

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Universität Würzburg

Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-B. Bröcker

**Die Rolle von Bcl-2 bei der UV- und TRAIL-induzierten
Keratinozytenapoptose**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Michael Czisch

aus Stambach

Würzburg, Juni 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Leverkus

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Vogel

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2004

Der Promovend ist Arzt

| INHALTSVERZEICHNIS | Seite |
|---|--------------|
| Verzeichnis der Abkürzungen | |
| Verzeichnis der Abbildungen | |
| I. EINLEITUNG | 1 |
| 1. Apoptose | 1 |
| 2. Pathophysiologie der Apoptose | 5 |
| 3. Apoptoseregulation: Mitochondriale Signalwege und die Rolle von Proteinen der Bcl-2-Familie | 7 |
| 4. UV-Bestrahlung: Karzinogen und Therapeutikum | 9 |
| II. MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 1. Material | 12 |
| 1.1. Verwendete Zellen | 12 |
| 1.2. Laborgeräte | 12 |
| 1.3. Verbrauchsgegenstände | 13 |
| 1.4. Allgemeine Medien und Reagentie | 14 |
| 1.5. Spezielle Medien und Reagentien | 16 |
| 1.5.1. Zellkultur | 16 |
| 1.5.2. Farbstoffe und weitere Reagentien für FACS-Analyse | 17 |
| 1.5.2.1. Farbstoffe für FACS-Analyse | 17 |
| 1.5.2.2. Weitere Reagentien für FACS-Analyse | 18 |
| 1.5.3. Western Blot | 18 |
| 1.5.3.1. Lösungen für Western Blot | 18 |
| 1.5.3.2. Primärantikörper für Western Blot-Untersuchungen | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5.3.3. Sekundärantikörper für Western Blot-Untersuchungen | 21 |
| 2. Methoden | 22 |
| 2.1. Zellkultur | 22 |
| 2.1.1. HaCaT-Zellkultur | 22 |
| 2.1.2. Isolation und Passagierung primärer Keratinozyten | 24 |
| 2.2. Behandlung der Zellen | 26 |
| 2.2.1. UV-Bestrahlung adhärenter Zellen | 26 |
| 2.2.1.1. Geräte | 26 |
| 2.2.1.2. Dosisberechnung | 27 |
| 2.2.1.3. Vorbereitung der Zellen | 27 |
| 2.2.2. Behandlung mit den Todesliganden TRAIL/ CD95-Ligand | 28 |
| 2.3. Durchflusszytometrie | 29 |
| 2.3.1. DiOC ₆ /TMRE + PI-Färbung | 29 |
| 2.3.2. DHR-Färbung | 31 |
| 2.3.3. Oberflächenfärbung von membrangebundenen Rezeptoren | 32 |
| 2.4. Methoden zum Nachweis von Apoptose und Zelltod | 32 |
| 2.4.1. Annexin-Färbung | 32 |
| 2.4.2. Hypodiploidie-Analyse nach Nicoletti | 33 |
| 2.4.3. ELISA zum Apoptosenachweis | 34 |
| 2.4.4. Kristallviolett-Färbung zum Nachweis von Zelltod | 35 |
| 2.5. Western Blot Analyse | 36 |
| 2.5.1. Allgemeines | 36 |
| 2.5.2. Herstellung von Zellysaten | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2.1. Vollzell-Lysat | 37 |
| 2.5.2.2. Subfraktionierung zytoplasmatischer Proteine | 37 |
| 2.5.3. Analyse des Proteingehalts nach Bradford | 39 |
| 2.5.4. Durchführung des Western Blot | 40 |
| 2.6. Klonogener Assay | 43 |
| | |
| III. ERGEBNISSE | 45 |
| | |
| 1. Nachweis von Apoptose in Keratinozyten nach UVB- und PUVA-Bestrahlung | 45 |
| | |
| 2. Aktivierung mitochondrialer Signalwege der Apoptose: Kinetische Unterschiede bei UVB- und PUVA-Bestrahlung | 47 |
| | |
| 3. Modulation von UVB und PUVA-induzierten Signalwegen der Apoptose durch Bcl-2-Überexpression | 50 |
| 3.1. Nachweis der Bcl-2-Überexpression | 51 |
| 3.2. Der Einfluss von Bcl-2 auf UVB-induzierte Apoptose | 52 |
| 3.3. Der Einfluss von Bcl-2 auf PUVA-induzierte Apoptose | 52 |
| 3.4. Der Einfluss von Bcl-2 auf Apoptose durch Todesliganden | 54 |
| | |
| 4. Aktivierungsmuster von Caspasen nach UVB, PUVA und nach TRAIL-Stimulation | 58 |
| 4.1. Aktivierungskinetik von Caspasen nach UVB und TRAIL | 58 |
| 4.2. Aktivierungskinetik von Caspasen nach PUVA | 60 |

| | |
|--|------------|
| 5. Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf das mitochondriale Transmembranpotential und das klonogene Potential nach UVB und PUVA-Bestrahlung | 63 |
| 5.1. Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB-Bestrahlung | 63 |
| 5.2. Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach PUVA-Bestrahlung | 66 |
| 5.3. Untersuchung des klonogenen Potentials nach UVB-Bestrahlung | 68 |
| 5.4. Untersuchung des klonogenen Potentials nach PUVA-Bestrahlung | 70 |
| 6. Vergleichende Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) nach verschiedenen Stimuli (UVB, PUVA, UVA, TRAIL) | 72 |
| 7. Auswirkung einer Bcl-2-Überexpression auf die Freisetzung von Zytochrom c aus dem Mitochondrium nach UVB und PUVA | 76 |
| 7.1. Auswirkung von Bcl-2 auf die Zytochrom c-Freisetzung nach UVB-Bestrahlung | 76 |
| 7.2. Einfluss von Bcl-2 auf die Zytochrom c-Freisetzung nach PUVA-Bestrahlung | 77 |
| IV. DISKUSSION | 79 |
| V. LITERATURVERZEICHNIS | 103 |
| VI. ANHANG | 119 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|------------------------------|---|
| AIF | A poptosis I nducing F actor |
| APAF1 | A poptosis P rotease A ctivating F actor 1 |
| ATP | A denosin- T ri- P hosphat |
| BAK | B cl-2 A ntagonist/ K iller |
| BAX | B cl- A ssociated X -protein |
| Bcl-2/Bcl-xL | erstmals in B -cell-lymphoma entdeckt |
| BH-Domains | B cl- H omology- D omains |
| BID | B H-3 I nteracting D omain D eath agonist |
| BSA | B ovines S erum- A lbumin |
| CD | C luster of D ifferentiation |
| CPP32 | Caspase 3 |
| DaR | D onkey a nti R abbit Antikörper |
| DiOC ₆ (3) | 3,3'- D ihexyl O xacarbo C yaninjodid |
| DHR | D i H ydro R hodamin 123 |
| DMEM | D ulbecco's M inimum E ssential M edium |
| DMSO | D i M ethyl S ulf O xid |
| DNA/DNS | D esoxyribo N uklein S äure/ - A cid |
| ECL | E nhanced C hemi L uminescence |
| EDTA | E thylen D iamin T etra A ccetat |
| ELISA | E nzyme L inked I mmuno S orbent A ssay |
| FACS | F luorescence A ctivated C ell S orter |
| FACScan | F luorescence A ctivated C ell S canning |
| FasLigand | F ibroblast a ssociated L igand |
| FCS | F etal C alf S erum |
| FITC (Annexin V- FITC) | F luorescein- I so T hio C yanat |
| FL 1,2,3 | F luoreszenz |
| FSC | F orward S catter |
| g | g ravitation |
| GaM | G oat a nti M ouse Antikörper |
| GvHD | G raft v ersus H ost D isease |
| HaCaT | H uman a dult keratinocytes, C alcium, T emperature |
| Ig | I mmunglobulin |
| IL | I nter L eukin |
| IMM | I nnner M itochondrial M embrane |
| kD | k ilo D alton |
| KGM | K eratinocyte G rowth M edium |
| LZ-CD95 | L eucine Z ipper – CD95 |
| LZ-TRAIL | L eucine Z ipper – TRAIL |
| MED | M inimale E rythem- D osis |

| | |
|--------------|--|
| MF | Mitochondriale Fraktion |
| 8-MOP | 8-MethOxyPsoralen |
| OMM | Outer Mitochondrial Membrane |
| p53 | Tumor suppressor gen p53 |
| PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline |
| PI | PropidiumIodid |
| PTP | Permeability Transition Pore |
| PUVA | Psoralen + UVA-Bestrahlung |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| rpm | rotations per minute |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| Smac | Second mitochondria derived activator of caspases |
| SSC | Sideward Scatter |
| TEMED | N,N,N',N'-TEtra-MEthyl-EthyleneDiamine |
| TMRE | TetraMethylRhodaminEthylesterperchlorat |
| TNF α | Tumor Nekrose Faktor α |
| TRAIL | Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand |
| TRAIL-R | TRAIL Rezeptor |
| TPBS | Tween-PBS |
| UV A/B/C | UltraViolett- Strahlung A/B/C |
| ZF | Zytosolische Fraktion |

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: HaCaT-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Auslösung von Apoptose
- Abb. 2: Modell zur Auslösung und zum Ablauf von Apoptose
- Abb. 3: DiOC₆/PI-Färbung
- Abb. 4: Mechanismus der Annexin-Färbung
- Abb. 5: Subdiploidie-Analyse
- Abb. 6: Modell zur Digitonin-Lyse
- Abb. 7: Subdiploidie-Assay nach unterschiedlichen Stimuli bei HaCaT-Keratinocyten
- Abb. 8: Annexin V-FITC-Färbung zum Apoptose-Nachweis
- Abb. 9: ELISA-Verfahren zum Apoptose-Nachweis
- Abb. 10: Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB
- Abb. 11: DiOC₆/PI-Färbung zur Darstellung des Verhaltens von $\Delta\psi_m$ während des programmierten Zelltods nach UVB und PUVA.
- Abb. 12: Western Blot zur Darstellung der Bcl-2-Überexpression
- Abb. 13: Subdiploidie-Assay nach UVB-Bestrahlung
- Abb. 14: Subdiploidie-Assay nach PUVA-Bestrahlung
- Abb. 15: Expression von Rezeptoren für TRAIL (TRAIL-R) und CD95-Ligand
- Abb. 16: Vergleich der Apoptoseinduktion nach Inkubation mit TRAIL oder CD95-Ligand
- Abb. 17: Zusammenfassung mehrerer Versuche (TRAIL, CD95-Ligand)

- Abb. 18: Untersuchung Bcl-2 überexprimierender Zellen und Kontrollzellen nach UVB-Bestrahlung im Western Blot hinsichtlich der Aktivierung von Caspasen (Caspase 7, 3, 8, 10 und 2) und BID
- Abb. 19: Untersuchung Bcl-2 überexprimierender Zellen und Kontrollzellen nach PUVA-Bestrahlung im Western Blot hinsichtlich der Aktivierung von Caspasen (Caspase 7, 3, 8, 10 und 2) und BID
- Abb. 20: Mitochondriale Depolarisation bei beiden Zelllinien nach UVB, TMRE-Färbung
- Abb. 21: Mitochondriale Depolarisation bei beiden Zelllinien nach UVB, DiOC₆/PI-Färbung
- Abb. 22: Mitochondriale Depolarisation bei beiden Zelllinien nach PUVA, TMRE-Färbung
- Abb. 23: Mitochondriale Depolarisation bei beiden Zelllinien nach PUVA, DiOC₆/PI-Färbung
- Abb. 24: Klonogenes Potential nach UVB
- Abb. 25: Klonogenes Potential nach UVB, Zusammenfassung mehrerer Versuche
- Abb. 26: Klonogenes Potential nach PUVA
- Abb. 27: Klonogenes Potential nach PUVA, Zusammenfassung mehrerer Versuche
- Abb. 28: Korrelation der Bildung von ROS und Apoptoseinduktion bei HaCaT-Keratinocyten nach verschiedenen Noxen

Abb. 29: Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen nach UVB

Abb. 30: Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen nach PUVA

Abb. 31: Zytochrom c-Freisetzung nach UVB

Abb. 32: Zytochrom c-Freisetzung nach PUVA

Abb. 33: Intrinsischer und extrinsischer Signalweg der Apoptose

Abb. 34: Ablauf der Apoptose nach UVB und PUVA; aufgeworfene Fragen

I. EINLEITUNG

1. Apoptose

Apoptose ist eine physiologische Form eines programmierten Zelltods. Im Gegensatz zur Nekrose ist sie ein fein regulierter Mechanismus, der aktive Proteinsynthese von der Zelle erfordert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung an wechselnde Belastungen, der Eliminierung überflüssiger Zellen während der Embryonalentwicklung sowie der Entfernung schädlicher Zellen, wie etwa Tumorzellen, virusbefallener Zellen oder immunkompetenter Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten (Strasser et al., 2000). Apoptotische Zellen zeigen ein anderes morphologisches und biochemisches Muster im Vergleich zu nekrotischen Zellen: Es kommt zur geordneten Spaltung wichtiger Strukturproteine und Reparaturenzyme, zur Kondensation von Nucleus und Zytoplasma, und zur raschen Reorganisation des Zytoskeletts (Nicholson, 1999), in deren Folge rasch sogenannte „apoptotic bodies“ entstehen. Die DNA wird geordnet fragmentiert und Plasmamembranveränderungen wie z.B. die Externalisation von Phosphatidylserin, die eine wichtige Rolle bei der über Makrophagen vermittelten Eliminierung apoptotischer Zellen spielt (Savill and Fadok, 2000), sind rasch nachzuweisen. In Abb. 1 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen des zeitlichen Ablaufs von Apoptose in Keratinozyten dargestellt. Die Zelle schrumpft regelrecht und die letztendlich entstehenden apoptotic bodies werden durch Phagozytose eliminiert. Es ist daher anders als bei der Nekrose nicht oder stark vermindert mit einer inflammatorischen Antwort des Gewebes zu rechnen (Chan et al., 2001).

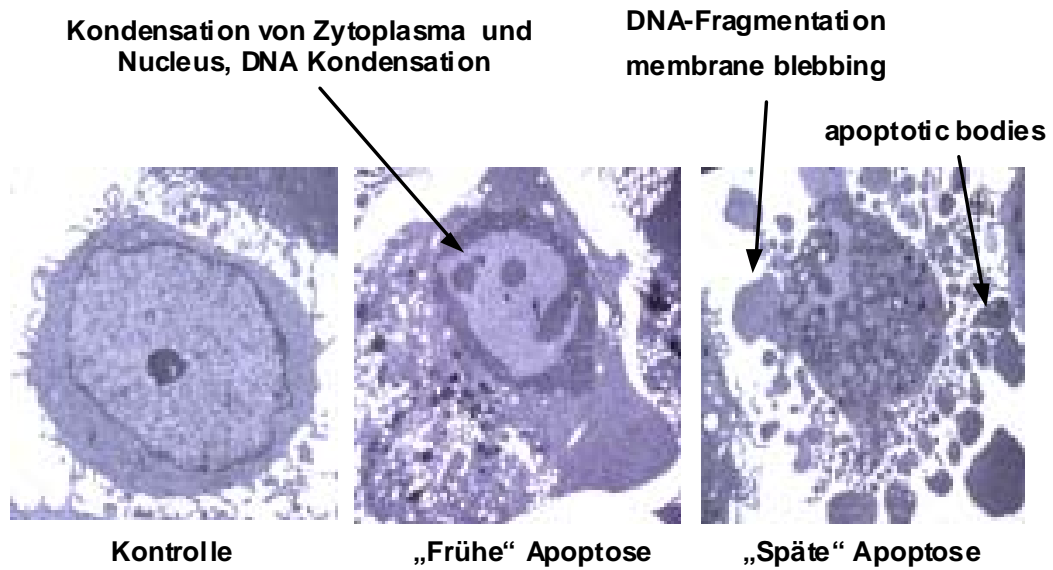


Abb. 1: HaCaT-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Auslösung von Apoptose. Im Gegensatz zur intakten Kontrollzelle zeigen frühe Apoptosestadien Kondensation und Marginalisierung der DNA sowie „membrane blebbing“. Apoptotic bodies sind zu einem späteren Zeitpunkt (rechts) erkennbar.

Bei der Apoptose spielt eine Familie von Proteasen eine wichtige Rolle, deren Mitglieder als inaktive Proenzyme intrazellulär präformiert vorliegen und beim programmierten Zelltod aktiviert werden. Diese Cysteinproteasen, die andere Proteine hinter Aspartatresten spalten („Cysteinyl-aspartate-specific proteases“) werden heute als Caspasen bezeichnet (Alnemri et al., 1996). Die an der Apoptose beteiligten Caspasen teilt man in Initiator- und Effektorcaspasen ein, wobei die Effektorcaspasen für die Durchführung des Apoptose zuständig sind und die Kondensation von Zytoplasma und Nucleus, Fragmentation der DNA, Inaktivierung von Reparaturenzymen und letztendlich Entstehung der “apoptotic bodies” initiieren. Dagegen setzen die Initiatorcaspasen die apoptotische Kaskade in Gang, ähnlich wie z.B. Faktor XII im intrinsischen oder Faktor VII im extrinsischen System der Blutgerinnung.

Apoptose kann durch sehr unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden. Dazu gehören z.B. sogenannte Todesliganden, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und über eine Signalkaskade Apoptose induzieren. Solche Faktoren sind z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder TRAIL (**T**NF α -**R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand). Beide wirken zytotoxisch auf eine Reihe von Tumorzelllinien, aber nicht auf normale Zellen. Ein weiterer Todesligand ist CD95-Ligand (nach dem Oberflächenmarker = **C**luster of **D**ifferentiation 95 benannt) (Walczak and Kramer, 2000). Die Bindung des CD95-Ligand oder anderer Liganden der TNF-Familie (z.B. TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)) an ihre entsprechenden Rezeptoren (CD95/APO-1/FAS, TRAIL-R1, TRAIL-R2) führt zur Trimerisation der Rezeptoren. Dies hat die Rekrutierung von Adapterproteinen an deren zytoplasmatischer Domäne zur Folge (Bildung des sogenannten DISC („**d**eath **i**nducing **s**ignaling **c**omplex“)). Über diesen wird die inaktive Initiatorcaspase 8 aktiviert (Walczak *et al.*, 2000; Walczak and Sprick, 2001). Auch Glukokortikoide, ein Entzug von Wachstumsfaktoren oder UV-Strahlung können programmierten Zelltod auslösen. Diese Stimuli setzen auf initial unterschiedlichen und nur z.T. verstandenen Wegen eine eng regulierte Signalkaskade in Gang, bei der u.a. das Mitochondrium beteiligt ist.

Wie bereits angedeutet kommt bei der Regulation von Apoptose den Mitochondrien eine wichtige Funktion zu: So kommt es beim programmierten Zelltod zur Änderung der Permeabilität der mitochondrialen Membranen, was sowohl die innere (IMM) als auch die äussere (OMM) mitochondriale Membran betreffen kann. Verschiedene Proteasen und Caspaseaktivatoren, die sich im intermembranösen Raum des Mitochondriums befinden, werden dann durch die äussere mitochondriale Membran freigesetzt (Gellerich *et al.*, 2000). Dazu zählen

z.B. inaktive Procaspasen, Smac/Diablo (ein Koaktivator von Caspasen) (Du et al., 2000), Apoptosis Inducing Factor (AIF) (Susin et al., 1999), Endonuklease G (Li et al., 2001), HtrA2/Omi (Silke et al., 2002;Verhagen et al., 2002) und Zytochrom c (ein Caspaseaktivator) (Desagher and Martinou, 2000). Zytochrom c transportiert normalerweise Elektronen zwischen Proteinkomplexen der Atmungskette. Einmal ins Zytosol freigesetzt, bildet es zusammen mit Apaf 1 (apoptotic protease activating factor 1), ATP und Procaspase 9 einen Komplex, den man als Apoptosom bezeichnet (Desagher *et al.*, 2000;Cain et al., 2002). Procaspase 9 wird dadurch in die aktive Form überführt und aktiviert dann andere Caspasen. Zudem ist in vielen apoptotischen Zellen eine Erhöhung der Permeabilität der IMM beschrieben (Crompton, 1999): Dies führt zur Entkopplung der Atmungskette und zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran, dem sogenannten Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ (Zamzami and Kroemer, 2001). Ob nun der Verlust von $\Delta\psi_m$ mit der Permeabilisierung der OMM in Zusammenhang steht oder beides voneinander unabhängige Ereignisse sind, die bei der Apoptose auftreten, ist Gegenstand intensiver Diskussionen (Martinou and Green, 2001;Zamzami *et al.*, 2001). Zusammenfassend ergibt sich folgendes vereinfachtes Modell für den Ablauf von Apoptose:

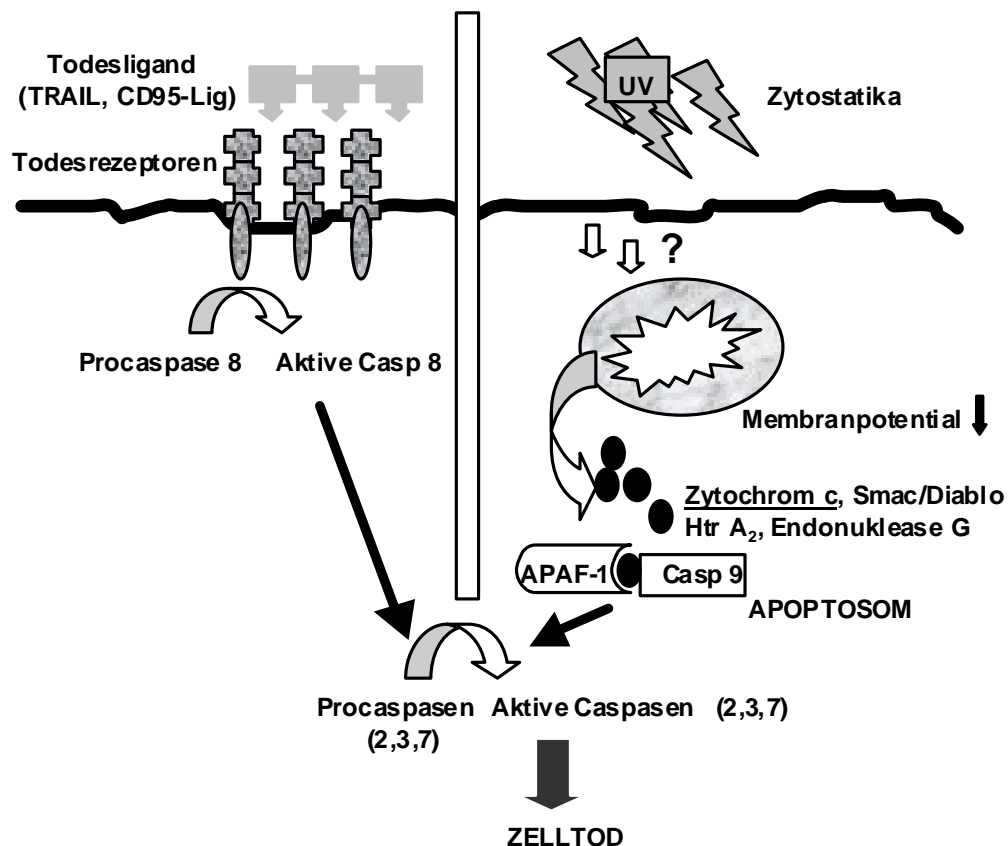


Abb. 2: Modell zur Auslösung und zum Ablauf von Apoptose, modifiziert nach Roy und Nicholson (Roy and Nicholson, 2000). Links ist der Mitochondrien-unabhängige Weg dargestellt, über den Todesligand-vermittelte Apoptose abläuft. Der Ligand bindet an einen Todesrezeptor auf der Zelloberfläche, der daraufhin über eine intrazelluläre Domäne die Initiatorcaspase 8 aktiviert. Beim Mitochondrien-abhängigen Weg (rechte Bildhälfte), über den programmierter Zelltod nach Noxen wie UV-Strahlung oder Zytostatika läuft, werden nach einer prämitochondrialen Phase (weitgehend unerforscht) Proteine wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt und das mitochondriale Transmembranpotential geht verloren. Postmitochondrial bildet Cytochrom c zusammen mit APAF-1 und Caspase 9 das Apoptosom. Beide dargestellten Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke: Effektorcaspasen werden durch Spaltung aktiviert und führen schließlich irreversibel zu Zelltod.

2. Pathophysiologie der Apoptose

Seit der Begriff der Apoptose (griech. herabfallen, wie geschrumpfte, gedörrte Blätter vom Baum) 1972 von Kerr, Currie und Wyllie erstmals formuliert wurde, hat die Erforschung der daran beteiligten Faktoren und der physiologischen

Bedeutung des programmierten Zelltods eine immer grösser werdende Aufmerksamkeit erfahren (Kerr et al., 1972).

Ein Beispiel für den inadäquaten Untergang funktionell erforderlicher Zellen durch Apoptose stellen neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. Morbus (M.) Parkinson, M. Alzheimer, amyotrophe Lateralsklerose und Chorea Huntington dar (Hajimohamadreza and Treherne, 1997;Offen et al., 2000). Bei HIV-Infektion führt die verstärkte Eliminierung von T-Zellen durch Apoptose zur klinischen Symptomatik der Immunschwäche (Dockrell, 2001). Auch beim Diabetes mellitus Typ I kommt es zur Apoptoseinduktion von B-Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas, so dass nicht mehr in ausreichender Menge Insulin produziert werden kann (Hayashi and Faustman, 2001). Ebenso sind aplastische Anämien oder die Ausbildung einer hepatitischen Leberzirrhose als Folge gesteigerter Apoptose erklärt worden (Callera and Falcao, 1997;Pianko et al., 2000). Dermatologische Erkrankungen, deren Ursache vermehrter programmierter Zelltod darstellt, sind u.a. die toxische epidermale Nekrolyse (TEN, Lyell-Syndrom) (Paquet et al., 2001), „Graft versus Host Disease“ (GvHD) (French and Tschopp, 2000) oder das Erythema multiforme (Chrysomali et al., 1997). Eine gesteigerte Apoptose kann die Folge einer erhöhten Bildung Apoptose-induzierender Mediatoren, der vermehrten Expression von Rezeptoren, an die Todesliganden binden oder die Folge einer Rezeptor-unabhängigen Aktivierung des Apoptoseprogramms sein. Als Ursachen dafür kommen z.B. Ischämie, Toxine, genetische Defekte, Bestrahlung, Infektionen oder Autoimmunerkrankungen in Betracht (Wang and Lenardo, 1997;Beutler and Bazzoni, 1998;Snider et al., 1999;van der Werff ten Bosch et al., 2001;Voss et al., 2001).

Im Gegensatz zu einem “Zuviel” an Apoptose kann auch eine verminderte Apoptose zur Ausbildung pathologischer Prozesse führen. Fehlende Apoptose virusbefallener Zellen kann persistierende Infektionen zur Folge haben, ein Beispiel hierfür ist die chronische Hepatitis B (Pan et al., 2001). Ausserdem können Zellen, die sich der Apoptose entziehen, zu Tumorzellen weiterentwickeln. Daher ist heute klar, dass fehlende Apoptose eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielt (Thompson, 1995). So können z.B. entweder angeborene oder erworbene Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 zu UV-induziertem Hautkrebs prädisponieren (Hussain et al., 2001). Weiterhin kommen einige Autoimmunerkrankungen durch ungenügende Eliminierung immunkompetenter Zellen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten, zustande (Hackett and Dickler, 1999).

3. Apoptoseregulation: Mitochondriale Signalwege und die Rolle von Proteinen der Bcl-2-Familie

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Molekülen beschrieben worden, die den Ablauf von Apoptose regulieren können. Dabei sind sowohl antiapoptotisch als auch proapoptotisch wirkende Proteine identifiziert worden. Bereits 1987 wurde das Protein Bcl-2 von Korsmeyer in B-Zell-Lymphomen (**B** cell lymphoma) beschrieben (Korsmeyer, 1987). Nach einer Translokation zwischen den Chromosomen 14 und 18 $t(14;18)$ wird es in diesen Lymphomen überexprimiert. Weitere Studien zeigten, dass Bcl-2 vor Apoptose schützen kann (McDonnell et al., 1990). Daher bezeichnet man Bcl-2 auch als Protoonkogen, denn z.B. nach DNA-Schäden können Bcl-2-überexprimierende Zellen vermehrt überleben und Ursache eines malignen Tumors werden. Untersuchungen ergaben,

dass Bcl-2 u.a. bei der Entstehung von Tumoren wie nasopharyngealen Karzinomen (Li et al., 2000), beim Endometrium Karzinom (Sheng et al., 1998), bei kolorektalen Karzinomen (Li et al., 1998b) eine Rolle spielen könnte. Auch in einigen Hauttumoren fand man eine Überexpression von Bcl-2, so z.B. im Basalzellkarzinom (Delehedde et al., 1999) oder im selteneren Merkelzell-Karzinom (Moll et al., 1996). Während Bcl-2 in malignen Melanomzellen im Vergleich zu primären Melanozyten geringer exprimiert wird (Saenz-Santamaria et al., 1994), scheint eine vermehrte Bcl-2-Expression in Metastasen des malignen Melanoms mit einem erhöhten malignen Potential einherzugehen (Leiter et al., 2000). Physiologisch ist Bcl-2 in post-mitotischen Zellen (z.B. Neuronen) (Middleton et al., 1998) oder in sich selbst erneuernden Geweben (z.B. hämatopoetische Stammzellen, Basalzellschicht der Epidermis) hoch exprimiert (Morales-Ducret et al., 1995).

Ausgehend von Bcl-2 wurden zahlreiche strukturhomologe Proteine, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkung haben, identifiziert. Die Strukturhomologien mit Bcl-2 werden als BH-Domains (**B**cl **H**omology-Domains) bezeichnet. Jedes Protein der Bcl-2-Familie enthält bis zu vier der BH1-BH4 benannten Domänen. Diese Domänen sind an der Homo- und Heterodimerisierung der Bcl-2-Proteine beteiligt. BH1- und BH2-Domänen sind in Todes-Antagonisten vorhanden, während BH3-Domänen in Todesagonisten vorhanden sind. Die meisten antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L bestehen aus allen vier Domänen. Dagegen haben die Proteine der Unterfamilie der „BH3-only-group“ nur eine BH3-Domäne und wirken sämtlich proapoptotisch (Huang et al., 2000). Bcl-2 wirkt hauptsächlich am Mitochondrium und endoplasmatischen Retikulum (Zamzami et al., 1998). Die

genauen Wirkungsmechanismen und Interaktionen der einzelnen Proteine aus der Bcl-2 Familie und ihr Einfluss auf den programmierten Zelltod sind Gegenstand intensiver Forschung.

4. UV-Bestrahlung: Karzinogen und Therapeutikum

UV-Strahlung ist einerseits essentiell für das Leben auf der Erde, andererseits kann UV-Strahlung genotoxische Schäden verursachen und so z.B. Hauttumoren induzieren (de Gruijl, 1999). Man teilt das Spektrum der UV-Strahlung in drei Bereiche ein: Wellenlängen unter 290 nm werden als UVC bezeichnet. UVC besitzt weniger Bedeutung für den Menschen, da es von der Ozonschicht komplett absorbiert wird. Weiterhin unterteilt man in UVB- (290-320 nm) und UVA-Strahlung (320-400 nm). Der Energiegehalt der Strahlung nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab, während die Eindringtiefe in die Haut mit grösserer Wellenlänge höher wird. Das bedeutet, dass UVA bis in die Dermis eindringen kann, während UVB in der Epidermis komplett absorbiert wird. UV-Bestrahlung verursacht eine Reihe nützlicher und schädlicher biologischer Reaktionen in der Haut. Während kleine Mengen UVB z.B. für die Vitamin D-Synthese notwendig sind, verursachen höhere Dosen, abhängig vom jeweiligen Hauttyp, Sonnenbrand (Garsen and van Loveren, 2001). Die minimale Erythem-Dosis (MED) liegt beim Mitteleuropäer bei etwa 40 mJ/cm² für UVB (Rigel et al., 2003). Sonnenbrand stellt eine Entzündungsreaktion der Haut dar (Clydesdale et al., 2001). Die Freisetzung von Zytokinen v.a. IL-10, TNF α und Prostaglandin E2 spielt hierbei eine wesentliche Rolle (Simon et al., 1994;Filipe et al., 1995;Farkas et al., 2002). Sowohl UVB als auch UVA tragen zur Hautalterung bei, wobei u.a. eine Elastose der Dermis charakteristisch ist. UVA kann im Stratum reticulare die

Kollagenaseproduktion induzieren (Scharffetter et al., 1991). Die Entstehung von malignen Hauttumoren ist v.a. auf die Effekte der UVB-Strahlung zurückzuführen, obwohl UVA insbesondere beim malignen Melanom beteiligt zu sein scheint (Wang et al., 2001; Zhang and Rosdahl, 2003). Ursächlich hierfür sind v.a. Mutationen in Genen, die Proteine kodieren, welche für die Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und Apoptose wichtig sind (de Gruijl et al., 2001). Zusätzlich können UVB- und UVA-Licht auch zur Immunsuppression führen (Schwarz, 2002; Ullrich, 2002; Aragane et al., 2003). Man nimmt an, dass die immunmodulatorische Wirkung von UVB auch zur Karzinogenese beiträgt (Hart et al., 2001).

Sowohl UVB- als auch UVA-Bestrahlung werden in der Dermatologie therapeutisch eingesetzt. Die Kombination von 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und UVA-Licht (Photochemotherapie), die sogenannte PUVA-Therapie (**P**sorale + **U****V****A**), ist eine häufig angewandte, wirksame Therapie für eine Reihe von Hauterkrankungen z.B. Psoriasis oder T-Zell-Lymphome. Sie wurde erstmals Mitte der 70er Jahre zur Behandlung von Psoriasis und Mycosis fungoides eingesetzt (Parrish et al., 1974). PUVA eliminiert hyperproliferative Zellen in der Epidermis, aber der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht erforscht. Arbeiten der letzten Jahre konnten nachweisen, dass PUVA auch in der Lage ist, spezifisch Apoptose in den die Haut infiltrierenden Lymphozyten auszulösen, womit ein Teil der klinischen Wirksamkeit erklärt wird (Krutmann, 2000). Bekannt ist, dass das photosensibilisierende Psoralen sich unter Einwirkung von UVA-Licht mit der DNS der Epidermalzellen zu Photoaddukten mit Quervernetzung des Doppelstrangs verbindet; diese Quervernetzung macht eine Zellteilung unmöglich (Tokura et al., 1991). Zusätzlich weiss man aus Tierstudien, dass PUVA seine

Wirkung über die Supprimierung inflammatorischer Reaktionen und durch Immunmodulation entfaltet (Kripke et al., 1983).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Verwendete Zellen

Die Versuche wurden mit HaCaT-Zellen (Boukamp et al., 1988), einer Linie spontan immortalisierter humaner Keratinozyten durchgeführt (siehe II.2.1.1.).

