

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Einfluss von Psoralen und UVA (PUVA) auf den Zellteilungszyklus von humanen Keratinozyten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Joerges
aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Th. Herzinger

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Kummer

Priv. Doz. Dr. F. Worek

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2006

**Einfluss von Psoralen und UVA
(PUVA) auf den Zellteilungszyklus
von humanen Keratinozyten**

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikation:

Joerges C, Kuntze I, Herzinger T (2003) Induction of a caffeine-sensitive S-phase cell cycle checkpoint by psoralen plus ultraviolet A radiation. *Oncogene* 22: 6119-6128

1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1 Anwendung von UV-Strahlung und Photochemotherapie in der Dermatologie.....	8
1.2 Biologische Wirkung von UV-Strahlung	8
1.2.1 Wellenlängen und Wirkspektren.....	8
1.2.2 UV-Strahlung und DNA-Schäden.....	11
1.2.3 Schäden durch Kombination von Psoralen und UVA	11
1.3 Überblick über den Zellzyklus und seine Regulation.....	14
2. Ergebnisse	23
2.1 PUVA arretiert Zellen in verschiedenen Stadien der S-Phase	26
2.2 PUVA induziert keinen G2-Phasearrest.....	29
2.3 PUVA induziert keinen G1-Phasearrest.....	35
2.4 Vermittlung des PUVA-induzierten Replikationsblocks durch ein Koffein-sensitives Signal.....	42
2.5 Beteiligung von Chk1 und Cdc25A an dem PUVA-induzierten Replikationsblock.....	44
2.6 Partielle Aufhebung des PUVA-induzierten S-Phase-Blocks durch Cdc25A-Überexpression.....	46
3. Diskussion	50
4. Material und Methoden	57
4.1 Material	57
4.1.1 Zelllinien	57
4.1.2 Zellkulturmedien.....	57
4.1.3 Pufferlösungen	57
4.1.4 Chemikalien und Lösungsmittel	60
4.1.5 Antikörper.....	63
4.2 Methoden.....	64
4.2.1 Zellkultur.....	64
4.2.2 Bestrahlung der Zellen	67
4.2.3 Synchronisation von HaCaT-Zellen und Fibroblasten	68
4.2.4 Gewinnung von Zellextrakten.....	68
4.2.5 Proteinmessung mit Dc-Proteinassay	68
4.2.6 Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE	69

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot	69
4.2.8 Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting = FACS)	74
4.2.9 Bestimmung des Mitotic-Index (DAPI-Färbung)	76
5. Zusammenfassung.....	77
6. Abkürzungen	78
7. Literaturverzeichnis	79
8. Danksagung.....	91
9. Lebenslauf	92

1. Einleitung und Fragestellung

Die menschliche Haut ist ein komplex aufgebautes und höchst differenziertes Organ, das den menschlichen Organismus gegen physikalische, chemische und biologische Umwelteinflüsse schützt. Zu ihren Aufgaben gehören überlebenswichtige Vorgänge wie Wärmeregulation, Schutz vor Austrocknung, Schutz vor UV-Strahlung, Regulation des Mineralstoffwechsels und Ausscheidungsfunktionen. In ihrer Funktion als Sinnesorgan trägt sie wesentlich zu unserer Wahrnehmung und unserem Wohlbefinden bei.

Die menschliche Haut setzt sich aus den folgenden Schichten zusammen: Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium) und Unterhaut (Subcutis). Die Epidermis besteht zum größten Teil aus Keratinozyten, die nach einem Differenzierungsprozess eine schützende Hornschicht bilden und sich schließlich als Hornschuppen von der Oberfläche loslösen. Das Corium ist ein fibroelastisches Gewebe von hoher Reißfestigkeit und Elastizität und versorgt die Haut mit Nerven und Gefäßen. Es besteht aus Fasern und einer Matrix, die von Fibroblasten gebildet werden. Die Subcutis besteht aus einem läppchenartig aufgebauten Fettgewebe, das zur Wärmeisolierung, als mechanisches Schutzpolster, Energiespeicher und als Verschiebeschicht dient. Darüber hinaus sind in die Haut die Anhangsgebilde (Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen) integriert.

Um die vielfältigen Aufgaben zu erfüllen und sich an die wechselnden Anforderungen der Umwelt sowie die Bedürfnisse des Organismus anpassen zu können, ist von grundlegender Wichtigkeit, dass die Haut sich immer wieder von neuem regenerieren kann. Die Zellteilung ermöglicht diese Regeneration. Die Zellproliferation steht normalerweise im Gleichgewicht mit dem Zellverlust, der durch natürlichen Zelltod oder durch Zellschädigungen entsteht. Gerät die Regulation des Zellzyklus aus dem Gleichgewicht, so kommt es bei Überwiegen der Zellproliferation zu Hauttumoren oder hyperproliferativen Hauterkrankungen. Eine der häufigsten hyperproliferativen Erkrankungen ist die Psoriasis (Schuppenflechte), bei der

der Zellumsatz auf das 7-8fache gesteigert ist. Klinisch äußert sich dies in einer Verdickung der Haut und einer stark vermehrten Abschuppung.

1.1 Anwendung von UV-Strahlung und Photochemotherapie in der Dermatologie

Die Phototherapie und die Photochemotherapie gehören zu den ältesten schriftlich dokumentierten Therapien dermatologischer Krankheiten. Bereits vor über 3000 Jahren wurde die Photochemotherapie in Ägypten und Indien zur Therapie der Vitiligo eingesetzt, die man damals als eine Form der Lepra einstufte [13]. Die erkrankten Körperpartien wurden mit photosensibilisierenden Pflanzenextrakten aus der Pflanze *Ammi majus* eingerieben und anschließend dem natürlichen Sonnenlicht exponiert. Heute weiß man, dass jene Pflanzenextrakte Psoralene enthielten, die auch heute noch zur Photochemotherapie eingesetzt werden.

In den letzten 30 Jahren hat die Phototherapie durch die Entwicklung von Strahlungsquellen, die reproduzierbar hochenergetische Strahlung definierter Wellenlängen in kontrollierbaren Dosen emittieren können, eine Renaissance erlebt. Mit der Einführung der systemischen, später auch der Balneophotochemotherapie gelang es, bei hyperproliferativen Krankheiten wie der Psoriasis vulgaris oder kutanen T-Zell-Lymphomen gute Heilerfolge zu erzielen [103]. Seitdem fand die Photochemotherapie bei einer Reihe anderer Dermatosen erfolgreiche Anwendung, wie etwa bei Lichen ruber, Granuloma anulare, Graft-versus-Host-Reaktion, atopischer Dermatitis, Pityriasis lichenoides, Parapsoriasis en plaques, Lichturtikaria, zirkumskripter Sklerodermie, Urticaria pigmentosa oder Alopecia areata.

1.2 Biologische Wirkung von UV-Strahlung

1.2.1 Wellenlängen und Wirkspektren

Das Sonnenlicht besteht aus einem kontinuierlichen Spektrum von elektromagnetischer Strahlung, das in drei Hauptwellenlängenbereiche eingeteilt wird: Ultraviolette Strahlung, sichtbares Licht und Infrarotstrahlung.

Die UV-Strahlung umfasst den Wellenlängenbereich von 100 – max. 400 nm. An diesen UV-Bereich schließt sich der längerwellige Bereich des sichtbaren Lichts (400 – 760 nm) mit violett und blau über grün (550 nm), gelb, rot bis zum nahen Infrarot an (siehe Abb.1). In der Praxis wird häufig der Begriff „Licht“ für Strahlung verwendet, wenngleich mit Licht strenggenommen nur das sichtbare gemeint ist.

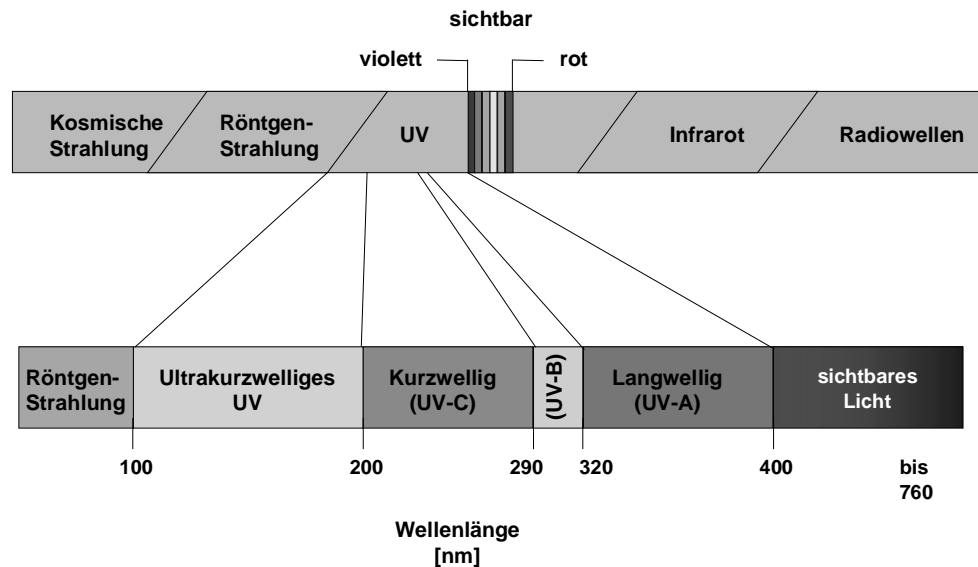


Abb.1: Elektromagnetisches Spektrum mit gespreizter UV-Skala [41].

Bei der UV-Strahlung werden drei weitere Teilbereiche unterschieden, denen unterschiedliche biologische Effekte zugeschrieben werden: UVA (320 - 400 nm), UVB (290 - 320 nm) und UVC (100 - 290 nm). UVC-Strahlung sollte effektiv von der intakten Ozonschicht der Erde absorbiert werden und deshalb unter normalen Bedingungen nicht die Erdoberfläche erreichen. Eine UVC-Exposition ist jedoch aus künstlichen Strahlungsquellen möglich, wie sie zum Beispiel zur Raum- und Flächendesinfektion verwendet werden. UVC-Strahlung kann Fensterglas nicht durchdringen. UVC-Strahlung führt zu einer Reizung der Bindehaut des Auges und zu einem Erythem, das sich

etwa 6 Stunden nach Bestrahlung entwickelt. UVC-Strahlung induziert keine wesentliche Pigmentierung der Haut.

UVA- und UVB-Strahlen erreichen die Erdoberfläche in einer ausreichend hohen Dosis, um an Augen und Haut relevante, biologische Reaktionen auszulösen. UVB-Strahlung ist energiereicher als UVA-Strahlung und kann im Gegensatz zu UVA Fensterglas nicht durchdringen. Das Sonnenlicht im UVB-Bereich wird von der Haut absorbiert und führt in Abhängigkeit von der Dosis zu einem Erythem und zur Dermatitis solaris. Die maximale Ausprägung des Erythems entwickelt sich im allgemeinen innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach Exposition. Zusätzlich hinterlässt die UVB-Strahlung auch eine spät (nach 48 - 72 Stunden) einsetzende, lang anhaltende Pigmentierung der Haut (Spätpigmentierung). Als Langzeitfolge werden verschiedene Hautkrebsformen der UVB-Strahlung zugeschrieben [62, 64].

Der UVA-Bereich stellt den größten Anteil der UV-Strahlung des Sonnenlichts. Der langwellige Anteil der UVA-Strahlung reicht an den Bereich des sichtbaren Lichts heran. Dieser Spektralbereich bewirkt eine Sofortpigmentierung der Haut innerhalb von Sekunden und kann in hohen Dosen zu einer raschen Erythemreaktion (Soforterythem) führen. Auch wenn keine direkten DNA-Schäden durch UVA-Strahlung bisher nachgewiesen sind, mehren sich die Hinweise, dass UVA - wenn auch im Vergleich zu UVB-Strahlung in schwächerem Ausmaß - karzinogen sein kann. Tierversuche zeigten, dass die Anwendung höherer Dosen über längere Zeit signifikant zu Hautkrebs führen kann [101]. Bei der Karzinogenese wird ein synergistischer Effekt von UVA und UVB vermutet [39, 76]. Darüber hinaus belegen Studien, dass UVA-Strahlung die Alterung der Haut und die Faltenbildung begünstigt.

Die Therapie mit UV-Strahlung beeinflusst oder verursacht eine Vielzahl von biologischen Reaktionen. UV-Strahlung induziert die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit DNA [108], beeinflusst die Strangelongation bei der Gentranskription [32], induziert Stresssignale, und kann zu Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Sekretion proinflammatorischer oder immunsuppressiver Zytokine führen.

1.2.2 UV-Strahlung und DNA-Schäden

Das Maximum der UV-Absorption der DNA liegt in einem Bereich von 245 – 290 nm [99]. Besonders UVB-Strahlung ist in der Lage, mutagene Photoprodukte oder Läsionen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen in Form von Pyrimidindimeren zu bilden, die kovalent miteinander verknüpft sind. Man unterscheidet bei diesen Dimeren zwei Hauptformen: Cyclobutandimere zwischen benachbarten Thymin- oder Cytosinresten. Sie stellen die häufigste Läsion dar. Des Weiteren können Pyrimidin -(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinresten entstehen. Obwohl beide Läsionen potentiell mutagen sind, wird dem Cyclobutandimer die Hauptrolle für Mutationen in Säugetierzellen zugeschrieben [110]. UVB führt über die Induktion von oxidativen Radikalen auch noch zu anderen Formen von DNA-Schäden, zum Beispiel 8-Oxo-7,8-Dihydroxyguanin und DNA-Strangbrüchen.

Die Reparatur der durch UVB induzierten Pyrimidindimere erfolgt durch Nukleotidexzisionsreparatur. Bei der Nukleotidexzisionsreparatur wird die fehlerhafte Base entfernt. Beim Wiedereinfügen der korrekten Base dient der nicht geschädigte komplementäre Strang als Matrize. Würde dieser DNA-Schaden nicht behoben, so käme es bei der Replikation am neu synthetisierten Strang zum Einbau einer fehlerhaften Base, üblicherweise eines Adenins. Die Folge sind charakteristische Punktmutationen, wie C- zu T- oder CC- zu TT-Transitionen, deren Existenz eine UV-induzierte Genese vermuten lässt [61, 64].

1.2.3 Schäden durch Kombination von Psoralen und UVA

Psoralene sind lineare Furocoumarine, die auch heute noch aus Pflanzenbestandteilen gewonnen und bei der Anwendung am Patienten mit UV-Strahlung kombiniert werden. Psoralenmoleküle interkalieren in den DNA-Doppelstrang. Psoralene entfalten ihre biologische Wirkung erst nach Aktivierung durch UV-Strahlung in den Hautschichten, die der UV-Strahlung zugänglich sind. Am häufigsten kommt 8-Methoxypsoralen (8-MOP) zur

klinischen Anwendung. 8-MOP verfügt über zwei durch UV-Strahlung aktivierbare Doppelbindungen und gehört damit zu den bifunktionellen Psoralenen. Bifunktionelle Psoralene wie 8-MOP können durch UVA-Licht aktiviert werden, um Thymin-Monoaddukte und DNA-Doppelstrangvernetzungen (intrastrand cross links, ICL) zu induzieren [67]. Bei den ICL handelt es sich um kovalente Bindungen zwischen gegenüberliegenden Thyminen der DNA, die die beiden komplementären DNA-Stränge miteinander vernetzen. In welchem Verhältnis DNA-Doppelstrangvernetzungen oder Monoaddukte auftreten wird unter anderem durch die Wellenlänge und die Dosis der UVA-Strahlung beeinflusst. Bis zu 40% der Monoaddukte können zu DNA-Doppelstrangvernetzungen konvertiert werden. Im Vergleich zu den Monoaddukten sind die DNA-Doppelstrangvernetzungen zytotoxischer und mutagener und führen häufiger zu Rekombinationsvorgängen [22].

Die Ausbildung der DNA-Doppelstrangvernetzungen erfolgt in 3 Schritten: Psoralenmoleküle interkalieren in den DNA-Doppelstrang und stehen mit den frei löslichen Psoralenmolekülen im Lösungsgleichgewicht. Werden die Psoralenmoleküle durch elektromagnetische Strahlung von 320 – 400 nm angeregt, so können sich durch Einwirkung weiterer Photonen Zyklobutanringe formieren. Diese interagieren mit der DNA-Doppelhelix, und eine kovalente Kreuzvernetzung der DNA-Doppelhelix kann resultieren [57]. Wahrscheinlich beinhalten durch 8-MOP erzeugte Läsionen sowohl Mono- als auch Biaddukte.

Eine Differenzierung, welche DNA Reparaturmechanismen für die Vielzahl der möglichen Läsionen zum Zuge kommen, ist schwierig. Doppelstrangvernetzungen können nicht durch Nukleotidexzisionsreparatur repariert werden [67], da auch der komplementäre Strang mit in die Läsion einbezogen ist. Ihre Reparatur erfolgt sehr langsam, vermutlich über homologe Rekombination. Die durch PUVA induzierten Punktmutationen sind weniger charakteristisch als die durch UVB erzeugten. Üblicherweise treten A - zu - T - Transversionen auf [44-48, 91, 92]. Möglicherweise können Doppelstrangvernetzungen sowohl über die Ausbildung von

Doppelstrangbrüchen und anschließender homologer Rekombination (HR), als auch durch das Zusammenfügen nicht homologer DNA-Bruchstellen (non-homologous end joining, NHEJ), behoben werden [10]. NHEJ ist jedoch ein stark fehlerbehafteter Vorgang, bei dem es häufig zu Deletionen oder kleinen Insertionen kommen kann [28].

1.3 Überblick über den Zellzyklus und seine Regulation

Auch in ausgewachsenen Organismen besteht die Notwendigkeit zur Zellteilung, um den natürlichen Zellverlust durch Überalterung und Zelltod auszugleichen. Zellen, die sich unter normalen Bedingungen in einer Art Ruhephase, der G₀-Phase, befinden und nicht am Zellteilungszyklus teilnehmen, können bei Bedarf reaktiviert werden und wieder in den Zellzyklus eintreten. Der Zellteilungszyklus gliedert sich in 4 Phasen: Zellteilung (Mitose), G₁-Phase (engl. G, für Gap= Ruhephase), Synthesephase (S-Phase) und G₂-Phase, die nacheinander durchlaufen und abgeschlossen werden, und in deren Abfolge zwei identische Tochterzellen entstehen (siehe Abb.2).

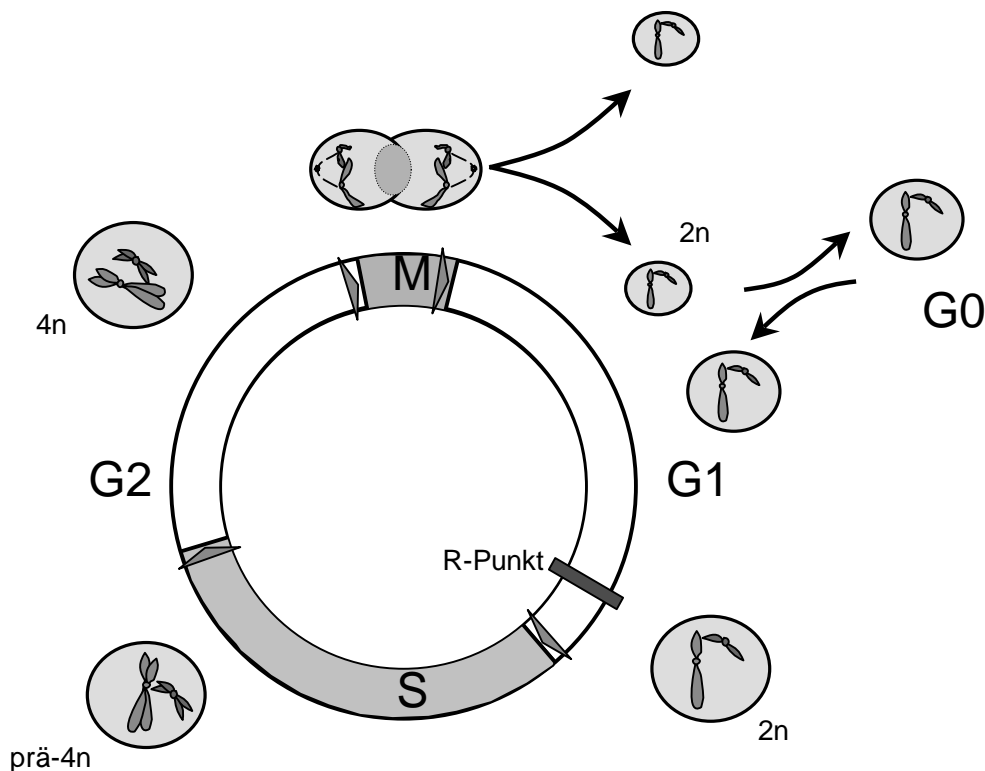


Abb.2: Der Zellzyklus

Die genetische Information von Zellen ist auf der DNA-Doppelhelix festgeschrieben. Während der Zellteilung (Mitose) werden die Chromosomen

symmetrisch aufgeteilt, sodass zwei identische Tochterzellen entstehen. Bei diesem Vorgang wird der DNA-Gehalt halbiert (Einchromatidchromosomen, $2n$). In der Synthese-Phase (S-Phase) wird der DNA-Gehalt durch den Vorgang der Replikation wieder komplettiert (Zweichromatidchromosomen, $4n$). Zwischen Mitose und S-Phase durchläuft die Zelle die G1-Phase, eine Ruhephase, in der sie an Größe zunimmt und auf die anschließende S-Phase vorbereitet wird. In der G1-Phase findet auch die Abstimmung des Zellzyklus mit extrazellulären Signalen statt, zum Beispiel der Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Diese Stimulation ist für das Fortschreiten in der frühen G1-Phase notwendig. Haben die Zellen einmal den Restriktionspunkt passiert (siehe Abb.2), werden die Zellen unabhängig vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren in die S-Phase eintreten und ihre DNA replizieren. An die S-Phase schließt sich eine zweite Ruhephase (G2-Phase) an. Hier werden die DNA-Doppelstränge auf Replikationsfehler überprüft, die repariert werden, ehe die Zellen in die Mitose eintreten.

Normalerweise können sich Zellen unter Zellkulturbedingungen nur teilen und wachsen, wenn im Zellkulturmedium Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Sie werden dem Zellkulturmedium in Form von fötalem Kälberserum (FKS) zugesetzt. Entzieht man diese Wachstumsfaktoren durch Verwendung von FKS-freiem Medium, so treten die Zellen nach Durchlaufen der Mitose in eine Ruhephase ein (G0-Phase), aus der sie bei erneuter Substitution der Faktoren wieder in die G1-Phase eintreten können (siehe Abb.2). Wie später im Ergebnisteil gezeigt, kann man sich diese Eigenschaft zur Synchronisation von Zellen in der G1-Phase zunutze machen.

Im Laufe der Evolution hat sich aus zunächst relativ einfachen Regulationsmechanismen ein Kontrollsystem entwickelt, das die richtige Abfolge und die vollständige Ausführung der komplexen Schritte des Zellzyklus garantiert. Der zeitliche Ablauf des Zellteilungszyklus wird reguliert durch die zyklische Aktivierung und Deaktivierung einer Reihe von Proteinkinasen, die sich aus einer katalytischen Untereinheit, der Cdk (cyclin dependent kinase), und einer regulatorischen Untereinheit, einem Cyclin, zusammensetzen. Cdks sind Proteinkinasen, die ihre Substrate an Serin- und Threoninresten phosphorylieren. Sie sind die wesentlichen Regulatoren

des Zellzyklus [25]. Die Menge der Cdks bleibt während des Zellzyklus konstant. Im Gegensatz zu den Cdks werden Cycline in jeweils unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus periodisch exprimiert und abgebaut. Die Aktivierung der Cdks wird durch allosterische Bindung ihres Cyclinpartners möglich [14, 24, 27, 78, 98].

