

# Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

## Untersuchung des Zusammenwirkens von UV- und Infrarot-Strahlung bei der Hautalterung und Krebsentstehung – Vorhaben 3605S04491

Auftragnehmer:  
Christian Albrechts-Universität, Kiel  
Universitätsklinikum Schleswig Holstein  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

C. Jantschitsch

A. Schwarz

T. Schwarz

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

**BfS-RESFOR-35/10**

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:  
**urn:nbn:de:0221-201009173222**

Salzgitter, September 2010

# **Untersuchung des Zusammenwirkens von UV- und Infrarot-Strahlung bei der Hautalterung und Krebsentstehung**

Christian Jantschitsch

Agatha Schwarz

Thomas Schwarz

Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Universitätsklinikum Schleswig Holstein Campus Kiel, Christian Albrechts-Universität,  
Kiel

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Kurzfassung deutsch	4
Kurzfassung englisch	5
Liste der Abkürzungen	5
1. Aufgabenstellung	6
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	10
3. Stand der Wissenschaft und Technik	11
4. Ergebnisse	14
4.1. Teilprojekt A: IR und UV-induzierte Apoptose	14
4.2. Teilprojekt B: IR und DNA-Reparatur	22
4.3. Teilprojekt C: IR und Karzinogenese	28
5. Diskussion und Ausblick	37
6. Bisherige Publikationen	48
7. Zitierte Literatur	48

## Kurzfassung

Obwohl künstliche Infrarotstrahler in zunehmendem Maße für kosmetische und "Wellness"-Zwecke – häufig kombiniert mit UV-Bestrahlungen zu Bräunungszwecken - eingesetzt werden und Infrarotstrahlung (IR) Hauptbestandteil des auf die Erdoberfläche treffenden Sonnenspektrums ist, sind die Interaktionen zwischen UV und IR insbesondere bei der Entstehung von Hautkrebs wenig untersucht. Im vorliegenden Projekt wurde der Einfluss von IR-A auf die UVB-induzierte Apoptose untersucht. Anhand eines Mausmodells konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, dass Vorbestrahlung mit IR-A die UVB-induzierte Apoptose in Keratinozyten reduziert. Dies geschieht einerseits durch Regulation anti-apoptotischer Proteine, andererseits durch eine Induktion der Reparatur UVB-induzierter DNA-Schäden. Da UV-induzierter apoptotischer Zelltod ein Schutzmechanismus ist, der DNA geschädigte Zellen eliminiert und somit vor maligner Entartung bewahrt, wurde untersucht, ob IR die Photokarzinogenese in der Maus beeinflusst. Eine Kaplan-Meier-Analyse der Daten ergab, dass in IR-bestrahlten Tieren UV-induzierte Hauttumoren nicht früher auftreten. Bestrahlung mit IR alleine induzierte keine Tumoren.

## Summary

Artificial infrared (IR) sources are increasingly used in the cosmetic and wellness business. In these settings IR is frequently delivered in combination with UV light for tanning purposes. Moreover, IR is an essential component of the solar spectrum reaching the earth surface. Nevertheless, the interactions between IR and UV are yet not well studied, in particular with regard to UV-induced skin cancer. In the present study the influence of IR-A on UV-induced apoptosis was investigated. In a mouse model it was demonstrated that pre-treatment with IR-A reduces UVB-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro*. This effect is mediated by the regulation of apoptosis-related proteins and by the induction of DNA-repair. Since UV-induced apoptosis is a protective mechanism eliminating DNA-damaged cells and thus preventing carcinogenesis, the impact of IR on photocarcinogenesis in mice was studied. The data suggests that the occurrence of UV-induced skin tumors is not enhanced in IR-treated animals. IR alone did not induce skin tumors.

## Liste der Abkürzungen

CAT, Chloracetyltransferase; CPD, Cyclobutanpyrimidin Dimere; DNA, Desoxyribonukleinsäure; FLIP, *FLICE inhibitory protein*; HSP, Hitzeschockproteine; IL, Interleukin; IR, Infrarot; NER, Nukleotid-Excisions-Reparatur; UV, Ultraviolett; XP, Xeroderma pigmentosum;

# 1. Aufgabenstellung

## 1.1. Darstellung des Gesamtziels des Vorhabens

In den letzten Jahren ist eine massive Zunahme der durch UV-Strahlung hervorgerufenen gesundheitlichen Schäden zu beobachten. Dies gilt insbesondere für die extreme Häufung von Hautkrebskrankungen, die in manchen Ländern bereits an 1. bzw. 2. Stelle der Krebsstatistik stehen (Garbe et al., 1997; Katalinic et al., 2003). Für die Entstehung von Hautkrebs (Photokarzinogenese) ist der UVB-Bereich (290-320 nm) von zentraler Bedeutung. Der dramatische Anstieg UV(B)-bedingter Hautschäden ist vorwiegend auf das veränderte Freizeitverhalten bzw. den sorglosen Umgang der Bevölkerung mit Sonnenlicht zurückzuführen. Zusätzlich ist in Zukunft auch mit einer vermehrten UVB-Einstrahlung infolge der Abnahme der Ozonschicht zu rechnen (Slaper et al., 1996). Die bisherigen Erkenntnisse über die Mechanismen der Photokarzinogenese und vorzeitigen Hautalterung beruhen vorwiegend auf Untersuchungen mit UVB- oder UVA-Strahlung bzw. der Kombination beider Spektren. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass der überwiegende Teil des Sonnenspektrums Infrarot (IR)-Strahlung ausmacht. In bisherigen Untersuchungen wurde der IR-Anteil nur wenig bis gar nicht berücksichtigt. Der IR-Anteil wird ähnlich wie UV in drei Bereiche eingeteilt IR-A- (760 – 1400 nm), IR-B- (1400 – 3000 nm) und IR-C (3000 nm – 1 mm). Im medizinischen Sektor wird vorwiegend IR-A eingesetzt. Die Indikationen reichen von Malignomen über Autoimmunerkrankungen (Meffert et al., 1990) bis zu Wundheilungsstörungen (Schramm et al., 2003). IR-Strahlung wird in letzter Zeit mit zunehmender Häufigkeit auch im Wellnessbereich z.B. als "Antiaging"-Behandlung eingesetzt (Schieke et al., 2003). Lange Zeit wurde IR als photobiologisch inert betrachtet, biologische Effekte von IR wurden ausschließlich durch dessen Wärmewirkung erklärt. In neuerer Zeit hingegen mehren sich die Hinweise, dass IR auch wel-

lenspektrumspezifische Effekte hat. Trotz dieser Tatsachen und obwohl Infrarotstrahlung (IR) ein essentieller Bestandteil des Sonnenspektrums ist, wurden die Interaktionen zwischen UV und IR bisher nicht systematisch untersucht. Welchen Effekt IR-Strahlung auf die UV-induzierte Karzinogenese hat, ist bislang unklar.

Die Induktion von apoptotischem Zelltod durch UV-Strahlung ist ein protektiver Mechanismus, durch den Zellen mit geschädigter DNA eliminiert werden (Kulms & Schwarz, 2000). UV-induzierte DNA-Schäden stellen die primäre Basis für Hautkrebs dar. Die Entfernung von Zellen mit geschädigter DNA trägt daher zur Reduktion des Entartungsrisikos bei. Es ist bekannt, dass IR-Strahlung zu einer Inhibition der UV-induzierten Apoptose führt (Menezes et al., 1998). Während man lange Zeit der Meinung war, dass die Verhinderung des UV-induzierten Zelltodes vorteilhaft ist und dadurch die Epidermis in ihrer Funktion erhalten bleibt (Maytin et al., 1994; Simon et al., 1995), vermutet man heute, dass dies negative Folgen hat. Dies gilt insbesondere für die Karzinogenese, da man weiß, dass UV-induzierter Zelltod an sich nichts Negatives ist, sondern einen protektiven Vorgang darstellt (Murphy et al., 2001). Aus diesem Grunde besteht die Möglichkeit, dass IR-Strahlung durch Verhinderung der Apoptose die Photokarzinogenese fördert. Es ist allerdings bis heute unklar, welche Mechanismen der Verhinderung der UV-induzierten Apoptose durch IR-Strahlung zugrunde liegen und ob in der Tat IR-Strahlung zu einer Erhöhung der Karzinogenese beiträgt. Dies sollte im vorliegenden Projekt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bearbeitet werden.

Die weitreichendste Wirkung von UVB Strahlung auf zellulärer Ebene ist die Induktion von Schäden in der DNA (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), (6-4)-Photoprodukte) (Patrick et al., 1977). UVB-induzierte DNA-Schäden sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einerseits mediiieren sie zahlreiche Effekte von UVB-

Strahlung, wie Entzündung bzw. Immunsuppression. Andererseits stellen DNA-Schäden die prinzipielle Basis für maligne Entartung dar. Zellen sind jedoch mit sehr effizienten Reparatursystemen ausgestattet, die DNA-Schäden permanent reparieren. Für UVB-induzierte DNA-Schäden ist die Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) von besonderer Bedeutung. Dies wird am besten anhand des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosum (XP) demonstriert. Diese Patienten weisen einen defekten NER auf und erkranken bereits im Kindesalter an multiplen Plattenepithelkarzinomen und malignen Melanomen (Berneburg & Lehmann, 2001). Bis vor kurzem war man der Ansicht, dass der NER als essentielles Schutzsystem konstitutiv exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt. Unlängst wurde jedoch beschrieben, dass Langzeit-UVB-Bestrahlung eine Unterdrückung des NER verursachen könnte (Mitchell et al., 2001). Zusätzlich scheint mit steigendem Alter die Leistungsfähigkeit des NER abzunehmen (Goukassian et al., 2000). Wir konnten kürzlich beobachten, dass eine einmalige UVB-Bestrahlung humaner Zellen zu einer Reduktion der transkriptionellen Expression bestimmter NER-Komponenten führt (Schwarz et al., 2002). Ob es sich hierbei um ein generelles Phänomen handelt oder individuelle Schwankungen vorliegen, die u.a. das Karzinomrisiko und somit die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber UV-induziertem Hautkrebs determinieren, ist bislang unbekannt. Zusätzlich konnten wir beobachten, dass der Immunmodulator Interleukin (IL)-12 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den UVB-induzierten DNA-Schaden in signifikanter Weise reduziert und dies vermutlich über eine Induktion des NER vermittelt wird (Schwarz et al., 2002). Ähnliches konnte für das Neuropeptid  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes-Hormon ( $\alpha$ MSH) (Böhm et al., 2005) und das Zytokin IL-18 (Schwarz et al., 2006) beobachtet werden. Bisher wurde nie systematisch untersucht, welchen Effekt IR-Strahlung auf den NER hat. Würde IR-Strahlung den NER inhibieren, hätte IR-Strahlung in Hinblick auf Photokarzinogenese einen doppelt fördernden Effekt, da sie ja auch den apopto-

tischen Zelltod verhindert. Ob dies der Fall ist, sollte im vorliegenden Projekt untersucht werden.

## **1.2. Wissenschaftliche Arbeitsziele des Vorhabens**

### ***Teilprojekt A: IR und UV-induzierte Apoptose***

*Welche Konsequenz hat die Inhibition der UV-induzierten Apoptose durch IR bzw. welche Mechanismen liegen zugrunde?*

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollte in unserem System *in vitro* und *in vivo* die postulierte inhibitorische Wirkung von IR auf die UVB-medierte Apoptose etabliert werden. UVB-induzierte Apoptose ist ein komplexer Prozess, in dem die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, die Aktivierung von p53 durch DNA-Schäden, und die Aktivierung von „Todes-Rezeptoren“ (z.B. Fas/CD95) entweder durch Rezeptor-Clustering oder durch Induktion von Todesrezeptor-Liganden (z.B. Fas-Ligand) eine Rolle spielen. Es sollte daher untersucht werden, ob der schützende Effekt von IR auch in einem weniger heterogenen System wie der Fas-induzierten Apoptose beobachtet werden kann. Außerdem sollten die dem protektiven Effekt von IR-A zugrunde liegenden Mechanismen untersucht werden. Bekanntermaßen ist UV-mediierter DNA-Schaden der wesentliche molekulare Trigger für UV-induzierte Apoptose. Daher sollte der Einfluss von IR auf UVB-induzierte DNA-Schäden (CPD) *in vivo* und *in vitro* untersucht werden (siehe auch Teilprojekt B). Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob IR die Expression einiger exemplarischer in die Apoptose involvierter Moleküle (FLIP<sub>L</sub>, BCL-x<sub>L</sub>, BAX) verändert.

### **Teilprojekt B: IR und DNA-Reparatur**

*Welchen Effekt übt IR auf die DNA-Reparatur aus, bzw. ist dies exogen zu beeinflussen?*

Hier galt es zunächst zu unterscheiden, ob IR die Reparatur oder aber die Entstehung von UVB-induzierten DNA Schäden beeinflusst. Ein Einfluss auf den NER sollte *in vivo* unter Verwendung von NER-defizienten Mäusen (Xpa <sup>-/-</sup>) untersucht werden, *in vitro* mittels eines Shuttle Vector Assays.

### **Teilprojekt C: IR und Karzinogenese**

*Erhöht IR das Karzinogeneserisiko *in vivo* und hat IR Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumoren *in vivo* und *in vitro*?*

C57BL/6 Mäuse sollten nach einem etablierten Bestrahlungsprotokoll mit IR und UVB behandelt werden und der Zeitpunkt des Auftretens von Hauttumoren beobachtet werden. Weiters sollte die Wachstumsgeschwindigkeit der entstandenen Tumoren verglichen werden. Aus den Tumoren sollten stabile Zelllinien gezogen und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht werden.

