm 3,3\%$) und nach der dritten Woche $66,5\%$ ($\pm 4,1\%$).

Alle Werte für die Wochen eins bis drei bei Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm^2 lagen über 50% . (Tabelle 7, Diagramm 5.2)

Die Auswertung der Zellzählung nach Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm^2 konnte das Ergebnis des MTT für diese Zelllinie in etwa bestätigen:

Nach einer Woche Bestrahlung mit 4 J/cm^2 ergab das Verhältnis „bestrahlte zu unbestrahlte Zellen“ $61,1\%$, nach zwei Wochen $57,1\%$ und nach drei Wochen $70,4\%$.

Bei der Bestrahlung mit 6 J/cm^2 ergaben sich $47,1\%$ nach der ersten Woche, $50,0\%$ nach der zweiten Woche und $47,1\%$ nach der dritten Woche. (Tabelle 9, Diagramm 6.2)

3.2.2 GM739

Für die Zelllinie GM739 legen die Versuche ebenfalls nahe, dass sie die Langzeitbestrahlung mit 4 J/cm^2 und 6 J/cm^2 überlebt.

Im MTT-Assay zeigten die bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten bei 4 J/cm^2 eine Viabilität von $55,3\%$ ($\pm 5,1\%$) nach einer Woche, $83,9\%$ ($\pm 2,5\%$) nach zwei Wochen und $59,2\%$ ($\pm 3,5\%$) nach drei Wochen.

Bei Bestrahlung mit 6 J/cm^2 war die Viabilität nach der ersten Woche im MTT $61,3\%$ ($\pm 5,6\%$), nach der zweiten Woche $58,4\%$ ($\pm 3,7\%$) und nach der dritten Woche $58,1\%$ ($\pm 3,5\%$).

Alle Werte für die Wochen eins bis drei bei Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² lagen über 50%. (Tabelle 7, Diagramm 5.3)

Die Auswertung der Zellzählung nach Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² konnte das Ergebnis des MTT für diese Zelllinie in etwa bestätigen. Nach einer Woche Bestrahlung mit 4 J/cm² ergab das Verhältnis „bestrahlte zu unbestrahlte Zellen“ 66,7%, nach zwei Wochen 54,5% und nach drei Wochen 54,5%.

Bei der Bestrahlung mit 6 J/cm² ergaben sich 62,5% nach der ersten Woche, 57,1% nach der zweiten Woche und 54,5% nach der dritten Woche. (Tabelle 9, Diagramm 6.3)

3.2.3 GM1856

Für die Zelllinie GM739 zeigten die Versuche, dass sie die Langzeitbestrahlung mit 4 J/cm² und 6 J/cm² überlebt.

Im MTT-Assay zeigten die bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten bei 4 J/cm² eine Viabilität von 59,0% (±4,7%) nach einer Woche, 69,4% (±1,8%) nach zwei Wochen und 55,3% (±3,2%) nach drei Wochen.

Bei Bestrahlung mit 6 J/cm² war die Viabilität nach der ersten Woche im MTT 79,3% (±2,1%), nach der zweiten Woche 66,7% (±6,5%) und nach der dritten Woche 53,3% (±3,9%).

Alle Werte für die Wochen eins bis drei bei Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² lagen über 50%. (Tabelle 7, Diagramm 5.4)

Die Auswertung der Zellzählung nach Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² konnte das Ergebnis des MTT für diese Zelllinie bestätigen. Nach einer Woche Bestrahlung mit 4 J/cm² ergab das Verhältnis „bestrahlte zu unbestrahlte Zellen“ 66,7%, nach zwei Wochen 70,6% und nach drei Wochen 68,0%.

Bei der Bestrahlung mit 6 J/cm² ergaben sich 72,7% für die erste Woche, 63,6% für die zweite Woche und 75,0% für die dritte Woche.

(Tabelle 9, Diagramm 6.4)

3.2.4 F92

Bei der Bestrahlung der Wildtypfibroblasten legen die Ergebnisse nahe, dass sie die Langzeitbestrahlung mit 4 und 6 J/cm² überleben.

Im MTT-Assay zeigte die bestrahlte Zelllinie im Vergleich zur unbestrahlten bei 4 J/cm² eine Viabilität von 69,0% ($\pm 6,2\%$) nach einer Woche, 80,0% ($\pm 6,7\%$) nach zwei Wochen und 78,5% ($\pm 3,0\%$) nach drei Wochen.

Bei Bestrahlung mit 6 J/cm² war die Viabilität nach der ersten Woche im MTT 66,8% ($\pm 7,7\%$), nach der zweiten Woche 95,9% (Einzelwert) und nach der dritten Woche 62,8% (Einzelwert).

Alle Ergebnisse für die Wochen eins bis drei bei Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² lagen über 50%. (Tabelle 7, Diagramm 5.1)

Die Auswertung der Zellzählung nach Bestrahlung mit 4 J/cm² konnte das Ergebnis des MTT in etwa bestätigen. Nach einer Woche Bestrahlung ergab das Verhältnis „bestrahlte zu unbestrahlte Zellen“ 52,9%, nach zwei Wochen 48,0% und nach drei Wochen 54,8%. Die Zellzählung nach Bestrahlung mit 6 J/cm² lieferte in der zweiten und dritten Woche ein vom MTT abweichendes Ergebnis: 51,9% nach einer Woche, 35,3% nach 2 Wochen und 8,7% nach 3 Wochen. Der Wert 8,7% in der 3. Woche bei 6 J/cm² wird als Ausreisser gewertet, insbesondere da der genauere und weniger störanfällige MTT-Wert über 50% bei 62,8% liegt. (Tabelle 9, Diagramm 6.1)

Die Ergebnisse legen nahe, dass sowohl die beiden CSB-Zelllinien (CS4BR und GM739), als auch die CSA-Zelllinie GM1856 die Langzeitbestrahlung über drei Wochen mit 4 und 6 J/cm² UVA1 gut überleben, und ihre Viabilität nicht unter 50% abfällt.

Die CS-Zelllinien zeigten in unseren Bestrahlungsversuchen ein ähnliches Verhalten wie die Zelllinie der Wildtypfibroblasten (F92).

3.3 Tabellen und Diagramme der MTT-Assays

3.3.1 Tabellen und Diagramme zur Bestrahlung mit 4 J/cm²:

Tabelle 1.1

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 4 J/cm² über eine Woche.
Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VB: Versuch B, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 4 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
1.Woche	VB				V0
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92 K	0,426	0,267	0,631	0,366	0,335
F92 UV	0,32	0,178	0,466	0,246	0,261
CS4BR K	0,218	0,154	0,31	0,215	0,212
CS4BR UV	0,173	0,115	0,226	0,142	0,153
GM739 K	0,25	0,151	0,384	0,202	0,946
GM739 UV	0,162	0,106	0,214	0,132	0,48
GM 1856 K	0,317	0,226	0,477	0,321	
GM 1856 UV	0,218	0,148	0,298	0,188	

Tabelle 1.2

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 4 J/cm² über zwei Wochen.
 Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VB: Versuch B, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 4 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
2. Woche	VB				V0
	40 µl	20 µl	40 µl	20 µl	
	595 nm	595 nm	540 nm	540 nm	595 nm
F92 K	0,443	0,265	0,658	0,371	1,924
F92 UV	0,353	0,217	0,503	0,292	1,766
CS4BR K	0,321	0,199	0,453	0,266	
CS4BR UV	0,283	0,176	0,4	0,235	
GM739 K	0,3	0,182	0,427	0,248	
GM739 UV	0,265	0,156	0,37	0,209	
GM 1856 K	0,404	0,24	0,607	0,328	
GM 1856 UV	0,294	0,179	0,417	0,243	

Tabelle 1.3

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 4 J/cm² über drei Wochen.
 Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VB: Versuch B, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 4 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
3. Woche	VB				V0
	40 µl	20 µl	40 µl	20 µl	
	595 nm	595 nm	540 nm	540 nm	595 nm
F92 K	0,781	0,406	1,12	0,598	1,345
F92 UV	0,647	0,331	0,899	0,47	1,005
CS4BR K	0,453	0,264	0,672	0,364	
CS4BR UV	0,398	0,232	0,576	0,329	
GM739 K	0,401	0,216	0,595	0,304	
GM739 UV	0,248	0,151	0,346	0,197	
GM 1856 K	0,659	0,355	1,01	0,56	
GM 1856 UV	0,383	0,227	0,551	0,315	

Tabelle 2.1

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 1.1) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

4 Joule	MTT UV/K				
1. Woche	VB				V0
	40 µl, 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl, 540 nm	20 µl, 540 nm	595 nm
F92	0,72750643	0,61304348	0,72222222	0,63525836	0,75167785
CS4BR	0,75138122	0,66666667	0,69230769	0,58988764	0,66285714
GM739	0,58685446	0,60526316	0,51008646	0,57575758	0,48734873
GM1856	0,64642857	0,58730159	0,59318182	0,53169014	

Tabelle 2.2

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 1.2) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

4 Joule	MTT UV/K				
2. Woche	VB				V0
	40 µl, 595 nm	20 µl, 595 nm	40 µl, 540 nm	20 µl, 540 nm	595 nm
F92	0,77832512	0,78947368	0,75040258	0,76347305	0,91626921
CS4BR	0,86619718	0,85802469	0,87259615	0,86462882	
GM739	0,86692015	0,82068966	0,85384615	0,81516588	
GM1856	0,70027248	0,69950739	0,66666667	0,70790378	

Tabelle 2.3

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 1.3) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

4 Joule	MTT UV/K				
3. Woche	VB				V0
	40 µl, 595 nm	20 µl, 595 nm	40 µl, 540 nm	20 µl, 540 nm	595 nm
F92	0,81989247	0,79674797	0,79593721	0,77183601	0,74006116
CS4BR	0,86778846	0,85903084	0,8488189	0,89296636	
GM739	0,57967033	0,63687151	0,55376344	0,59925094	
GM1856	0,5562701	0,59748428	0,5282631	0,53154876	

Tabelle 3

Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (STABW), errechnet aus den in Tabelle 2 aufgelisteten Einzelwerten.