Davon abgeleitet verwendeten wir Bcl-2 transfizierte HaCaT-Zellen und Kontrollzellen (Pincelli et al., 1997). Die Kontrollzellen wurden ebenfalls mit dem Bcl-2 Expressionsvektor transfiziert, exprimieren aber kein Bcl-2.

Desweiteren stellten wir Zellkulturen aus primären Keratinozyten (neonatale Vorhäute aus dem US Army Hospital, Würzburg) her, um festzustellen, ob die in HaCaT-Zellen gewonnenen Ergebnisse auf normale, nicht immortalisierte Keratinozyten übertragbar sind.

1.2. Laborgeräte

| | |
|----------------------|--|
| Sterile Werkbank: | UniFlow UVUB 2200, BioFlow, Meckenheim |
| Zentrifugen: | <ul style="list-style-type: none">• Biofuge fresco, Heraeus, Hanau• Appligene, Illkirch• Megafuge 1,0R, Heraeus, Hanau |
| Inkubator: | CO ₂ -Auto-Zero, Heraeus, Hanau |
| Wasserbad: | Typ 1002, GFL, Burgwedel |
| Thermostat: | Test Tube Thermostat TCR 100, Roth |
| Mikroskop: | Labovert, Leitz, Bensheim |
| Neubauer-Zählkammer: | Heiland Fachversand, Hamburg |
| Pipettboy: | Falcon Express, Becton Dickinson |
| Waage: | Scout SCA210, Florham Park , N.J. |
| FACScan-Gerät: | Becton Dickinson, Hannover |
| UVB-Lampe: | UV 800, Waldmann GmbH |

| | |
|--|--|
| UVA-Lampe: | PUVA 800, Waldmann GmbH |
| Western-Blot Elektrophorese-Geräte, Kammern + Zubehör: | BioRad, CA 94547/USA |
| Hypercassette Intensifying Screen | Amersham, Buckinghamshire/England |
| Pipetten: | 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl Eppendorf |

1.3. Verbrauchsgegenstände

Becton Dickinson:

| | |
|-------------|---|
| Falcon 3003 | Gewebekulturschalen 100x20mm |
| Falcon 3004 | Gewebekulturschalen 60x10mm |
| Falcon 3001 | Gewebekulturschalen 35x10mm |
| Falcon 3047 | Gewebekulturplatte, 24 Vertiefungen, Polystyrol |
| Falcon 3072 | Gewebekulturplatte, 96 Vertiefungen, Polystyrol |
| Falcon 2096 | Polypropylen-Reagenzglas, 15ml |
| Falcon 2095 | Polystyren-Reagenzglas, 15ml |
| Falcon 2070 | Polypropylen-Reagenzröhrchen, 50ml |
| Falcon 3014 | Zellkulturflaschen 25cm ² /50ml |
| Falcon 3024 | Zellkulturflaschen 75cm ² /250ml |

Hartenstein, Würzburg:

| |
|--|
| Reaktionsgefäße 1,5ml RK1M |
| Reaktionsgefäße 0,7ml RK07 |
| Mikrotiter-Röhrchen (FACS-Röhrchen) MT96 |
| Pipettenspitzen |

Amersham:

| |
|---|
| Hybond ECL Nitrocellulose membrane RPN68D |
| Hyperfilm ECL RPN3103K |

BioRad:

| |
|-----------------------------------|
| GelAir Cellophane Support 1651779 |
|-----------------------------------|

1.4. Allgemeine Medien und Reagentien

| FIRMA | PRODUKT | KAT.-NR. |
|-------------------------------------|---|------------|
| PAN Biotech GmbH, Aidenbach/D | DMEM (4,5g/l Glucose, L-Glutamine, 3,7g/l NaHCO ₃ , Pyruvat) | P04-03590 |
| | Penicillin/Streptomycin (10000U Pen/10mg Strep) | P06-07100 |
| | Trypsin/EDTA 10x (0,5/0,2%) | P10-024100 |
| | Amphotericin B 250µg/ml | P06-01050 |
| PAALabs GmbH,Linz/A | FCS (fötale Kälberserum), Inaktivierung bei 56° für 30min im Wasserbad | A15-043 |
| Gibco BRL, Paisley/Scotl. | PBS Dulbecco´s | 14190-094 |
| Sigma, St. Louis/USA | FCS (für Keratinozyten) | F-7524 |
| | DMSO | D-2650 |
| | NaCl | S-7653 |
| | MgCl ₂ | M-2670 |
| | CaCl ₂ | C-5080 |
| | Ponceau S Concentrate | P-7767 |
| | 2-Mercaptoethanol | M-7522 |
| | APS (Ammonium Persulfate) (Endkonz. 10%, d.h. 0,1g auf 1ml H ₂ O) | A-9164 |
| | Lauryl Sulfat (Sodium dodecyl sulfate) (10% Lösung in H ₂ O) | L-4509 |
| | Sodium citrate | S-4641 |
| | Triton X-100 | T-9284 |
| | Sucrose | S-7903 |

| | | |
|--|---|---------|
| ICN Biochemicals InC, Aurora/Ohio | Geneticin G418 (1g lösen in 20ml H ₂ O, d.h. Stammlösung 50mg/ml, Endkonzentration (im Kulturmedium) 400µg/ml) | 158782 |
| | Hepes Puffer | 1688449 |

| | | |
|--|--|--------------|
| Merck, Darmstadt | Kristallviolett | 1408 |
| | Glycin p.a. | 1.04201.1000 |
| | Phosphorsäure H ₃ PO ₄ | 100573 |
| | Tween 20 | 8.22184.0500 |
| Serva, Heidelberg | EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid Na ₂ -Salt) (Stammlösung 50mM, Endkonzentration 2mM in PBS) | 11280 |
| Carl Roth GmbH, Karlsruhe | TRIS Puffer p.a. | 4855.2 |
| | Essigsäure Rotipuran 100% p.a. | 3738.1 |
| BioRad Hercules/CA | Coomassie Brilliant Blue R-250 | 161-0400 |
| | Coomassie Brilliant Blue G-250 | 161-0406 |
| | TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine) | 161-0800 |
| | 30% Acrylamide/Bis Solution 29:1 | 161-0156 |
| Amersham Biotech, Buckinghamshire/England | ECL Western blotting detection reagents (zu gleichen Teilen Lösung 1 und Lösung 2 mischen) | RPN 2106 |
| | Rainbow Marker | RPN 755 |
| Sigma-Aldrich Dorset/UK | Glycerol A.C.S. Reagent | 32,000-5 |
| Fluka Chemie Buchs/CH | Digitonin (Endkonzentration 15mg/ml) | 37006 |
| Boehringer, Mannheim | Complete Protease Inhibitor 20Tbl. (1 Tbl in 2ml H ₂ O lösen) | 1 697 498 |
| | Cell Death Detection ELISA | 1 774 425 |
| J.T.Baker, Deventer/NL | Methanol | 8045 |

| | | |
|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| Saliter, Obergünzburg | Magermilchpulver Instant | |
| | LZ-TRAIL, LZ-CD95 Ligand | (Walczak et al., 1997) |

| | | |
|----------------------------|---|---------|
| Galderma GmbH, Freiburg | 8-Methoxypsoralen (8-MOP) Meladinine Lösungskonzentrat 0,3% 1ml Lösung enthält 3mg 8-MOP (in 96% Ethanol) | |
| BioWitthaker, Walkersville | keratinocyte basal medium (KBM) | CC 3101 |
| | KGM singlequots enthalten: <ul style="list-style-type: none"> • Gentamycinsulfat 50µg/ml • Amphotericin B 7,5ng/ml • bovine pituitary extract 5µg/ml • Bovines Insulin 5mg/ml • human epidermal growth factor 0,1µg/ml • Hydrocortison 0,5mg/ml • 0,15mM Calcium (angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen, wenn singlequots zu 500ml KBM hinzugegeben) | CC 4131 |

1.5. Spezielle Medien und Reagentien

1.5.1. Zellkultur

| | |
|--------------------------------|---|
| HaCaT-Kulturmedium: | <ul style="list-style-type: none"> • DMEM 500ml • +10% FCS (PAA) d.h. 50ml • +1% Penicillin/Streptomycin |
| HaCaT-Gefriermedium: | <ul style="list-style-type: none"> • 60% FCS • 30% DMEM (ohne Zusatz) • 10% DMSO |
| Keratinocyten-Transportmedium: | <ul style="list-style-type: none"> • DMEM 250ml • +0,5% Penicillin/Streptomycin |

| | |
|------------------------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • +2% Amphotericin |
| Keratinocyten-Kulturmedium: | <ul style="list-style-type: none"> • Keratinocyten Basal Medium • +KGM singlequots (BioWitthaker) |
| Keratinocyten-Gefriermedium: | <ul style="list-style-type: none"> • 70% Keratinocyten-Kulturmedium • 20% FCS (Sigma) • 10% DMSO |
| Sucrose/Trypsin | <ul style="list-style-type: none"> • Sucrose 0,1g • Trypsin 0,25g • EDTA (50mM) 2ml • PBS ad 100ml |
| Kristallviolett Lösung | 0,5% Kristallviolett in 20% Methanol |

1.5.2. Farbstoffe und weitere Reagentien für FACS-Analyse

1.5.2.1. Farbstoffe für FACS-Analyse

| PRODUKT | FIRMA | KAT.-NR. |
|--|--|----------|
| DiOC ₆ (3) 3,3'-dihexyloxycarbocyaninjodid | Molecular Probes | D-273 |
| PI Propidiumjodid | Sigma | P-4170 |
| TMRE Tetramethylrhodaminethylesterperchlorat | Molecular Probes | T-669 |
| DHR Dihydrorhodamin 125 | Molecular Probes | D-632 |
| Annexin | FITC Annexin V, fluorescein conjugate, Sigma | A-9120 |

1.5.2.2. Weitere Reagentien für FACS-Analyse

| LÖSUNG | ZUSAMMENSETZUNG |
|-----------------------|---|
| 5x Annexin-Puffer | <ul style="list-style-type: none"> • 50mM Hepes Puffer mit NaOH auf pH 7,4 einstellen • 700 mM NaCl • 12,5 mM CaCl₂ |
| Nicoletti-Färbelösung | <ul style="list-style-type: none"> • 2,5ml 20xSodiumzitat/Triton Stammlösung (wobei 2g Sodiumzitat auf 98ml H₂O + 2ml Triton X-100) • 2,5ml 20x Propidiumjodid Stammlösung (1mg/ml) • 45ml H₂O |

| | | |
|---------------------|--|--------------------------------|
| TRAIL-R1 Antikörper | clone M 271, Immunex Corp., Seattle, WA | IgG 2a (Griffith et al., 1999) |
| TRAIL-R2 Antikörper | clone M 413 - “ - | IgG 1 |
| TRAIL-R3 Antikörper | clone M 430 - “ - | IgG 1 |
| TRAIL-R4 Antikörper | clone M 444 - “ - | IgG 2a |
| CD95-Antikörper | Apo-1 | IgG 3κ (Trauth et al., 1989) |

1.5.3. Western Blot

1.5.3.1. Lösungen für Western Blot

| | |
|---------------------------|---|
| RIPA-Lysepuffer (10ml) | <ul style="list-style-type: none"> • TrisHCl pH 7,5 (1M) 2,5ml • NaCl (1,5M) 5ml + MgCl₂ 250µl • NaDOC (10% in H₂O) 2,5ml • Triton X-100 100µl + • Complete Protease Inhibitor 400µl |
|---------------------------|---|

| | |
|--|--|
| Digitonin-Lysepuffer (2ml) | <ul style="list-style-type: none"> • Sucrose (500mM) 1985µl • Digitonin (15mg/ml) 15µl <p>Digitonin im Reaktionsgefäß vor dem Hinzufügen 30 min bei 90° aufkochen</p> |
| Bradford-Lösung (2x) | <ul style="list-style-type: none"> • Coomassie Brilliant Blue G-250 50mg • Ethanol (95%) 25ml • H₃PO₄ 50ml • H₂O 375ml <p>vor Gebrauch 1:1 mit H₂O verdünnen</p> |
| 4x Gelpuffer | <ul style="list-style-type: none"> • Tris 16,95g • H₂O 90ml • Sodium dodecyl sulfate 10% 4ml <p>pH auf 8,8 anpassen, auf 100ml auffüllen mit H₂O</p> |
| 5x Gelpuffer | <ul style="list-style-type: none"> • 1M TrisHCl pH 6,8 25ml • H₂O 13ml • Sodium dodecyl sulfate 10% 2ml |
| 5x Ladepuffer | <ul style="list-style-type: none"> • 1M Tris Base pH 6,8 2,5ml • Sodium dodecyl sulfate 1g • 100% Glycerol 2,5ml • Bromophenol blue 50mg • H₂O 4ml <p>Aliquot 900µl + 100 µl β-Mercaptoethanol</p> |
| Coomassie Blau Lösung (Gelfärbelösung) | <ul style="list-style-type: none"> • Coomassie Brilliant Blue R-250 0,5g • Methanol 200ml • Essigsäure 50ml • H₂O 250ml |
| Gelwaschlösung | <ul style="list-style-type: none"> • Methanol 200ml • Essigsäure 50ml • H₂O 250ml • Glycerol 4ml |

| | |
|----------------------------|---|
| 5x Laufpuffer (für 1l) | <ul style="list-style-type: none"> • Tris 15,175g • Glycin 72g • Sodium dodecyl sulfate 10% 50ml <p>Für 1x Laufpuffer 1:5 mit dest. H₂O verdünnen</p> |
| 5x Transferpuffer (für 1l) | <ul style="list-style-type: none"> • Tris 15,175g • Glycin 72g <p>Für 1l 1x Transferpuffer: zu 200ml 5x Transferpuffer-Stammlösung 200ml 20%iges Methanol und 600ml dest. H₂O hinzufügen</p> |
| Tween/PBS | <p>0,1% = 1 ml Tween auf 1000 ml PBS</p> <p>0,3% = 3 ml Tween auf 1000 ml PBS</p> |

1.5.3.2. Primärantikörper für Western Blot-Untersuchungen

| ANTI-KÖRPER | FIRMA | KAT.-NR. | SEK.-AK. |
|----------------------------|---|----------|--------------|
| Anti-Bcl-2 | Mouse anti Human (MaH), Pharmingen | 14831A | GaM |
| Anti-Caspase 2 | MaH IgG 1, Transduction Labs (Becton Dickinson) | I75620 | GaM IgG1 |
| Anti-Caspase 3/ CPP32 | Rabbit anti Human (RaH) , Nicholson, Merck Frosst Corp., Quebec, Canada | | DaR |
| Anti-Caspase 7 | | | DaR |
| Anti-Caspase 8 (C – 15) | MaH, (Medema et al., 1997) | | GaM IgG2b |
| Anti-Caspase 10 | MaH IgG 1, MBL/Nagoya, Japan | M059-3 | GaM IgG1 |
| Anti-BID | RaH, (Luo et al., 1998) | | DaR |
| Anti-Zytochrom c | Anti-Cytochrome c Antibody, Pharmingen | 65971A | GaM IgG2b |

| | | | |
|-----------------------------|---|-------|-------------|
| Anti-Zytochrom c-Oxidase | Complex IV Subunit II IgG 2 α , κ , Molecular Probes | A6404 | GaM IgG1 |
| Anti-Tubulin | Anti β -Tubulin Clone Tub 2.1 mouse ascites fluid, Sigma | T4026 | GaM IgG1 |

1.5.3.3. Sekundärantikörper für WesternBlot-Untersuchungen

| ANTIKÖRPER | FIRMA | KAT.-NR. |
|---------------------------------|---|-----------------|
| GaM (goat anti mouse) IgG 2b | Southern Biotechnology Associates, InC, Birmingham | 1090-05 |
| GaM IgG 1 | Southern Biotechnology Associates, InC, Birmingham | 1070-05 |
| DaR (donkey anti rabbit) | Jackson ImmunoResearch Labs, InC | 711-035-152 |

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. HaCaT-Zellkultur

HaCaT-Zellen sind spontan immortalisierte humane Keratinozyten (Boukamp *et al.*, 1988). Sie werden bei 37°C in DMEM in Kultur gehalten. Die Abkürzung HaCaT steht für H=human, a=adult keratinocytes, Ca=Ca²⁺ 0,2 mM, T=Temperature 37°C. Bei der HaCaT Bcl-2 hochexprimierenden Zelllinie (HaCaT Bcl-2, in Abbildungen mit „Bcl-2“ bezeichnet) handelt es sich um HaCaT-Zellen die mit Bcl-2 transfiziert sind. Als Kontrollzellen verwendeten wir HaCaT, die ebenfalls mit dem Bcl-2 Expressionvektor transfiziert wurden, aber kein Bcl-2 exprimieren (HaCaT Vektor, in Abbildungen mit „Vektor“ bezeichnet) (Pincelli *et al.*, 1997). Von dem Expressionsvektor wird auch ein Geneticin-Resistenz-Gen exprimiert. Die beiden Zelllinien werden in DMEM-Medium gehalten, das in einer Konzentration von 400 µg/ml Geneticin (G418) enthält. So werden Zellen, die den Vektor und damit das Resistenzgen nicht enthalten oder verlieren, eliminiert. Die eingefrorenen HaCaT-Zellen werden durch zügiges Auf- und Abpipettieren mit 37°C warmem DMEM-Medium (10 ml) aufgetaut. Nach Zentrifugieren über 5 min bei 1000 rpm saugt man den Überstand ab und wäscht die Zellen einmal mit 37°C warmem Medium, um das für die Zellen toxische Gefriermedium zu entfernen. Nach dem Waschen wird nochmals zentrifugiert und die HaCaT-Zellen dann relativ dicht in eine T75-Kulturflasche eingesetzt. Man sollte möglichst am folgenden Tag das Medium erneuern. Nach etwa einer Woche wird die Konfluenz erreicht.

Die HaCaT-Zellen sollen passagiert werden, wenn 100% Konfluenz erreicht wird (Boukamp *et al.*, 1988). Pro T75-Kulturflasche werden benötigt: 20 ml PBS,

10 ml 2 mM EDTA, 10 ml Trypsin/EDTA und DMEM-Medium. Man erwärmt diese Reagenzien auf 37°C. Die Zellen werden nun zweimalig mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 10 ml EDTA wird die Kulturflasche 10 min in den Brutschrank gestellt. Anschliessend wird das EDTA abgesaugt, 10 ml Trypsin/EDTA zugegeben und für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen sollten möglichst kurze Zeit in Trypsin sein, da das Enzym die Zellen sonst zu stark schädigt. Um noch bestehende Zellverbände aufzubrechen, pipettiert man einige Male auf und ab und setzt die Zellen anschliessend in neue Kulturflaschen oder Kulturschalen mit DMEM-Medium im Verdünnungsverhältnis 1:5 bis 1:100 je nach gewünschter Dichte ein.

Um jeweils vergleichbare Mengen an Zellen einzusetzen, wird die Zellzahl zuvor in einer Neubauerzählkammer ermittelt. Dazu gibt man 40 µl Zellsuspension in die Kammer und 10 µl TrypanBlau hinzu um vitale von toten Zellen (nehmen Trypan-Blau auf) unterscheiden zu können. Dann werden alle vier großen Quadrate der Neubauerkammer ausgezählt, die erhaltenen Zellzahlen durch 4 dividiert und mit dem Faktor 10 000 multipliziert, um die Anzahl an Zellen pro ml zu erhalten.

Will man HaCaT für spätere Versuche einfrieren, so stellt man zunächst das Gefriermedium (siehe II.1.5.1) her und kühlt es auf Eis. Man benötigt pro T75-Kulturflasche 10 ml Gefriermedium. Nun werden die Zellen abgelöst und zusammen mit 4 ml FCS in ein Reaktionsröhrchen überführt. Nach Absaugen des Überstandes resuspendiert man die Zellen im Gefriermedium, aliquotiert diese 10,8 ml zu je 1,8 ml in die Gefrier Röhrchen und friert sie so rasch wie möglich

über 24 h bei -80°C ein, bevor sie zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff (-140°C) eingefroren werden.

2.1.2. Isolation und Passagierung primärer Keratinozyten

Die Keratinozyten werden aus neonataler Vorhaut, die vom American Hospital Würzburg nach Zirkumzision von Neugeborenen zur Verfügung gestellt wird, gewonnen. Die Vorhaut wird bis zur Verarbeitung in 20 ml Transportmedium (siehe II.1.5.1.) bei 4°C aufbewahrt. Sie sollte möglichst nicht länger als 24 h aufbewahrt werden, da sonst die Zellausbeute sinkt.

Zunächst wird eine Sucrose/Trypsin-Lösung (siehe II.1.5.1) hergestellt, die zum Aufbrechen von Zellverbänden dient und damit die Isolierung der Keratinozyten erleichtert. Pro Vorhaut werden 5ml dieser Sucrose/Trypsin-Lösung benötigt. Der Rest kann aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Die Vorhaut wird mit einer sterilen Pinzette aus dem Transportmedium herausgenommen und in mit jeweils 5 ml DMEM vorbereiteten Zellkulturschalen (p60) aufgenommen. Nun wird sie in 4 etwa gleich grosse Stücke geschnitten. Diese Teile werden in einer Zellkulturschale (p60) mit 5ml Sucrose/Trypsin bei 4°C für 12-16 h eingelegt. Die Dermis der Vorhaut sollte nach unten orientiert sein. Zur weiteren Präparation werden pro Vorhaut 20 ml KGM (siehe II 1.5.1), 3 ml Keratinozyten-FCS (siehe II.1.4), eine gebogene und eine gerade Pinzette gebraucht. Die für die Keratinozyten-Kultur vorgesehene T25-Kulturflasche benetzt man mit 1-2 ml FCS und stellt sie bis zum Einsetzen der Zellen in den Brutschrank. In einem 15 ml Reaktionsröhrchen bereitet man 1 ml FCS + 4 ml KGM vor. Die Vorhautstücke werden in eine Zellkulturschale mit 5 ml KGM überführt, die Epidermis sollte nach oben zeigen. Jedes Vorhaut-Stückchen wird mit der

geraden Pinzette fixiert, mit der gebogenen Pinzette wird die Epidermis abgestreift. Die Dermis wird aus der resultierenden Zellsuspension entfernt, grössere Epidermisanteile werden mit der Pinzette noch etwas zerkleinert. Man nimmt die Suspension mit der Pipette auf und resuspendiert zum Aufbrechen noch bestehender Zellverbände mehrmals. Die Zellsuspension wird in das vorbereitete 15 ml Reaktionsröhrchen überführt, die Kulturschale nochmals mit 3 ml KGM gewaschen und ebenso in das Reaktionsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (5' ohne Bremse bei 1000 rpm) wird der Zellpellet mit 5 ml KGM resuspendiert, in die vorbereitete T25 überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anfangs sollte täglich das Medium gewechselt werden, um die abschwimmenden toten Zellen zu entfernen. Nach 1-2 Wochen wird in der Primärkultur Konfluenz erreicht.

Keratinocyten sollten passagiert werden, bevor sie 100% Konfluenz erreichen, weil es sonst, im Gegensatz zu HaCaT-Zellen, zur terminalen Differenzierung der Zellen kommt. Wichtig bei der ersten Passage ist, die anderen Zellen der Primärkultur, v.a. Fibroblasten oder Melanozyten, aus der Kultur durch selektive Trypsinierung zu entfernen. In einem 50 ml Reaktionsröhrchen bereitet man 1 ml FCS+4 ml KGM vor. Nun wird das Medium aus der Kulturflasche abgenommen, mit PBS gewaschen und dann 4 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Die T25 (25 cm²) kommt für 2 min in den Brutschrank. Alle Zellen ausser Keratinocyten lösen sich rasch vom Boden ab. Sobald diese Zellen nach zusätzlichem mehrmaligem Klopfen gegen den Flaschenboden gelöst sind, nimmt man das Trypsin mit diesen Zellen ab und gibt erneut 4 ml Trypsin hinzu. Die verbleibenden Keratinocyten schwimmen nach ca. 6 min ab und werden in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Man spült die Flasche nochmals mit 5 ml KGM nach und zentrifugiert

5 min bei 1000 rpm. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen werden in 20 ml KGM resuspendiert und in 2 T75 (80 cm²) eingesetzt.

Der beste Zeitpunkt für die zweite Passagierung ist erreicht, wenn die Zellen zu 70% konfluent sind. Man nimmt das Medium ab, wäscht mit PBS und inkubiert für ca. 6 min in 10 ml Trypsin/EDTA. Wenn sich die Zellen gelöst haben (zusätzlich gegen Flaschenboden klopfen), überführt man analog zur ersten Passage die Suspension in ein mit 1 ml FCS und 4 ml KGM vorbereitetes 50 ml Reaktionsröhrchen und zentrifugiert. Aus einer T75 kann man 6 Gefrier Röhrchen a 1,8 ml einfrieren. Pro T75 bereitet man in einem 15 ml Reaktionsröhrchen 1,1 ml DMSO, 2,2 ml FCS und 2,2 ml KGM vor (Gefriermedium siehe II.1.5.1.) und gibt davon in jedes der 6 Gefrier Röhrchen 0,9 ml. Dann nimmt man das Zellpellet nach Zentrifugation in 5,4 ml KGM auf und pipettiert je 0,9 ml in die Gefrier Röhrchen. Die Keratinozyten werden für 2-12 h bei -80°C eingefroren und dann in den Stickstoffbehälter (-140°C) überführt.

2.2. Behandlung der Zellen

2.2.1. UV-Bestrahlung adhärenter Zellen

2.2.1.1. Geräte

Als Bestrahlungsquelle für die UVB-Bestrahlung dient uns die UVB-Lampe UV 800 (siehe II.1.2.). Sie strahlt UVB-Licht im Bereich von 285-350 nm mit einem Intensitätsmaximum bei 310-315 nm aus. Die UVA-Bestrahlungen führen wir mit dem Gerät PUVA 800 (siehe II.1.2) aus. Sie hat ein Strahlungsspektrum von 315-395 nm mit einem Maximum bei 355-365 nm. Die eingestrahlte UVB bzw UVA-Dosis (Dosisleistung) wird mit einem Dosimeter (Waldmann GmbH) ermittelt.

2.2.1.2. Dosisberechnung

Die Bestrahlungsintensität (Dosisleistung) ist vom Abstand zwischen Bestrahlungsquelle und Zellkulturschale abhängig. Die Dauer der Bestrahlung richtet sich bei konstant gehaltenem Abstand nach der gewünschten UVB bzw. UVA-Dosis. Für unsere Experimente haben wir den Abstand für UVB jeweils so eingestellt, dass auf die Zellen eine Dosisleistung W von 1 mW/cm^2 einstrahlt bzw. für die UVA-Bestrahlung eine Dosisleistung W von 5 mW/cm^2 . Die Formel zum Berechnen der Bestrahlungsdauer (s) lautet:

$$S = \frac{J \text{ (mJ/cm}^2\text{)}}{W \text{ (mW/cm}^2\text{)}}$$

wobei J = gewünschte Dosis, W = gemessene Dosisleistung

Daraus resultiert, dass z.B. für eine UVB-Dosis von 120 mJ/cm^2 die Bestrahlungszeit bei einer Dosisleistung von 1 mW/cm^2 120 s beträgt.

2.2.1.3. Vorbereitung der Zellen

Vor der Bestrahlung mit UVB wird aus den Zellkulturschalen das Medium abgenommen, einmal mit vorgewärmtem PBS gespült, und dann für die Bestrahlung soviel PBS zugegeben, dass die Zellen gerade bedeckt sind (d.h. 1 ml pro p60). Die Bestrahlung erfolgt mit Deckel auf der Zellkulturschale. Nach der Bestrahlung saugt man das PBS ab und fügt wieder Medium hinzu. Kontrollkulturen werden identisch behandelt, bei der Bestrahlung allerdings mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Zur PUVA-Bestrahlung (siehe I.4) werden die Zellen in PBS mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP) 15 min bei 37°C vorinkubiert und dann in dieser

Lösung bestrahlt. Hier erfolgt die Bestrahlung ohne Deckel. Für unsere Versuche verwendeten wir eine 8-MOP-Konzentration von 500 ng/ml, die ohne UVA-Bestrahlung nicht toxisch für die Zellen ist (Luftl et al., 1998). Bei der therapeutischen PUVA-Bestrahlung liegt bei der Bade-PUVA-Behandlung die 8-MOP-Konzentration in einem ähnlichen Grössenbereich (Tanew et al., 2001). Nach der Bestrahlung wird die 8-MOP-Lösung in PBS abgesaugt und wieder Medium hinzugegeben. Parallel wird jeweils eine UVA-bestrahlte Kontrolle ohne 8-MOP nur in PBS (UVA-Kontrolle), sowie eine unbestrahlte Kontrolle mit 8-MOP alleine (MOP-Kontrolle) bei jedem Experiment als interne Kontrolle mitgeführt.

2.2.2. Behandlung mit den Todesliganden TRAIL/CD95-Ligand

Die subkonfluent bewachsenen Kulturschalen werden 1 x in PBS gewaschen und dann mit der gewünschten Konzentration von rekombinantem LZ-TRAIL oder LZ-CD95-Ligand in Medium verdünnt stimuliert. Als Kontrolle dient jeweils eine Schale, in der nur frisches Medium zugesetzt wird. Anschliessend werden die Zellen bis zur Analyse bei 37°C inkubiert.

2.3. Durchflusszytometrie

Die Untersuchung von Zellen im **Fluorescence Activated Cell Sorter (FACScan)** erlaubt die quantitative und qualitative Erfassung von zellulären Charakteristika auf Einzelzellniveau innerhalb einer größeren Zellpopulation. Man erhält Informationen über die Zellgrösse (FSC), die Zellgranularität (SSC) und die Fluoreszenzintensität der an- oder eingelagerten Farbstoffe (FL1, FL2, FL3). Das Gerät verwendet einen Argon-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. Über ein System aus Linsen, Spiegeln und optischen Filtern wird die Differenzierung mehrerer Signale möglich. Das FACScan-Gerät erlaubt über FL1, FL2 und FL3, die bei verschiedenen Wellenlängen messen, die Detektierbarkeit von 3 verschiedenen Fluoreszenzbereichen: FL1 (530 +/- 15 nm, grüne Fluoreszenz), FL2 (585 +/- 42 nm, orange Fluoreszenz) und FL3 (> 650 nm, rote Fluoreszenz). Mit dieser Methodik können in kurzer Zeit verschiedene Parameter einzelner Zellen erfasst werden. Bei unseren Experimenten verwendeten wir für die Detektierung 3,3'-Dihexyloxycarbocyaninjodid (DiOC₆), Annexin und Dihydrorhodamin (DHR) die FL1, für Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) die FL2 und für Propidiumjodid (PI) die FL3.

2.3.1. DiOC₆/TMRE + PI-Färbung

In jeder intakten Zelle, so auch in Keratinozyten, besteht ein Transmembranpotential ($\Delta\psi_m$) über der inneren Mitochondrienmembran (Murphy and Brand, 1988). Polare Farbstoffe wie 3,3'-Dihexyloxycarbocyaninjodid (DiOC₆) oder Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) reichern sich an Mitochondrien mit intaktem Transmembranpotential an (Scaduto, Jr. and Grotyohann, 1999). Für diese Anreicherung ist notwendig, dass der

Protonengradient über der inneren Membran des Mitochondriums erhalten ist. Daher zeigen „gesunde“ Zellen eine Anfärbung mit diesen Farbstoffen, die auch im FACS erfasst werden kann. Apoptotische Zellen, deren $\Delta\psi_m$ abfällt, lassen sich nicht mehr von diesen Farbstoffen anfärben. Zur Doppelfärbung wird zur Unterscheidung vitaler und toter Zellen zusätzlich Propidiumjodid (PI) eingesetzt (siehe Abb. 3). Da PI nicht fähig ist, die intakte Zellmembran zu permeieren, bedeutet eine Anfärbung mit PI den Verlust der Membranintegrität und damit irreversiblen Zelltod (Hamel et al., 1996).

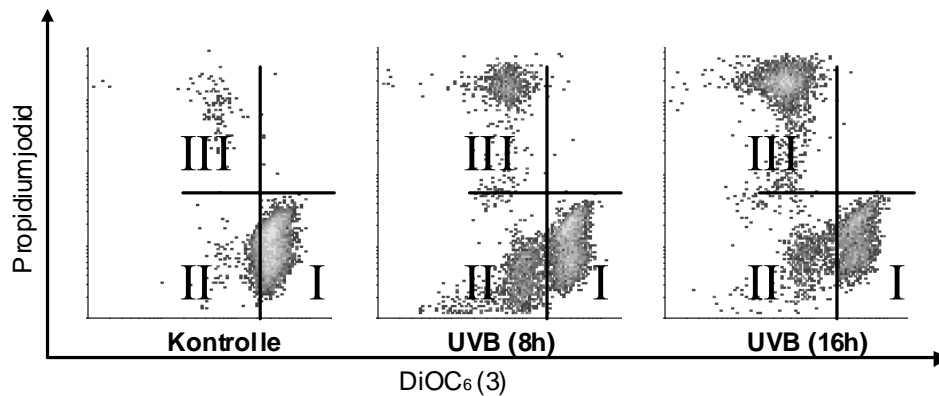


Abb. 3: DiOC₆/PI-Färbung. In einer durchflusszytometrischen Analyse sind DiOC₆/PI-gefärbte HaCaT-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung dargestellt. Die Kontrollzellen lassen sich gut mit DiOC₆ anfärben, die Mehrzahl befindet sich hier im Quadranten I (DiOC₆-positiv). Ihr mitochondriales Membranpotential ist intakt. 8 h nach UVB ist die Anzahl der Zellen im Quadranten I geringer, viele Zellen lassen sich nicht mehr mit DiOC₆ anfärben, sind aber auch noch nicht PI-positiv (Quadrant II). Sie haben ihr Transmembranpotential verloren, aber noch nicht ihre Zellintegrität. 16 h nach UVB befindet sich der grösste Teil der Zellen in Quadrant III (PI-positiv, DiOC₆-negativ), d.h. der irreversible Zelltod ist eingetreten.