## **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Dem vorliegenden Projekt lag primär keine hypothetische Annahme zugrunde, es basierte auf der Beobachtung, dass IR die UVB-induzierte Apoptose inhibiert. Aus dieser Tatsache ergab sich die Fragestellung nach den genaueren Wirkmechanismen. Die UVB-induzierte Apoptose ist ein prinzipiell protektives Ereignis, das Zellen mit nicht mehr vollständig reparierbaren DNA-Schäden eliminiert und so maligne Transformation verhindert. Eine Reduktion der UVB-induzierten Apoptose könnte solchermaßen zu einer erhöhten Photokarzinogenese führen. Obwohl genauere experimentelle Grundlagen noch ausständig sind, wird bereits die Einarbeitung von IR-

Filtern in Sonnenschutzmittel propagiert. Daher stand im Zentrum der Untersuchungen die Frage, ob IR Einfluss auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden und Auswirkungen auf die Photokarzinogenese hat. Alleine die Aufklärung der Frage, ob und auf welche Weise IR UV-induzierte DNA-Schäden und somit UV-medierte Zell-tod verhindert, ist für die photobiologische Grundlagenforschung von großem wissenschaftlichem Wert. Es wurde erwartet, dass diese Erkenntnisse eine Basis darstellen, um alternative Strategien zu finden, UV-medierte Zellschaden zu minimieren. In anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurden bereits ausreichend Vorkenntnisse erworben, die in das Projekt einfließen konnten.

### **3. Stand der Wissenschaft und Technik**

Bei natürlicher Sonnenexposition ist menschliche Haut nicht nur UVB (290-320 nm) und UVA (320-400 nm) Strahlung ausgesetzt, sondern auch IR. Bisher hat sich jedoch die photobiologische Forschung vor allem auf den UV-Bereich konzentriert, wohingegen IR weitgehend ignoriert wurde. Es wurde lange Zeit angenommen, dass IR inert ist und biologische Effekte ausschließlich durch dessen Wärmewirkung zu erklären sind. In neuere Zeit hingegen mehren sich die Hinweise, dass IR auch wellenspektrumspezifische Effekte ausübt (Schieke et al., 2003). IR entspricht ca. 54% der solaren Energie, die auf die Erdoberfläche trifft, wohingegen UV Strahlung nur etwa 7% ausmacht. IR wird ähnlich wie UV in drei Bereiche eingeteilt, den kurzwelligen IR-A- (760-1400 nm), den IR-B- (1400 – 3000 nm) und den IR-C-Bereich (3000 nm – 1 mm). Im medizinischen Sektor, aber auch im Kosmetik- und „Wellness“-Bereich wird vorwiegend IR-A eingesetzt. Im Gegensatz zu IR-B und IR-C dringt IR-A tief in die Haut ein (Schroeder et al., 2007).

Die wesentlichen Ereignisse bei der Schädigung einer Zelle durch UVB-Strahlung (290-320 nm) sind Veränderungen an der DNA. UVB-Strahlung induziert vorwiegend zwei Arten von DNA-Schäden, Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte (Patrick et al., 1977). Diese DNA-Schäden treten obligat nach UVB-Exposition auf und können prinzipiell die Basis für die Entstehung von Hautkrebs bilden. Zellen sind jedoch mit sehr effizienten Reparatursystemen ausgestattet, die DNA-Schäden permanent reparieren (Hoeijmakers, 2001). Für die UVB-induzierten DNA-Schäden ist in diesem Zusammenhang die Nukleotid-Excisions-Reparatur (*nucleotide excision repair*, NER) von besonderer Bedeutung. Im Rahmen der Reparatur durch NER wird der DNA-Schaden erkannt, aus dem DNA-Strang herausgeschnitten (Excision) und schließlich die Lücke mit den korrekten DNA-Bestandteilen wieder aufgefüllt. Es handelt sich hierbei um ein äußerst komplexes Geschehen, an dem zahlreiche unterschiedliche Enzyme (NER Komponenten) beteiligt sind (de Laat et al., 1999). Im Rahmen des NER werden sowohl aktiv transkribierte (*transcription coupled repair*) als auch nicht transkribierte (*global genome repair*) Gene repariert.

Die Bedeutung und vor allem die Effizienz des NER wird am besten anhand des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosum (XP) demonstriert. Diese Patienten weisen aufgrund genetischer Defekte ein fehlerhaftes Reparatursystem auf, was zur Entstehung multipler Plattenepithelkarzinome und maligner Melanome bereits in frühen Lebensjahren führt (Berneburg & Lehmann, 2001). Da unterschiedliche Komponenten des NER Komplexes betroffen sein können, existieren 8 Subtypen, so genannte Komplementationstypen (A-G, Variante), die sich im Schweregrad des klinischen Erscheinungsbildes unterscheiden. Zu dem Verständnis des Krankheitsbildes XP aber auch zu den Mechanismen des NER im Allgemeinen haben Tiermodelle in Form von Knock-out-Mäusen einen ganz erheblichen Beitrag geleistet (de Boer &

Hoeijmakers, 1999). Neben den hocheffizienten Reparaturapparaten ist die Haut noch mit einem zusätzlichen Schutzmechanismus ausgestattet, nämlich der Induktion von apoptotischem Zelltod (Kulms & Schwarz, 2000). Zellen, in denen der UVB-induzierte DNA-Schaden nicht komplett repariert wurde, haben prinzipiell das Potential zur malignen Entartung (erster Schritt). Um dem vorzubeugen, schaltet das Tumorsuppressorgen *p53* im Interesse des Gesamtorganismus das Apoptoseprogramm, ein inhärentes Selbstmordprogramm, an, was zur sukzessiven Fragmentierung der geschädigten Zelle führt (Kraemer, 1997; Ziegler et al., 1994). Morphologisch erscheinen die apoptotischen Keratinozyten nach UV-Bestrahlung als Sonnenbrandzellen in der Epidermis. Die Induktion von UV-induzierter Apoptose ist somit ein protektiver Vorgang, der vor maligner Entartung schützt (Murphy et al., 2001). UV-induzierte Apoptose zu beschleunigen bzw. zu verstärken, ist daher ein Konzept, das im Rahmen alternativer Schutzstrategien verfolgt wird. Umgekehrt gehen Störungen im Ablauf der Apoptose mit einer Erhöhung des Karzinogeneserisikos einher (Hoeijmakers, 2001).

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver Vorgang, der strenger Kontrolle unterliegt, so dass gewährleistet ist, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. UV-induzierte Apoptose ist ein komplexer Prozess, in dem die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, die Aktivierung von *p53* durch DNA-Schäden, und die Aktivierung von „Todesrezeptoren“ (wie z.B. Fas) entweder durch Rezeptor-Clustering oder durch Induktion von Todesrezeptor-Liganden (z.B. Fas-Ligand) eine Rolle spielen. Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Ligandenbindung (z.B. Fas-Ligand) an einen Rezeptor der TNF-Familie (z.B. Fas) eingeleitet. Der intrazytoplasmatische Teil des Rezeptors trimerisiert, was die Bindung von Adaptermolekülen ermöglicht, wodurch letztendlich

Caspase 8 aktiviert wird. Das antiapoptotische Molekül FLIP<sub>L</sub> blockiert die Aktivierung von Caspase 8 und damit den extrinsischen Apoptoseweg. Beim intrinsischen oder mitochondrialen Apoptoseweg kommt es über eine erhöhte Expression von proapoptischen Molekülen wie z.B. BAX zur Freisetzung pro-apoptischer Faktoren wie z.B. Cytochrom C aus Mitochondrien, die einen Signalweg in Gang setzen, der letztendlich zur Aktivierung von Caspase-8 führt. Das anti-apoptotische Molekül BCL-X<sub>L</sub> blockiert die Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren aus den Mitochondrien und damit den intrinsischen Apoptoseweg (Jin & El-Deiry, 2005).

## 4. Ergebnisse

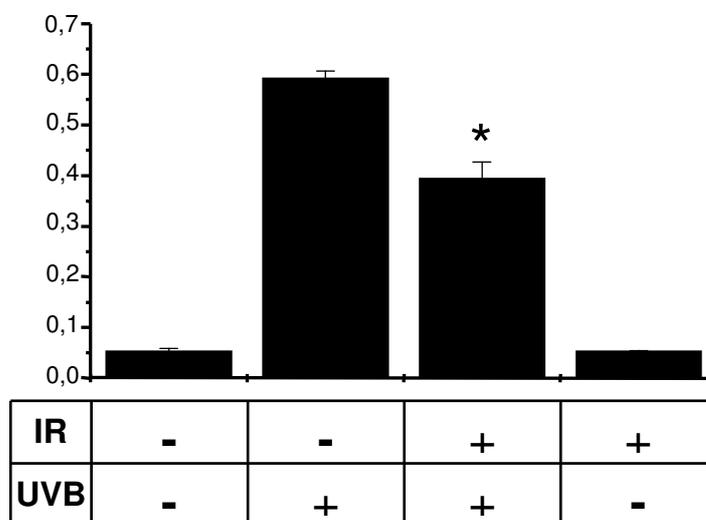
### 4.1. Teilprojekt A: IR und UV-induzierte Apoptose

#### 4.1.1. IR-A reduziert UVB-induzierte Apoptose *in vitro*

In allen Experimenten wurde als IR-Quelle das Gerät Photo Dyn 505 mit schwarzem cut-off Filter verwendet, das IR-A von 780 nm bis 1400 nm emittiert. Als UVB-Strahlenquelle dienten UVB-Fluoreszenzstrahler (Philips TL09, Emissionsmaximum etwa 310 nm).

Um den Effekt von IR-A auf die UVB-induzierte Apoptose *in vitro* zu untersuchen, wurden aus der Epidermis von Ohren von C57BL/6 Mäusen frisch isolierte Keratinozyten verwendet. Diese wurden mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A bestrahlt, bevor sie drei Stunden später 55 mJ/cm<sup>2</sup> UVB exponiert wurden. 16 Stunden danach wurde die Apoptoserate mittels eines DNA-Fragmentierungs-ELISA gemessen. UVB alleine führte zu einer massiven Zunahme der Apoptose (Abbildung 1). Im Gegensatz dazu war in Zellen, die vor UVB mit IR-A bestrahlt worden waren, die Apoptoserate signifikant erniedrigt. IR-A alleine induzierte keine Apoptose.

Abbildung 1



#### **Vorbehandlung mit IR-A reduziert UVB-induzierte Apoptose**

Frisch isolierte Mauskeratinozyten wurden mit  $250 \text{ J/cm}^2$  IR-A vorbehandelt und 3 h später mit  $55 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. 16 h nach UVB wurde Apoptose mittels eines DNA-Fragmentierungs-ELISAs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Absorptionen (495 nm) von Zweifachbestimmungen eines repräsentativen Experimentes (von insgesamt 3 unabhängig durchgeführten Experimenten). \* $p < 0,0005$  vs. UVB alleine (Student's t-Test).

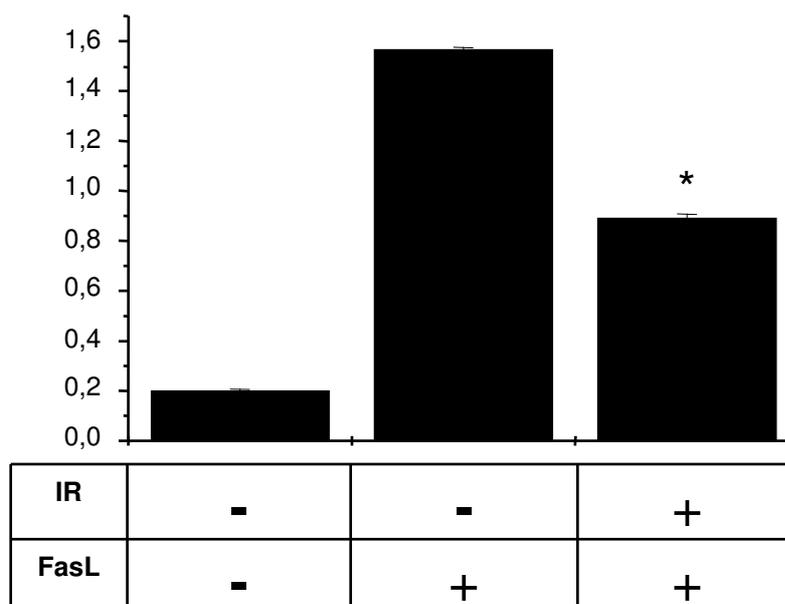
#### **4.1.2. IR-A schützt vor durch Fas-FasL Interaktion induzierter Apoptose**

UVB-induzierte Apoptose ist ein komplexer Prozess, in dem die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, die Aktivierung von p53 durch DNA-Schäden, und die Aktivierung von „Todes-Rezeptoren“ (wie z.B. Fas) entweder durch Rezeptor-Clustering oder durch Induktion von Todesrezeptor- Liganden (z.B. Fas-Ligand) eine Rolle spielen (Kulms & Schwarz, 2000). Es sollte daher untersucht werden, ob der schützende Effekt von IR auch in einem weniger heterogenen System wie der Fas-induzierten Apoptose beobachtet werden kann.

Aus der Epidermis von Ohren von C57BL/6 Mäusen isolierte Keratinozyten wurden mit  $250 \text{ J/cm}^2$  IR-A bestrahlt, drei Stunden später wurde  $75 \text{ ng/ml}$  FasL dem Kul-

turmedium zugefügt. 16 Stunden danach wurde die Apoptoserate mittels eines DNA-Fragmentierungs-ELISAs gemessen. Entsprechend dem UV-induzierten Zelltod wurde auch die FasL-induzierte Apoptose signifikant durch IR-A Vorbehandlung reduziert (Abbildung 2).

**Abbildung 2**



#### **Vorbehandlung mit IR-A reduziert FasL-induzierte Apoptose**

Frisch isolierte Mauskeratinozyten wurden mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A vorbehandelt und 3 h später mit 75 ng/ml FasL inkubiert. 16 h nach der Zugabe von FasL wurde die Apoptose mittels eines DNA-Fragmentierungs-ELISAs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Absorptionen (495 nm) von Zweifachbestimmungen eines repräsentativen Experimentes (von insgesamt 3 unabhängig durchgeführten Experimenten). \* $p < 0,0005$  vs. FasL ohne Vorbehandlung mit IR-A (Student's t-Test).