Für die MW gilt: Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

4 Joule		
F92	MW	STABW
1.Woche	0,6899	0,0616
2.Woche	0,7996	0,0669
3.Woche	0,7849	0,0303
CS4BR	MW	STABW
1.Woche	0,6726	0,0582
2.Woche	0,8654	0,0060
3.Woche	0,8672	0,0189
GM739	MW	STABW
1.Woche	0,5531	0,0513
2.Woche	0,8392	0,0252
3.Woche	0,5924	0,0350
GM1856	MW	STABW
1.Woche	0,5897	0,0469
2.Woche	0,6936	0,0183
3.Woche	0,5534	0,0319

Diagramm 1.1

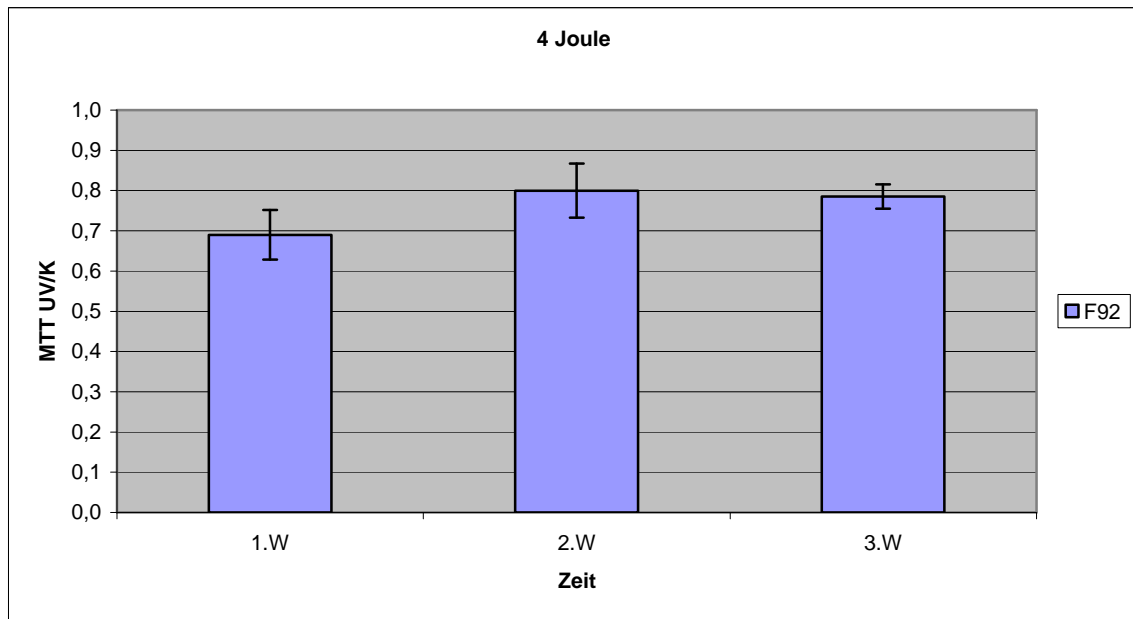


Diagramm der in Tabelle 3 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien F92 bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 .

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 1.2

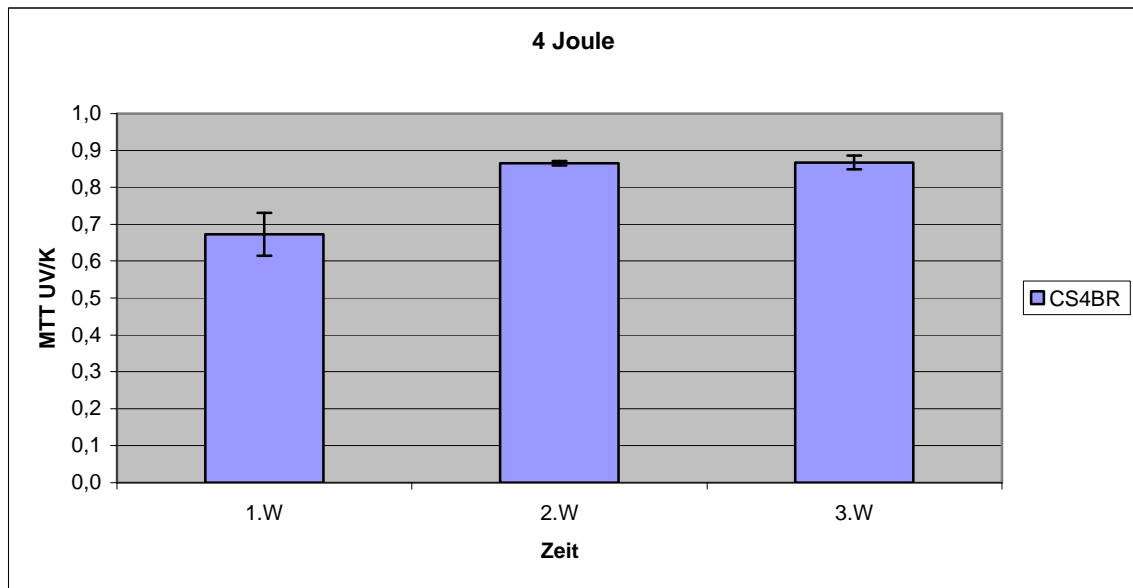


Diagramm der in Tabelle 3 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien CS4BR bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 .

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 1.3

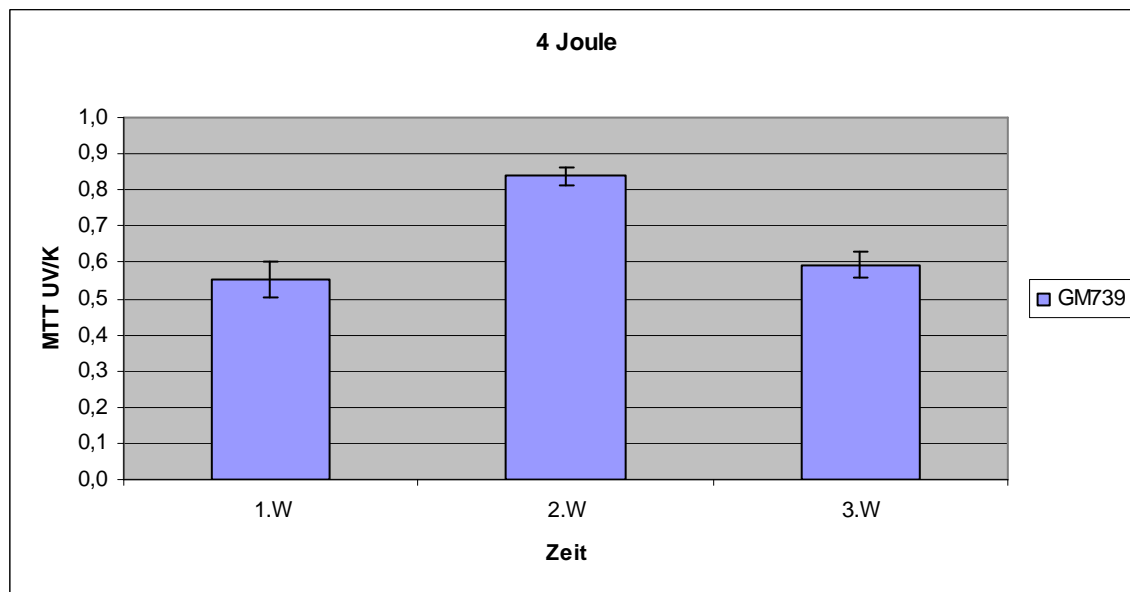


Diagramm der in Tabelle 3 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien GM739 bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 .

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben

Diagramm 1.4

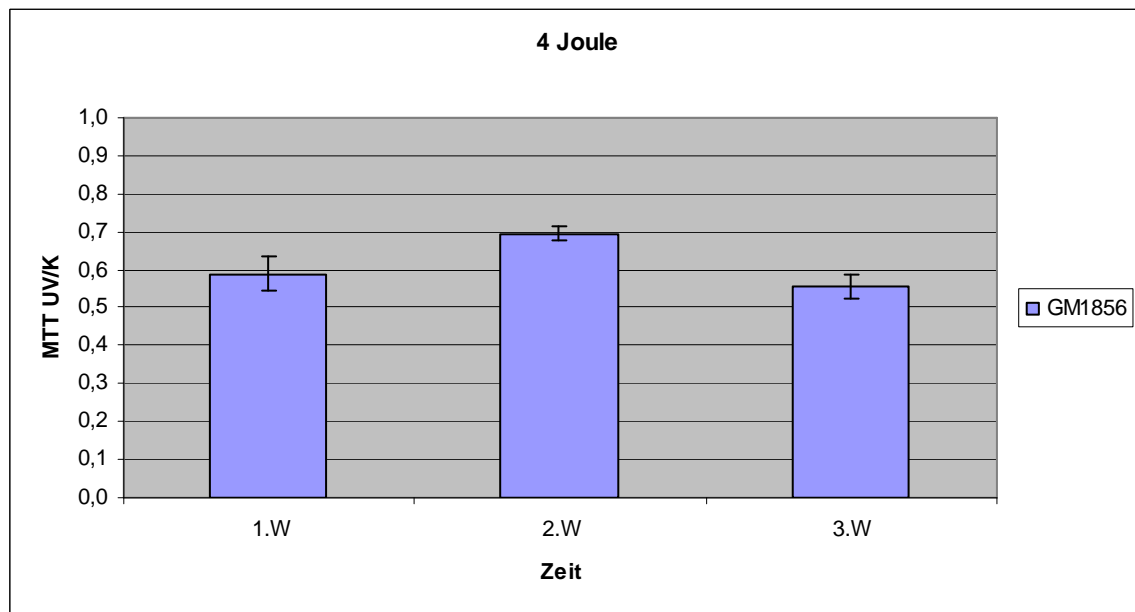


Diagramm der in Tabelle 3 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien GM1856 bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 .

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 2

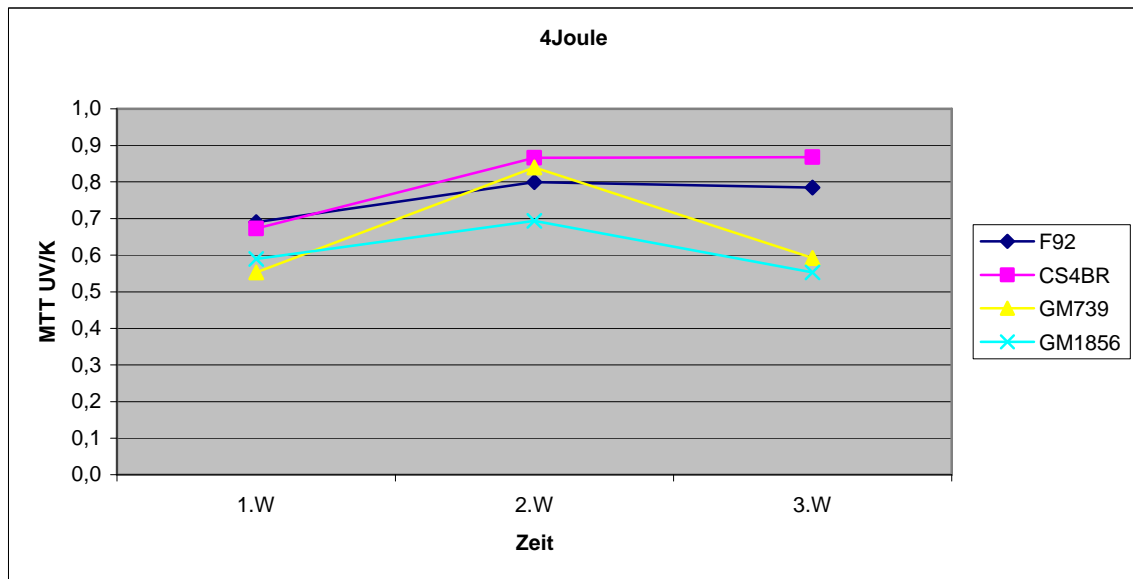


Diagramm der in Tabelle 3 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 bei Bestrahlung mit 4 J/cm^2 im Vergleich.