Für diese Experimente werden die HaCaT-Zellen bei 30-40% Konfluenz in p60 bestrahlt (pro Schale ca. 200 000 Zellen). Nach dem gewünschten Zeitraum werden sowohl im Überstand schwimmende als auch adhärenente Zellen nach Trypsinierung 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, gezählt und zu je 100 000 Zellen in PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen. Man gibt dann DiOC₆ (80 nM; d.h.

Endkonzentration 460 ng/ml) bzw. TMRE (40 nM; d.h. Endkonzentration 200 ng/ml) hinzu, resuspendiert und inkubiert die Zellen 15 min bei 37°C im Brutschrank. Danach wird 5min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in ca. 200 µl PBS resuspendiert. Man stellt die FACS-Röhrchen nun auf Eis und pipettiert jeweils 20 µl PI (50 µg/ml) hinzu. Anschliessend werden die Proben möglichst sofort am FACScan-Gerät bei FL1 (für DiOC₆), FL2 (für TMRE) und FL3 (für PI) gemessen.

2.3.2. DHR-Färbung

Dihydrorhodamin 123 (DHR) kann zum Nachweis der Produktion reaktiver Oxygen-Species benutzt werden (Wei et al., 2000;Peus et al., 2001). DHR wird durch Radikale (ROS), v.a. durch Superoxid, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit (Wei *et al.*, 2000) zu einem fluoreszierenden Produkt oxidiert und kann so bei der FACS Analyse quantitativ erfasst werden. Die Zellen werden 1h vor Behandlung (UVB, PUVA) bei 37°C in 5 µM DHR, das man zuvor in Medium löst, vorinkubiert. Nach der Behandlung ist bereits nach wenigen Minuten die Generierung von ROS messbar. Für unsere Experimente haben wir die Zellen nach einer Inkubation von 30 min im Brutschrank bei 37°C abgelöst und im FACS analysiert.

2.3.3. Oberflächenfärbung von membrangebundenen Rezeptoren

Die Zellen werden von den Kulturschalen abgelöst (siehe II.2.1.1.) und in eiskaltem PBS mit 1% BSA (PBS/BSA) resuspendiert. Es werden 5 µg/ml monoklonaler Antikörper (TRAIL R1-R4 oder CD95-Antikörper) oder isotypisierter Kontroll-IgG hinzugegeben (Leverkus et al., 2000). Nach 30 minütiger Inkubation und anschließenden Waschschrinen werden FITC-gekoppelte Sekundär-Antikörper zugegeben. Anschliessend erfolgt die Analyse im FACScan.

2.4. Methoden zum Nachweis von Apoptose und Zelltod

2.4.1. Annexin-Färbung

Während des Ablaufs der Apoptose kommt es zu einem relativ frühen Zeitpunkt zu einer Änderung der Architektur der Plasmamembran der Zelle: Es findet eine Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Zellmembran nach aussen statt (Fadok et al., 1992). Diese Phosphatidylserinexposition kann man mit Hilfe von FITC-gekoppeltem Annexin V detektieren und stellt ein frühes Ereignis beim Ablauf der Apoptose dar (Martin et al., 1995). Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein (Andree et al., 1990). Das daran gebundene FITC, ein fluoreszierender Farbstoff, kann man im FACScan bei FL1 messen (siehe Abb.4).

Die Zellen werden nach Behandlung abtrypsiniert und in FACS-Röhrchen überführt. Man inkubiert die Zellen dann im Dunkeln für 15 min in 50 µl Annexin-Puffer, 1 µl Annexin-FITC und zur Gegenfärbung toter Zellen 12,5 µl

Propidiumjodid (50 µg/ml). Danach werden weitere 250 µl Annexin-Puffer hinzugegeben und sofort im FACScan gemessen.

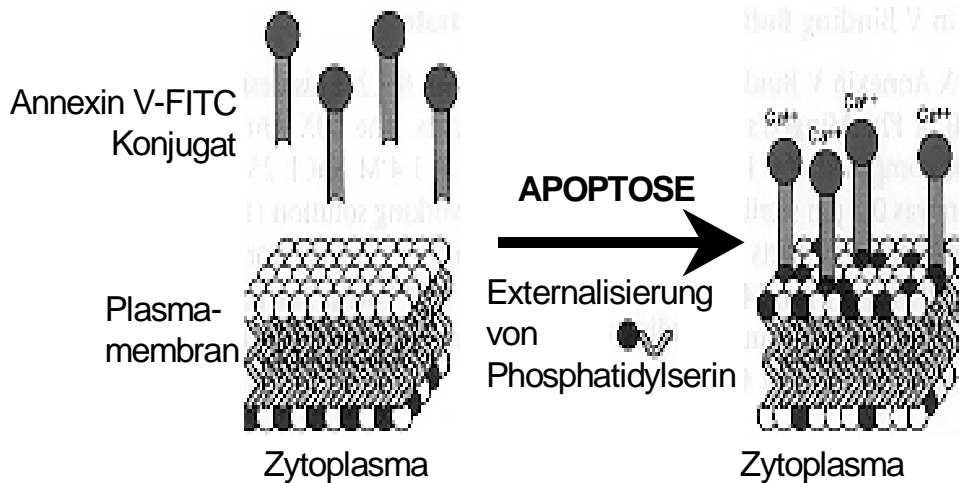


Abb. 4: Mechanismus der Annexin-Färbung. Bei gesunden Zellen ist das Plasmamembran-Protein Phosphatidylserin auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite lokalisiert. Bei Apoptose findet eine Externalisierung statt. Annexin V kann nun an das verlagerte Phosphatidylserin binden. Mittels eines daran gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffs kann man das an die Zelloberfläche gebundene Annexin V-FITC nachweisen. Fluoreszierende, d.h. Annexin V-FITC positive Zellen sind apoptotisch.

2.4.2. Hypodiploidie-Analyse nach Nicoletti

Die Hypodiploidie-Analyse nach Nicoletti dient dem Nachweis von Apoptose (Nicoletti et al., 1991). Mit dieser Methode wird der Anteil hypodiploider DNA am Gesamt DNA-Gehalt der Zelle bestimmt. Die Zellen werden abtrypsiniert, mit Medium neutralisiert und nach 5 min Zentrifugieren bei 1000 rpm mit 1 ml Nicoletti-Färbelösung versetzt (siehe II.1.5.2.). Diese sollte jeweils frisch angesetzt werden. Sie enthält als Lysepuffer Natriumzitat/Triton (siehe II 1.5.2.), wodurch die Zellmembran nach Behandlung über 24-48 h lysiert wird und Propidiumjodid (50µg/ml), welches die verbleibenden Zellkerne anfärbt. Bei „gesunden“ Zellen lässt sich im FACS ein Peak für diploide und ein Peak für tetraploide DNA (die Zellen, die kurz vor der Teilung standen und damit den

vierfachen Chromosomensatz aufweisen) detektieren. Internukleosomale DNA-Fragmente, die bei Apoptose typischerweise entstehen, werden aus dem Kern ausgeschwemmt. Daher stellt sich der reduzierte DNA-Gehalt apoptotischer Zellen als hypodiploider Gipfel dar (siehe Abb.5). Die Analyse erfolgt dann am FACS-Gerät bei Wellenlängen >650 nm (FL3).

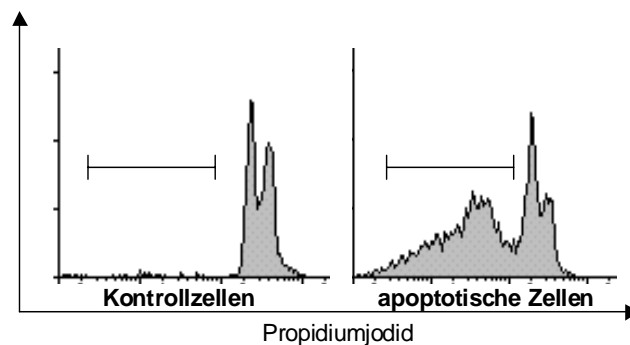


Abb. 5: Subdiploidie-Analyse. Kontrollzellen zeigen einen ersten Peak für Zellen mit diploider DNA (2-facher Chromosomensatz) und einen zweiten Peak für Zellen mit tetraploider DNA (4-facher Chromosomensatz bei Zellen, die vor der Teilung standen). Bei apoptotischen Zellen (24h nach UVB 150mJ/cm²) stellt sich der reduzierte DNA-Gehalt als hypodiploider Gipfel dar.

2.4.3. ELISA zum Apoptosenachweis

Beim ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) bindet man die nachzuweisende Substanz zunächst an eine feste Phase und gibt dann Antikörper gegen die Substanz hinzu, an die ein Enzym (oft Peroxidase) gekoppelt ist (“Sandwich-Prinzip”). Als Substrat für das Enzym zugegebener Farbstoff kann mittels Photometrie quantitativ detektiert werden.

Da bei der Apoptose eine internukleosomale Spaltung der DNA stattfindet, erhält man Fragmente, die eine Größe von 180 Basenpaaren bzw. ein Vielfaches davon haben. Der verwendete Cell Death Detection ELISA-Assay (siehe II.1.4.) verwendet monoklonale Antikörper gegen DNA und Histone, was die Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen zulässt. Die behandelten Zellen

(Lysate + Überstand) werden in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte (Cell Death Detection ELISA- Assay) gegeben. Danach wird eine Mischung aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase hinzugefügt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Anti-Histon Antikörper bindet an die Histonkomponente der Nukleosomen und fixiert durch Biotinylierung den Immunkomplex an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper reagiert mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Nach Entfernung des ungebundenen Antikörpers durch 3-maliges Waschen wird die Menge der nach Apoptoseinduktion gebildeten Nukleosomen über die gebundene Peroxidase mit einer Farbreaktion (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat) = ABTS) quantifiziert.

2.4.4. Kristallviolett-Färbung zum Nachweis von Zelltod

Mit dem Kristallviolett-Assay kann man mit Hilfe des Farbstoffs Kristallviolett quantitative Aussagen über die Zytotoxizität eines Stimulus auf Zellpopulationen adhärenter Zellen machen (Gentry and Dalrymple, 1980). Man macht sich dabei zunutze, dass sich tote Zellen von der Kulturschale ablösen. Nach mehrmaligem Waschen der Wells mit PBS gibt man in jede Schale die gleiche Menge Kristallviolett-Lösung (siehe II.1.5.1.) (z.B. bei Gewebekulturplatte 24 Well jeweils 200 µl). Anschliessend erfolgt 3-maliges Waschen mit destilliertem H₂O und das Trocknen für 30 min. Um semiquantitative Aussagen zu machen, wird der Farbstoff mit 100% Methanol ausgewaschen und photometrisch die Extinktion bei 570 nm bestimmt. Als Referenz verwendet man einen Leerwert (nur Methanol), der einer Vitalität von 0% entspricht, und eine unbehandelte Kontrolle, die einer Vitalität von 100% entspricht.

2.5. Western Blot Analyse

2.5.1. Allgemeines

Die Western Blot Analyse dient der Trennung und anschliessenden Detektion von Proteinen nach dem Molekulargewicht. Bei der zunächst durchgeführten Polyacrylamidgel-Elektrophorese kann die Porengrösse des Gels durch Variation der Acrylamid-Konzentration (siehe II.2.4.4.) so eingestellt werden, dass sich eine optimale Auftrennung im Bereich des Molekulargewichts der interessierenden Proteine ergibt. Die Proteine werden zur Auftrennung dabei zunächst in einem negativ geladenen Detergens aufgenommen, das Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. SDS bindet mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Bezirke des Proteins, so dass sich das Molekül zur Denaturierung entfaltet und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Lipiden aufgehoben werden. Zusätzlich wird zur chemischen Reduzierung β -Mercaptoethanol hinzugefügt, das Disulfidbindungen spaltet, so dass die über Disulfidbrücken stabilisierte Konformation nicht aufrechterhalten werden kann. Dies hat zur Folge, dass Proteine in reduziertem und denaturiertem Zustand überwiegend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei der Elektrophorese wandern die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch das Polyacrylamidgel in Richtung der positiven Elektrode. Da kleine Proteine schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels wandern können, werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, d.h. die niedrigmolekularen Proteine sind nach Abschluss der Elektrophorese der Kathode am nächsten. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird ein Gemisch von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht parallel analysiert. Nach der Elektrophorese erfolgt ein

Transfer (Blot) der auf dem Gel separierten Proteine auf Nitrocellulose-Papier. Anschliessend inkubiert man die Nitrozellulose mit einem spezifischen Antikörper (sog. Primär-Antikörper). Um die Bindung des Primärantikörpers sichtbar zu machen, gibt man einen zweiten Antikörper hinzu, der an den ersten bindet und der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Diese oxidiert das chemilumineszierende Luminol unter alkalischen Bedingungen, so dass Lichtquanten abgegeben werden. Die maximale Lichtemission (bei einer Wellenlänge von 428 nm) kann durch Auflegen eines für dieses Licht sensiblen Films (z.B. Hyperfilm ECL siehe II.1.3.) detektiert werden.

2.5.2. Herstellung von Zellysaten

2.5.2.1. Vollzell-Lysat

Zur Herstellung von Zellysaten werden die abgelösten Zellen und die Zellen des Überstands zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Dann gibt man RIPA-Lysepuffer (siehe II.1.5.1.) hinzu und lässt die Reagenzröhrchen 1 h auf Eis lysieren. Zur weiteren Aufschliessung noch bestehender Membranbestandteile und zur Zertrümmerung der DNA der Zellen behandelt man die Lysate jeweils 30'' mit Ultraschall. Anschließend wird 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet nichtlöslicher Proteine verworfen. Der klare Überstand entspricht dem Gesamtzellextrakt aller löslichen Proteine.

2.5.2.2. Subfraktionierung zytoplasmatischer Proteine

Um zu untersuchen, ob bestimmte Proteine aus Zellorganellen (z.B. Mitochondrien) ins Zytoplasma freigesetzt werden, kann man über differentielle Lyse und mehrere Zentrifugationsschritte eine Subfraktionierung durchführen

(Single et al., 1998). Eine Möglichkeit hierfür ist die Digitonin-Lyse. Digitonin permeabilisiert die Zellmembran und zytoplasmatische Proteine werden ausgeschwemmt. Zellorganellen, die von den eingesetzten Konzentrationen des Digitonin nicht lysiert werden (Mitochondrien, Zellkern), werden abzentrifugiert (siehe Abb. 6).

Die Pellets werden 2x in PBS gewaschen, in PBS und Digitonin Lysepuffer (siehe II.1.5.1.) im Verhältnis 1:1 (pro 10^6 Zellen 100 μ l PBS + 100 μ l Digitonin Lysepuffer) resuspendiert und während der 10-minütigen Lyse (optimierte Zeit für HaCaT) mehrmals auf- und abpipettiert. Durch Zentrifugieren (700 x g für 5' bei 4°) trennt man die sog. schwere Membranfraktion ab, der Überstand wird vorsichtig abgenommen und 30' bei 13000g bei 4° zentrifugiert. So erhält man als Pellet die mitochondriale Fraktion, die in 100 μ l RIPA-Puffer (siehe II.2.4.2.1.) vollständig lysiert wird und u.a. Mitochondrien und Zellkerne enthält, sowie als Überstand die zytosolische Fraktion. Die unterschiedlichen Fraktionen können anschliessend getrennt analysiert werden.

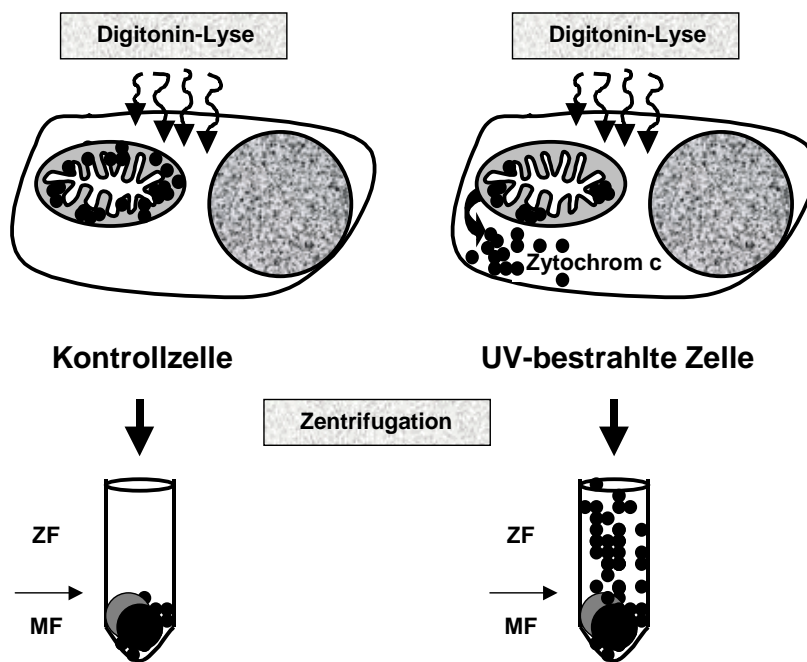


Abb. 6: Modell zur Digitonin-Lyse. Durch den Digitonin-Lysepuffer wird die äussere Zellmembran permeabilisiert. Ausgeschwemmte zytosolische Proteine (ZF = zytosolische Fraktion) reichern sich nach Zentrifugieren im Überstand an. So können diese getrennt von den schwereren Membranen und Zellorganellen (MF = mitochondriale Fraktion) analysiert werden.

2.5.3. Analyse des Proteingehalts nach Bradford

Um im Western Blot vergleichbare Mengen an Protein aufzutragen, wird photometrisch die Analyse des Proteingehalts nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Diese Methode beruht auf einer Farbänderung, wenn der in der Bradford-Lösung enthaltene Coomassie Blau-Farbstoff in saurem Medium an Peptide bindet. Dieser Farbumschlag kann im Photometer bei 595 nm gemessen werden. Als Eichkurve wird eine Verdünnungsreihe mit BSA (Ursprungslösung 1 mg/ml) in Wasser hergestellt:

| | 0 | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 25 |
|---|----------|----------|------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| BSA (μl) | 0 | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 | 15 | 25 |
| H₂O (μl) | 100 | 99 | 97,5 | 95 | 92,5 | 90 | 85 | 75 |

Zu den einzelnen Standardlösungen wird 900 μ l Bradford Lösung zugegeben (siehe II.1.5.3.1.) und die jeweilige Extinktion bei 595 nm gemessen. Von den Zellextrakten gibt man 1 μ l zu 99 μ l H₂O, bei sehr niedrigen Konzentrationen 2 μ l zu 98 μ l oder 10 μ l zu 90 μ l zu, um messbare Extinktionen zu erreichen und kann nach Erstellung einer Eichkurve für jeden Zellextrakt die Proteinkonzentration berechnen.

2.5.4. Durchführung des Western Blot

Nach Bestimmung des Proteingehalts (siehe II.2.4.3.) werden entsprechende Mengen der Proteinproben in Eppendorf Reaktionsgefäßen vorgelegt und im Verhältnis 4 + 1 von Proteinprobe/5x Ladebuffer und β -Mercaptoethanol (90% 5x Ladebuffer + 10% β -Mercaptoethanol) durchmischt. In der Zwischenzeit stellt man ein Polyacrylamidgel her, das für die Grösse des zu analysierenden Proteins geeignet ist:

Laufgel:

| | Acrylamid (30 %) | 4x TRIS/SDS | H₂O | 10 % APS | TEMED |
|-------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|--------------|
| 12 % | 4ml | 2,5ml | 3,44ml | 75µl | 15µl |
| 15 % | 5ml | 2,5ml | 2,3ml | 75µl | 15µl |

Über das Laufgel kommt das sog. Sammelgel mit den einzelnen Taschen, in die die denaturierten Extrakte gegeben werden.

Sammelgel:

| | Acrylamid (30 %) | 4x TRIS/SDS | H₂O | 10 % APS | TEMED |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------|--------------|
| Sammel- Gel (4 %) | 0,665ml | 1ml | 3,3ml | 25µl | 5µl |

Wenn das Gel polymerisiert ist, werden die Proben für 10min bei 95° aufgekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nun werden sie in die Taschen des Gels gefüllt, das sich im bereits mit Laufpuffer (siehe II.1.5.3.1.) gefüllten Elektrophoresegerät befindet. Als Laufspannung wurde für unsere Experimente meist 60 V pro Gel gewählt.

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgt in 4°C kaltem Transferpuffer (siehe II.1.5.3.1.) bei 100 V für 90 min. Um den erfolgreichen Transfer der nach Größe aufgetrennten Proteine zu überprüfen, färbt man die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Rot (siehe II.1.4.) an. Anschliessend wird mit 0,1% TPBS (siehe Abkürzungen) gespült, bis keine Farbe mehr sichtbar ist und die Membran mit 5% Milch, 3% BSA in 0,05% TPBS inkubiert, um

unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrozellulose bzw. an in grossen Quantitäten vorhandenen, aber unspezifisch erkannte Proteine verringert wird. Danach wird die Membran 3 x 10 min mit 0,1% TPBS gewaschen und gemäss dem jeweiligen optimierten Zeitraum mit Primärantikörper inkubiert (siehe II.1.5.3.2). Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit 0,1% TPBS) wird über 30-60 min mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe II.1.5.3.2.) inkubiert. Die Membran wird erneut gewaschen (1 x 10 min mit 0,3% TBS, 1 x 10 min mit 0,1% TBS und etwa 1 h mit 0,05% TBS). Man gibt schliesslich ECL (siehe II.1.4.) hinzu. Je nach Antikörper wird zwischen 1 s bis 1 h ein Film aufgelegt und dieser entwickelt. Zur Dokumentierung der gleichmässigen Auftragung der Proteinproben wird das Elektrophorese-Gel nach erfolgtem Transfer ca. 45 min mit Coomassie Blau Lösung (siehe II.1.4.) angefärbt, man wäscht mit der Gelwaschlösung (siehe II.1.5.3.1.) und trocknet das Gel zwischen zwei aufgespannten Folien (Gel Air Cellophane Support). Die einzelnen Antikörper mit entsprechenden Sekundärantikörpern sind tabellarisch im Materialteil unter II.1.5.3.2. aufgeführt. Die Sekundärantikörper wurden sämtlich in einer Konzentration von 1:5000 verwendet. Um zu zeigen, dass von jedem Zellextrakt vergleichbare Proteinmengen analysiert wurden (als sogenannte Ladekontrolle), führten wir eine Detektion von β -Tubulin durch. β -Tubulin ist ein Protein des Zytoskeletts, das stark exprimiert wird, aber keiner wesentlichen Regulation seiner Expression unterliegt. Dazu müssen die Membranen 30' in 15% H_2O_2 inkubiert werden, um die an die noch gebundenen Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase zu inaktivieren. Danach wird die Membran 1 h in PBS gewaschen. Über Nacht inkubiert man mit β -Tubulin-Antikörper (1:4000 in 0,05% Tween

PBS bei 4°C), wäscht 3 x 10 min mit 0,05% Tween PBS, gibt den Sekundärantikörper (1:2000 GaM in 0,05% Tween PBS) für 30' hinzu und verfährt weiter wie oben beschrieben.

2.6. Klonogener Assay

Ein klonogener Assay dient der Analyse der Proliferationsfähigkeit von Zellen nach verschiedenen zellulären Noxen. Man kann so untersuchen, ob nach Einwirkung von z.B. UV-Strahlung die Bildung von Zellkolonien als anspruchsvollste Leistung einer Zelle erhalten bleibt (Haake and Polakowska, 1993). Bei der Durchführung des Assays werden die Zellen zunächst gezählt, um identische Zellzahlen in eine Vielzahl von Schalen einsetzen zu können. Benötigt werden 10 Kulturschalen, in die die Zellen in absteigender Anzahl eingesetzt und gleichmässig verteilt werden: (1 x 2400 Zellen, 2 x 1200 Zellen, 2 x 600, 2 x 240, 2 x 120, 1 x 60). Man inkubiert die Schalen nun für 4 h bei 37°C im Brutschrank. Nach dieser Zeit ist der grösste Teil adhärent. Nun kann die jeweilige Behandlung der Zellen erfolgen. Bei UVB Bestrahlung wurden die folgenden Bestrahlungsprotokolle gewählt:

| <u>Zellzahl</u> | <u>mJ/cm</u> |
|-----------------|--------------|
| 60 | 0 |
| 120 | 0 |
| 120 | 40 |
| 240 | 40 |
| 240 | 80 |
| 600 | 80 |
| 600 | 100 |
| 1200 | 100 |
| 1200 | 140 |
| 2400 | 140 |

Die Zellen werden nach der Bestrahlung mit frischem Medium versehen, und unter regelmässiger Kontrolle der Zelldichte für 7-10 d bei 37°C inkubiert. Man muss dabei darauf achten, dass die Zellen nicht zu dicht werden, denn die Quantifizierung erfordert die optische Isolierung einzelner Kolonien. Danach erfolgt eine Färbung mit Kristallviolett (siehe II.2.4.4.). Die Anzahl der gewachsenen Kolonien in den einzelnen Schalen kann nun ausgezählt werden und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen werden.

III. ERGEBNISSE

1. Nachweis von Apoptose in Keratinozyten nach UVB- und PUVA-Bestrahlung

Um den Nachweis der Apoptose im System humaner Keratinozyten zu führen, bedienten wir uns drei verschiedener Methoden: die Analyse subdiploider DNA, die Phosphatidylserin-Externalisierung apoptotischer Zellen und mittels eines ELISA-Verfahren zum Nachweis der internukleosomalen DNA-Fragmentierung. Zu Beginn unserer Untersuchungen analysierten wir HaCaT-Zellen 24h nach UVB-Bestrahlung ($120\text{mJ}/\text{cm}^2$). Diese Dosis entspricht etwa der dreifachen bis zehnfachen minimalen Erythemdosis (Young and Diffey, 1985). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle liess sich ein deutlich erhöhter Prozentsatz hypodiploider DNA nachweisen. Dies zeigt, dass durch UVB Apoptose ausgelöst wurde (Abb. 7). Wir betrachteten als nächstes den ebenfalls im Spektrum des Sonnenlichts enthaltenen UVA-Wellenlängenbereich. Im Gegensatz zu UVB löst UVA alleine ($1,5\text{ J}/\text{cm}^2$) keinen programmierten Zelltod aus. Das gleiche gilt für 8-MOP, das bei unseren Experimenten in der Konzentration von $500\text{ ng}/\text{ml}$ nicht toxisch ist. Bei Kombination von UVA und 8-Methoxypsoralen (PUVA-Bestrahlung) hingegen wird effizient Apoptose induziert (Abb. 7).

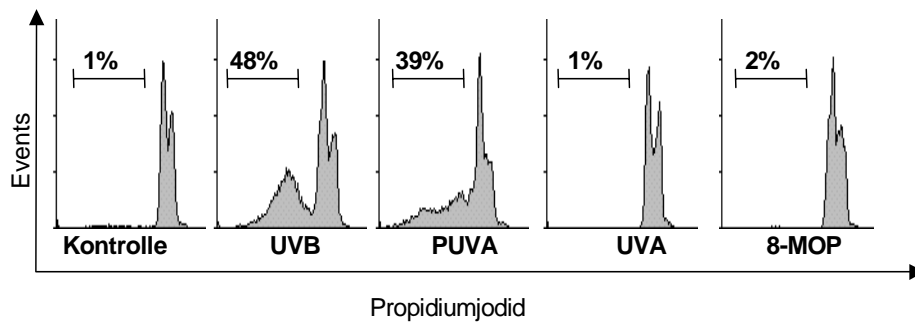


Abb. 7: Subdiploidie-Assay (Nicoletti *et al.*, 1991) nach unterschiedlichen Stimuli in HaCaT-Keratinocyten. Bei den Kontrollzellen ist keine hypodiploide DNA nachweisbar, ebensowenig nach UVA (1,5 J/cm²) und 8-MOP (500 ng/ml) alleine. UVB (120 mJ/cm²) und PUVA (500 ng/ml 8-MOP; 1,5 J/cm² UVA) induzieren hingegen Apoptose.

Um die oben gezeigten Ergebnisse mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurde die Annexin-Bindung an externalisiertem Phosphatidylserin gemessen (siehe II.2.4.1.). Nach UVB-Bestrahlung und PUVA-Bestrahlung ist eine Zellpopulation zu erkennen, die deutlich Annexin-positiv ist.

Die hier gezeigten Untersuchungen bestätigen: UVB und PUVA, aber nicht UVA bzw. 8-MOP alleine induzieren Keratinocyten-Apoptose in unserem Modellsystem (Abb. 8).

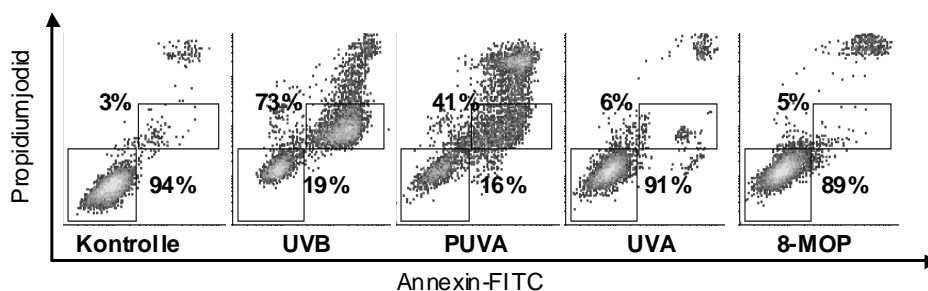


Abb. 8: Annexin-V-FITC-Färbung apoptotischer Zellen. Die Mehrzahl der Kontrollzellen sowie der Zellen nach UVA (1 J/cm²) und 8-MOP (500 ng/ml) befindet sich im Rechteck unten links, d.h. lassen sich nicht mit Annexin-V-FITC anfärben. Nach UVB (120 mJ/cm²) und PUVA steigt der Anteil der Zellen im rechten Feld (Annexin-V-FITC positiv).

Ebenso spezifisch lässt sich mit einem ELISA-Verfahren sowohl bei UVB als auch bei PUVA internukleosomale DNA-Fragmentierung nachweisen (Abb. 9).

Auf die 8-MOP und UVA-Kontrollen wurde hier verzichtet, da mit den in III.1.1. und in III.1.2. beschriebenen Methoden mehrmals gezeigt werden konnte, dass keine Apoptose induziert wird.

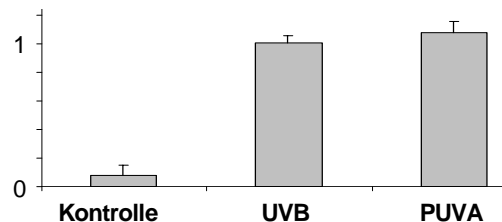


Abb. 9: ELISA-Verfahren zum Apoptose-Nachweis. Apoptose-typische internukleosomale DNA-Spaltung konnten wir bei HaCaT-Keratinozyten sowohl nach UVB-Bestrahlung (120 mJ/cm²) als auch nach PUVA-Bestrahlung detektieren.

2. Aktivierung mitochondrialer Signalwege der Apoptose: kinetische Unterschiede bei UVB- und PUVA-Bestrahlung

Nach dem Nachweis, dass UVB und PUVA grundsätzlich Keratinozytenapoptose auslösen können, untersuchten wir weiter, über welche Signalwege dieser Zelltod abläuft. In den letzten Jahren haben viele Forschungsergebnisse gezeigt, dass das Mitochondrium eine zentrale Rolle bei der Aktivierung apoptotischer Signalwege einnimmt. Erste Hinweise auf die bedeutende Rolle des Mitochondriums bei der Apoptose lieferten Beobachtungen, dass bei durch TNF α oder Ceramid ausgelösten Zelltod eine erhöhte mitochondriale Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen stattfindet (Richter, 1993). Es wurde auch gezeigt, dass das Mitochondrium Moleküle freisetzt, die an der Aktivierung von Caspasen und anderen apoptotischen Ereignissen beteiligt sind. Ausserdem verlieren Mitochondrien apoptotischer Zellen ihr Transmembranpotential $\Delta\Psi_m$ bevor andere Zeichen des programmierten Zelltods wie z.B. DNA-Fragmentierung sichtbar sind (Heiskanen et al., 1999). Durch diese Resultate wurde klar, dass das

Mitochondrium nicht nur als Energielieferant der Zelle anzusehen ist, sondern vielmehr aktiv an der Induktion von Apoptose beteiligt ist. Manche Autoren betrachten es als das „zentrale Apoptoseorganell“, das eine entscheidende Rolle für Leben und Tod einer Zelle spielt (Green and Amarante-Mendes, 1998; Pollack and Leeuwenburgh, 2001).

Um herauszufinden, ob auch bei UVB- und PUVA-induzierter Apoptose humaner Keratinozyten mitochondriale Signale beteiligt sind, analysierten wir zunächst die Kinetik des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB und PUVA Bestrahlung von Keratinozyten.

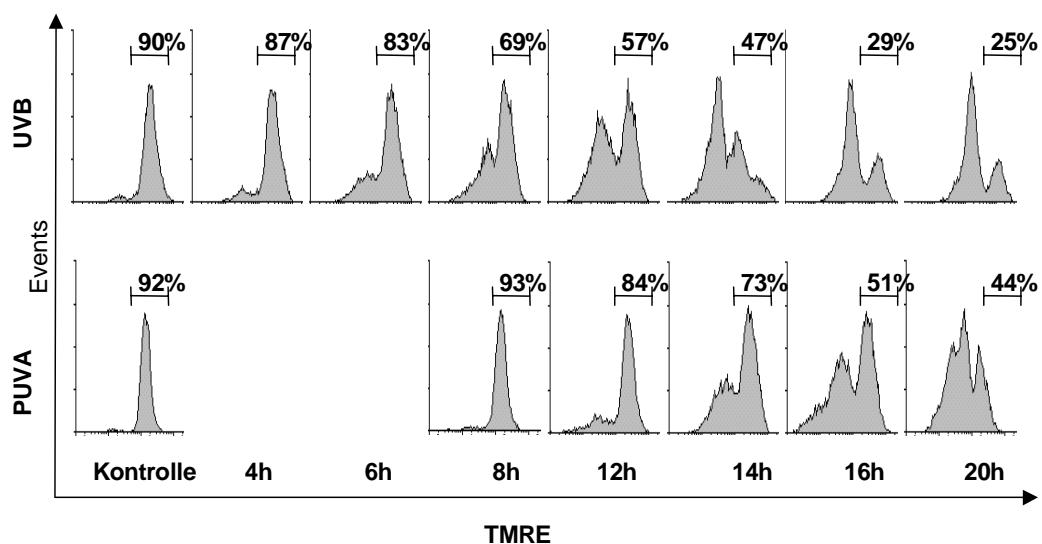


Abb. 10: Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB (120 mJ/cm²) und PUVA (500 ng/ml 8-MOP, 1,5 J/cm² UVA) bei HaCaT-Keratinozyten.