In Säugetierzellen kommen verschiedene Unterformen von Cdks und Cyclinen vor, die nur in bestimmten Kombinationen miteinander in Verbindung treten. Die wichtigsten Regulatoren der Mitose sind die Cycline A und B, die mit Cdk1 interagieren. Charakteristisch für die G1-Phase sind die Cycline D und E, die ihrerseits mit Cdk4 und 6 und in der S-Phase mit Cdk2 Komplexe bilden (Abb.3).

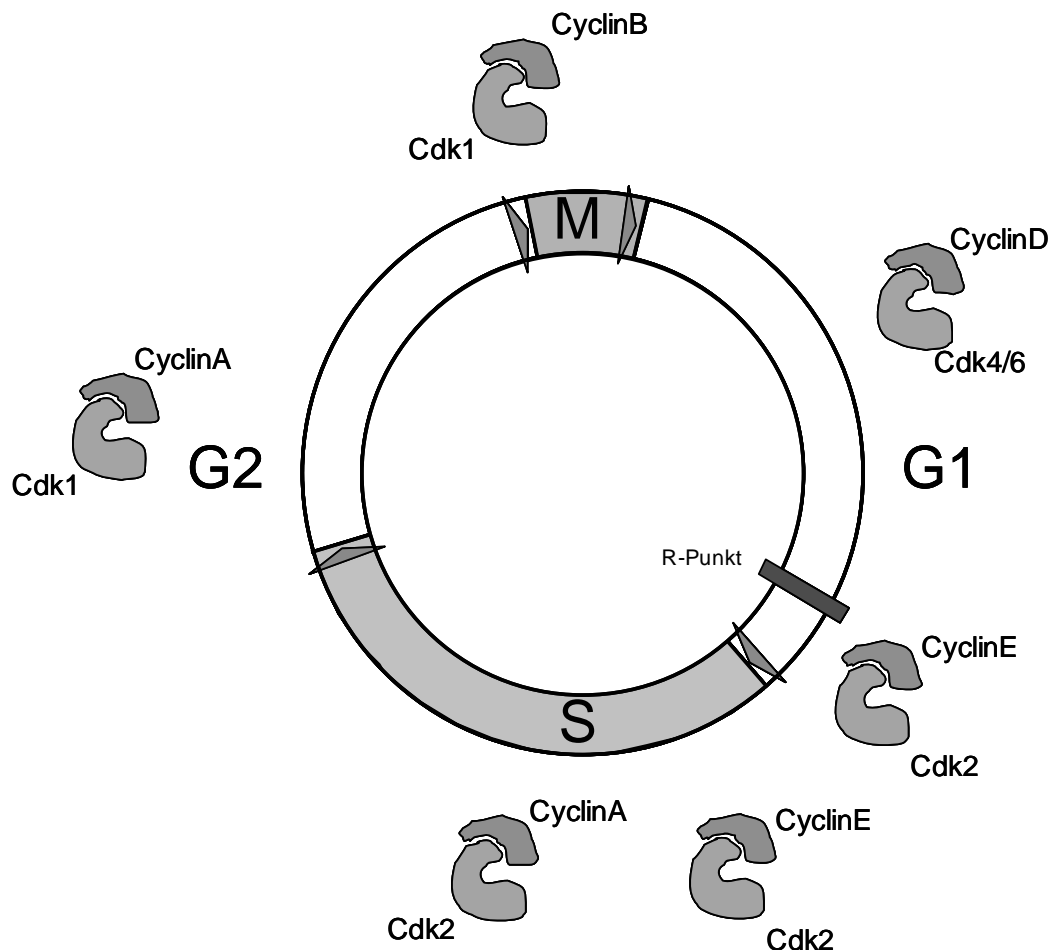


Abb.3: Vereinfachtes Schema der Cyclin-Cdk-Interaktion während des Zellzyklus.

Bei den Cyclin/Cdk-Komplexen der frühen G1-Phase handelt es sich um Cyclin D, das mit Cdk 4 oder Cdk 6 in Wechselwirkung tritt. In

Säugetierzellen werden drei Homologe, die Cycline D1, D2 und D3 unterschieden [27, 87].

Eines der wichtigsten Substrate der CyclinD/Cdk4- bzw. Cdk6-Komplexe während der G1-Phase ist das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein pRb und seine Homologe p107 und p130. pRb befindet sich in der frühen G1-Phase in hypophosphoryliertem Zustand. In dieser Form bindet und inaktiviert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die die Expression zahlreicher Gene regulieren, die für den Eintritt der Zellen in die S-Phase und für die DNA-Synthese notwendig sind. In der mittleren und späten G1-Phase wird pRb zunehmend an verschiedenen Stellen phosphoryliert und ändert dadurch seine Konformation. E2F wird freigesetzt und die Aktivierung von S-Phase-Promotoren kann erfolgen [30, 100].

Cyclin E bildet einen Komplex mit Cdk2. Cyclin E erreicht in der späten G1-Phase seine höchste Konzentration und ist für den Eintritt in die S-Phase erforderlich [83]. CyclinE/Cdk2 phosphoryliert zusätzlich das pRb-Protein in der späten G1-Phase.

Nach Eintritt der Zellen in die S-Phase wird Cyclin E abgebaut. Cdk2 assoziiert im folgenden mit Cyclin A [40]. Schließlich assoziieren Cyclin A und Cyclin B mit Cdk1, um den Eintritt der Zellen in die Mitose vorzubereiten. Cdk1 entwickelt nach Binden von Cyclin A seine höchste Aktivität in der G2-Phase. Cyclin A wird abgebaut und der Eintritt in die Mitose wird durch Cyclin B-Cdk1 eingeleitet. Erst nach Abbau von Cyclin B können die Zellen die Mitosephase wieder verlassen und in die nächste G1-Phase oder G0-Phase eintreten.

Die Aktivität der Cdks wird auf verschiedenen Ebenen reguliert: Durch Veränderung der Konzentration der Cyclin-Untereinheit, deren Assoziation mit der Cdk, durch aktivierende und hemmende Phosphorylierungen an bestimmten funktionellen Gruppen der Cdk [88] und durch Sequestrierung in unterschiedliche Zellkompartimente [78].

Eine zusätzliche Regulation der G1-Cdk-Aktivität erfolgt durch allosterische Hemmung durch Cdk-Inhibitoren (CKI), zu denen Vertreter der Ink4- (p15, p16, p18 und p19) [23, 56, 96] und der Cip/Kip-Proteinfamilie (p21, p27 und p57) [79, 112] zählen. Eine vereinfachte Übersicht zeigt Abb.4.

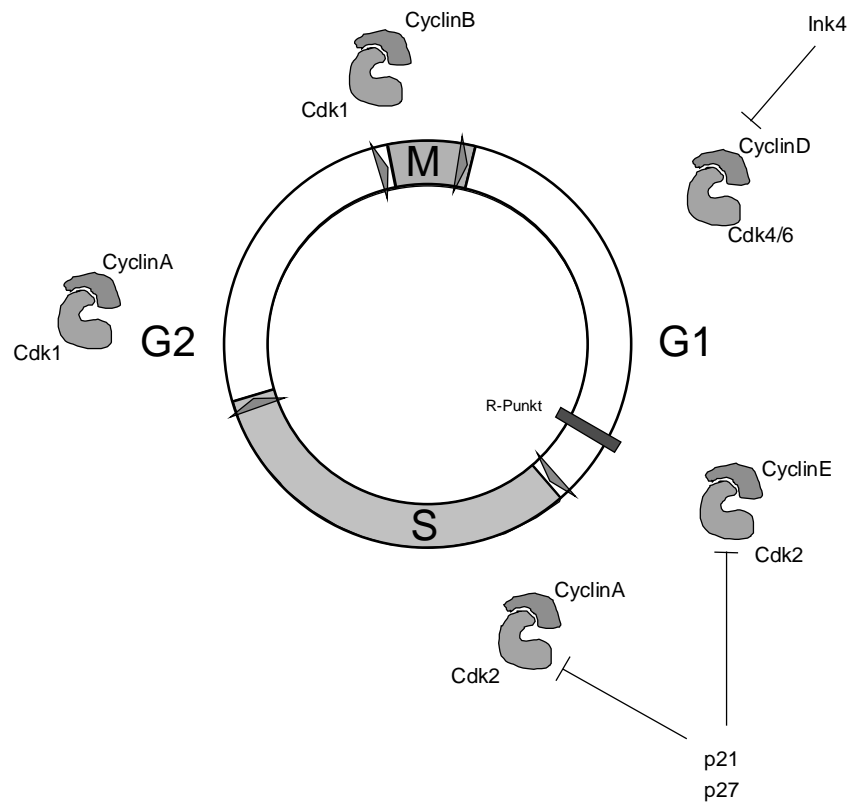


Abb.4: Regulation der Cyclin/Cdk-Aktivität durch Cdk-Inhibitoren (CKI).

Die Expression von Cdk1 und Cdk2 bleibt im Verlauf des Zellzyklus konstant. Ihre Aktivierung setzt zum einen die Assoziation mit ihren Cyclin-Untereinheiten voraus, zum anderen die Phosphorylierung an einem Threoninrest, der sich in der T-Loop-Domäne befindet. Phosphorylierung an Tyrosin 15 und Threonin 14 (siehe Abb.5), die sich innerhalb der ATP-Bindungsstelle finden, führt hingegen zur Inaktivierung von Cdk1 und Cdk2 [8]. Diese inhibitorischen Phosphorylierungen werden durch die Wee1/Mik1/Myt1-Protein-Kinasen vermittelt. Die Cdc25-Phosphatasen (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) können diese Phosphotyrosin- und Phosphothreonin-Phosphatgruppen wieder entfernen und damit die Cdk aktivieren [35] (siehe Abb.5).

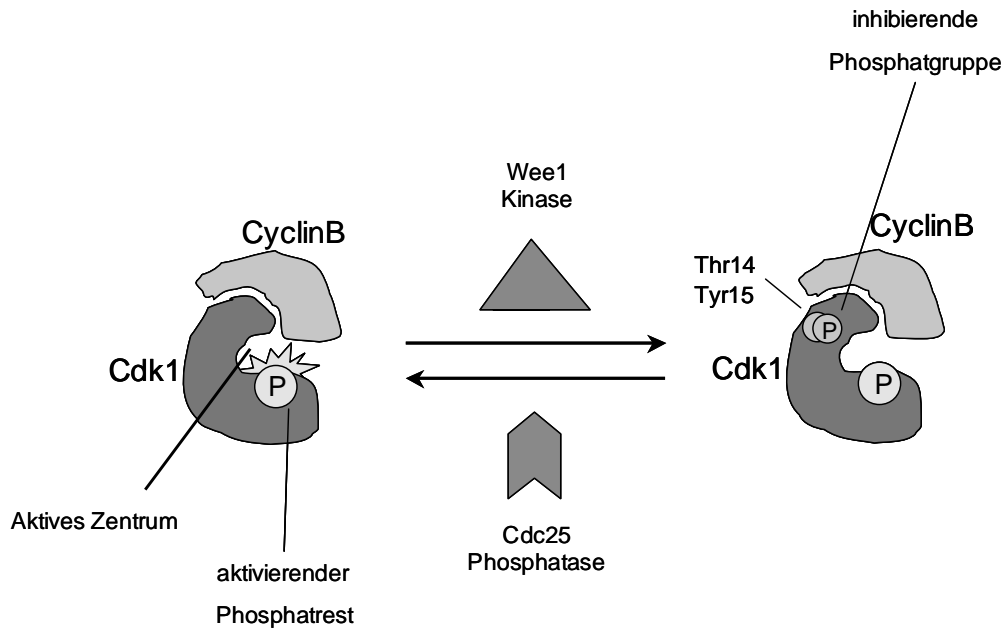


Abb.5: Regulation der Cyclin/Cdk-Aktivität durch aktivierende und hemmende Phosphorylierungen an funktionellen Gruppen.

Die Cdc25 Phosphatasen übernehmen im Zellzyklus unterschiedliche Rollen. Während Cdc25 B und - C wahrscheinlich in erster Linie den Übergang von der G2- zur M-Phase regulieren, vermutet man, dass Cdc25A vielfältige Aufgaben erfüllt, sowohl am Übergang von früher G1/S-Phase, als auch bei der späten G2/M-Transition. Die Cdc25A-Aktivität wird vor allem über die periodische Expression und Ubiquitin-vermittelte Proteolyse reguliert [17, 18, 33, 80].

Der Zellzyklus wird durch ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden und Kontrollpunkten überwacht, das inkomplette Replikation, DNA-Schäden, Chromosomenbrüche, Defekte des Spindelapparats und der Verteilung der Chromosomen während der Zellteilung erkennt. Die Kontrollpunkte, an denen in das Zellzyklusgeschehen eingegriffen werden kann, werden Checkpoints genannt [7-9, 81]. Checkpoints sind aktiv induzierte Unterbrechungen im Zellzyklus nach Schädigung von Zellen. Sie verzögern die Progression im Zellzyklus und geben den Zellen Zeit, den Schaden wieder zu beheben. Nach erfolgreicher Reparatur können die Zellen wieder den Zellzyklus fortsetzen.

Checkpoints stellen sicher, dass die Vorgänge während des Zellzyklus korrekt und in der richtigen Reihenfolge abgeschlossen werden. Erst dann

kann die Zelle zur nächsten Zellzyklusphase übergehen. Die meisten Checkpoints sind in Zellen wirksam, die aktiv am Zellzyklusgeschehen teilnehmen und dadurch einem höheren Risiko für folgenschwere Mutationen ausgesetzt sind als ruhende Zellen. Mindestens drei Checkpoints sind heute gut definiert:

In der G1-Phase, während der S-Phase und am Übergang von der G2- in die M-Phase. Bei der Aktivierung von Checkpoints, die DNA-Schäden und inkomplette DNA-Replikation überwachen, wird der Zellzyklusarrest durch Hemmung der Cdks vermittelt [113].

In Säugetierzellen kommt den strukturell eng miteinander verwandten Proteinen ATM (engl. Ataxia teleangiectasia mutated) und ATR (ATM-and Rad3-related) aus der Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3Ks) [1] eine wesentliche Rolle als Serin- und Threonin-Kinasen bei der initialen Signalübertragung in Zellzykluscheckpoints zu [104, 116].

Welche weitreichenden Auswirkungen Defekte in der Checkpointregulierung haben können, wird eindrucksvoll am Beispiel der erblichen Krankheit Ataxia teleangiectasia deutlich, der eine Mutation des ATM-Gens (ataxia teleangiectasia mutated) zugrunde liegt [6, 114]. Patienten mit dieser Krankheit leiden an progressiver cerebellärer Ataxie, haben eine gestörte Immunabwehr, atrophierte Gonaden, okulokutane Teleangiektasien, frühzeitige Alterserscheinungen und besonders im Hinblick auf Lymphome ein erhöhtes Risiko, Tumore zu entwickeln. Zelllinien, die von AT-Patienten isoliert wurden, sind sehr empfindlich gegenüber ionisierender Strahlung und zeigen nach Exposition mit ionisierender Strahlung Defekte in G1-, S- und G2-Checkpoint-Antworten. Dieses Phänomen wird „Radio resistant DNA-Synthesis“ (RDS) genannt. Die Kinase-Aktivität von ATM wird unter anderem durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert. ATM beeinflusst verschiedene Effektorproteine der Checkpoints, z.B. Chk2, Brca1, Nbs1, p53 und Mdm2. Auch ATR (ATM- and Rad3-related protein kinase) trägt zu der Checkpointkontrolle in eukaryotischen Zellen bei. Im Gegensatz zu ATM ist ATR offensichtlich ein essentielles Gen, da die Deletion des ATR-Gens in Mäuseembryos bereits in utero zum Tode führt [29]. Kürzlich wurde eine sehr seltene menschliche Erbkrankheit beschrieben, das Seckel-Syndrom, für

dessen Ausbildung eine Mutation des ATR-Gens verantwortlich gemacht wird. Die autosomal rezessiv vererbte Erkrankung ist durch eine uneinheitlich ausgeprägte intrauterine Wachstumsretardierung, Zwergwuchs, Mikrocephalie und geistige Retardierung charakterisiert. Im klinischen Erscheinungsbild der Krankheit gibt es Ähnlichkeiten mit dem Nijmegen Breakage Syndrom (Nbs) und LIG4-Syndrom. ATR-Seckel-Zellen zeigen Defekte im G2/M-Checkpointarrest nach Exposition mit UV-Strahlung oder Substanzen, die zum Replikationsarrest führen [3, 21, 82].

Zellen, die eine dominant-negative ATR-Mutante überexprimieren, sind sowohl gegen UV-Strahlung und Hydroxyharnstoff (HU), als auch gegen ionisierende Strahlung überempfindlich. Man nimmt an, dass ATR im Vergleich zu ATM eine prominentere Rolle bei der zellulären Antwort auf unvollständig replizierte DNA spielt, die durch Noxen wie Hydroxyharnstoff oder UV-Strahlung ausgelöst wird. Die Überexpression von ATR hebt den Defekt der radioresistenten DNA-Synthese in AT-Zellen auf, denen das funktionelle ATM-Gen fehlt, was darauf hinweist, dass ATM und ATR in vivo überlappende Funktionen haben [114].

ATM und ATR phosphorylieren eine Vielzahl gemeinsamer Substrate in vivo und in vitro (z.B. p53, hRad17, Nbs) [104, 105]. In Abhängigkeit von der Natur des DNA-Schadens werden auch die Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2 von ATM und ATR phosphoryliert und aktiviert [114]. Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass sowohl der Übergang von der G1- zur S-Phase als auch ein transienter intra-S-Phase-Checkpoint durch Beteiligung der Cdc25A-Phosphatase reguliert werden [9, 60, 61, 74, 75, 78]. In der Folge der Aktivierung von ATM/ATR nach Exposition mit UV- und Gamma-Strahlung verringert sich die Menge an zellulärem Cdc25A, woraus die Hemmung von Cdk2 resultiert.

Unterschiedliche Noxen führen zu unterschiedlichen DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüchen, Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangvernetzungen oder Verwindungen der DNA-Helix. Die DNA-Läsionen führen zur Aktivierung unterschiedlicher Checkpoints. Chemotherapeutika wie Cisplatin, Mitomycin C oder Stickstofflostverbindungen induzieren Doppelstrangvernetzungen. Die Doppelstrangvernetzungen, die durch Cisplatin ausgebildet werden, führen

zu einem G2/M-Block. Auch PUVA erzeugt Doppelstrangvernetzungen. Die zunehmenden Kenntnisse über die Existenz und Regulation von DNA-Schaden-Checkpoints haben unser Interesse daran geweckt, welche Rolle diese Checkpoints bei der in der Dermatologie eingesetzten Photochemotherapie mit PUVA spielen. Diese Arbeit untersucht die Wirkung von PUVA auf den Zellteilungszyklus. Hierbei zeigte sich, dass PUVA selektiv Checkpoints aktiviert und sich dabei eindrucksvoll von anderen doppelstrangvernetzenden Noxen und von UVB unterscheidet.

2. Ergebnisse

Als Modellsystem für epidermale menschliche Zellen wurden HaCaT-Keratinocyten verwendet. Bei HaCaT-Keratinocyten handelt es sich um eine spontan immortalisierte Zelllinie mit einem mutierten p53-Gen, deren biologisches Verhalten und deren Morphologie normalen Keratinocyten sehr ähnelt [43]. Sie können vollständig epidermal ausdifferenzieren [15]. Obwohl HaCaT-Keratinocyten keine Tumorzellen sind, überstehen sie im Gegensatz zu normalen Keratinocyten bis zu 140 Passagen ohne Beeinträchtigung durch Langzeitkultivierung. Das Akronym „HaCaT“ verweist auf die Zellkulturbedingungen, unter denen die Immortalisierung der Zellen stattgefunden hat (siehe auch Material und Methoden).

Durch Analyse des DNA-Gehalts von HaCaT-Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) wurde die Zellzyklusphase bestimmt, in der sich die Zellen befanden. Nach PUVA-Behandlung wurden die Zellen von der Zellkulturschale losgelöst, fixiert, die Zellkerne isoliert und mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid gefärbt. Die Ergebnisse der Analyse wurden in Histogrammen dargestellt. Dabei handelt es sich um zweidimensionale Diagramme, in denen die während der Analyse gewonnene Information durch unterschiedliche Parameter visualisiert werden kann. Die x-Achse repräsentiert den DNA-Gehalt, die y-Achse die Anzahl der ausgezählten Zellen. In dem resultierenden Diagramm kann die relative Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen durch Berechnung der Fläche unter der Kurve (Area under the Curve, AUC) ermittelt werden.

Im Histogramm zeigen die Zellen in der G₂-Phase nach dem Abschluss der Replikation einen tetraploiden Chromosomensatz (4n, siehe Abb.6). Die G₁-Phasezellen, die sich in der Mitose geteilt haben und noch nicht mit der DNA-Replikation begonnen haben, weisen einen diploiden Chromosomensatz (2n) auf. Zellen, die sich in der S-Phase befinden zeigen einen DNA-Gehalt in dem Bereich, der zwischen dem von G₁- und von G₂-Phasezellen liegt. Die Stärke des Propidiumjodidsignals ist direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zellen. Entsprechend geben Zellen mit 4n-DNA-Gehalt auch in der FACS-Analyse ein doppelt so starkes Signal wie Zellen mit 2n-DNA-Gehalt (siehe Abb.6).

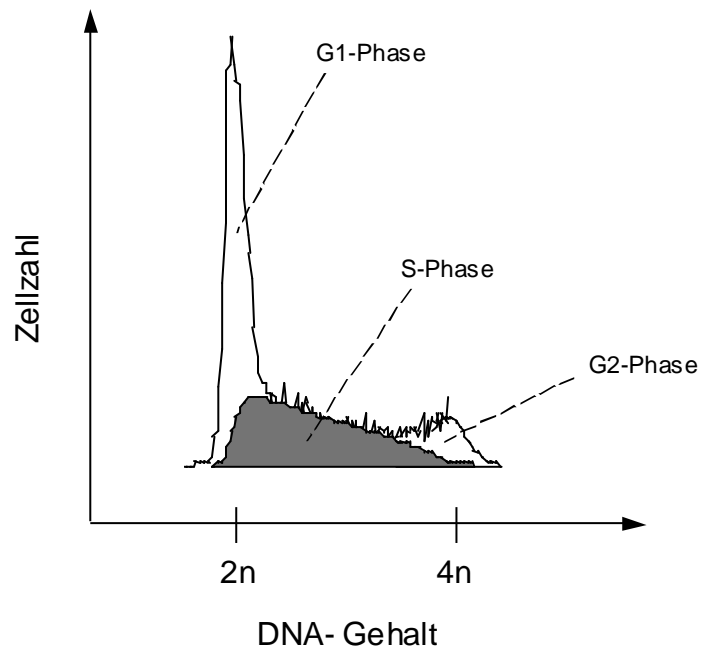


Abb.6: Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Der DNA-Gehalt von G2-Phasezellen entspricht dem doppelten DNA-Gehalt von G1-Phasezellen, der DNA-Gehalt von S-Phasezellen liegt in dem Bereich dazwischen.

