

# Evaluierung zellulärer Marker zur Charakterisierung der Schutzleistung von Sonnenschutzprodukten

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie  
vorgelegt der  
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von

Nicole Walter

aus Löhningen, Schaffhausen

Bern, 2013

Originaldokument gespeichert auf dem Dokumentenserver der Universität Basel  
[edoc.unibas.ch](http://edoc.unibas.ch)



Dieses Werk ist unter dem Vertrag „Creative Commons Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz“ lizenziert. Die vollständige Lizenz kann unter [creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.5/ch](http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.5/ch) eingesehen werden.



## Namensnennung-Keine kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 2.5 Schweiz

---

Sie dürfen:



das Werk vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen

Zu den folgenden Bedingungen:



**Namensnennung.** Sie müssen den Namen des Autors/Rechteinhabers in der von ihm festgelegten Weise nennen (wodurch aber nicht der Eindruck entstehen darf, Sie oder die Nutzung des Werkes durch Sie würden entlohnt).



**Keine kommerzielle Nutzung.** Dieses Werk darf nicht für kommerzielle Zwecke verwendet werden.



**Keine Bearbeitung.** Dieses Werk darf nicht bearbeitet oder in anderer Weise verändert werden.

- Im Falle einer Verbreitung müssen Sie anderen die Lizenzbedingungen, unter welche dieses Werk fällt, mitteilen. Am Einfachsten ist es, einen Link auf diese Seite einzubinden.
- Jede der vorgenannten Bedingungen kann aufgehoben werden, sofern Sie die Einwilligung des Rechteinhabers dazu erhalten.
- Diese Lizenz lässt die Urheberpersönlichkeitsrechte unberührt.

**Die gesetzlichen Schranken des Urheberrechts bleiben hiervon unberührt.**

Die Commons Deed ist eine Zusammenfassung des Lizenzvertrags in allgemeinverständlicher Sprache: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ch/legalcode.de>

Haftungsausschluss:

Die Commons Deed ist kein Lizenzvertrag. Sie ist lediglich ein Referenztext, der den zugrundeliegenden Lizenzvertrag übersichtlich und in allgemeinverständlicher Sprache wiedergibt. Die Deed selbst entfaltet keine juristische Wirkung und erscheint im eigentlichen Lizenzvertrag nicht. Creative Commons ist keine Rechtsanwalts-gesellschaft und leistet keine Rechtsberatung. Die Weitergabe und Verlinkung des Commons Deeds führt zu keinem Mandatsverhältnis.



Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag von

Prof. Dr. Christian Surber

Prof. Dr. Georgios Imanidis

Prof. Dr. Matthias Hamburger

Basel, den 18.06.2013

Prof. Dr. Jörg Schibler  
Dekan

# Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Surber und der Firma Spirig Pharma AG für die Ermöglichung meiner Dissertation im Bereich der präklinischen Forschung und Entwicklung und der Bereitstellung der Ressourcen bedanken. Es waren drei spannende Jahre, in welchen ich viel gelernt habe und neue Erkenntnisse gewinnen konnte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Georgios Imanidis für seine konstruktiven Vorschläge, die lehrreichen Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Matthias Hamburger, der sich als Fakultätsverantwortlicher meiner Dissertation zur Verfügung stellte.

Ein Dankeschön für die Betreuung meiner Arbeit, die Inputs und Hilfestellungen möchte ich auch Dr. Gernot Kunze aussprechen. Ich habe die interessanten Gespräche und Diskussionen mit ihm geschätzt. Für die Tipps und Tricks bezüglich Grafiken und Excel Verwendung bin ich sehr dankbar.

Bei meinem Laborteam möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung und die Einführung in alle für mich neuen Techniken bedanken. Sie waren während der Zeit bei Spirig für mich da und haben mich aufgebaut, wenn es mal schwierig war. Für ihre guten Ideen, hilfreichen Hände und die ab und zu benötigte Ablenkung im Labor und ausserhalb danke ich ihnen sehr.

Il mio profondo ringraziamento va alla dottoressa Annalisa Stilla, che è venuta appena in tempo, al momento più disperato portandomi luce e speranza. Con il suo sapere e la sua esperienza mi ha aiutato tantissimo, riuscendo insieme ad arrivare al punto finale di questo lavoro. I suoi consigli per la realizzazione dei grafici nel power point valevano oro. Senza di lei il lavoro non sarebbe stato quello di oggi. Non ha mai mollato, dandomi coraggio, restandomi sempre vicina. Grazie di cuore !

Ich bedanke mich zudem bei allen anderen Angestellten der Firma Spirig, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen. Speziell erwähnen möchte ich das Team des Galenik-Labors, welches mich mit verschiedenen Formulierungen versorgte, die Herren von der Pharmawerkstatt, welche mir die tollen Befestigungshalterungen und andere technische Hilfsmittel anfertigten, sowie Frau Carmen Brunner, Teamassistentin F&E. Carmen half mir meinen Text zu bändigen und zu formatieren, dafür vielen herzlichen Dank.

Mein grösster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Sie sind mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen, haben mich mit einer unermüdlichen Geduld stets in jeder erdenklichen Weise unterstützt und mich motiviert. Sie hatten immer ein offenes Ohr für mich und munterten mich jeweils mit einfallsreichen Kleinigkeiten auf. Tausend Dank dafür, ich werde das nie vergessen.

Vorrei anche ringraziare con tutto il cuore il mio ragazzo Nico. Ogni giorno mi è stato di sostegno, mi ha sopportato anche in giorni difficili e ha sempre cercato di distrarmi un pò quando era necessario. Non ha mai smesso di incoraggiarmi. Senza di lui non ce l'avrei fatta ! Grazie Amore.

**Für meine Familie**

Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>Summary .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Die Sonne .....	9
1.2 Auswirkungen der UV-Strahlung auf den menschlichen Körper.....	11
1.2.1. Lokale Wirkungen.....	11
1.2.2. Systemische Wirkungen .....	13
1.3 Der Aufbau der Haut und dort vorkommende Krebsarten .....	14
1.3.1. Epidermis .....	14
1.3.2. Dermis .....	15
1.3.3. Subkutis.....	15
1.3.4. Das Basaliom (Basalzellkarzinom) .....	16
1.3.5. Das Spinaliom (Plattenepithelkarzinom).....	16
1.3.6. Das Melanom .....	17
1.4 Schutz vor der Sonne .....	18
1.4.1. Körpereigene Schutzmechanismen.....	18
1.4.2. Künstliche Schutzmassnahmen .....	19
1.5 Der Aufbau von Sonnenschutzprodukten .....	21
1.5.1. Anorganische Filter.....	21
1.5.2. Organische Filter .....	21
1.5.3. Filter und ihre Wirkungen .....	22
1.5.4. Der Sonnenschutzfaktor (SPF).....	24
1.5.5. Der UVA Schutzfaktor (UVA-PF).....	25
1.5.6. Sonnenschutzformulierungen.....	26
1.6 Auswirkungen ultravioletter Strahlung auf Zellebene .....	28
1.6.1. Allgemeines zur Signaltransduktion.....	28
1.6.2. Durch UV ausgelöste Signalkaskaden .....	28
1.7 Zelluläre Marker zur Charakterisierung von UV bedingten Zellschäden. 35	
1.7.1. Extrazelluläre Marker.....	35
1.7.2. Zytosolische Marker .....	36
1.7.3. Marker im Zellkern.....	36
1.8 Potentiell geeignete Marker zur Charakterisierung von UV bedingten Zellschäden .....	37
1.8.1. Interleukin 1 $\alpha$ .....	37
1.8.2. Interleukin 8.....	38
1.8.3. p38-MAPK.....	38
1.8.4. p53 .....	39
1.8.5. CPD.....	40
1.9 Forschungsschwerpunkte anderer Gruppen und deren Detektionsmethoden für verschiedene Marker .....	42
1.10 Ziele.....	43

<b>2.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1</b>	<b>Sonnenschutzprodukte</b> .....	<b>44</b>
	2.1.1. Kategorisierung des SPF .....	44
	2.1.2. UVA-PF Bestimmung der Sonnenschutzprodukte .....	45
<b>2.2</b>	<b>Bestrahlung</b> .....	<b>47</b>
	2.2.1. Vorbereitung der PMMA-Platten .....	51
	2.2.2. Bestrahlungsablauf .....	52
<b>2.3</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>53</b>
	2.3.1. Vitalitätsbestimmung .....	54
<b>2.4</b>	<b>Assaytechniken</b> .....	<b>57</b>
	2.4.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	57
	2.4.2. Durchflusszytometrie (FACS) .....	58
<b>2.5</b>	<b>Interleukin 1<math>\alpha</math></b> .....	<b>60</b>
	2.5.1. Sandwich-ELISA für Interleukin 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ ) .....	60
<b>2.6</b>	<b>Interleukin 8</b> .....	<b>61</b>
	2.6.1. Sandwich-ELISA für Interleukin 8 (IL-8) .....	61
<b>2.7</b>	<b>p38-MAPK</b> .....	<b>62</b>
	2.7.1. p38-MAPK-ELISA .....	62
	2.7.2. Messung von phosphorylierter p38-MAPK mittels FACS .....	63
<b>2.8</b>	<b>p53</b> .....	<b>64</b>
	2.8.1. p53-ELISA .....	64
<b>2.9</b>	<b>Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD)</b> .....	<b>65</b>
	2.9.1. CPD-ELISA .....	65
	2.9.2. Messung von CPDs mittels FACS .....	66
<b>3.</b>	<b>Resultate</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Vitalitätsexperimente</b> .....	<b>67</b>
	3.1.1. Normale humane Keratinozyten (HNK) .....	67
	3.1.2. Human adult low Calcium high Temperature Keratinozyten (HaCaT) .....	69
<b>3.2</b>	<b>Interleukin 1<math>\alpha</math></b> .....	<b>71</b>
<b>3.3</b>	<b>Interleukin 8</b> .....	<b>76</b>
<b>3.4</b>	<b>p38 – MAPK</b> .....	<b>79</b>
	3.4.1. Kinetik Experimente .....	79
	3.4.2. Dosisabhängigkeitsexperimente .....	80
	3.4.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten .....	82
<b>3.5</b>	<b>p53</b> .....	<b>85</b>
	3.5.1. Kinetik Experimente .....	85
	3.5.2. Dosisabhängigkeitsexperimente .....	85
	3.5.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten .....	86
<b>3.6</b>	<b>Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD)</b> .....	<b>91</b>
	3.6.1. Kinetik Experimente ELISA .....	91
	3.6.2. Dosisabhängigkeitsexperimente ELISA .....	92
	3.6.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten ELISA .....	93
	3.6.4. Kinetik Experimente FACS .....	95