Wie in Abb. 10 erkennbar wird, ist in den UVB-bestrahlten Zellen 6 h nach Behandlung ein 2. Gipfel links des in den Kontrollzellen sichtbaren Signals zu sehen. Dieser Peak nimmt im zeitlichen Verlauf deutlich zu. 16 h nach UVB ist der Anteil des rechten Gipfels auf 29% zurückgegangen. Diese Verschiebung nach links deutet an, dass die Anfärbarkeit der Zellen mit TMRE verloren geht, was eine mitochondriale Depolarisation anzeigt. Der Verlust des mitochondrialen

Transmembranpotentials beginnt demnach etwa 6 h nach UVB Bestrahlung, 16 – 20 h nach Behandlung haben ungefähr zwei Drittel der Zellen ihr Transmembranpotential verloren.

Die kinetische Analyse von $\Delta\psi_m$ nach PUVA-Bestrahlung lieferte ein anderes Resultat: Erst etwa 12 - 14 h nach PUVA-Behandlung und damit wesentlich später als nach UVB-Bestrahlung kann man den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials erstmals detektieren. 20 h nach PUVA-Bestrahlung haben erst etwa die Hälfte der Zellen $\Delta\psi_m$ verloren. Dieser kinetische Unterschied ist nicht dosisabhängig; denn auch bei Verwendung niedrigerer Dosen (z.B. 30mJ/cm² UVB, 0,5J/cm² UVA) ist diese Kinetik bei insgesamt geringerem Anteil apoptotischer Zellen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Bei primärer Anfärbung der Zellen mit TMRE (gemessen in FL2 585nm +/- 42 nm) und Gegenfärbung mit Propidiumjodid (gemessen in FL3 >650nm), überlagern sich z.T. die Fluoreszenzbereiche der beiden Farbstoffe. Aus diesem Grund haben wir parallele Experimente mit DiOC₆ (gemessen in FL1) und PI durchgeführt, um zu zeigen, dass der Verlust des Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$ der Anfärbbarkeit mit PI vorausgeht. In Abb. 11 ist dargestellt, dass sowohl nach UVB als auch nach PUVA die Zellen zuerst ihre Anfärbbarkeit durch DiOC₆ verlieren, bevor man sie mit PI anfärben kann. Dies veranschaulicht, dass die mitochondriale Depolarisation ein frühes Ereignis des programmierten Zelltods ist und nicht nur dessen Folge. Diese Ergebnisse belegen, dass sowohl nach UVB als auch nach PUVA die Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen.

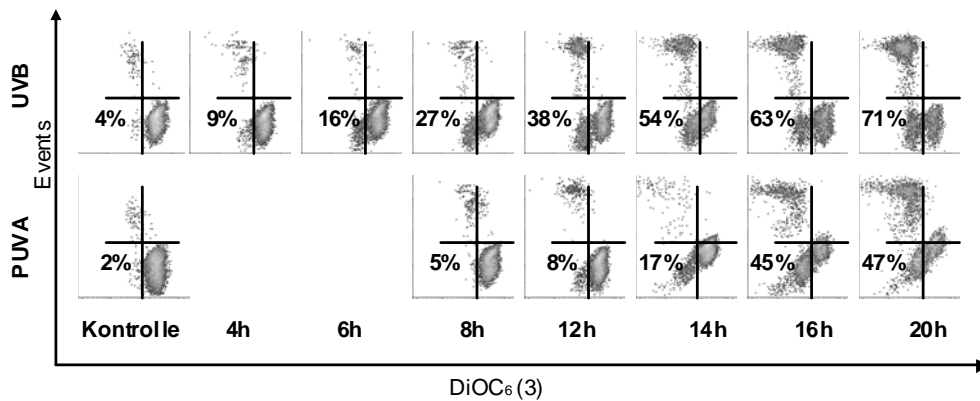


Abb. 11: DiOC₆/PI – Färbung zur Darstellung des Verhaltens von $\Delta\psi_m$ während des programmierten Zelltods von HaCaT-Keratinocyten nach UVB und PUVA. Sowohl nach UVB als auch nach PUVA-Bestrahlung tritt der Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials (erkennbar an einer Verschiebung nach links auf der x-Achse) ein, bevor die Zellen als Zeichen des Verlustes der Membranintegrität mit PI angefärbt werden.

3. Modulation von UVB und PUVA-induzierten Signalwegen der Apoptose durch Bcl-2-Überexpression

Die oben gezeigten Experimente stellen dar, dass die Mitochondrien bei UV-induzierter Apoptose beteiligt sind. Sowohl UVB als auch PUVA verursachen eine mitochondriale Depolarisation, obwohl kinetische Unterschiede bestehen. Familienmitglieder der Bcl-2 Familie können den Ablauf von Apoptose blockieren und Bcl-2 scheint seine Wirkung durch Protektion des Mitochondriums auszuüben (Gross et al., 1999a). Um zu untersuchen ob Bcl-2 den programmierten Zelltod auch bei UVB- und PUVA-bestrahlten Keratinocyten hemmt, untersuchten wir den Einfluss von Bcl-2 auf die Apoptose von Keratinocyten nach UVB, PUVA. Weiterhin studierten wir als Vergleichsexperiment die Apoptose-Induktion nach Behandlung mit Todesliganden (TRAIL und CD95 Ligand). Von diesen Todesliganden ist bekannt, dass sie den extrinsischen Apoptose-Signalweg zur Auslösung des

programmierten Zelltods aktivieren.

3.1. Nachweis der Bcl-2 - Überexpression

Wir untersuchten für diese Fragestellung ein Modell, bei dem durch einen eukaryonten Expressionsvektor Bcl-2 in HaCaT-Keratinocyten stabil überexprimiert wurde (Pincelli *et al.*, 1997). Als Kontrolle dienen mit demselben Vektor transfizierte HaCaT-Zellen, die vermutlich aufgrund unterschiedlicher Integrierung ins Genom keine detektierbaren Mengen Bcl-2 exprimieren.

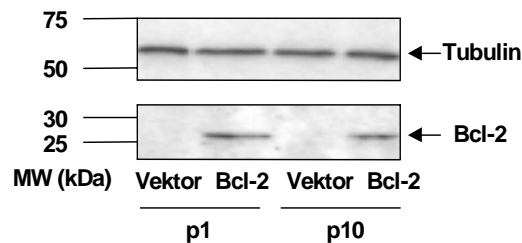


Abb. 12: Western Blot zur Darstellung der Bcl-2 – Überexpression. Bei den Lysaten der Bcl-2 überexprimierenden Zellen (#6) kann man auch nach 10 Passagen noch das 26 kD grosse Bcl-2 detektieren, während dies bei den Kontrollzellen (#5) nicht der Fall ist. Oben ist Tubulin als Ladekontrolle gezeigt, um hervorzuheben, dass überall gleich viel Protein aufgetragen wurde.

Der Western Blot (Abb. 12) zeigt, dass auch nach mehreren Passagen in Kultur Bcl-2 stabil überexprimiert wird, während sich bei den Kontrollzellen kein Bcl-2 nachweisen lässt.

In unseren Versuchen arbeiteten wir stets mit Zellen, die weniger als 10 mal passagiert waren, so dass sichergestellt war, dass nur mit Bcl-2 überexprimierenden Zellen gearbeitet wurde.

3.2. Der Einfluss von Bcl-2 auf UVB-induzierte Apoptose

Zunächst untersuchten wir inwieweit bei beiden Zelllinien nach verschiedenen Bestrahlungsdosen UVB (30-150 mJ/cm²) Apoptose ausgelöst wird. Es lässt sich v.a. im mittleren Dosisbereich (80 und 120 mJ/cm²) bei der Hypodiploidie-Analyse ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Zelllinien erkennen (Abb. 13A). Die dosisabhängige Protektion Bcl-2-überexprimierender Zellen zeigt sich auch bei der Analyse mehrerer Versuche (Abb. 13B). Wir können daraus den Schluss ziehen, dass Bcl-2 vor einer Apoptose-Induktion durch UVB-Bestrahlung schützt.

3.3. Der Einfluss von Bcl-2 auf PUVA-induzierte Apoptose

Auch 24h nach PUVA-Bestrahlung kann man einen Unterschied im Prozentsatz apoptotischer Zellen zwischen beiden Zelllinien sehen.

Bei der Analyse der Dosisabhängigkeit wurde 24h nach PUVA bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen signifikant weniger subdiploide DNA gefunden (Abb. 14A). Die Zusammenfassung mehrerer Versuche bestätigt dies (Abb 14B). Bei sehr hohen UVA-Dosen (3 J/cm²) ist allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien mehr erkennbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Gegensatz zu den Befunden mit UVB der Bcl-2-vermittelte Schutz gegenüber PUVA-induzierter Apoptose nur dosisabhängig besteht.

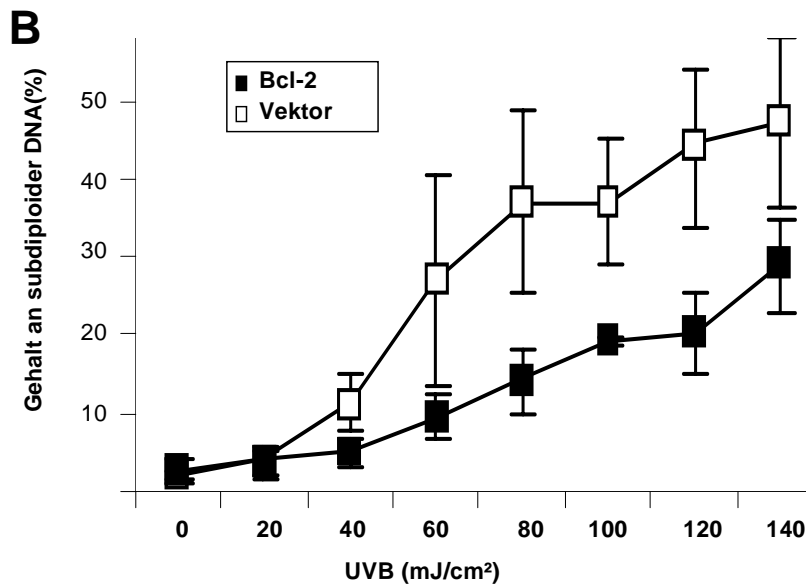
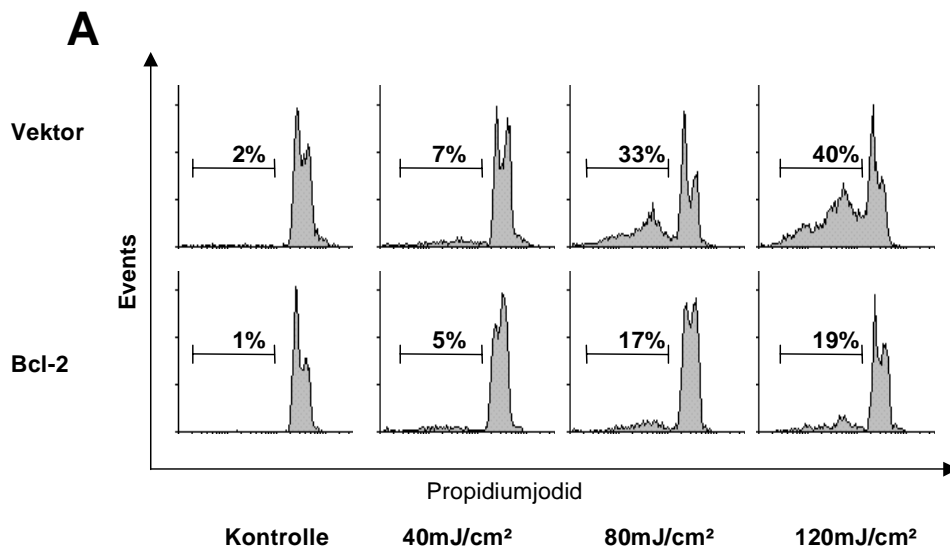


Abb. 13A: Subdiploidie-Analyse nach UVB-Bestrahlung (120 mJ/cm²). Ein deutlich stärkerer Anteil apoptotischer Zellen ist bei den Kontrollzellen (obere Reihe) detektierbar im Gegensatz zu Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten (untere Reihe).
B: Zusammenfassung mehrerer (n>3) unabhängiger Experimente nach UVB-Bestrahlung.

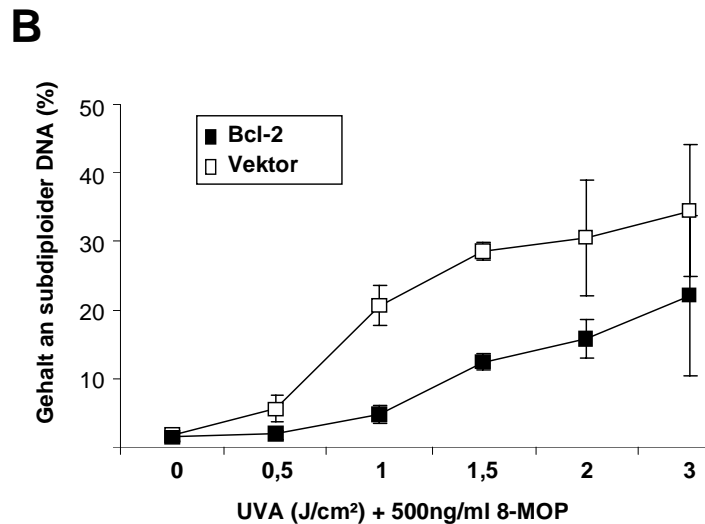
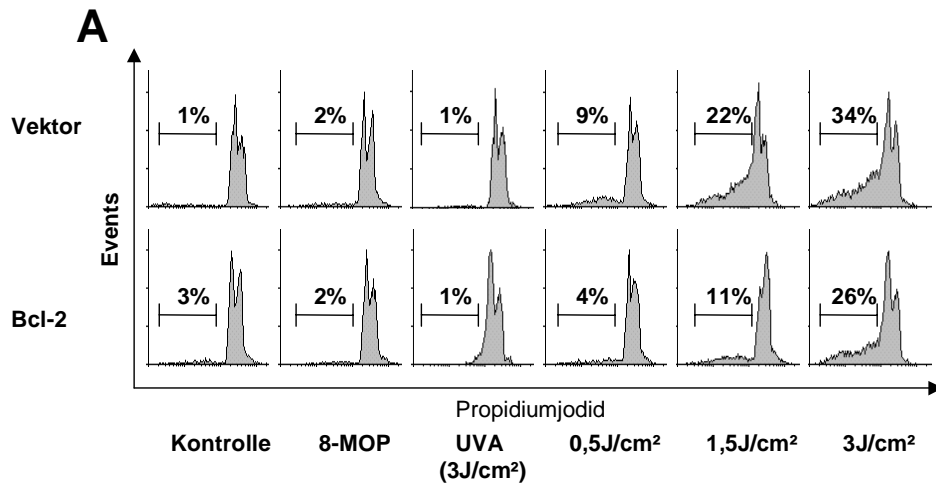


Abb. 14A: Subdiploidie-Analyse nach PUVA-Bestrahlung (500 ng/ml 8-MOP, 1,5 J/cm² UVA). Der Anteil von Zellen mit Apoptose-typischer hypodiploider DNA ist bei den Kontrollzellen (obere Reihe) in dem repräsentativ gezeigten Versuch deutlich höher als bei Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten (untere Reihe).

B: Zusammenfassung mehrerer (n>3) unabhängiger Experimente nach PUVA.

3.4. Der Einfluss von Bcl-2 auf Apoptose durch Todesliganden

Für bestimmte Zelltypen ist beschrieben, dass Todesliganden wie TRAIL oder CD95-Ligand ihren Effekt über einen weitgehend Mitochondrien-unabhängigen Weg vermitteln, während andere Zelltypen einen Mitochondrien-abhängigen Weg

zur Apoptose-Induktion benötigen (Scaffidi et al., 1998). Wir untersuchten daher, ob ähnlich wie bei der Apoptose durch UVB und PUVA auch bei der durch TRAIL oder CD95-Ligand ausgelösten Apoptose Bcl-2 einen Einfluss auf die Induktion des programmierten Zelltods hat.

Zunächst analysierten wir, ob sich die beiden Zelllinien in Bezug auf die Oberflächenrezeptoren für TRAIL und CD95-Ligand unterscheiden. Dazu wurde eine Oberflächenfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den TRAIL-R1, R2, R3, R4 und CD95-Rezeptor durchgeführt (Leverkus *et al.*, 2000). Das vorliegende Ergebnis zeigt, dass beide Zelllinien in gleichem Ausmaß den TRAIL-R1 und TRAIL-R2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, den R3 und R4-Rezeptor jedoch nicht (Abb. 15).

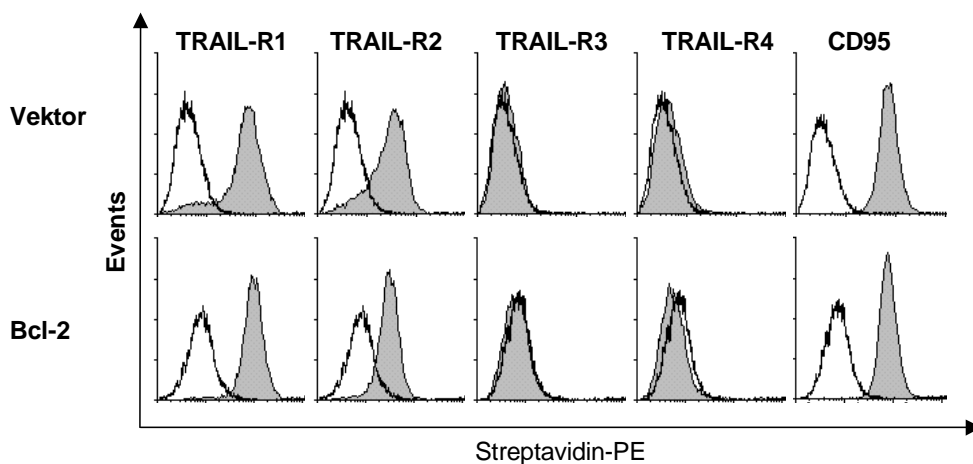


Abb. 15: Expression von Rezeptoren für TRAIL (TRAIL-R) und CD95-Ligand. Beide Zelllinien (Kontrollzellen oben, Bcl-2 überexprimierende unten) exprimieren stark die Todesrezeptoren TRAIL-R1, TRAIL-R2 und CD95 auf der Zelloberfläche, aber nicht TRAIL-R3 und TRAIL-R4.

Damit unterscheidet sich die transfizierte Linie nicht von HaCaT-Zellen oder auch primären Keratinozyten (Leverkus *et al.*, 2000). Auch der CD95-Rezeptor konnte auf der Oberfläche beider Zelllinien vergleichbar nachgewiesen werden.

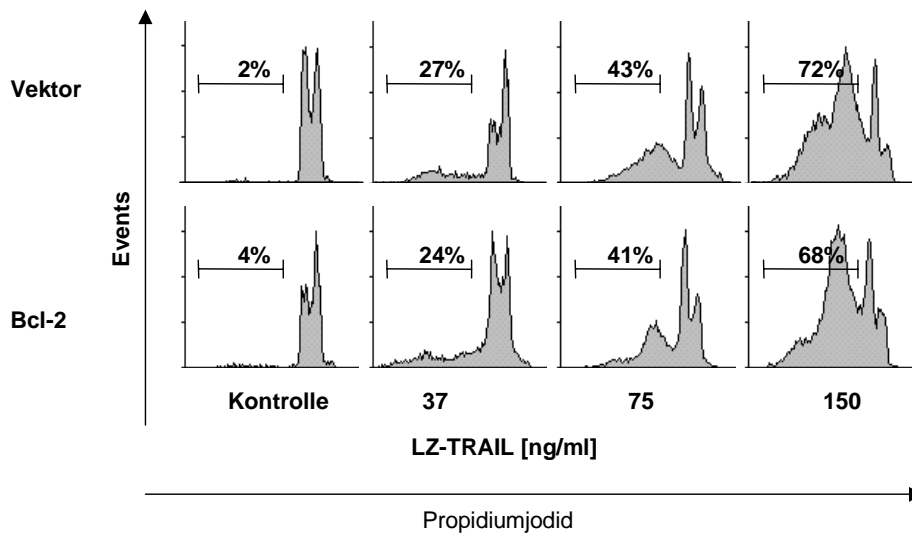


Abb. 16A: Vergleich der Apoptoseinduktion bei beiden Zelllinien 24 h nach Inkubation mit TRAIL von Kontrollzellen (obere Reihe) und Bcl-2 überexprimierenden Zellen (untere Reihe). Beide Zelltypen induzieren nach TRAIL-Behandlung vergleichbar Apoptose.

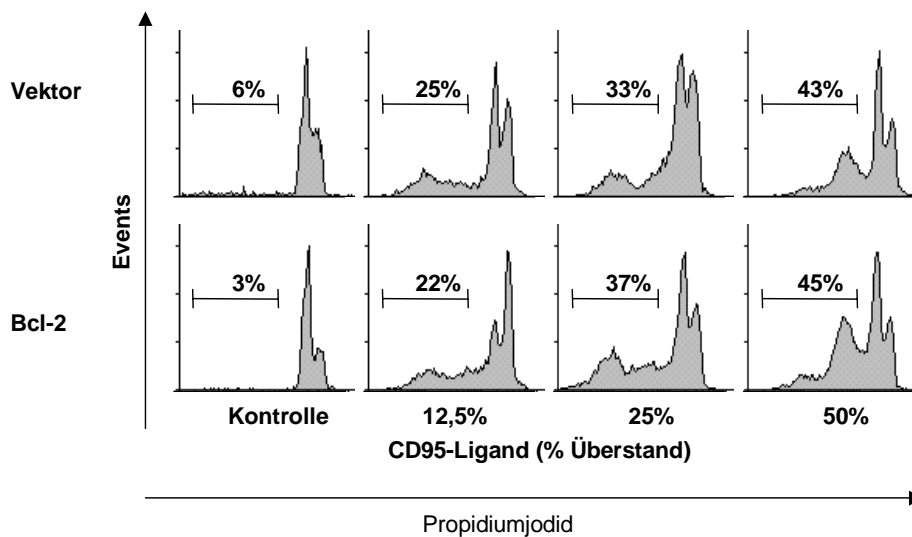


Abb. 16B: Vergleich der Apoptoseinduktion bei beiden Zelllinien 24 h nach Inkubation mit CD95-Ligand. Beide Zelltypen induzieren nach TRAIL- oder CD95-Ligand-Behandlung vergleichbar Apoptose.

Die beiden Zelllinien wurden nun in mehreren Versuchen gemäß II.2.2.2. mit TRAIL und CD95-Ligand inkubiert und 24h später die Induktion von Apoptose

analysiert. Abb. 16 zeigt jeweils repräsentativ einen Versuch. In Abb. 17 ist die Zusammenfassung mehrerer unabhängiger Versuche (n=3) gezeigt. Bcl-2-Überexpression schützt nicht signifikant vor CD95- oder TRAIL-induzierter Apoptose.

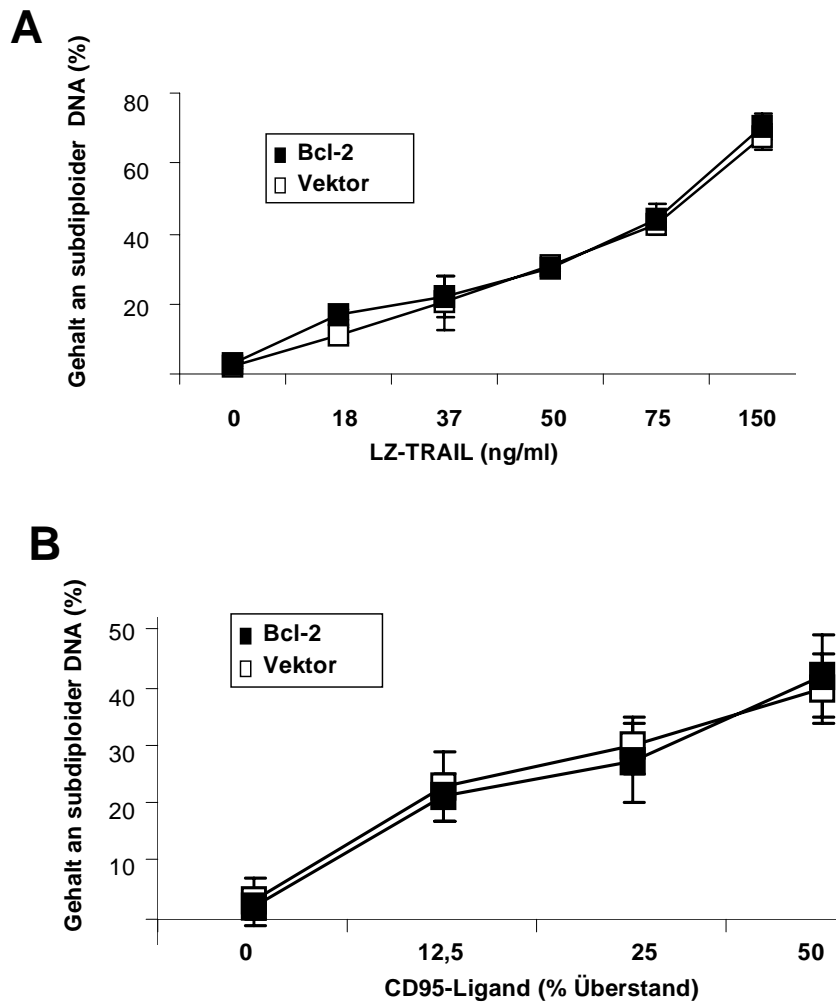


Abb. 17A: Apoptoseinduktion 24 h nach Zugabe von TRAIL. Die Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=3) zeigt ein ähnliches Verhalten beider Zelllinien bei unterschiedlichen TRAIL-Konzentrationen.

B: Apoptoseinduktion 24 h nach Zugabe von CD95-Ligand. Die Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=3) zeigt ein ähnliches Verhalten beider Zelllinien bei unterschiedlichen Konzentrationen von CD95-Ligand.

4. Aktivierungsmuster von Caspasen nach UVB, PUVA und nach TRAIL-Stimulation

Die DNA-Fragmentierung im Rahmen der Apoptose findet zu einem relativ späten Zeitpunkt statt. Viele zentrale Schritte der apoptotischen Signalkaskade wie der Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials (siehe III.5.), die Freisetzung von Proteinen wie Zytochrom c aus dem Intermembranraum (siehe III.7.) oder die Aktivierung von Caspasen gehen der DNA-Fragmentierung voraus. Daher haben wir als nächstes die Frage untersucht, auf welcher Ebene Bcl-2 seinen Schutz vor UVB- und PUVA-induzierter Apoptose vermittelt. Zunächst versuchten wir herauszufinden, ob Bcl-2 die Aktivierung von Caspasen beeinflusst.

4.1. Aktivierungskinetik von Caspasen nach UVB und TRAIL

Die Caspasen 8, 9 und 10 gelten als Initiatorcaspasen, die zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 führen. Wir haben nun im Western Blot untersucht, ob UVB-Bestrahlung zur Spaltung und damit Aktivierung von Caspasen führt und konnten dabei zu den folgenden Ergebnissen kommen (Abb. 18): Bei allen analysierten Caspasen (Initiatorcaspasen 8, 10, Effektorcaspasen 2, 3, 7) ist bei den Kontrollzellen etwa 4h nach UVB-Bestrahlung eine Abnahme der inaktiven Proform und eine Zunahme von Spaltprodukten zu detektieren, d.h. diese liegen in aktiver Form im Zytosol vor. Bei Caspase 8 detektierten wir schon 2 h nach Bestrahlung die 41 und 43 kD grossen Fragmente, das aktive 18 kD Fragment ist allerdings deutlich erst nach 6 h detektierbar. Bcl-2 schützt vor der UVB-induzierten Caspaseaktivierung, es zeigte sich nur eine geringe Abnahme der

einzelnen Procaspasen 6 h nach UVB und entsprechende Caspase-Spaltprodukte sind in einem geringeren Ausmass zu erkennen. Bei Caspase 8 sieht man 6 h nach Bestrahlung nur die inaktiven 41 und 43 kD Fragmente, nicht aber das aktive Fragment p18. Bei Untersuchung des proapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes BID, das von Caspase 8 aktiviert wird, lässt sich bei den Kontrollzellen im Vergleich zu den Bcl-2 - überexprimierenden Zellen eine Abnahme der inaktiven Proform erkennen, was auf eine Zunahme der aktiven Form hinweist, die aber der von uns verwendete Antikörper unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht erkannte.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Überexpression von Bcl-2 die Caspaseaktivierung bei der Todesligand-vermittelten Apoptose beeinflusst. TRAIL-Behandlung über 6 h führt bei Kontrollzellen als auch den Bcl-2 überexprimierenden Zellen gleichermassen zu einer deutlichen Detektion aktiver Spaltprodukte bei allen betrachteten Caspasen. Ebenso ist bei beiden Zelllinien eine vergleichbare Abnahme der Procaspasen und von BID erkennbar.

Unsere Experimente zeigten somit, dass Bcl-2 in dem untersuchten Zeitraum von 0 – 6 h vor der UVB-induzierten Aktivierung sämtlicher betrachteten Initiator- als auch Effektorcaspasen schützt. Dagegen kann Bcl-2 die Caspaseaktivierung bei TRAIL-induzierter Apoptose nicht beeinflussen. Diese Befunde stehen somit im Einklang mit den zellbiologischen Ergebnissen in III.3.2. und 3.4.

4.2. Aktivierungskinetik von Caspasen nach PUVA

Um herauszufinden, ob Bcl-2-Überexpression eine Auswirkung auf die PUVA-induzierte Aktivierung von Caspasen hat, haben wir für beide Zelllinien biochemisch analysiert, ob und wann aktive Spaltprodukte von Caspasen detektiert werden können (Abb. 19). Da Apoptose nach PUVA erst wesentlich später als nach UVB nachweisbar sind (siehe III.2.), haben wir nach Vorversuchen die Zellen wesentlich später als nach UVB, nämlich erst 12, 24, 36 und 48 h nach Bestrahlung biochemisch analysiert. Dabei kann man bei den Kontrollzellen etwa 12 h nach Bestrahlung eine leicht Abnahme der Procaspasen und eine Zunahme der aktiven Enzymformen erkennen. Dies trifft sowohl für die untersuchten Initiatorcaspasen als auch Effektorcaspasen zu. Nur für Caspase 2 konnten wir ausschliesslich einen Rückgang der Procaspase und keine Spaltprodukte detektieren.

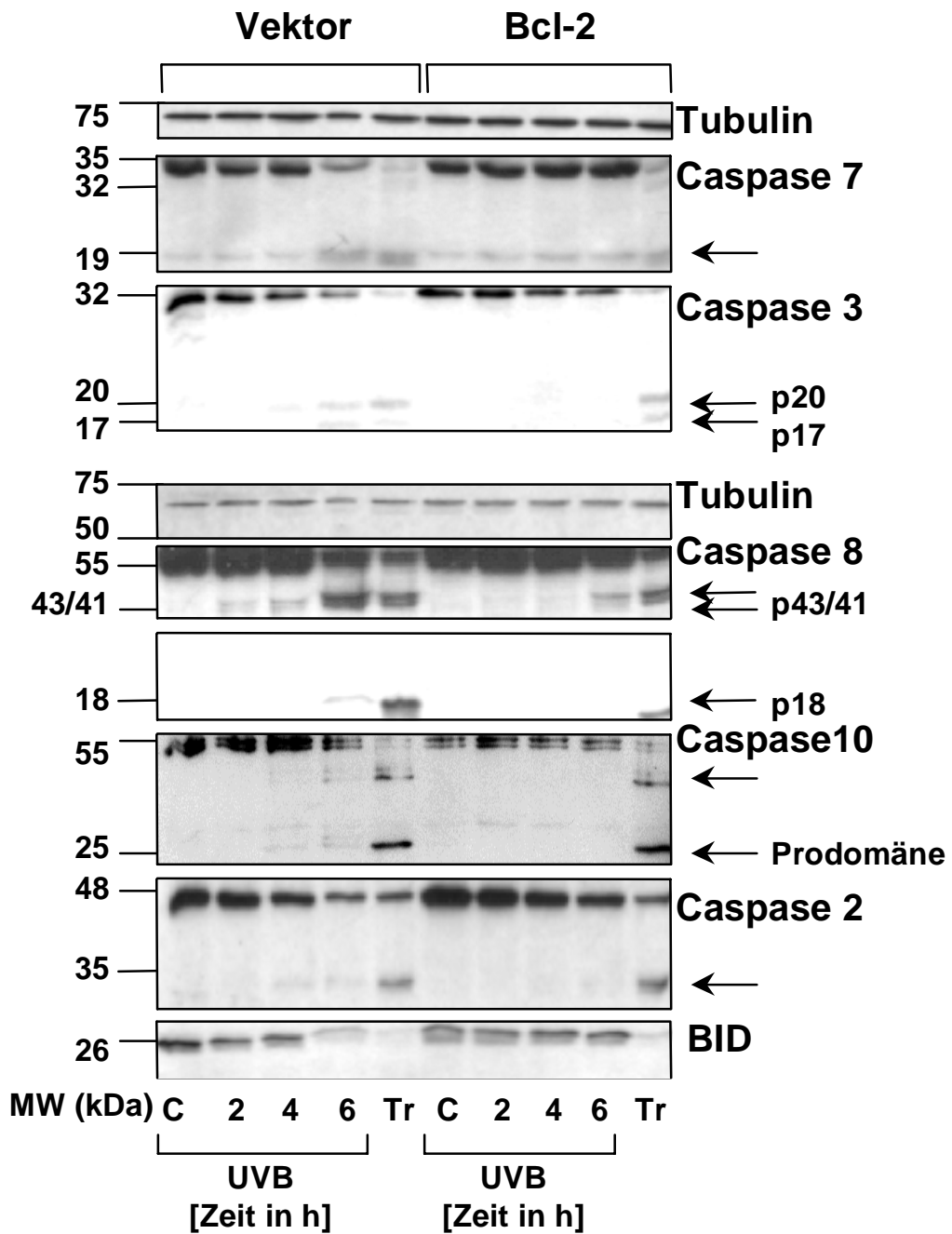


Abb. 18: Bcl-2 überexprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden nach UVB-Bestrahlung (120 mJ/cm²) im Western Blot hinsichtlich der Aktivierung von Caspasen (Caspase 7, 3, 8, 10 und 2) und BID untersucht. Zum Vergleich wurden TRAIL (Tr) behandelte Zellen (150 ng/ml, 6 h) analysiert. Bei den Kontrollzellen konnten wir nach UVB eine Spaltung aller betrachteten Caspasen und BID nachweisen. Bei den Bcl-2 überexprimierenden Zellen zeigten sich nach UVB keine Spaltprodukte, während nach Inkubation mit TRAIL alle Caspasen und BID aktiviert werden.