Das Propidiumjodid-Histogramm lässt nur eine statische Momentaufnahme der Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen zu. Um dynamische Prozesse zu erfassen, war die gezielte Markierung der Zellen in spezifischen Zyklusphasen erforderlich. Hierzu wurden HaCaT-Zellen vor der Exposition mit PUVA in einem zusätzlichen Schritt für ein kurzes Zeitintervall mit Bromodeoxy-Uridin (BrdU) inkubiert. Alle Zellen, die sich in der S-Phase befinden, bauen die zu Thymin analoge Base BrdU in ihre DNA ein. Durch einen mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelten Antikörper lassen sich die Zellen, die sich während der BrdU-Inkubation in der S-Phase befanden und in dieser Zeit BrdU einbauten, spezifisch in der Durchflusszytometrie unterscheiden (Abb.7).

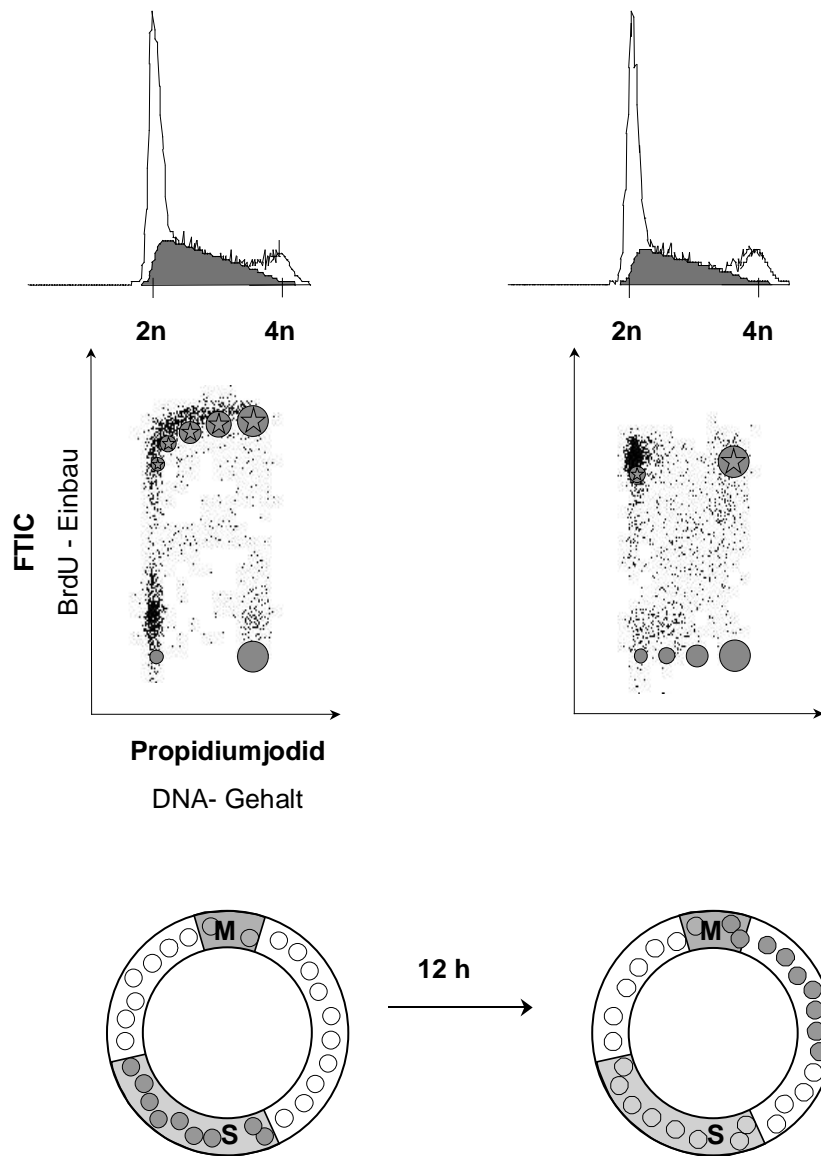


Abb.7: BrdU-Markierung von Zellen in der S-Phase. Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut haben zeigen im Punktwolkendiagramm der FACS-Analyse ein FITC-positives Signal und lassen sich dadurch im Verlauf des Zellzyklus verfolgen.

S-Phasezellen zeigen nach BrdU-Einbau ein FITC-positives Signal und bilden sich in der oberen Hälfte des Punktwolkendiagramms ab. Auf der rechten Seite finden sich Zellen mit $4n$ -, auf der linken Seite des Diagramms jene mit $2n$ -DNA-Gehalt. Die durch BrdU markierten Zellen zeigen auch nach Durchlaufen der Mitose ein FITC-positives Signal und sind in der linken oberen Ecke des Diagramms abgebildet (siehe Punktwolkendiagramm Abb. 7, rechte Spalte).

2.1 PUVA arretiert Zellen in verschiedenen Stadien der S-Phase

Um den Einfluss von PUVA auf den Zellzyklus von HaCaT-Keratinocyten zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Exposition mit UV-Strahlung mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ 8-Methoxy-Psoralen (8-MOP) für 20 Minuten inkubiert. BrdU wurde der Inkubationslösung zugegeben und damit die Zellen markiert, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befanden. Die Psoralen-Konzentration entspricht dem Serumspiegel, der bei Patienten ermittelt wurde, die im Rahmen einer systemischen PUVA-Therapie das 8-MOP per os einnahmen [50, 69, 70]. Die UVA-Dosis wurde schrittweise in einem Bereich von $0,05$ bis 1J/cm^2 gesteigert. Dies entspricht der UVA-Dosis zu Beginn der PUVA-Therapie bei noch ungebräunter Haut des Patienten. 12 Stunden nach Exposition mit PUVA wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und danach fixiert. Nach Inkubation mit anti-BrdU-FITC-Antikörper und Färbung mit Propidiumjodid wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Abbildung 8a zeigt die nicht mit UVA-exponierten Kontrollzellen 12 Stunden nach BrdU-Einbau. Fast alle BrdU-positiven Zellen hatten die Mitose durchlaufen und die G1-Phase erreicht (Abb.8a, linker oberer Quadrant des Punktwolkendiagramms). Bereits bei einer Dosis von $0,05 \text{J/cm}^2$ und $0,1 \text{J/cm}^2$ erreichten nicht mehr alle BrdU-positiven Zellen die G1-Phase. Eine Population von BrdU-positiven Zellen schien am Ende der S-Phase oder am G2/M-Übergang festgehalten. Nach einer Dosis von $0,5 \text{J/cm}^2$ und 1J/cm^2 UVA verringerte sich der Anteil der Zellen des G2/M-Gipfels. Offensichtlich wurden auch die Zellen in der frühen und mittleren S-Phase arretiert. Es

schien, als ob mit ansteigender UVA-Dosis die Zellen in zunehmend früheren Stadien der S-Phase festgehalten würden [111]. Auch traten keine weiteren Zellen mehr in die S-Phase ein, denn der Anteil der BrdU-negativen 2n-Population (Abb.8b-f, linker unterer Quadrant der Punktwolkendiagramme) reduzierte sich nicht weiter (vgl. Abb.8a, linker unterer Quadrant). Die Steigerung der 8-MOP-Konzentration zeigte keinen weiteren Einfluss auf das Verteilungsmuster der Zellen (Abb.8f). Die Analyse mit ModFit[®] ergab, dass es sich bei den BrdU-positiven Zellen nach PUVA-Exposition (Abb.8b-e, rechter oberer Quadrant des Punktwolkendiagramms) um Zellen handelte, deren DNA-Gehalt nicht dem tetraploiden DNA-Gehalt von G2/M-Zellen entsprach, sondern dass der DNA-Gehalt etwas darunter lag. Offensichtlich hatten die Zellen mit dem beinahe-4n-DNA-Gehalt die Replikation noch nicht abgeschlossen. Es handelte sich demnach vermutlich um S-Phasezellen, die die G2-Phase noch nicht erreicht hatten. Weiterhin fiel auf, dass die BrdU-negative 4n-Population, die sich während der Bestrahlung in der G2-Phase befunden hatte, nicht mehr nachzuweisen war (Abb.8e, Quadrat).

Für das Fehlen dieser Population gab es zwei plausible Erklärungen:

Einerseits war es denkbar, dass G2-Zellen gegenüber der Exposition mit PUVA in besonderem Maße empfindlich sind, daran zugrunde gehen und sich damit der FACS-Analyse entziehen. Andererseits bestand auch die Möglichkeit, dass diese Zellen die PUVA-Exposition in der G2-Phase überstehen und ungehindert den Zellzyklus bis zur nächsten G1-Phase durchlaufen können.

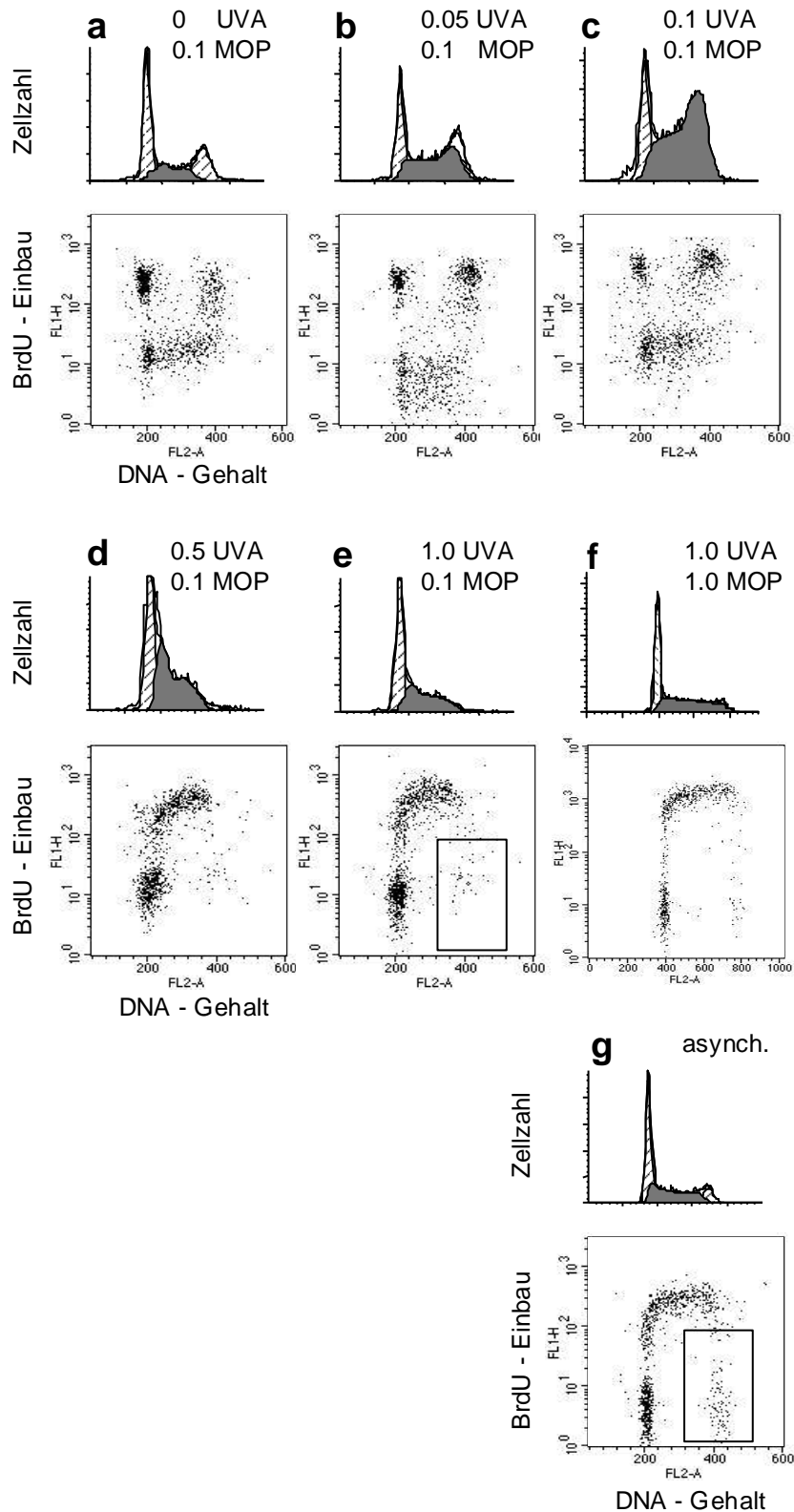


Abb.8: PUVA arretiert Zellen in der S-Phase. HaCaT-Zellen wurden mit 8-MOP und BrdU für 20 Minuten vor der Exposition mit den angegebenen Dosen von UVA und 8-MOP inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumjodid und FITC-anti-BrdU-Antikörper für die FACS-Analyse vorbereitet. UVA-Dosis in $[J/cm^2]$, 8-MOP-Konzentration in $[\mu g/ml]$.

2.2 PUVA induziert keinen G2-Phasearrest

Um festzustellen, inwieweit PUVA-Exposition den Mitoseeintritt von G2-Zellen beeinträchtigt, wurde im folgenden Experiment das Verhalten von G2-Zellen in den ersten Stunden nach der Exposition analysiert. Hierzu wurde dem Kulturmedium das Zellspindelgift Nocodazol zugegeben. Es verhindert das Ansetzen des Spindelapparates an den Zentromeren der Chromosomen und arretiert dadurch die Zellen in der Metaphase der Zellteilung. Deshalb war zu erwarten, dass mit zunehmender Zeit zunehmend mehr Zellen in die Mitose eintreten und durch Nocodazol in der Metaphase festgehalten werden.

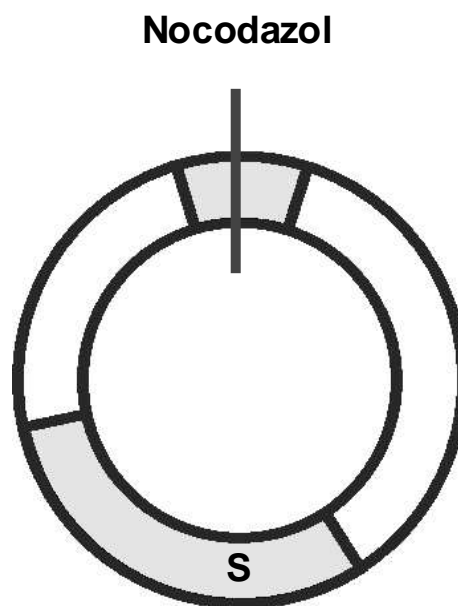


Abb.9: Das Spindelgift Nocodazol arretiert Zellen in der Metaphase der Mitose.

Nach PUVA-Exposition und Zusatz von Nocodazol wurde der prozentuale Zuwachs der Mitosefiguren über 8 Stunden im Fluoreszenzmikroskop verfolgt und der Mitoseindex $([\text{Metaphasezellen}/\text{Gesamtzellen}] \times 100)$ bestimmt (Abb.10).

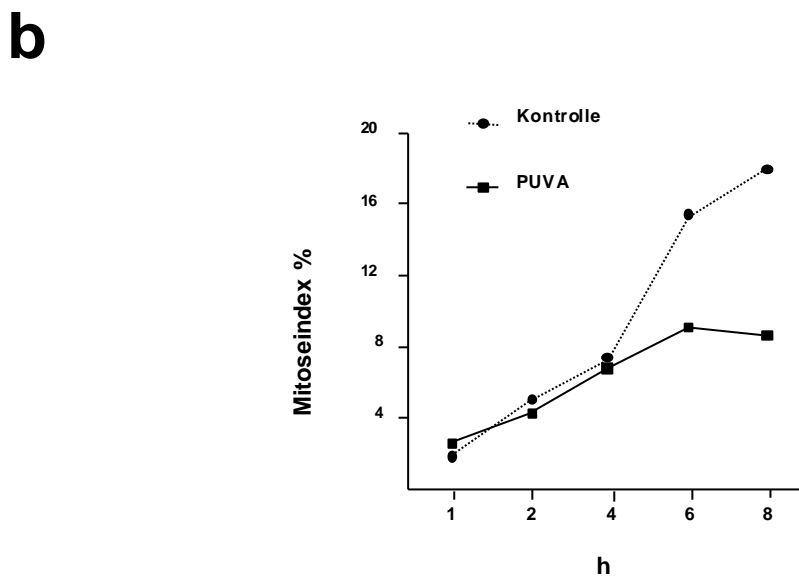
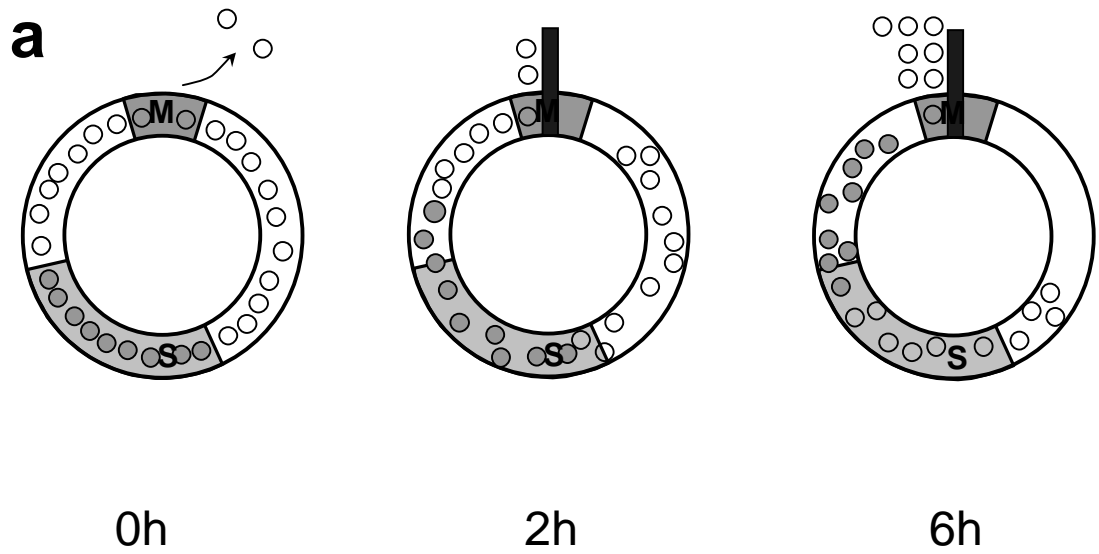


Abb.10: Kein Arrest der G2-Phase-Zellen durch PUVA. **(a)** Modellhafte Überlegung zum Mitoseeintritt von G2-Phasezellen unter der Einwirkung von Nocodazol. **(b)** Bestimmung des Mitoseindex als Maß für die relative Zunahme der Metaphasefiguren unter Nocodazoleinwirkung in den ersten 8 Stunden nach PUVA-Exposition.

Während der ersten 6 Stunden nach PUVA-Exposition traten die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit in die Mitose ein (Abb.10b). In dieser Zeit, die ungefähr der Länge der G2-Phase der Zellen entspricht, nahm der Mitoseindex kontinuierlich zu. Erst 8 Stunden nach PUVA-Exposition stagnierte die Zuwachsrate, während bei den unbehandelten Kontrollzellen der Mitoseindex weiter zunahm. Offensichtlich traten die G2-Phasezellen also ungehindert in die Mitose ein. Dies belegt, dass PUVA HaCaT-Zellen nicht in der G2-Phase arretiert, wohingegen dies für S-Phasezellen der Fall ist (siehe Abb.10c).

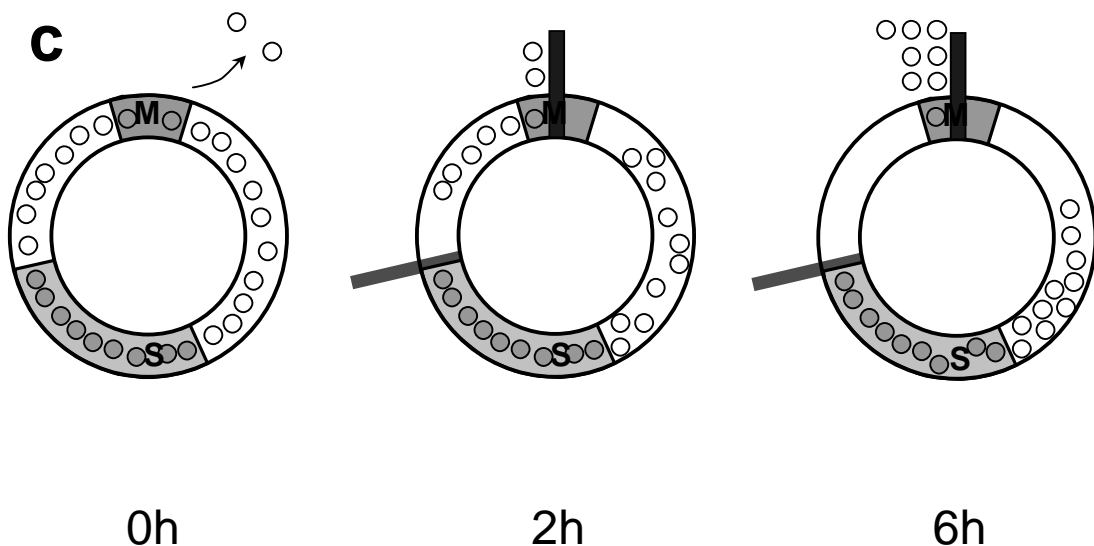


Abb.10 (c): Kein Arrest der G2-Phase-Zellen durch PUVA. Modellhafte Überlegung zum Mitoseeintritt von G2-Phasezellen nach PUVA-Exposition und unter der Einwirkung von Nocodazol.

Ob die Zellen aber tatsächlich die gesamte Mitose abschließen und in die G1-Phase eintreten konnten, blieb damit weiter unklar. Bislang gibt es keine Möglichkeit, G2-Phasezellen spezifisch zu markieren und ihren weiteren Verlauf im Zellzyklus zu verfolgen. Durch einen gleichzeitigen BrdU-Puls ließen sich bisher ausschließlich die Zellen differenzieren, die sich während der PUVA-Exposition in der S-Phase befanden. Die Zellen der späten S-Phase erreichen früher als die Zellen der mittleren und frühen S-Phase den G2/M-Übergang. Erfolgt die PUVA-Exposition allerdings nicht zeitgleich mit

der kurzzeitigen BrdU-Inkubation („Puls“), sondern nach einem definierten zeitlichen Intervall („Pause“) danach, so wird zum Zeitpunkt der PUVA-Exposition bereits ein Teil der Zellen, nämlich die Zellen, die sich während des BrdU-Pulses in der späten S-Phase befanden, die S-Phase abgeschlossen haben und sich bereits in der G2-Phase befinden („Puls-und-Pause“). In den restlichen Zellen, die sich während des Pulses in früheren Abschnitten der S-Phase befunden hatten, wird zum Zeitpunkt der PUVA-Exposition der Replikationsprozess noch nicht abgeschlossen sein und die Zellen sich tatsächlich noch in der S-Phase befinden.

Durch die zeitliche Trennung von BrdU-Puls und PUVA-Exposition finden sich also sowohl S-Phase-, als auch ein Teil der G2-Zellen, die BrdU eingebaut haben. Dadurch lassen sich die markierten G2-Zellen nach PUVA-Exposition weiter verfolgen (siehe Abb.11).