3.6.5. Dosisabhängigkeitsexperimente FACS .....	95
3.6.6. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten FACS .....	96
<b>3.7 Kenngrößenvergleich von Sonnenschutzprodukten .....</b>	<b>103</b>
<b>4. Gesamtdiskussion .....</b>	<b>105</b>
Abbildungsverzeichnis .....	112
Quellenverzeichnis Abbildungen .....	115
Tabellenverzeichnis .....	117
<b>5. Anhang.....</b>	<b>118</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>7. Lebenslauf .....</b>	<b>138</b>

## Zusammenfassung

Dem Schutz vor UV-Strahlung und den daraus resultierenden kurz- und/oder langfristigen, schädlichen Einflüssen auf die menschliche Haut, kommt weltweit eine wachsende Bedeutung zu. Steigende Hautkrebsraten zeigen die Dringlichkeit eines umfassenden Schutzes der Haut vor Sonnenstrahlung, sowie einer umfassenden Information und Verhaltensschulung der Bevölkerung auf. Aktuelle Sonnenschutzprodukte enthalten, im Gegensatz zu früheren Formulierungen (zwischen 1985 und 2000), Filterkombinationen, die einen breiteren Schutz im UVB- und UVA-Bereich des Sonnenlichtspektrums aufweisen. Die Wirksamkeit der Produkte wird primär über den Sonnenschutzfaktor (SPF) (*in vivo* Bestimmung), der ein Mass für den Schutz vor Erythemstehung darstellt, ausgedrückt. Der SPF charakterisiert allerdings nur die UVB-Schutzleistung des Produktes. Die Bestimmung des SPF erfolgt ausschliesslich am Menschen, ist aufwändig, teuer und geht mit einer bewusst in Kauf genommenen Schädigung der Haut der Probanden einher. Hinzu kommt, dass der Zusammenhang zwischen Erythem und Hautkrebsentstehung nicht vollständig geklärt ist. Der UVA-Schutz einer Formulierung kann ebenfalls bestimmt werden und die Erfüllung bestimmter Kriterien wird durch das EU UVA-Logo gekennzeichnet. Der UVA-Schutzfaktor (UVA-PF) kann mit Hilfe einer akzeptierten *in vitro* Bestimmungsmethode ermittelt werden. Weltweit wird nach weiteren Kenngrössen für die umfassende Charakterisierung der Schutzleistung von Sonnenschutzprodukten gesucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems, das bereits in der Entwicklungsphase von Formulierungen zur Charakterisierung der Schutzleistung eingesetzt werden könnte. Dabei sollen auf zellulärer Ebene Marker evaluiert werden, die sich zur Charakterisierung einer UV-bedingten Schädigung eignen würden. Bei der Auswahl möglicher Zellschadenmarker sollten verschiedene Zelllokalisationen, wie extrazelluläre Matrix, zytoplasmatischer Bereich und Kernregion berücksichtigt werden.

Als mögliche Marker wurden Zytokine (Interleukin 1 $\alpha$  und Interleukin 8), die p38-MAPK, p53, sowie Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD) experimentell untersucht. Als Modell dienten humane normale Keratinozyten (HNK) und immortalisierte HaCaT-Zellen, die einer UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden. Zur Analyse der Marker wurden Assay-Techniken wie ELISA und/oder Durchflusszytometrie (FACS) eingesetzt.

Die Kinetiken und Dosis-Effektbeziehungen wurden für jeden Marker in Vorversuchen bestimmt. Zwei der fünf untersuchten Marker lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Arbeit mit Zytokinen als mögliche Zellschadenmarker erwies sich aufgrund der Messvarianzen als ungeeignet und wurde nicht weiterverfolgt.

Zur Evaluierung der ausgewählten Testsysteme wurden exemplarisch verschiedene Sonnenschutzprodukte (SPF 5 bis 50+) eingesetzt. Die Produkte wurden auf Plexiglasplatten (PMMA-Platten) aufgetragen und diese auf den Kulturbehältnissen der Zellen befestigt. Anschliessend erfolgten die Bestrahlung mit UVB, sowie die Quantifizierung der Marker.

Bei der **p38-MAPK** fand sich nach einer Bestrahlung mit der Dosis von 200 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und einer anschliessenden Inkubationszeit von 30 Minuten eine maximale p38-Aktivierung um den Faktor  $2.2 \pm 0.29$ . Die Schutzleistung von fünf Sonnenschutzpro-

dukten mit SPF zwischen 5 und 50+ wurde mit dem p38-MAPK-Assay charakterisiert. Alle Produkte unterschieden sich in der Menge an aktivierter p38-MAPK statistisch signifikant von der Positivkontrolle (ohne schützendes Produkt). Anhand des SPFs konnte jedoch nur eine Unterteilung der Produkte in eine Gruppe SPF 5 und eine Gruppe SPF 16 bis 50+ gemacht werden.

Die maximal gemessene Steigerung an **p53-Protein** betrug nach einer Bestrahlung mit  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UVB und einer darauf folgenden Inkubationszeit von 6 Stunden  $1.5 \pm 0.01$ . Die Ergebnisse der Experimente mit Sonnenschutzprodukten waren vergleichbar mit denjenigen mit p38-MAPK als Marker. Zwei Sonnenschutzprodukte mit SPF 50+ und 25, sowie der COLIPA Standard P3 (SPF 16) unterschieden sich in ihren p53-Proteinkonzentrationen kaum von der unbestrahlten Negativkontrolle. Einzig die reine UVA-Schutzformulierung mit einem tiefen SPF von 5 unterschied sich von den anderen Testprodukten. Somit konnten auch bei p53 als Zellschadenmarker lediglich zwei Gruppen ermittelt werden: 1) Produkte mit hohem, mittlerem und tiefem SPF (SPF 16 bis 50+) und 2) Produkte mit sehr tiefem SPF (SPF 5).

Der einzige UV-spezifische Marker waren die **CPD**. Zur Bestimmung der CPD konnten sowohl ein ELISA-Assay, als auch ein FACS-Assay etabliert werden. Die verwendete Bestrahlungsdosis betrug  $828 \text{ mJ/cm}^2$  mit einer anschliessenden Inkubationszeit von zwei Stunden. Beide Assays lieferten in ihrer Aussage vergleichbare Resultate, wobei sich der ELISA mit einer maximal detektierten Steigerung der CPD-Menge um Faktor 30 als sensitiver erwies. Die Analysetechnik FACS ergab eine maximale Steigerung um den Faktor 8. Von den dreizehn untersuchten Sonnenschutzprodukten waren acht Handelsprodukte und weitere fünf für diese Testzwecke selbst hergestellte Entwicklungsformulierungen. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit CPDs als Marker liessen eine detailliertere Aufteilung der Produkte anhand ihres SPFs zu. Mit der FACS-Quantifizierung konnten drei Gruppen erstellt werden: 1) Produkte mit hohem und mittlerem SPF (SPF 25 bis 50+), 2) Produkte mit tiefem SPF (SPF 16) und 3) Produkte mit sehr tiefem SPF (SPF 5). Die Klassierung anhand der ELISA-Resultate resultierte ebenfalls in drei Gruppen: 1) Produkte mit sehr hohem und hohem SPF (SPF 30+ bis 50+), 2) Produkte mit mittlerem SPF (SPF 25 und 30) und 3) Produkte mit tiefem und sehr tiefem SPF (SPF 5 und 16). Aus den Versuchen mit den Entwicklungsformulierungen konnte zudem die Erkenntnis gewonnen werden, dass CPDs bei den verwendeten Testbedingungen dieser Arbeit hauptsächlich durch UVB-Einfluss entstehen, was die in der Literatur vorherrschende Meinung bestätigte.

Von drei der fünf potentiellen Markern konnte ein *in vitro*-Testsystem etabliert werden, wobei sich insbesondere das Testsystem der CPD-Quantifizierung als geeignet für eine Klassierung der Schutzleistung von Sonnenschutzprodukten darstellte. Die DNA-Dimere sind in dieser Form zwar kein Ersatz für den SPF, da auch sie vor allem UVB-spezifisch sind, allerdings besteht zwischen DNA-Schädigungen und der Krebsentstehung ein besser bekannter Zusammenhang, als das beim Erythem der Fall ist.

Die Bestimmung der Cyclobutan Pyrimidin Dimere in der entwickelten Testanordnung erscheint geeignet um die Schutzleistung von Sonnenschutzprodukten bereits in der frühen Entwicklungsphase zu bestimmen. Durch diese Möglichkeit wird dem Entwickler von Sonnenschutzprodukten ein wichtiges Screeninginstrument in die Hand gegeben.