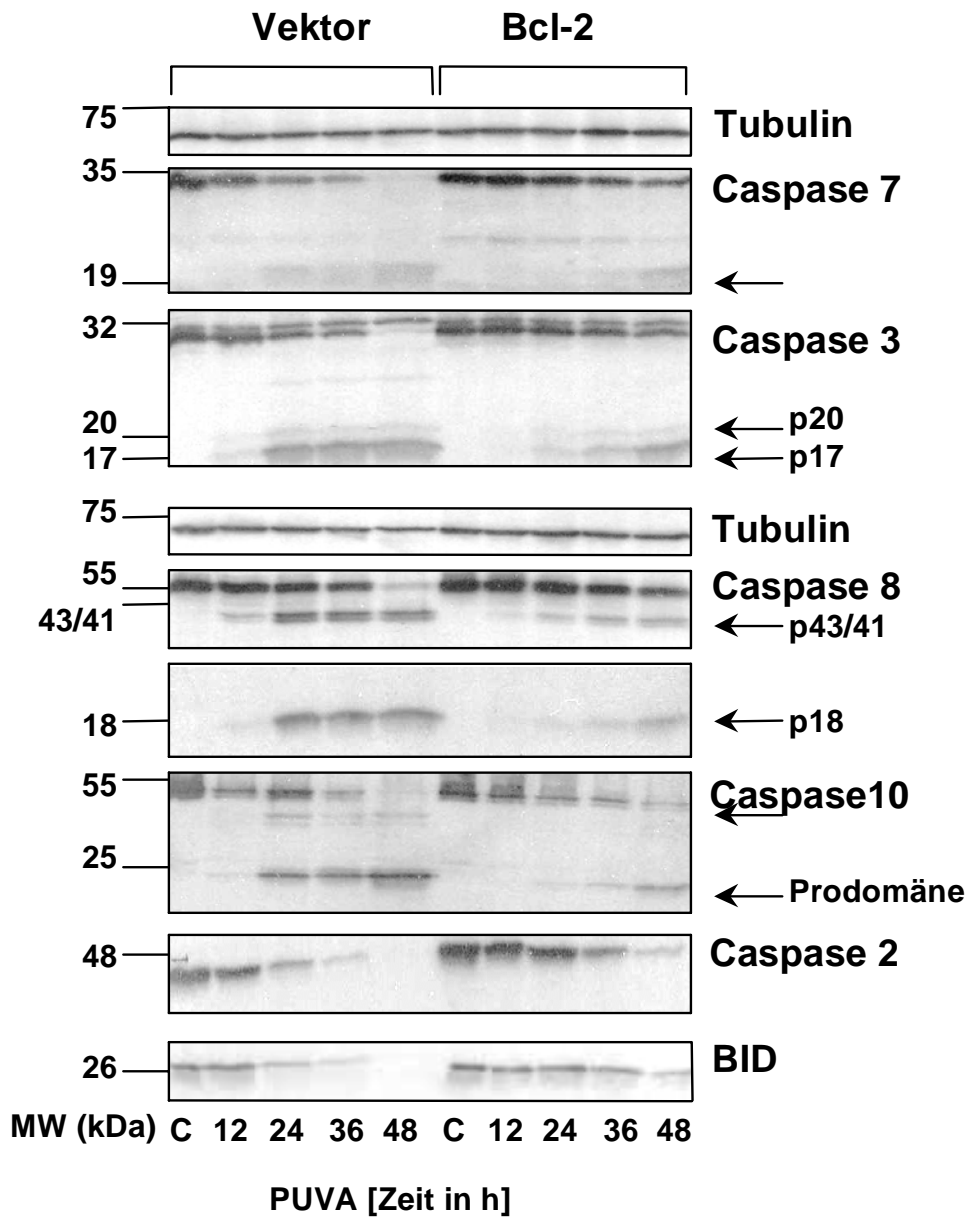


Abb. 19: Bcl-2 überexprimierende Zellen und Kontrollzellen wurden nach PUVA-Bestrahlung (500 ng/ml, 1,5 J/cm²) im Western Blot hinsichtlich der Aktivierung von Caspasen (Caspase 7, 3, 8, 10 und 2) und BID untersucht. Caspasespaltung konnte bei den Kontrollzellen erstmals 12 – 24 h nach PUVA nachgewiesen werden, aber nicht bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen. 48 h nach PUVA-Bestrahlung zeigte sich auch bei den Bcl-2 überexprimierenden Zellen sowohl eine Caspase- als auch eine BID-Aktivierung.

Im Gegensatz dazu kann Bcl-2 vor der PUVA-induzierten Caspaseaktivierung schützen. In Übereinstimmung mit den zellbiologischen Ergebnissen (siehe 5.4) lässt sich auch in den Bcl-2-überexprimierenden Zellen mit einer Verzögerung

von etwa 12-24 h eine Spaltung von Procaspasen in ihre aktiven Fragmente detektieren. 48 h nach PUVA-Bestrahlung liegen dann bei beiden Zelltypen vergleichbare Mengen aktiver Caspasen vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die proteolytische Aktivierung von Caspasen ebenso wie der Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials nach PUVA später einsetzt als nach UVB Bestrahlung. Ebenso konnten wir zeigen, dass Bcl-2 zwar initial vor einer Caspaseaktivierung nach PUVA-Bestrahlung schützt, diese jedoch letztendlich nicht verhindern kann, während dies bei UVB-Bestrahlung möglich ist.

5. Der Einfluss einer Bcl-2-Überexpression auf das mitochondriale Transmembranpotential und das klonogene Potential nach UVB- und PUVA-Bestrahlung

Wie oben dargestellt, verursachen UVB und PUVA Caspaseaktivierung (siehe III.4.) und können zur mitochondrialen Depolarisierung führen (siehe III.2.). Es stellte sich nun die Frage, ob Bcl-2 vor der mitochondrialen Depolarisation, ähnlich wie vor Caspaseaktivierung schützen kann. Dazu haben wir weitere zellbiologische Experimente durchgeführt.

5.1. Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB-Bestrahlung

Zunächst untersuchten wir den Einfluss von Bcl-2 auf den durch UVB ausgelösten Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$). Wir führten dazu Kinetiken in stündlichen Intervallen (1-24 h, sowie 48 h) mit der Bcl-2 überexprimierenden Linie und Kontrollzellen durch und untersuchten

mittels TMRE-Färbung, wann es zur mitochondrialen Depolarisation kommt. Es fiel auf, dass die Bcl-2 überexprimierenden Zellen deutlich länger nach der Bestrahlung ihr Transmembranpotential aufrechterhalten konnten. Ähnlich wie bei den HaCaT-Zellen in III.2. verlieren die Mitochondrien der Kontrolltransfizierten Zellen dagegen 6 h nach UVB ihr Transmembranpotential. In dem repräsentativ dargestellten Experiment zeigen 6 h nach Bestrahlung 13% der Kontrollzellen $\Delta\psi_m$ -Verlust; 12 h nach UVB haben 43% $\Delta\psi_m$ verloren (Abb. 20). Im Vergleich dazu schützt Bcl-2 vor dem Verlust von $\Delta\psi_m$.

Die Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=4) im insgesamt betrachteten Zeitraum von 0 – 48 h bestätigt, dass die Mitochondrien der Bcl-2 überexprimierenden Zellen zu einem signifikant niedrigeren Prozentsatz depolarisieren. Selbst 48 h nach Bestrahlung vermag Bcl-2 vor dem Verlust des Transmembranpotentials zu schützen.

Analog III.2. haben wir in parallelen Versuchen die Zellen in DiOC₆/PI-Doppelfärbungen untersucht und kamen zu ähnlichen Ergebnissen, die bestätigten, dass Bcl-2 auch langfristig vor UVB-induzierter Apoptose schützen kann (Abb. 21).

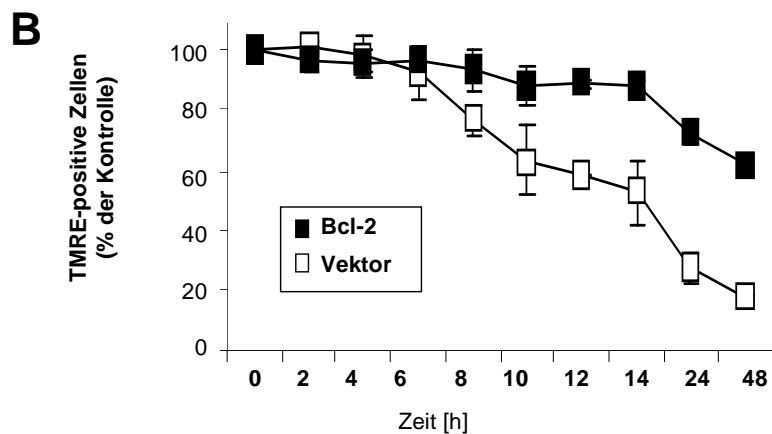
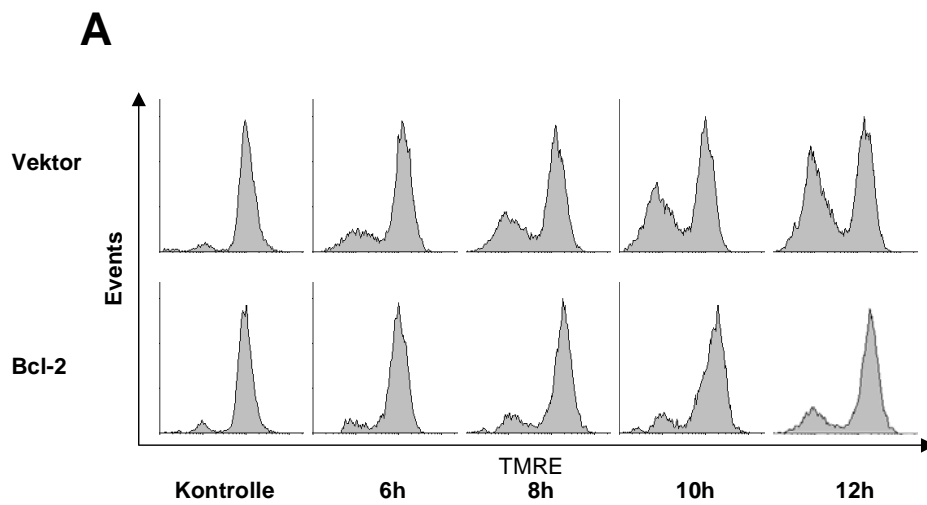


Abb. 20A: Mitochondriale Depolarisation nach UVB (120 mJ/cm²). Oben ist repräsentativ ein Versuch dargestellt, in dem die Anfärbbarkeit des Mitochondriums mit TMRE betrachtet wird. In den Kontrollzellen beginnt der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials 6-8 h nach UVB, Bcl-2 überexprimierende Zellen sind davor weitgehend geschützt.

B: Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=5). Auch 48 h nach UVB sind die Bcl-2 überexprimierenden Zellen vor dem Verlust von $\Delta\psi_m$ geschützt.

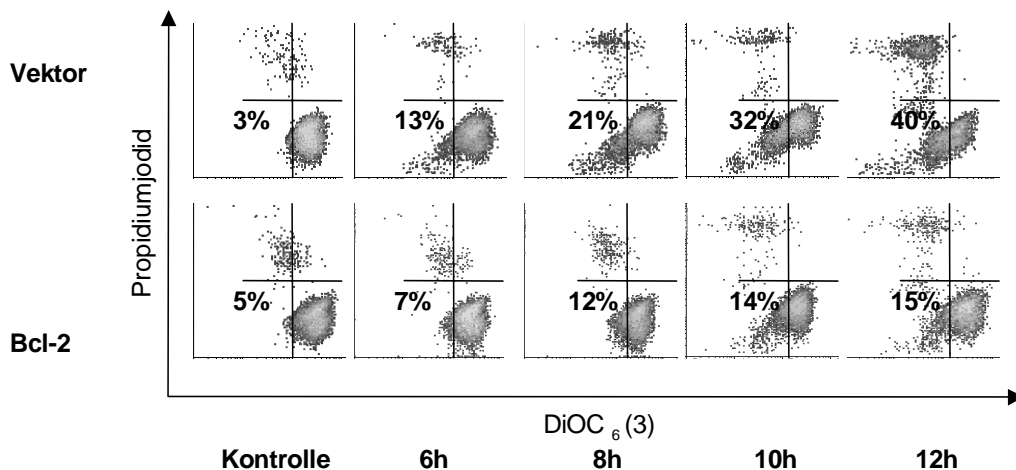


Abb. 21: Mitochondriale Depolarisation nach UVB (120 mJ/cm²), dargestellt mit DiOC₆/PI – Färbung. Die Kontrollzellen verlieren ihr Transmembranpotential beginnend 6-8 h nach UVB, d.h. die Anfärbbarkeit mit DiOC₆ geht verloren. 10 h nach UVB haben bereits 32% $\Delta\psi_m$ verloren. Erst nach dem Verlust von $\Delta\psi_m$ kommt es zu einer Anfärbbarkeit mit PI (12 h nach UVB), was ein Zeichen für irreversiblen Zelltod darstellt. Die Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten verlieren zu einem deutlich geringeren Teil $\Delta\psi_m$. Selbst 12 h nach UVB sind erst 15% der Gesamtpopulation DiOC₆-negativ.

5.2. Analyse des mitochondrialen Transmembranpotentials nach PUVA-Bestrahlung

24 h nach PUVA-Behandlung haben die Subdiploidie-Analysen einen quantitativen Unterschied der Apoptose-Induktion zwischen beiden Zelllinien erkennen lassen (siehe III 3.3.). Wir haben daher auch den Einfluss von Bcl-2 auf das Verhalten des mitochondrialen Transmembranpotentials nach PUVA untersucht. Ähnlich den UVB-Versuchen in III.5.1. betrachteten wir einen Zeitraum von 1 – 48 h nach PUVA-Bestrahlung. Repräsentativ sind hier die Resultate eines Versuches 12, 16, 24 und 48h nach Bestrahlung gezeigt (Abb. 22). 12 h nach der PUVA-Bestrahlung kann man bei den Kontrollzellen $\Delta\psi_m$ -Verlust erkennen, 16 h nach PUVA ist dies auch bei der Bcl-2 – Zelllinie der Fall. 24 h nach PUVA haben 70% der Kontrollzellen $\Delta\psi_m$ verloren und 41% der Bcl-2 –

Zelllinie. 48 h nach Bestrahlung ist bei beiden Zelllinien in Übereinstimmung mit unseren zellbiologischen (siehe III.5.4.) und biochemischen Daten (siehe III.4.2.) bei beiden Zelllinien im gleichen Prozentsatz der Verlust von $\Delta\psi_m$ nachzuweisen.

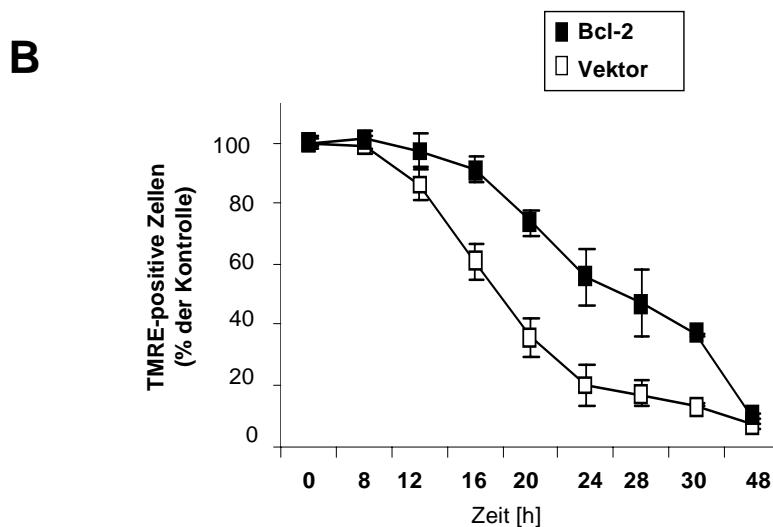
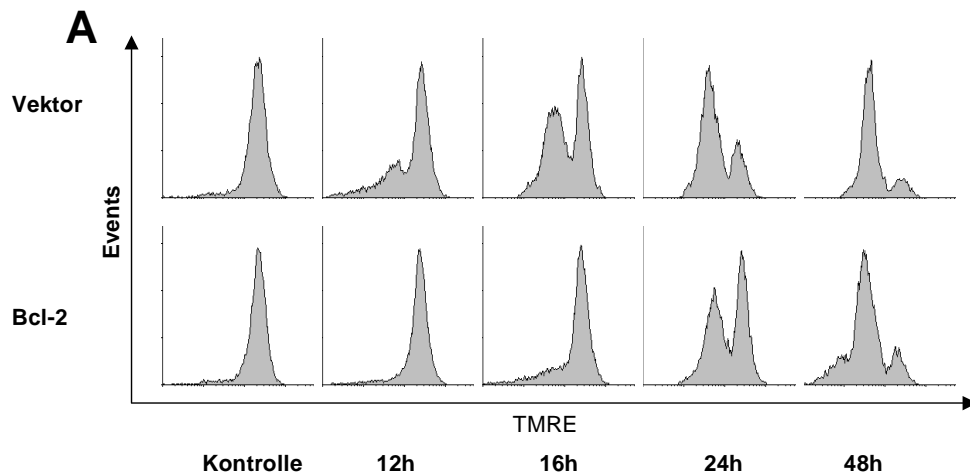


Abb. 22A: Mitochondriale Depolarisation nach PUVA (500 ng/ml 8-MOP; 1,5 J/cm² UVA). Repräsentativer Versuch, in dem die potentialabhängige Anfärbbarkeit des Mitochondriums mit TMRE betrachtet wird. In den Kontrollzellen beginnt der Verlust von $\Delta\psi_m$ 12-16h nach PUVA, also deutlich später als nach UVB. 48h nach PUVA beobachteten wir bei fast allen Kontrollzellen Verlust von $\Delta\psi_m$. Bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen ist ein verzögerter (beginnend zwischen 16-24h) aber letztlich auch vollständiger Verlust von $\Delta\psi_m$ detektierbar. B: zeigt die Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=5).

Die Zusammenfassung mehrerer Versuche zeigte, dass Bcl-2 überexprimierende Keratinozyten nach PUVA zwar in der Lage sind, ihr mitochondriales Transmembranpotential länger aufrechtzuerhalten als die Kontrollzellen, es aber zu späteren Zeitpunkten verlieren. Während 24 h nach Bestrahlung noch ein deutlicher Unterschied des mitochondrialen Transmembranpotentials erkennbar ist, sind nach 48h keine Unterschiede mehr detektierbar. Analog III.2. haben wir DiOC₆/PI-Doppelfärbungen durchgeführt, die ähnliche Ergebnisse zeigten (Abb. 23).

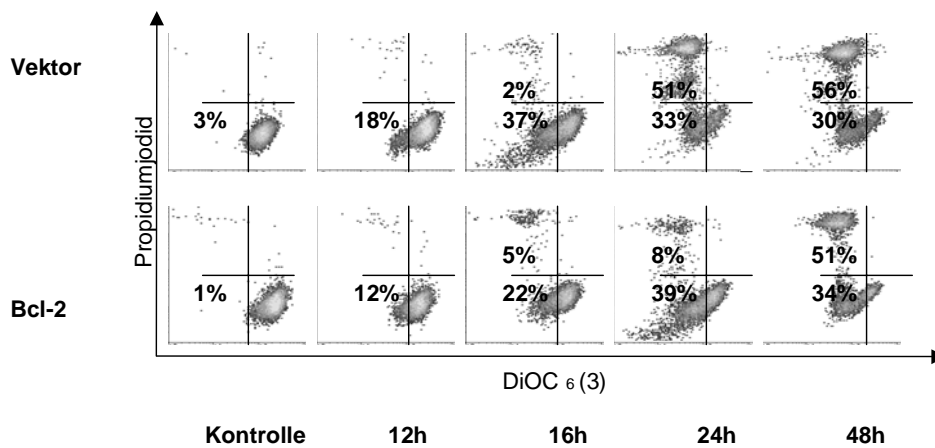


Abb. 23: Mitochondriale Depolarisation nach PUVA (500 ng/ml 8-MOP ; 1,5 J/cm² UVA), dargestellt mit DiOC₆/PI-Färbung. Die Kontrollzellen verlieren ihr Transmembranpotential beginnend 12-16 h nach PUVA, d.h. die Anfärbbarkeit mit DiOC₆ geht verloren. Erst zu späteren Zeitpunkten lassen sie sich mit PI anfärben. Die Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten sind zunächst vor $\Delta\psi_m$ -Verlust geschützt, verzögert kommt es jedoch auch hier zu einem Verlust der Anfärbbarkeit mit DiOC₆ und schliesslich zu PI-Positivität.

5.3. Untersuchung des klonogenen Potentials nach UVB-Bestrahlung

Als nächstes haben wir untersucht, ob die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen zellbiologischen und biochemischen Ergebnisse auch eine funktionelle Relevanz in Bezug auf die Proliferation der UVB- oder PUVA-bestrahlten Zellen haben. Dies ist deshalb von Bedeutung, da man weiss, dass UVB-Bestrahlung als auch

PUVA-Bestrahlung DNA-Schäden und damit Mutationen verursachen kann (Griffiths et al., 1998). Schwerwiegend mutagen beschädigte Zellen werden im Normalfall durch Apoptose eliminiert. Wir wollten nun herausfinden, ob die durch Bcl-2 vor Apoptose geschützten Zellen sich weiter teilen und so Mutationen potentiell an Tochterzellen weitergeben können. Dazu haben wir einen klonogenen Assay (siehe II.2.6.) durchgeführt. Ein Experiment ist hier repräsentativ dargestellt (Abb. 24).

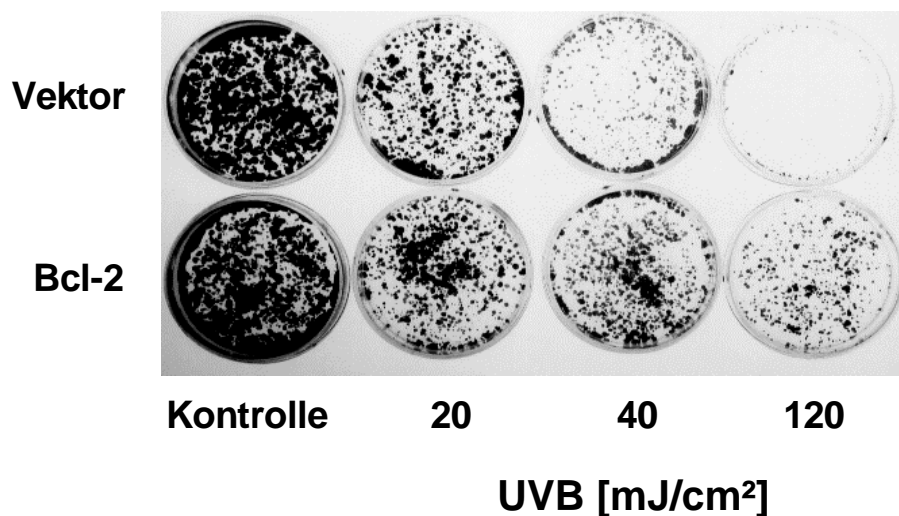


Abb. 24: Klonogenes Potential nach unterschiedlichen UVB-Dosen. Repräsentativ ist ein Versuch gezeigt. Eine Woche nach Bestrahlung wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Oben die Kontrollzellen, unten die Bcl-2 überexprimierenden Zellen, jeweils mit 40, 80 und 120 mJ/cm² bestrahlt. Bcl-2 vermittelt nach UVB auch klonogenen Schutz, bei den Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten (unten) sind deutlich mehr Kolonien zu erkennen.

Die Zusammenfassung mehrerer Versuche zeigt, dass schon bei der relativ niedrigen Dosis von 40 mJ/cm² (entspricht etwa der minimalen Erythem-Dosis) beide Zelllinien deutlich weniger Kolonien bilden, und zwar in etwa in gleichem Ausmass. Höhere Bestrahlungsdosen lassen jedoch einen Unterschied erkennen: Bcl-2 überexprimierende Zellen bilden bei 80 und 120 mJ/cm² signifikant mehr Kolonien aus als die Kontrollzellen (Abb. 25).

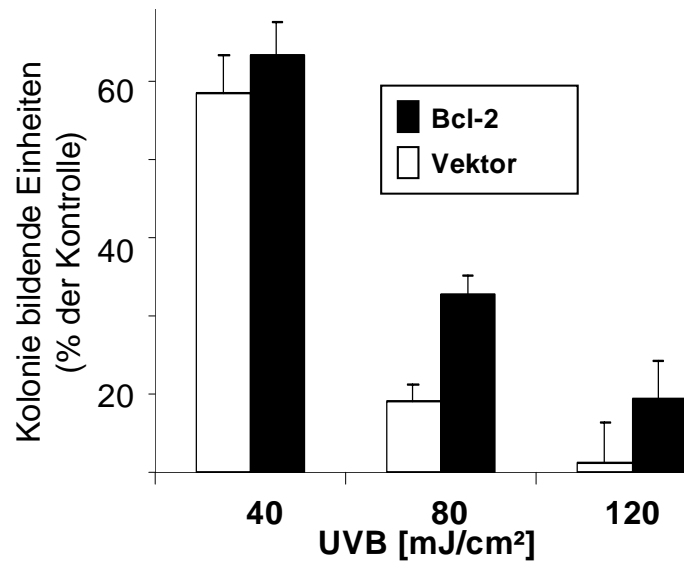


Abb. 25: Klonogenes Potential von Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten bzw. Kontrollzellen nach UVB-Bestrahlung. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung bei der Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=5).

5.4. Untersuchung des klonogenen Potentials nach PUVA-Bestrahlung

Es stellt sich nun die Frage, wie sich die Behandlung mit PUVA auf das klonogene Potential auswirkt (siehe II 2.6.).

Es liessen sich zwei Befunde erheben (Abb. 26, Abb. 27): Interessanterweise beginnen die Keratinozyten bereits nach einer niedrigen PUVA-Dosis (0,12 J/cm²) keine Kolonien mehr zu bilden. Ebenso kann Bcl-2 keinen signifikanten Schutz mehr ausüben.

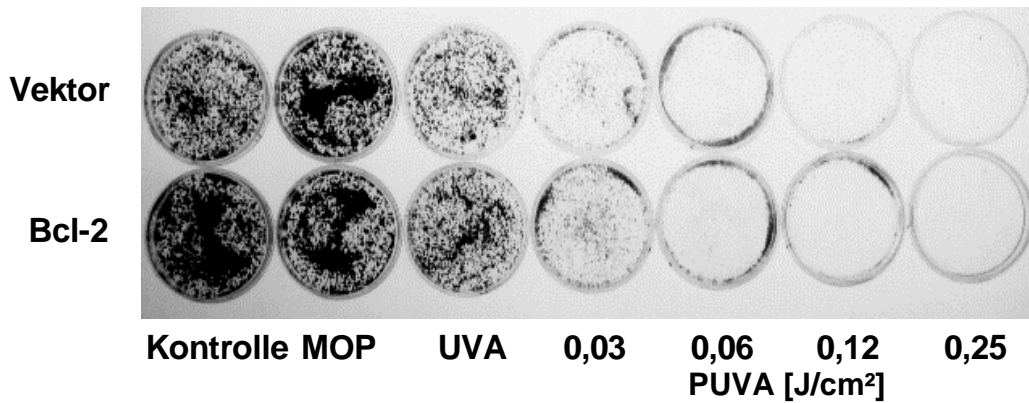


Abb. 26: Klonogenes Potential nach unterschiedlichen PUVA-Dosen. Repräsentativ ist ein Versuch gezeigt. Eine Woche nach Bestrahlung wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Oben die Kontrollzellen, unten die Bcl-2 überexprimierenden Zellen. Während 8-MOP und UVA alleine das klonogene Potential bei Kontroll- und Bcl-2 überexprimierenden Zellen nicht beeinflussen, ist die Fähigkeit, sich zu teilen und Kolonien zu bilden bei beiden Zelllinien gleich schon bei äusserst niedrigen PUVA-Dosen stark bis vollständig eingeschränkt.

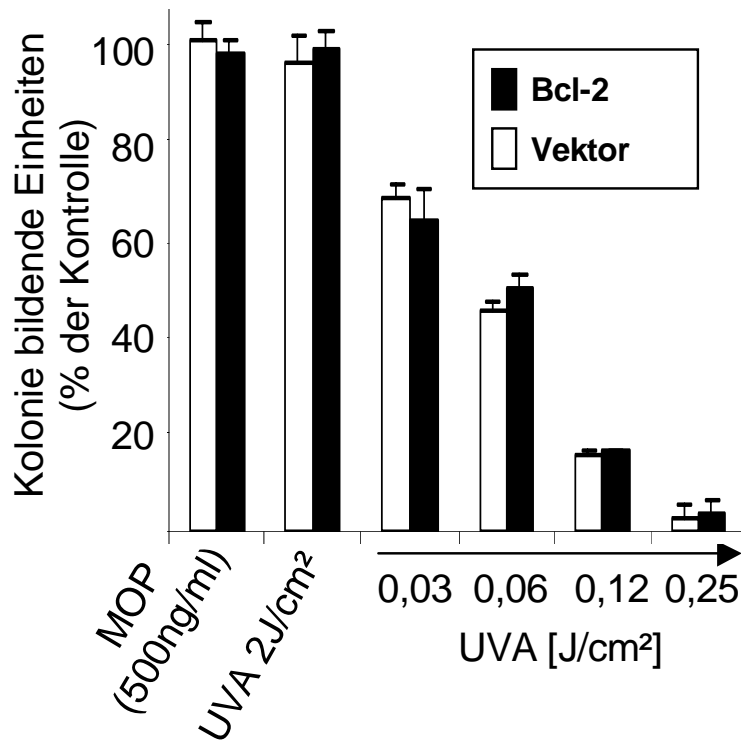


Abb. 27: Klonogenes Potential nach PUVA, es ist die Zusammenfassung mehrerer Versuche (n=6) dargestellt. 8-MOP und UVA alleine beeinflussen die Fähigkeit zur Koloniebildung nicht. Das klonogene Potential sowohl bei Kontroll- als auch bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen wird schon bei sehr niedrigen PUVA-Dosen verloren.

6. Vergleichende Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) nach verschiedenen Stimuli (UVB, PUVA, UVA, TRAIL)

Es wurde mehrfach beschrieben, dass reaktive Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle bei Proliferation und Zelltod spielen (Fiskum, 2000). Für einige Arten von Apoptose, darunter auch die UV-Bestrahlung wurde die erhöhte Bildung von ROS als frühes Ereignis nachgewiesen (Heck et al., 2003). In der Säugetierzelle wird ein Teil des Sauerstoffs in einer Weise reduziert, die die Entstehung von freien Radikalen (ROS) zur Folge hat. ROS werden gebildet bei Redoxreaktionen, an denen elektronenübertragende Substanzen wie Quinoline, ihre Phenol-Vorstufen, Metallkomplexe, aromatische Nitroverbindungen und konjugierte Imine beteiligt sind. Zu den ROS zählen u.a. das Superoxid-Anion, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikale. Diese entstehen in der Zelle während mitochondrialer und mikrosomaler Elektronentransportvorgänge durch NAD(P)H-Oxidasen und bestimmte Dioxygenasen und sind somit in Mitochondrien, in Peroxisomen und im Zytosol zu finden. (Lee and Wei, 2000; Jackson and Loeb, 2001). Aufgrund ihrer angeregten Elektronen treten ROS leicht in Interaktion mit zahlreichen Molekülen der Zelle (Droge, 2002). So können sie u.a. Peroxidation von Lipiden, Oxidation von Aminosäureresten (besonders Cysteinreste), Quervernetzung von Proteinen und oxidative DNA-Schäden auslösen. Diese Reaktionen können zu verändertem Zellwachstum oder veränderter Differenzierung führen (Thiele et al., 2001) und so der Zelle Schaden zufügen. Als Schutzmechanismus gegen freie Radikale besitzt die Zelle Moleküle mit antioxidativen Eigenschaften, zu denen z.B. Glutathion, Superoxiddismutase und Katalase gehören (Thannickal and Fanburg, 2000). Unter bestimmten pathologischen Bedingungen kann das dynamische Gleichgewicht zwischen

Bildung und Eliminierung von ROS gestört sein und damit zum Anstieg freier Radikale in der Zelle führen.

Wir haben für die von uns betrachteten Apoptoseinduktoren (UVB, PUVA, TRAIL) in allen untersuchten zellulären Modellen analysiert, wie die Generierung von ROS mit der Auslösung von Apoptose korreliert. Die behandelten Zellen wurden je zur Hälfte zur Untersuchung der ROS-Bildung mittels DHR-Färbung (siehe II.2.3.3.) und zur Analyse apoptotischer Zellen verwendet. DHR wird durch ROS, v.a. durch Superoxid, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit (Wei *et al.*, 2000) zu einem fluoreszierenden Produkt oxidiert und kann daher bei einer FACS Analyse quantifiziert werden. Nach Behandlung der HaCaT-Zellen mit 8-MOP kann man keine Bildung von ROS und auch keine Auslösung von Apoptose erkennen. UVA führt zwar zu einem deutlichen Anstieg intrazellulärer ROS, allerdings findet keine Apoptose statt. Nach Bestrahlung mit UVB und PUVA sind ROS deutlich nachweisbar. Diese Zellen zeigen in Übereinstimmung mit unseren bisherigen Ergebnissen eine starke Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen. Aus diesen Ergebnissen schliessen wir, dass die Generierung von ROS nicht mit der Apoptose-Induktion nach PUVA korreliert. Keine Rolle scheinen ROS dagegen bei der TRAIL-vermittelten Apoptose zu spielen, da wir keine Bildung von ROS nachweisen konnten (Abb. 28).