Die Zellen wurden mit BrdU für 20 Minuten inkubiert („Puls“) und erst nach einem Intervall von 1 oder 2 Stunden PUVA exponiert („Pause“). Abbildung 12 zeigt die Zellen, die 12 Stunden nach PUVA-Exposition geerntet wurden. In der Kontrollgruppe ohne UVA-Exposition (Abb. 12e, f) hatten bereits fast alle Zellen die G1-Phase erreicht und traten zum Teil in die nächste S-Phase ein. Nach PUVA-Exposition (Abb. 12a, b) bildeten sich die in der S-Phase arretierten Zellen in der Punktwolke der oberen Diagrammhälfte ab. Wiederum fiel die Abwesenheit von G2-Zellen auf (siehe Abb.12a+b, rechter unterer Quadrant). Im Unterschied zu den vorangegangenen Versuchen war jedoch eine BrdU-positive Population mit $2n$ -DNA-Gehalt neu aufgetreten, die vorher nicht nachzuweisen war (Abb.12a, schräger Pfeil). Eine Verdopplung des Intervalls zwischen BrdU-Puls und PUVA auf 2 Stunden führte zur Verdopplung dieser Population (Abb. 12b, schräger Pfeil). In der doppelten Zeit waren demzufolge auch doppelt so viele Zellen bei PUVA-Exposition bereits in der G2-Phase und konnten trotz PUVA-Exposition ungehindert bis zur G1-Phase voranschreiten. Als Kontrolle wurden Zellen mit UVB-Strahlung exponiert. UVB-Strahlung induziert G1- und G2-Phase-Arrests [85]. Die Zellen wurden in analoger Weise mit BrdU gepulst und anstelle von PUVA mit UVB-Strahlung behandelt. Abbildung 12c und 12d zeigen, dass die Zellen erwartungsgemäß in der G2-Phase festgehalten

wurden. Sowohl die BrdU-positiven als auch BrdU-negativen 4n-Zellen waren 12 Stunden nach UVB nachweisbar. Die BrdU-positive 2n-Population fehlte jedoch. Diese Versuche zeigten eindrucksvoll, dass Exposition mit PUVA die Zellen - im Gegensatz zu UVB - nicht in der G2-Phase arretiert, sondern dass die Zellen frei die Mitose durchlaufen und in die nächste G1-Phase eintreten können.

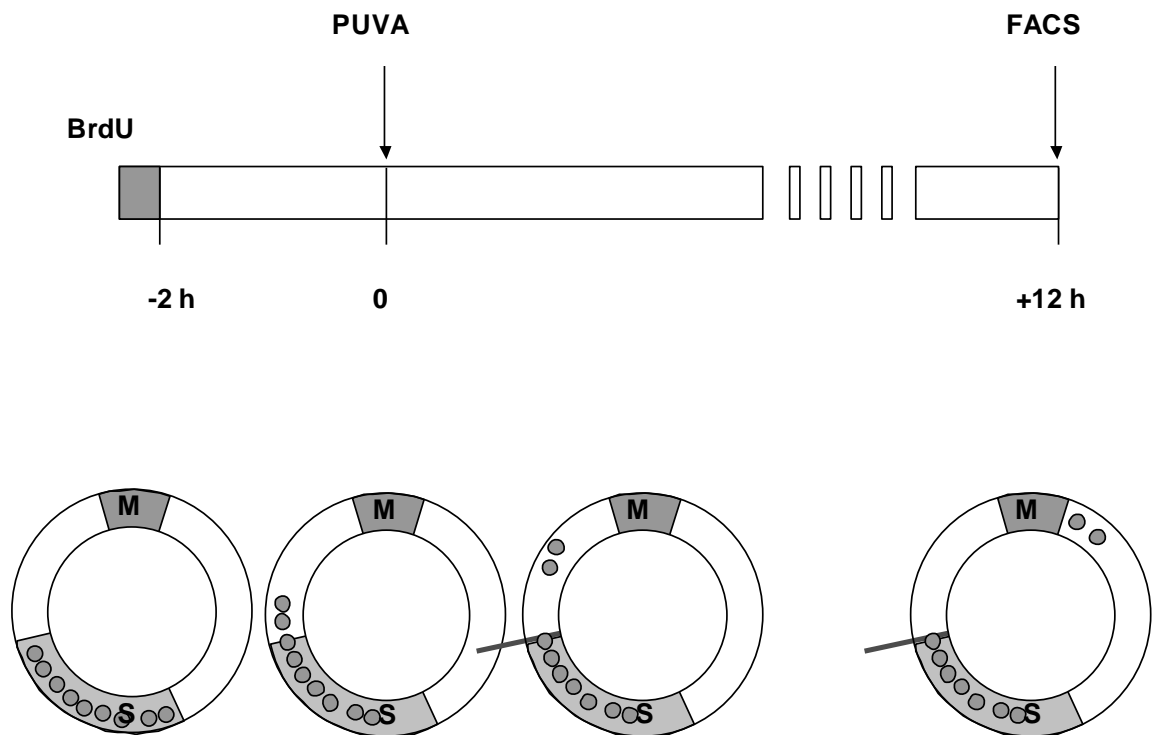


Abb.11: Schematische Darstellung des „Puls-und-Pause“-Experiments. S-Phase Zellen werden mit BrdU markiert („Puls“), jedoch im Unterschied zu den vorangegangenen Experimenten erst nach einem Zeitintervall von 1 bzw. 2 Stunden („Pause“) mit PUVA exponiert. Werden nur S-Phase-Zellen durch PUVA arretiert, sollten die markierten Zellen, die während der PUVA-Exposition bereits in die G2-Phase gelangt waren, den Zellzyklus unbeeinflusst weiter durchlaufen können.

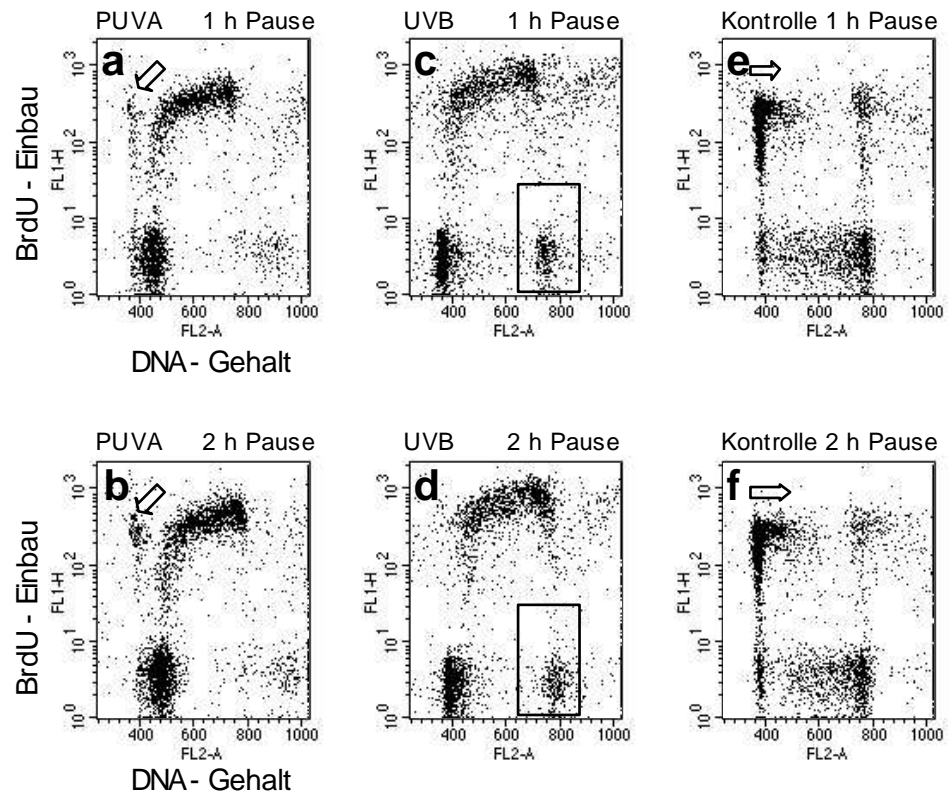


Abb.12: „Puls-und-Pause“-Analyse der G2/M-Progression nach PUVA-Exposition. HaCaT-Zellen wurden mit BrdU markiert und nach einem Intervall von 1 bzw. 2 Stunden mit PUVA (0,1 µg/ml 8-MOP; 1,0 J/cm² UVA) exponiert. Kontrollexperimente wurden zum Vergleich mit UVB-Strahlung durchgeführt. Die Zellen wurden 12 Stunden nach Exposition im FACS analysiert. Die schrägen Pfeile zeigen Zellen, die sich während der PUVA-Exposition bereits in der G2-Phase befunden hatten, und die durch PUVA unbeeinflusst die G1-Phase erreichten. Das Quadrat hebt die Zellpopulationen hervor, die durch UVB in der G2-Phase arretiert wurden, während dies durch PUVA nicht erfolgte. Die waagrechten Pfeile zeigen unbehandelte Zellen, die die G1-Phase verlassen und wieder mit der DNA-Replikation beginnen.

2.3 PUVA induziert keinen G1-Phasearrest

Wie eingangs (Abb. 8) gezeigt, arretieren HaCaT-Zellen nach PUVA-Exposition mit steigender UVA-Dosis zunächst in späten, dann auch zunehmend in immer früheren Abschnitten der S-Phase (Abb.8 a-e). Bisher war in den Punktwolkendiagrammen ein G1-Arrest nicht zuverlässig von einem frühen S-Phase-Arrest abzugrenzen. Um zu überprüfen, ob PUVA-Exposition in der G1-Phase die Zellen am Eintritt in die S-Phase hindern kann, wurden die HaCaT-Zellen durch Verwendung von Kulturmedium, dem kein fötales Serum zugesetzt worden war, für 48 Stunden in der G₀-Phase synchronisiert (Abb.13a, siehe auch Einleitung). Die Restimulation durch die erneute Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium bewirkte den synchronen Wiedereintritt der Zellen in die G₁-Phase (siehe Abb.13b).

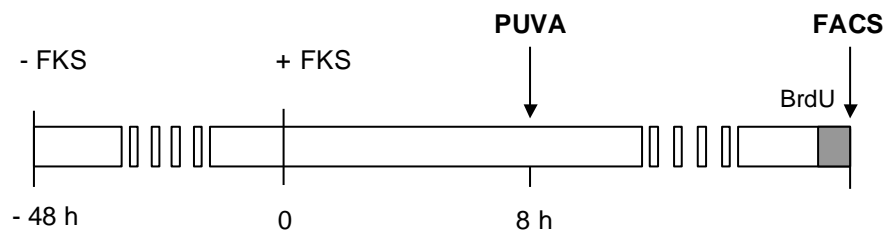


Abb.13a: Schematische Darstellung der Synchronisation von HaCaT-Zellen in der G₁-Phase durch Entzug von Wachstumsfaktoren (- FKS) und Restimulation (+ FKS).

Kurz vor der Ernte der Zellen für die FACS-Analyse wurde dem Serum BrdU zugegeben, um den Zeitpunkt des Eintritts der Zellen in die S-Phase festzuhalten (vergleiche Abb.13a). Nach etwa 16 Stunden begannen die ersten Zellen in der S-Phase mit der Replikation, erkennbar am BrdU-positiven Signal (siehe Abb.13b). 24 Stunden nach Restimulation mit FKS

hatte der wesentliche Anteil der Zellen die G1-Phase verlassen. Manche der Zellen hatten die S-Phase bereits zu fast 2/3 durchlaufen. Es war davon auszugehen, dass sich also 8 Stunden nach Restimulation der größte Teil der Zellen schon in der G1-Phase befinden musste.

Wurden die Zellen 8 Stunden nach Restimulation mit PUVA exponiert (Abb. 13c), so erfolgte ebenfalls der BrdU-Einbau zum Zeitpunkt 16 Stunden (Abb.13c, 16h + 24h). Die BrdU-negativen diploiden Zellen nahmen währenddessen ab. Allerdings fiel auf, dass die Zellen, die das BrdU eingebaut hatten, offenbar mit der Replikation begonnen hatten, jedoch nicht weiter in der S-Phase fortschreiten konnten, denn ihr DNA-Gehalt hatte auch 24h nach Serumstimulation nicht weiter zugenommen (Abb.13c, 24h). Dies erlaubte die folgenden Schlüsse: PUVA-Exposition der Zellen in der G1-Phase scheint auch bei höheren UVA-Dosen kein relevantes Signal zu induzieren, um die Zellen in der G1-Phase zu arretieren. PUVA-Exposition hindert die Zellen auch nicht am Eintritt in die S-Phase. Wahrscheinlich wird jedoch der während der G1-Phase entstandene DNA-Schaden mit dem Beginn der Replikation erkannt und löst einen Arrest aus.

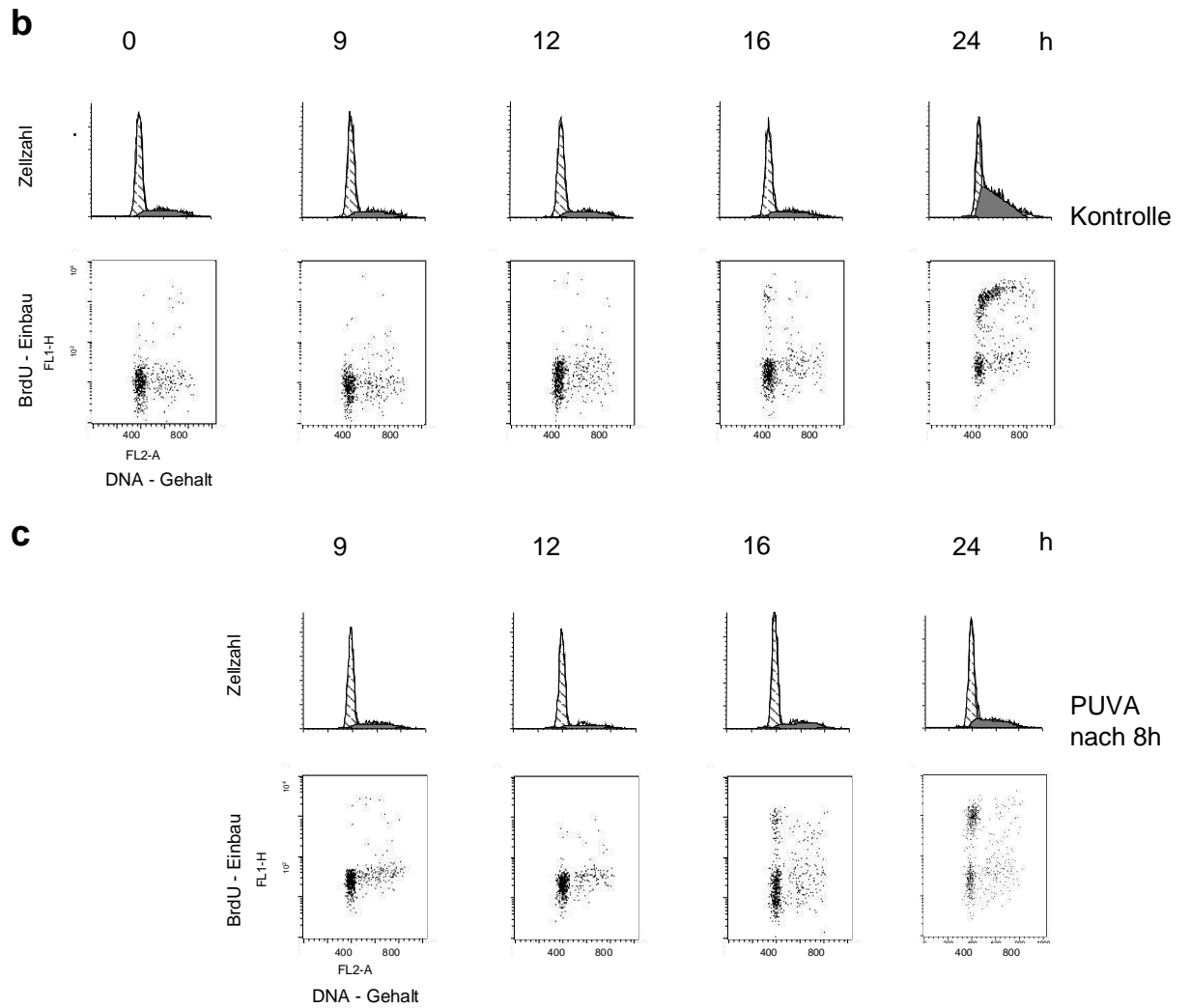


Abb.13b+c: Kein Arrest der Zellen in der G1-Phase durch PUVA. 48 Stunden nach Serumentzug wurden die Zellen mit Medium restimuliert, das 10% FKS enthielt. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit PUVA behandelt ((c), PUVA) oder blieben unbehandelt ((b), Kontrolle). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 15 Minuten mit BrdU inkubiert und für die FACS-Analyse vorbereitet.

Eine andere Erklärung wäre, dass der BrdU-Einbau nicht auf aktive Replikation, sondern auf Reparaturvorgänge zurückzuführen ist, die im Prinzip unabhängig von der S-Phase auch in der G1-Phase ablaufen könnten. Diese Reparaturvorgänge würden auch dann ablaufen, wenn die Zellen gar nicht erst die S-Phase erreichten. Um diese beiden Szenarien trennen zu können, wurden HaCaT-Keratinocyten wieder durch Serumentzug in der G0-Phase synchronisiert, 8 Stunden nach Serumzugabe mit PUVA exponiert und danach mit Roscovitin, einem Cdk-Inhibitor, in der G1-Phase festgehalten (Abb.14).

Roscovitin hemmt selektiv Cdk2 und Cdk5, jedoch Cdk4 und Cdk6 kaum [4, 5]. Die Zellen, denen kein Roscovitin zugegeben worden war, traten nach PUVA-Exposition und 24 Stunden nach Serumzugabe erwartungsgemäß in die S-Phase ein (Abb. 14, Spalte 3). Zugabe von Roscovitin verhinderte effektiv den Eintritt der Zellen in die S-Phase (Abb.14, Spalte 4). Unter dem Einfluss von Roscovitin konnte durch Exposition mit PUVA ebenfalls kein BrdU-Einbau induziert werden (Abb.14, Spalte 5). Dies belegt, dass PUVA-Exposition Zellen nicht in der G1-Phase arretiert und dass der BrdU-Einbau keine Reparaturvorgänge in diploiden G1-Phasezellen, sondern aktive Replikation widerspiegelt.

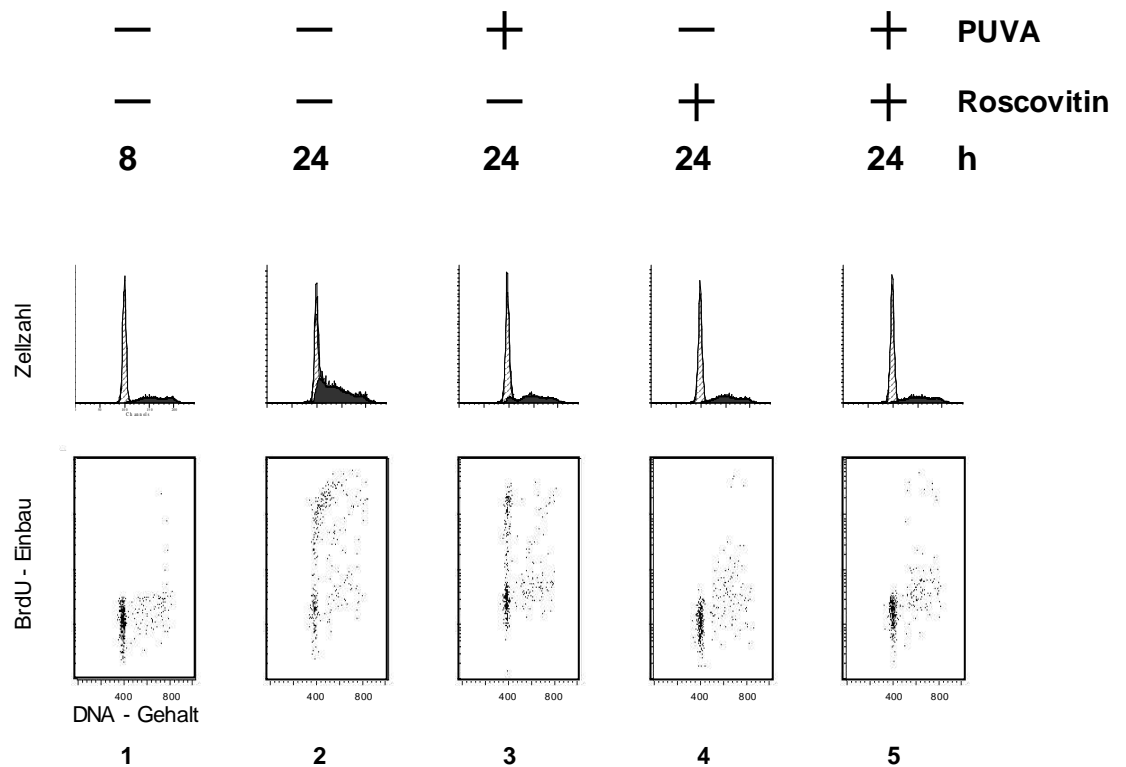


Abb.14: BrdU-Einbau in Zellen, die während der G1-Phase mit PUVA exponiert wurden, ist nicht auf Reparaturvorgänge, sondern auf aktive Replikation zurückzuführen. Der Versuchsaufbau entspricht dem in Abb.13b, jedoch wurden die Zellen bei der PUVA-Exposition zusätzlich mit dem Cdk2-Inhibitor Roscovitin inkubiert, der die G1/S-Progression verhindert.

Um die Progression der synchronisierten Zellen durch die G1-Phase zu dokumentieren, wurde das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein pRb als biochemischer Marker genutzt. Während es sich in der frühen G1-Phase in hypophosphoryliertem Zustand befindet, wird es im Verlauf der G1-Phase in mehreren Schritten an verschiedenen Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Je stärker pRb phosphoryliert ist, desto weiter haben die Zellen die G1-Phase durchschritten. Die Phosphorylierung von pRb nimmt in den Zellen nach Serumstimulation stetig zu (Abb.15, Immunoblot, - PUVA, Kontrolle). Auch nach PUVA-Exposition wird die Phosphorylierung von pRb nicht verhindert. Sowohl die unbehandelten Kontrollzellen, als auch die mit PUVA exponierten HaCaT-Zellen zeigen im Immunoblot eine identisch

fortschreitende Zunahme der Phosphorylierung von pRb. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Progression von G1-Zellen durch PUVA-Exposition unbeeinträchtigt bleibt (Vergleiche Abb.15, – PUVA / + PUVA).

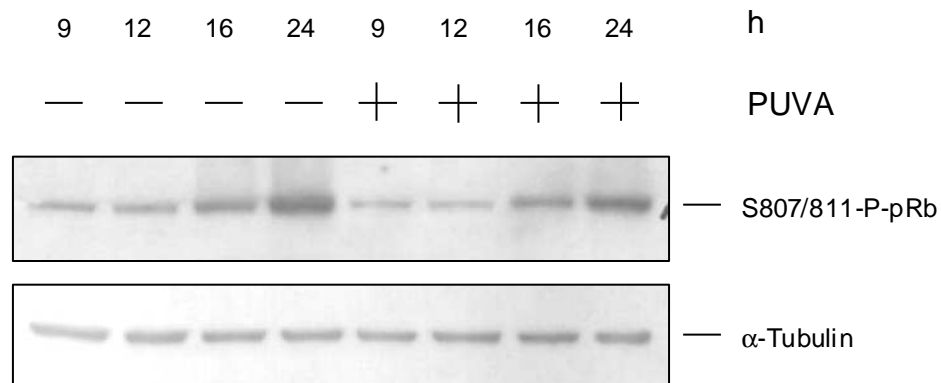


Abb.15: Immunoblot-Analyse der Phosphorylierung von pRb während der Progression durch G1. In parallelen Ansätzen zu den Experimenten von Abb.13b+c wurden Zelllysate gewonnen. pRb wird im Verlauf der G1-Phase sukzessive phosphoryliert. PUVA-Exposition lässt die G1-Progression wie auch die pRb-Phosphorylierung unbeeinträchtigt. Die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben wurde durch die Analyse von α -Tubulin verifiziert, das als Bestandteil des Zytoskeletts ein sogenanntes House-Keeping-Gen darstellt.