## Summary

Great importance is attributed globally to the protection against UV radiation and the resulting short and/or long-term damaging effects on the human skin. Increasing skin-cancer rates demonstrate the urgency of a broad-spectrum protection of the skin against sunlight and an extensive information and behavioural training for the population. Unlike earlier formulations (between 1985 and 2000), current sunscreen products contain UV filter combinations, with broader protection in the UVB and UVA range of the solar spectrum. The efficacy of the products is expressed by the sun protection factor (SPF) (*in vivo* determination), which is a measure of the protection against the development of erythema. However, SPF only characterises the protective performance in the UVB range. Determination of SPF is performed exclusively on humans, is time-consuming and expensive and is accompanied by the damaging of the skin of volunteers. Additionally the link between erythema and the development of skin cancer is not completely understood. The UVA protection capacity of a sun protection product can also be determined and the compliance with all requested EU recommendations is indicated with the UVA logo. The UVA protection factor (UVA-PF) can be determined with an accepted *in vitro* method. There is a worldwide research for additional parameters for characterizing the protective performance of sunscreen products.

The objective of the present work was the development of an *in vitro* test system to characterize the protective performance of formulations already during the development phase. In this context, markers suitable for the characterization of UV-induced damage are evaluated at cellular levels. Different cellular localisations, such as extracellular matrix, cytoplasmic range and nucleic region should be considered in the selection of potential cell damage markers.

Cytokines (interleukin 1 $\alpha$  and interleukin 8), p38-MAPK, p53, and cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) have been analysed experimentally as potential markers. Normal human keratinocytes (HNK) and immortalised HaCaT cells served as models and were exposed to UV radiation. Assay techniques such as ELISA and/or flow cytometry (FACS) were used for read-out evaluation.

The kinetics and dose-response relationships were determined for each marker in individual preliminary tests. Two of the five markers tested, delivered no reproducible results. The experiments performed with cytokines as potential cell damage markers were regarded as unsuitable due to the high divergence in the measurement values, and were not followed up.

In order to evaluate the selected test systems, different sunscreen products (SPF 5 to 50+) were analyzed. The products were applied to PMMA platelets and the latter were attached to the cell culture dishes. Following UV exposure the markers were quantified.

In the case of **p38-MAPK**, after exposure to a dose of 200 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and subsequent incubation period of 30 minutes, the maximal activation of p38 was  $2.2 \pm 0.29$ . The protective performance of five sunscreen products (SPF between 5 und 50+)

was characterized with the established p38-MAPK assay. All the products differed significantly in the amount of activated p38-MAPK compared to the positive control (no protecting product). By means of the SPF only a subdivision of the products into a SPF 5 group and a SPF 16 to 50+ group could be achieved.

The maximal measured increase in **p53 protein** after exposure to 100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and subsequent incubation period of 6 hours was  $1.5 \pm 0.01$ . The results of the experiments with sunscreen products were comparable to those found with p38-MAPK. Two sunscreen products with SPF 50+ and 25, as well as the COLIPA Standard P3 (SPF 16) differed hardly from the non-exposed negative control in terms of their p53 protein concentrations. Solely the formulation with pure UVA protection with a low SPF of 5 differed from the other test products. Hence, also with p53 as cell damage marker, merely two groups were achieved: 1) Products with a high, medium and low SPF (SPF 16 to 50+) and 2) Products with a very low SPF (SPF 5).

The only UV-specific marker were the **CPD**. For the determination of the CPD an ELISA assay as well as a FACS assay could be established. The exposure dose used, was 828 mJ/cm<sup>2</sup> with a subsequent incubation period of two hours. Both assays exhibited comparable results, whereby the ELISA, with a maximal detected increase of factor 30 in the CPD amount proved to be more sensitive. The analysis technique FACS produced a maximal increase of factor 8. Eight out of a total of thirteen tested sunscreen products were trade brands and five were development formulations, specifically compounded for these test purposes. The results from the experiments with CPDs as markers allowed a more detailed classification of the products by means of their SPFs. Three groups were compiled with the FACS quantification: 1) Products with high and medium SPF (SPF 25 to 50+), 2) Products with low SPF (SPF 16) and 3) Products with very low SPF (SPF 5). The classification using the ELISA Assay also resulted in three groups: 1) Products with very high and high SPF (SPF 30+ to 50+), 2) Products with medium SPF (SPF 25 and 30) and 3) Products with low and very low SPF (SPF 5 and 16). The experiments with the development formulations, revealed, that under the used test conditions CPDs mainly occur as a result of UVB influence, confirming the predominant opinion in the literature.

An *in vitro* test system could be established from three of the five potential markers, whereat the CPD quantification was best suitable for classification of the protective performance of sunscreen products. However these DNA dimers are no replacement for SPF, since they are also mainly UVB-specific, nevertheless there is a better known link between DNA damage and the development of cancer compared to erythema.

The determination of the cyclobutane pyrimidine dimers in the developed experimental set-up appears suitable for determining the protective performance of sunscreen products already in an early development phase. Therefore the assay provides an important screening instrument for developers of sunscreen products.

# 1. Einleitung

Im April 2011 wurde eine vom Bundesamt für Gesundheit in Auftrag gegebene Studie über Krebsarten und deren Häufigkeit in der Schweiz im Zeitraum zwischen 1983-2007 veröffentlicht. Stellvertretend für Hautkrebs wurden Melanome untersucht. Während des in der Studie untersuchten Zeitraums hat sich die Inzidenzrate in der Schweiz und anderen Teilen der Erde mehr als verdoppelt<sup>1</sup>. Eine weitere Erkenntnis war, dass die Schweiz im weltweiten Vergleich der Melanominzidenz den dritten Platz hinter Australien und Neuseeland einnimmt und in Europa gar den Spitzenplatz innehält (Abbildung 1).

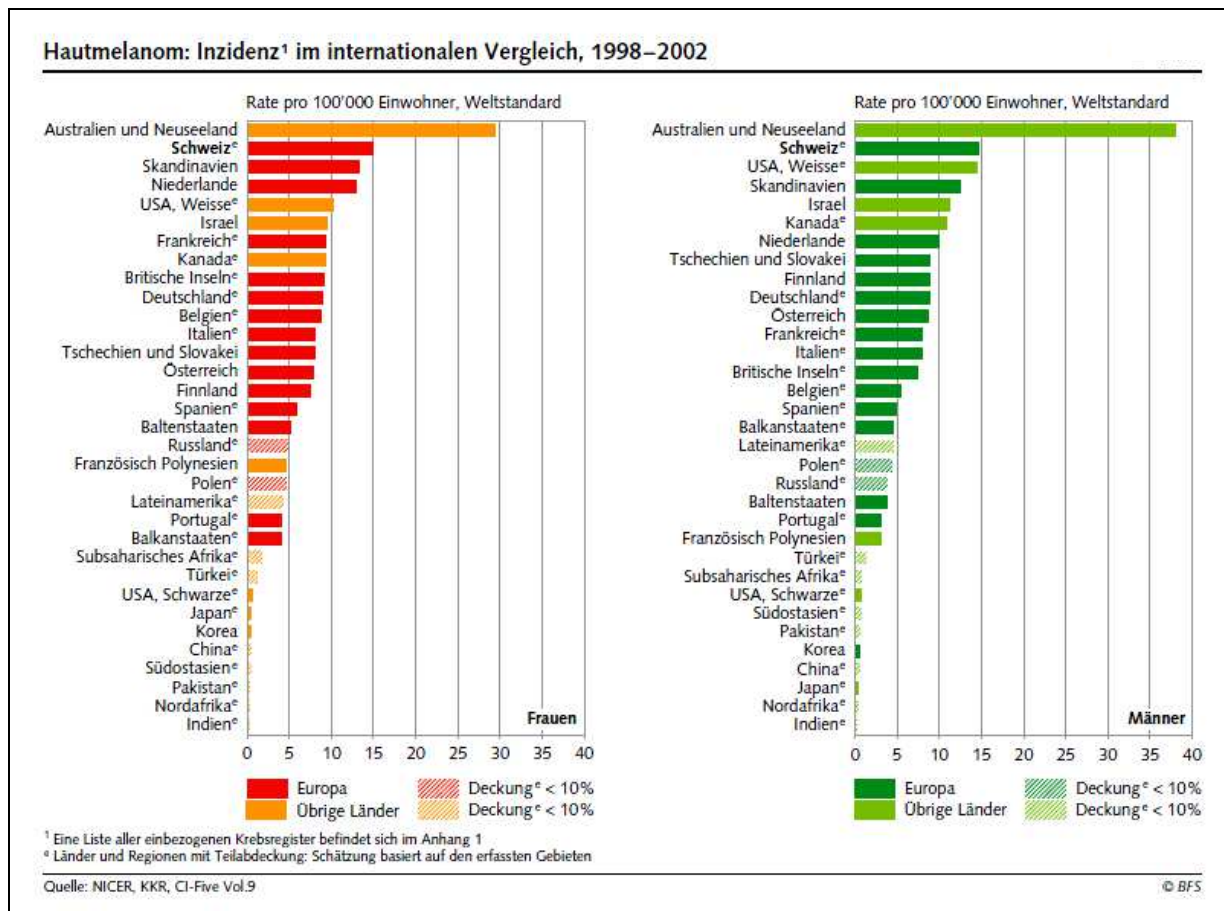


Abbildung 1: Melanominzidenzrate weltweit zwischen 1998-2002.