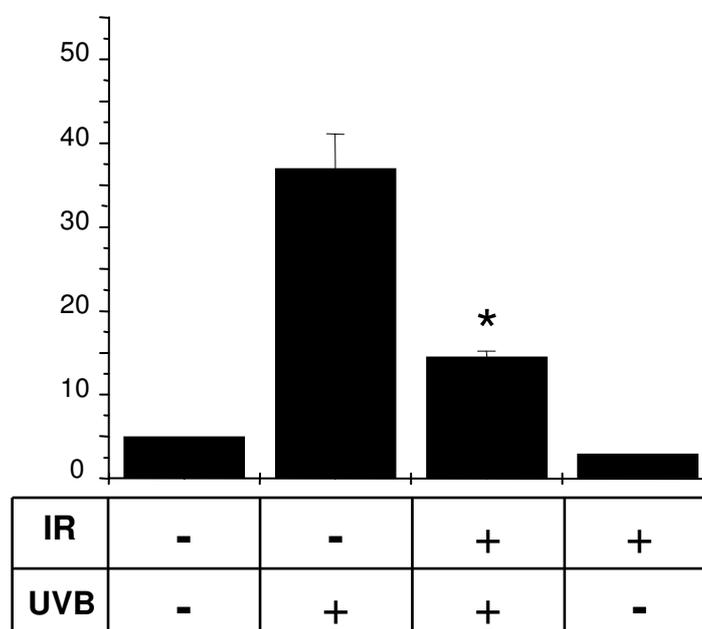
#### **4.1.3. Vorbehandlung mit IR-A inhibiert UVB-induzierte Apoptose *in vivo***

Um den Effekt von IR-A auf die UVB-induzierte Apoptose *in vivo* zu untersuchen, wurde die Bildung von sogenannten „Sunburn Cells“ mit und ohne Vorbehandlung mit IR-A analysiert. „Sunburn Cells“ entsprechen apoptotischen Keratinozyten, die

durch einen pyknotischen Zellkern und ein geschrumpftes eosinophiles Zytoplasma gekennzeichnet sind.

C57BL/6 Mäuse wurden mit  $135 \text{ J/cm}^2$  IR-A am rasierten Rücken exponiert. 3 Stunden später wurden die Tiere mit  $150 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. 16 Stunden später wurden Stanzbiopsien von den UV-exponierten Arealen entnommen, formalinfixiert, und Schnitte mit Haematoxylin und Eosin gefärbt. Die Anzahl an „Sunburn cells“ in der Epidermis wurde ausgezählt. In der Epidermis von IR-A vorbehandelten Mäusen war die Anzahl an „Sunburn cells“ signifikant reduziert im Vergleich zu Tieren, die nur UVB bestrahlt worden waren (Abbildung 3). IR-A alleine hatte keinen Einfluss auf die Bildung von „Sunburn cells“.

**Abbildung 3**



***Vorbehandlung mit IR-A reduziert die Bildung von „Sunburn cells“ in Mausepidermis***

*C57BL/6N Mäuse wurden mit  $135 \text{ J/cm}^2$  IR-A vorbehandelt und 3 h später mit  $150 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. 16 h nach UVB wurden Biopsien entnommen und H/E gefärbte Schnitte hergestellt. Die Anzahl an „Sunburn cells“ pro 6 mm Epidermis wurde bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der „Sunburn cells“ pro 6*

*mm Epidermis aus 3 unterschiedlichen Schnitten eines repräsentativen Experimentes (von insgesamt 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten).*

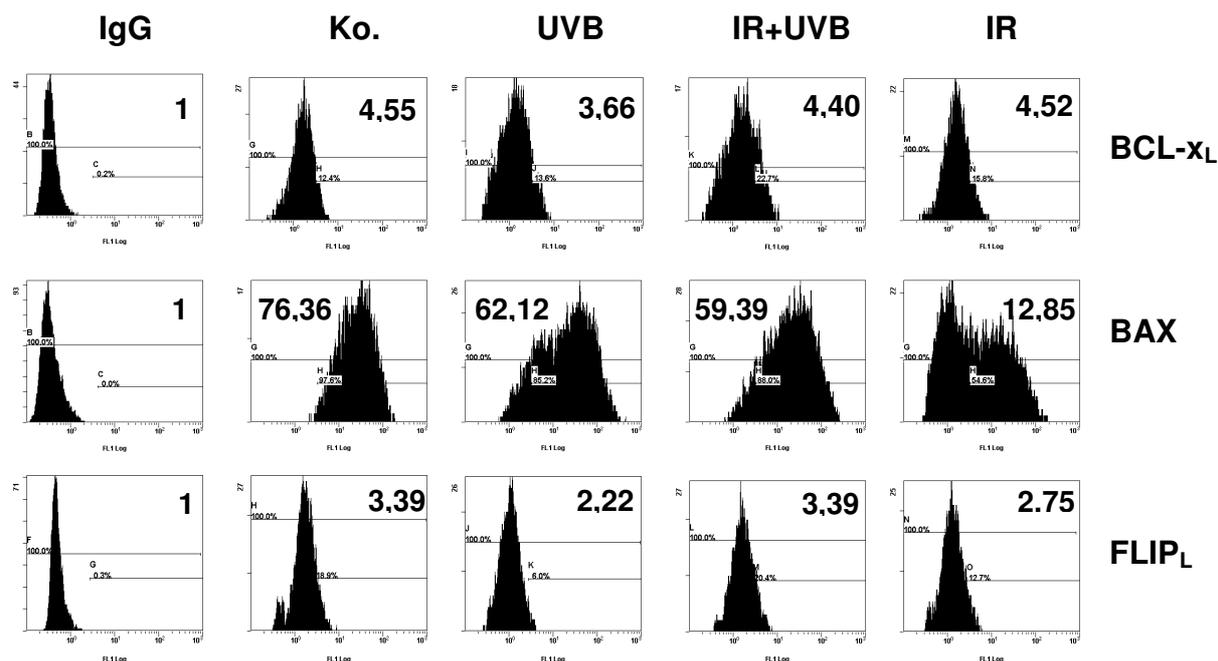
*\* $p < 0,05$  vs. nur UVB-bestrahlte Mäuse (Student's t-Test).*

#### **4.1.4. IR-A Vorbehandlung verändert die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen**

Aus den Ergebnissen des Teilprojektes B lässt sich ableiten, dass die verringerte UV-induzierte Apoptose nach IR-A Vorbehandlung auf einer Verringerung des DNA-Schadens beruht (Abbildung 7 und 8). Wie oben beschrieben, reduziert IR-A auch die FasL-induzierte Apoptose (Abbildung 2). Da im FasL-medierten Apoptoseweg DNA-Schaden keine Rolle spielt, müssen andere Mechanismen involviert sein. Daher wurde der Einfluss von IR-A auf die Expression der antiapoptotischen Proteine FLIP<sub>L</sub> und BCL-x<sub>L</sub> untersucht. FLIP<sub>L</sub> interferiert mit der extrinsischen Apoptoseinitiation, BCL-x<sub>L</sub> hingegen als Vertreter der BCL-2 Familie mit dem intrinsischen Apoptoseweg (Jin & El-Deiry, 2005).

Mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A vorbehandelte oder nicht vorbehandelte frisch isolierte Keratinozyten wurden mit 55 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. 16 Stunden später wurden die Zellen geerntet, permeabilisiert und eine intrazelluläre Färbung mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen FLIP<sub>L</sub> und BCL-x<sub>L</sub> durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde mittels FACS-Analyse unter Verwendung eines FC500 Flow-Cytometers (Beckmann-Coulter) und der CXP 2,2 Software ermittelt. UVB führte zu einer verminderten Expression von FLIP<sub>L</sub> und BCL-x<sub>L</sub> (Abbildung 4). Waren die Keratinozyten hingegen mit IR-A vorbehandelt, so konnte die UVB-induzierte Suppression der beiden antiapoptotischen Proteine verhindert werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine Analyse der Expression des proapoptotischen BAX Proteins, dass dieses durch Behandlung mit IR-A alleine deutlich reduziert wird (Abbildung 4).

Abbildung 4



**Vorbehandlung mit IR-A verhindert UVB-induzierte Suppression der anti-apoptischen Proteine BCL-x<sub>L</sub> und FLIP<sub>L</sub> und reduziert die Expression des proapoptischen BAX-Proteins**

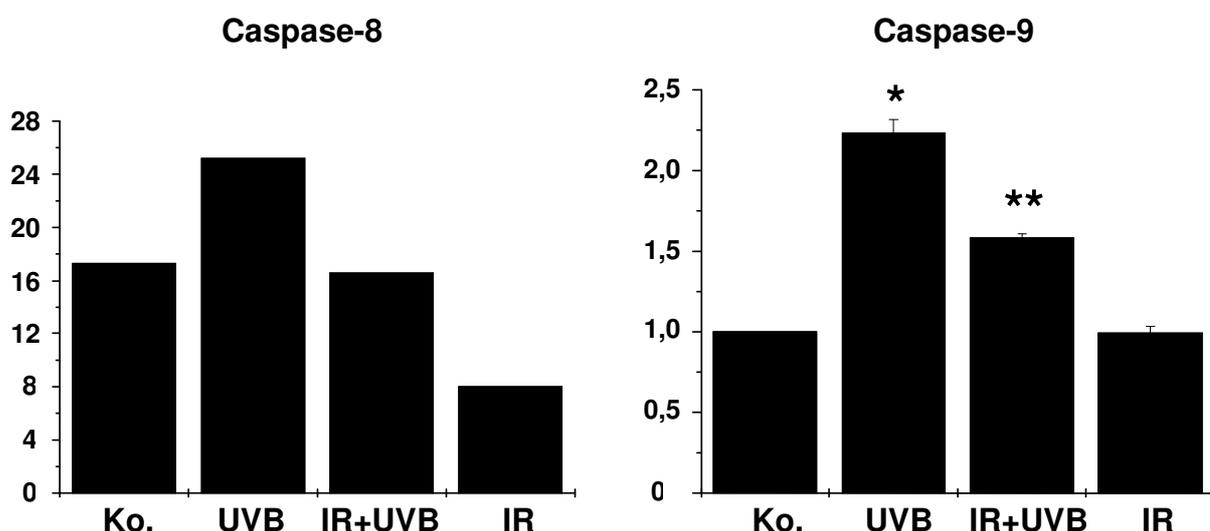
Frisch isolierte Mauskeratinozyten blieben entweder unbehandelt (Ko.) oder wurden mit 55 mJ/cm<sup>2</sup> UVB (UVB) bestrahlt, bzw. mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A 3 h vor UVB Exposition (IR+UVB) vorbehandelt oder nur mit IR bestrahlt (IR). 16 h nach UVB-Bestrahlung wurde eine intrazelluläre FACS-Färbung mit Antikörpern gegen BCL-x<sub>L</sub>, FLIP<sub>L</sub>, oder BAX durchgeführt. In den Histogrammen stellt die x-Achse die Fluoreszenzintensität, die y-Achse die Zellzahl dar. Die Zahlenwerte stellen die x-Mediane normalisiert auf die auf 1 gesetzte IgG-Kontrolle (IgG) dar. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment (von insgesamt 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten)

#### 4.1.5. IR-A inhibiert intrinsische und extrinsische Apoptose

Um zu bestätigen, dass tatsächlich sowohl der intrinsische (vertreten durch das antiapoptische Protein BCL-x<sub>L</sub> und das proapoptische Protein BAX) als auch der extrinsische (vertreten durch das antiapoptische Protein FLIP<sub>L</sub>) Apoptoseweg durch IR-A inhibiert wird, wurden die Aktivitäten von Caspase-9 (als Parameter für den intrinsischen Weg) und Caspase-8 (als Parameter für den extrinsischen Weg) bestimmt.

Mit  $250 \text{ J/cm}^2$  IR-A vorbehandelte bzw. nicht vorbehandelte Zellen der transformierten Mauskeratinozyten-Zelllinie PAM 212 wurden mit  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. 16 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die Caspasen-Aktivität mittels kommerziell erhältlichen Caspase-8- bzw. Caspase-9-Assays bestimmt. IR-A Vorbehandlung inhibierte die UVB-induzierte Aktivierung sowohl von Caspase-8 als auch von Caspase-9 (Abbildung 5). Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass durch IR-A sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg betroffen ist.

**Abbildung 5**



#### **IR-A verhindert UVB-induzierte Aktivitätszunahme von Caspase-8 und -9**

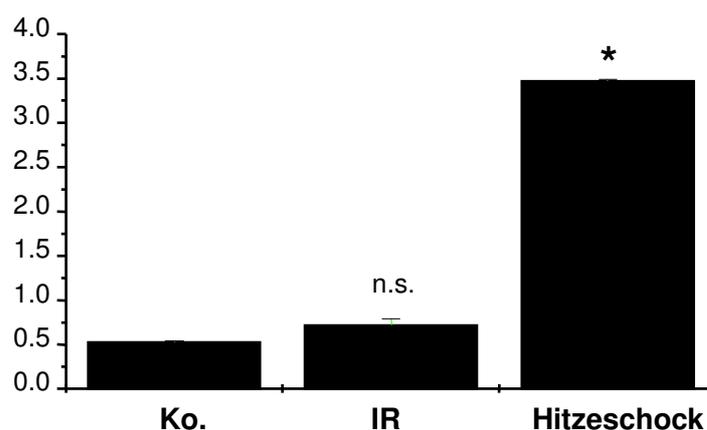
PAM 212 Zellen blieben entweder unbehandelt (Ko.) oder wurden mit  $30 \text{ mJ/cm}^2$  UVB (UVB) bestrahlt bzw. mit  $250 \text{ J/cm}^2$  IR-A 3 h vor UVB (IR+UVB) behandelt oder nur mit IR bestrahlt. 16 h nach UVB wurden die Zellen geerntet und die Caspase-Aktivität bestimmt. **Caspase-8:** Die Aktivität von Caspase-8 wurde aus der errechneten Steigung der über 10 Minuten jede Minute gemessenen Absorptionen bei  $405 \text{ nm}$  bestimmt. Die Balken stellen die Aktivität von Caspase-8 in  $\text{pmol pro Minute}$  dar. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment (von insgesamt 2 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten). **Caspase-9:** Die Balken stellen die Aktivitätszunahme (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Zweifachbestimmungen) von Caspase-9 nach Stimulation im Vergleich zur Aktivität von unbehandelten Zellen (Ko.), welche auf 1 gesetzt wurde, dar. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment (von insgesamt 2 voneinander unabhängigen Experimenten). \* $p < 0,05$  verglichen mit Ko., \*\* $p < 0,01$  verglichen mit UVB (Student's t-Test).