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

3.3.2 Tabellen und Diagramme zur Bestrahlung mit 6 J/cm²:

Tabelle 4.1

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 6 J/cm² über eine Woche.

Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VA: Versuch A, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 6 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
1.Woche	VA				VO
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92 K	0,664	0,364	0,99	0,546	0,335
F92 UV	0,453	0,252	0,626	0,344	0,275
CS4BR K	0,241	0,161	0,334	0,211	0,212
CS4BR UV	0,187	0,126	0,258	0,163	0,162
GM739 K	0,231	0,149	0,328	0,204	0,946
GM739 UV	0,156	0,115	0,204	0,142	0,538
GM 1856 K	0,299	0,186	0,41	0,251	
GM 1856 UV	0,247	0,156	0,339	0,2	

Tabelle 4.2

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 6 J/cm² über zwei Wochen.
 Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VA: Versuch A, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 6 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
2.Woche	VA				VO
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92 K					1,924
F92 UV					1,847
CS4BR K	0,4	0,248	0,603	0,321	
CS4BR UV	0,266	0,177	0,376	0,228	
GM739 K	0,361	0,22	0,525	0,277	
GM739 UV	0,22	0,15	0,301	0,184	
GM 1856 K	0,396	0,227	0,608	0,32	
GM 1856 UV	0,266	0,18	0,38	0,229	

Tabelle 4.3

Messwerte des MTT-Assay nach Bestrahlung mit 6 J/cm² über drei Wochen.
 Zeilen: Zelllinie, UV steht für die bestrahlten Zellen, K für die nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: MTT-Readerwerte bei den angegebenen Verdünnungen und Messwellenlängen.

Ein hoher MTT-Wert bedeutet viel Farbstoffumsatz und damit eine hohe Vitalität der gemessenen Zellen.

VA: Versuch A, gemessen wurden die Zellen bei zwei Wellenlängen und zwei Verdünnungen (540 nm und 595 nm sowie 20 µl und 40 µl umgesetzte MTT-Lösung auf 100 µl mit DMSO ergänzt).

VO: Vorversuch, gemessen wurde bei 595 nm

Für die weiteren Berechnungen wurde von den Messwerten der Leerwert der Platte subtrahiert.

MTT 6 Joule, F92, CS4BR, GM739, GM1856					
	Messwerte				
3.Woche	VA				VO
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92 K					1,345
F92 UV					0,859
CS4BR K	0,39	0,236	0,588	0,321	
CS4BR UV	0,267	0,176	0,375	0,235	
GM739 K	0,351	0,21	0,517	0,288	
GM739 UV	0,215	0,143	0,295	0,189	
GM 1856 K	0,4	0,241	0,596	0,335	
GM 1856 UV	0,224	0,155	0,311	0,201	

Tabelle 5.1

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 4.1) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

6 Joule	MTT UV/K				
1.Woche					
	VA				V0
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92	0,66347687	0,65749235	0,61804827	0,60314342	0,79865772
CS4BR	0,73529412	0,71774194	0,74410774	0,72413793	0,71428571
GM739	0,61340206	0,69642857	0,57388316	0,62874251	0,55115512
GM 1856	0,80152672	0,79865772	0,80965147	0,76168224	

Tabelle 5.2

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 4.2) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt. Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

6 Joule	MTT UV/K				
2.Woche					
	VA				V0
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92					0,95919449
CS4BR	0,63085399	0,66350711	0,59893993	0,67253521	
GM739	0,56481481	0,61748634	0,54098361	0,6125	
GM 1856	0,63788301	0,75263158	0,60070053	0,67844523	

Tabelle 5.3

Zuerst wurde von den gemessenen MTT-Werten (Tab 4.3) der Leerwert der Platte subtrahiert, dann wurden die MTT-Werte der bestrahlten Zellen durch die MTT-Werte der Kontrollzellen geteilt.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

6 Joule	MTT UV/K				
3.Woche					
	VA				V0
	40 µl 595 nm	20 µl 595 nm	40 µl 540 nm	20 µl 540 nm	595 nm
F92					0,62844037
CS4BR	0,65155807	0,69849246	0,61343013	0,6971831	
GM739	0,56687898	0,61271676	0,5375	0,60557769	
GM 1856	0,51515152	0,57843137	0,490161	0,55033557	

Tabelle 6

Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (STABW), errechnet aus den in Tabelle 5 aufgelisteten Einzelwerten.

Bei F92 konnten für Wochen 2 und 3 keine Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet werden da nur je ein Wert des Vorversuches zur Verfügung stand.

Für die MW gilt: Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

6 Joule		
F92	MW	STABW
1.Woche	0,6682	0,0773
2.Woche	0,9592	
3.Woche	0,6284	
CS4BR	MW	STABW
1.Woche	0,7271	0,0124
2.Woche	0,6415	0,0335
3.Woche	0,6652	0,0408
GM739	MW	STABW
1.Woche	0,6127	0,0560
2.Woche	0,5839	0,0372
3.Woche	0,5807	0,0351
GM 1856	MW	STABW
1.Woche	0,7929	0,0213
2.Woche	0,6674	0,0651
3.Woche	0,5335	0,0388

Diagramm 3.1

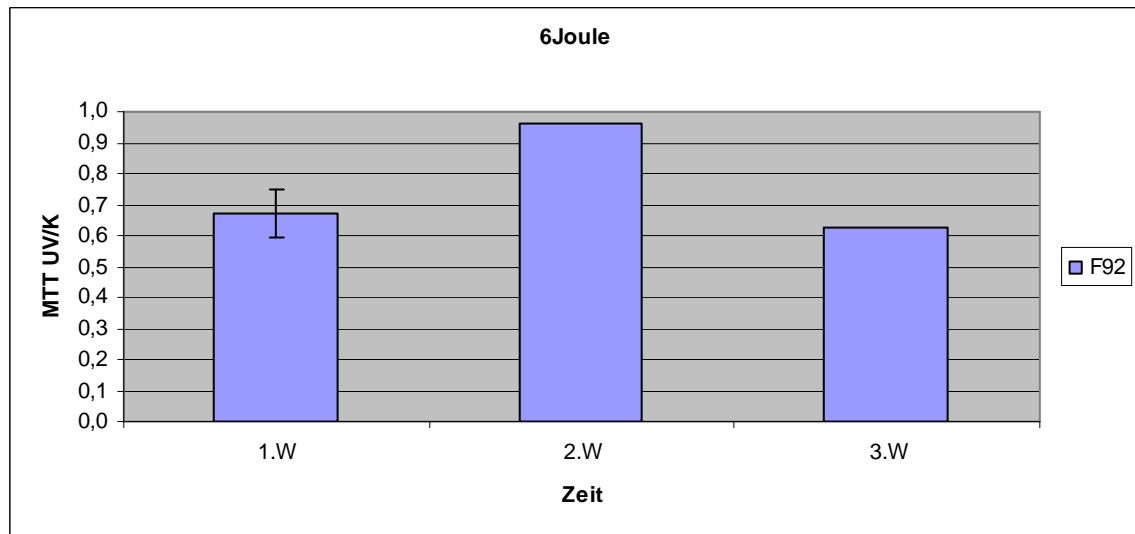


Diagramm der in Tabelle 6 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien F92 bei Bestrahlung mit 6 Joule

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 6

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 3.2

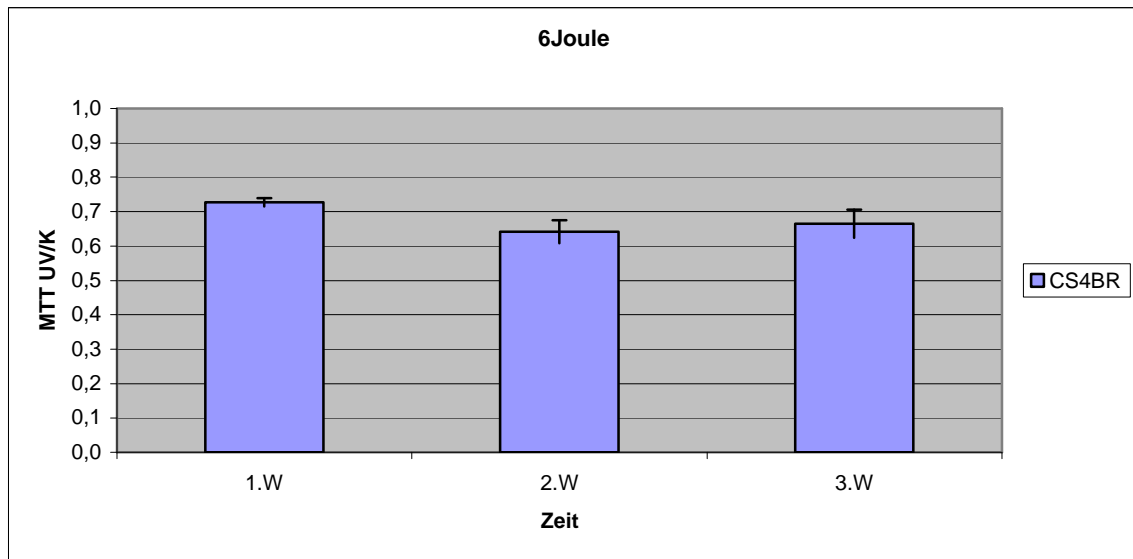


Diagramm der in Tabelle 6 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien CS4BR bei Bestrahlung mit 6 Joule