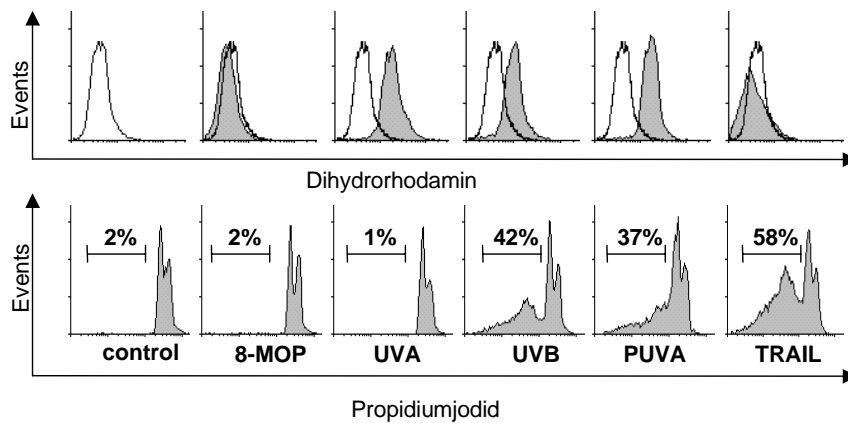


Abb. 28: Korrelation der Bildung von ROS und Apoptoseinduktion (siehe II.2.4.2.) in HaCaT-Keratinocyten nach verschiedenen Noxen. UVA, UVB und PUVA induzieren ROS, allerdings induziert UVA alleine keine Apoptose. TRAIL verursacht zwar Apoptose (58% hypodiploide DNA), scheint dies aber ohne detektierbare Beteiligung von ROS zu verursachen.

Nachdem einzelne Berichte eine wichtige antioxidative Funktion von Bcl-2 postulierten (Gottlieb et al., 2000; Madesh and Hajnoczky, 2001), haben wir auch die Bcl-2-überexprimierenden Zellen hinsichtlich der Bildung von ROS untersucht. Sowohl Kontrollzellen als auch Bcl-2-überexprimierende Zellen zeigten nach UVB (40 und 120 mJ/cm²) im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen eine deutliche Bildung von ROS (Abb. 29).

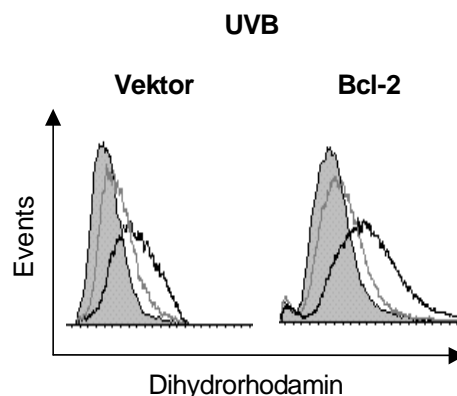


Abb. 29: Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen nach UVB. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach Bestrahlung mit 40 mJ/cm² (graue Linie) als auch 120 mJ/cm² (schwarze Linie) Bildung von ROS im Vergleich zur Kontrolle (grau ausgefüllt) zu erkennen.

Ein signifikanter Unterschied war auch in mehreren Wiederholungsversuchen nicht erkennbar, so dass Bcl-2 offenbar keinen Einfluss auf die ROS-Bildung nach UVB ausübt.

Ähnlich wie bei anderen Apoptoseinduktoren (z.B. UVB) wird Sauerstoffradikalen eine Beteiligung am programmierten Zelltod nach PUVA-Bestrahlung zugeschrieben. Unterscheiden sich Kontrollzellen und Bcl-2 überexprimierende Zellen in der Bildung von Sauerstoffradikalen nach PUVA-Behandlung? Vorexperimente konnten zeigen, dass 8-MOP alleine keine ROS induziert (Daten nicht gezeigt), während UVA-Bestrahlung alleine dagegen bei beiden Zelltypen eine deutliche Bildung von ROS zeigte. Behandlung mit PUVA führte sowohl bei Kontroll- als auch Bcl-2-überexprimierenden Zellen zu einem ähnlichen Resultat wie eine ausschliessliche UVA-Bestrahlung. Wir folgern daraus, dass Bcl-2 also nicht die Bildung von ROS in unserem experimentellem System beeinflusst.

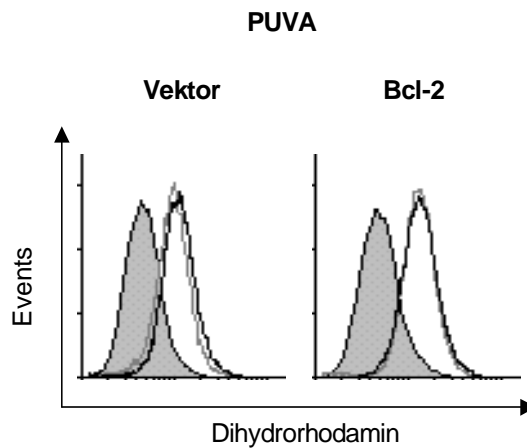


Abb. 30: Analyse der Bildung von Sauerstoffradikalen nach PUVA-Bestrahlung (schwarze Linie, 500 ng/ml 8-MOP ; 1,5 J/cm² UVA). Sowohl UVA-Bestrahlung alleine (graue Linie, 1,5 J/cm²) als auch PUVA-Bestrahlung induziert bei beiden Zelllinien in gleichem Ausmass Bildung von ROS im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen (grau ausgefüllt).

7. Auswirkung einer Bcl-2 auf die Freisetzung von Zytochrom c aus dem Mitochondrium nach UVB und PUVA

Man vermutet, dass zeitgleich, vielleicht auch vor der Depolarisation der Mitochondrien, Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt werden (van Loo et al., 2002). Wir haben deshalb die intrazytoplasmatische Freisetzung des für die Caspaseaktivierung benötigten Proteins Zytochrom c nach UVB und PUVA untersucht, um herauszufinden, ob Bcl-2 diese Freisetzung beeinflusst.

7.1. Auswirkung von Bcl-2 auf die Zytochrom c-Freisetzung nach UVB-Bestrahlung

Bei den Kontrollzellen war bereits 2 h nach Bestrahlung deutlich eine Zytochrom c-Freisetzung ins Zytosol nachweisbar, während Bcl-2-exprimierende Zellen erst mit einer Verzögerung Zytochrom c ins Zytosol freisetzen. Um sicherzugehen, dass bei der angewandten Methode (siehe II.2.5.2.2.) nur die Zellmembran permeabilisiert wurde, nicht aber die mitochondriale Membran, verwendeten wir als Kontrolle einen Antikörper gegen Zytochrom c-Oxidase. Damit kann sichergestellt werden, dass tatsächlich freigesetztes Zytochrom c in der zytosolischen Fraktion gemessen wird, nicht aber irrtümlich durch Lyse des Mitochondriums im Lysat befindliches Zytochrom c. Zytochrom c-Oxidase ist ein intramitochondriales Protein der Atmungskette, das im Zytosol nicht vorkommt. Es ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, und reduziert als letztes Enzym der Atmungskette Dioxygen zu Wasser, wobei Protonen durch die innere

Mitochondrienmembran gepumpt werden (Maneg et al., 2003; Tsukihara et al., 2003).

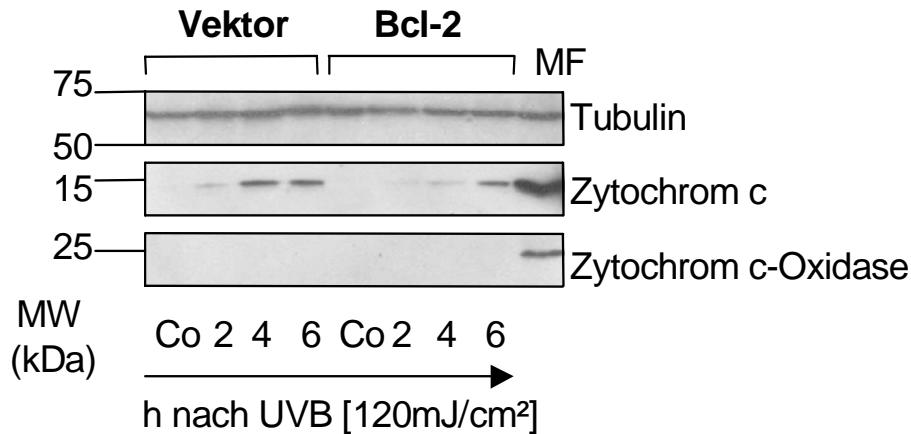


Abb. 31: Zytochrom c-Freisetzung nach UVB-Bestrahlung. Bei den Kontrollzellen ist schon 2 h nach UVB-Bestrahlung eine deutliche Freisetzung von Zytochrom c ins Zytosol zu erkennen, bei Bcl-2 überexprimierenden konnten wir auch Zytochrom c-Freisetzung nachweisen, allerdings mit gering verzögerter Kinetik. Rechts ist die mitochondriale Fraktion (MF) als Positivkontrolle für Zytochrom c aufgetragen. Zum Nachweis, dass tatsächlich nur die zytosolischen Fraktionen analysiert wurden, ist unten derselbe Western Blot zum Nachweis der Zytochrom c-Oxidase dargestellt. Zytochrom c-Oxidase ist nur bei der MF sichtbar. Oben ist als Ladekontrolle Tubulin gezeigt.

Nur bei der mitochondrialen Fraktion kann man Zytochrom c-Oxidase nachweisen, was zeigt, dass unsere Lyse-Bedingungen nicht zur Freisetzung intramitochondrialer Proteine führen. Ausserdem wurde als Ladekontrolle die Membran mit Anti-Tubulin-Antikörper inkubiert (Abb. 31).

7.2. Einfluss von Bcl-2 auf die Zytochrom c-Freisetzung nach PUVA-Bestrahlung

Analog zur späteren Detektierbarkeit des Abfalls des mitochondrialen Transmembranpotentials und der Aktivierung von Caspasen nach PUVA-Bestrahlung (siehe III.4.2. und III.5.2.) findet auch die Freisetzung von Zytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol im Vergleich zu den

Ergebnissen nach UVB-Bestrahlung mit Verzögerung statt. 2-4 h nach PUVA-Bestrahlung konnten wir mit unserer Methode kein Zytosom c im Zytosol nachweisen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wählten wir nach mehreren Vorversuchen hier wesentlich spätere Zeitpunkte nach der Bestrahlung aus, als dies bei UVB-Bestrahlung der Fall war. Dabei konnten wir beginnend ab 6 h nach Bestrahlung eine Freisetzung von Zytosom c ins Zytosol detektieren, während die Bcl-2 überexprimierenden Zellen erst mit einer weiteren Verzögerung Zytosom c ins Zytosol freisetzen (Abb. 32).

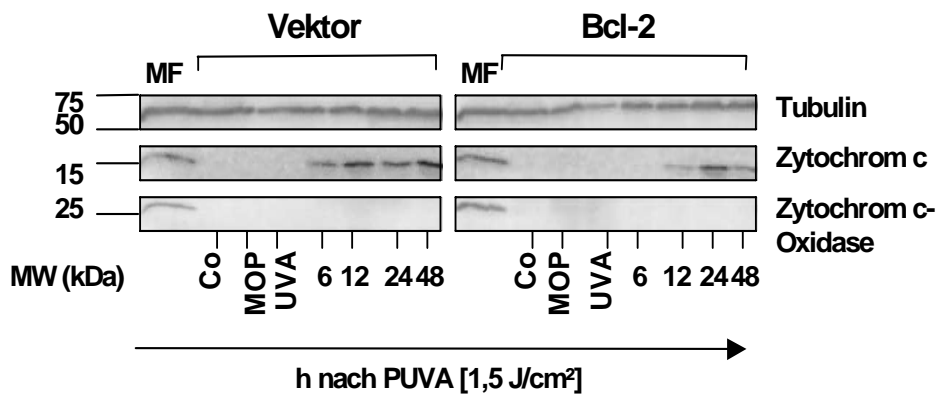


Abb. 32: Zytosom c-Freisetzung nach PUVA-Bestrahlung. Nach 8-MOP und UVA alleine liess sich bei beiden Zelltypen keine Zytosom c-Freisetzung detektieren. Bei den Kontrollzellen ist schon 6 h nach PUVA Zytosom c im Zytosol nachweisbar, bei Bcl-2 überexprimierenden Zellen wird dieses Protein verzögert freigesetzt. Links ist die mitochondriale Fraktion (MF) als Positivkontrolle für Zytosom c aufgetragen. Zum Nachweis, dass tatsächlich nur die zytosolischen Fraktionen betrachtet wurden, ist dieselbe Membran mit Zytosom c-Oxidase rehybridisiert worden. Zytosom c-Oxidase ist nur bei der MF sichtbar. Als Ladekontrolle wurde die Membran noch mit Tubulin rehybridisiert.

IV. DISKUSSION

Die vorgelegte Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Proteins Bcl-2 während der Apoptose-Induktion durch Stimuli wie UV-Bestrahlung und Todesliganden. Als zelluläres Modell haben wir dazu HaCaT-Keratinocyten ausgewählt. Keratinocyten stellen die natürlichen Zielzellen von UV-Strahlung in der menschlichen Haut dar. Immortalisierte HaCaT-Keratinocyten, die häufig für *in vitro* Versuche verwendet werden, stellen eine Zelllinie mit hohem Differenzierungspotential dar (Boukamp *et al.*, 1988; Polakowska *et al.*, 1994; Breitkreutz *et al.*, 1998). Der Anteil der UV-Strahlung mit vermutlich höchstem karzinogenen Potential ist das UVB (280-320nm) und in geringerem Masse UVA (320-400nm (Assefa *et al.*, 1997). Seit längerer Zeit ist klar, dass UVB-Strahlung auch Apoptose auslösen kann (Ziegler *et al.*, 1994). Jedoch kann manchmal ein Stimulus sowohl Apoptose als auch Nekrose verursachen, was z.T. von der ATP-Konzentration in der Zelle abhängig zu sein scheint (Leist *et al.*, 1997). Apoptose und Nekrose können daher auch nebeneinander ablaufen. Deshalb ist es wichtig zu wissen, ob in unseren Versuchen apoptotische oder nekrotische Zellen untersucht werden. Seit der Begriff Apoptose 1972 von Kerr *et al.* definiert wurde, wurden unterschiedliche Methoden beschrieben, um den programmierten Zelltod von Nekrose abzugrenzen (Dive *et al.*, 1992). Einige davon sind z.B. der Nachweis der Phosphatidylserinexposition auf die Zelloberfläche mittels Annexin V-Färbung (Koopman *et al.*, 1994), die Propidiumjodid-Färbung nach Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991) oder der Nachweis der internukleosomalen DNA-Fragmentierung. Mit diesen drei Methoden konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass unter unseren Versuchsbedingungen sowohl

durch UVB als auch durch PUVA Apoptose ausgelöst wird (Abb. 7, 8, 9). Die Intensität von UVB, mit der wir unsere Zellen bestrahlten, entspricht etwa der doppelten bis dreifachen minimalen Erythemdosis (MED) und liegt damit im physiologischen Bereich, die Intensität von PUVA entspricht in etwa der therapeutisch angewandten Dosis, was für die physiologische Relevanz unserer Befunde spricht.

Man nimmt an, dass Proteine der Bcl-2-Familie eine Schlüsselposition bei der Auslösung von Apoptose spielen (Gross *et al.*, 1999a; Coultas and Strasser, 2003). Expression des Proto-Onkogens Bcl-2 verhindert Apoptose in vielen Zelltypen (Pincelli *et al.*, 1997). Bcl-2 ist in der Zelle v.a. in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Krajewski *et al.*, 1993) und wirkt inhibierend auf ein frühes Ereignis im Ablauf des programmierten Zelltods (Reed, 1994). Es wurde auch beschrieben, dass Überexpression von Bcl-2 in Keratinozyten diese gegenüber spontaner und UV-induzierter Apoptose resistent macht (Pincelli and Marconi, 2000; Qin *et al.*, 2002). In der Epidermis lässt sich Bcl-2 nur in den basalen Keratinozyten nachweisen (Pincelli *et al.*, 1997). Wir zeigten in unseren Versuchen, dass Bcl-2 transfizierte Keratinozyten (Abb. 12) vor UVB- und PUVA-induzierter Apoptose schützt, nicht jedoch vor programmiertem Zelltod durch Todesliganden wie TRAIL oder CD95-Ligand (Abb. 13, 14, 16, 17). Es stellt sich daher die Frage, auf welcher Ebene dieser Schutz vermittelt wird. Wir haben in dieser Arbeit die Fragen bearbeitet, ob dieser Schutz womöglich durch Blockierung der Bildung von Sauerstoffradikalen, auf der Ebene des Mitochondriums (Depolarisation oder Zytocrom c-Freisetzung) oder durch Inhibierung der Caspase-Aktivierung vermittelt wird.

Proteine der Bcl-2 Familie können die Bildung von mitochondrialen ROS regulieren (Gottlieb *et al.*, 2000) und die durch ONOO⁻ verursachte Zytochrom c-Freisetzung von isolierten Mitochondrien distal der ONOO⁻ - Bildung inhibieren (Ghafourifar *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass es nach UV-Strahlung zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (wie O₂⁻, H₂O₂, NO, ONOO⁻) in der Zelle kommt (Peus *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). Auch wir konnten dies mittels Dihydrorhodamin-Färbung im FACS in unserem experimentellen System bestätigen. Bestrahlung mit UVB, PUVA, aber auch mit UVA alleine erhöht die Konzentration reaktiver Sauerstoffmetabolite intrazellulär (Abb. 28). TRAIL scheint zumindest mit dieser Methode keine nachweisbare Induktion von ROS zu bewirken. Im Gegensatz dazu ist beschrieben, dass TNF α ROS induziert (Sakon *et al.*, 2003). Dies führt in murinen embryonalen Fibroblasten zu verlängerter Aktivierung von MAP-Kinasen und sowohl zu nekrotischem als auch zu apoptotischen Zelltod. Es konnte dabei gezeigt werden, dass antioxidative Substanzen nekrotischen, aber nicht apoptotischen Zelltod verhindern (Sakon *et al.*, 2003), was dafür spricht, dass ausser ROS auch noch andere Faktoren am programmierten Zelltod beteiligt sind.

Die Frage, inwieweit die Generierung von Sauerstoffradikalen am programmierten Zelltod nach UVB beteiligt ist, ist noch offen. In unseren Experimenten konnten wir auch nach UVA-Bestrahlung alleine, bei der in dem von uns verwendeten Dosisbereich keine DNA-Fragmentierung, also keine Apoptose, aber auch kein Verlust der Proliferationsfähigkeit stattfindet, deutlich die Akkumulation intrazellulärer Sauerstoffmetabolite nachweisen. Die Bildung von ROS nach UVA steht dabei im Einklang zu bereits beschriebenen

Ergebnissen (Tobi et al., 2000). Allerdings besteht in unseren Experimenten keine Beziehung zwischen detektierter ROS-Bildung und Zelltod, was eine wesentliche Beteiligung unwahrscheinlich macht.

Unsere Experimente zeigten weiterhin, dass nach UVB- und nach PUVA-Bestrahlung die Bildung von Sauerstoffmetaboliten in Bcl-2 überexprimierenden Zellen ebenso wie in Kontrollzellen ähnlich hoch ist. Das steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die beschreiben, dass Bcl-2 die Generierung von ROS blockiert (Fleury et al., 2002; Howard et al., 2002). Man kann daher aus unseren Beobachtungen die Schlussfolgerung ziehen, dass in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung Bcl-2 zwar nicht die Bildung von Sauerstoffmetaboliten reduziert, aber evtl. „downstream“-Ereignisse blockiert, die durch die produzierten ROS ausgelöst werden können. Um die Rolle der ROS bei der UV-vermittelten Apoptose zu beleuchten, sind daher weitere Versuche, ggf. auch in der Gegenwart von Caspase-Inhibitoren, notwendig. Man könnte z.B. untersuchen, welche unterschiedlichen Sauerstoffmetabolite gebildet werden. Mit der von uns verwendeten Dihydrorhodamin-Färbung kann man nicht zwischen unterschiedlichen ROS differenzieren (Peus et al., 1998; Peus *et al.*, 2000). Dies wäre für die weitergehende Fragestellung wichtig, da auch Ergebnisse vorliegen, die belegen, dass unterschiedliche ROS verschiedene Reaktionen auslösen: So wurde z.B. gezeigt, dass in HepG2-Zellen O_2^- Zytochrom c-Freisetzung verursacht, während dies durch H_2O_2 nicht geschieht (Madhesh *et al.*, 2001). Desweiteren könnte man Experimente anschliessen, in denen man die Induktion von Sauerstoffmetaboliten durch Substanzen wie Acetylcystein (Mayer and Noble, 1994), Glutathion, Ascorbinsäure (Wei *et al.*, 2000) oder Vitamin E

Analoga (Peus *et al.*, 2000;Tobi *et al.*, 2000) hemmt und dann untersucht, ob dies die Apoptose-Empfindlichkeit modifiziert.

Der Fokus unserer Experimente über die UV-induzierte Keratinozyten-Apoptose war auf die Analyse mitochondrialer Signalwege gerichtet, da diese eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielen. Wir stellten uns zunächst die Frage, ob durch UVB und PUVA überhaupt mitochondriale Signalwege der Apoptose aktiviert werden. Mitochondriale Depolarisation als wichtiges Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes kann im FACS mit unterschiedlichen Fluorochromen gemessen werden (Green and Reed, 1998;Mignotte and Vayssiere, 1998). Wir konnten zeigen, dass UVB und PUVA in Keratinozyten eine verzögerte Depolarisation des Mitochondriums auslöst (Abb. 10, 11). Es handelt sich damit nach D. Godar, die eine sofortige Apoptose, welche nach dem Stimulus keine Proteinsynthese mehr benötigt, von einer verzögerten Form der Apoptose, welche nach dem Stimulus Proteinsynthese erfordert, unterscheidet, um die verzögerte Form der Apoptose (Godar, 1996). Weiterhin fiel auf, dass bei in ähnlichem Masse zytotoxisch wirkenden Bestrahlungsdosen PUVA wesentlich später als UVB eine mitochondriale Depolarisation auslöst. Während wir bei UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen bereits 6h nach dem Stimulus den beginnenden Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials zeigen konnten, ist dies bei PUVA-bestrahlten Zellen erst 14h nach dem Stimulus der Fall. Die in Keratinozyten detektierbaren Kinetiken nach Bestrahlung mit UVB und PUVA sind in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Gruppen, die die Blockierung von DNA-Synthese, der Reduktion der Mitoserate und der Thymidin-Aufnahme nach UVB und PUVA in Keratinozyten untersucht haben (Hashimoto *et al.*, 1995).

Wie können diese unterschiedlichen Kinetiken erklärt sein? Es ist bekannt, dass UVB und PUVA unterschiedliche Art von DNA-Schäden verursachen. Während UVB-Bestrahlung v.a. die Bildung von Cyclobutyl-Pyrimidin-Dimeren und Pyrimidin(6-4)Pyrimidonen induziert (Zhang et al., 1997), führt PUVA zu DNA-Quervernetzungen (Sage and Bredberg, 1991). All diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass beide Stimuli (UVB und PUVA) über unterschiedliche Wege Apoptose induzieren könnten. Über welche konkreten Mechanismen PUVA, die sehr wirkungsvoll hyperproliferative Keratinozyten in der Epidermis (z.B. bei Psoriasis) eliminiert, wirkt, ist noch wenig erforscht. In einigen Studien wurde, analog zu unseren Beobachtungen in HaCaT-Keratinozyten (Abb. 7 - 9), gezeigt, dass PUVA-Bestrahlung in menschlichen Lymphozyten und bei kutanen T-Zell-Lymphomen Apoptose auslöst (Miracco et al., 1997; Morita et al., 1997). Weiterhin wurde auch DNA-Fragmentierung nach PUVA in der Epidermis von Rattenhaut beobachtet (Iwasaki et al., 1996). Die genauen Apoptosewege nach PUVA und daran beteiligte Moleküle sind jedoch im Gegensatz zu den Signalwegen der UVB-induzierten Apoptose weniger bekannt. Es liegen Hinweise vor, dass Wechselwirkungen mit p53 und Fas bzw. FasLigand wichtig für PUVA-induzierte Apoptose sein könnten (Santamaria et al., 2002) und dies einen Unterschied zu UVB induzierter Apoptose darstellen könnte (Abb. 33). Das Tumorsuppressorprotein p53, auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, kann den Zellzyklus am Übergang von der G1 zur S-Phase unterbrechen, um notwendige Reparaturen zu ermöglichen oder, wenn dies aufgrund zu grosser Schäden nicht möglich ist, Apoptose auslösen (Pietenpol and Stewart, 2002; Fei and el Deiry, 2003). Bestimmte UV-Wellenlängenbereiche und andere DNA-Noxen können eine Erhöhung der intrazellulären Spiegel von p53 verursachen

(Campbell et al., 1993). Zum einen kann p53 dann p21^{Waf1/Cip1} aktivieren, welches an Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) bindet und diese damit inaktiviert. Dadurch wird der Zellzyklus angehalten und DNA-Reparatur ermöglicht (el Deiry et al., 1993). Zum anderen kann p53, wenn der DNA-Schaden irreparabel ist, Gene aktivieren, die für den Ablauf des Apoptoseprogramms wichtig sind (Bates and Vousden, 1996). Santamaria et al. konnten in *in vitro* und *in vivo*-Experimenten zeigen, dass p53 für die PUVA-vermittelte Apoptose wichtig ist (Santamaria *et al.*, 2002). Aber es wurde auch beobachtet, dass Apoptose unabhängig von p53-Aktivierung ausgelöst werden kann (Gniadecki et al., 1997). Hier gilt anzumerken, dass HaCaT-Zellen, die wir in unseren Experimenten verwendeten, mutantes p53 besitzen, welches aber immer noch eine Rolle bei der Apoptose spielen könnte (Assefa et al., 2003). Ein weiterer von uns nicht untersuchter Effekt nach UV-Bestrahlung ist die Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPK), u.a. ERKs, JNKs und p38 MAPK (Chen et al., 1996; Assefa *et al.*, 1997; Peus et al., 1999). So wurden verschiedene Effekte von JNKs und ERKs, abhängig von UV-Wellenlänge und Zelltyp, beschrieben. So soll z.B. die Aktivierung von p38 MAPK eine wichtige Rolle bei UVB-induzierter Zytocrom c-Freisetzung spielen (Shimizu et al., 1999; Assefa et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass PD169316, ein spezifischer Inhibitor der p38 MAPK, abhängig von der Dosis der UVB-Strahlung, die Zytocrom c-Freisetzung beeinflusst (Assefa *et al.*, 2003). Zur Rolle von MAPK bei PUVA liegen aktuell noch keine Daten vor. UVB und PUVA könnten daher auch über diese Wege ganz unterschiedlich regulierende Effekte auf den programmierten Zelltod ausüben. Hierzu sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig, um zu verstehen, über welche differentiellen Mechanismen der Signaltransduktion PUVA- bzw. UVB-Bestrahlung abläuft.

So kann klarer erkannt werden, wie der therapeutische Effekt von PUVA oder UVB-Bestrahlung bei Hauterkrankungen erklärt werden kann oder wie potentielle Nebenwirkungen vermieden werden können.

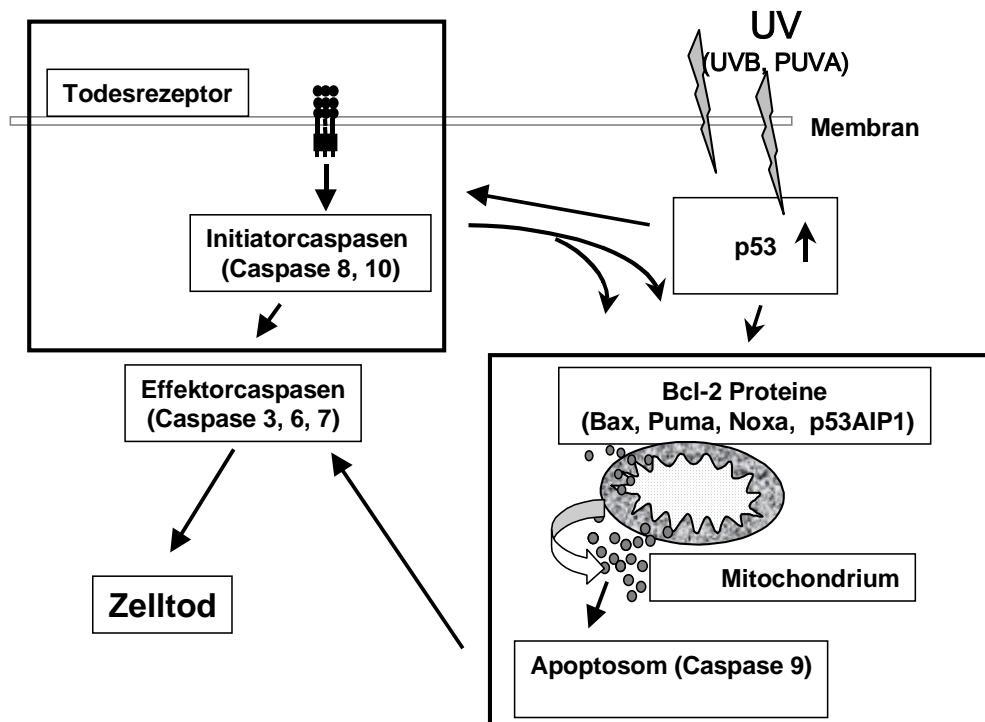


Abb. 33: Intrinsischer und extrinscher Signalweg der Apoptose und mögliche Verknüpfungen (z.B. über p53), die auch bei PUVA-induzierter Apoptose eine wichtige Rolle spielen könnten.

Es ist bekannt, dass Proteine wie SMAC/Diablo, AIF und Zytocrom c aus dem Mitochondrium freigesetzt werden und dass es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kommt (Desagher *et al.*, 2000; Waterhouse *et al.*, 2002). Um zu sehen, ob dies auch bei UV-induzierter Keratinozytenapoptose der Fall ist, und wo Bcl-2 bei diesem Prozess regulierend beteiligt ist, untersuchten wir insbesondere das Verhalten des mitochondrialen Transmembranpotentials und die Freisetzung von Zytocrom c. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Bcl-2 schützt Keratinozyten vor dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials nach UVB-Bestrahlung (Abb. 20, 21), und die Zellen erhalten ihr proliferatives Potential (Abb. 24, 25). Ebenso schützt Bcl-2 vor dem Abfall des Transmembranpotentials nach PUVA-Bestrahlung. Allerdings verzögert Bcl-2 nur die Depolarisation (Abb. 22, 23), so dass die Überschreitung des „points of no return“ der Apoptose durch Bcl-2 nach PUVA-Bestrahlung nicht blockiert wird. In Konkordanz dazu konnten wir nachweisen, dass PUVA-bestrahlte Zellen bereits nach sehr niedrigen Dosen in ihrer proliferativen Kapazität gehemmt sind (Abb. 26, 27). Sowohl nach UVB als auch nach PUVA kann Bcl-2 die Freisetzung von Zytochrom c verzögern, verhindert sie allerdings nicht (Abb. 31, 32).

Aus diesen Befunden lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ziehen: Der durch UVB aktivierte Apoptose-Signalweg läuft hauptsächlich über das Mitochondrium. Die Blockierung der UVB-induzierten mitochondrialen Depolarisation durch Bcl-2 hemmt die Apoptose. Bei PUVA-induzierter Apoptose scheint das Mitochondrium zwar eine wichtige Rolle zu spielen, allerdings können Depolarisation und letztendlicher Zelltod nicht verhindert werden. Es scheint, dass hier noch andere Bcl-2-unabhängige Signalwege von Bedeutung sind (Green and Evan, 2002). Um mehr über die noch wenig erforschten Mechanismen, die bei PUVA-vermittelter Apoptose aktiviert werden, herauszufinden, sind daher weitere Experimente notwendig.