In HaCaT-Keratinocyten sind beide Allele des p53-Gens mutiert. Der G1-Checkpoint wird durch das Tumorsuppressorgen p53 vermittelt. Durch Verlust von p53 wird der G1-Checkpoint aufgehoben [66]. Es wäre also denkbar, dass das Fehlen eines G1-Arrests nach PUVA eine spezifische Eigenschaft von HaCaT-Zellen darstellt. Um dies zu überprüfen, sollten die Versuche mit Zellen, die Wildtyp p53 besitzen, kontrolliert werden. Da Keratinocyten unter Zellkulturbedingungen nur wenige Passagen unbeschadet überstehen und zudem nicht zuverlässig zu synchronisieren sind, wählten wir hierzu humane Vorhautfibroblasten. 8 Stunden nach Restimulation wurden Fibroblasten mit PUVA exponiert. Abbildung 16 belegt, dass auch in diesen Zellen kein G1-Arrest durch PUVA induziert wird.

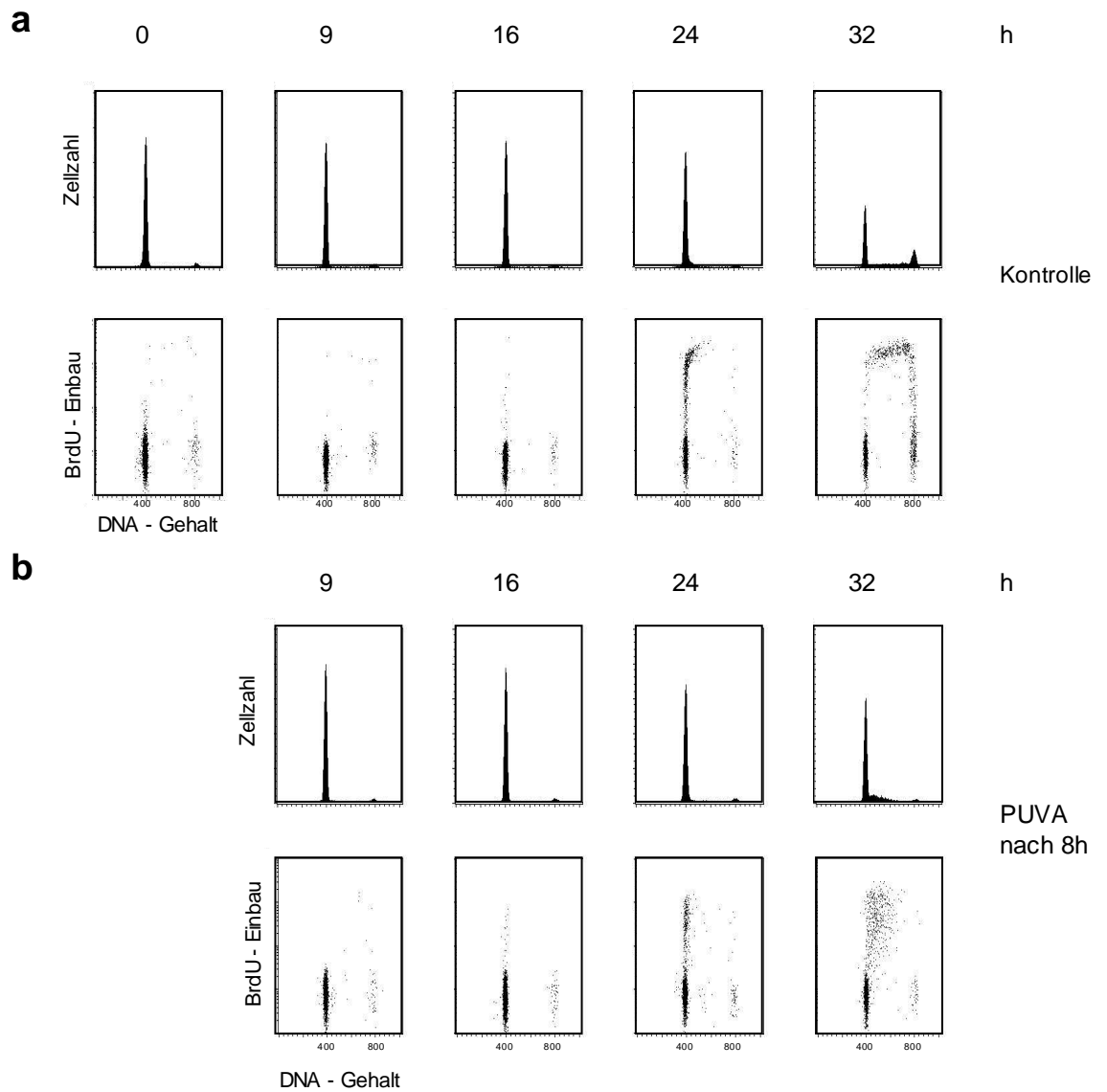


Abb.16: PUVA bewirkt keinen G1-Arrest in normalen diploiden humanen Fibroblasten. Nach 48 Stunden Serumentzug (Spalte 1) wurden Fibroblasten mit 10% FKS restimuliert. 8 Stunden später wurden die Zellen mit PUVA behandelt (**b**) oder blieben unbehandelt (**a**). 15 Minuten vor der Fixierung der Zellen wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten mit BrdU markiert.

2.4 Vermittlung des PUVA-induzierten Replikationsblocks durch ein Koffein-sensitives Signal

Der S-Phase-Arrest der HaCaT-Zellen nach PUVA könnte durch ein Checkpointsignal vermittelt sein, das durch DNA-Schaden oder inkomplette Replikation erzeugt wird. Auch eine rein mechanische Blockierung der DNA-Polymerase an Replikationsgabeln durch DNA-Doppelstrangvernetzungen wäre denkbar. In diesem Fall sollte eine Aufhebung von S-Phase-Checkpointsignalwegen, zum Beispiel durch chemische Hemmung, keinen Einfluss auf den hier beobachteten S-Phase-Arrest haben. Eine solche Hemmung von Checkpoints, die in der S-Phase oder bei DNA-Schäden aktiviert werden, wird durch das Methylxanthin Koffein erreicht. Die am Anfang der Signalkaskaden gelegene Checkpointkinasen ATM und ATR werden durch Koffein gehemmt [54, 65, 115]. Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von Checkpointsignalkaskaden beim PUVA-induzierten S-Phase-Arrest reversibel ist, wurden die Zellen vor der Exposition mit PUVA sowie in den darauffolgenden 12 Stunden mit Koffein inkubiert (Abb.17).

Die meisten Zellen wurden in Abwesenheit von Koffein nach Exposition mit PUVA in der S-Phase festgehalten (Abb.17a). Bei Zugabe von Koffein bei PUVA-Exposition konnten die Zellen hingegen die S-Phase passieren und erreichten nach der Zellteilung die G1-Phase (Abb.17b, BrdU-positive Zellen im oberen linken Quadranten). Dieses Verhalten glich dem von nicht mit PUVA exponierten Kontrollzellen (Abb.17c und d).

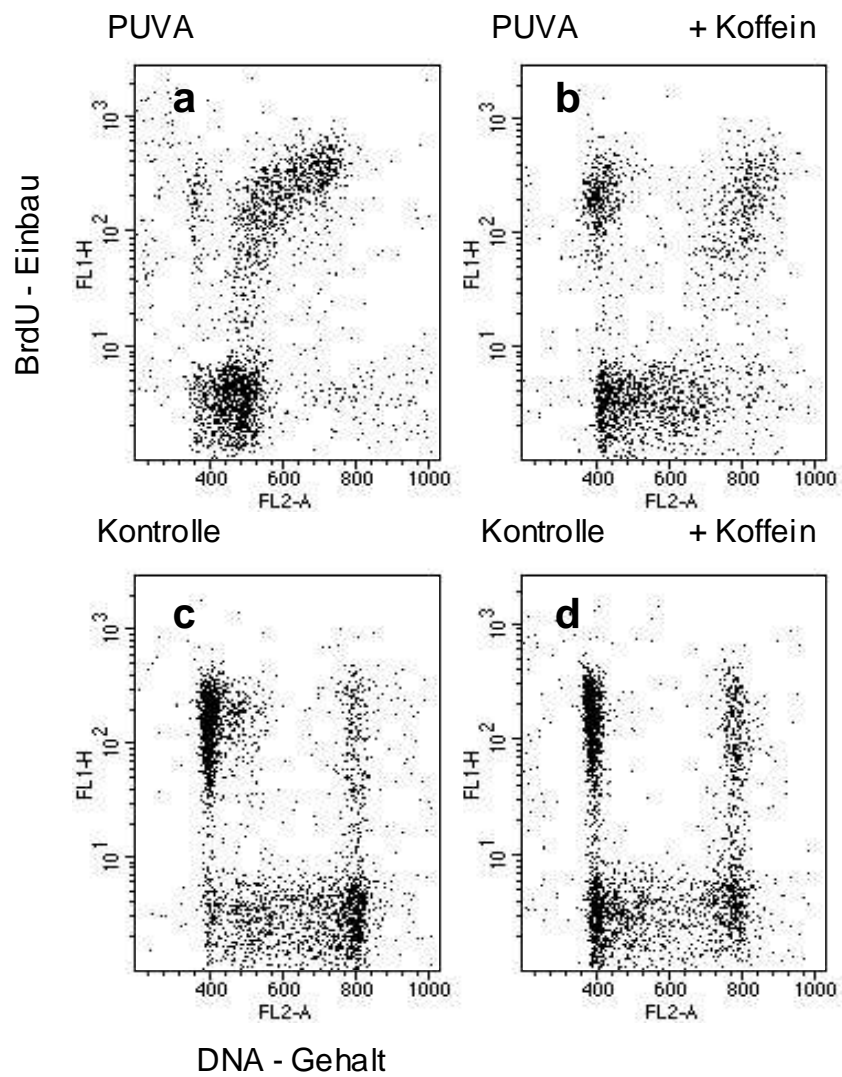


Abb.17: Der PUVA-induzierte S-Phase-Arrest wird durch ein Koffein-sensitives Checkpointsignal vermittelt. HaCaT-Zellen wurden mit BrdU gepulst und vor der Exposition mit PUVA (0,1 μ g/ml 8-MOP, 1,0J/cm² UVA) mit (**b, d**) oder ohne 2 mM Koffein (**a, c**) inkubiert. Die FACS-Analyse erfolgte 12 Stunden später.

2.5 Beteiligung von Chk1 und Cdc25A an dem PUVA-induzierten Replikationsblock

Offensichtlich liegt dem S-Phase-Arrest der HaCaT-Zellen die Aktivierung eines Zellzykluscheckpoints zugrunde. Chk1 ist eine der Checkpointkinasen, die direkt von ATM/ATR phosphoryliert werden [68, 114]. Auslöser für eine Phosphorylierung und Aktivierung von Chk1 sind DNA-Schäden oder inkomplette DNA-Replikation in der S-Phase [68]. Der Phosphorylierungsstatus von Chk1 lässt sich im Immunoblot mittels Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper nachweisen. Es zeigte sich, dass Chk1 nach PUVA-Exposition an Serinrest 345 phosphoryliert wird (Abb.18, Spalten 2 und 7).

Die Gesamtmenge von Chk1 blieb unverändert (Abb.18, Chk1). Die Zunahme der an Serin 345 phosphorylierten Form von Chk1 war bereits 1 Stunde nach PUVA nachzuweisen. Das Auftreten dieser phosphorylierten Chk1-Form bereits nach 1 Stunde spricht für einen aktiv induzierten Phosphorylierungsprozess und gegen einen sekundären Positionseffekt durch Akkumulation von Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen.

Der Übergang von der G1-zur S-Phase wird durch Cdk2 vermittelt. Allosterische Hemmung durch Phosphorylierung an Threonin 14 und Tyrosin 15 führt zur Inaktivierung von Cdk2. Diese inhibitorischen Phosphatreste an Threonin 14 und Tyrosin 15 werden durch Cdc25A wieder entfernt. Die Cdc25A-Phosphatase ist ein direktes Substrat von Phospho-Chk1 in der Signalkaskade des G1/S-Checkpoints. Nach Aktivierung des Checkpoints wird Cdc25A durch Phospho-Chk1 phosphoryliert. In der Folge wird Cdc25A mit Ubiquitinresten konjugiert und destabilisiert. Im Proteasom erfolgt sodann der proteolytische Abbau von Cdc25A. Nach Abnahme von Cdc25A können die inhibitorischen Phosphatreste Threonin 14 und Tyrosin 15 an Cdk2 nicht mehr entfernt werden. Cdk2 verbleibt in seiner inaktiven Form und der S-Phase-Arrest resultiert [17].

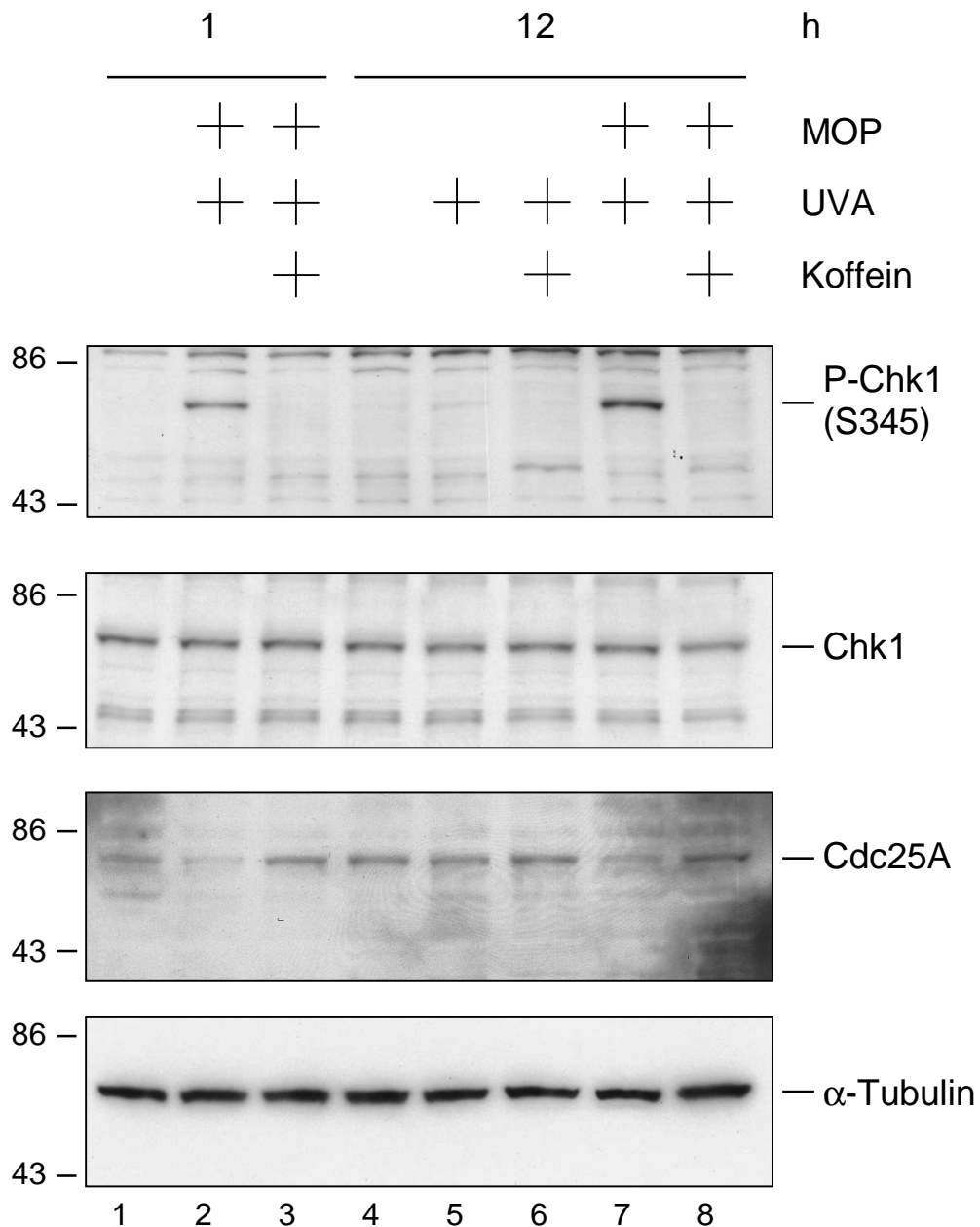


Abb.18: Chk1 und Cdc25A als Effektoren des PUVA-vermittelten Replikationsblocks. HaCaT-Zellen wurden mit oder ohne 2 mM Koffein nach 1 und 12 Stunden PUVA-Exposition (0,1 μ g/ml 8-MOP, 1,0J/cm² UVA) lysiert und die Zellextrakte im Immunoblot analysiert (phosphoryliertes Chk1 (Ser345), Gesamt-Chk1 und Cdc25A, α -Tubulin als Ladekontrolle).

Dies war auch nach der Exposition der Zellen mit PUVA der Fall. Während Chk1 an Serin 345 phosphoryliert wurde, nahm gleichzeitig die Menge an Cdc25A ab (Abb.18, Cdc25A, Spalten 2+7). Zusatz von Koffein zum Zellkulturmedium unterbindet die durch PUVA-induzierte Phosphorylierung von Chk1 und verhindert gleichzeitig den Abbau von Cdc25A (Abb.18, Spalten 3+8).

2.6 Partielle Aufhebung des PUVA-induzierten S-Phase-Blocks durch Cdc25A-Überexpression

Die Induktion des S-Phase-Arrests ging mit der Abnahme von Cdc25A einher. Falls der durch PUVA induzierte S-Phase-Arrest ausschließlich durch den Abbau von Cdc25A vermittelt wäre, sollte eine Überexpression von Cdc25A diesen Arrest wieder aufheben können. Da eine andauernde Cdc25A-Überexpression zytotoxisch ist, wurde eine Rattenfibroblastenzelllinie verwendet, die ein Expressionssystem enthält, mit dessen Hilfe es möglich ist Cdc25A Tetrazyklin-gesteuert zu exprimieren (siehe auch Material und Methoden). Das Cdc25A Protein ist zusätzlich mit einem Flag-Epitop versehen, das als Marker für exogen exprimiertes Protein im Immunoblot dient. Das von Gossen und Bujard [51, 86] entwickelte tTA-Expressionssystem besteht aus zwei Komponenten: Ein erster Vektor kodiert einen Tetrazyklin-Transaktivator (tTA). Der Transaktivator ist ein Fusionsprotein, das aus dem Tetrazyklinrepressor (tetR) von *E. coli* und der Transaktivierungsdomäne des VP16 (Virion Protein 16) aus Herpes-simplex-Virus zusammengesetzt ist. Der zweite Vektor des Expressionssystems enthält das zu induzierende Zielgen (Cdc25A) unter der Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors und des Tetrazyklin-Operators (tetO). In Anwesenheit von Tetrazyklin im Zellkulturmedium kann tTA nicht an den Promotor des Flag-Cdc25A-Vektors binden, sodass die Transkription des Flag-Cdc25A-Gens unterdrückt wird. Wird Tetrazyklin dem Medium entzogen, bindet der Transaktivator tTA an den Promotor und die Transkription des abwärts gelegenen Cdc25A-Gens kann erfolgen (siehe Abb.19).

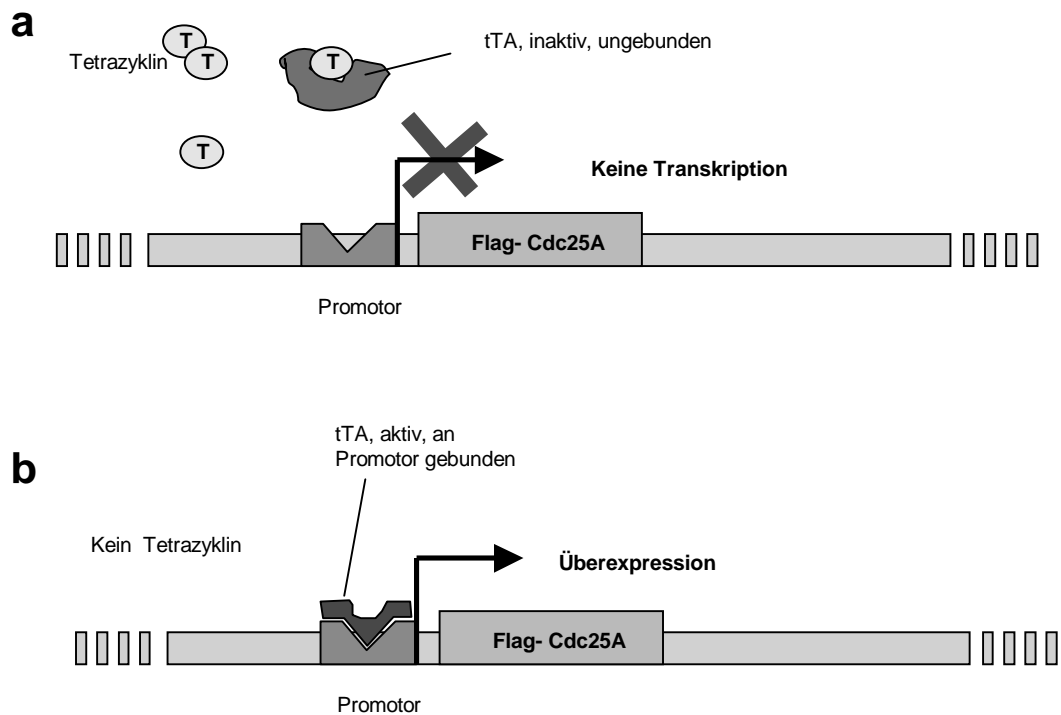


Abb.19: Regulation der Cdc25A-Überexpression in einer Rattenfibroblastenzelllinie durch Tetracyclin-kontrollierte Aktivierung der Transkription. Der Transaktivator tTA kann unter dem Einfluss von Tetracyclin nicht an den Promotor binden **(a)**. Erst in Abwesenheit von Tetracyclin erfolgt die Transkription des Zielgens Cdc25A **(b)**.

Die Zellen wurden - wenn nicht anders angegeben - in Medium kultiviert, das 10µg/ml Tetracyclin enthielt zur Unterdrückung der Cdc25A-Überexpression. Da möglicherweise bereits auch kleinste Tetracyclin-Spuren eine Induktion der Flag-Cdc25A-Expression unterdrücken könnten, wurden zur Induktion der Überexpression die Zellen mit PBS-Pufferlösung gewaschen und danach mit einem Tetracyclin-freiem Medium inkubiert. 24 Stunden nach Tetracyclin-freier Inkubation zeigten die Zellen eine starke Induktion der Flag-Cdc25A-Expression (siehe Abb.20).