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 6

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben

Diagramm 3.3

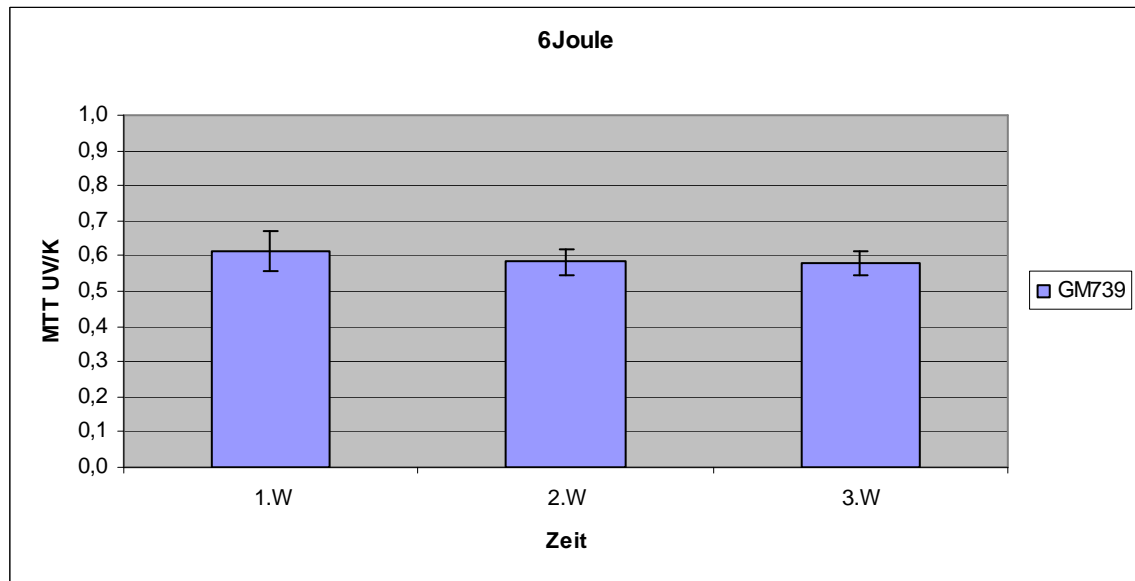


Diagramm der in Tabelle 6 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien GM739 bei Bestrahlung mit 6 Joule

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 6

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 3.4

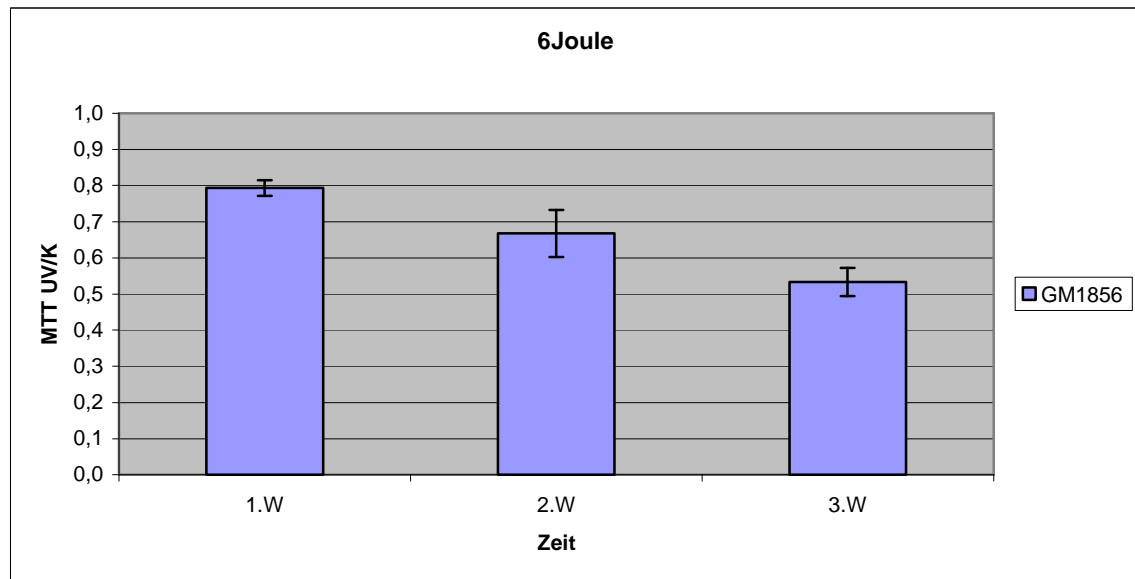


Diagramm der in Tabelle 6 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien GM1856 bei Bestrahlung mit 6 Joule

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 6

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 4

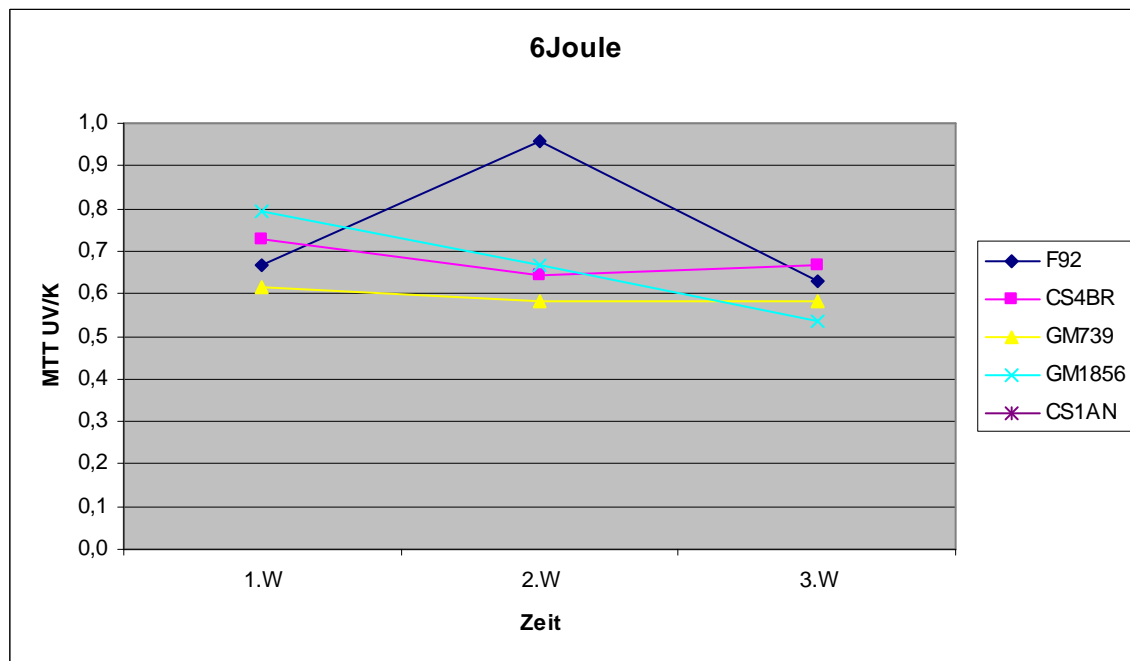


Diagramm der in Tabelle 6 aufgelisteten Werte (MW und STABW) für die Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 bei Bestrahlung mit 6 J/cm^2 im Vergleich

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 3

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an eins bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

3.3.3 Tabellen und Diagramme bei 4 und 6 J/cm² im Vergleich

Tabelle 7

Viabilität der Zelllinien F92, CS4BR, GM739, GM1856 nach Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm², als Prozentwert der unbestrahlten Kontrolle.

Die in Tab. 3 und Tab. 6 aufgeführten MW sind hier mit 100 multipliziert als %-Werte angegeben.

Die errechneten, aufgeführten Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Viabilität UV/K in %			
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
F92 4J	68,9942	79,9589	78,4895
F92 6J	66,8164	95,9200	62,8400
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
CS4BR 4J	67,2620	86,5362	86,7151
CS4BR 6J	72,7113	64,1459	66,5166
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
GM739 4J	55,3062	83,9155	59,2389
GM739 6J	61,2722	58,3946	58,0668
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
GM1856 4J	58,9651	69,3588	55,3392
GM1856 6J	79,2880	66,7415	53,3520

Diagramm 5.1

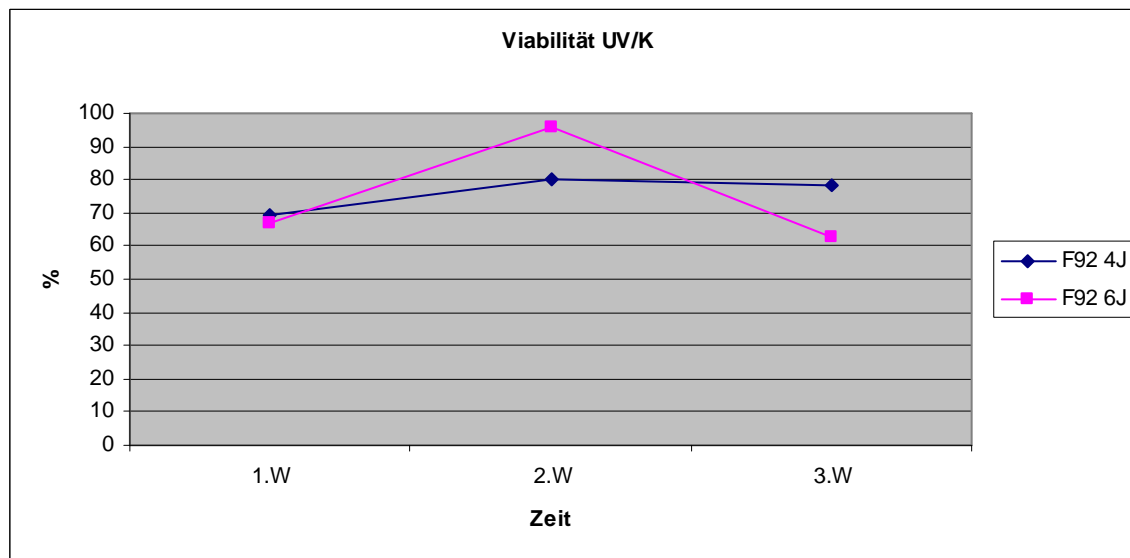


Diagramm der in Tabelle 7 aufgelisteten Werte für die Zelllinien F92 bei Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² im Vergleich

Gezeigt wird die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nach Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² als Prozentwert von der unbestrahlten Kontrolle.