Die Studie zeigt die Aktualität und die grosse Wichtigkeit der Themen Sonnenschutz und Hautkrebs auf. Die Protektion vor ultravioletter (UV)-Strahlung basiert auf drei Säulen: das Aufsuchen von Schatten, das Tragen von Kleidung und die Anwendung von topischen Sonnenschutzprodukten. Der Bedarf an zuverlässigen, gut schützenden Produkten ist gegeben. Die Beurteilung eines Sonnenschutzproduktes erfolgt über die Schutzleistung, gegeben durch den Sonnenschutzfaktor (SPF), und den Schutzcharakter (Abdeckungsbreite des UV-Bereichs, UVA vs. UVB). Für die Einschätzung der Effektivität eines Sonnenschutzproduktes wird nach neuen Kenngrößen gesucht, die vor allem auch Abläufe auf Zellebene einbeziehen. Vor diesem Hintergrund wurden in vorliegender Arbeit potentielle Zellschadenmarker untersucht, welche mittels *in vitro*-Assay zur Bestimmung der Schutzleistung von Sonnenschutzformulierungen verwendet werden können.

## 1.1 Die Sonne

Die Sonne und ihre Strahlungsenergie sind essentiell für viele biologische Prozesse auf der Erde (z.B. Photosynthese, Vitamin D Produktion). Die Energie wird in Form von elektromagnetischer Strahlung freigesetzt und je nach Wellenlänge in drei verschiedene Bereiche mit fließenden Grenzen aufgeteilt (Abbildung 2).

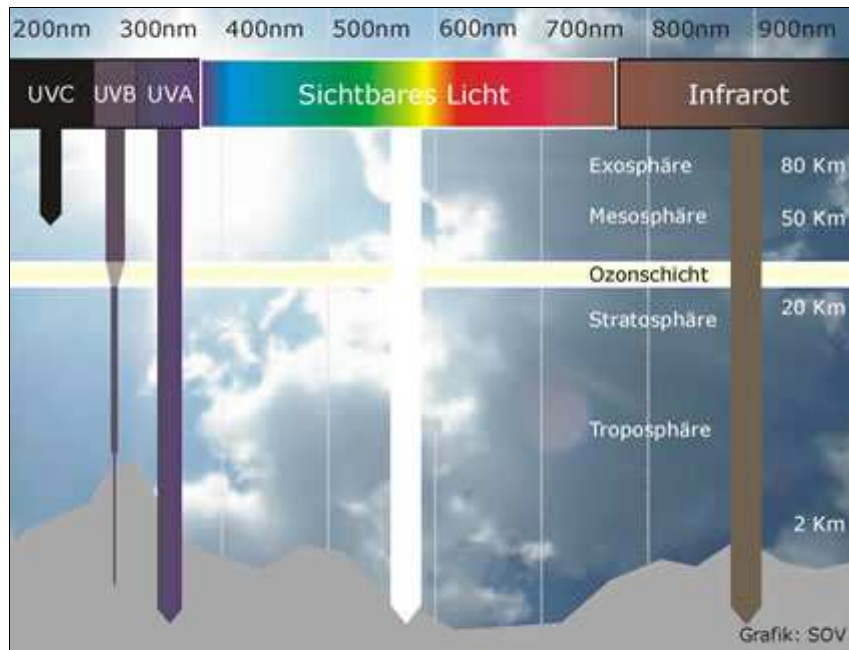


Abbildung 2: Wellenlängenspektrum des Sonnenlichts (mit Relevanz für die Erde).

Das sichtbare Licht macht den grössten Anteil (ca. 52% der Gesamtenergie) der auf der Erde auftreffenden Sonnenstrahlung aus. Es umfasst den Wellenlängenbereich von 380 (violett) bis 780 nm (rot), bestimmt Helligkeit und Farbgebung.

Die längerwellige Infrarotstrahlung (44%) reicht von 780 nm bis 1 mm und hat eine Wärmewirkung.

Die restlichen vier Prozent umfassen die ultraviolette (UV) Strahlung; sie ist nicht sicht- oder spürbar und hat grosse Energieintensität. Sie deckt den kurzwelligen Bereich von 100 bis 380 nm ab und kann nochmals in drei Untergruppen aufgeteilt werden.

**UVC (100-280 nm):** Sehr energiereich, erreicht die Erdoberfläche aufgrund der Ozonschicht nicht.

**UVB (280-320 nm):** Ist für die lang anhaltende Bräunung der Haut, die Cholecalciferolproduktion (Vitamin D<sub>3</sub>), sowie für das Sonnenerythem verantwortlich. Langfristig erhöht sich durch UVB das Risiko für Hautkrebs.

UVA (320-380 nm): Erreicht ungehindert die Erdoberfläche, dringt am tiefsten in die Haut ein und führt zu einer unmittelbaren und kurz anhaltenden Bräunung. UVA begünstigt Hautalterung und verschiedene Lichtdermatosen. Auch UVA-Exposition kann zur Entstehung von Hautkrebs beitragen.

Es gibt verschiedene Umweltfaktoren, die die Sonnenstrahlung beeinflussen. Dazu gehören der Sonnenstand, welcher sich je nach Breitengrad, nach Jahres- und Tageszeit ändert, die geographische Höhenlage (Berge oder Flachland), der Ozongehalt und auch das Ausmass der Luftverschmutzung.



## 1.2 Auswirkungen der UV-Strahlung auf den menschlichen Körper

An der Hautoberfläche wird die Strahlung entweder absorbiert, gestreut oder reflektiert. In Abhängigkeit der Eindringtiefe in die Haut variieren die Effekte. Der UVB-Anteil kann durch die verhornten Zellen der Epidermis (Keratinocyten) bis zu den Basalzellen gelangen. Das langwelligere UVA erreicht das Bindegewebe der Dermis und damit auch die dort lokalisierten Blutgefäße (Abbildung 3).

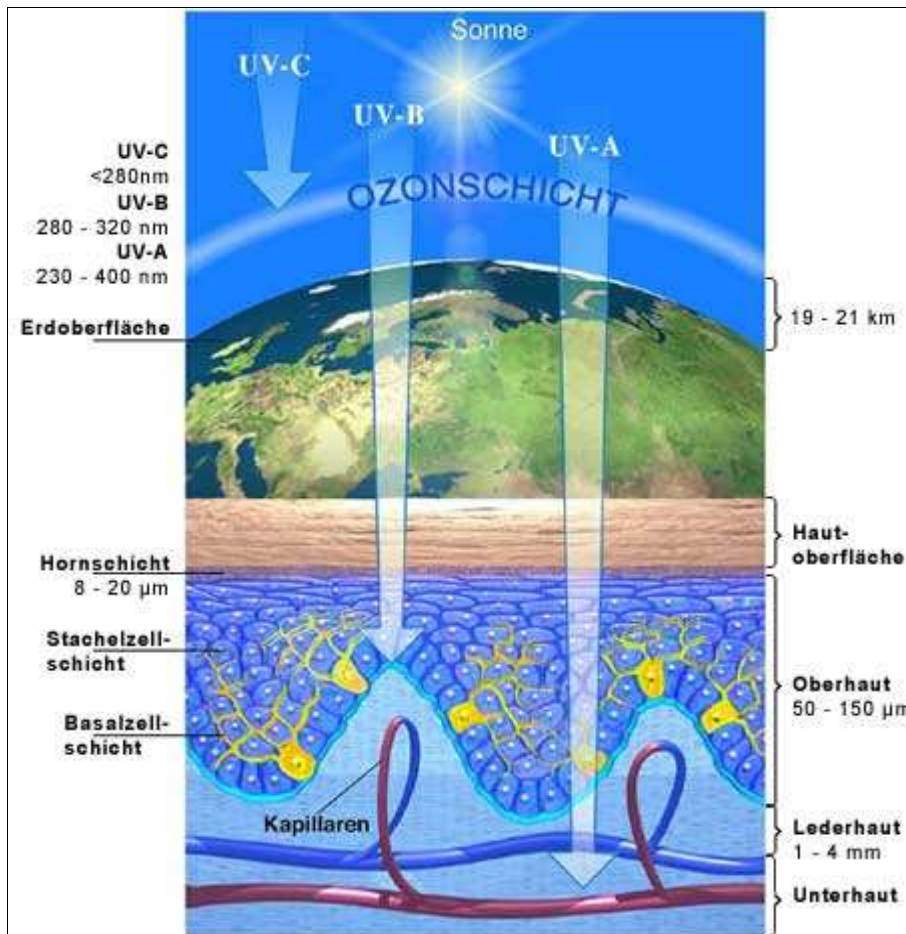


Abbildung 3: Eindringtiefe UV-Strahlung.

### 1.2.1. Lokale Wirkungen

#### Allgemeines

Viele Zellbestandteile (z.B. Organellen, Membranen und Zytoplasmaproteine) sind von der Wirkung der elektromagnetischen Strahlung betroffen. Bei Nukleoproteinen, Bausteine der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA), kommt es zu Dimerisierungsreaktionen (Kapitel DNA-Schäden, S.28/29) und/oder Photoadditionen (chemische Addition mit Hilfe von Licht oder elektromagnetischer Strahlung). Die Zellteilung (DNA-Transkription, Replikation u.a.) und allgemeine Zellstoffwechsel und -synthesevorgänge werden gestört. Das kann, vor allem bei der gestörten Signaltransduktion durch die veränderte DNA, zu Mutationen und so zu einem späteren Zeitpunkt zu kanzerösen Veränderungen oder direkt zum Zelltod führen. Durch Oxidationsreaktionen bei Lipiden kann das Gleichgewicht ganzer Membransysteme dysreguliert werden, was gegebenenfalls zum Zelltod führt.