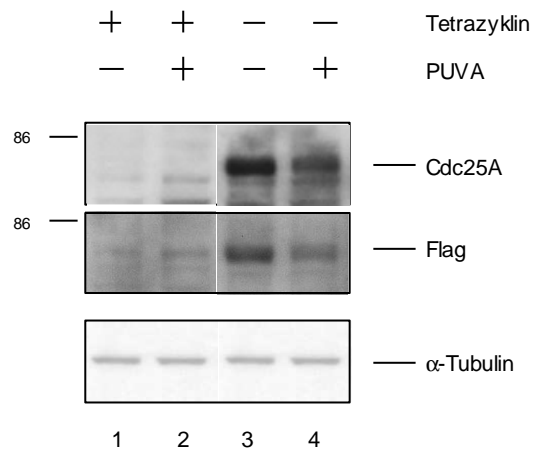


Abb.20: Überexpression von Flag-gekoppeltem Cdc25A in Rattenfibroblasten unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren Promotors. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Wachstum in Gegenwart (Promotor unterdrückt) oder Abwesenheit (Promotor aktiviert) von 10 μ g/ml Tetrazyklin mit PUVA exponiert (Spalten 2 und 4) oder blieben unbehandelt (Spalten 1 und 3). Die Induktion des exogenen Cdc25A (anti-Flag) wurde unabhängig von der endogenen Cdc25A-Expression im Immunoblot durch Antikörper differenziert, die gegen das Flag-Epitop gerichtet sind. α -Tubulin als Ladekontrolle.

Das exogene Flag-Cdc25A wurde in wesentlich höheren Spiegeln als das endogene Cdc25A exprimiert. PUVA-Exposition der Zellen führte nicht nur zur Abnahme des endogenen Cdc25A (Abb.18, Spalten 2+7), sondern auch des exogenen Cdc25A (Abb.20, Spalte 4). Die Überexpression war allerdings so stark, dass auch nach PUVA Cdc25A-Protein in den Zellextrakten nachzuweisen war. Die Cdc25A überexprimierenden Zellen wurden durch PUVA-Exposition nicht mehr länger am Anfang der S-Phase festgehalten, sondern durchliefen die S-Phase etwa bis zur Hälfte (siehe Abb.21, Spalte 4). Im Unterschied zur kompletten Aufhebung des S-Phase-Blocks durch Koffein war die Aufhebung des Arrests durch Cdc25A nur unvollständig, denn die Zellen befanden sich 12 Stunden nach PUVA-Exposition noch in der S-Phase. Sie hatten die Zellteilung nicht durchlaufen und die G1-Phase nicht erreicht (Abb.21, Spalte 4).

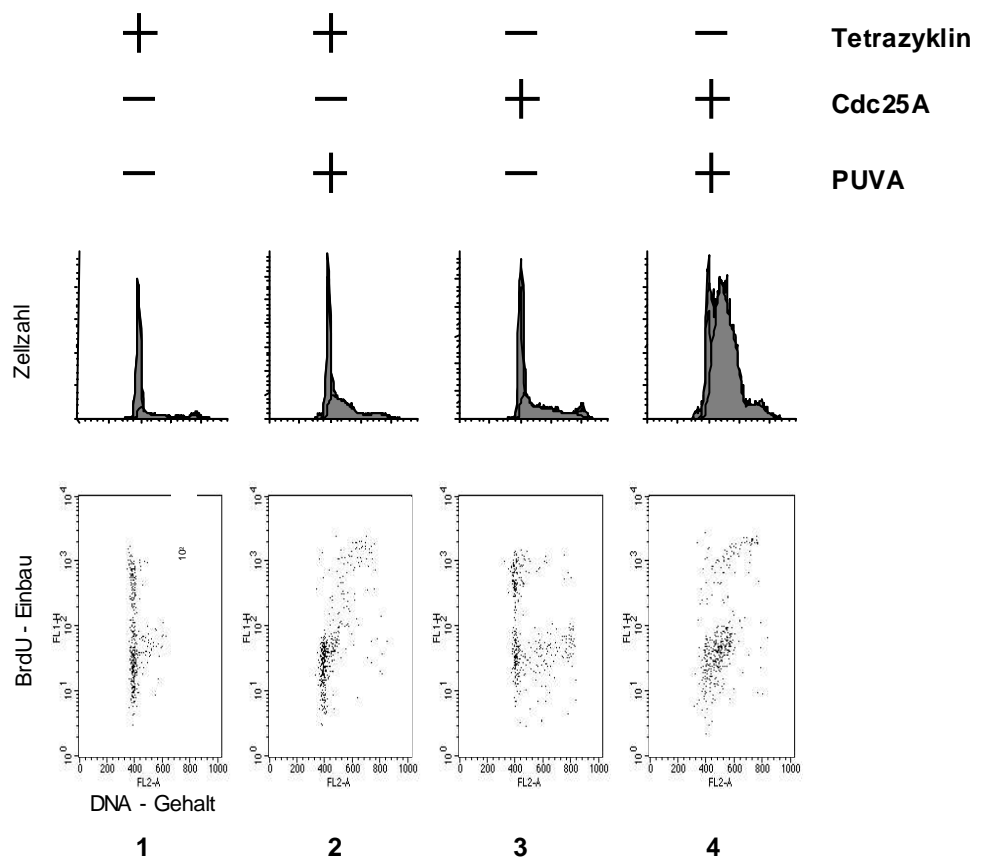


Abb.21: Überexpression von exogenem Cdc25A führt nur zu einer partiellen Aufhebung des PUVA-induzierten Replikationsblocks. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Inkubation in Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin (Promotor unterdrückt) oder ohne Tetrazyklin (Promoter aktiviert) mit PUVA exponiert (Spalten 2 und 4). Die Kontrollzellen wurden nicht mit PUVA exponiert (Spalten 1 und 3). Die Zellen wurden nach 12 Stunden mittels FACS analysiert.

Vermutlich ist die Abnahme von Cdc25A nach PUVA-Exposition ein notwendiges, jedoch nicht allein bestimmendes und ausreichendes Ereignis, um den PUVA-induzierten S-Phase-Arrest auszubilden. Es ist wahrscheinlich, dass noch weitere, koffein-empfindliche Signalwege existieren, die parallel zur Chk1/Cdc25A-Achse den S-Phase-Arrest ausbilden können.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird der Nachweis erbracht, dass die Exposition mit PUVA HaCaT-Keratinocyten in verschiedenen Stadien der S-Phase arretiert. Der Arrest der Zellen war ausschließlich auf die S-Phase beschränkt, denn sowohl ein Arrest in der G2- als auch in der G1-Phase konnte ausgeschlossen werden. Der PUVA-induzierte S-Phase-Arrest ging einher mit der Phosphorylierung und Aktivierung von Chk1, die mit einer gleichzeitigen Abnahme der Phosphatase Cdc25A verbunden war. Durch Überexpression von Cdc25A konnte eine teilweise Aufhebung des S-Phaseblocks erzielt werden. Das Methylxanthin Koffein war in der Lage, den S-Phase-Arrest vollständig aufzuheben. Diese Ergebnisse belegen, dass PUVA ein Signal für die Aktivierung von aktiven Checkpointkaskaden induziert und eine rein mechanische Blockierung von Replikationsgabeln allein keine ausreichende Erklärung für den S-Phase-Arrest ist.

Das Ausbleiben eines G2/M-Arrests nach PUVA war unerwartet, denn Experimente verschiedener Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung einen G2/M-Arrest auslösen [59, 71, 75, 106]. Bei dem Auftreten von Zellen mit 4n-DNA-Gehalt nach niedrigen PUVA-Dosen ging man bisher von einem G2-Arrest aus, ohne die Möglichkeit eines späten S-Phase-Arrests zu berücksichtigen [26, 111]. Akkari et al. zeigten erstmals an durch Mimosin synchronisierten Zellen, dass durch PUVA induzierte Doppelstrangvernetzungen einen S-Phase-, jedoch keinen G2-Block verursachten [2]. Wahrscheinlich jedoch beeinflusst bereits die Synchronisation der Zellen durch Mimosin die Aktivierung von Checkpoints. Deshalb waren wir bemüht Synchronisationsprotokolle für die Untersuchung von Checkpoints soweit als möglich zu vermeiden.

In erster Linie führen DNA-Doppelstrangbrüche zur Aktivierung des G2/M-Checkpoints, da sie zu fehlerhafter Chromosomenverteilung während der Mitose führen können. Im Unterschied zu ionisierender Strahlung verursacht PUVA nicht direkt DNA-Doppelstrangbrüche. Möglicherweise

führt jedoch die Reparatur von DNA-Doppelstrangvernetzungen zu Doppelstrangbrüchen. Im Modellsystem Hefe konnte gezeigt werden, dass Doppelstrangvernetzungen durch homologe Rekombination behoben werden. Dabei besteht eine erhöhte Gefahr von Doppelstrangbrüchen [63, 72]. Homologe Rekombinationsvorgänge nehmen in Säugetierzellen nach Einwirkung von Noxen zu, die zu Doppelstrangvernetzung führen. In den Zellen, die in der G2-Phase mit PUVA exponiert worden waren, konnten jedoch in unseren Experimenten während der Mitose keine Anzeichen für Chromosomenbrüche gefunden werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass solche homologen Reparaturvorgänge zwar in den übrigen Phasen des Zellzyklus, nicht aber in der G2-Phase stattfinden [2]. Schätzungsweise werden 11 Doppelstrangvernetzungen pro Stunde im Genom repariert. Diese Geschwindigkeit erscheint im Vergleich zu den etwa 96000 Doppelstrangvernetzungen pro Genom, die durch 1J/cm² UVA/0.1 µg/ml 8-MOP verursacht werden müssten, gering [52]. Der fehlende Nachweis von nennenswertem Auftreten von Doppelstrangbrüchen könnte also sowohl durch das komplette Fehlen von Rekombinations-reparaturvorgängen in der G2-Phase, als auch durch die langsame Geschwindigkeit dieser Reparaturvorgänge erklärt werden. Denkbar ist auch, dass die durch PUVA verursachten Doppelstrangvernetzungen im Gegensatz zu Platinverbindungen und Stickstofflost, nur eine geringere Verwindung der DNA-Doppelhelix bewirken und deshalb eine Checkpointantwort außerhalb der S-Phase ausbleibt [34].

DNA-Replikation wird in eukaryotischen Zellen in einer genau festgelegten Reihenfolge von vielen Initiationspunkten (engl. Origins) eingeleitet [31]. Die Behinderung der DNA-Polymerase an Replikationsgabeln durch DNA-Doppelstrangvernetzungen führt zum Abbruch der DNA-Synthese am zugehörigen Replikationsorigin. Die Zahl der DNA-Doppelstrangvernetzungen nimmt bei konstanter 8-MOP-Konzentration linear mit der applizierten UVA-Dosis zu [44-48, 107, 111]. Deshalb sollte mit der Zunahme der Doppelstrangvernetzungen die DNA-Synthese fortschreitend gehemmt werden. Die DNA-Synthese käme zum Erliegen, wenn schließlich die Anzahl der Doppelstrangvernetzungen die Zahl der

Replikationsorigins überstiege. Schätzungen zufolge war dies bei den Experimenten aber nicht der Fall, denn 1 J/cm^2 UVA/0,1 $\mu\text{g/ml}$ 8-MOP führt zu etwa 1,6 DNA-Doppelstrangvernetzungen/1000 Basenpaare, während ungefähr 5 Origins pro 1000 Basenpaare im menschlichen Genom vermutet werden [55]. Außerdem wird die Zahl der relevanten Doppelstrangvernetzungen noch geringer sein, da sie sich zum Teil in Bereichen der DNA befinden, in denen die Replikation bereits stattgefunden hat.

Gegen einen rein mechanischen Block der DNA-Polymerasen spricht aber vor allem die Tatsache, dass der durch PUVA induzierte Replikationsarrest durch Koffein vollständig aufgehoben werden kann. Viele der Checkpoints für Replikationsfehler und DNA-Schäden werden durch Koffein beeinflusst, wodurch die Zellen auch bei vorliegenden Schäden durch die Zellzyklusphasen voranschreiten [19, 20, 93]. Die Kinasen ATM und ATR werden in vivo von Koffein gehemmt [11, 54]. ATM und ATR sind übergeordnete Regulatoren der Chk1- und Chk2-Kinasen. Nach Überexpression eines dominant-negativen ATR-Proteins in humanen Zellen wird Chk1 nicht mehr phosphoryliert [68]. Durch ATR-Depletion in *Xenopus*-Extrakten fehlt die Chk1-Phosphorylierung, und der Zellzyklusarrest nach Hydroxharnstoff oder UVC wird aufgehoben [53, 58]. Koffein vermag nicht nur die Chk1-Phosphorylierung nach PUVA-Exposition aufzuheben, sondern auch die Chk1-Phosphorylierung nach Exposition mit UVC oder dem Replikationsinhibitor Hydroxyharnstoff [38, 73, 77]. Wie es bei PUVA der Fall ist, bewirkt auch die Exposition mit UVC und Hydroxyharnstoff eine schnelle Abnahme von Cdc25A. Umgekehrt ermöglicht die Überexpression von Cdc25A den Eintritt der Zellen in die S-Phase [12, 97]. Die Cdc25A-Überexpression beeinflusst auch den Replikationscheckpoint, der durch Harnstoff ausgelöst wird, und verursacht die vorzeitige Kondensation von Chromosomen [77]. Die Überexpression von Cdc25A konnte in unseren Experimenten den durch PUVA verursachten S-Phase-Arrest zum Teil aufheben. Im Vergleich zu Koffein war diese Aufhebung durch Cdc25A allerdings nicht vollständig. Die Zellen konnten die S-Phase etwa nur zur Hälfte passieren. Aus diesen Beobachtungen leitet sich die Vermutung ab, dass die Abnahme von

Cdc25A ein notwendiges Ereignis ist, jedoch nicht die einzige Ursache für die Ausbildung des PUVA-induzierten S-Phase-Arrests. Wahrscheinlich existieren und kooperieren noch weitere, Koffein-sensible Signalwege parallel zu dem von ATR vermittelten. Falck und Mitarbeiter lieferten einen Hinweis für einen ATM-abhängigen Signalweg, der über den Nbs1/Mre11/Rad50-Komplex verläuft [37].

In Säugetierzellen konnte nachgewiesen werden, dass Chk1 an den ATR-Signalweg geknüpft ist und nach Hemmung der Replikation und UV-induzierten Schäden durch ATR modifiziert wird. Hingegen wird die Chk2-Kinase bevorzugt durch ATM aktiviert als Antwort auf ionisierende Strahlung. Auch gibt es Hinweise, dass die ATR-Chk1- und ATM-Chk2-Signalwege nicht allein zwei parallele Arme in der Antwort auf DNA-Schädigung sind, sondern miteinander kommunizieren [49]. Nbs1 scheint zum Beispiel auch für die Phosphorylierung von Chk1 notwendig zu sein.

Die Existenz eines DNA-Replikationscheckpoints in Säugetierzellen wurde erstmalig durch Zellfusionsexperimente belegt. Die Fusion von S-Phasezellen mit G2-Zellen verzögert den Eintritt in die Mitose, weswegen man vermutete, dass DNA-Replikation aktive Signale induziert, die ein weiteres Voranschreiten der Zellen verhindern [89]. Die Schädigung der DNA während der S-Phase durch ionisierende Strahlung verhindert sowohl die Initiierung der Replikation, als auch die Kettenverlängerung der Replikation. Verlust von funktionellem ATM führt in Zellen zu Defekten dieses Checkpoints und sie setzen trotz DNA-Schäden die DNA-Synthese fort (Radio-resistent DNA Synthesis = RDS) [84]. Die strahlungsresistente DNA-Synthese wird durch den ATM-Chk2/Cds1-Cdc25A-Signalweg verhindert, wobei Chk1 nicht beteiligt ist [36]. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass die Antwort auf Replikationsblocks, z. B. durch Hydroxyharnstoff zwar sensibel für Koffein, jedoch von ATM unabhängig ist. Hinzu kommt, dass die Wiederaufnahme der DNA-Synthese nach Aufhebung des Replikationsblocks einhergeht mit der Chk1-Inaktivierung, nicht aber mit der Inaktivierung von Chk2 [24]. Wahrscheinlich werden durch DNA-Schäden und Hemmungen der Replikation während der S-Phase unterschiedliche Checkpointsignale erzeugt. Hierbei erzeugen

bereits einige wenige blockierte Replikationsgabeln ein Checkpointsignal, das den Stillstand der übrigen Replikation bewirkt.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen machen: Der Zellzyklusarrest, der durch PUVA induziert wird, hat die Eigenschaften eines echten Replikationscheckpoints: Er ist beschränkt auf die S-Phase, ist Koffein-sensibel und involviert die Phosphorylierung von Chk1. Die Aktivierung des Replikationscheckpoints wird vermutlich durch folgenden Signalweg vermittelt:

Durch Psoralen/DNA-Doppelstrangvernetzungen wird die DNA-Polymerase während der Replikation aufgehalten. Dies verursacht eine schnelle Kaskade von Phosphorylierungsereignissen, in der ATR (möglicherweise auch ATM) und Chk1 beteiligt sind. ATR (und ATM) wird aktiviert, was zur Phosphorylierung und Aktivierung von Chk1 führt. Ein wesentlicher Schritt dieser Signalkaskade ist die Phosphorylierung der Cdc25A-Phosphatase durch Chk1. Die Ubiquitinierung der Cdc25A-Phosphatase und deren nachfolgender Abbau durch das Proteasom ist die Folge. In Abwesenheit der Cdc25A-Phosphatase bleibt die Cdk2-Kinase durch die inhibitorischen Phosphorylierungen an Threonin 14 und Tyrosin 15 in ihrer inaktiven Form (siehe Abb.22). Die Hemmung des CyclinE/Cdk2-vermittelten S-Phaseeintritts erfolgt, und die schnelle Blockade der Initiierung der DNA Replikations-Origins ist die Folge (siehe Abb.22).

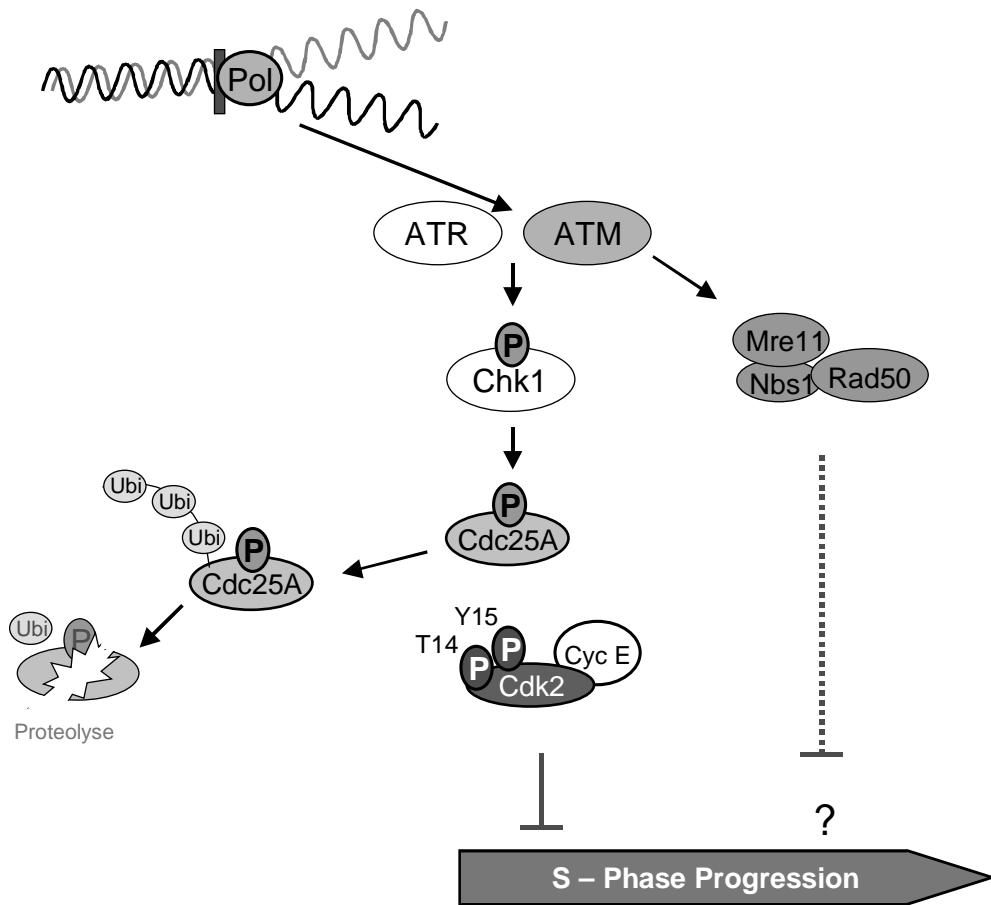


Abb.22: Schematisches vereinfachtes Modell von der Aktivierung des Replikations-Checkpoints durch PUVA.

Mit der Entdeckung der Cdks als potentieller molekularer Zielstrukturen bei der Therapie von proliferativen Erkrankungen verbindet sich die Hoffnung auf Entwicklung neuer Therapieansätze. Die Wirkung der meisten bislang angewendeten anti-proliferativen Therapien durch ionisierende oder ultraviolette Strahlung oder durch Zytostatika beruht auf Zellschädigungen, die Stresssignale in den Zellen auslösen. Die Zellen werden indirekt durch Apoptose oder Zellzyklusarrest in ihrem Wachstum gehindert. Gerade im Hinblick auf die zahlreichen und folgenschweren Nebenwirkungen dieser zytotoxischen Therapien, wie Haarausfall, Entzündungen der Schleimhäute, Schädigung der Keimzellen und des Knochenmarks oder der Entstehung von Tumoren als Langzeitfolge, wäre eine direkte Beeinflussung der Zellzykluskontrolle ohne Schädigung der

gesunden Zellen von großem Vorteil. Einen möglichen Therapieansatz stellen die niedermolekularen pharmakologischen Cdk-Inhibitoren dar, von denen einige bereits für klinische Studien zugelassen wurden. Zu den etwa 50 der bisher bekannten Cdk-Inhibitoren, die sich zum Teil jedoch erheblich in ihrer Spezifität für die einzelnen Cdks unterscheiden, gehören Flavopiridol und 7-Hydroxystauroporin (UCN-01). Auch wenn UCN-01 als Cdk2-Inhibitor einwickelt wurde, hemmt es *in vitro* relativ unspezifisch auch andere Cdks. Zudem zeigte sich *in vivo*, dass UCN-01 auch Zellzykluscheckpoints aufhebt. Diese scheinbar gegensätzliche Wirkung ist dadurch zu erklären, dass UCN-01 zusätzlich die Aktivierung von Chk1 verhindert [102]. Diese Entdeckung hat dazu geführt, dass UCN-01 nun auch in klinischen Studien mit der Zielsetzung eingesetzt wird, Tumoren für antineoplastische Radio- oder Chemotherapien zu sensibilisieren [94, 95, 109]. Die komplexen Auswirkungen von pharmakologischen Modulationen der Checkpoints werden durch jüngste Arbeiten belegt, die zeigen, dass eine Hemmung von Chk1 per se durch UCN-01 zu einer massiven Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in menschlichen S-Phasezellen führt. Dies zeigt, dass eine sorgsame Prüfung von neu entwickelten Wirkstoffen vonnöten ist, damit eine klinische Anwendung von Chk1-Inhibitoren beispielsweise für die Therapie von Tumoren möglich wird [102].