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 7

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 5.2

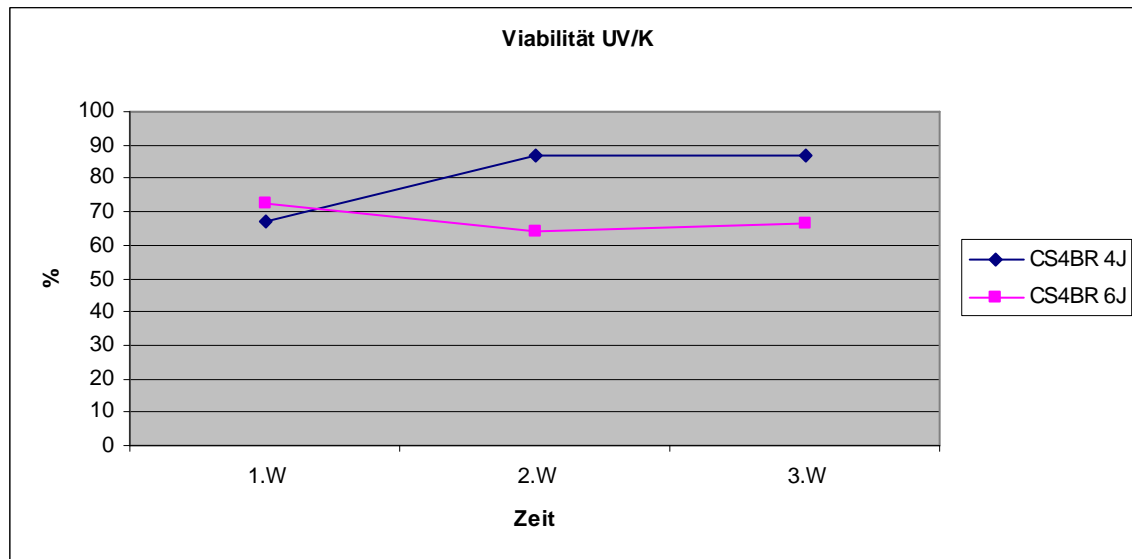


Diagramm der in Tabelle 7 aufgelisteten Werte für die Zelllinien CS4BR bei Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² im Vergleich

Gezeigt wird die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nach Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² als Prozentwert von der unbestrahlten Kontrolle.

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 7

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 5.3

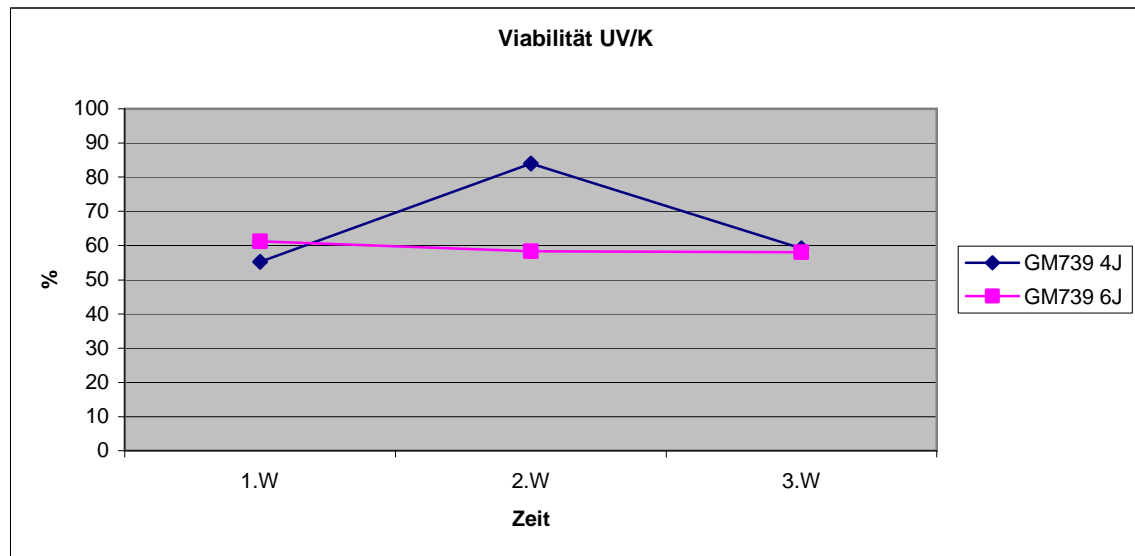


Diagramm der in Tabelle 7 aufgelisteten Werte für die Zelllinien GM739 bei Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² im Vergleich

Gezeigt wird die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nach Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² als Prozentwert von der unbestrahlten Kontrolle.

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 7

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 5.4

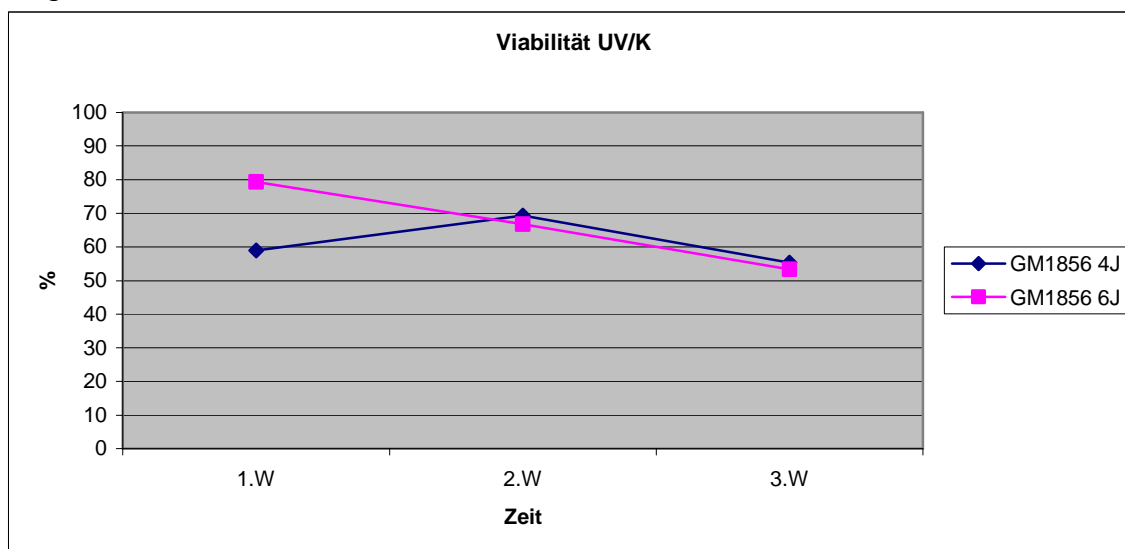


Diagramm der in Tabelle 7 aufgelisteten Werte für die Zelllinien GM1856 bei Bestrahlung mit 4 und 6 J/cm² im Vergleich

Gezeigt wird die Viabilität der jeweiligen Zelllinie nach Bestrahlung mit 4 und mit 6 J/cm² als Prozentwert von der unbestrahlten Kontrolle.

x-Achse: Zeit,

y-Achse: Werte aus Tabelle 7

Die Werte beschreiben die Viabilität der bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

3.4 Tabellen und Diagramme zur Zellzahlbestimmung

Tabelle 8

Zellzahlen auf 6-Well Kulturplatte von F92, CS4BR, GM739 und GM1856 nach Bestrahlung mit 4 beziehungsweise 6 J/cm².

Zeilen: Zelllinien, UV bedeutet bestrahlte Zellen, K bedeutet nicht bestrahlte Kontrolle

Spalten: Zellzahlen nach ein, zwei und drei Wochen

Trypan Blau			
		Zellzahl 4J	
	1. Woche	2. Woche	3. Woche
F92 K	340000	500000	620000
F92 UV	180000	240000	340000
CS4BR K	360000	420000	540000
CS4BR UV	220000	240000	380000
GM739 K	60000	220000	220000
GM739 UV	40000	120000	120000
GM 1856 K	240000	340000	500000
GM 1856 UV	160000	240000	340000
		Zellzahl 6J	
	1. Woche	2. Woche	3. Woche
F92 K	540000	680000	920000
F92 UV	280000	240000	80000
CS4BR K	340000	400000	340000
CS4BR UV	160000	200000	160000
GM739 K	160000	140000	220000
GM739 UV	100000	80000	120000
GM 1856 K	220000	220000	160000
GM 1856 UV	160000	140000	120000

Tabelle 9

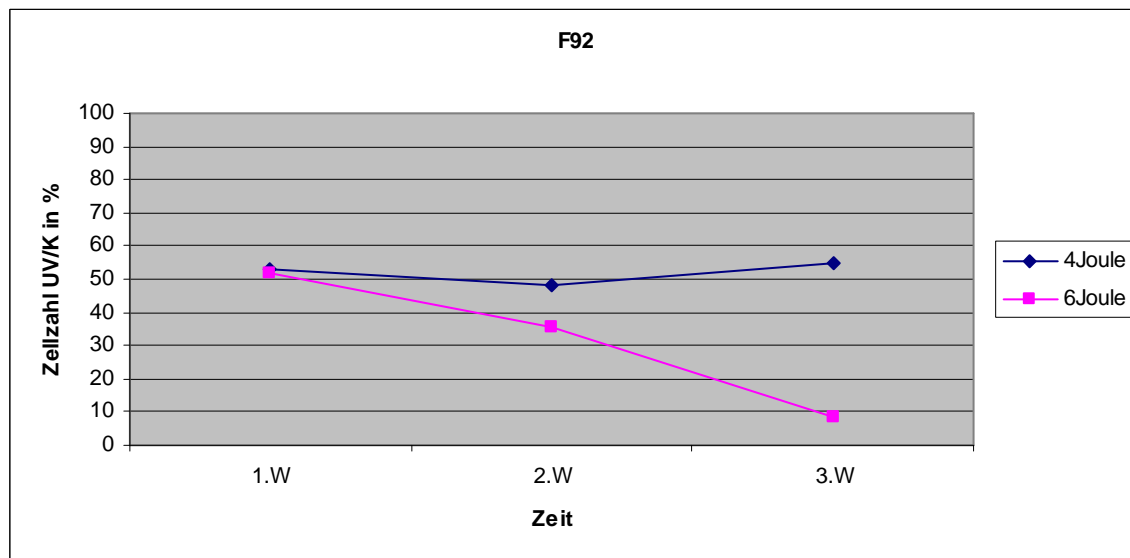
Verhältnisse der Zellzahlen bestrahlte Zellen/unbestrahlte Zellen in Prozent.