UV-Strahlung modifiziert die Struktur von Proteinen und auf der Stufe der Aminosäuren kann es zu Decarboxylierungen und Desaminierungen kommen.

Das Sonnenlicht hat auch positive Effekte auf die Gesundheit des Menschen. Neben der Regulierung des circadianen Rhythmus und der Stimmungslage, ist die Vitamin D-Synthese essentiell <sup>2</sup>. Die UVB-Strahlung induziert die Umwandlung von Provitaminen in Vitamin D. Die Hauptvertreter Ergo- und Cholecalciferol werden dann in der Leber metabolisiert und regulieren schliesslich den Calcium- und Phosphat-Stoffwechsel.

## Haut

Generell führt Sonneneinstrahlung zur Freisetzung verschiedener Gewebshormone (Kinine, Prostaglandine, biogene Amine) <sup>3</sup>, die hauptsächlich ins Entzündungsgeschehen eingreifen.

UVB hat verschiedene Auswirkungen auf die Haut. In einer ersten Phase setzt als Bräunungsreaktion die indirekte Pigmentierung ein (siehe Kapitel 1.4.1.). Nach längerem, intensivem UVB-Einfluss entsteht das Strahlenerthem. Es handelt sich hierbei um eine Entzündungsreaktion, die sichtbar wird, sobald die sogenannte Erythemschwelle (Kapitel 1.5.4) überschritten wird und der Eigenschutz der Haut erschöpft ist. Typische Entzündungszeichen wie Schwellung, Rötung, Schmerz und zum Teil Juckreiz sind die Folge. Der klassische Sonnenbrand ist mit einer leichten Verbrennung vergleichbar und es kann bis zur Blasenbildung oder selten gar zu Nekrosen kommen.

UVB schädigt die DNA direkt <sup>4</sup>. Bei Überlastung der körpereigenen Reparaturmechanismen kommt es zu Mutationen, welche längerfristig zur Entartung der Zellen und zu Hautkrebs führen <sup>5,6</sup>.

UVA bewirkt eine unmittelbare, kurz anhaltende Pigmentierung, sowie längerfristig Hautalterung. Da diese Strahlenart bis ins Bindegewebe vordringen kann, setzt sie dort verschiedene Mechanismen in Gang. Durch einen Elastizitätsverlust der Haut kommt es zur Faltenbildung.

Zusätzlich ist UVA auch für eine Reihe von Lichtdermatosen verantwortlich (Lupus erythematoses, Mallorca Acne, sogenannte Sonnenallergie).

Im Gegensatz zu UVB beeinträchtigt UVA die Hautzellen nicht direkt, sondern indirekt. Durch UVA-Strahlung vermehrt gebildete Sauerstoffradikale schädigen die DNA durch die Erzeugung von Strangbrüchen, die zu Strukturmodifikationen führen können. Dadurch kommt auch UVA eine Rolle bei der Krebsentstehung zu.

Obschon UVB-Auswirkungen auf die Haut meist getrennt von UVA-Auswirkungen betrachtet werden, ist eine exakte Trennung der beiden Bereiche ultravioletter Strahlung aufgrund deren fließenden Übergangs und deren gegenseitigen Wechselwirkungen nicht möglich.

## Augen

Die Augen sind sehr empfindlich gegenüber der ultravioletten Strahlung. Die Hornhaut und die Linse verhindern zu einem grossen Teil das Eindringen von UV in die tiefer liegenden Bestandteile des Auges. Durch übermässige Strahlenbelastung so-

wie altersbedingte Veränderungen kann UV-Strahlung in das Auge vordringen und folgende Beeinträchtigungen hervorrufen:

UVB schädigt die DNA der Linsenepithel- und der Hornhautzellen und bei akuter UV-Einwirkung hoher Intensität kommt es zu einer Entzündung mit Zytokinausschüttungen. Reaktive Sauerstoffspezies können Augengewebe schädigen.

In der Linse kann UV-Strahlung zur Beeinträchtigung der Linsenepithelzellen und ihren Pigmenten führen und so eine Trübung der Linse (Katarakt) zur Folge haben <sup>7</sup>.

Die Retina besteht aus Photorezeptorzellen und den darunter liegenden epithelialen Retinapigmentzellen. Letztere ernähren die Rezeptorzellen und produzieren ausserdem Melanin zum Schutz der Retina. Auch hier führt UV-Strahlung aus oben erwähnten Gründen zu einer Schädigung des Auges. Durch eine Entzündung entstehende Radikale schädigen die Retinapigmentzellen und es kommt aufgrund fehlender Versorgung der Rezeptorzellen zur Makuladegeneration, einer Erblindung.

### **1.2.2. Systemische Wirkungen**

Neben der Vitamin D Produktion steht die immunsuppressive Wirkung von UV-Strahlung im Vordergrund <sup>6,8</sup>. Es werden Langerhans-Zellen, zuständig für die Antigenpräsentation, beeinträchtigt und in ihrer Funktion gestört. Dies hat beispielsweise zur Folge, dass die Entstehung von Kontaktallergien stark abgeschwächt oder gar nicht vorhanden ist oder dass Herpes (re)aktiviert und deren Vermehrung begünstigt werden kann. Durch die Immunsuppression werden Krebszellen nicht mehr als fremd erkannt und somit nicht bekämpft, was sich auf den Körper besonders nachteilig auswirkt.

Die Durchführung von klinischen Studien zur Krebsentstehung und –entwicklung ist aus ethischer Sicht, sowie aufgrund des eher langen Zeitraums bis zur Manifestierung von Krebs sehr schwierig. Personen mit Organtransplantationen sind wegen ihrer Immunsuppression sehr anfällig auf UV-Strahlung und erkranken dementsprechend häufig (ein Drittel bis die Hälfte innerhalb von zehn Jahren nach Transplantation) an Hautkrebs <sup>9</sup>. Dadurch werden sie oft als Studienpopulationen in klinischen Studien zu Krebs ausgewählt.

## 1.3 Der Aufbau der Haut und dort vorkommende Krebsarten

Die Haut ist die äussere Abgrenzung des Körpers gegen die Umwelt. Sie erfüllt wichtige Aufgaben wie Schutz der inneren Gewebe gegen Mikroorganismen, sowie gegen chemische und physikalische Schädigungen, Verhinderung einer übermässigen Austrocknung, Regulierung der Körpertemperatur und sie dient als Sinnesorgan<sup>10</sup>. Oftmals wird die Haut als grösstes Organ des Menschen bezeichnet, weist sie doch eine Fläche von beinahe 1.7 m<sup>2</sup> auf<sup>11</sup>.

Die Haut gliedert sich in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut), wobei die beiden Ersteren auch unter dem Begriff Kutis zusammengefasst werden können (Abbildung 4). Jede dieser drei Schichten besitzt einen charakteristischen Aufbau und erfüllt spezifische Aufgaben.

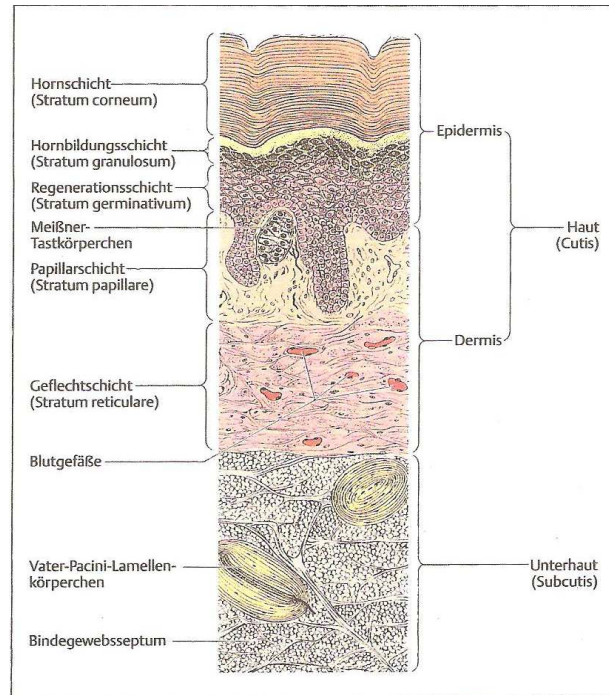


Abbildung 4: Schematischer Hautaufbau, Querschnitt.

### 1.3.1. Epidermis

Sie bildet die äusserste Schicht der Haut und besteht aus mehrschichtigem, verhornendem Plattenepithel (*Stratum corneum*). Je nach Körperstelle ist die Epidermis unterschiedlich dick, die grösste Dicke weisen Hand- und Fusssohlen auf. Der Hauptzelltyp dieser Region sind die Keratinozyten, weitere Zellen wie Melanozyten, Langerhans-Zellen (Immunzellen) und auch Merkelzellen (Sinneszellen) sind vorhanden. Die Versorgung dieser Aussenschicht mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgt über Papillen (Ausstülpungen) der Dermis, über Drüsen und Haarbälge. Ein stetiger Verhornungsprozess ist charakteristisch für die Epidermis. Keratinozyten wandern von innen gegen aussen und verhornen dabei immer mehr. Der vollständige Erneuerungsprozess der Epidermis dauert etwa 28 Tage<sup>12</sup>. Es können von aussen nach innen die folgenden Schichten unterschieden werden:

#### Stratum corneum (Hornschicht)

Abgeplattete, vollkommen verhornte Zellen sind die Hauptbestandteile, sie lösen sich kontinuierlich in Schüppchen von der Haut ab. Diese Schicht erfüllt die Barriereaufgaben der Haut, verhindert einerseits eine zu starke Wasserverdunstung und andererseits das Eindringen von unerwünschten Fremdstoffen. Unterstützend bei Letzterem wirkt auch das saure Milieu der Hautoberfläche mit einem pH von 5<sup>10</sup>. Er begünstigt ein Wachstum der Komponenten der normalen Hautmikroflora wie z.B. Staphylokokken, Propionibakterien und Pityrosporum-Arten und verhindert gleichzeitig eine Ansiedelung von pathogenen Keimen.