#### 4.1.6. IR-A induziert nicht das Stressprotein HSP70

Es wurde berichtet, dass die Induktion von Stressproteinen, im Besonderen von Heat-Shock-Protein 70 (HSP70), Keratinozyten vor UVB-induzierter Apoptose schützt (Trautinger et al., 1995). Daher drängt sich die Frage auf, ob die antiapoptotische Wirkung von IR-A auf einer Induktion von HSP70 beruht. HSP70 zählt zu den bestuntersuchten Stressproteinen und wird durch unterschiedliche Stresseinwirkungen, unter anderem durch Wärmeeinwirkung („Hitzeschock“), induziert.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden frisch isolierte Maus-Keratinozyten mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A exponiert bzw. ein klassischer Hitzeschock durchgeführt, indem die Zellen über 3 Stunden auf 42° C erwärmt wurden. 3 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen geerntet, Proteine gewonnen und in einem kommerziell erhältlichen HSP70-ELISA eingesetzt. Während der klassische Hitzeschock zu einer deutlichen Induktion der HSP70-Expression führte (Abbildung 6), wurde HSP70 nach IR-A Exposition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht signifikant induziert.

**Abbildung 6**



#### **Keine Induktion des Stressproteins HSP70 nach IR-A Exposition**

*Frisch isolierte Maus-Keratinozyten blieben entweder unbehandelt (Ko.) oder wurden mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A bestrahlt bzw. Hitzeschock ausgesetzt (42° C über 3 Stunden). 3 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen geerntet und HSP70 mittels eines ELISAs bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen der Absorptio-*

nen von Zweifachbestimmungen eines repräsentativen Experiments (von insgesamt 3 unabhängig durchgeführten Experimenten). \* $p < 0,00005$  vs. Ko. (Student's t-Test)

## 4.2. Teilprojekt B: IR und DNA-Reparatur

### 4.2.1. Vorbehandlung mit IR-A reduziert UVB-induzierten DNA-Schaden *in vitro*

UV-mediierter DNA-Schaden ist ein wesentlicher molekularer Trigger für UV-induzierte Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass verminderter DNA-Schaden mit einer Reduktion der Apoptoserate einhergeht (Kulms et al., 1999). UVB verursacht im Wesentlichen 2 Photoprodukte, Pyrimidin Dimere (CPD) und 6-4-Photoprodukte. Daher wurde die Menge an DNA-Schaden *in vitro* mit einer Southwestern Dotblot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen CPD bestimmt.

Hierfür wurden Zellen der transformierten Keratinozytenlinie PAM 212 3 Stunden vor Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB mit 250 mJ/cm<sup>2</sup> IR-A behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte bzw. nur mit IR-A oder nur mit UVB-bestrahlte Zellen. 4 h nach UVB Exposition wurden die Zellen geerntet, DNA extrahiert und auf eine Membran gebロットet. Diese wurde dann mit einem gegen CPD gerichteten Antikörper inkubiert und mittels Chemilumineszenzverfahren sichtbar gemacht. In unbehandelten Zellen fanden sich keine CPD (Abbildung 7). Hingegen war in UVB-bestrahlten Zellen eine deutliche Induktion von CPD zu beobachten. Waren die Zellen mit IR-A vorbehandelt, so war die Anzahl der CPD deutlich verringert. In nur mit IR-A bestrahlten Zellen konnten keine CPD nachgewiesen werden. Eine densitometrische Analyse der Blots von 4 voneinander unabhängigen Experimenten ergab in UVB-bestrahlten Zellen, die mit IR-A vorbehandelt worden sind, eine Reduktion der CPD um  $52,2 \pm 13,0$  % (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Abbildung 7

<b>IR</b>	-	-	+	+
<b>UVB</b>	-	+	+	-
<b>CPD</b>				
<b>Adenosin</b>				

#### ***IR-A reduziert UVB-induzierte CPD in vitro***

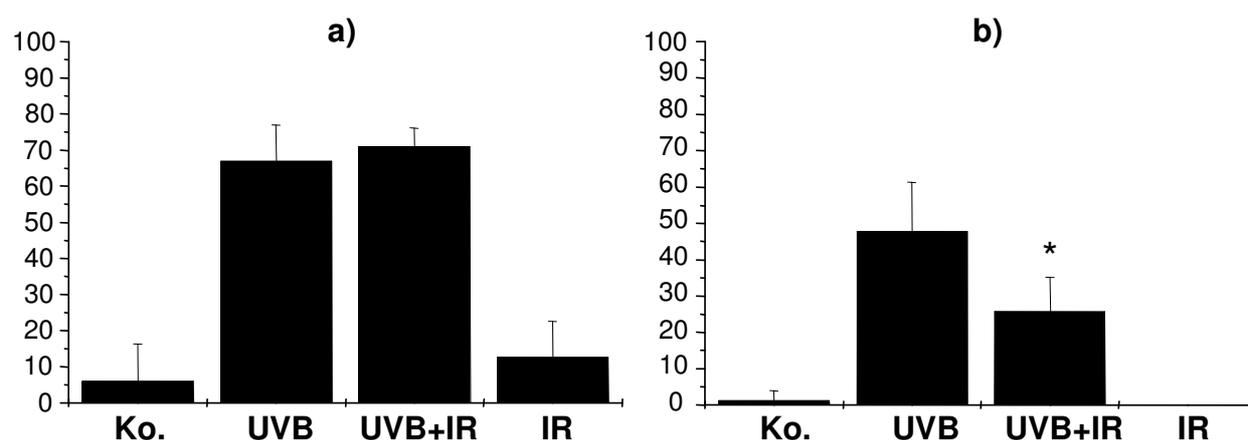
*PAM 212 Zellen wurden 3 h vor Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A behandelt. 4 h nach UVB wurden die Zellen geerntet, DNA extrahiert, und eine Southwestern Dotblot Analyse unter Verwendung eines spezifischen gegen CPD gerichteten Antikörpers durchgeführt. Um gleiche DNA-Mengen zu gewährleisten, wurde der Blot gestriipt und mit einem Antikörper gegen Adenosin inkubiert (Adenosin-Kontrolle). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment (von insgesamt 4 voneinander unabhängigen durchgeführten Experimenten).*

#### **4.2.2. Vorbehandlung mit IR-A reduziert UVB-induzierten DNA-Schaden *in vivo***

Um zu überprüfen, ob die unter 4.2.1 angeführten Ergebnisse auch *in vivo* nachvollzogen werden können, wurden C57BL/6 Mäuse am Rücken rasiert und mit 135 J/cm<sup>2</sup> IR-A exponiert. 3 Stunden später wurden die gleichen Areale mit 75 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. 16 Stunden später wurden Stanzbiopsien von den UVB exponierten Stellen entnommen. Diese wurden formalinfixiert und anschließend wurden Paraffinschnitte hergestellt. Einem etablierten immunhistochemischen Protokoll entsprechend wurden die Schnitte mittels eines spezifischen gegen CPD gerichteten Antikörpers *in situ* gefärbt. Die CPD-positiven Zellkerne in der Epidermis wurden bestimmt und der Prozentsatz CPD-positiver Zellen in den einzelnen Schnitten berechnet. In Hautproben, die nur mit UVB bestrahlt wurden, war der Großteil der Zellkerne

in der Epidermis CPD-positiv gefärbt, d.h. die betreffenden Zellen weisen einen relevanten DNA Schaden auf (Abbildung 8b). Waren die Tiere hingegen vor der Exposition mit UVB mit IR-A bestrahlt worden, so war die Anzahl CPD-positiver Zellkerne um 46 % reduziert. Um zu unterscheiden, ob IR-A die Entstehung von CPD inhibiert, wurde das Experiment wiederholt, allerdings die Stanzbiopsien diesmal unmittelbar nach der UVB-Exposition entnommen. Bezüglich der Zahl CPD-positiver Zellkerne konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IR-A vorbehandelten und nur mit UVB bestrahlten Hautproben festgestellt werden (Abbildung 8a). Da die Menge des DNA-Schadens unmittelbar nach UVB-Bestrahlung offensichtlich unabhängig von der IR-A Behandlung ist, kann man folgern, dass IR-A keinen Einfluss auf die Bildung von CPD hat. Die Tatsache, dass unmittelbar nach UVB kein Effekt von IR-A auf die Menge des DNA-Schadens zu beobachten war, hingegen 16 Stunden nach UVB sehr wohl, impliziert, dass IR-A möglicherweise einen Einfluss auf die Reparatur von bereits entstandenen DNA-Schäden hat.

**Abbildung 8**



### ***IR-A verringert CPD in vivo***

*C57BL/6N Mäuse wurden mit 135 J/cm<sup>2</sup> IR-A vorbehandelt und 3 h später mit 75 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. (a) unmittelbar bzw. (b) 16 h nach UVB-Exposition wurden Hautbiopsien aus den bestrahlten Arealen entnommen und die Schnitte in situ mit einem gegen CPD gerichteten Antikörper gefärbt. Angegeben wird der Prozentsatz CPD-positiver Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung). Hierzu wurde die Anzahl CPD-positiver Zellen in jeweils 3 zufällig gewählten Epidermislängen von*

630  $\mu\text{m}$  aus jeder Probe zweier unabhängiger Experimente gezählt und der Prozentsatz CPD-positiver Zellen errechnet.

\* $p < 0,01$  verglichen mit UVB alleine (Student's *t*-Test)

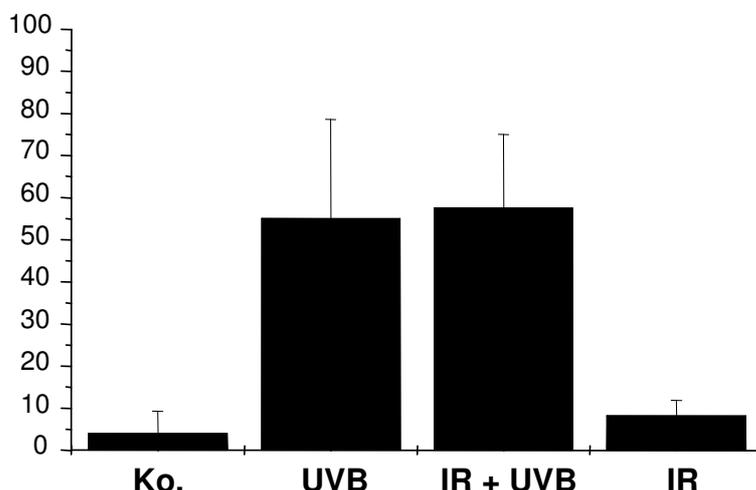
### 4.2.3. Vorbehandlung mit IR-A induziert die DNA-Reparatur

Die Ergebnisse aus 4.2.2. legen eine Beeinflussung der DNA-Reparatur durch IR-A nahe. UVB-medierte DNA-Schäden werden durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) höchst effizient repariert (de Laat, 1999). Um zu untersuchen, ob die NER in die beobachtete Reduktion der CPD nach IR-A Vorbehandlung involviert ist, wurden die unter 4.2.2 ausgeführten Experimente mit *Xpa* knock-out (*Xpa*  $-/-$ ) Mäusen wiederholt. Diese verfügen aufgrund einer Mutation des *Xpa*-Gens über keinen funktionellen NER (deVries et al., 1995).

*Xpa*  $-/-$  Mäuse wurden 3 Stunden vor Bestrahlung mit 55  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  UVB (die UVB Dosis wurde geringer gewählt als in den Experimenten mit den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen, da *Xpa*  $-/-$  Mäuse photosensitiver sind) mit 135  $\text{J}/\text{cm}^2$  IR-A behandelt. 16 Stunden später wurden Stanzbiopsien von den UVB-exponierten Hautarealen entnommen. Die Biopsien wurden formalinfixiert und Paraffinschnitte hergestellt. Mittels eines etablierten immunhistochemischen Protokolls wurden die Schnitte mittels eines spezifischen gegen CPD gerichteten Antikörpers *in situ* gefärbt. Die Anzahl der CPD-positiven Zellkerne in der Epidermis wurde bestimmt und der Prozentsatz CPD-positiver Zellen in den einzelnen Schnitten berechnet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Abbildung 8b) hatte in den *Xpa*  $-/-$  Mäusen die IR-A Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Anzahl CPD-positiver Zellen (Abbildung 9). Aus der Tatsache, dass der Effekt von IR-A in den NER-defizienten *Xpa*  $-/-$  Mäusen nicht zu beobachten ist, aber in den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen sehr wohl, lässt sich auf eine Rolle der NER bei der Reduktion des UVB-induzierten DNA-Schadens durch IR-A schließen. Die Beobachtungen, dass IR-A den UVB-

induzierten DNA-Schaden *in vitro* und *in vivo* reduziert und dass dieser Effekt auf einer Induktion der NER beruht, waren unerwartet.

**Abbildung 9**



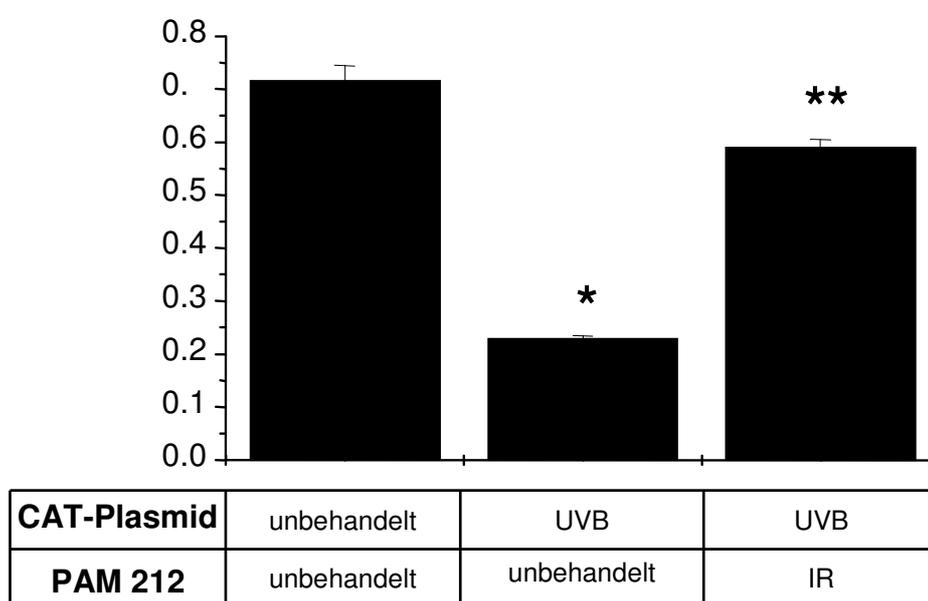
***Die Reduktion des UVB-induzierten DNA-Schadens durch IR-A Vorbehandlung ist NER-abhängig***

*Xpa* <sup>-/-</sup> Mäuse (NER-defizient) wurden mit 135 J/cm<sup>2</sup> IR-A und 3 h später mit 55 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. 16 h nach UVB Exposition wurden Hautbiopsien aus den bestrahlten Arealen entnommen und die Schnitte *in situ* mit einem spezifischen gegen CPD gerichteten Antikörper gefärbt. Angegeben wird der Prozentsatz CPD-positiver Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung). Hierzu wurde die Anzahl CPD-positiver Zellen in jeweils 3 zufällig gewählten Epidermislängen von 630 µm aus jeder Probe zweier unabhängiger Experimente gezählt und der Prozentsatz CPD positiver Zellen errechnet.