Zeilen: Zelllinien bei 4 und 6 J/cm²

Spalten: Verhältnisse der Zellzahlen bestrahlte Zellen/unbestrahlte Zellen in Prozent. Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Zellzahlen			
UV/K in %			
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
F92 4J	52,9412	48,0000	54,8387
F92 6J	51,8519	35,2941	8,6957
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
CS4BR 4J	61,1111	57,1429	70,3704
CS4BR 6J	47,0588	50,0000	47,0588
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
GM739 4J	66,6667	54,5455	54,5455
GM739 6J	62,5000	57,1429	54,5455
	1.Woche	2.Woche	3.Woche
GM 1856 4J	66,6667	70,5882	68,0000
GM 1856 6J	72,7273	63,6364	75,0000

Diagramm 6.1

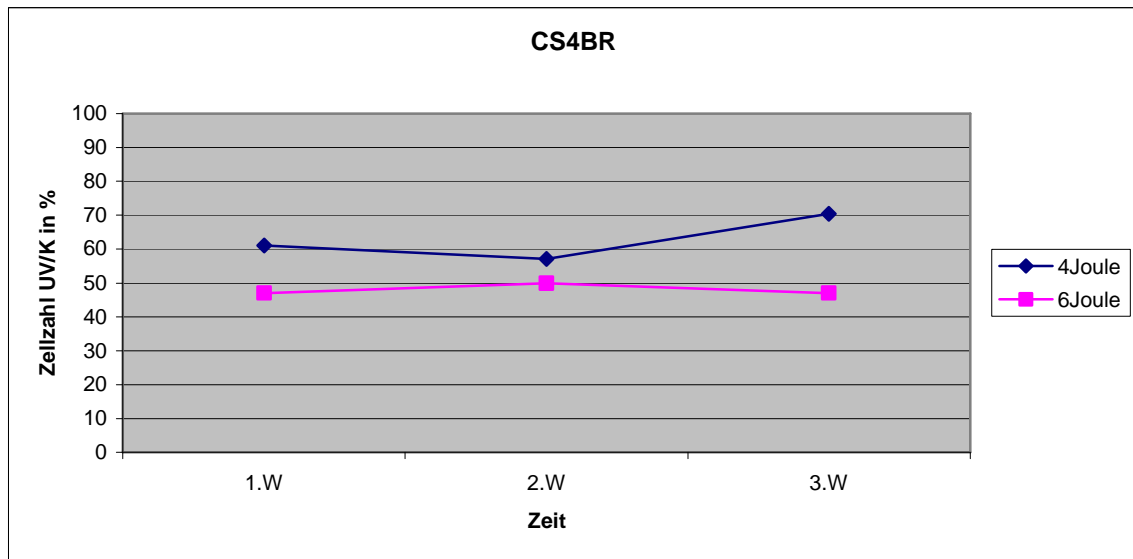


Zellzahlen der bestrahlten Zelllinien F92 nach Bestrahlung mit 4, beziehungsweise 6 J/cm² als Prozent der Zellzahlen der unbestrahlten Kontrollen.

Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Der Wert (8,7%) der Zelllinie F92 in der 3. Woche bei 6 J/cm² wird als Ausrutscher gewertet, insbesondere da der genauere MTT-Wert über 50% bei 62,8% liegt.

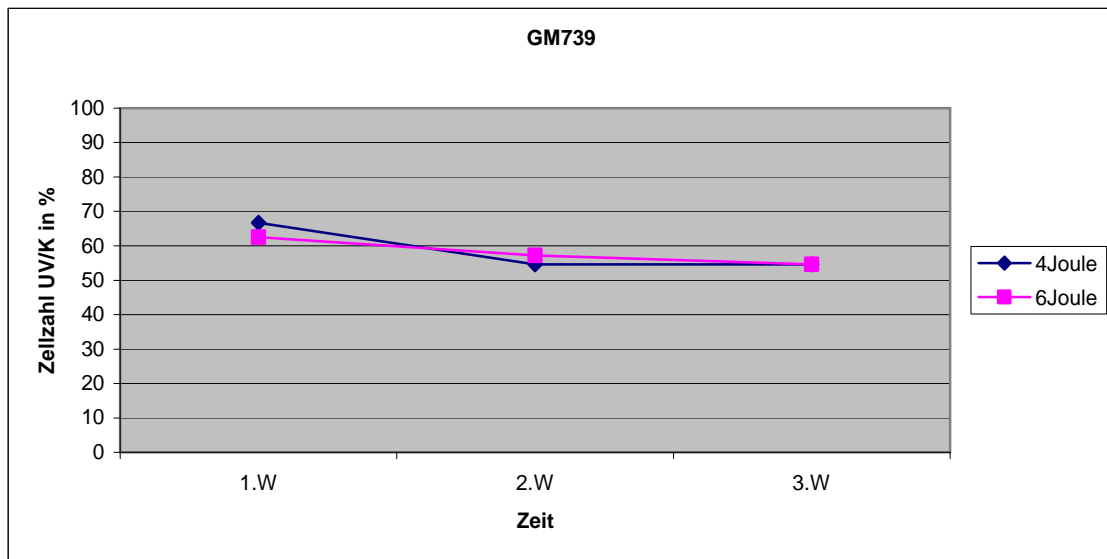
Diagramm 6.2



Zellzahlen der bestrahlten Zelllinien CS4BR nach Bestrahlung mit 4 beziehungsweise 6 J/cm² als Prozent der Zellzahlen der unbestrahlten Kontrollen.

Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

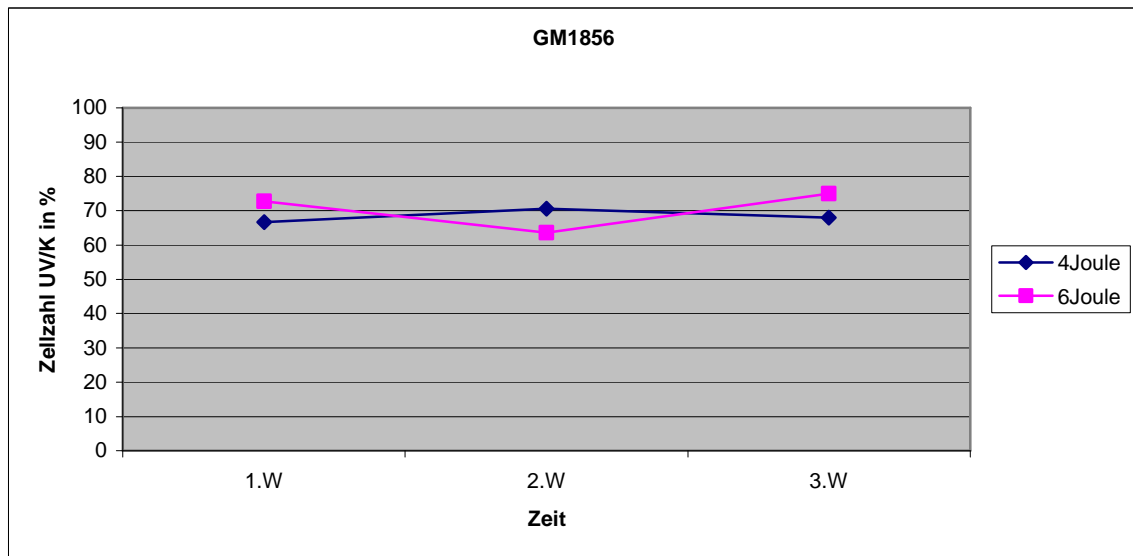
Diagramm 6.3



Zellzahlen der bestrahlten Zelllinien GM739 nach Bestrahlung mit 4 beziehungsweise 6 J/cm² als Prozent der Zellzahlen der unbestrahlten Kontrollen.

Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben.

Diagramm 6.4



Zellzahlen der bestrahlten Zelllinien F92, CS4BR, GM739 und GM1856 nach Bestrahlung mit 4 beziehungsweise 6 J/cm² als Prozent der Zellzahlen der unbestrahlten Kontrollen.

Ein Wert nahe an 100 bedeutet, dass die bestrahlten Zellen ähnlich vital sind wie die unbestrahlten, ein Wert nahe an null bedeutet, dass die Zellen bei der Bestrahlung stark an Vitalität eingebüßt haben

4. Diskussion

4.1 Aussage der Ergebnisse

Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die untersuchten Zelllinien beide Strahlendosen in der Langzeitbestrahlung mit UVA1 gleich gut überleben. Die Viabilitätsmessung im MTT gab keinen Anhalt, dass die Wildtypfibroblasten die Langzeitbestrahlung mit UVA1 besser überleben als die untersuchten CS-Zelllinien. Die untersuchte CSA und die beiden untersuchten CSB-Zelllinien unterschieden sich in der Viabilität nach UVA1-Bestrahlung nicht.

Dies legt nahe, dass die drei untersuchten CS-Zelllinien bei den gewählten UVA1-Dosen keine erhebliche Einbuße der Viabilität im Vergleich zu den Wildtypfibroblasten erleiden.

Insbesondere im Bereich subletaler UVA1-Dosen sind die beiden gewählten UVA1-Dosen für die Durchführung weiterer Experimente zur Wirkung von UVA1 auf CS-Fibroblasten geeignet.

4.2 Diskussion der Methoden, Qualität, Zellzahl und MTT

4.2.1 Trypanblaumethode

Die Trypanblaumethode ist zur Abschätzung der Zellzahl geeignet. Schritte, die die tatsächliche Zellzahl verfälschen können, sind vor allem das Ablösen der Zellen mit Trypsin, sowie das Vorliegen von kleinen Zellhaufen in der Zellsuspension für die Auszählung. Beim Ablösen der Zellen mit Trypsin können diese bei langer Einwirkdauer geschädigt werden. Die Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau sagt nichts über die Stoffwechselaktivität der einzelnen Zellen aus, sondern beruht auf der Intaktheit der äußeren Zellmembran. Es lässt sich also nur zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Die Methode liefert jedoch keinen Hinweis ob und wie stark die lebenden Zellen durch die verwendete UVA1-Strahlung geschädigt wurden.

4.2.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay misst die Viabilität der Zellen indem er hauptsächlich die Glykolyseaktivität der Zellpopulation widerspiegelt. Da das MTT-Reagenz aber auch durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen umgesetzt wird, besteht die Möglichkeit, dass intakte Mitochondrien von bereits toten Zellen in geringem Umfang an dem Umsatz des MTT-Reagenzes beteiligt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der MTT-Test aus diesem Grund bis zu drei Tage lang auch durch tote Zellen beeinflusst werden kann. Dieser Effekt dürfte allerdings als sehr gering angesehen werden, da insgesamt nur ein kleiner Teil des MTT in den Mitochondrien umgesetzt wird. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Funktion der Mitochondrien in den toten Zellen durch die UV-Strahlung zusätzlich geschädigt wird, was diese Fehlerquelle nochmals verkleinern dürfte. (Page 1988, Berridge 1993, Berridge 1996)

4.3 Möglichkeiten zur Verbesserung der Aussagekraft

Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern sind verschiedene Möglichkeiten denkbar:

Es wäre sicherlich hilfreich, die Versuchsreihen mehrfach zu wiederholen, um ein verlässlicheres Ergebnis zu erzielen.

Auch die Untersuchung bei weiteren UVA-Dosen sowie mit weiteren CSA- und CSB-Zelllinien könnte zusätzliche Informationen liefern.