Bei dem mitochondrialen Signalweg der Apoptose wird neben Proteinen wie SMAC/Diablo und AIF auch Zytochrom c aus dem Intermembranraum ins Zytosol freigesetzt (van Loo *et al.*, 2002). Das Mitochondrium besteht aus einer

inneren und einer äusseren Membran, welche unterschiedliche Durchlässigkeit und Selektivität für Proteine besitzen. Es gibt mehrere Erklärungsmodelle dafür, über welche Mechanismen die Zytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium ins Zytosol erfolgen könnte und welche Rolle dabei das mitochondriale Transmembranpotential spielt (Waterhouse *et al.*, 2002): Die Permeabilisierung der äusseren Membran (z.B. durch Ca^{2+} und andere Chemikalien) (Hunter and Haworth, 1979) führt zur Bildung des sogenannten PTP (permeability transition pore), die für Moleküle $< 1,5$ kD durchlässig ist. Als Folge davon geht das Transmembranpotential verloren, was zur Schwellung und Ruptur der äusseren Membran führt (Bernardi *et al.*, 1999). Daraufhin werden Proteine aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma freigesetzt. Untersuchungen, die zeigen, dass der Verlust von $\Delta\psi_m$ und das Auftreten proapoptotischer Proteine wie Zytochrom c aus dem Intermembranraum parallel verlaufen und durch Bcl-2 inhibierbar sind (Yang *et al.*, 1997) unterstützen dieses Modell. Im Gegensatz dazu könnte auch eine mitochondriale Hyperpolarisation die Zytochrom c-Freisetzung verursachen (Vander Heiden *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass dabei der VDAC (voltage dependent anion channel) schliesst und damit den Austausch von ATP und ADP aus dem und ins Mitochondrium verhindert (Vander Heiden *et al.*, 1997). Dies führt zu einer Erhöhung des mitochondrialen Transmembranpotentials (Hyperpolarisation), was letztendlich Schwellung, Ruptur der mitochondrialen Matrix und damit wiederum Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum zur Folge hat (Waterhouse *et al.*, 2001). Ein drittes Modell nimmt an, dass die Freisetzung von Zytochrom c und von anderen Intermembranproteinen, die Apoptose auslösen, durch Interaktion von Mitgliedern der Bcl-2-Familie, u.a. BH3-Proteine wie BID, BAX und BAD,

verursacht wird. Es existieren Hinweise, dass diese Bcl-2-Proteine interagieren und so grosse Poren in der äusseren Mitochondrienmembran formen (Chou et al., 1999;McDonnell et al., 1999b). Einmal freigesetzt, bindet Zytochrom c im Zytosol an APAF 1 bindet und ändert dessen Konformation. Der APAF 1-Zytochrom c-Komplex bindet dann ATP und bildet zusammen mit diesem das sogenannte Apoptosom, das zur Aktivierung von Procaspase 9 führt (Jiang and Wang, 2000;Chandra and Tang, 2003). In anderen Untersuchungen wurde mehrfach gezeigt, dass Freisetzung von Zytochrom c und Veränderungen des Transmembranpotentials unabhängig voneinander ablaufen (Bossy-Wetzel et al., 1998;Krohn et al., 1999). In unseren Versuchen beobachteten wir, dass Bcl-2 die Depolarisation des Mitochondriums nach UVB-Bestrahlung blockiert, die Freisetzung von Zytochrom c aber nur verzögert und insgesamt nicht verhindert. Es lässt sich daher vermuten, dass nach UVB-Bestrahlung durch Bcl-2 die Integrität der inneren Mitochondrienmembran, die notwendig für die Aufrechterhaltung des Transmembranpotentials ist, erhalten bleibt. Es ist bekannt, dass auch nach erfolgter Freisetzung von Zytochrom c ins Zytosol ausreichend Zytochrom c im Mitochondrium vorhanden sein kann, um die Funktion der Atmungskette und damit ein stabiles Transmembranpotential zu garantieren, d.h. die mitochondriale Struktur wird aufrecht erhalten (von Ahsen et al., 2000). Es ist möglich, dass eine bestimmte zytoplasmatische Konzentration von Zytochrom c überschritten werden muss, um das Apoptosom zu aktivieren. Daher könnte es sein, dass die Freisetzung geringer Mengen von Zytochrom c (z.B. während des normalen mitochondrialen „Turnover“) noch nicht notwendigerweise Apoptose verursacht (Deshmukh and Johnson, Jr., 1998;Neame et al., 1998). Mit unserer Methode (Western Blot zum Zytochrom c Nachweis) können wir keine

quantitativen Aussagen über die freigesetzte Menge von Zytocrom c machen. Ausserdem ist bei Experimenten, in denen eine unter Umständen inhomogene Population von Zellen betrachtet wird, nicht möglich zu unterscheiden, ob das freigesetzte Zytocrom c von einzelnen Zellen stammt, die komplett Zytocrom c freisetzen oder ob in allen Zellen der Population jeweils eine geringe Menge an Zytocrom c freigesetzt wird. Um das herauszufinden, wären Einzellanalysen mit konfokalmikroskopischer Bestimmung der Zytocrom c-Freisetzung notwendig. Mit Hilfe derartiger Methoden wurde beschrieben, dass die Freisetzung von Zytocrom c beim programmierten Zelltod ein sehr frühes Ereignis ist, und dass in apoptotischen Zellen eine vollständige Freisetzung von Zytocrom c aus dem Mitochondrium erfolgt (Goldstein et al., 2000). Allerdings zeigt unsere Beobachtung, dass Bcl-2 überexprimierende Keratinozyten trotz verzögerter Zytocrom c-Freisetzung nach UVB ihr klonogenes Potential erhalten. Damit muss ein Mechanismus existieren, der die Integrität der äusseren Membran wiederherstellen kann, so dass erneut Zytocrom c in den Mitochondrien akkumulieren kann (Kluck et al., 1999;Goldstein *et al.*, 2000). Dass Freisetzung von Zytocrom c ins Zytosol nicht immer zur Induktion von Apoptose führt, und Zellen danach überleben können, ist mehrfach veröffentlicht worden (Dorstyn et al., 2002;Zimmermann et al., 2002). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen jedoch beschreiben manche Autoren eine Stimulus-abhängige Hemmung der Zytocrom c-Freisetzung durch Bcl-2 (Green *et al.*, 1998;Zhuang et al., 1998). In Experimenten mit isolierten Mitochondrien und lebenden Zellen konnten proapoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie die Freisetzung von Zytocrom c und anderen Proteinen aus dem Intermembranraum regulieren ohne die Depolarisation oder Schwellung der mitochondrialen Matrix zu induzieren

(Shimizu *et al.*, 1999;McDonnell *et al.*, 1999a). Dies steht im Gegensatz zu Modellen, die auf der Schwellung der mitochondrialen Matrix oder Ruptur der äusseren Membran (PTP, Hyperpolarisation) als Mechanismus für die Zytochrom c-Freisetzung beruhen (von Ahsen *et al.*, 2000). Bcl-2 könnte daher nach UVB durch Verhinderung der Zytochrom c-getriggerten Effektorcaspase-Aktivierung die Spaltung von BID hemmen und so einen Verstärkungsmechanismus für die Induktion von Apoptose blockieren (Slee *et al.*, 2000;Pinkoski *et al.*, 2001). So könnte bei hoher Bcl-2-Expression das UVB-induzierte, am Mitochondrium wirkende Signal nicht ausreichend sein, um programmierten Zelltod zu induzieren. Es wurde kürzlich ein neuer Weg beschrieben, der unabhängig von der Aktivierung von Caspasen zur Freisetzung von Zytochrom c führt und an der die Aktivierung von p38 MAP-Kinasen (MAPK) beteiligt ist (Green *et al.*, 1998;Assefa *et al.*, 2000). Ausserdem könnte es sein, dass ausser Zytochrom c zusätzlich die Freisetzung weiterer Proteine wie SMAC/Diablo, AIF oder Endonuklease G aus dem mitochondrialen Intermembranraum notwendig ist, um Apoptose zu induzieren (Du *et al.*, 2000;Ekert *et al.*, 2001). Um dies zukünftig weiter aufzuklären, könnte man z.B. untersuchen, ob auch nach UVB- und PUVA-Bestrahlung diese Proteine freigesetzt werden und wenn ja, wie sich die Hemmung der bislang nur unvollständig verstandenen Effektorfunktion einzelner Proteine auf UVB oder PUVA-Apoptose auswirkt.

Sowohl der extrinsische (Todesrezeptoren-vermittelte) als auch der intrinsische (über das Mitochondrium laufende) Signalweg münden in eine gemeinsame Endstrecke, die Aktivierung von Effektor-Caspasen (Budihardjo *et al.*, 1999;Slee *et al.*, 1999). Caspasen können auf vier verschiedenen Wegen aktiviert werden:

durch Spaltung von anderen Caspasen oder durch Autoaktivierung (Stennicke et al., 1998), durch Spaltung von Granzym B (Van de et al., 1997), was insbesondere in zytotoxischen T-Lymphozyten von Bedeutung ist, durch Todesrezeptor-assoziierte Komplexe (Medema *et al.*, 1997) oder durch die Zytochrom c-vermittelte Aktivierung von APAF-1 (Wolf et al., 2001). Bcl-2 kann die Aktivierung zytoplasmatischer Caspasen nach apoptotischen Stimuli in vielen Zellsystemen hemmen (Chinnaiyan et al., 1996;Srinivasan et al., 1996). Wir haben in der vorliegenden Arbeit zeigen können, dass Bcl-2 vor Caspase-Aktivierung nach UVB und PUVA, nicht jedoch vor Caspase-Aktivierung nach TRAIL schützt (Abb. 18,19). Bei manchen Zellarten werden nach Aktivierung des programmierten Zelltods durch Todesliganden über den extrinsischen Weg mitochondriale Signale benötigt, damit Apoptose abläuft. Blockiert man diese, z.B. bei Hepatozyten, so unterbleibt die Apoptose-Induktion. Derartige Zellen werden als Typ II Zellen bezeichnet (Gross et al., 1999b;Roy *et al.*, 2000). Man fand heraus, dass u.a. über BID, ein proapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie, der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg eng verknüpft sind (Luo *et al.*, 1998;Li et al., 1998a), denn Caspase 8 spaltet ausser Procaspase 3 auch das zytosolische BID. Aktiviertes BID führt am Mitochondrium zur Freisetzung von Zytochrom c (Scaffidi et al., 1999;Hengartner, 2000). Wir konnten in Keratinozyten eine deutliche Aktivierung von BID durch TRAIL nachweisen, auf die Bcl-2 keinen Einfluss hatte. Andererseits konnte sowohl bei UVB- als auch bei PUVA-induzierter Apoptose Bcl-2 vor BID-Aktivierung schützen (Abb. 18, 19). Diese Befunde lassen den folgenden Schluss zu: Bcl-2 entfaltet seine schützende Wirkung im Signalweg oberhalb der Aktivierung von BID, d.h. dass im intrinsischen Apoptoseweg (ausgelöst durch UVB oder PUVA) die

Aktivierung von BID erst unterhalb des Mitochondriums im Sinne einer „Autoaktivierungs-Schleife“ erfolgt. Ähnliche Beobachtungen sind in der Literatur beschrieben (Slee *et al.*, 2000). Weiterhin scheint bei Keratinozyten, im Gegensatz zu Hepatozyten (Gross *et al.*, 1999a), diese Querverbindung zum Mitochondrium bei TRAIL-induzierter Apoptose keine wesentliche Rolle zu spielen, denn „Blockierung“ des Mitochondriums durch Bcl-2 vermittelt keinen Schutz vor TRAIL-Apoptose. Man könnte HaCaT-Keratinozyten deshalb als Typ I-Zellen bezeichnen (Gross *et al.*, 1999a; Leverkus *et al.*, 2003b). Um dies noch weiter zu bestätigen, könnte man bei Keratinozyten weitere Versuche anschliessen, in denen man BID selbst, z.B. durch Überexpression einer mutanten Form, blockiert. Sollte sich unsere Hypothese bestätigen, dass es sich bei HaCaT-Keratinozyten um Typ I-Zellen handelt, so müsste dann die durch TRAIL verursachte Apoptoserate und die mitochondriale Depolarisation, sowie die Zytochrom c-Freisetzung nach TRAIL reduziert sein. Interessanterweise sind primäre Keratinozyten im Gegensatz zu den immortalisierten HaCaT-Keratinozyten resistenter gegenüber TRAIL, man beobachtete eine wesentlich geringere Apoptose-Induktion nach TRAIL-Behandlung (Leverkus *et al.*, 2000). Die Annahme, dass dieser Unterschied hauptsächlich auf einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Expression von TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche beider Zelltypen beruht, bestätigte sich nicht (Leverkus *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass die Resistenz primärer Keratinozyten gegenüber TRAIL auf intrazellulärer Ebene reguliert wird. So kann man durch Vorbehandlung primärer Keratinozyten mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid diese Resistenz durchbrechen, dann wird in beiden Zelltypen nach TRAIL-Behandlung in ähnlichem Masse Caspase 8 aktiviert. Es wurde auch gezeigt, dass

Vorbehandlung primärer Keratinozyten mit dem Proteasominhibitor MG 115 diese für TRAIL-induzierte Apoptose sensitiviert (Leverkus et al., 2003b).

Auf welche Weise Todesliganden in Keratinozyten Apoptose auslösen, ist gut erforscht (Leverkus *et al.*, 2000;Rohn et al., 2001;Leverkus et al., 2003a;Leverkus *et al.*, 2003b). Es wurde gezeigt, dass TRAIL auch in Keratinozyten Apoptose auslöst, und zwar sowohl in primären als auch in transformierten Zellen. Allerdings wurde beobachtet, dass in transformierten Keratinozyten (potentiellen Tumorzellen) zu einem viel höheren Prozentsatz Apoptose ausgelöst wird und diese Sensitivität auf intrazellulärer Ebene reguliert wird. Wir wiesen nach, dass HaCaT-Keratinozyten sowohl Rezeptoren für TRAIL-R1, TRAIL-R2 als auch für CD95-Ligand auf ihrer Oberfläche besitzen (Abb. 15), die Rezeptorexpression aber keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Bcl-2 überexprimierenden HaCaT-Keratinozyten zeigte; ebenso lösen TRAIL und CD95-Ligand in beiden Zellarten in vergleichbarem Masse Apoptose aus. Damit konnten wir ausschliessen, dass Bcl-2 (zumindest in der Höhe, in der es in unserem Modell überexprimiert ist) in Keratinozyten vor Todesliganden-induzierter Apoptose schützt.

Unsere Beobachtung, dass Bcl-2 in Keratinozyten differentiell vor PUVA- und UVB-induzierter, aber nicht vor Todesligand-induzierter Apoptose schützen kann, bestätigen, dass diese Stimuli über unterschiedliche Signalwege Apoptose auslösen. In Glioblastom-Zellen hingegen konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 vor Todesligand-induzierter Apoptose schützt (Fulda et al., 2002;Ozoren and el Deiry, 2002). Es ist zwar einerseits akzeptiert, dass ein Weg existiert, bei dem das am Mitochondrium lokalisierte Bcl-2 einen Schutz vermittelt, aber es andererseits

auch Bcl-2 unabhängige Signalwege der Apoptose gibt (Hengartner, 2000; Kroemer and Reed, 2000). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass Todesligand-induzierte Apoptose über den extrinsischen, UVB und PUVA-induzierte Apoptose jedoch als kritischen Schritt einen mitochondrialen Signalweg benötigen. Es wurde aber ebenso postuliert, dass UVB-Strahlung auch Mitochondrium-unabhängig über Quervernetzung von Todesrezeptoren oder Induktion von Todesliganden Apoptose induzieren kann (Leverkus et al., 1997; Aragane et al., 1998; Caricchio et al., 1998). Diese Berichte zeigten, dass UVB-induzierte Apoptose durch Blockade des extrinsischen Weges partiell, aber nicht vollständig inhibiert werden kann, und damit andere UVB-induzierte Apoptose-Signalwege ebenfalls an der Apoptoseinduktion beteiligt sein müssen.

In unseren Versuchen wiesen wir nach, dass Bcl-2 Keratinozyten vor UV-induzierter Apoptose schützt. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die Proliferationsfähigkeit als anspruchsvollste Leistung einer Zelle nach UV-Bestrahlung eingeschränkt ist. Da viele Untersuchungen nur die Apoptose (z.B. anhand des Prozentsatz hypodiploider Zellen), nicht aber die Proliferation messen, können keine Aussagen über die „Spätfolgen“ der UV-Strahlung auf die überlebenden Zellen gemacht werden. Dies kann mit Untersuchungen, die nur Apoptose nachweisen, nicht gezeigt werden. So ist nach vollständiger Hemmung der Caspase-Aktivität die Apoptoseinduktion (durch proapoptotische Stimuli wie die Onkoproteine Myc und E1A oder durch Etoposid, UV oder Staurosporin) unterdrückt. Diese Zellen können sich nach diesen Noxen nicht weiter teilen (Amarante-Mendes et al., 1998), überleben zwar temporär, haben aber durch den vollständigen Verlust der Proliferationsfähigkeit keine Möglichkeit, entstandene

Schäden an Tochterzellen weiterzugeben. Damit ist gewissermaßen als zusätzlicher „Schutzmechanismus“ ihr klonogenes Potential aufgehoben. In unseren Experimenten zeigte sich, dass das klonogene Potential überraschenderweise schon bei sehr geringen UV-Dosen (UVB 40 mJ/cm², PUVA 0,03 J/cm²), bei denen wir nur einen sehr geringen Prozentsatz an apoptotischen Zellen nachweisen konnten (Abb. 13, 14), bereits deutlich eingeschränkt ist. Interessanterweise schützt Bcl-2 nach UVB-Bestrahlung das klonogene Potential, während dies nach PUVA-Bestrahlung nicht der Fall ist. Auch wenn Bcl-2 zunächst Protektion vor PUVA-induzierten Apoptosesignalen (DNA-Fragmentierung (Abb. 14), mitochondrialer Depolarisation (Abb. 22, 23), und Caspaseaktivierung (Abb. 19)) vermittelt, verlieren diese Zellen ultimativ das Potential zur Zellteilung. Die Erklärung für diese Beobachtungen könnte sein, dass PUVA-Bestrahlung zum einen dosisabhängig stärkere DNA-Schäden verursacht (Cooke et al., 2001; Wang *et al.*, 2001) und diese nach initialem Schutz dann zur Blockade des Zellzyklus, zur Hemmung der Proliferation und letztlich zum Tod der Zelle führen. So scheinen die Zellen nach PUVA im Gegensatz zu UVB mit deutlich niedrigeren Dosen als zur Induktion von Apoptose notwendig bereits einer irreversiblen Zellzyklusblockade zu unterliegen. Ähnliche Befunde wurden kürzlich mitgeteilt (Santamaria *et al.*, 2002). Damit ist klar, dass unterschiedliche Wellenlängenbereiche von UV-Licht (und zusätzlich 8-MOP bei PUVA) unterschiedliche biologische Effekte auslösen. Es gilt anzumerken, dass es v.a. bei Experimenten mit UVA wichtig ist, anzugeben, in welchem Wellenlängenbereich bestrahlt wird, da das UVA-Spektrum weiter ist als das UVB-Spektrum (UVA 320-400nm, UVB 290-320nm). Wir bestrahlten in unseren

UVA-Experimenten die Keratinozyten mit einem Maximum im Wellenlängenbereich von 355-365nm.

Die ersten Proteine, die in Zusammenhang mit Entstehung von Tumoren gebracht wurden, waren Regulatoren der Zellproliferation wie ras, c-myc oder p53 (Balmain and Harris, 2000). Später fand man heraus, dass auch Proteine, die die Induktion von Apoptose verhindern, eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielen, wenn sie z.B. durch Überexpression das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod stören (Jaattela, 1999). Während das antiapoptotische Protein Bcl-2 in normaler Haut nur gering in der basalen Stammzellschicht exprimiert wird (Isoherranen et al., 1999), wird es in einer Reihe prämaligener und maligner Hautveränderungen deutlich stärker exprimiert, z.B. in malignen Melanomen aller Stadien und histologischer Subtypen (van den Oord et al., 1994). Auch in benignen Hauttumoren wie Nävuszellnävi fand man eine Bcl-2-Überexpression (Plettenberg et al., 1995), desweiteren in malignen Tumoren wie Merkelzell-Karzinomen (Plettenberg et al., 1996), Basalzellkarzinomen, dem Morbus Bowen oder Plattenepithelkarzinomen (Nakagawa et al., 1994). In Bcl-2 überexprimierenden Keratinozyten konnten wir zeigen, dass diese vor UVB auch klonogen geschützt sind, vor PUVA jedoch nicht (Abb. 24-27). Es könnte daher sein, dass in der Haut Bcl-2 als Onkogen wirkt, indem es vor Apoptose schützt und Keratinozyten so DNA-Schäden an Tochterzellen weitergeben. In Modellen, in denen Bcl-2 in der gesamten Epidermis von Mäusen überexprimiert wird, fand man eine erhöhte Anfälligkeit für nichtmelanotische Hauttumoren als Antwort auf Behandlung mit chemischen Substanzen wie DMBA (Dimethylbenzanthrazen) oder TPA

(Tetradekanoylphorbolacetat) (Pena et al., 1998;Rodriguez-Villanueva et al., 1998). Dazu, wie die Haut dieser Mäuse auf UV-Bestrahlung reagiert, liegen keine Berichte vor. In neueren Untersuchungen wurde beschrieben, dass Überexpression von Bcl-2 paradoxerweise einen Schutz vor der Entstehung von Tumoren vermitteln kann (Murphy et al., 1999;Rossiter et al., 2001). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Bcl-2 auch regulierend in den Zellzyklus eingreift (Borner, 1996;Huang et al., 1997), dadurch dessen Ablauf verzögert und so auch die Akkumulation von Mutationen und letztendlich Tumoren verlangsamt wird.

Der Ablauf der stressinduzierten Apoptose (u.a. UV-Bestrahlung) stellt ein hochkomplexes Geschehen dar, dass in den letzten Jahren zunehmend charakterisiert wurde. Die Bedeutung vieler verschiedener Proteine konnte mit genetischen Modellen bestätigt werden. Die vorgelegte Arbeit in einem physiologisch bedeutsamen Modell trägt ein weiteres „Mosaiksteinchen“ bei, das feine Zusammenspiel zwischen den Proteinen der Bcl-2 Familie, mitochondrialen apoptoseinduzierenden Faktoren, Inhibitor-Proteinen und Caspasen weiter zu beleuchten und zu verstehen. In diesem Zusammenhang kann zukünftig auch mehr über neue Therapiemöglichkeiten von Hauttumoren herausgefunden werden. Heute ist bekannt, dass bestimmte Immunomodulatoren wie z.B. das Imidazoquinolin Imiquimod Keratinozyten in Basalzellkarzinomen durch Herabregulierung der Bcl-2-Expression empfindlicher für Apoptose machen kann (Urosevic et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen mit Imiquimod wurden auch bei Plattenepithelkarzinomen gemacht (Schon et al., 2003). Da man weiss, dass bei malignen Melanomen mit Organmetastasen auch durch Polychemotherapie kaum

eine Lebensverlängerung erzielt werden kann, versucht man neue Konzepte zu entwickeln, um die Ursache der Apoptose-Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu durchbrechen. Um grundsätzlich therapeutisch Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, könnte man versuchen proapoptotische Signale zu verstärken oder während der Entstehung des Tumors aktivierte antiapoptotische Mechanismen zu durchbrechen. Zum Beispiel stellt die Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren, wie z.B. durch direkte Aktivierung von TRAIL-Rezeptoren, einen möglichen Mechanismus dar, über den Chemotherapie-resistente Tumorzellen eliminiert werden könnten (Rohn *et al.*, 2001). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Bcl-2 als potentiell Karzinogen nicht vor Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren schützt. Somit ist es möglich, dass TRAIL oder auch CD95-Ligand als Therapiealternativen bei Tumoren eingesetzt werden könnten, bei deren Entstehung Bcl-2 oder andere antiapoptotische Moleküle eine Schlüsselrolle spielen. Dies scheint insbesondere deshalb erfolgversprechend, da TRAIL hauptsächlich auf Tumorzellen wirkt und keine systemische Toxizität zeigt (Walczak *et al.*, 1999). Wenn man zukünftig breitere Kenntnis über die antiapoptotischen Resistenzmechanismen von Tumorzellen gewinnen kann, wären auch hier therapeutische Ansatzpunkte gegeben. So könnte man versuchen blockierte proapoptotische Signalwege in Tumorzellen zu „reparieren“. Der Einsatz von BH3-Agonisten zur Suppression der antiapoptotischen Mechanismen in Tumorzellen stellt damit eine attraktive Therapieoption dar (Yamaguchi *et al.*, 2002; Bettaieb *et al.*, 2003). Dies wurde bereits in menschlichen Ovarialkarzinomzellen oder in Prostatakarzinomzellen getestet (Finnegan *et al.*, 2001; Minko *et al.*, 2003). Zu Hauttumoren sind dazu bisher keine Untersuchungen veröffentlicht. Um hier neue Therapiemöglichkeiten zu

entwickeln, muss mehr über das Zusammenspiel von Tumorigenese und Proteinen, die Apoptose regulieren (z.B. Bcl-2 oder p53) gelernt werden. In neuesten Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass p53, welches neben einer Reihe wichtiger Funktionen im Zellzyklus auch Apoptose auslösen kann (z.B. nach DNA-Schädigung oder durch Onkogene induziert), nicht nur, wie allgemein bekannt, auf Ebene des Zellkerns durch Regulation der Transkription (z.B. durch Hochregulation der Transkription proapoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder wie Bax, Puma oder Noxa oder Herabregulation der Transkription antiapoptotischer Gene wie dem von Bcl-2) programmierten Zelltod induziert, sondern auch über davon unabhängige Mechanismen. Es liegen Ergebnisse vor, die zeigen, dass p53 auch durch direkte Interaktion mit Proteinen der Bcl-2-Familie im Zytosol (bzw. am Mitochondrium) zur Permeabilisierung der äusseren Mitochondrienmembran und damit zur direkten Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium führen kann (Perfettini et al., 2004). Es werden jedoch unterschiedliche Mechanismen dafür postuliert: Einerseits soll die direkte Bindung von p53 an antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x_L erfolgen und dadurch der durch diese Proteine vermittelte Schutz vor Apoptose durchbrochen werden (Mihara et al., 2003), andererseits die direkte Interaktion mit proapoptotischem Bax (Chipuk et al., 2004) oder Bak (Leu et al., 2004) deren proapoptotische Aktivität erhöhen. Therapeutisch erfolgversprechend könnte z.B. eine Hemmung von Bcl-2 bei Lymphomen und anderen malignen hämatologischen Erkrankungen sein (Flaherty et al., 2001). Ebenso gibt es erste Berichte über Versuche, die verlorengangene Funktion von p53, die man in vielen Tumorzellen findet, wiederherzustellen (Selivanova et al., 1999; Woods and Vousden, 2001). Es wurde gezeigt, dass das kleine Molekül PRIMA-1 (p53

reactivation and induction of massive apoptosis) in Zellen mit mutantern, funktionslosem p53 durch Reaktivierung dessen transkriptioneller Aktivität Apoptose induziert (Bykov et al., 2002). Erste Ergebnisse liegen vor, dass PRIMA-1 die nicht mehr funktionierende Bindung von mutantern p53 an DNA und u.a. die Aktivierung der p53-Zielgene p21 und MDM2 wiederherstellt. Da in Tumorzellen oft hohe Spiegel von mutantern p53 gefunden werden und Onkogene aktiviert sind, kann man vermuten, dass nach Reaktivierung von p53 in höherer Masse Apoptose ausgelöst wird als in gesunden Zellen mit normalem p53-Spiegel und ohne Onkogen-Aktivierung. Dies lässt auf neue Therapiemöglichkeiten zur Bekämpfung von Krebserkrankungen hoffen. Auch in immortalisierten HaCaT-Zellen liegt mutantes p53 vor, von dem nicht bekannt ist, ob es noch suffizient Apoptose induzieren kann (Paramio et al., 2000; Will et al., 2000; Mudgil et al., 2003). Weitere Untersuchungen werden vielleicht zur Beantwortung der Fragen führen, welche Verbindungen zwischen p53 und Proteinen der Bcl-2-Familie bestehen, sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf davon unabhängigen „zytoplasmatischen“ Signalwegen.

Mit unseren Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass sowohl UVB als auch PUVA in Keratinozyten Apoptose auslösen, dies jedoch wahrscheinlich über unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen tun. Unseren Ergebnissen nach zu urteilen, scheint reaktiven Sauerstoffradikalen, weder nach UVB noch nach PUVA, keine wesentliche Rolle zuzukommen. Dagegen spielen mitochondriale Signalwege insbesondere für die UVB-induzierte Apoptose eine entscheidende Rolle. Inwiefern die Freisetzung von Zytochrom c kritisch am Ablauf des programmierten Zelltods nach UVB beteiligt ist, muss derzeit noch offen bleiben.

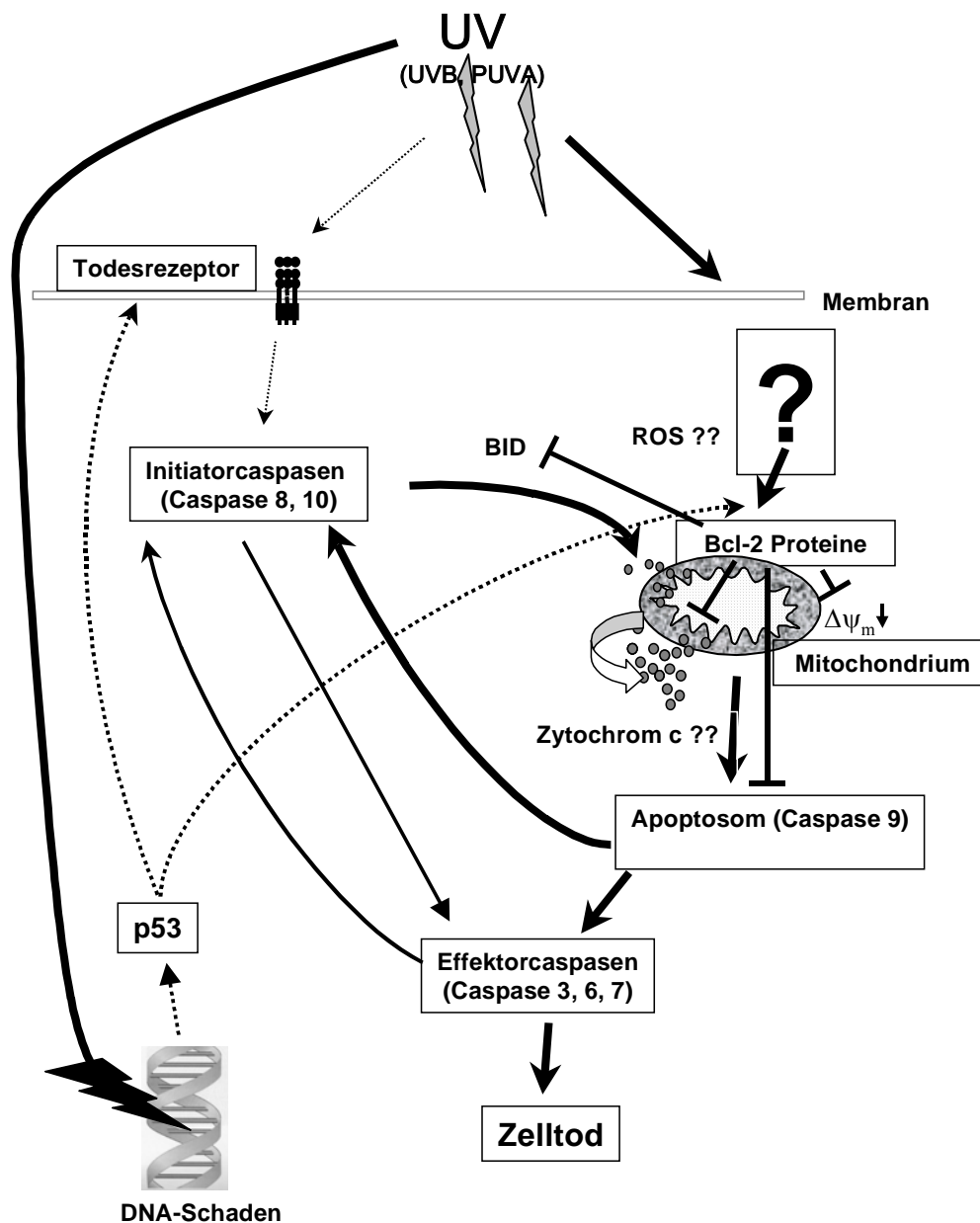


Abb. 34: Ablauf der Apoptose nach UVB und PUVA aufgrund unserer Befunde. Es konnte gezeigt werden, dass Bcl-2 den Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials, die Caspaseaktivierung und Aktivierung von BID nach UVB hemmt, ebenso nach PUVA. Nach PUVA-Bestrahlung tritt jedoch zu einem späteren Zeitpunkt dennoch vollständiger Verlust von $\Delta\psi_m$ und Caspaseaktivierung ein. Die Zytochrom c-Freisetzung wird zwar gehemmt, aber letztendlich nicht verhindert. Zukünftig zu beantwortende Fragen: Welche Signalwege sind an PUVA-induzierter Apoptose beteiligt? Welche Rolle spielen Sauerstoffradikale? Wie erfolgt die Zytochrom c-Freisetzung und nimmt sie eine Schlüsselposition ein?

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
2. Amarante-Mendes, G.P., Finucane, D.M., Martin, S.J., Cotter, T.G., Salvesen, G.S., and Green, D.R. (1998). Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death. Differ.*, **5**, 298-306.
3. Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., and Willems, G.M. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4923-4928.
4. Aragane, Y., Kulms, D., Metzke, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T.A., and Schwarz, T. (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.*, **140**, 171-182.
5. Aragane, Y., Maeda, A., Schwarz, A., Tezuka, T., Ariizumi, K., and Schwarz, T. (2003). Involvement of dectin-2 in ultraviolet radiation-induced tolerance. *J. Immunol.*, **171**, 3801-3807.
6. Assefa, Z., Garmyn, M., Bouillon, R., Merlevede, W., Vandenheede, J.R., and Agostinis, P. (1997). Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, **108**, 886-891.
7. Assefa, Z., Garmyn, M., Vantieghem, A., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., and Agostinis, P. (2003). Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of Bcl-2. *FEBS Lett.*, **540**, 125-132.
8. Assefa, Z., Vantieghem, A., Garmyn, M., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., Bouillon, R., Merlevede, W., and Agostinis, P. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 21416-21421.
9. Balmain, A. and Harris, C.C. (2000). Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, **21**, 371-377.
10. Bates, S. and Vousden, K.H. (1996). p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 12-18.
11. Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., and Di Lisa, F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, **264**, 687-701.
12. Bettaieb, A., Dubrez-Daloz, L., Launay, S., Plenchette, S., Rebe, C., Cathelin, S., and Solary, E. (2003). Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Curr. Med. Chem. Anti. -Canc. Agents*, **3**, 307-318.

13. Beutler,B. and Bazzoni,F. (1998). TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol. Dis.*, **24**, 216-230.
14. Borner,C. (1996). Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12695-12698.
15. Bossy-Wetzels,E., Newmeyer,D.D., and Green,D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD- specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.*, **17**, 37-49.
16. Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, **106**, 761-771.
17. Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
18. Breitkreutz,D., Schoop,V.M., Mirancea,N., Baur,M., Stark,H.J., and Fusenig,N.E. (1998). Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur. J. Cell Biol.*, **75**, 273-286.
19. Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., and Wang,X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 269-290.
20. Bykov,V.J., Issaeva,N., Shilov,A., Hultcrantz,M., Pugacheva,E., Chumakov,P., Bergman,J., Wiman,K.G., and Selivanova,G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.*, **8**, 282-288.
21. Cain,K., Bratton,S.B., and Cohen,G.M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, **84**, 203-214.
22. Callera,F. and Falcao,R.P. (1997). Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.*, **98**, 18-20.
23. Campbell,C., Quinn,A.G., Angus,B., Farr,P.M., and Rees,J.L. (1993). Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res.*, **53**, 2697-2699.
24. Caricchio,R., Reap,E.A., and Cohen,P.L. (1998). Fas/Fas ligand interactions are involved in ultraviolet-B-induced human lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, **161**, 241-251.
25. Chan,A., Magnus,T., and Gold,R. (2001). Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia*, **33**, 87-95.
26. Chandra,D. and Tang,D.G. (2003). Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17408-17420.
27. Chen,Y.R., Wang,X., Templeton,D., Davis,R.J., and Tan,T.H. (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. **271**, 31929-31936.