Um die Annahme einer Induktion der DNA-Reparatur bzw. der NER durch IR-A zu bestätigen, wurde ein Shuttle Vector Assay durchgeführt. Ein Plasmid, das die Sequenz für das Reportergen **Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)** enthält, wurde mit UVB bestrahlt und unmittelbar danach in PAM 212 Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Die Zellen waren entweder 3 Stunden vor der Transfektion mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A bestrahlt und unbehandelt geblieben. 16 Stunden nach der Transfektion wurde die CAT Enzymaktivität mittels eines kommerziell erhältlichen CAT-ELISAs bestimmt. Zellen, die das UVB-bestrahlte Plasmid erhielten, zeigten eine deutlich reduzierte CAT-Aktivität im Vergleich zu Zellen, die mit dem unbestrahlten

Plasmid transfiziert wurden (Abbildung 10). Waren die Zellen hingegen vor Transfektion mit dem UV-bestrahlten CAT Plasmid mit IR-A behandelt worden, so war die CAT-Aktivität signifikant erhöht. Da die verringerte CAT-Aktivität mit der Schwere des DNA-Schadens korreliert, bestätigen die Experimente die Annahme, dass durch IR-A Vorbestrahlung die NER induziert wird.

**Abbildung 10**



### ***IR-A verhindert UV-induzierte Reduktion der CAT Aktivität im Shuttle Vector Assay***

*PAM 212 Zellen blieben unbehandelt oder wurden mit 250 J/cm<sup>2</sup> IR-A bestrahlt. 3 h später wurden die Zellen mit dem mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlten CAT-Plasmid transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die unbestrahltes CAT-Plasmid erhielten. 16 h nach Transfektion wurde die CAT Enzymaktivität mittels ELISA bestimmt. Die Balken stellen Mittelwert  $\pm$  Standard-Abweichung der Absorption eines repräsentativen Experimentes dar (von insgesamt 3 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten).*

*\* $p < 0,005$  vs. Kontrolle. \*\* $p < 0,005$  vs. unbehandelte Zellen, die UVB-bestrahltes CAT-Plasmid erhalten haben (Student's t-Test)*

### **4.3. Teilprojekt C: IR und Karzinogenese**

#### **4.3.1. IR-A hat keinen Einfluss auf die Photokarzinogenese**

Im Rahmen der Teilprojekte A und B konnte gezeigt werden, dass durch Vorbehandlung mit IR-A die UVB-induzierte Apoptose reduziert wird. Da die Induktion UV-induzierter Apoptose ein protektiver Vorgang ist, der vor maligner Entartung schützt, könnte deren Inhibition das Überleben von UV-geschädigten Zellen ermöglichen und damit zu verstärkter Krebsentstehung führen. Andererseits ist zu berücksichtigen, dass IR-A eine Reduktion des UVB-induzierten DNA-Schadens verursacht, was einer kanzeroprotektiven Wirkung gleichkäme. Aus diesem Grund wurde in einem Langzeitexperiment der Einfluss von IR-A auf die Entstehung von UVB-induzierten Hauttumoren untersucht.

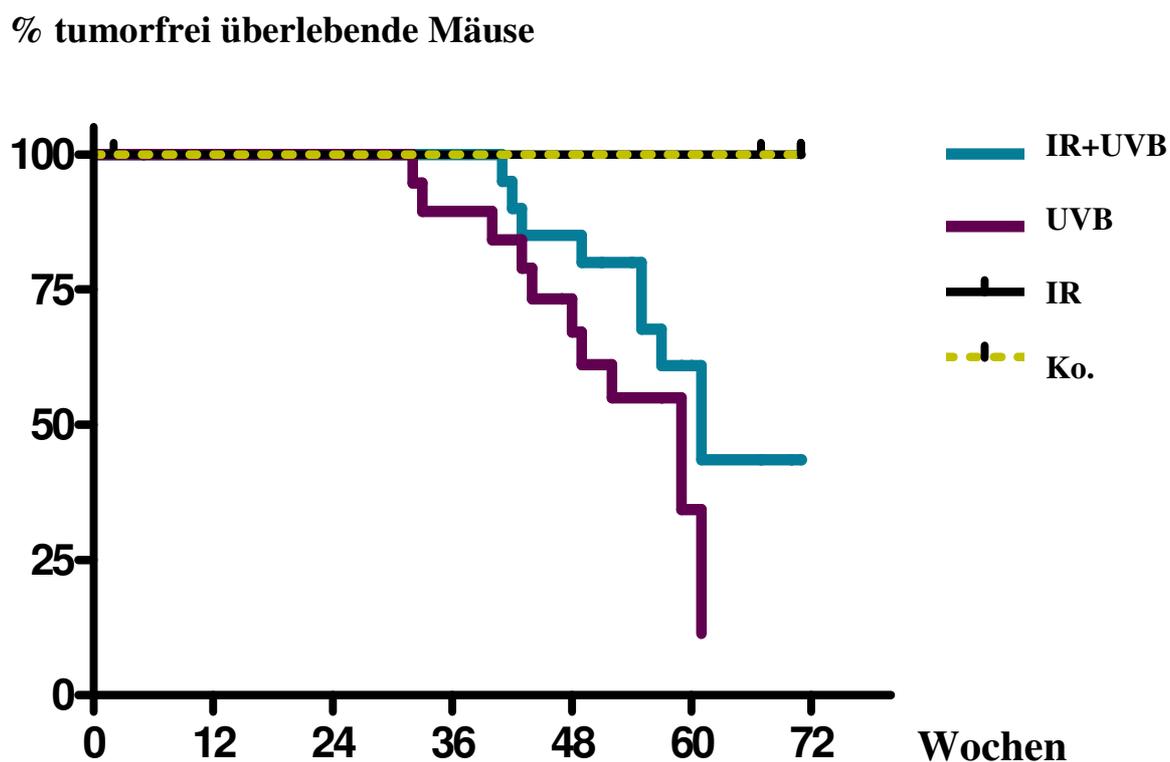
Entsprechend einem etablierten Photokarzinogeneseprotokoll (Beissert et al., 2001) wurden C57BL/6 Mäuse 3-mal wöchentlich mit  $135 \text{ J/cm}^2$  IR-A und zwei Stunden später mit  $800 \text{ mJ/cm}^2$  UVB über insgesamt 25 Wochen bestrahlt (Gruppe IR+UVB). Weitere Gruppen wurden entweder nur mit UVB (Gruppe UVB) oder nur mit IR-A (Gruppe IR) bestrahlt oder blieben völlig unbehandelt (Gruppe Ko.). Der Beobachtungszeitraum nach Bestrahlungsende betrug 80 Wochen. In der UVB-Gruppe entwickelten sich 17 Hauttumoren in 12 Mäusen (aus insgesamt 20 Mäusen pro Gruppe) (Tabelle 1). Ähnlich war die Situation in der Gruppe IR+UVB. Hier entwickelten sich 16 Hauttumoren in 11 Mäusen (durchschnittlich 1,42 Tumore pro Maus in der Gruppe UVB im Vergleich zu 1,45 Tumore pro Maus in der Gruppe IR+UVB). Nur mit IR bestrahlte Tiere entwickelten ebenso wie die unbehandelten Mäuse keine Hauttumoren.

**Tabelle 1**

	<b>Ko.</b>	<b>UVB</b>	<b>IR+UVB</b>	<b>IR</b>
Tumortragende Mäuse pro Gruppe	0	12	11	0
Tumore pro Gruppe	0	17	16	0
Tumore/Maus	0	1,42	1,45	0
<i>Gesamtanzahl Mäuse</i>	<i>20</i>	<i>20</i>	<i>20</i>	<i>20</i>

Mäuse aus der Gruppe IR+UVB entwickelten ihre Hauttumoren im Schnitt 56 ( $\pm$  12,22) Wochen nach Beginn des Bestrahlungsprotokolls, Tiere aus der UVB-Gruppe schon nach durchschnittlich 48,25 ( $\pm$  10,15) Wochen (jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Der Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant (Student's t-Test). Ferner wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung zu evaluieren. Entsprechend der Methode werden hierbei auch Tiere berücksichtigt, die vor Entwicklung eines Tumors versterben. Die statistische Auswertung der Daten mittels eines log rank Tests ergab, dass das Auftreten der Hauttumoren durch IR-A-Vorbehandlung im Vergleich zu nur UVB-bestrahlten Tieren zumindest nicht beschleunigt ist (Abbildung 11). Es fand sich sogar eine Tendenz in Richtung verzögertes Auftreten von UV-induzierten Tumoren nach IR-A Vorbehandlung. Der Unterschied zwischen den Gruppen UVB und IR+UVB war allerdings nicht signifikant (log rank Test). Nur mit IR bestrahlte Tiere (Gruppe IR) und unbehandelte Tiere (Gruppe Ko.) entwickelten keine Tumoren (Abbildung 11).

Abbildung 11



### ***IR-A beschleunigt nicht das Auftreten UV-induzierter Tumoren***

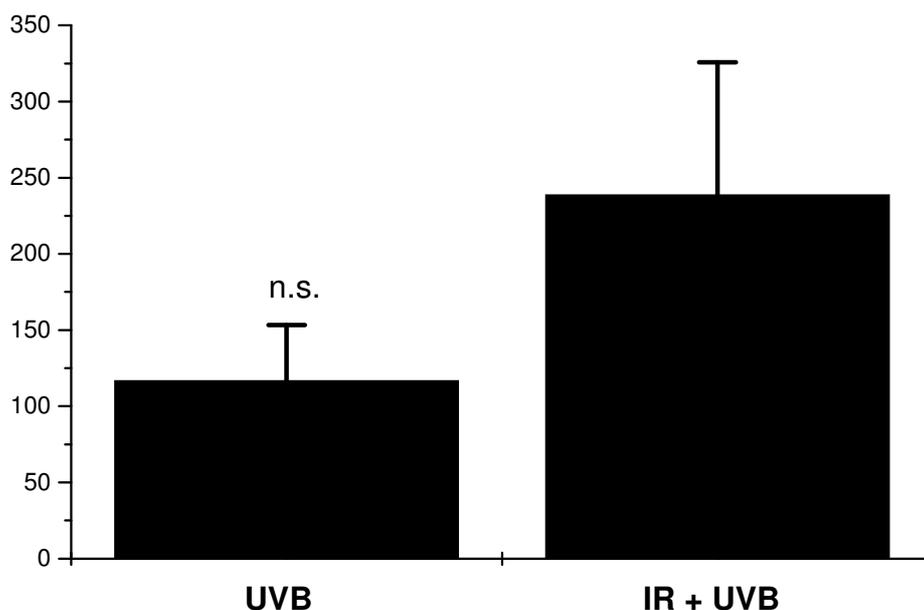
*C57BL/6 Mäuse wurden 3-mal wöchentlich mit 135 J/cm<sup>2</sup> IR-A und zwei Stunden später mit 800 mJ/cm<sup>2</sup> UVB über insgesamt 25 Wochen bestrahlt (Gruppe IR+UVB). Weitere Gruppen wurden entweder nur mit UVB (Gruppe UVB) oder nur mit IR-A (Gruppe IR) bestrahlt oder blieben völlig unbehandelt (Gruppe Ko.). Jede Gruppe bestand aus 20 weiblichen gleichaltrigen Mäusen. Am Anfang des Experimentes waren die Tiere 6-8 Wochen alt. 72 Wochen nach Beginn des Bestrahlungsprotokolls wurde eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung zu bestimmen. Statistische Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen wurden mittels eines log rank Tests berechnet. Die statistischen Unterschiede in den Tumor-latenten Perioden wurden mittels eines Mann-Whitney U Testes bestimmt. Das Langzeit-Experiment wurde insgesamt einmal durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen UVB und IR+UVB bezüglich der Wahrscheinlichkeit, Tumore zu entwickeln, waren statistisch nicht signifikant.*

#### 4.3.2. Vorbehandlung mit IR-A führt zu einer tendenziell erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit UVB-induzierter Hauttumore

Sobald sich die UVB-induzierten Tumore entwickelt hatten, wurden diese zweimal wöchentlich gemessen. Hierzu wurden die maximalen Durchmesser (Breite x Tiefe x Höhe) mit einer Schublehre gemessen und das Tumorumfang nach der Ellipsoid Volumen Formel ( $\text{Tumorumfang} = (\text{Breite} \times \text{Tiefe} \times \text{Höhe})/2$ ) nach Tomayko & Reynolds (1989) berechnet. Die Tumorumfänge aus der Gruppe IR + UVB und aus der Gruppe UVB wurden gepoolt und die durchschnittliche Wachstumsrate in  $\text{mm}^3$  pro Woche berechnet. 7 Tumore folgender histologischer Diagnosen (siehe auch Tabelle 2) aus Tieren der Gruppe IR + UVB wurden gepoolt: 5 x Sarkome, 1 x malignes Trichoepitheliom und 1 x Plattenepithelkarzinom. 7 Tumore folgender histologischer Diagnosen (siehe auch Tabelle 2) aus Tieren der Gruppe UVB wurden gepoolt: 5 x Sarkome, 1 x malignes Trichoepitheliom und 1 x Basalzellkarzinom. Tendenzuell wuchsen Tumoren in der Gruppe IR + UVB rascher als jene der Gruppe UVB ( $239,15 \pm 228,84 \text{ mm}^3$  pro Woche vs.  $117,22 \pm 95,58 \text{ mm}^3$  pro Woche, jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (*Student's t-Test*) (Abbildung 12). Spätestens nach Erreichen eines Tumorumfanges von  $1 \text{ cm}^3$  wurden die Tiere getötet. Um die Tumoren auch *in vitro* näher charakterisieren zu können, wurde versucht, aus den exzidierten Tumoren stabile Zelllinien zu etablieren. Die Wachstumsrate *in vitro* wurde mittels eines MTT Assays (Mosmann, 1983) bestimmt. Die proliferative Kapazität 0 und 72 Stunden nach Aussäen der Zellen wurde von jeweils 6 stabilen Zelllinien aus der Gruppe IR + UVB (histologische Diagnosen: 5 x Sarkom und 1 x malignes Trichoepitheliom) und aus der Gruppe UVB (histologische Diagnosen: 5 x Sarkom und 1 x Basalzellkarzinom) ermittelt. Die Absorptionen (540 nm) nach 0 Stunden wurden auf 1 gesetzt und die Proliferationszunahme nach 72 Stunden berechnet (Abbildung 13). Bezüglich der Wachstumskinetik