Die Viabilitätsbestimmung der bestrahlten Zellen mit anderen Methoden, wie zum Beispiel mittels ‚fluorescence activated cell sorting‘ (FACS)-Messung, ist anzustreben, um die vorgestellten Ergebnisse zu bestätigen.

Auch denkbar und wünschenswert wäre die parallele Viabilitätsmessung mittels FACS und MTT, um die Ergebnisse der beiden Methoden zu vergleichen.

Da in der Literatur eine stark schwankende Sensibilität von CS-Zellen auf UVC-Strahlung beschrieben ist (Deschavanne 1984), wäre es interessant, CS-Zelllinien mit UVC (oder UVB) im direkten Vergleich mit UVA1 zu bestrahlen.

4.4 Zelluläre Charakterisierung von CS-Zellen

Circa 80% der CS-Patienten weisen eine Mutation im CSB- und 20% eine Mutation im CSA-Gen auf. Mutationen in den Genen *XPB*, *XPD* und *XPG* wurden bei Patienten mit einem kombinierten XP/CS-Phänotyp gefunden.

Die beiden CS-Gene konnten bereits geklont werden.

CSA (auf 5q12-q31) codiert für ein Tryptophan-Aspartat (WD-) Repeat-Protein (46kDa), über seine Funktion ist bisher allerdings wenig bekannt.

Das CSB-Gen (auf 2q21) codiert für ein Polypeptid von 89-kDa. Das CSB-Protein hat eine Helikase-Domäne und gehört zur Familie der Swi2/Snf2 DNA-abhängigen ATPasen.

Es wird angenommen, dass das CSB-Protein neben der DNA-Reparatur auch an der Transkription beteiligt ist. Es besteht die Vermutung, dass sowohl TTD als auch das Cockayne Syndrom Defekte in der basalen Transkription aufweisen. Die Datenlage unterstützt diese Hypothese bisher jedoch nur für TTD-Zellen.

Außerdem gibt es Berichte, die darauf hindeuten, dass das CSB-Protein an der Reparatur UV-induzierter DNS-Schäden, z.B. durch ROS beteiligt ist. (Berneburg 2007)

Bei der TCR finden sich die beiden CS-Proteine CSA und CSB an der Stelle des Defekts ein. Ihre Funktion ist das Entfernen der Polymerase und das Engagement von TFIIH, sowie der Endonukleasen XPG und XPF. Es wird angenommen, dass CS-Proteine auch benötigt werden, um bei der TCR den Faktor TFIIH vom Reparaturmodus zurück zum Transkriptionsmodus zu überführen. Das Ablösen von der Polymerase II geschieht vermutlich CSB-abhängig durch Ubiquitinierung und durch proteasomalen Abbau der großen Untereinheit. Es wird angenommen, dass eine blockierte Polymerase die Transkription anhalten und zu Apoptose führen kann. (Berneburg 2001, Berneburg 2003, Berneburg 2007, Licht 2003)

Neue Studien konnten zeigen, dass in vivo der Wechsel zwischen Reparatur- und Transkriptionsmodus möglicherweise auch spontan und sehr häufig geschehen kann. Neben der Beteiligung bei der transkriptionsgekoppelten NER

scheint CSB auch an der Transkription durch RNA-Polymerasen I, II und möglicherweise III sowie an der BER beteiligt zu sein.

Die verschiedenen Rollen von CSB können eine Erklärung für die vielfältigen Manifestationen im Phänotyp sein.

Es sind weitere Proteine bekannt, mit denen CSB interagiert oder Komplexe bildet. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über diese Proteine sowie deren zelluläre Funktion: (Licht 2003)

Protein	Zelluläre Funktion
CSA	TCR
XPB und XPD von TFIIH	Transkription durch Pol I und II, NER
XPG	NER, Stimulation von BER
XAB2	TCR
RNA Pol II	Transkription
RNA Pol I	Transkription
p44 und p62 von TFIIH	Transkription durch Pol I und II, NER
p53	Zellzykluskontrolle, Stopp in G1, NER, Apoptose
Histone 2A, 2B, 3, 4	Chromatinkomponente
p43 von TFIIH	Transkription durch RNA Pol II
OGG1	BER von 8-oxoG und 8-oxoA
XPA	NER

4.5 Viabilität/Sensibilität von CS-Zellen bei UVB/C-Bestrahlung

CSA- und CSB-Zellen wurden in Bezug auf ihr Verhalten auf UV-Bestrahlung ausgiebig untersucht. Die hierbei verwendete UV-Strahlung lag meist im UVC-Bereich (oft mit einer Wellenlänge um 254 nm) und bei manchen Untersuchungen im UVB-Bereich. Schon vor 1980 wurde die Hypersensibilität von CS-Zellen auf Bestrahlung mit UV(C) beschrieben. (Schmickel 1977)

Es folgten viele weitere Untersuchungen in Bezug auf Sensibilität und später auf Apoptoseverhalten nach UV(C)-Bestrahlung.

(Fujiwara 1982, Yatani 1982, Mayne 1982, Deschavanne 1984, Mayne 1984, Stefanini 1996, Ljungman 1999, Balajee 2000, McKay 2002, Licht 2003)

Neben Fibroblasten wurden auch andere Zelllinien von CS-Patienten, wie zum Beispiel Lymphoblasten untersucht. (Otsuka 1984)

Bei manchen Studien wurde außer UVC- auch UVB-Licht zur Bestrahlung verwendet. (Queille 2001, Berneburg, Clingen 2000, Berneburg, Lowe 2000)

Die bisherigen Untersuchungen legen nahe, dass CS-Fibroblasten nach UVC- und UVB-Bestrahlung hypersensibel reagieren und ihre Viabilität nach Bestrahlung mit UVB/C eingeschränkt ist. Die Hypersensibilität kann allerdings von Zelllinie zu Zelllinie stark schwanken. (Deschavanne 1984)

Neben der erhöhten Sensibilität für UV(C)-Licht beschrieb Schmickel eine normale Fähigkeit der CS-Zellen Thymidin-Dimere nach Bestrahlung zu reparieren. Auch konnte er eine normale Sensibilität der untersuchten CS-Fibroblasten gegenüber Röntgenstrahlung nachweisen. Die UV-Bestrahlung führte er mit einer Hauptwellenlänge von 254 nm durch. Die Sensibilität gegenüber UV-Licht und Röntgenstrahlung wurde über die Fähigkeit der Zellen, nach Bestrahlung Zellkolonien zu bilden, gemessen. (Schmickel 1977)

Deschavanne fand bei vier der fünf von ihm untersuchten CS-Zelllinien neben der Hypersensibilität gegenüber UV(C)-Strahlung auch eine gesteigerte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung. (Deschavanne 1984)

Mayne und Lehmann berichteten von Versuchen, in denen CS-Zellen einen Defekt in der Erholung der DNA- und RNA-Synthese nach UV-Bestrahlung aufwiesen. Nach ihren Ergebnissen ist die UV-Sensibilität keine Folge von

einem erniedrigten NAD-Gehalt der CS-Zellen, wie es zuvor von Fujiwara vorgeschlagen wurde. (Mayne und Lehmann 1984)

Zur Induktion von Apoptose bei CS-Zelllinien durch UV-Licht liegen wie bereits aufgeführt multiple Untersuchungen vor: Bei niedrigen UV(C)-Dosen wurden die Zellen aufgrund ihres Defektes in der TCR mehr geschädigt als gesunde Zellen und gingen nach Eintritt in die S-Phase vermehrt in Apoptose. Bei höheren UV-Dosen scheinen die Zellen so stark geschädigt zu werden, dass der Eintritt in die S-Phase verhindert wird und im Vergleich zu gesunden Zellen weniger Apoptose stattfindet. Es wird angenommen, dass die Intaktheit der ATPase-Region von CSB wichtig ist, um UV-induzierte Apoptose zu verhindern. (Ljungman 1999, Balajee 2000, McKay 2002, Licht 2003)

Die Blockierung der RNA Polymerase II durch UV-induzierte DNA Veränderungen wird für die p53 Antwort und somit für Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht. (Ljungman 1996, Ljungman 1999)

4.6 Viabilität/Sensibilität von CS-Zellen bei UVA1-Bestrahlung

Im Gegensatz zu den aufgeführten Studien, bei denen mit UVC und UVB bestrahlt wurde, sollte nun das Verhalten der CS-Fibroblasten bei UVA1-Bestrahlung untersucht werden, und nicht bei UVB oder UVC.

Die Pathogenese UVA-bedingter Schäden unterscheidet sich von der Entstehung UVC- und UVB-bedingter Schäden. UVC und UVB können durch ihre kürzere Wellenlänge DNA direkt schädigen. UVA hingegen schädigt DNA hauptsächlich indirekt über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und führt wie beschrieben zu einem anderen Spektrum an zellulären und DNA Schäden.

Die vorgestellten Versuche legen nahe, dass CS-Fibroblasten nicht im gleichen Umfang hypersensibel auf UVA1-Licht reagieren wie auf UVC.

Es gab keinen Hinweis darauf, dass bei den beiden gewählten UVA1-Dosen die untersuchten CS-Zelllinien weniger viabel sind als die bestrahlten Wildtypfibroblasten.

Eine Erklärungsmöglichkeit für das dargestellte Ergebnis könnte in dem unterschiedlichen Schädigungsmuster von UVC/UVB- und UVA-Strahlung liegen, sowie in dem von der Wellenlänge abhängigen Spektrum an DNA Schäden.

Die vergleichbare Viabilität von CS-Zelllinien und Wildtypfibroblasten nach UVA1-Bestrahlung könnte auch auf der Tatsache beruhen, dass die CS-Proteine an der TCR aber wohl nicht an der GGR beteiligt sind. Möglicherweise können die CS-Zellen dadurch die UVA1-induzierten Schäden vergleichsweise besser als die UVC- und UVB-induzierten Schäden überleben.

Möglich wäre auch, dass die CS-Zelllinien zwar durch die UVA1-Strahlung mehr Schäden bekommen als die Wildtypfibroblasten, aber durch den Gendefekt seltener in Apoptose gehen, sodass sich bei der Viabilität kein Unterschied zeigt.

4.7 Zusammenfassung

Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass CS-Fibroblasten auf UVA1-Licht nicht im gleichen Umfang hypersensibel reagieren wie auf UVC- und UVB-Licht.

Bei den verwendeten UVA1-Dosen fand sich kein Unterschied in der Viabilität von CS- und Wildtypfibroblasten nach Bestrahlung.

Weitere Experimente müssen diese Ergebnisse bestätigen.

5. Literatur

Balajee AS, D. L., Brosh Jr RM, Selzer R und Bohr VA (2000). "Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis." Oncogene **19**: 477-489.