### Stratum granulosum (Körnerschicht)

Diese Schicht ist nur zwei bis fünf Zellen dick und beinhaltet flache Zellen mit kleinem Zellkern. Von diesen werden Ceramidgemische in den Interzellularraum abgesondert, die als Bestandteile der epidermalen Lipide ebenfalls zur Barrierefunktion beitragen.

### Stratum spinosum (Stachelzellschicht)

Weist eine Dicke von vier bis acht Zellschichten auf. Die bereits geschrumpften, stachelförmigen Zellen sorgen hier für eine Verfestigung des Zellverbandes.

### Stratum basale (Basalschicht)

Grenzschrift zur darunterliegenden Dermis. Hier befinden sich zylinderförmige Zellen, welche sich kontinuierlich teilen. Die neu gebildeten Zellen wandern Schicht für Schicht nach oben, wobei sie sich differenzieren, den Kern verlieren und langsam absterben. In dieser Zone gibt es ausserdem Melanozyten (Pigmentierung) und Merkelzellen (Druckempfindungen), welche mit der Basalmembran assoziiert sind.

Stachelzellschicht und Basalschicht werden manchmal auch unter dem Namen *Stratum germinativum* (Keimschicht) zusammengefasst.

## **1.3.2. Dermis**

Der Zusammenhalt mit der Epidermis wird durch Bindegewebspapillen der Papillarschicht in der Dermis gewährleistet. Sie reichen zapfenförmig in die Epidermis und durch diese Anordnung kommt eine Verzahnung zustande. Das *Stratum papillare* (Papillarschicht) ist zudem reich an feinen Fibrillen, an Gewebsmakrophagen und Mastzellen und auch an Kapillaren, welche die Versorgung wahrnehmen<sup>10</sup>.

Daran schliesst sich das *Stratum reticulare* (Geflechschicht) an. Wie es der Name bereits andeutet, befindet sich hier ein Netz aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. In Bündeln zusammengefasst sind sie geflechtartig angeordnet, was der Dermis einerseits ihre Elastizität und andererseits ihre Reissfestigkeit verleiht. Dazwischen eingelagert sind Fibroblasten, Nervenfasern, sowie Blut- und Lymphgefässe.

## **1.3.3. Subkutis**

Die Grenze zwischen Dermis und Subkutis ist fliessend. Dieser Bereich der Haut besteht vorwiegend aus lockerem, lamellar angeordnetem Bindegewebe, welches Fettgewebe-Läppchen umfasst. Diese dienen dem Kälteschutz und auch als Energiespeicher und sind je nach Körperregion in unterschiedlicher Menge vorhanden.

Die Subkutis beherbergt ausserdem ein Netz aus Arterien und Venen. Davon gehen kleinere Gefässe wie Arteriolen und Venolen in die oberen Hautschichten ab. Diese versorgen Papillen und Kapillaren, welche ihrerseits via Diffusion die Epidermis ernähren, da sich dort keine Gefässe befinden.

In der Haut befinden sich diverse Nerven, sie leiten Informationen zu Druck, Vibration, Temperatur, Schmerz und Juckreiz weiter und auch der Tast- und der Lagesinn sind dort lokalisiert.

Des Weiteren hat die Haut verschiedene Anhangsgebilde. Dazu gehören Nägel, Haare, Talg-, Schweiss- und apokrine Drüsen.

Auf die Haut, als äussere Schutzschicht des Körpers, treffen Fremdeinflüsse zuerst; sie ist somit auch der UV-Strahlung stark ausgesetzt. Sonnenexposition findet im Alltag häufig statt, sei es aus arbeitsbedingten Gründen bei Freiluftberufen oder in der Freizeit beim Sport oder im Urlaub. Bei nicht ausreichendem oder gar fehlendem Schutz kann die Haut massive Schädigungen erfahren, die sich nicht zwangsläufig sofort, sondern insbesondere zeitversetzt äussern. Zu den späteren Auswirkungen gehören die verschiedenen Hautkrebsarten.

#### 1.3.4. Das Basaliom (Basalzellkarzinom)

Betroffen sind die basalen Zellschichten, sowie Haarfollikel und es handelt sich um den häufigsten malignen Hautkrebstyp. Das Basaliom ist als ein der Haut breit aufsitzendes oder in der Mitte eingesunkenes Knötchen mit derber Konsistenz erkennbar (Abbildung 5). Oftmals weisen sie feine, blutrote Gefässreiser sogenannte Teleangiectasien auf<sup>10</sup>.

Basaliome können auch pigmentiert sein. Sie bilden sich auf sonnenexponierten Hautstellen, vor allem bei Personen mit hellem, sonnenempfindlichem Hauttyp (Hauttyp I-II).



Abbildung 5: Basaliom.

Ein langsames Wachstum, lokal infiltrierend und destruktiv ist charakteristisch für diese Krebsart. In den allermeisten Fällen kommt es zu keiner Metastasierung. Diese Punkte führen dazu, dass bei früher Diagnose sehr gute Heilungschancen bestehen.

#### 1.3.5. Das Spinaliom (Plattenepithelkarzinom)



Beim Spinaliom sind die Zellen des *Stratum spinosum* betroffen. Dieser Krebs breitet sich normalerweise rascher aus als ein Basaliom und es besteht zudem die Möglichkeit einer Metastasierung in die regionalen Lymphknoten, was eine Heilung erheblich erschwert. Ein Spinaliom entwickelt sich meist aus einer aktinischen Keratose (Präkanzerose). Dabei handelt es sich um eine anfangs kleine, raue und unscharf begrenzte Hautveränderung, welche über die Zeit in eine weissliche, dicke hyperkeratotische Stelle übergeht, die sich sehr rau anfühlt (Abbildung 6).

Abbildung 6: Spinaliom.

### 1.3.6. Das Melanom

Das Melanom gehört zu den bösartigsten, gefährlichsten Krebsarten überhaupt. Durch seine extrem früh einsetzende, ausgeprägte Metastasierung in Blut- und Lymphgefäße ist es nur bei ganz früher Erkennung noch zu heilen. Oftmals wird es jedoch zu spät entdeckt und hat bereits in viele Orte im Körper metastasiert, was dann zum Tod führt.

Der grösste Anteil der Melanome entsteht auf normaler, gesunder Haut, etwa 30% entwickeln sich aus bereits bestehenden Muttermalen (Naevuszellnaevus) <sup>10</sup>.

Optisch handelt es sich um tiefbraune bis blauschwarze, knotige Tumore (Abbildung 7), die in ihrer Anfangsphase ein horizontales Wachstum aufweisen. Gerade in dieser

Phase sind sie durch Herausschneiden noch relativ gut zu entfernen. Eine regelmäßige Hautuntersuchung nach der ABCDE-Regel zu Hause ist empfehlenswert und kann lebensrettend sein. Bei Vorkommen eines solchen Punktes oder plötzlicher Veränderung eines Muttermals sollte rasch der Hautarzt aufgesucht werden.



Abbildung 7: Melanom.

- A Asymetrie des Flecks
- B Unregelmässige Begrenzung
- C Veränderung der Farbe (Colorit)
- D Veränderung des Durchmessers
- E Gibt es eine Erhebung des Flecks

## 1.4 Schutz vor der Sonne

Neben der Vermeidung der Sonnenexposition stehen diverse Möglichkeiten zur Verfügung um sich vor ihrer Strahlung zu schützen. Es gibt zwei verschiedene Ebenen des Sonnenschutzes: die natürlichen, körpereigenen Schutzmechanismen mit der Melaninsynthese, der Ausbildung einer Lichtschwiele, körpereigenen Reparaturmechanismen und der Urocaninsäure, sowie die artifiziellen Schutzmechanismen wie Aufsuchen von Schatten, Tragen von schützender Kleidung und Anwendung von Sonnenschutzprodukten. Wichtig dabei ist, dass der körpereigene Schutz nicht sofort vorhanden ist, sondern über einen Zeitraum von zwei, drei Wochen aufgebaut werden muss<sup>13</sup>.

### 1.4.1. Körpereigene Schutzmechanismen

Ein effektiver Prozess ist die Synthese des Pigmentes Melanin. Dieses wird von Melanozyten produziert, welche sich in der Basalschicht der Epidermis befinden und durch ultraviolette Strahlung stimuliert werden. Das Verhältnis von Keratinozyten zu Melanozyten beträgt etwa 40:1<sup>13</sup>. Melanozyten versorgen Keratinozyten über lange Zellfortsätze mit Melanosomen. Das sind Vesikel, in welchen die Produktion von Melanin stattfindet und worin dieses dann auch gespeichert wird. Das Pigment entsteht aus Tyrosin, das mittels Tyrosinase zuerst zu DOPA und dann zu Melanin umgewandelt wird. In den Keratinozyten legt es sich schützend über den Zellkern. Es gibt zwei Formen von Melanin; das häufigere schwarz-braune Eumelanin, wie auch das gelb-rote Phäomelanin (Abbildung 8). Ersteres wird durch Strahlung mit Wellenlängen von 280-380 nm reversibel verändert, es kommt zu Bräunungsreaktionen und zur Verhinderung der Bildung freier Radikale. Die Melaninkörnchen streuen die Strahlung mit Wellenlängen kleiner als 400 nm. Die Längerwelligeren absorbieren sie und wandeln sie in Wärme um, die direkt von der Oberhaut an die Umgebung abgegeben wird, was vor einer Überwärmung schützt.