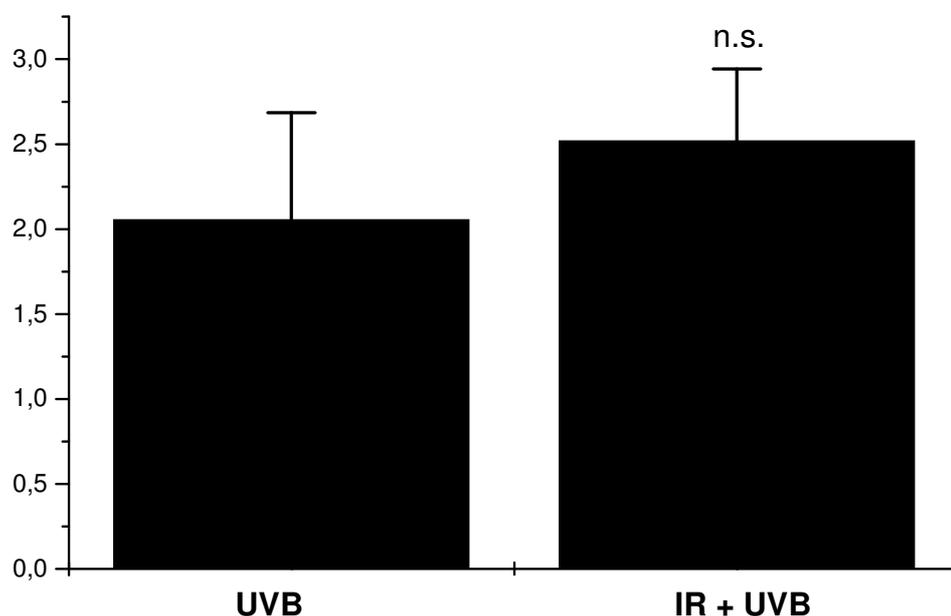
zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Hauttumoren aus den beiden Gruppen, tendenziell war aber auch hier wie *in vivo* in Tumoren aus der Gruppe IR + UVB eine leicht erhöhte Proliferation zu beobachten.

**Abbildung 12**



***UVB-induzierte Hauttumore aus IR-A vorbehandelten Mäusen wachsen in vivo tendenziell rascher***

*Sobald sich die UVB-induzierten Tumore entwickelt hatten, wurden diese zweimal wöchentlich gemessen. Hierzu wurden die maximalen Durchmesser (Breite x Tiefe x Höhe) mit einer Schublehre gemessen und das Tumolvolumen nach der Ellipsoid Volumen Formel ( $\text{Tumolvolumen} = (\text{Breite} \times \text{Tiefe} \times \text{Höhe})/2$ ) berechnet. Die Tumorumfänge aus der Gruppe IR + UVB und aus der Gruppe UVB wurden gepoolt und die durchschnittliche Wachstumsrate in  $\text{mm}^3$  pro Woche berechnet. 7 Tumore folgender histologischer Diagnosen aus der Gruppe IR + UVB wurden gepoolt: 5 x Sarkome, 1 x malignes Trichoepitheliom, 1 x Plattenepithelkarzinom. 7 Tumore folgender histologischer Diagnosen aus der Gruppe UVB wurden gepoolt: 5 x Sarkome, 1 x malignes Trichoepitheliom, 1 x Basalzellkarzinom. Die Balken zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM), der Unterschied ist nicht signifikant (n.s.) (Student's t-Test).*

**Abbildung 13**

### ***In vitro* Wachstumskinetik (MTT-Test) stabiler Zelllinien aus UVB-induzierten Hauttumoren**

Die proliferative Kapazität 0 und 72 Stunden nach Aussäen von jeweils 2500 Zellen in 96-Loch Mikrotiterplatten wurde mittels MTT Assays bestimmt. Jeweils 6 stabile Zelllinien aus der Gruppe IR + UVB (histologische Diagnosen: 5 x Sarkom, 1 x malignes Trichoepitheliom) und aus der Gruppe UVB (histologische Diagnosen: 5 x Sarkom, 1 x Basalzellkarzinom) wurden eingesetzt. Die Absorptionen (540 nm) nach 0 Stunden wurden auf 1 gesetzt und die Proliferationszunahme nach 72 Stunden berechnet. Die Balken zeigen die Zunahme der Proliferation nach 72 Stunden (gepoolte Mittelwerte aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten durchgeführt als Dreifachbestimmung von jeweils 6 Zelllinien  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM)). n.s. = nicht signifikant (Student's t-Test).

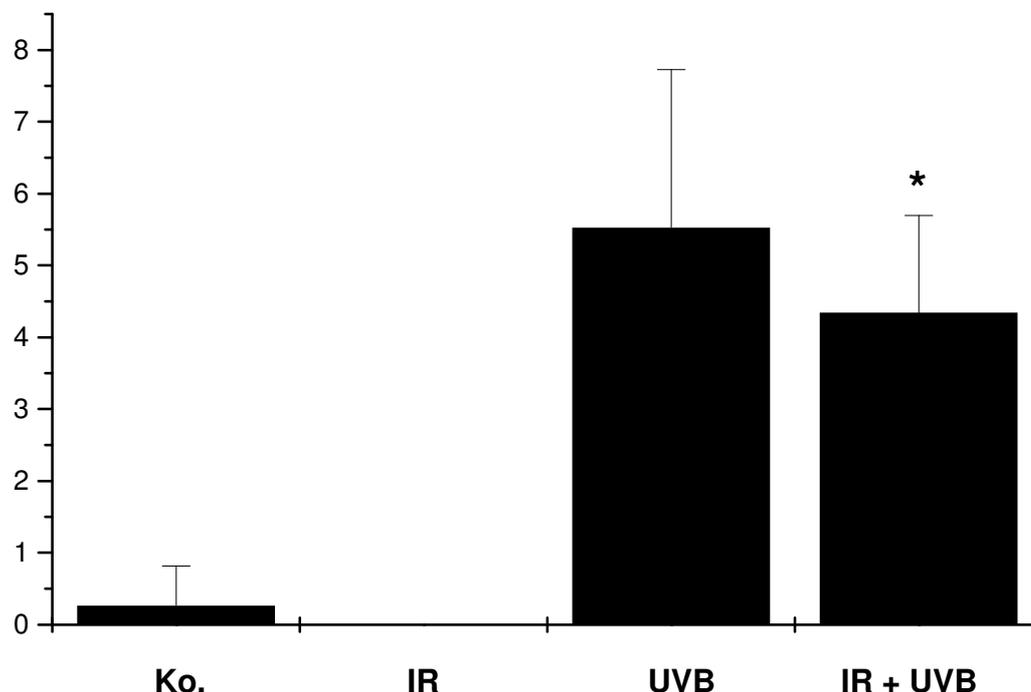
### **4.3.3. Vorbestrahlung mit IR-A reduziert UVB-induzierte p53 Mutationen in vivo**

Es ist bekannt, dass UVB Mutationen im *p53* Gen induziert. Dementsprechend finden sich in sonnenexponierter Haut zahlreiche Klone *p53* mutierter Keratinozyten (Jonason et al., 1996; Ren et al., 1996). In Mäusen korreliert die Anzahl *p53* mutier-

ter Klone mit dem Tumorrisiko (Rebel et al., 2001). Aus der Beobachtung, dass durch IR-A die Reparatur UVB-induzierter DNA-Schäden induziert wird, ergab sich die Frage, ob sich dies auch in einer verringerten Anzahl *p53* mutierter Klone zeigen würde.

Um diese Frage zu beantworten, wurden C57BL/6 Mäuse vier bzw. acht Wochen nach Beginn des Bestrahlungsprotokolls getötet und Spalthaut aus den Ohren gewonnen. Die Tiere entstammten entweder der Gruppe IR + UVB, der Gruppe UVB, der Gruppe IR, oder der Kontrollgruppe. Die Spalthäute wurden nach einem etablierten Protokoll (Maeda et al., 2006) mit einem gegen mutiertes *p53* gerichteten Antikörper gefärbt. Bereits nach vier Wochen zeigte sich in Spalthäuten, die aus IR-A vorbehandelten Tieren entnommen worden waren, im Vergleich zu solchen von nur UVB exponierten Mäusen eine leicht verringerte Anzahl *p53* mutierter Klone, der Unterschied war aber noch nicht signifikant (ohne Abbildung). Nach acht Wochen verstärkte sich der Effekt und wurde statistisch signifikant (Abbildung 14).

Abbildung 14



#### **Vorbestrahlung mit IR-A reduziert UVB-induzierte p53 Mutationen in vivo**

*C57BL/6 Mäuse wurden 3-mal wöchentlich mit 135 J/cm<sup>2</sup> IR-A und zwei Stunden später mit 800 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt (Gruppe IR+UVB). Weitere Gruppen wurden entweder nur mit UVB (UVB) oder nur mit IR-A (IR) bestrahlt oder blieben völlig unbehandelt (Ko.). Nach 8 Wochen wurde Spalthaut aus den Ohren präpariert und p53 mutierte Klone mit einem gegen mutiertes p53 gerichteten Antikörper gefärbt. Die Anzahl p53 mutierter Klone in der Spalthaut wurde verblindet mittels Lichtmikroskopie bestimmt. Die Balken stellen die Anzahl p53 mutierter Klone pro cm<sup>2</sup> dar (Mittelwert ± Standardabweichung). Ausgezählt wurden jeweils insgesamt 4 Ohren von 2 Mäusen (= 8 Spalthäute, „epidermal sheets“). \* p < 0,05 (Student's t Test)*

#### **4.3.4. Histologische Aufarbeitung der UVB-induzierten Hauttumore**

Die exzidierten Hauttumore wurden formalinfixiert, in Paraffin eingebettet, gemäß einem Standardprotokoll mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und dermatohistopathologisch klassifiziert (Tabelle 2). In den Gruppen UVB und IR + UVB fanden sich jeweils 5 Sarkome (29,4 % (UVB) bzw. 31,25 % (IR + UVB) der Tumore). Diese rela-

tiv hohe Anzahl an Sarkomen nach UVB-Bestrahlung scheint im Vergleich zum Humansystem ungewöhnlich, ist aber in Bezug auf C57BL/6 Mäuse durchaus im Einklang mit der Literatur (Jiang et al., 1999). Auffällig war die geringere Anzahl UVB-induzierter Plattenepithelkarzinome in den IR-A vorbehandelten Tieren (6,25 % (IR + UVB) vs. 41 % (UVB)). Zusätzlich entwickelten sich Melanome, Basalzellkarzinome und Lymphome. Interessanterweise bildete sich in beiden Behandlungsgruppen jeweils einmal das relativ seltene maligne Trichoepitheliom. Weiters entstanden in beiden Gruppen auch benigne Papillome. Die Klassifizierung von vier Tumoren (alle aus der Gruppe IR + UVB) ist gegenwärtig noch ausständig.

**Tabelle 2**

	<b>UVB</b>	<b>IR + UVB</b>
Aktinische Keratosen/ Plattenepithelkarzinome	7	1
Sarkome	5	5
Papillome	2	4
Basalzellkarzinome	1	0
Maligne Trichoepitheliome	1	1
Melanome	0	1
Maligne Lymphome	1	0
Nicht klassifiziert	0	4
<i>SUMME</i>	<i>17</i>	<i>16</i>

## 5. Diskussion und Ausblick

Im Gegensatz zu den detaillierten Kenntnissen über UV-Strahlung und deren Wirkungen auf den Menschen ist über IR überraschend wenig bekannt, obwohl sowohl die künstliche als auch die natürliche IR Exposition der Bevölkerung eher zu- als abnimmt. Lange Zeit wurde IR als biologisch inert angesehen und daher nicht detaillierter erforscht. In letzter Zeit häufen sich die Hinweise, dass IR, und im Besonderen IR-A, biologische Effekte in der Haut ausübt. Mehrere Autoren berichten, dass IR vorzeitige Hautalterung und auch die Entstehung von Hauttumoren fördert oder auch verursacht (Kligman, 1982; Dover et al., 1989; Schieke et al., 2002; Kim et al., 2005; Cho et al., 2008). Es wurde auch publiziert, dass IR-A indirekt antioxidativ wirksam ist, indem es Ferritin induziert, welches seinerseits freies Eisen und damit freie Radikale reduziert (Applegate et al., 2000). IR wird in der Kosmetik und im Wellnessbereich breit eingesetzt. So wird es zum Beispiel zur Körperfettreduktion und auch zur Gewichtsabnahme angepriesen (Möckel et al., 2006). IR wird zur Behandlung unterschiedlichster Erkrankungen eingesetzt, zum Beispiel in der Wundheilung (Horwitz et al., 1999; Danno et al., 2001; Schramm et al., 2003), in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Meffert et al., 1990; Yokoyama et al., 1999). Selbst zur Besserung bösartiger Erkrankungen wird IR empfohlen (Dees et al., 2002). Im Gesamten gesehen ist die Datenlage aber eher bescheiden.