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

HaCaT-Keratinocyten wurden freundlicherweise von Professor Dr. N. Fusenig zur Verfügung gestellt [15, 16, 42].

Eine Rattenfibroblasten-Zelllinie, die die Tetrazyklin-regulierbare Expression eines an ein Flag-Epitop gekoppelten Cdc25A-Proteins erlaubt, wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Ingrid Hoffman zur Verfügung gestellt [12].

Humane Fibroblasten wurden aus Vorhäuten isoliert, die bei elektiven Zirkumzisionen gewonnen wurden.

4.1.2 Zellkulturmedien

Standard-Zellkulturmedium DMEM 10% FKS

Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM, PAA)		
10	%	Fötale Kälberserum, FKS (PAA oder Clontech)
2	mM	L-Glutamin (Gibco)
5	ml	Penicillin/Streptomycin (100x, PAA)

4.1.3 Pufferlösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4		
137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,05% EDTA, pH 7,4		
137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
250	mg/500 ml PBS	EDTA

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4			
25	mM	Tris-Cl	(pH 7,4)
149	mM	NaCl	

RIPA-Puffer für die Zellyse			
50	mM	Tris-Cl	pH 7,5
150	mM	NaCl	
0,1	%	SDS	
1	%	Deoxycholat (DOC)	
1	%	Triton X-100	

2x Ladepuffer für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese		
100	mM	Tris-Cl, pH 6,8
200	mM	Dithiotreitol (DTT)
4	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,2	%	Bromphenolblau
20	%	Glycerol

10x SDS-Elektrophoresepuffer (Laemmli)		
250	mM	Tris-Cl
2,5	M	Glycin
1	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)

Amidoschwarz-Lösung 0,1%		
45	%	Methanol
10	%	Eisessig (CH ₃ -COOH)
ad 1 Liter mit aqua bidest.		

Amidoschwarzentfärbelösung		
90	%	Methanol
2	%	Eisessig HAc
ad 1 Liter mit aqua bidest.		

Stripping-Puffer		
62,5	mM	Tris, pH 6,8
2	mM	SDS
7	µl	β-Mercaptoethanol

FACS-Puffer		
0,1	%	Rinderserumalbumin (BSA)
0,05	%	Tween 20
in PBS		

Semi-Dry Transferpuffer		
48	mM	Tris-Cl, pH 9,2
39	mM	Glycin
0,037	%	SDS
20	%	Methanol

4.1.4 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad Laboratories
Amidoblack 10 B	Bio-Rad Laboratories
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories
Blasticidin	Invitrogen
Borat	Merck
BrdU (5'-bromo-2'-deoxy-uridin)	Boehringer
Bromphenolblau	Serva
BSA Albumin bovine Frakt.V	Sigma
Koffein	Sigma
Complete TM mini Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics
DAPI (4,6,-diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid)	Sigma
Dc Protein Assay Reagent A	Bio-Rad
Dc Protein Assay Reagent B	Bio-Rad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DTT (Dithiothreitol)	Sigma
ECL Westernblotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech
Eisessig (CH ₃ -COOH)	Merck
Ethylendiamin-tetra acetic acid (EDTA)	Sigma
Ethanol	Roth
Geneticin G418	GibcoBRL Life Technologies
L-Glutamin 100x	PAA
Glycerol	Sigma
Glycin	ICN Biomedicals
HCl	Merck
Hygromycin	Calbiochem
KCl	Merck
Kaleidoscope-Marker	BioRad
K ₂ HPO ₄	Merck

Methanol	Merck
8-MOP (8-Methoxypsoralen)	Sigma
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Natriumfluorid	Fluka Chemie
Penicillin/Streptomycin	PAA
Pepsin, aus Schweinemagenmukosa	Sigma
Propidiumjodid (PI)	Fluka
Puromycin-HCl	Fluka
Gentamicinsulfat (Refobacin [®])	Merck
RNAse A (Ribonuclease A)	Sigma
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva
Streptomycin	Merck
Tetrazyklin-HCl	Sigma
Tris-Base	Sigma
Trypsin (0,025%)/EDTA(1mM)	PAA
Tween 20	Merck

Medien und Medienzusätze zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA
Fötales Kälberserum (FKS)	Clontech

Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten, 12,5x12,5x4,5 mm	Plastibrand
PVDF-Immobilon-P-Transfer-Membran	Millipore
Röntgenfilm	Fuji
Whatman 3 mm Filterpapier	Merck

Zellkulturschalen	TPP
Zellkulturlochplatten 6-, 24- well	TPP
Zellschaber	Fisher Scientific

Geräte

CO ₂ -Inkubator	Heræus Instruments
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Heizblock Blockthermostat	HLC, Scientific Plastics
Heizblock	Kika Labortechnik
Hybridisierungssofen	Hybaid
Mikroskop, invers Axiovert 25	Zeiss
Neubauerkammer	Karl Hecht Glaswarenfabrik
Spectrophotometer UV-1202	Shimadzu
Pipettierhilfe Power Pac 1000	BioRad
Schwenktisch Polymax 2040	Heidolph
Sterilwerkbank LaminAir	Heræus Instruments
Tischzentrifuge Centrifuge 5410	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heræus Instruments
Standzentrifuge Megafuge 2.0R	Heræus Instruments
Ultraschallhomogenisatorsonde	Kika Labortechnik
UVA-Lampe PUVA 200	Waldmann
UVB-Lampe TL20/12	Philips
Vortex Genie2	Scientific Industries
Wasserstrahlpumpe Handy Aspirator WP-15	Yamato

4.1.5 Antikörper

Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierter anti-Bromodeoxyuridin-Antikörper	Becton Dickinson
anti-Phospho-Chk1 (Ser345)-Antikörper	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-pRb (Ser807/811)-Antikörper	Cell Signaling Technology
anti-Cdc25A-Antikörper	Santa Cruz
anti-Chk1-Antikörper	Santa Cruz
anti-Chk2-Antikörper	Santa Cruz
anti-Phospho-Chk2-Antikörper (Thr68)	Cell Signaling Technology
anti- α -Tubulin Antikörper	Sigma-Aldrich
anti-Flag-M5 Monoclonal Antibody	Sigma-Aldrich

Meerrettich-Peroxydase-konjugierte sekundäre Antikörper

anti-Rabbit IgG HRP Conjugate	Promega
anti-Mouse IgG HRP Conjugate	Promega

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Zellkultur und Subkultivierung (Passagierung):

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen in DMEM mit 10% FKS in einem Zellkulturbrutschrank bei 37°C und wassergesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Waren die Zellen zu etwa 70% konfluent, wurden sie zweimal mit warmem PBS gewaschen, um FKS-Rückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 0,025 %iger Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert. HaCaT Zellen wurden zusätzlich mit PBS-EDTA 0,05% für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor die Zellen nach Trypsininkubation bei 37°C und Losklopfen von der Zellkulturschale abgelöst wurden. Der Trypsinverdau wurde mit FKS-haltigem DMEM gestoppt. Nach Abzentrifugieren bei 1400U/min für 8 min wurde der Überstand abgesaugt und der Bodensatz (Pellet) mit den Zellen in Medium resuspendiert.

4.2.1.2 Kultur von HaCaT-Zellen

Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um eine spontan immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie, die aus der Haut eines Erwachsenen isoliert wurde. Das Akronym „HaCaT“ setzt sich aus den Abkürzungen der Ursprungszellen (Human aadult) und den Kulturbedingungen, einer vergleichsweise hohen Temperatur von 38,5 °C (Temperature) in Kombination mit einer niedrigen Calciumkonzentration (Calcium) des Kulturmediums, zusammen, unter denen die Immortalisierung stattgefunden hatte. Auch wenn die Immortalisierung der HaCaT-Keratinozyten u.a. auf Mutationen in beiden Allelen des p53-Gens und dem Verlust verschiedener Seneszenzgene zurückzuführen ist, handelt es sich um eine nicht tumorigene und in Tiermodellen nicht metastasierende Zelllinie mit stabiler epithelialer Differenzierung. HaCaT Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS kultiviert, bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre. Zur

Passagierung wurden die adhären wachsenden HaCaT-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend für 10 Minuten mit verdünnter EDTA-Lösung bei 37°C vorinkubiert, um dann mit Trypsin-EDTA-Lösung über 3-5 Minuten von der Kulturschale abgelöst zu werden.

4.2.1.3 Kultur von Cdc25A-überexprimierenden Rattenfibroblasten

Da konstitutive Cdc25A-Expression zytotoxisch ist, wurde eine Fibroblastenzelllinie, R12-Rattenfibroblasten, verwendet, die die induzierbare Expression von Cdc25A mit Hilfe des von Gossen und Bujard entwickelten tTA-Expressionssystems erlaubt. Dieses System setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einem Vektor, der den Tetrazyklin-Transaktivator (tTA) exprimiert, einem Fusionsprotein bestehend aus dem Tetrazyklinrepressor und der Transaktivierungsdomäne des VP16 aus Herpes-simplex-Virus, und aus einem zweiten Vektor, der das zu induzierende Gen (Cdc25A) enthält, das unter der Kontrolle eines Minimalpromotors und des Tetrazyklin-Operators steht. In Gegenwart von Tetrazyklin kann der tTA nicht an den Promotor des zweiten Vektors binden. Entzug von Tetrazyklin führt zur Bindung des Transaktivators tTA an den Promotor und zur Aktivierung der Transkription des abwärts gelegenen Gens Cdc25A durch die VP16-Domäne.

Zusätzlich ist das hier exprimierte Cdc25A-Protein am N-Terminus mit einem Flag-Epitop versehen, einer kurzen Peptidsequenz von 9 Aminosäuren, die als Marker in der Westernblotanalyse fungiert zum Nachweis der Expression des exogenen Cdc25A-Gens.

Cdc25A-Fibroblasten wurden in DMEM mit 10% FKS bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Dem Medium wurden 10 µg/ml Tetrazyklin sowie die Selektionsantibiotika G418 (Geneticin, 600µg/ml, Gibco) und Hygromycin B (150µg/ml, Calbiochem) zugesetzt. Die Zellen ließen sich durch zweimaliges Waschen mit warmem PBS und Inkubation mit 0,025%iger Trypsin/EDTA-Lösung über 6-8 Minuten von der Kulturschale loslösen.

4.2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Nach Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde die Trypsinaktivität mit FKS-haltigem DMEM abgestoppt, und die Zellen wurden bei 4°C in einer Heræus-Zentrifuge bei 1400U/min abzentrifugiert. Einfriermedium für HaCaT Zellen und Fibroblasten war fötales Kälberserum (FKS), bei R12-Cdc25A-Zellen konditioniertes Einfriermedium, jeweils mit Zusatz von 10% DMSO, das die Eiskristallbildung des Wassers beim Einfrieren verhindert. Die Kryoröhrchen mit den Zellen werden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß langsam auf –80°C gekühlt, danach in flüssigem Stickstoff bei –195,8°C aufbewahrt.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte durch rasches Vermengen mit warmem Medium mit Hilfe einer Pipette. Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturschale mit Medium gegeben. Im Brutschrank wurden sie alsdann auf einem Nivelliertisch waagrecht platziert. Sobald die Zellen an der Zellkulturschale anhafteten wurde das DMSO-enhaltende Medium durch frisches DMEM mit den o.g. Zusätzen ersetzt.

4.2.1.5 Konditioniertes Medium

24 Stunden vor Loslösen der Zellen wurde das Medium von den Zellkulturschalen abgesaugt und durch frisches DMEM mit 10% FKS ersetzt. Den Cdc25A-Rattenfibroblasten wurde zusätzlich Tetrazyklin (10µg/ml) zugesetzt. Vor Passagierung wurde das überstehende Medium abgesaugt und aufbewahrt. Um konditioniertes Einfriermedium herzustellen, wurde zu gleichen Teilen konditioniertes DMEM mit frischem DMEM vermengt und 10% DMSO zugegeben.

4.2.1.6 Zellzählungen

Zellzählungen wurden in einer Neubauerkammer durchgeführt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde durch Auszählung von 4 großen Quadraten ermittelt.

4.2.2 Bestrahlung der Zellen

Für die Versuche wurden die Zellen 24 Stunden vor den UV-Bestrahlungen in 10 cm Schalen ausgesät.

Vor der Bestrahlung mit UVB wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und für die Bestrahlung mit einer 1 mm dünnen PBS-Schicht bedeckt. Die Bestrahlung im UVB-Spektralbereich erfolgte unter drei parallel angeordneten Philips TL20/12 Fluoreszenzröhren in einem Abstand von 45 cm. Deren beinahe kontinuierliches Spektrum umfasst einen Bereich von 280 nm bis 320 nm mit einem Maximum bei 312 nm. Die UVB-Dosis wurde aus dem Produkt aus Bestrahlungsintensität (Joule/cm^2) und der Bestrahlungszeit (Sekunden) errechnet. Die Bestrahlungsintensität wurde mit einem Hand-UV-Meter der Firma Waldmann bestimmt.

Wurden die Zellen mit PUVA behandelt, erfolgte nach zweimaligem Waschen mit warmem PBS eine 20-minütige Inkubation mit 8-Methoxypsoralen (8-MOP 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, Schichtdicke 1mm). Die UVA-Bestrahlung erfolgte mit einem UVA-Teilkörperbestrahlungsgerät (PUVA 200, Firma Waldmann), das mit 14 parallel angeordneten Sylvania F8T5 Fluoreszenzröhren ausgerüstet war, die ein UVA-Breitspektrum emittieren. Nach Verabreichung der UVA-Dosis wurde die 8-MOP-Lösung wieder durch Zellkulturmedium ersetzt. Die UVA-Dosis wurde ebenfalls mit Hilfe des UV-Meters bestimmt. Dabei überschritt die Temperatur des Bestrahlungspuffers bei einer Dosis von bis zu 3 J/cm^2 und einer Bestrahlungsdauer von durchschnittlich 3 Minuten und 12 Sekunden zu keiner Zeit die Temperatur von 37,5°C.

4.2.3 Synchronisation von HaCaT-Zellen und Fibroblasten

24 Stunden nach Aussaat der Zellen in Vollmedium mit 10% FKS-Zusatz wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen. HaCaT-Zellen wurden in DMEM ohne FKS-Zusatz, Fibroblasten mit 0,1% FKS-Zusatz in der G0-Phase synchronisiert. 48 Stunden nach Serumentzug wurde wieder Medium mit 10% FKS-Anteil zugegeben, wodurch die Zellen wieder in die G1-Phase eintraten.

4.2.4 Gewinnung von Zellextrakten

Um das Protein der Zellen zu gewinnen, wurden das Medium abgesaugt und durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS die verbleibenden Mediumspuren entfernt. Um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erreichen, wurde überschüssiges PBS abgesaugt. 200µl RIPA-Puffer wurde flächig auf den Zellkulturschalen verteilt, die Zell-Lysate mit einem Zellschaber abgeschabt und mit einer Pipette in ein hitzebeständiges Zentrifugenröhrchen überführt. Zusatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zum RIPA-Puffer (NaF, Orthovanadat, Complete™ mini Proteaseinhibitor Tabletten in RIPA-Pufferlösung) und sofortiges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei minus 195,8°C minimierte den unerwünschten Proteinverdau. Die Proteinproben wurden alsdann bei minus 80°C bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

4.2.5 Proteinmessung mit Dc-Proteinassay

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, mit einer Ultraschallsonde homogenisiert und die Zellfragmente bei 4°C und 13.000 U/min abzentrifugiert. Um die Taschen der SDS-Elektrophoresegele mit gleichen Proteinmengen zu befüllen, wurde zuvor die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Proteinassays der Firma BioRad ermittelt und das Füllvolumen der Taschen berechnet. Bei der kolorimetrischen Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry, 1951) werden die Zellextrakte in

Detergenzien gelöst. Durch Interaktion von Kupfer und Aminosäuren (v.a. Tyrosin und Tryptophan) wird bei alkalischem pH ein kupferhaltiges Reagenz reduziert. Dadurch entwickelt sich eine photometrisch erfassbare Blaufärbung der gelösten Extrakte. Durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe eines Proteinstandards (BSA) wurde die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet.

4.2.6 Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit 2x - Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und bei 95°C für 3 Minuten in einem Heizblock denaturiert. Vor Befüllung der Taschen des SDS-PAGE-Gels wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert.

4.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblot

Immunoblotting ist ein Verfahren, mit dem Proteine näher charakterisiert werden können. Die Proteine werden entsprechend ihrer Größe durch Anlegen einer Spannung in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Membran als Träger übertragen (Blotting). Die Membran wird mit Antikörpern, die aus Tierseren (polyklonal) oder Lymphozyten-Zelllinien (monoklonal) gewonnen wurden, inkubiert (Immunoblotting). Zunächst bindet ein Antikörper an spezifische Epitope des Proteins. Durch Verwendung eines zweiten Antikörpers, der mit Meerrettichperoxidase (horse-radish-peroxidase, HRP) gekoppelt ist und der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, gelingt durch eine Chemilumineszenzreaktion die Darstellung des Proteins auf der Membran über die Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms.

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde nach dem von Sambrook und Russell entwickelten Verfahren wie unten beschrieben durchgeführt [90]. Es wurden BioRad mini-Protean Elektrophoresekammern verwendet. Das Gel hat eine Dicke von 1,5 mm

und besteht aus einem oberen Teil, dem Sammelgel, das mit Taschen für die Proteinextrakte versehen ist. Das Sammelgel bewirkt, dass die Proteine auf ein möglichst kleines Volumen konzentriert werden. Darunter befindet sich das Trenngel, in dem die Proben durch den Siebeffekt der Poren des Gels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Der Acrylamidgehalt des Gels wurde entsprechend dem Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins gewählt. Die Acrylamid-Konzentration lag zwischen 7,5 % für den Nachweis von Chk1 und bei 10 % für Cdc25A.

Acrylamidkonzentration (%)	7,5	10	12
30% Acrylamidmix 29:1 (ml)	1,25	1,67	2,0
H ₂ O (ml)	2,4	1,98	1,62
1,5M Tris-Cl pH8,8 (ml)	1,25	1,25	1,25
10% SDS (ml)	0,05	0,05	0,05
10% APS(μl)	50	50	50
TEMED (μl)	2,5	2,5	2,5

Das Gel wurde zwischen zwei Glasscheiben gegossen und vor dem Aushärten mit Isobutanol überschichtet, um eine glatte und waagrechte Oberfläche zu erzielen. Nach 45 Minuten Polymerisationszeit wurden die Isobutanolrückstände mit Wasser entfernt und eine Schablone für die Geltaschen zwischen die Glasplatten eingesetzt. Danach wurde das Sammelgel mit der folgenden Zusammensetzung zwischen die Glasplatten gegossen:

Acrylamidkonzentration (%)	5,0
30% Acrylamidmix 29:1 (ml)	0,17
H ₂ O (ml)	0,68
1,5M Tris-Cl pH8,8 (ml)	1,25
10% SDS (ml)	0,01
10% APS(μl)	10
TEMED (μl)	1

Nach einer Polymerisationszeit von etwa 30 Minuten wurden die Taschen nochmals mit Wasser gespült, um noch unpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Danach wurde das Gel in die Elektrophoresekammern eingesetzt und die Behälter mit Laemmli-Puffer gefüllt.

Die Proteinextrakte wurden für 3 Minuten bei 95°C in SDS-Ladepuffer gekocht und die unlöslichen Bestandteile für 5 Minuten bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Die Proteinextrakte wurden mit einer Mikroliterpipette in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Ebenso wurde Kaleidoscope-Marker (BioRad) als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200V konstanter Spannung für 40 bis 60 Minuten.

Semi-Dry-Blotting

Die Gele wurden durch Semi-Dry-Blotting auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) übertragen. Die Membran wurde zuvor in reinem Methanol hydrophilisiert. Nach Auftrennung der Proteine in SDS-PAGE wurden die Glasplatten entfernt und mit einem Skalpell das Sammelgel abgetrennt. Danach wurde das Gel auf ein in Puffer getränktes Filterpapier aufgelegt, und die überstehenden Ränder wurden zurechtgeschnitten. Das Trenngel und die PVDF-Membran wurden in Semi-Dry-Puffer equilibriert. In der Transferkammer wurde das Gel auf die PVDF-Membran aufgelegt. In Semi-Dry-Puffer getränktes 3 mm Whatman Filterpapier vermittelte die

elektrische Leitfähigkeit zur Edelstahl-Kathode (oben) und der Platin-Anode (unten). Nach 30 Minuten bei 15V waren die durch das SDS negativ geladenen Proteine vollständig auf die Membran transferiert.

Membranfärbung mit Amidoschwarz und Blocken

Um die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben und den gleichmäßigen Lauf der Proteinbanden zu dokumentieren, wurden die Membranen nach dem Proteintransfer in Amidoschwarz-Färbelösung für maximal 5 Minuten gefärbt. Nach einem Entfärbeschritt in Amidoschwarz-Entfärbelösung wurde die Membran zwischen Klarsichtfolien eingelegt. Die Auftragung wurde durch Schwarz-Weiss-Fotokopie dokumentiert. Nach 3 weiteren Entfärbeschritten für je 5 Minuten wurden die Membranen in einer proteinhaltigen Lösung (Milk Diluent 1:10 in aqua dest., Fa. Kierkegaard&Perry Laboratories, KPL) über Nacht bei 4°C unter fortwährender Bewegung inkubiert, um die Membran gegen ein unspezifisches Binden der Antikörper abzusättigen.

Antikörperinkubation

Alle Antikörper wurden in den vorgeschriebenen Konzentrationen in Milk-Diluent 1:20 verdünnt und bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. Die Inkubationszeit des ersten Antikörpers betrug 1,5 Stunden, die des zweiten eine halbe Stunde. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Membranen 4 mal für 5 Minuten in KPL Waschlösung 1:20 in aqua bidest. von überschüssigem, nicht gebundenem Antikörper gereinigt.

Chemilumineszenz

Nach Inkubation der Membranen mit einem zweiten Antikörper wurden die Lösungen 1 und 2 des ECL Chemilumineszenzreagenzes im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membranen mit wenigen Millilitern für 1-2 Minuten

benetzt. Die Membranen wurden zwischen Klarsichtfolien in eine kleine Röntgenfilmkassette eingelegt. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm den fluoreszierenden Membranen exponiert und im Fotoentwickler entwickelt.

Membran-Stripping

Die mit den Antikörpern beladenen Membranen konnten durch Waschen in einer β -Mercaptoethanol-haltigen Stripping-Pufferlösung erneut mit weiteren Antikörpern inkubiert werden. Dabei bewirkt das reduzierende Agens β -Mercaptoethanol ein Aufbrechen aller Disulfidbrücken der Antikörper und eine Dissoziation von der Membran. Nach Inkubation für 30 Minuten in Stripping-Puffer bei einer Temperatur von 50°C in einem Hybridisierofen wurden die Membranen 3 x 10 min in TBS-Tween, 1 x 10 min in TBS pH8,0 gewaschen und erneut bei 4°C über Nacht auf einem Rütteltisch in KPL Milk-Diluent inkubiert.

4.2.8 Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting = FACS)

Einbau von BrdU als Marker für S-Phase

Die Durchflusszytometrie wurde ursprünglich in der Immunologie entwickelt und ermöglicht das Messen der Fluoreszenz von Einzelzellen. Diese Methode wird heute weit darüber hinaus verwendet, da man praktisch jeden zellulären Parameter, der sich in Fluoreszenz oder Partikelgröße ausdrücken lässt, damit erfassen kann. Grundsätzlich wird die Information pro Einzelzelle registriert, die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen ist die Summe dieser Einzelinformationen. Voraussetzung ist, dass die gefärbten Zellen bzw. Zellkerne in Suspension vorliegen.