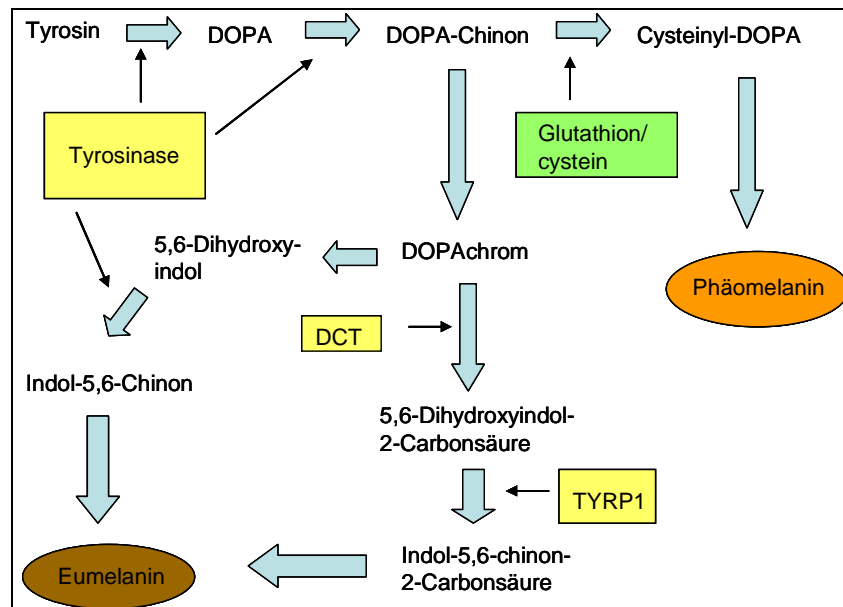


Abbildung 8: Melaninsynthese; DCT (DOPachrom Tautomerase), TYRP1 (Tyrosinase-related Protein 1).

Die oben erwähnte, durch UVB hervorgerufene indirekte Pigmentierung, führt zu einer lang anhaltenden Bräune, die allerdings erst nach einigen Tagen sichtbar wird.



Es setzt eine Vermehrung aktiver Melanozyten, wie auch eine Aktivierung der Tyrosinkinase ein, was eine erhöhte Melaninmenge zu Folge hat und mehrere Tage in Anspruch nimmt <sup>13</sup>.

Im Gegensatz dazu ist die direkte Pigmentierung von kürzerer Dauer, erfolgt aber rasch. Dabei handelt es sich um eine Oxidation und Nachdunkelung von Melaninvorstufen durch UVA-Einfluss. Ist die UVA-Intensität sehr hoch, kann Melanin gar neu produziert werden, was eine intensive und lang anhaltende Bräune hervorruft.

Einen Schutzeffekt hat auch die Hornschicht der Haut, deren Dicke innerhalb der Hautregionen variiert. Die Dicke hat einen Einfluss auf das Ausmass des Schutzes; so können zum Beispiel 10 µm die Intensität von kurzwelliger Strahlung bereits halbieren <sup>13</sup>. Eine wiederholte UVB-Exposition kann zu einer Verdickung der Hornschicht führen. Stufenweise Erhöhung der Intensität bis unter die Erythemschwelle ergibt nach zwei bis drei Wochen die sogenannte Lichtschwiele, welche die maximal mögliche Dicke aufweist. Diese Schicht reflektiert, streut und filtert das ankommende, kurzwellige Licht und schützt so die oberen Zellschichten.

Die Zellen der Haut haben auch die Möglichkeit auf DNA-Ebene Schäden (v.a. Einzelstrangveränderungen) selbst zu reparieren. Im Strang werden Dimere gebildet (Kapitel 1.8.5.), Pyrimidine hydriert oder es entstehen gar Strangbrüche. Dies führt zu einer Änderung der Grundstruktur, was eine reibungslose Weitergabe der genetischen Information verunmöglicht. Das geschieht bereits bei geringen Strahlungsdosen, bleibt aber aufgrund der sofort einsetzenden Eigenreparatur meist unbemerkt und ohne Folgen. Erst wenn diese Reparatur durch zu hohe Anzahl von Schäden oder durch zu kurze Abstände zwischen den Strahlungsexpositionen überlastet ist, entstehen Schäden. Es gibt zwei Reparationsvorgänge; die Exzisionsreparatur und die Photoreaktivierung. Bei Ersterer werden mit Enzymen die Fehlstellen erkannt, herausgeschnitten und durch intakte Stücke ersetzt. Die Enzyme erledigen diese Schritte ohne weitere Hilfe. Bei der Photoreaktivierung <sup>14</sup> hingegen wird die Pyrimidinverbindung direkt von einem energieabhängigen Enzym gespalten. Diese Energie bezieht es durch die Absorption von UV mit Wellenlängen zwischen 340-430 nm. Solche Reparaturmechanismen setzen sofort ein und nehmen Minuten bis Stunden in Anspruch.

Die Urocaninsäure entsteht bei einer Desaminierung von Histidin. Durch Sonnenstrahlung nimmt diese Umwandlung in der Epidermis, wo Histidin ein Bestandteil des Keratins ist, um bis zu hundertfach zu <sup>13</sup>. Die Urocaninsäure kann die Energie aufnehmen und eine Isomerisierung vom trans- zum cis-Zustand induzieren. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 265 nm. Später wird die Energie dann als Wärme abgegeben und die ursprüngliche Konformation wieder hergestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Sonnenstrahlung einerseits dazu führt, dass der Körper eigene Schutzmechanismen gegen UV aufbauen kann, andererseits bei zu hoher Intensität beträchtliche Schädigungen hervorruft. Das Endergebnis hängt letztlich von der erhaltenen UV-Dosis ab.

#### **1.4.2. Künstliche Schutzmassnahmen**

Der Aufenthalt im Schatten oder geeignete Bekleidung schützen am besten vor den Schäden der ultravioletten Strahlung. Bei der Kleidung sollte auf dicht gewobenes Material, Kunststofffasern (Polyester) und kräftige Farben geachtet werden. Nasses

Gewebe wird für UV Strahlung durchlässiger. Für Kinder und Personen mit empfindlicher Haut gibt es zudem UV-Schutz-Textilien, welche entweder speziell dicht verarbeitet oder mit UV-Filtern vorbehandelt worden sind <sup>15</sup>.

Wichtig ist auch der Schutz der Augen. Entscheidend bei Sonnenbrillen ist eine genügende Strahlenabschirmung, d.h. gute Schutzgläser mit ausreichender UV-Absorption. Die Qualität der Schutzwirkung ist europäisch reguliert (CE-Zeichen und die Aufschrift EN 1836:1997).

Neben den wirklich effektiven Schutzmassnahmen wie Schatten und Kleidung gibt es den weniger effektiven, aber populären topischen Sonnenschutz. Sonnenschutzprodukte erhöhen bei korrekter Anwendung die Eigenschutzzeit der Haut. Der Schutzcharakter und –wirkung sind abhängig von den Filtern und der aufgetragenen Dosis (von der European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association COLIPA werden 2 mg pro Quadratcentimeter empfohlen). Grosse Herausforderungen ergeben sich durch die häufig inadäquate Dosierung und den mechanischen Abrieb.

## 1.5 Der Aufbau von Sonnenschutzprodukten

Die zentralen Bestandteile von sämtlichen Sonnenschutzprodukten sind die Filter, welche für den UV-Schutz verantwortlich sind und in eine Grundlage (Vehikel) eingearbeitet werden. Alle Produkte können entsprechend ihrer Filter in zwei grosse Gruppen unterteilt werden; in solche mit organischen Filtern oder anorganischen Filtern.

### 1.5.1. Anorganische Filter

Sie bestehen aus anorganischen Partikeln, die in der Präparatgrundlage suspendiert vorliegen. Ihren Schutz entfalten sie durch Reflexion und Streuung der auftreffenden Strahlung. Entscheidend für die Schutzwirkung sind die Partikelkonzentration, die Partikelgrösse und die Partikeldispersion. Ein Negativaspekt ist der sogenannte „Weisseffekt“. Die Mikropigmente hinterlassen eine weissliche Schicht auf der Haut, was aus kosmetischer Sicht unvorteilhaft ist. Diese Schwierigkeiten lassen sich zum grössten Teil durch die Verwendung von Nanopartikeln (1-100 nm) lösen. Es bestehen allerdings diverse Kontroversen bezüglich deren Verwendung in Sonnenschutzprodukten und Kosmetika allgemein. Kritiker führen eine schädigende Wirkung für den Körper und die Umwelt ins Feld. Sie sind der Meinung, dass diese Stoffe durch die Haut in den Körper eindringen und dort für Zytotoxizität, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und Phototoxizität<sup>16,17</sup> sorgen. Bisher gibt es jedoch keine Studien am Menschen, welche eine solche Penetration in lebende Hautschichten und tiefer bei intakter Haut belegen. Anhand der momentanen Datenlage kann nicht von einer schädigenden Wirkung der Nanopartikel auf den Menschen und/oder die Umwelt ausgegangen werden<sup>18,19</sup>. Es braucht aber noch weitere Studien und Abklärungen um den genauen Verbleib und die Elimination dieser Stoffe zu klären<sup>18</sup>.

Vorteile dieser Filterart sind einerseits die Inertheit, sowie die gute Photostabilität, weshalb sie sich gut für Personen mit empfindlicher Haut eignet.