Die mit der modernen Lebensweise und dem aktuellen Freizeitverhalten assoziierte verstärkte Sonnenexposition der Bevölkerung ist mit einer erhöhten kumulativen Dosis nicht nur von UV-Strahlung, sondern auch von IR verbunden. Daher besteht aktuell Interesse bezüglich fraglicher Interaktionen zwischen UV und IR, vor allem in Hinblick auf die wesentlichen beiden Langzeiteffekte von Sonnenlicht auf die Haut,

nämlich Hautalterung und Hautkrebs. Eine Konsequenz dieser Überlegungen ist die Einarbeitung von IR-Filtern in Sonnenschutzpräparate. Sehr zur Verwirrung der Konsumenten wird gleichzeitig von anderer Stelle die Bestrahlung mit IR beispielsweise als wirksame Anti-aging Maßnahme angepriesen. Gerade im Wellnessbereich werden IR Expositionen häufig mit UV Bestrahlungen - letztere zu Bräunungszwecken - kombiniert. Die experimentelle Datenlage bezüglich der Interaktionen zwischen UV und IR ist derzeit noch sehr dürftig. Aus diesem Anlass untersuchten wir zunächst den Einfluss von IR auf die UV-induzierte Apoptose und auf die zugrunde liegenden Mechanismen, in der weiteren Folge welche Auswirkungen diese Effekte auf die Photokarzinogenese haben würden.

Grundsätzlich wird die UV-induzierte Apoptose als ein protektiver Mechanismus betrachtet, welcher die maligne Transformation von Zellen verhindern kann (Nickoloff et al., 2002). Dementsprechend könnten also Veränderungen in der Apoptoserate unmittelbar Einfluss auf die Photokarzinogenese haben. Es ist bekannt, dass durch Hitzeexposition die UV-induzierte Apoptose in menschlichen Keratinozyten reduziert werden kann (Trautinger et al., 1995). Diese Beobachtung wird häufig im Zusammenhang mit dem durch den Treibhauseffekt bedingten Klimawandel, der zu einer Zunahme der Umgebungstemperatur führt, zitiert. Solchermaßen könnte sich über eine reduzierte UV-induzierte Apoptose das Photokarzinogeneserisiko erhöhen (Owens & Knox, 1978; Dover et al., 1989). Allerdings dürfen Daten, die die Effekte von Wärme untersuchen, nicht ohne weiteres auf IR übertragen werden. Die im vorliegenden Projekt verwendete Strahlenquelle emittiert IR-A (780-1400 nm) und wurde gewählt, da auch im Medizin und Kosmetikbereich überwiegend IR-A Strahler zum Einsatz kommen. Es handelt sich beim Photodyn 505 Strahler (Hydrosun Medizintechnik, Mühlheim, Deutschland) um eine wassergefilterte IR-A Quelle, vor die ein

schwarzer cut-off Filter (öffnet bei 780 nm) geschaltet ist, sodass weitgehend reines IR-A emittiert wird. Im Gegensatz zu IR-C, welches komplett in der Epidermis absorbiert wird und zu einer raschen und schmerzhaften Erwärmung der Epidermis führt, dringt IR-A tief in die Haut ein ohne wesentliche Erwärmung der Epidermis. Der Wasserfilter der eingesetzten Strahlenquelle absorbiert die für die Erwärmung von Wasser relevanten Spektralbereiche und minimiert daher die Wärmewirkung des IR-A Strahlers in der Haut. Entsprechend konnte in Zellen, die mit  $250 \text{ J/cm}^2$  IR-A bestrahlt wurden, keine Induktion des Hitzeschockproteins HSP70 nachgewiesen werden (Abbildung 6). Menschen sind einer durchschnittlichen Dosis von  $75 \text{ J/cm}^2$  IR pro Stunde ausgesetzt (Mittagszeit, München; Schieke et al., 2003). Die im Projekt eingesetzten IR-A Dosen von  $250 \text{ J/cm}^2$  in den *in vitro* Experimenten und  $135 \text{ J/cm}^2$  in den *in vivo* Experimenten sind daher als physiologisch zu betrachten. Die geringere Dosis von IR-A bei den *in vivo* Experimenten hatte eine praktisch experimentelle Ursache, da längere *in vivo* Bestrahlungszeiten eine Anästhesie und Sedierung der Tiere erfordert hätten.

Im vorliegenden Projekt konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von Maus-Keratinozyten mit IR-A die UVB-induzierte Apoptose reduziert. Wurden Mäuse vor UVB Bestrahlung mit IR-A behandelt, so war die Zahl an apoptotischen Keratinozyten in der Epidermis (so genannte „Sunburn-cells“) signifikant verringert (Abbildung 3). Danno et al. konnten bereits 1992 zeigen, dass nach Vorbehandlung mit IR die Bildung von „Sunburn cells“ nach UVB Bestrahlung inhibiert wird. Allerdings wurde in diesem System die Hautoberflächentemperatur auf  $42^\circ$  Celsius erhöht und somit könnte dieser Effekt auch durch die Induktion von Hitzeschockproteinen vermittelt worden sein.

Überraschend ist zweifelsfrei die Beobachtung, dass durch Vorbehandlung mit IR-A der UVB-induzierte DNA-Schaden reduziert werden kann. *In vitro* wurde diese Beobachtung anhand einer Southwestern Dotblot Analyse gemacht (Abbildung 7). Eine quantitative densitometrische Analyse der Blots ergab eine ungefähr 50%-ige Reduktion der CPD durch IR-A Vorbehandlung. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei den *in vivo* Untersuchungen (Abbildung 8b). Da die CPD Färbung in Biopsien, die unmittelbar nach UVB-Bestrahlung entnommen wurden, in IR-A vorbehandelten und nicht vorbehandelten Tieren gleich war, wird die Bildung von CPD durch IR-A offensichtlich nicht beeinflusst (Abbildung 8a). Wenn anfangs die Menge an CPD nicht durch IR-A beeinflusst wird, aber im Laufe der Zeit nach IR-A Vorbestrahlung signifikant weniger wird, so könnte eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen eine effizientere oder raschere Reparatur von DNA-Schäden nach IR-A Bestrahlung sein. Da Vorbestrahlung mit IR-A in *Xpa* knockout Mäusen (denen eine funktionelle NER fehlt) keinen Effekt auf UVB-induzierten DNA-Schaden hat (Abbildung 9), scheint die NER am beobachteten Effekt beteiligt zu sein. Da IR-A CPD in *Xpa* knockout Mäusen nicht reduziert, kann angenommen werden, dass in diesen Tieren auch die Anzahl an „Sunburn cells“ durch IR-A nicht verringert wird. Obgleich dieses Experiment nicht durchgeführt wurde, ist diese Annahme sehr wahrscheinlich, da der DNA-Schaden der hauptsächlich molekulare Trigger für die UV-induzierte Apoptose ist (Kulms et al., 1999). Da IR-A auch die Expression von antiapoptotischen Proteinen beeinflusst, ist es natürlich denkbar, dass über diesen Mechanismus IR-A die Anzahl an „Sunburn cells“ auch in den NER-defizienten *Xpa* knockout Mäusen reduzieren könnte. Durch den Shuttle Vector Assay konnte mit einer unabhängigen zweiten Methode gezeigt werden, dass IR-A die NER induzieren dürfte. Die CAT Enzymaktivität war signifikant erhöht, wenn das UV-geschädigte CAT-Plasmid in IR-A-vorbestrahlte Zellen transfiziert wurde (Abbildung 10). Natürlich sind beide Methoden (*Xpa* knockout

Mäuse, Shuttle Vector Assay) kein endgültiger Beweis für eine Induktion des NER durch IR-A, es handelt sich aber zumindest um einen starken Hinweis, dass IR-A Einfluss auf die DNA-Reparatur nimmt. Es ist nicht klar, ob IR-A die NER direkt beeinflusst oder ob dies indirekt z.B. über die Freisetzung von Mediatoren geschieht. Bis dato sind eine Reihe von Molekülen bekannt, die die DNA-Reparatur beeinflussen und von Keratinozyten produziert werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass IL-12, IL-18, und auch  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes-Hormon ( $\alpha$ -MSH) die Fähigkeit besitzen, UV-induzierten DNA-Schaden zu reduzieren (Schwarz et al., 2002; Schwarz et al., 2006; Böhm et al., 2005).

Frank et al. (2006) berichteten, dass eine Vorbestrahlung mit IR humane Fibroblasten *in vitro* vor UV-induzierter Zytotoxizität schützt. Ähnlich den Ergebnissen des vorliegenden Projektes war dieser Effekt nicht mit der Induktion von Hitzeschockproteinen assoziiert, sehr wohl aber mit p53, da in p53-defizienten SaOs Zellen kein Schutz vor UVB-vermittelter Zytotoxizität durch IR beobachtet werden konnte. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, dass IR zu einer Akkumulation, Stabilisierung, und Phosphorylierung von p53 führt, was die Zellen gegen nachfolgenden UV-bedingten Stress resistenter macht. Auch im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden Experimente durchgeführt, die in diese Richtung weisen. In diesen vorläufigen Experimenten wurden humane HaCaT Zellen vor UVB Exposition mit IR-A vorbestrahlt. Es wurde kein antiapoptotischer Effekt von IR festgestellt. HaCaT Zellen stellen eine spontan transformierte humane Keratinozytenzelllinie dar, die aufgrund zweier *p53* Mutationen kein funktionelles p53 besitzt (Lehman et al., 1993). Wurden die Experimente mit primären humanen Keratinozyten durchgeführt, so konnte der antiapoptotische Effekt von IR-A beobachtet werden (ohne Abbildung). Es

sind jedoch weitere Experimente nötig, um zu beweisen, dass die beobachteten IR-A-vermittelten Effekte von funktionellem p53 Protein abhängig sind.

Die Beobachtung, dass IR-A auch die Fas-Ligand-induzierte Apoptose inhibiert (Abbildung 2), ließ andere zusätzlich Mechanismen als die Reduktion von DNA-Schaden vermuten, über die die antiapoptotischen Effekte von IR-A vermittelt werden. DNA-Schaden spielt nämlich bei der Fas-Ligand-induzierten Apoptose keine Rolle. Aufgrund dieser Überlegung wurde die Beeinflussung von antiapoptotischen Proteinen durch IR-A untersucht. Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass durch Vorbestrahlung mit IR-A die durch UVB-Exposition bedingte verringerte Expression der antiapoptotischen Proteine FLIP<sub>L</sub> und BCL-X<sub>L</sub> verhindert werden kann (Abbildung 4). Außerdem wurde beobachtet, dass durch IR-A Bestrahlung die Expression des proapoptotischen Proteins BAX reduziert wird (Abbildung 4). Daraus lässt sich folgern, dass IR-A seine antiapoptotische Wirkung sowohl über den intrinsischen (BCL-X<sub>L</sub>, BAX) als auch über den extrinsischen (FLIP<sub>L</sub>) Apoptoseweg ausübt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die Aktivität von Caspase-8 (extrinsischer Apoptoseweg) bzw. Caspase-9 (intrinsischer Apoptoseweg) bestimmt. Es zeigte sich, dass die UVB-induzierte Aktivierung beider Caspasen durch IR-A Vorbehandlung inhibiert werden kann (Abbildung 5). Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Frank et al. (2004). Diese Gruppe publizierte, dass durch Vorbehandlung humaner Fibroblasten mit IR-A die UVB-induzierte Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 (Repräsentant der apoptotischen Effektorphase) unterdrückt wird. In der Zukunft wird zu untersuchen sein, ob durch IR-A noch weitere Apoptose-assoziierte Proteine beeinflusst werden.

Die im vorliegenden Projekt gewonnenen Daten zeigen, dass IR-A die UVB-induzierte Apoptose reduziert. Dies ist die Konsequenz (zumindest zweier) unter-

schiedlicher Mechanismen. Einerseits kann durch IR-A der UVB-induzierte DNA-Schaden reduziert werden, andererseits beeinflusst IR-A die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine. Grundsätzlich handelt es sich beim UV-vermittelten apoptotischen Zelltod um einen protektiven Mechanismus, da dadurch Zellen mit geschädigter DNA eliminiert werden (Kulms & Schwarz, 2000). Ein Überleben der DNA-geschädigten Zellen kann zur Anhäufung von Mutationen und letztendlich zur malignen Transformation der Zellen führen. Daher könnte IR-A durch Inhibition der UVB-induzierten Apoptose zu einem vermehrten Überleben DNA-geschädigter Zellen und damit zu einer verstärkten Photokarzinogenese führen. Andererseits reduziert IR-A den UVB-induzierten DNA-Schaden, was in Bezug auf die Photokarzinogenese einen protektiven Vorgang darstellt. Letztlich ist also die Balance dieser beiden Mechanismen ausschlaggebend, welchen Einfluss IR-A auf die Photokarzinogenese hat. Aus diesem Grund wurde ein *in vivo* Langzeitversuch durchgeführt, mit dem der Einfluss von IR-A auf die Photokarzinogenese untersucht werden sollte.

C57BL/6 Mäuse wurden entsprechend einem etablierten Bestrahlungsprotokoll (Beissert et al., 2001) über insgesamt 25 Wochen 3-mal wöchentlich mit IR-A und UVB bestrahlt. Der Beobachtungszeitraum nach Bestrahlungsende betrug 80 Wochen. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten zeigte keinen Hinweis auf eine verstärkte Photokarzinogenese durch IR-A (Abbildung 11). In der IR-A vorbehandelten Gruppe konnte sogar ein geringfügig verzögertes Auftreten der Hauttumoren beobachtet werden. Die Hauttumore in den IR-A vorbehandelten Tieren entwickelten sich durchschnittlich 8 Wochen später (56 vs. 48 Wochen ab Bestrahlungsbeginn), dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Um in Bezug auf diese Fragestellung eine statistisch valide Aussage treffen zu können, wären weiterführende Photokarzinogenesestudien mit weitaus größeren Gruppen notwendig.

In der Literatur wurde von einigen Autoren (Kligman, 1982; Dover, 1989;) eine prokanzerogene Wirkung von IR beschrieben. Im untersuchten Modell konnte dies nicht bestätigt werden. In den nur IR-A bestrahlten Mäusen entwickelte sich im Beobachtungszeitraum kein einziger Hauttumor, ebenso wie auch in der unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 11). Die Anzahl der Hauttumoren pro Maus war in der Gruppe IR + UVB gleich wie in der nur UVB-bestrahlten Gruppe (Tabelle 1). Interessanterweise zeigten jedoch Tumoren aus Mäusen, die vor UVB Bestrahlung mit IR-A vorbehandelt worden waren, ein rascheres Wachstum als Tumoren aus nur UVB-bestrahlten Tieren (Abbildung 12). Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass IR-A die Entstehung UVB-induzierter Tumore nicht beschleunigt, möglicherweise sogar verzögert. IR-A alleine induziert keine Hauttumore. Haben sich die Hauttumore einmal gebildet, so scheinen Tumoren aus IR-A vorbehandelten Tieren stärker zu proliferieren als jene aus nur UVB-bestrahlten Mäusen.