Die Daten wurden mit einem FACScan-Durchflusszytometer gewonnen, das Licht mit einem Emissionsmaximum im Bereich von 488 nm aussendet. Mit diesem Spektrum lassen sich Fluoreszenzfarbstoffe wie PI und FITC anregen, die Licht in einem längerwelligen Bereich (FITC: Grün 530 nm; PI: rot 650 nm) abgeben. Die Emissionsspektren liegen deutlich über der Anregungswellenlänge 488 nm und können dadurch selektiv mit Detektoren erfasst werden.

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist ein Fluorochrom mit einem Molekulargewicht von 389 Daltons und einem Absorptionsmaximum bei 495 nm. Seine Anregung durch Strahlung von 488 nm Wellenlänge führt zu einem Fluoreszenzemissionsmaximum bei etwa 520 nm. Das Isothiocyanat Derivat (FITC) ist das am weitesten verbreitete Fluorochrom für die Konjugation an Antikörper.

Um den Einbau des Thymidin-Analogons BrdU während der S-Phase zu erfassen, wurden die Zellkerne nach ihrer Isolierung mit einem FITC-gekoppelten anti-BrdU-FITC-Antikörper inkubiert.

Propidiumjodid (PI) ist ein Fluorochrom, das bevorzugt an Chromatinstrukturen bindet und das sich mit Wellenlängen von 488 und 595 nm anregen lässt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 535 nm. Es kann mit seinem Emissionsmaximum von 617 nm von allen gängigen Durchflusszytometern erfasst werden.

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten für 20 Minuten mit BrdU inkubiert. Um auch das Zellmaterial von eventuell nach Bestrahlung abgestorbenen Zellen mitzuerfassen, wurde das Medium vor dem Loslösen der Zellen von der Zellkulturschale aufbewahrt und später zusammen mit den Zellen zentrifugiert. Nach Trypsinierung wurde die Zellsuspension mit einer Pipette mehrmals aufgezogen, um Zellkonglomerate in Einzelzellen aufzulösen, danach mit dem aufbewahrten Überstand das Trypsin inaktiviert und bei 4°C und 1200 U/min in einer Heræus Megafuge 2.0R Zentrifuge abzentrifugiert. Nach Resuspension in 200 µl PBS wurden die Zellen tröpfchenweise langsam auf dem Vortex zu 3 ml eiskalter 70%iger Ethanollösung in FACS-Röhrchen (Falcon) zugegeben und für mindestens 2 Stunden bei 4°C im Kühlschrank fixiert.

Um möglichst genaue Aussagen über den DNA-Gehalt im Verlaufe des Zellzyklus zu machen, wurden die Zellen nach Fixierung für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 0,4 mg/ml Pepsin in 0,1 N HCl inkubiert und die Zellkerne isoliert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 1.200 U/min über 8 Minuten wurden die Zellkerne in 1,5 ml 2 N HCl resuspendiert und bei 37°C inkubiert, um die chromosomale DNA zu denaturieren. Nach 20 Minuten wurde die Salzsäure durch Zugabe von 3 ml Boratpuffer neutralisiert, die Zellkernsuspension erneut zentrifugiert und mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 100µl FACS-Puffer resuspendiert und pro Probe 10 µl anti-BrdU-FITC-Antikörper zugegeben und gut vermischt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellkerne mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in 1 ml Propidiumjodidlösung (20 µg/ml Propidiumjodid + 40 µg/ml RNase A in 10 ml FACS-Puffer) resuspendiert. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Analyse aller Proben erfolgte mittels eines FACScan-Durchflusszytometers (Becton-Dickinson) und der Software Cell Quest[®]. Zur quantitativen Auswertung von Propidiumjodid-Histogrammen (Verteilung der Zellen auf die jeweiligen Zellzyklusphasen) wurde das Softwareprogramm ModFit[®] verwendet.

4.2.9 Bestimmung des Mitotic-Index (DAPI-Färbung)

Zur Vorbereitung wurden runde Deckgläser in 70%igem Ethanol desinfiziert und in Zellkulturschalen, deren Boden mit Parafilm ausgelegt war, fixiert. Nach Abdunsten des Ethanols erfolgte eine 30-minütige Bestrahlung mit UVC-Strahlung. Auf den Deckgläsern aus Glas konnten die HaCaT-Zellen anhaften. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Parafilms verblieb das wässrige Zellkulturmedium in einem flachen Tropfen auf dem Deckglas. Zwischen 8000 und 10000 Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuch ausgesät. Das Medium wurde zu den angegebenen Zeiten abgesaugt. Die Zellen wurden für maximal 5 Minuten in Methanol fixiert. Danach wurden die Zellen bis zur Färbung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Färbung des Chromatins erfolgte mit DAPI. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt nach Bindung an doppelsträngige DNA bei 358 nm und das Emissionsmaximum bei 461 nm. 200 µl des DAPI-Farbstoffs wurde in 10 ml PBS gelöst (Verdünnung 1:50). Bei abgedunkelter Raumbelichtung wurde von der Verdünnung je 100 µl auf die Deckgläser gegeben und etwa 5 Minuten belassen. Die Deckgläser wurden in Wasser gewaschen und vorsichtig mit einem saugfähigen Papiertuch getrocknet. Um die Fluoreszenz des DAPI-Farbstoffes möglichst lange zu erhalten, wurde ein Tropfen der Lösung Antifade B auf einen Objektträger gegeben. Das Deckglas wurde aufgelegt und mit einem weiteren Tropfen der Antifadelösung B benetzt. Ein großes dünnes Deckglas wurde oben aufgelegt und am Rand mit Nagellack fixiert. Danach konnte die Auszählung der Metaphasefiguren im Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

5. Zusammenfassung

Für den antiproliferativen Effekt der Kombinationstherapie aus UVA-Strahlung mit dem Furocoumarin Psoralen (PUVA) wird die Ausbildung von Doppelstrangvernetzungen (Interstrand Cross Links, ICL) verantwortlich gemacht. Unklar war, ob der PUVA-induzierte Zellzyklusarrest durch Doppelstrangvernetzungen, die die Replikationsgabeln mechanisch behindern, oder durch die Aktivierung von Zellzykluscheckpoints ausgelöst wird. Zellzykluscheckpoints garantieren die Stabilität des Genoms, indem sie die Zellzyklusprogression soweit verlangsamen oder anhalten, dass die Replikation von aufgetretenen DNA-Schäden oder Fehlverteilungen von Chromosomen verhindert werden kann. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass HaCaT-Keratinocyten durch PUVA-Exposition mit S-Phase-DNA-Gehalt arretiert werden. Zellen, die die DNA-Replikation bereits abgeschlossen hatten, waren von der PUVA-Exposition unbeeinträchtigt und durchliefen die Mitose. Zellen, die während der G1-Phase PUVA exponiert worden waren, durchquerten die G1-Phase und arretierten erst in der frühen S-Phase. PUVA induzierte eine schnelle Phosphorylierung der Chk1-Checkpointkinase an Serin 345, die mit einer Abnahme von Cdc25A einherging. Die Chk1-Phosphorylierung, die Abnahme von Cdc25A und der S-Phase-Arrest konnten durch Koffein aufgehoben werden. Dies lieferte den Beweis, dass die Aktivierung von Checkpointsignalkaskaden und nicht eine passive, mechanische Blockierung durch DNA-Doppelstrangvernetzungen für den PUVA-induzierten Replikationsarrest verantwortlich ist. Die Überexpression von Cdc25A konnte den S-Phase-Arrest nur zum Teil aufheben, woraus sich folgern lässt, dass die Aktivierung von zusätzlichen Signalwegen an der Ausbildung des PUVA-induzierten S-Phase-Arrests beteiligt ist.

6. Abkürzungen

ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATR	ATM-and Rad3-related Protein
Brca1	Breast Cancer Gene 1
BrdU	Bromo-deoxy-Uridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdc25A	Cell-division-cycle 25 A
Cdk	Cyclin-dependent-kinase
Chk1/2	Checkpointkinase1/2
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modyfied Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
ICL	interstrand cross link
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome protein1
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositolkinase
pRb	Retinoblastomprotein
p53	Tumorsuppressorgen p53
RDS	Radio resistant DNA synthesis
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator

7. Literaturverzeichnis

1. Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15: 2177-2196
2. Akkari YM, Bateman RL, Reifsteck CA, Olson SB, Grompe M (2000) DNA replication is required to elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* 20: 8283-8289
3. Alderton GK, Joenje H, Varon R, Borglum AD, Jeggo PA, O'Driscoll M (2004) Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway. *Hum Mol Genet* 13: 3127-3138
4. Alessi F, Quarta S, Savio M, Riva F, Rossi L, Stivala LA, Scovassi AI, Meijer L, Prosperi E (1998) The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exp Cell Res* 245: 8-18
5. Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schachtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan Y, Gray N, Meijer L (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 280: 31208-31219
6. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506
7. Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 792-804
8. Bartek J, Lukas J (2001) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13: 738-747
9. Bartek J, Lukas J (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 490: 117-122

10. Bessho T (2003) Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *J Biol Chem* 278: 5250-5254
11. Blasina A, Price BD, Turenne GA, McGowan CH (1999) Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol* 9: 1135-1138
12. Blomberg I, Hoffmann I (1999) Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 19: 6183-6194
13. Bloomfield M (1897) *Hymns of the Atharva Veda in: Sacred Books of the East, Bd 42*, Clarendon Press (Hrsg), Oxford
14. Boonstra J (2003) Progression through the G1-phase of the ongoing cell cycle. *J Cell Biochem* 90: 244-252
15. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771
16. Boukamp P, Popp S, Bleuel K, Tomakidi E, Burkle A, Fusenig NE (1999) Tumorigenic conversion of immortal human skin keratinocytes (HaCaT) by elevated temperature. *Oncogene* 18: 5638-5645
17. Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M (2004) Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23: 2050-2056
18. Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, Hershko A, Pagano M, Draetta GF (2003) Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426: 87-91
19. Busse PM, Bose SK, Jones RW, Tolmach LJ (1977) The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. II. Synergistic lethality. *Radiat Res* 71: 666-677

20. Busse PM, Bose SK, Jones RW, Tolmach LJ (1978) The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. *Radiat Res* 76: 292-307
21. Casper AM, Durkin SG, Arlt MF, Glover TW (2004) Chromosomal instability at common fragile sites in Seckel syndrome. *Am J Hum Genet* 75: 654-660
22. Cassier C, Chanet R, Moustacchi E (1984) Mutagenic and recombinogenic effects of DNA cross-links induced in yeast by 8-methoxypsoralen photoaddition. *Photochem Photobiol* 39: 799-803
23. Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A (1995) Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15: 2682-2688
24. Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y, Mattern MR, Mishra R, Hurle MR, Zhang X, Annan RS, Lu Q, Faucette LF, Scott GF, Li X, Carr SA, Johnson RK, Winkler JD, Zhou BB (1999) Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18: 4047-4054
25. Chow JP, Siu WY, Ho HT, Ma KH, Ho CC, Poon RY (2003) Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints. *J Biol Chem* 278: 40815-40828
26. Cohen SR, Burkholder DE, Varga JM, Carter DM, Bartholomew JC (1981) Cell cycle analysis of cultured mammalian cells after exposure to 4,5',8-trimethylpsoralen and long-wave ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 76: 409-413
27. Coqueret O (2002) Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299: 35-55
28. Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18: 7883-7899
29. de Klein A, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM, Lehmann AR, Hoeijmakers JH (2000) Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 10: 479-482

30. DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR (1995) E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev* 9: 2873-2887
31. Diffley JF (1998) Replication control: choreographing replication origins. *Curr Biol* 8: R771-773
32. Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt PC (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8502-8506
33. Donzelli M, Draetta GF (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4: 671-677
34. Dronkert ML, Kanaar R (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res* 486: 217-247
35. Dunphy WG, Kumagai A (1991) The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 67: 189-196
36. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410: 842-847
37. Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30: 290-294
38. Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, Smythe C (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *J Cell Biol* 154: 913-923
39. Forbes PD, Davies RE, Urbach F (1978) Experimental ultraviolet photocarcinogenesis: wavelength interactions and time-dose relationships. *Natl Cancer Inst Monogr* 31-38
40. Fotedar R, Fotedar A (1995) Cell cycle control of DNA replication. *Prog Cell Cycle Res* 1: 73-89

41. Fritsch P (1998) Lehrbuch und Atlas *in*: Dermatologie und Venerologie, Springer Verlag (Hrsg), Berlin Heidelberg New York
42. Fusenig NE, Boukamp P (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23: 144-158
43. Fusenig NE, Breitkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp P, Bohnert A, Tilgen W (1983) Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 81: 168s-175s
44. Gasparro FP (1996) Psoralen photobiology: recent advances. *Photochem Photobiol* 63: 553-557
45. Gasparro FP (2000) The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence. *Am J Clin Dermatol* 1: 337-348
46. Gasparro FP, Dall'Amico R, O'Malley M, Heald PW, Edelson RL (1990) Cell membrane DNA: a new target for psoralen photoadduct formation. *Photochem Photobiol* 52: 315-321
47. Gasparro FP, Felli A, Schmitt IM (1997) Psoralen photobiology: the relationship between DNA damage, chromatin structure, transcription, and immunogenic effects. *Recent Results Cancer Res* 143: 101-127
48. Gasparro FP, Song J, Knobler RM, Edelson RL (1986) Quantitation of psoralen photoadducts in DNA isolated from lymphocytes treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A radiation (extracorporeal photopheresis). *Curr Probl Dermatol* 15: 67-84
49. Gatei M, Sloper K, Sorensen C, Syljuasen R, Falck J, Hobson K, Savage K, Lukas J, Zhou BB, Bartek J, Khanna KK (2003) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278: 14806-14811
50. Goldstein DP, Carter DM, Ljunggren B, Burkholder J (1982) Minimal phototoxic doses and 8-MOP plasma levels in PUVA patients. *J Invest Dermatol* 78: 429-433

51. Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551
52. Gunther EJ, Yeasky TM, Gasparro FP, Glazer PM (1995) Mutagenesis by 8-methoxypsoralen and 5-methylangelicin photoadducts in mouse fibroblasts: mutations at cross-linkable sites induced by offoaducts as well as cross-links. *Cancer Res* 55: 1283-1288
53. Guo Z, Dunphy WG (2000) Response of *Xenopus* Cds1 in cell-free extracts to DNA templates with double-stranded ends. *Mol Biol Cell* 11: 1535-1546
54. Hall-Jackson CA, Cross DA, Morrice N, Smythe C (1999) ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 18: 6707-6713
55. Hamlin JL (1992) Mammalian origins of replication. *Bioessays* 14: 651-659
56. Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261
57. Hearst JE, Isaacs ST, Kanne D, Rapoport H, Straub K (1984) The reaction of the psoralens with deoxyribonucleic acid. *Q Rev Biophys* 17: 1-44
58. Hekmat-Nejad M, You Z, Yee MC, Newport JW, Cimprich KA (2000) *Xenopus* ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 10: 1565-1573
59. Herzinger T, Funk JO, Hillmer K, Eick D, Wolf DA, Kind P (1995) Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11: 2151-2156
60. Hoffmann I, Karsenti E (1994) The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 18: 75-79

61. Hölzle E (2003) Photodermatosen und Lichtreaktionen der Haut
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Hrsg), Stuttgart
62. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M,
Tsuru K, Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology*
189: 21-39
63. Jachymczyk WJ, von Borstel RC, Mowat MR, Hastings PJ (1981)
Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces*
cerevisiae requires two systems for DNA repair: the RAD3 system
and the RAD51 system. *Mol Gen Genet* 182: 196-205
64. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G (2003) Ultraviolet radiation and
cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 22: 3099-3112
65. Kaufmann WK, Heffernan TP, Beaulieu LM, Doherty S, Frank AR,
Zhou Y, Bryant MF, Zhou T, Luche DD, Nikolaishvili-Feinberg N,
Simpson DA, Cordeiro-Stone M (2003) Caffeine and human DNA
metabolism: the magic and the mystery. *Mutat Res* 532: 85-102
66. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild-type
p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc*
Natl Acad Sci U S A 89: 7491-7495
67. Lage C, de Padula M, de Alencar TA, da Fonseca Goncalves SR,
da Silva Vidal L, Cabral-Neto J, Leitao AC (2003) New insights on
how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced
by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in
Escherichia coli cells. *Mutat Res* 544: 143-157
68. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G,
Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge
SJ (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and
required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14:
1448-1459
69. Ljunggren B, Bjellerup M, Carter DM (1981) Dose-response
relations in phototoxicity due to 8-methoxypsoralen and UV-A in
man. *J Invest Dermatol* 76: 73-75
70. Ljunggren B, Carter DM, Albert J, Reid T (1980) Plasma levels of 8-
methoxypsoralen determined by high-pressure liquid
chromatography in psoriatic patients ingesting drug from two
manufacturers. *J Invest Dermatol* 74: 59-62

71. Maeda T, Hanna AN, Sim AB, Chua PP, Chong MT, Tron VA (2002) GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure. *J Invest Dermatol* 119: 22-26
72. Magana-Schwencke N, Henriques JA, Chanet R, Moustacchi E (1982) The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1722-1726
73. Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuasen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288: 1425-1429
74. Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J (2002) Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 21: 5911-5920
75. Manke IA, Nguyen A, Lim D, Stewart MQ, Elia AE, Yaffe MB (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* 17: 37-48
76. Matsui MS, DeLeo VA (1990) Induction of protein kinase C activity by ultraviolet radiation. *Carcinogenesis* 11: 229-234
77. Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, Goubin F, Draetta GF (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* 1: 71-79
78. Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116: 221-234
79. Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K (2001) Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 853-860
80. Nilsson I, Hoffmann I (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4: 107-114

81. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36: 617-656
82. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003) A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33: 497-501
83. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15: 2612-2624
84. Painter RB, Young BR (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7315-7317
85. Pavey S, Russell T, Gabrielli B (2001) G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene* 20: 6103-6110
86. Presland RB, Fleckman P (2005) Tetracycline-regulated gene expression in epidermal keratinocytes. *Methods Mol Biol* 289: 273-286
87. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7: 1559-1571
88. Raleigh JM, O'Connell MJ (2000) The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1727-1736
89. Rao PN, Johnson RT (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225: 159-164
90. Sambrook J RD (2001) *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Laboratory Press (Hrsg), New York
91. Santella RM, Gasparro FP, Edelson RL (1986) Quantification of methoxsalen-DNA adducts with specific antibodies. *IARC Sci Publ* 127-139

92. Santella RM, Yang XY, DeLeo VA, Gasparro FP (1988) Detection and quantification of 8-methoxypsoralen-DNA adducts. *IARC Sci Publ* 333-340
93. Schlegel R, Pardee AB (1986) Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science* 232: 1264-1266
94. Senderowicz AM (2002) The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologist* 7 Suppl 3: 12-19
95. Senderowicz AM (2003) Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. *Cancer Biol Ther* 2: S84-95
96. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707
97. Sexl V, Diehl JA, Sherr CJ, Ashmun R, Beach D, Roussel MF (1999) A rate limiting function of cdc25A for S phase entry inversely correlates with tyrosine dephosphorylation of Cdk2. *Oncogene* 18: 573-582
98. Sherr CJ (1995) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* 107: 181-186
99. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy ON (1997) Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci* 2: d538-551
100. Stevaux O, Dyson NJ (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14: 684-691
101. Strickland PT (1986) Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in Sencar mice. *J Invest Dermatol* 87: 272-275
102. Syljuasen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J (2005) Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 25: 3553-3562

103. Taylor A, Gasparro FP (1992) Extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T-cell lymphoma and other diseases. *Semin Hematol* 29: 132-141
104. Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13: 152-157
105. Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14: 2989-3002
106. Tobey RA (1975) Different drugs arrest cells at a number of distinct stages in G2. *Nature* 254: 245-247
107. Tokura Y, Edelson RL, Gasparro FP (1991) Formation and removal of 8-MOP-DNA photoadducts in keratinocytes: effects of calcium concentration and retinoids. *J Invest Dermatol* 96: 942-949
108. Tommasi S, Swiderski PM, Tu Y, Kaplan BE, Pfeifer GP (1996) Inhibition of transcription factor binding by ultraviolet-induced pyrimidine dimers. *Biochemistry* 35: 15693-15703
109. Toogood PL (2002) Progress toward the development of agents to modulate the cell cycle. *Curr Opin Chem Biol* 6: 472-478
110. Tornaletti S, Pfeifer GP (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18: 221-228
111. Varga JM, Wieseahn G, Bartholomew JC, Hearst JE (1982) Dose-related effects of psoralen and ultraviolet light on the cell cycle of murine melanoma cells. *Cancer Res* 42: 2223-2226
112. Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15
113. Walworth NC (2000) Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12: 697-704

114. Zhao H, Piwnica-Worms H (2001) ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 21: 4129-4139
115. Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna KK (2000) Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem* 275: 10342-10348
116. Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439

8. Danksagung

Diese Danksagung richtet sich an alle, die es mir ermöglicht haben, meine Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München verfassen zu können.

Besonders danke ich Herrn Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Plewig, der mich mit seinen Vorlesungen für die Dermatologie begeisterte und mein Interesse für das Fach weckte.

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Herzinger danke ich besonders herzlich für die gute Betreuung meiner Arbeit, für die Unterstützung auf geistigem und fachlichen Wege und die stete Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, und vor allem für den wissenschaftlichen Dialog.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Inge Kuntze, die ihre langjährige Laborerfahrung weitergab und mir mit großer Geduld und zahlreichen Tipps und Tricks den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert hat.

Frau Multhaupt, Frau Nau, Frau Orthgiess und Frau Urban danke ich für die freundliche Unterstützung und Einweisung unter anderem in die Arbeit mit dem Durchflusszytometer im Serologischen Labor.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung bei den Arbeiten und den langjährigen Beistand, der Grundstein für das Gelingen dieser Arbeit war.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name: Christoph Stefan Arno Joerges
Geburtstag: 23. März 1976
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Dr. Ekkehard Joerges, Physiker
Gundelinde Joerges, Apothekerin

Schulbildung:

1987 – 1996 Feodor-Lynen-Gymnasium in Planegg, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife,
Hauptfächer Französisch und Biologie

Zivildienst:

August 1996 - Pfarrei St. Hildegard in Pasing
August 1997

Medizinische

Ausbildung:

Oktober 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
September 1999 Ärztliche Vorprüfung
März 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

Oktober 2003 - Februar 2004 Dermatologie und Venerologie in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Universität München
Februar 2004 - Mai 2004 Hämatologie, Onkologie und Gastroenterologie in den Medizinischen Kliniken II und III des Klinikums Großhadern
Juni 2004 – September 2004 Allgemein- und Viszeralchirurgie im städtischen Krankenhaus München Harlaching

Publikation: Joerges C, Kuntze I, Herzinger T (2003)
Induction of a caffeine-sensitive S-phase cell cycle checkpoint
by psoralen plus ultraviolet A radiation
Oncogene 22:6119-6128

Posterpreis: Posterpreis bei der 30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft
Dermatologische Forschung, 27.02. – 01.03.2003, Frankfurt a
Main

**Beruflicher
Werdegang:** seit 01.03.2005 Assistenzarzt am Klinikum Nürnberg,
4. Medizinische Klinik
Lehrstuhl für Innere Medizin IV, Nephrologie und
Hypertensiologie, Universitätsklinikum Nürnberg - Erlangen