28. Chinnaiyan,A.M., Orth,K., O'Rourke,K., Duan,H., Poirier,G.G., and Dixit,V.M. (1996). Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4573-4576.
29. Chipuk,J.E., Kuwana,T., Bouchier-Hayes,L., Droin,N.M., Newmeyer,D.D., Schuler,M., and Green,D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, **303**, 1010-1014.
30. Chou,J.J., Li,H., Salvesen,G.S., Yuan,J., and Wagner,G. (1999). Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, **96**, 615-624.
31. Chrysomali,E., Lozada-Nur,F., Dekker,N.P., Papanicolaou,S.I., and Regezi,J.A. (1997). Apoptosis in oral erythema multiforme. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **83**, 272-280.
32. Clydesdale,G.J., Dandie,G.W., and Muller,H.K. (2001). Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.*, **79**, 547-568.
33. Cooke,M.S., Evans,M.D., Burd,R.M., Patel,K., Barnard,A., Lunec,J., and Hutchinson,P.E. (2001). Induction and excretion of ultraviolet-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine and thymine dimers in vivo: implications for PUVA. *J. Invest Dermatol.*, **116**, 281-285.
34. Coultas,L. and Strasser,A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **13**, 115-123.
35. Crompton,M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, **341** (Pt 2), 233-249.
36. de Gruijl,F.R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer*, **35**, 2003-2009.
37. de Gruijl,F.R., van Kranen,H.J., and Mullenders,L.H. (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B*, **63**, 19-27.
38. Delehedde,M., Cho,S.H., Sarkiss,M., Brisbay,S., Davies,M., El Naggar,A.K., and McDonnell,T.J. (1999). Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*, **85**, 1514-1522.
39. Desagher,S. and Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **10**, 369-377.
40. Deshmukh,M. and Johnson,E.M., Jr. (1998). Evidence of a novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome c. *Neuron*, **21**, 695-705.
41. Dive,C., Gregory,C.D., Phipps,D.J., Evans,D.L., Milner,A.E., and Wyllie,A.H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **1133**, 275-285.
42. Dockrell,D.H. (2001). Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J. Infect.*, **42**, 227-234.
43. Dorstyn,L., Read,S., Cakouros,D., Huh,J.R., Hay,B.A., and Kumar,S. (2002). The role of cytochrome c in caspase activation in Drosophila melanogaster cells. *J. Cell Biol.*, **156**, 1089-1098.

44. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, **82**, 47-95.
45. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
46. Ekert, P.G., Silke, J., Hawkins, C.J., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2001). DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J. Cell Biol.*, **152**, 483-490.
47. el Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
48. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, **148**, 2207-2216.
49. Farkas, B., Magyarlaki, M., Csete, B., Nemeth, J., Rabluczky, G., Bernath, S., Literati, N.P., and Sumegi, B. (2002). Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 921-932.
50. Fei, P. and el Deiry, W.S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene*, **22**, 5774-5783.
51. Filipe, P.M., Freitas, J.P., Castro, M., Pinto, R., Fernandes, A., de Castro, L.C., Rico, T., and Rodrigo, F.G. (1995). [Lipid peroxidation, production of PGE2 and cellular mortality induced by UV in cultured human skin fibroblasts]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **189**, 443-451.
52. Finnegan, N.M., Curtin, J.F., Prevost, G., Morgan, B., and Cotter, T.G. (2001). Induction of apoptosis in prostate carcinoma cells by BH3 peptides which inhibit Bak/Bcl-2 interactions. *Br. J. Cancer*, **85**, 115-121.
53. Fiskum, G. (2000). Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J. Neurotrauma*, **17**, 843-855.
54. Flaherty, K.T., Stevenson, J.P., and O'Dwyer, P.J. (2001). Antisense therapeutics: lessons from early clinical trials. *Curr. Opin. Oncol.*, **13**, 499-505.
55. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J.L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, **84**, 131-141.
56. French, L.E. and Tschopp, J. (2000). Fas-mediated cell death in toxic epidermal necrolysis and graft-versus-host disease: potential for therapeutic inhibition. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **130**, 1656-1661.
57. Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, **21**, 2283-2294.
58. Garssen, J. and van Loveren, H. (2001). Effects of ultraviolet exposure on the immune system. *Crit Rev. Immunol.*, **21**, 359-397.
59. Gellerich, F.N., Trumbeckaite, S., Opalka, J.R., Seppet, E., Rasmussen, H.N., Neuhoff, C., and Zierz, S. (2000). Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 164-169.

60. Gentry, M.K. and Dalrymple, J.M. (1980). Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 361-366.
61. Ghafourifar, P., Schenk, U., Klein, S.D., and Richter, C. (1999). Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31185-31188.
62. Gniadecki, R., Hansen, M., and Wulf, H.C. (1997). Two pathways for induction of apoptosis by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, **109**, 163-169.
63. Godar, D.E. (1996). Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV- induced immediate and delayed apoptosis. *Photochem. Photobiol.*, **63**, 825-830.
64. Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., and Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 156-162.
65. Gottlieb, E., Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (2000). Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 5680-5689.
66. Green, D.R. and Amarante-Mendes, G.P. (1998). The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results Probl. Cell Differ.*, **24**, 45-61.
67. Green, D.R. and Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**, 19-30.
68. Green, D.R. and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
69. Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., and Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor- related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.*, **189**, 1343-1354.
70. Griffiths, H.R., Mistry, P., Herbert, K.E., and Lunec, J. (1998). Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.*, **35**, 189-237.
71. Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 1899-1911.
72. Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999b). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1156-1163.
73. Haake, A.R. and Polakowska, R.R. (1993). Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J. Invest Dermatol.*, **101**, 107-112.
74. Hackett, C.J. and Dickler, H.B. (1999). Immunologic tolerance for immune system-mediated diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 362-370.
75. Hajimohamadreza, I. and Treherne, J.M. (1997). The role of apoptosis in neurodegenerative diseases. *Prog. Drug Res.*, **48**, 55-98.

76. Hamel,W., Dazin,P., and Israel,M.A. (1996). Adaptation of a simple flow cytometric assay to identify different stages during apoptosis. *Cytometry*, **25**, 173-181.
77. Hart,P.H., Grimbaldeston,M.A., and Finlay-Jones,J.J. (2001). Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **28**, 1-8.
78. Hashimoto,Y., Tsutsui,M., Matsuo,S., and Iizuka,H. (1995). Flow cytometric analysis of pig epidermal keratinocytes: effects of ultraviolet B irradiation (UVB) and topical PUVA treatment. *J. Dermatol. Sci.*, **10**, 16-24.
79. Hayashi,T. and Faustman,D.L. (2001). Implications of altered apoptosis in diabetes mellitus and autoimmune disease. *Apoptosis.*, **6**, 31-45.
80. Heck,D.E., Vetrano,A.M., Mariano,T.M., and Laskin,J.D. (2003). UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J. Biol. Chem.*, **278**, 22432-22436.
81. Heiskanen,K.M., Bhat,M.B., Wang,H.W., Ma,J., and Nieminen,A.L. (1999). Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5654-5658.
82. Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
83. Howard,S., Bottino,C., Brooke,S., Cheng,E., Giffard,R.G., and Sapolsky,R. (2002). Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. *J. Neurochem.*, **83**, 914-923.
84. Huang,D.C., O'Reilly,L.A., Strasser,A., and Cory,S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.*, **16**, 4628-4638.
85. Huang,D.C., Tschopp,J., and Strasser,A. (2000). Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death. Differ.*, **7**, 754-755.
86. Hunter,D.R. and Haworth,R.A. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 468-477.
87. Hussain,S.P., Hofseth,L.J., and Harris,C.C. (2001). Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*, **34 Suppl 2**, S7-15.
88. Isoherranen,K., Sauroja,I., Jansen,C., and Punnonen,K. (1999). UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 212-216.
89. Iwasaki,K., Izawa,M., and Mihara,M. (1996). UV-induced apoptosis in rat skin. *J. Dermatol. Sci.*, **12**, 31-35.
90. Jaattela,M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.*, **248**, 30-43.
91. Jackson,A.L. and Loeb,L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, **477**, 7-21.
92. Jiang,X. and Wang,X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31199-31203.

93. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257.
94. Kluck, R.M., Esposti, M.D., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M.J., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1999). The proapoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J. Cell Biol.*, **147**, 809-822.
95. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.
96. Korsmeyer, S.J. (1987). Antigen receptor genes as molecular markers of lymphoid neoplasms. *J. Clin. Invest.*, **79**, 1291-1295.
97. Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W., and Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.*, **53**, 4701-4714.
98. Kripke, M.L., Morison, W.L., and Parrish, J.A. (1983). Systemic suppression of contact hypersensitivity in mice by psoralen plus UVA radiation (PUVA). *J. Invest Dermatol.*, **81**, 87-92.
99. Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, **6**, 513-519.
100. Krohn, A.J., Wahlbrink, T., and Prehn, J.H. (1999). Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. *J. Neurosci.*, **19**, 7394-7404.
101. Krutmann, J. (2000). Phototherapy for atopic dermatitis. *Clin. Exp. Dermatol.*, **25**, 552-558.
102. Lee, H.C. and Wei, Y.H. (2000). Mitochondrial role in life and death of the cell. *J. Biomed. Sci.*, **7**, 2-15.
103. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, **185**, 1481-1486.
104. Leiter, U., Schmid, R.M., Kaskel, P., Peter, R.U., and Krahn, G. (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 225-232.
105. Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 443-450.
106. Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C.T., Brocker, E.B., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes. *Cancer Res.*, **60**, 553-559.
107. Leverkus, M., Sprick, M.R., Wachter, T., Denk, A., Brocker, E.B., Walczak, H., and Neumann, M. (2003a). TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J. Invest Dermatol.*, **121**, 149-155.

108. Leverkus,M., Sprick,M.R., Wachter,T., Mengling,T., Baumann,B., Serfling,E., Brocker,E.B., Goebeler,M., Neumann,M., and Walczak,H. (2003b). Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 777-790.
109. Leverkus,M., Yaar,M., and Gilchrest,B.A. (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, **232**, 255-262.
110. Li,H., Zhu,H., Xu,C.J., and Yuan,J. (1998a). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
111. Li,J., Tang,A., and Huang,G. (2000). [Apoptosis and apoptosis-related gene expression in nasopharyngeal carcinoma]. *Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi.*, **22**, 158-160.
112. Li,L., Yan,L., Liu,Z., and et,A. (1998b). [Cellular apoptosis, proliferation and bcl-2 Bax expression in colorectal carcinoma and their association with tumor prognosis]. *Zhonghua Wai Ke. Za Zhi.*, **36**, 614-616.
113. Li,L.Y., Luo,X., and Wang,X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
114. Luftl,M., Rocken,M., Plewig,G., and Degitz,K. (1998). PUVA inhibits DNA replication, but not gene transcription at nonlethal dosages. *J. Invest Dermatol.*, **111**, 399-405.
115. Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C., and Wang,X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.
116. Madesh,M. and Hajnoczky,G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell Biol.*, **155**, 1003-1015.
117. Maneg,O., Ludwig,B., and Malatesta,F. (2003). Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble CuA fragments with their substrates. *J. Biol. Chem.*, **278**, 46734-46740.
118. Martin,S.J., Reutelingsperger,C.P., McGahon,A.J., Rader,J.A., van Schie,R.C., LaFace,D.M., and Green,D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, **182**, 1545-1556.
119. Martinou,J.C. and Green,D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 63-67.
120. Mayer,M. and Noble,M. (1994). N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7496-7500.
121. McDonnell,J.M., Fushman,D., Milliman,C.L., Korsmeyer,S.J., and Cowburn,D. (1999a). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, **96**, 625-634.
122. McDonnell,J.M., Fushman,D., Milliman,C.L., Korsmeyer,S.J., and Cowburn,D. (1999b). Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, **96**, 625-634.

123. McDonnell,T.J., Nunez,G., Platt,F.M., Hockenberry,D., London,L., McKearn,J.P., and Korsmeyer,S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 1901-1907.
124. Medema,J.P., Scaffidi,C., Kischkel,F.C., Shevchenko,A., Mann,M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.*, **16**, 2794-2804.
125. Middleton,G., Pinon,L.G., Wyatt,S., and Davies,A.M. (1998). Bcl-2 accelerates the maturation of early sensory neurons. *J. Neurosci.*, **18**, 3344-3350.
126. Mignotte,B. and Vayssiere,J.L. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, **252**, 1-15.
127. Mihara,M., Erster,S., Zaika,A., Petrenko,O., Chittenden,T., Pancoska,P., and Moll,U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell*, **11**, 577-590.
128. Minko,T., Dharap,S.S., and Fabbricatore,A.T. (2003). Enhancing the efficacy of chemotherapeutic drugs by the suppression of antiapoptotic cellular defense. *Cancer Detect. Prev.*, **27**, 193-202.
129. Miracco,C., Rubegni,P., De Aloe,G., D'Ascenzo,G., Mazzatenta,C., De Santi,M.M., and Fimiani,M. (1997). Extracorporeal photochemotherapy induces apoptosis of infiltrating lymphoid cells in patients with mycosis fungoides in early stages. A quantitative histological study. *Br. J. Dermatol.*, **137**, 549-557.
130. Moll,I., Gillardon,F., Waltering,S., Schmelz,M., and Moll,R. (1996). Differences of bcl-2 protein expression between Merkel cells and Merkel cell carcinomas. *J. Cutan. Pathol.*, **23**, 109-117.
131. Morales-Ducret,C.R., van de,R.M., LeBrun,D.P., and Smoller,B.R. (1995). bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch. Dermatol.*, **131**, 909-912.
132. Morita,A., Werfel,T., Stege,H., Ahrens,C., Karmann,K., Grewe,M., Grether-Beck,S., Ruzicka,T., Kapp,A., Klotz,L.O., Sies,H., and Krutmann,J. (1997). Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J. Exp. Med.*, **186**, 1763-1768.
133. Mudgil,A.V., Segal,N., Andriani,F., Wang,Y., Fusenig,N.E., and Garlick,J.A. (2003). Ultraviolet B irradiation induces expansion of intraepithelial tumor cells in a tissue model of early cancer progression. *J. Invest Dermatol.*, **121**, 191-197.
134. Murphy,K.L., Kittrell,F.S., Gay,J.P., Jager,R., Medina,D., and Rosen,J.M. (1999). Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene*, **18**, 6597-6604.
135. Murphy,M.P. and Brand,M.D. (1988). Membrane-potential-dependent changes in the stoichiometry of charge translocation by the mitochondrial electron transport chain. *Eur. J. Biochem.*, **173**, 637-644.
136. Nakagawa,K., Yamamura,K., Maeda,S., and Ichihashi,M. (1994). bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer*, **74**, 1720-1724.
137. Neame,S.J., Rubin,L.L., and Philpott,K.L. (1998). Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. *J. Cell Biol.*, **142**, 1583-1593.

138. Nicholson,D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death. Differ.*, **6**, 1028-1042.
139. Nicoletti,I., Migliorati,G., Pagliacci,M.C., Grignani,F., and Riccardi,C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **139**, 271-279.
140. Offen,D., Elkon,H., and Melamed,E. (2000). Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm. Suppl*, 153-166.
141. Ozoren,N. and el Deiry,W.S. (2002). Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia.*, **4**, 551-557.
142. Pan,J., Duan,L.X., Sun,B.S., and Feitelson,M.A. (2001). Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J. Gen. Virol.*, **82**, 171-182.
143. Paquet,P., Jacob,E., Damas,P., and Pierard,G.E. (2001). Treatment of drug-induced toxic epidermal necrolysis (Lyell's syndrome) with intravenous human immunoglobulins. *Burns*, **27**, 652-655.
144. Paramio,J.M., Segrelles,C., Lain,S., Gomez-Casero,E., Lane,D.P., Lane,E.B., and Jorcano,J.L. (2000). p53 is phosphorylated at the carboxyl terminus and promotes the differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol. Carcinog.*, **29**, 251-262.
145. Parrish,J.A., Fitzpatrick,T.B., Tanenbaum,L., and Pathak,M.A. (1974). Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 1207-1211.
146. Pena,J.C., Rudin,C.M., and Thompson,C.B. (1998). A Bcl-xL transgene promotes malignant conversion of chemically initiated skin papillomas. *Cancer Res.*, **58**, 2111-2116.
147. Perfettini,J.L., Kroemer,R.T., and Kroemer,G. (2004). Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 386-388.
148. Peus,D., Beyerle,A., Rittner,H.L., Pott,M., Meves,A., Weyand,C., and Pittelkow,M.R. (2000). Anti-psoriatic drug anthralin activates JNK via lipid peroxidation: mononuclear cells are more sensitive than keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, **114**, 688-692.
149. Peus,D., Meves,A., Pott,M., Beyerle,A., and Pittelkow,M.R. (2001). Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 425-432.
150. Peus,D., Vasa,R.A., Beyerle,A., Meves,A., Krautmacher,C., and Pittelkow,M.R. (1999). UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, **112**, 751-756.
151. Peus,D., Vasa,R.A., Meves,A., Pott,M., Beyerle,A., Squillace,K., and Pittelkow,M.R. (1998). H2O2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, **110**, 966-971.
152. Pianko,S., Patella,S., and Sievert,W. (2000). Alcohol consumption induces hepatocyte apoptosis in patients with chronic hepatitis C infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **15**, 798-805.
153. Pietenpol,J.A. and Stewart,Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, **181-182**, 475-481.

154. Pincelli,C., Haake,A.R., Benassi,L., Grassilli,E., Magnoni,C., Ottani,D., Polakowska,R., Franceschi,C., and Giannetti,A. (1997). Autocrine nerve growth factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): a role for BCL-2. *J. Invest Dermatol.*, **109**, 757-764.
155. Pincelli,C. and Marconi,A. (2000). Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, **22**, 71-79.
156. Pinkoski,M.J., Waterhouse,N.J., Heibein,J.A., Wolf,B.B., Kuwana,T., Goldstein,J.C., Newmeyer,D.D., Bleackley,R.C., and Green,D.R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2- inhibitable mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12060-12067.
157. Plettenberg,A., Ballaun,C., Pammer,J., Mildner,M., Strunk,D., Weninger,W., and Tschachler,E. (1995). Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am. J. Pathol.*, **146**, 651-659.
158. Plettenberg,A., Pammer,J., and Tschachler,E. (1996). Merkel cells and Merkel cell carcinoma express the BCL-2 proto-oncogene [corrected and and republished article originally printed in *Exp Dermatol* 1996 Apr;5(2):102-7]. *Exp. Dermatol.*, **5**, 183-188.
159. Polakowska,R.R., Piacentini,M., Bartlett,R., Goldsmith,L.A., and Haake,A.R. (1994). Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev. Dyn.*, **199**, 176-188.
160. Pollack,M. and Leeuwenburgh,C. (2001). Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **56**, B475-B482.
161. Qin,J.Z., Bacon,P.E., Chaturvedi,V., Bonish,B., and Nickoloff,B.J. (2002). Pathways involved in proliferating, senescent and immortalized keratinocyte cell death mediated by two different TRAIL preparations. *Exp. Dermatol.*, **11**, 573-583.
162. Reed,J.C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.*, **124**, 1-6.
163. Richter,C. (1993). Pro-oxidants and mitochondrial Ca²⁺: their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett.*, **325**, 104-107.
164. Rigel,E.G., Leibold,M.G., Rigel,A.C., and Rigel,D.S. (2003). Ultraviolet radiation in alpine skiing: magnitude of exposure and importance of regular protection. *Arch. Dermatol.*, **139**, 60-62.
165. Rodriguez-Villanueva,J., Greenhalgh,D., Wang,X.J., Bundman,D., Cho,S., Delehedde,M., Roop,D., and McDonnell,T.J. (1998). Human keratin-1.bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction, and are susceptible to skin tumor formation. *Oncogene*, **16**, 853-863.
166. Rohn,T.A., Wagenknecht,B., Roth,W., Naumann,U., Gulbins,E., Krammer,P.H., Walczak,H., and Weller,M. (2001). CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene*, **20**, 4128-4137.
167. Rossiter,H., Beissert,S., Mayer,C., Schon,M.P., Wienrich,B.G., Tschachler,E., and Kupper,T.S. (2001). Targeted expression of bcl-2 to murine basal epidermal keratinocytes results in paradoxical retardation of ultraviolet- and chemical-induced tumorigenesis. *Cancer Res.*, **61**, 3619-3626.

168. Roy,S. and Nicholson,D.W. (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J. Exp. Med.*, **192**, F21-F25.
169. Saenz-Santamaria,M.C., Reed,J.A., McNutt,N.S., and Shea,C.R. (1994). Immunohistochemical expression of BCL-2 in melanomas and intradermal nevi. *J. Cutan. Pathol.*, **21**, 393-397.
170. Sage,E. and Bredberg,A. (1991). Damage distribution and mutation spectrum: the case of 8-methoxypsoralen plus UVA in mammalian cells. *Mutat. Res.*, **263**, 217-222.
171. Sakon,S., Xue,X., Takekawa,M., Sasazuki,T., Okazaki,T., Kojima,Y., Piao,J.H., Yagita,H., Okumura,K., Doi,T., and Nakano,H. (2003). NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.*, **22**, 3898-3909.
172. Santamaria,A.B., Davis,D.W., Nghiem,D.X., McConkey,D.J., Ullrich,S.E., Kapoor,M., Lozano,G., and Ananthaswamy,H.N. (2002). p53 and Fas ligand are required for psoralen and UVA-induced apoptosis in mouse epidermal cells. *Cell Death. Differ.*, **9**, 549-560.
173. Savill,J. and Fadok,V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, **407**, 784-788.
174. Scaduto,R.C., Jr. and Grotyohann,L.W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.*, **76**, 469-477.
175. Scaffidi,C., Fulda,S., Srinivasan,A., Friesen,C., Li,F., Tomaselli,K.J., Debatin,K.M., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, **17**, 1675-1687.
176. Scaffidi,C., Schmitz,I., Zha,J., Korsmeyer,S.J., Krammer,P.H., and Peter,M.E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22532-22538.
177. Scharffetter,K., Wlaschek,M., Hogg,A., Bolsen,K., Schothorst,A., Goerz,G., Krieg,T., and Plewig,G. (1991). UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.*, **283**, 506-511.
178. Schon,M., Bong,A.B., Drewniok,C., Herz,J., Geilen,C.C., Reifenberger,J., Benninghoff,B., Slade,H.B., Gollnick,H., and Schon,M.P. (2003). Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 1138-1149.
179. Schwarz,T. (2002). Photoimmunosuppression. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **18**, 141-145.
180. Selivanova,G., Ryabchenko,L., Jansson,E., Iotsova,V., and Wiman,K.G. (1999). Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 3395-3402.
181. Sheng,X., Song,H., and He,X. (1998). [Bcl-2 gene expression in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi.*, **20**, 365-366.
182. Shimizu,H., Banno,Y., Sumi,N., Naganawa,T., Kitajima,Y., and Nozawa,Y. (1999). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *J. Invest Dermatol.*, **112**, 769-774.

183. Silke, J., Hawkins, C.J., Ekert, P.G., Chew, J., Day, C.L., Pakusch, M., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2002). The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J. Cell Biol.*, **157**, 115-124.
184. Simon, M.M., Aragane, Y., Schwarz, A., Luger, T.A., and Schwarz, T. (1994). UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *J. Invest Dermatol.*, **102**, 422-427.
185. Single, B., Leist, M., and Nicotera, P. (1998). Simultaneous release of adenylate kinase and cytochrome c in cell death. *Cell Death. Differ.*, **5**, 1001-1003.
186. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R., and Martin, S.J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J. Cell Biol.*, **144**, 281-292.
187. Slee, E.A., Keogh, S.A., and Martin, S.J. (2000). Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death. Differ.*, **7**, 556-565.
188. Snider, B.J., Gottron, F.J., and Choi, D.W. (1999). Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **893**, 243-253.
189. Srinivasan, A., Foster, L.M., Testa, M.P., Ord, T., Keane, R.W., Bredesen, D.E., and Kayalar, C. (1996). Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3 family proteases during apoptosis. *J. Neurosci.*, **16**, 5654-5660.
190. Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R., Reed, J.C., Froelich, C.J., and Salvesen, G.S. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27084-27090.
191. Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 217-245.
192. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.
193. Tanew, A., Kipfelsperger, T., Seeber, A., Radakovic-Fijan, S., and Honigsmann, H. (2001). Correlation between 8-methoxypsoralen bath-water concentration and photosensitivity in bath-PUVA treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **44**, 638-642.
194. Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*, **279**, L1005-L1028.
195. Thiele, J.J., Schroeter, C., Hsieh, S.N., Podda, M., and Packer, L. (2001). The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr. Probl. Dermatol.*, **29**, 26-42.
196. Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
197. Tobi, S.E., Paul, N., and McMillan, T.J. (2000). Glutathione modulates the level of free radicals produced in UVA- irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol. B*, **57**, 102-112.

198. Tokura,Y., Yagi,J., Edelson,R.L., and Gasparro,F.P. (1991). Inhibitory effect of 8-methoxypsoralen plus ultraviolet-A on interleukin-1 production by murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, **53**, 517-523.
199. Trauth,B.C., Klas,C., Peters,A.M., Matzku,S., Moller,P., Falk,W., Debatin,K.M., and Krammer,P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-305.
200. Tsukihara,T., Shimokata,K., Katayama,Y., Shimada,H., Muramoto,K., Aoyama,H., Mochizuki,M., Shinzawa-Itoh,K., Yamashita,E., Yao,M., Ishimura,Y., and Yoshikawa,S. (2003). The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 15304-15309.
201. Ullrich,S.E. (2002). Photoimmune suppression and photocarcinogenesis. *Front Biosci.*, **7**, d684-d703.
202. Urošević,M., Maier,T., Benninghoff,B., Slade,H., Burg,G., and Dummer,R. (2003). Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo. *Arch. Dermatol.*, **139**, 1325-1332.
203. Van de,C.M., Van,d.B., I, Declercq,W., Irmeler,M., Beyaert,R., Tschopp,J., Fiers,W., and Vandenabeele,P. (1997). Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1296-1299.
204. van den Oord,J.J., Vandeghinste,N., De Ley,M., and Wolf-Peeters,C. (1994). Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am. J. Pathol.*, **145**, 294-300.
205. van der Werff ten Bosch, Otten,J., and Thielemans,K. (2001). Autoimmune lymphoproliferative syndrome type III, an indefinite disorder. *Leuk. Lymphoma*, **41**, 501-511.
206. van Loo,G., Saelens,X., van Gurp,M., MacFarlane,M., Martin,S.J., and Vandenabeele,P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death. Differ.*, **9**, 1031-1042.
207. Vander Heiden,M.G., Chandel,N.S., Williamson,E.K., Schumacker,P.T., and Thompson,C.B. (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, **91**, 627-637.
208. Verhagen,A.M., Silke,J., Ekert,P.G., Pakusch,M., Kaufmann,H., Connolly,L.M., Day,C.L., Tikoo,A., Burke,R., Wrobel,C., Moritz,R.L., Simpson,R.J., and Vaux,D.L. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 445-454.
209. von Ahsen,O., Waterhouse,N.J., Kuwana,T., Newmeyer,D.D., and Green,D.R. (2000). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death. Differ.*, **7**, 1192-1199.
210. Voss,K.A., Riley,R.T., Norred,W.P., Bacon,C.W., Meredith,F.I., Howard,P.C., Plattner,R.D., Collins,T.F., Hansen,D.K., and Porter,J.K. (2001). An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme. *Environ. Health Perspect.*, **109 Suppl 2**, 259-266.
211. Walczak,H., Degli-Esposti,M.A., Johnson,R.S., Smolak,P.J., Waugh,J.Y., Boiani,N., Timour,M.S., Gerhart,M.J., Schooley,K.A., Smith,C.A., Goodwin,R.G., and Rauch,C.T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.*, **16**, 5386-5397.

212. Walczak,H. and Krammer,P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.*, **256**, 58-66.
213. Walczak,H., Miller,R.E., Ariail,K., Gliniak,B., Griffith,T.S., Kubin,M., Chin,W., Jones,J., Woodward,A., Le,T., Smith,C., Smolak,P., Goodwin,R.G., Rauch,C.T., Schuh,J.C., and Lynch,D.H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.*, **5**, 157-163.
214. Walczak,H. and Sprick,M.R. (2001). Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 452-453.
215. Wang,J. and Lenardo,M.J. (1997). Molecules involved in cell death and peripheral tolerance. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 818-825.
216. Wang,S.Q., Setlow,R., Berwick,M., Polsky,D., Marghoob,A.A., Kopf,A.W., and Bart,R.S. (2001). Ultraviolet A and melanoma: a review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **44**, 837-846.
217. Waterhouse,N.J., Goldstein,J.C., von Ahsen,O., Schuler,M., Newmeyer,D.D., and Green,D.R. (2001). Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J. Cell Biol.*, **153**, 319-328.
218. Waterhouse,N.J., Ricci,J.E., and Green,D.R. (2002). And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie*, **84**, 113-121.
219. Wei,T., Chen,C., Hou,J., Xin,W., and Mori,A. (2000). Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1498**, 72-79.
220. Will,K., Neben,M., Schmidt-Rose,T., Deppert,W., Wittern,K.P., and Bergemann,J. (2000). P53-dependent UVB responsiveness of human keratinocytes can be altered by cultivation on cell cycle-arrested dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.*, **71**, 321-326.
221. Wolf,B.B., Schuler,M., Li,W., Eggers-Sedlet,B., Lee,W., Taylor,P., Fitzgerald,P., Mills,G.B., and Green,D.R. (2001). Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34244-34251.
222. Woods,D.B. and Vousden,K.H. (2001). Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.*, **264**, 56-66.
223. Yamaguchi,H., Paranawithana,S.R., Lee,M.W., Huang,Z., Bhalla,K.N., and Wang,H.G. (2002). Epothilone B analogue (BMS-247550)-mediated cytotoxicity through induction of Bax conformational change in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **62**, 466-471.
224. Yang,J., Liu,X., Bhalla,K., Kim,C.N., Ibrado,A.M., Cai,J., Peng,T.I., Jones,D.P., and Wang,X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**, 1129-1132.
225. Young,S. and Diffey,B. (1985). Influence of monochromator bandwidth on the erythema action spectrum in the UV-B region. *Photodermatol.*, **2**, 383-387.
226. Zamzami,N., Brenner,C., Marzo,I., Susin,S.A., and Kroemer,G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, **16**, 2265-2282.

227. Zamzami,N. and Kroemer,G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 67-71.
228. Zhang,H. and Rosdahl,I. (2003). Ultraviolet A and B differently induce intracellular protein expression in human skin melanocytes--a speculation of separate pathways in initiation of melanoma. *Carcinogenesis*, **24**, 1929-1934.
229. Zhang,X., Rosenstein,B.S., Wang,Y., Lebwohl,M., Mitchell,D.M., and Wei,H. (1997). Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 119-124.
230. Zhuang,J., Dinsdale,D., and Cohen,G.M. (1998). Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death. Differ.*, **5**, 953-962.
231. Ziegler,A., Jonason,A.S., Leffell,D.J., Simon,J.A., Sharma,H.W., Kimmelman,J., Remington,L., Jacks,T., and Brash,D.E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372**, 773-776.
232. Zimmermann,K.C., Ricci,J.E., Droin,N.M., and Green,D.R. (2002). The role of ARK in stress-induced apoptosis in Drosophila cells. *J. Cell Biol.*, **156**, 1077-1087.

VI. ANHANG

Danksagung

Ich danke....

ganz besonders meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. med. Martin Leverkus, für seine einmalige Betreuung während der gesamten Arbeit innerhalb und ausserhalb des Labors, sowie für die Weckung des Interesses an der Zellbiologie und insbesondere der Apoptose.

Frau Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker (Direktorin der Universitätshautklinik Würzburg) für das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse und für die Arbeitsmöglichkeit an ihrer Klinik

Dr. med. Thilo Mengling, Dr. med. Tina Wachter, Evi Horn und Thorsten Renz für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung während der vielen Stunden im Labor.

allen weiteren Mitarbeitern im Labor (insbesondere AG Becker) für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Czisch
Geburtsdatum: 28.01.1976
Geburtsort: Kulmbach
Religion: evangelisch
Familie: Karin Czisch, geb. Schmelz, * 1955
Horst Czisch, * 1957
Stefan Czisch, * 1979
Familienstand: ledig
Derzeitige Anschrift: Kiautschoustrasse 1, 13353 Berlin

Schulbildung

1982-1986 Grundschule „Elisabeth-Schlemmer-Schule“
Stammbach
1986-1995 Mathematisch-naturwissenschaftliches
Gymnasium, Münchberg
Juni 1995 Abitur

Wehrdienst

Ab Juli 1995 Sanitätsbataillon 4, Feldkirchen
01.01.1996 Übernahme in die Laufbahn
Sanitätsoffizieranwärter bei
Sanitätsbataillon 141, Hamburg

Studium

Oktober 1996-September 1998 Immatrikulation an der Universität Regensburg
im Fachbereich Humanmedizin

| | |
|-----------------------------|--|
| September 1998 | Physikum |
| Oktober 1998 | Wechsel an die Universität Würzburg |
| September 1999 | 1. Staatsexamen |
| November 1999 | Beginn der Dissertation |
| September 2001 | 2. Staatsexamen |
| Oktober 2001-September 2002 | Praktisches Jahr (PJ) an der Universitätsklinik Würzburg und am Universitätsspital Zürich |
| November 2002 | 3. Staatsexamen |
| AiP | |
| 04.12.2002-04.06.2004 | AiP am Bundeswehrkrankenhaus Berlin im Fach HNO |
| Ab Juni 2004 | Bundeswehrkrankenhaus Berlin (HNO) |

Berchtesgaden, 19.06.2004
Michael Laub