Berneburg M, C. P., Harcourt SA, Lowe JE, Tayloe EM, Green MHL, Krutmann J, Arlett CF und Lehmann AR (2000). "The cancer-free phenotype in trichothiodystrophie is unrelated to its repair defect." Cancer Research **60**: 431-438.

Berneburg M, G.-B. S., Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J (1999). "Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion." The Journal of Biological Chemistry **274**: 15345-15349.

Berneburg M, G. N., Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Krutmann J. (1997). "Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system." Photochem Photobiol **66**(2): 271-5.

Berneburg M, G. T., Kürten V, Schroeder P, Hertel I, von Mikecz A, Wild S, Chen M, Declercq L, Matsui M, Ruzicka T, Krutmann J. (2005). "Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences." J Invest Dermatol. **125**(2): 213-20.

Berneburg M, K. J. (2003). "Xeroderma pigmentosum und verwandte Syndrome." Hautarzt **54**: 33-40.

Berneburg M, K. K. (2007). "Xeroderma Pigmentosum and Other DNA Repair Deficient Photodermatoses." Photodermatology. H. H. Lim HW, Hawk JLM, CRC Press.

Berneburg M, K. Y., Krutmann J (2006). "Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis." Photochem. Photobiol. Sci. **5**: 190-198.

Berneburg M, L. A. (2001). "Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription." Adv. Genet. **43**: 71-102.

Berneburg M, L. J., Nardo T, Araújo S, Fousteri MI, Green MHL, Krutmann J, Wood R D, Stefanini M und Lehmann AR (2000). "UV damage causes uncontrolled DNA breakage in cells from patients with combined features of XP-D and Cockayne syndrome." EMBO Journal **19**(5): 1157-1166.

Berneburg M, P. H., Medve-König K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J. (2004). "Induction of the photoaging-associated mitochondrial

common deletion in vivo in normal human skin." J Invest Dermatol. **122**(5): 1277-83.

Berridge MV, T. A. (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." Archives of Biochemistry and Biophysics **303**: 474-482.

Berridge MV, T. A., McCoy KD und Wang R (1996). "The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts." Biochemica **4**: 14-19.

Carmichael J, D. G. W., Gazdar AF, Minna ID und Mitchell JB (1987). "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." Cancer Research **47**: 936-942.

Courdavault S, B. C., Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2004). "Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells." Mutat Res **556**: 135-42.

De Boer J, u. H. J. (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes." Carcinogenesis **21**(3): 453-460.

Deschavanne PJ, C. N., Fertil B, und Malaise EP (1984). "Abnormal sensitivity of some Cockayne's syndrome cell strains to UV- and gamma-rays. Association with a reduced ability to repair potentially lethal damage." Mutation Research **131**: 61-70.

Eicker J, K. V., Wild S, Riss G, Goralczyk R, Krutmann J, Berneburg M. (2003). "Betacarotene supplementation protects from photoaging-associated mitochondrial DNA mutation." Photochem Photobiol Sci. **2**(6): 655-9.

Fujiwara Y, G. K. u. K. Y. (1982). "Ultraviolet hypersensitivity of Cockayne's syndrome fibroblasts. Effects of nicotinamide adenine dinucleotide and poly(ADP-ribose) synthesis." Experimental Cell Research **139**: 207-215.

Garmyn M, Y. D. (2007). The Molecular and Genetic Effects of Ultraviolet Radiation Exposure on Skin Cells. Photodermatology. H. H. Lim HW, Hawk JLM, CRC Press.

Hofhaus G, B. M., Wulfert M, Gattermann N. (2003). "Live now--pay by ageing: high performance mitochondrial activity in youth and its age-related side effects." Exp Physiol. **88**(1): 167-174.

Kleijer WJ, L. V., Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, Jaspers NGJ, Sarasin A, Stefanini M, Lehmann AR (2008). "Incidence of DNA repair

deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne Syndrome and trichothiodystrophy." DNA Repair **7**: 744-750.

Knippers R (2006). Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag.

Larsen NB, R. M., Rasmussen LJ (2005). "Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?" Mitochondrion **5**: 89-108.

Lehmann AR (1982). "Three complementation groups in Cockayne Syndrome." Mutation Research **106**: 347-356.

Lehmann B, T. 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**: 507-10.

Licht CL, S. T. u. B. V. (2003). "Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions." Am J Hum Genet **73**: 1217-1239.

Ljungman M, Z. F. (1996). "Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis." Oncogene **15**: 823-31.

Ljungman M, Z. F., Chen F, Raibow AJ und McKay BC (1999). "Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response." Oncogene **18**: 583-592.

Matsumura Y und Ananthaswamy HN (2002). "Short-term and long-term cellular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine." Expert Rev Mol Med **4**(26): 1-22.

Mayne LV, B. B., und Lehmann AR (1984). "The ultraviolet sensitivity of Cockayne syndrome cells is not a consequence of reduced cellular NAD content." Am J Hum Genet **36**: 311-319.

Mayne LV, u. L. A. (1982). "Failure of RNA synthesis to recover after UV irradiation: An early defect in cells from individuals with Cockayne`s syndrome and xeroderma pigmentosum." Cancer research **42**: 1473-1478.

McKay BC, B. C., Spronck JC, Ljungman M (2002). "Ultraviolet light-induced apoptosis is associated with S-phase entry in primary human fibroblasts." DNA Repair **1**: 811-820.

Mosmann T (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**: 55-6.

Otsuka F, T. R., Cayeux S und Robbins JH (1984). "Use of lymphoblastoid cell lines to evaluate the hypersensitivity to ultraviolet radiation in Cockayne syndrome." Journal of Investigative Dermatology **82**: 480-484.

Page M, B. N., Cinq-Mars B und Lemieux P (1988). "Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity." Int J Immunopharmac **10**: 785-793.

Queille S, D. C., Sarasin A und Daya- Grosjean L (2001). "Effects of XPD mutations on ultraviolet-induced apoptosis in relation to skin cancer-proneness in repair-deficient syndromes." J Invest Dermatol **117**(5): 1162-70.

Rhodes LE, L. H. (2007). The Acute Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin. Photodermatology. H. H. Lim HW, Hawk JLM, CRC Press.

Schmickel RD, C. E., Trosko JE und Chang CC (1977). "Cockayne syndrome: a cellular sensitivity to ultraviolet light." Pediatrics **60**(2): 135-139.

Stefanini M, F. H., Botta E, Nardo T, Lehmann AR (1996). "Genetic analysis of twenty-two patients with Cockayne syndrome." Hum Genet **97**: 418.423.

Yaar M (2007). The chronic effects of ultraviolet radiation on the skin: Photoaging. Photodermatology. H. H. Lim HW, Hawk JLM, CRC Press.

Yatani R, K. I., Shiraishi T, Noda M und Takeda S, (1982). "DNA synthesis and hypersensitivity to ultraviolet radiation in Cockayne's syndrome cells." Experimental and Molecular Pathology **36**: 361-372.

Yoon JH, L. C., O'Connor TR, Yasui A, Pfeifer GP (2000). "The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight." J Mol Biol **299**(3): 681-93.

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

6. Abkürzungen

8oxoG	8-oxo-Guanin
AGT	Alkylguanin-Transferase
AP	Aktivator Protein
AP-Stelle	Apurin bzw. Apyrimidinstelle
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia teleangiektasia and Rad3 related Kinase
BAX	B-cell lymphoma 2 assoziiertes X Protein
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
CD	Cluster of Differentiation
Chk	Checkpoint homologe Proteinkinase
COFS	Zerebro-okulo-fazio-skelettales Syndrom
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin Dimer
CS	Cockayne Syndrome
CYP27A1	CytochromP27A1
DBP	Vitamin D bindendes Protein
DHC	Dehydrocholesterol
DMSO	Dimethyl-Sulphoxid
DNA	Deoxynukleinsäure
dRPase	Deoxyphosphodiesterase
FAD	Flavinadenin-Dinukleotid
FAS	TNF Rezeptortyp
FBS	fetales Kälberserum
G	Gap
GADD	growth arrest and DNA damage inducible gene
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GGR	Globale-Genom-Reparatur
HNPCC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
INF	Interferon
KGF	Keratozytenwachstumsfaktor
MAKP	mitogen aktivierte Proteinkinasen
MEM	Minimum Essential Medium
Mfd	mutation frequency declining Protein
	Matrix-Metallo
MMP	Proteinase
MMR	Mismatch-Reparatur
MSH	MutS-Homolog
MTT	Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid
MutH	methyl directed mismatch repair proteine
MW	Mittelwert
NAD	Nikotin-Adenin-Dinukleotid
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NFkB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickoxid
OGG	8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase
p21/WAF1	ein Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor

p53	Tumorsuppressorgen p53
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	Ringklemmprotein
PDGF	Plättchen abhängiger Wachstumsfaktor
PG	Prostaglandin
PK	Proteinkinase
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffradikale
S	Synthese
STABW	Standardabweichung
TCR	Transkriptions-gekoppelte Reparatur
TFIIH	basaler Transkriptionsfaktor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRCF	transcription repair coupling factor
TTD	Trichothiodystrophie
UDS	unscheduled DNA Synthese
UV	ultraviolett
UvrA	Teil der UvrABC Endonuklease
Vit D3	Vitamin D3
WD	Tryptophan-Aspartat
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC4	x-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4

7. Danksagung

Zuerst Gott, der es mir ermöglicht hat zu studieren
und diese Arbeit zu schreiben.

Ihm sei Ehre und Dank.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Mark Berneburg für alles Engagement.

York Kamenisch für die Betreuung im Labor.

Julia Wenz für die Zellkulturarbeit, die Bestrahlungen und den Vorversuch.

Dr. Martin Ebinger für sein Mentoring.

Meiner lieben Frau Deborah und meiner Familie
für alle Unterstützung und Ermutigung.

8. Curriculum Vitae

Georg Johannes Schüle

geboren am 15.02.1980 in Freudenstadt

Eltern: Bernhard und Gisela Schüle

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet mit Deborah Schüle

Schulbildung	1986 - 1990	Grundschule Nagold & Mötzingen
	1990 - 1999	Otto-Hahn-Gymnasium Nagold
Zivildienst	1999 - 2000	Evangelisches Jugendwerk Herrenberg
Hochschulbildung	2000 - 2002	Eberhard-Karls-Universität Tübingen Fach: Biochemie
	2002 - 2008	Eberhard-Karls-Universität Tübingen Fach: Humanmedizin Staatsexamen am 27. November 08
Beruf	Seit Februar 2009	Assistenzarzt zur Weiterbildung in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Nagold bei Prof. Dr. Benz