Anhand der vorliegenden Studie kann vorerst zumindest im untersuchten Mausmodell die Befürchtung einer Verstärkung der Photokarzinogenese durch IR-A entkräftet werden. Diese war ja aufgrund der Inhibition der UVB-induzierten Apoptose durch IR-A nicht ganz unberechtigt, da solchermaßen das Überleben DNA-geschädigter Zellen gefördert werden könnte. Außerdem postulierten mehrere Autoren eine prokanzerogene Wirkung von IR (Kligman, 1982; Dover, 1989). Möglicherweise überwiegt hier der Effekt einer durch IR-A induzierten Reparatur UVB-verursachter DNA-Schäden. Zu dieser Überlegung passt auch die Beobachtung, dass durch IR-A die Anzahl UVB-induzierter *p53* mutierter Klone reduziert wird (Abbildung 14). Es ist bekannt, dass zumindest in Mäusen die Anzahl *p53* mutierter Klone mit dem Tumorrisiko korreliert (Rebel et al., 2001). Funktionelles *p53* ist für die

ordnungsgemäße Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden essentiell und dient, falls der DNA-Schaden irreparabel ist, der apoptotischen Elimination der betreffenden Zelle. Entsprechend ist in *p53* mutierten Zellen die DNA-Reparatur ineffizienter bzw. wird das Überleben DNA-geschädigter Zellen erleichtert, was letztendlich zur Krebsentstehung führen kann.

Interessanterweise scheinen einmal entstandene UVB-induzierte Hauttumore aus IR-A vorbestrahlten Tieren rascher zu wachsen als Hauttumore aus nur UVB exponierten Mäusen (obgleich darauf hingewiesen werden muss, dass der Unterschied statistisch nicht signifikant ist). Dieser Effekt ist *in vivo* weitaus stärker ausgeprägt als *in vitro* (Vergleich Abbildung 12 mit Abbildung 13), was auf eine Beteiligung des Immunsystems, beispielsweise der Induktion von regulatorischen T-Zellen (Beisert et al., 2006) durch IR-A, zurückzuführen sein könnte. In vorläufigen Experimenten konnte eine Unterdrückung der Kontaktsensibilisierung durch IR-A, ähnlich wie durch UVB, beobachtet werden, die durch adoptiven Transfer auf naive Mäuse übertragbar war (ohne Abbildung). Diese Daten stehen im Einklang mit einer bereits publizierten Arbeit von Kandolf-Sekulovic et al. (2003). Vorläufige Experimente weisen auch darauf hin, dass die UVB-induzierte Unterdrückung der Kontaktsensibilisierung durch IR-A verstärkt wird. Daher wäre eine durch IR-A verstärkte UVB-induzierte Immunsuppression eine mögliche Erklärung, dass Tumore aus IR-A vorbestrahlten Mäusen *in vivo* rascher wachsen als Tumore aus nur UVB bestrahlten Tieren. Möglicherweise wachsen aber Zelllinien, die aus Tumoren der Gruppe IR + UVB gewonnen worden sind, bereits *per se in vitro* schneller als jene aus nur UVB exponierten Tieren (Abbildung 13). Über die molekularen Mechanismen, die diesen Phänomenen zugrunde liegen, kann bei derzeitiger Datenlage keine Aussage getroffen werden.

Die histologische Klassifikation der UVB-induzierten Tumore ergab, dass die klassischen UVB-induzierten epithelialen Neoplasien, nämlich Plattenepithelkarzinome der Haut in den IR-A vorbehandelten Tieren deutlich seltener auftraten als in den nur UVB bestrahlten Mäusen (Tabelle 2). Dies könnte im Zusammenhang mit der reduzierten Zahl von *p53* Mutationen in IR-A vorbehandelten Mäusen stehen (Abbildung 14). Es ist bekannt, dass Plattenepithelkarzinome UVB-„Fingerprint“-Mutationen im *p53* Gen haben (Ziegler et al., 1993). Interessanterweise waren jedoch Fibrosarkome mit 30% aller UVB-induzierten Tumore am häufigsten. Im humanen System sind Sarkome der Haut eine äußerst seltene Entität, ein Zusammenhang mit UVB gilt als fraglich. Im Maussystem hingegen sind UVB-induzierte Sarkome bei weitem nicht so selten und die diagnostizierte Häufigkeit von Sarkomen durchaus in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Jiang et al. (1999), die gleichfalls im C57BL/6 Mausmodell zu ganz ähnlichen Prozentzahlen kam. UVB-induzierte Sarkome der Haut fanden sich in der Gruppe IR + UVB und in der Gruppe UVB in gleicher Zahl. Über alle anderen diagnostizierten Neoplasien (gutartige Papillome, Basalzellkarzinom, malignes Lymphom, Melanom, maligne Trichoepitheliome) können bezüglich relativer Häufigkeiten aufgrund der geringen Fallzahlen keine Aussagen getroffen werden. Bemerkenswert ist aber das zweifache Auftreten des seltenen malignen Trichoepithelioms.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass IR-A über wenigstens zwei unterschiedliche Mechanismen UVB-induzierte Apoptose inhibiert. *In vivo* führt dieser Effekt nicht zu einer gesteigerten Photokarzinogenese. IR-A alleine induziert keine Hauttumore. Bevor der Einsatz künstlicher IR-A Quellen bzw. die natürliche IR Strahlung im Sonnenlicht als für die menschliche Haut schädlich oder möglicherweise sogar vorteilhaft beurteilt werden kann, sind noch weitere Un-

tersuchungen nötig. So ergibt sich beispielsweise aus den hier genannten Daten die Frage, weshalb UVB-induzierte Hauttumore aus IR-A-vorbehandelten Mäusen schneller wachsen als jene aus nur UVB-bestrahlten Tieren. Sollte IR-A tatsächlich immunsuppressive Wirkungen ausüben, so hätte dies weitreichende Implikationen auf den Sicherheitsaspekt von IR-A.

## 6. Bisherige Publikationen

Jantschitsch C, Majewski S, Maeda A, Schwarz T, Schwarz A. Infrared Radiation Confers Resistance to UV-Induced Apoptosis Via Reduction of DNA Damage and Upregulation of Antiapoptotic Proteins. *J Invest Dermatol.* 2008 Nov 27 (dzt. nur elektronisch publiziert, gedruckte Version folgt später)  
doi:10.1038/jid.2008.362

## 7. Zitierte Literatur

(eigene Arbeiten mit \* gekennzeichnet)

Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, Frenk E, Hohlfeld P, Schwarzkopf S (2000) Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation: Implications in skin repair. *J Mol Med* 5:247-51

\*Beissert S, Rühlemann D, Mohammad T, Grabbe S, El-Ghorr A, Norval M, Morrison H, Granstein RD, Schwarz T (2001) IL-12 prevents the inhibitory effects of cis-urocanic acid on tumor antigen presentation by Langerhans cells: implications for photocarcinogenesis. *J Immunol.* 1;167(11):6232-8

\*Beissert S, Schwarz A, Schwarz T (2006) Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 126(1):15-24

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

\*Böhm, M., Wolff , Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, Schwarz T, Schwarz A (2005) Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem.* 280: 5795-5802

- Cho S, Lee MJ, Kim MS, Lee S, Kim YK, Lee DH *et al.* (2008) Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo. *J Dermatol Sci* 50:123-33
- Danno K, Horio T, Imamura S (1992) Infrared radiation suppresses ultraviolet B-induced sunburn-cell formation. *Arch Dermatol Res* 284:92-4
- Danno K, Mori N, Toda K, Kobayashi T, Utani A (2001) Near-infrared irradiation stimulates cutaneous wound repair: laboratory experiments on possible mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17:261-5
- Dees C, Harkins J, Petersen MG, Fisher WG, Wachter EA (2002) Treatment of murine cutaneous melanoma with near infrared light. *Photochem Photobiol* 75:296-301
- de Boer J, Hoeijmakers JH (1999) Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair. *Biochimie* 81: 127-37
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13:768-85
- de Vries A, van Oostrom CT, Hofhuis FM, Dortant PM, Berg RJ, de Gruijl FR, *et al.* (1995) Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature* 377:169-73
- Dover JS, Phillips TJ, Arndt KA (1989) Cutaneous effects and therapeutic uses of heat with emphasis on infrared radiation. *J Am Acad Dermatol* 20:278-86
- Frank S, Oliver L, Lebreton-De Coster C, Moreau C, Lecabellec MT, Michel L *et al.* (2004) Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 123:823-31

Frank S, Menezes S, Lebreton-De Coster C, Oster M, Dubretet L, Coulomb B (2006) Infrared radiation induces the p53 signaling pathway: role in infrared prevention of ultraviolet B toxicity. *Exp Dermatol* 15:130-7

Garbe C. Epidemiologie des Hautkrebses. In: Dermatologische Onkologie. C. Garbe, R. Dummer, R. Kaufmann, W. Tilgen (Hrsg.). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1997; 4: 40-56

Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrest BA (2000) Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J.* 14:1325-34

Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374

Horwitz LR, Burke TJ, Carnegie D (1999) Augmentation of wound healing using monochromatic infrared energy. Exploration of a new technology for wound management. *Adv Wound Care* 12:35-40

Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML (1999) p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* 18(29):4247-53

Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4(2):139-63

Jonason AS, Kunala S, Price GJ, et al (1996) Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14025–9

Kandolf-Sekulovic L, Kataranovski M, Pavlovic MD (2003) Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19(4):203-12

Katalinic A, Kunze U, Schäfer T (2003) Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol.* 149(6):1200-6

Kim HH, Lee MJ, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH (2005) Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev* 126:1170-7

Kligman LH (1982) Intensification of ultraviolet-induced dermal damage by infrared radiation. *Arch Dermatol Res* 272:229-38

Kraemer KH (1997) Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1-14

\*Kulms D, Pöppelmann B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J, Schwarz T (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7974-9

\*Kulms, D., T. Schwarz (2000) Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 195-201

\*Kulms D, Pöppelmann B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J, Schwarz T (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7974-7979

- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA *et al.* (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14:833-9
- \*Maeda A, Schneider SW, Kojima M, Beissert S, Schwarz T, Schwarz A (2006) Enhanced photocarcinogenesis in interleukin-12-deficient mice. *Cancer Res.* 66(6):2962-9
- Maytin EV, Wimberly JM, Kane KS (1994) Heat shock modulates UVB-induced cell death in human epidermal keratinocytes: evidence for a hyperthermia-inducible protective response. *J Invest Dermatol.* 103(4):547-53
- Meffert H, Buchholtz I, Brenke A (1990) Mild infrared A hyperthermia in treatment of systemic scleroderma. *Dermatol Monatsschr* 176:683-6
- Menezes S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L (1998) Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblasts from solar ultraviolet toxicity. *J Invest Dermatol.* 111(4):629-33
- Mitchell DL, Byrom M, Chiarello S, Lowery MG (2001) Effects of chronic exposure to ultraviolet B radiation on DNA repair in the dermis and epidermis of the hairless mouse. *J Invest Dermatol* 116: 209-215
- Möckel F, Hoffmann G, Obermüller R, Drobnik W, Schmitz G (2006) Influence of water-filtered infrared-A (wIRA) on reduction of local fat and body weight by physical exercise. *GMS Ger Med Sci* 4:Doc05
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63
- \*Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T (2001) The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol.* 10: 155-160

- Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Bacon P, Panella J, Denning MF (2002) Life and death signaling pathways contributing to skin cancer. *J Invest Dermatol Symp Proc* 7:27-35
- Owens DW, Knox JM (1978) Influence of heat, wind, and humidity on ultraviolet radiation injury. *Natl Cancer Inst Monogr* 50:161-7
- Patrick MH (1977) Studies on thymine-derived UV photoproducts in DNA--I. Formation and biological role of pyrimidine adducts in DNA. *Photochem Photobiol* 25, 357-372
- Rebel H, Mosnier LO, Berg RJ, et al. (2001) Early p53-positive foci as indicators of tumor risk in ultraviolet-exposed hairless mice: kinetics of induction, effects of DNA repair deficiency, and p53 heterozygosity. *Cancer Res* 61:977–83
- Ren ZP, Hedrum A, Ponten F, et al. (1996) Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded nonneoplastic keratinocytes. *Oncogene* 12:765–73
- Schieke S, Stege H, Kürten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J (2002) Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 119:1323
- Schieke SM, Schroeder P, Krutman J (2003) Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19:228-34

Schramm JM, Warner D, Hardesty RA, Oberg KC (2003) A unique combination of infrared and microwave radiation accelerates wound healing. *Plast Reconstr Surg* 111:258-66

Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J (2007) Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 43:128-35

\*Schwarz, A., S. Ständer, M. Berneburg, M. Böhm, D. Kulms, H. van Steeg, K. Große-Heitmeyer, J. Krutmann, T. Schwarz (2002) Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol.* 4: 26-31

\*Schwarz A, Maeda A, Ständer S, van Steeg H, Schwarz T (2006) IL-18 reduces ultraviolet radiation-induced DNA damage and thereby affects photoimmunosuppression. *J Immunol* 176:2896-901

\*Simon, M.M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, Ch. Krone, T.A. Luger, M. Jäättelä, T. Schwarz (1995) Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. *J Clin Invest* 95: 926-933

Slaper H, Velders GJM, Daniel JS, de Gruijl FR, van der Leun JC (1996) Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna convention achievements. *Nature.* 384: 256-258

Tomayko MM, Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 24(3):148-54

Trautinger F, Kindas-Mügge I, Barlan B, Neuner P, Knobler RM (1995) 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J Invest Dermatol* 105:160-2

Yokoyama K, Oku T (1999) Rheumatoid arthritis-affected temporomandibular joint pain analgesia by linear polarized near infrared irradiation. *Can J Anaesth* 46:683-7

Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, et al. (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9):4216-20

Ziegler A, Jonason JS, Leffel DW, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372: 773-776

# | Verantwortung für Mensch und Umwelt |

**Kontakt:**

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: [www.bfs.de](http://www.bfs.de)

E-Mail: [ePost@bfs.de](mailto:ePost@bfs.de)

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



**Bundesamt für Strahlenschutz**