Die eingesetzten anorganischen Filter sind Titandioxid (TiO<sub>2</sub>) und Zinkoxid (ZnO), beides Breitbandfilter, die sowohl im UVB- als auch im UVA-Bereich eine Schutzwirkung aufweisen (Abbildung 9).

### 1.5.2. Organische Filter

Im Gegensatz zu den Partikeln der anorganischen Filter, welche auf der Haut bleiben, können chemische Filtersubstanzen in die Epidermis eindringen und können auch systemisch aufgenommen werden. Strukturell sind es organische Moleküle meist Aromaten mit konjugierten Doppelbindungen. Die Strahlungsenergie wird absorbiert und mit dieser können Elektronen aus inneren Schalen auf äussere Schalen angehoben werden. Schritt für Schritt wird die Energie in Form von Wärme- oder Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben und die Elektronen fallen in ihren Ursprungszustand zurück.

Es gibt Diskussionen bezüglich der Permeabilität einzelner UV-Filter, verbunden mit der Frage, ob diese durch die Haut gelangen und systemisch aufgenommen werden können. Bei kleinmolekularen Filtern ist das durchaus möglich und teilweise auch nachgewiesen<sup>20,21</sup>. Es besteht deshalb der Trend zur Verwendung von lipophilen Filtern mit hohem Molekulargewicht (> 500 Dalton), die zu gross sind um in relevanten Mengen in die tieferen Hautschichten zu permeieren.

Nachteilig kann sich auch die Photoinstabilität einiger chemischen Filter, z.B. Derivate der Zimtsäure, auswirken.

Häufig werden Abkömmlinge der p-Amino-Benzoesäure, der Zimtsäure (EHMC) sowie Campherbindungen (TDSA) (Abbildung 9) verwendet.

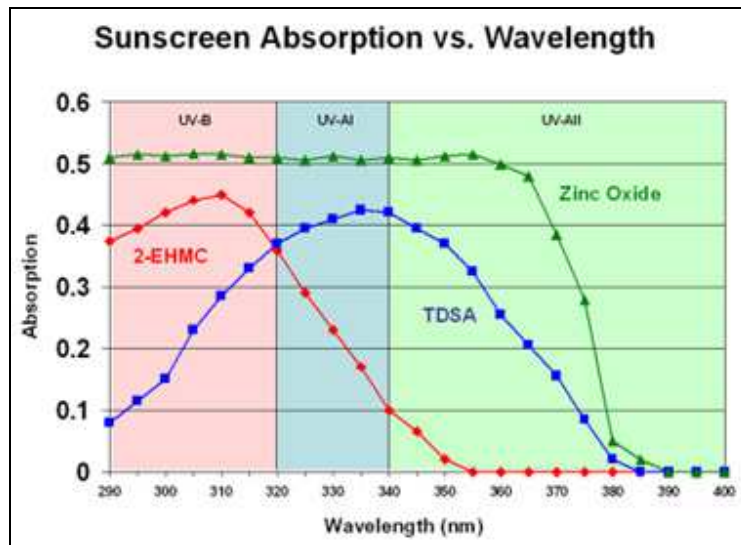


Abbildung 9: Absorptionsvergleich physikalische und chemische Filter.

Eine neue Generation von Filtern bilden die photostabilen Breitbandfilter Tinosorb M und Tinosorb S. Tinosorb M liegt partikulär vor, ist also in der Formulierung suspendiert. Partikuläre, organische Filter haben den Vorteil, dass sie Licht reflektieren, streuen und auch absorbieren, während lösliche, organische Filter die Strahlung ausschliesslich absorbieren.

### 1.5.3. Filter und ihre Wirkungen

In Sonnenschutzprodukten sind immer mehrere Filter vorhanden, einerseits um eine breite Abdeckung des Spektrums zu erhalten, andererseits um die Schutzwirkung zu potenzieren. Filter können sich gegenseitig einen Schutz bieten, der zu einer Erhöhung der Photostabilität eines Produktes führt.

Wichtig für die Filterwahl einer Formulierung ist unter anderem deren Absorptionsbereich. Zentral sind das Absorptionsmaximum, also der Wellenlängenbereich in dem der Filter am meisten Strahlung absorbieren kann, sowie der ganze Bereich, in welchem der Filter eine Absorptionswirkung aufweist. Es kann zwischen UVA-, UVB- und Breitbandfiltern unterschieden werden.

Beispiele dazu Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12.



## Breitbandfilter Methylen bis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (MBBT), Tinosorb M

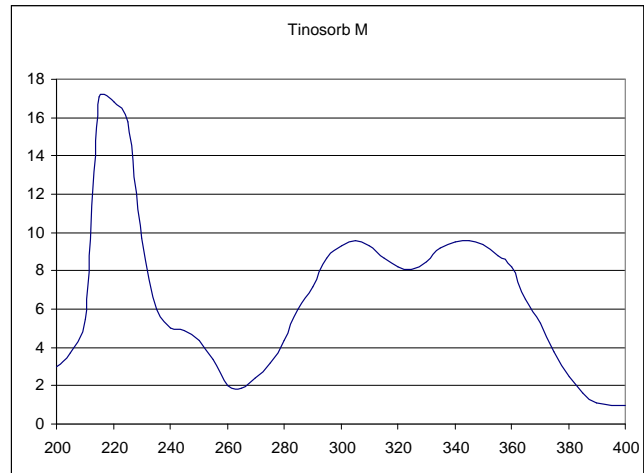
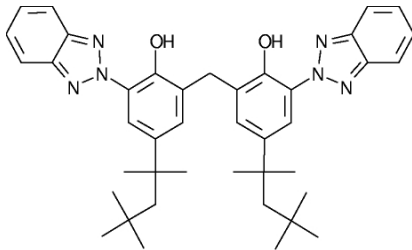


Abbildung 12: Strukturformel und Absorptionsspektrum von Tinosorb M.

Durch Mischen diverser Filter kann der Schutz erhöht und der ultraviolette Bereich breit abgedeckt werden.

### 1.5.4. Der Sonnenschutzfaktor (SPF)

Jeder Mensch hat eine individuelle Eigenschutzzeit. Das ist die Zeitspanne, während der sich ohne Schutz noch gerade keine Rötung (Erythem) bildet. Nach Ablauf dieser Zeit (=Erythemschwellenzeit) beginnt sich die Haut zu röten, die Erythemschwelle ist überschritten. Die Dosis an UV, welche eine gerade noch wahrnehmbare Rötung hervorruft, nennt sich minimale erythemale Dosis (MED).

Beim Erythem handelt es sich um eine Entzündungsreaktion der Haut, welche eine Ausschüttung verschiedener Zytokine zur Folge hat, die ihrerseits als Initiatoren für diverse intrazelluläre Kaskaden dienen (siehe Kapitel 1.6.2.). Mögliche, schädigende Endergebnisse dieser Kaskaden sind die Zerstörung von Proteinen und Zellwandstrukturen, Aufrechterhaltung der Entzündung, sowie die Einleitung des programmierten Zelltodes.

Die verschiedenen Wellenlängen des UV-Spektrums haben einen unterschiedlichen Anteil an der Entstehung eines Erythems. Dieser Tatsache wird im sogenannten erythemalen Wirkungsspektrum von Mc Kinlay und Diffey von 1987 Rechnung getragen<sup>22</sup>. Sie haben damals die biologische Antwort auf jede einzelne Wellenlänge gemessen und festgestellt, dass Wellenlängen über 315 nm praktisch keinen Einfluss mehr auf die Erythembildung haben.

Die Schutzleistung eines Sonnenschutzproduktes kann durch den SPF (sun protection factor) charakterisiert werden. Er errechnet sich aus dem Verhältnis der Erythemschwellenzeit mit Sonnenschutzprodukt zur Erythemschwellenzeit ohne Sonnenschutzprodukt. Der SPF gibt an wie viel länger man sich mit Produkt der Sonne aussetzen kann, bevor sich ein Sonnenerythem entwickelt. Dadurch, dass die für ein Erythem verantwortlichen Wellenlängen vornehmlich aus dem UVB-Bereich

der Strahlung stammen, ist der SPF hauptsächlich ein Mass für die UVB-Schutzleistung. Die mögliche Gesamtexposition ohne Sonnenerythembildung errechnet sich aus der Eigenschutzzeit multipliziert mit dem SPF.

Ein Rechenbeispiel: eine Person kann sich 15 Minuten ohne Schutz exponieren (Eigenschutzzeit 15 Min.). Cremt sie sich jedoch vorher mit einem Produkt mit SPF 30 ein, verlängert sich die Erythemschwellenzeit auf 7.5 Stunden (15 Min. x 30 = 450 Min.).

Formel: 
$$SPF_i = \frac{MED_i \text{ geschützt}}{MED_i \text{ ungeschützt}}$$
 wobei i individuell bedeutet

$MED_i$  ungeschützt: erreicht nach 15 Min. →  $SPF \times MED_i$  ungeschützt =  $MED_i$  geschützt

SPF: 30 ➔ 30 x 15 Min. =  $MED_i$  erst nach 450 Min. erreicht

Es ist darauf hinzuweisen, dass sich durch mehrmaliges Eincrèmen die Schutzzeit nicht verlängert, sondern lediglich erhalten bleibt. Nach Ablauf dieser Schutzzeit sollte man entweder Schatten aufsuchen oder die Haut mit Kleidung vor weiterer Sonneneinwirkung schützen, da es sonst zu einem Sonnenerythem kommen kann. Bei der Wahl der Sonnenschutzleistung (benötigter Schutzfaktor SPF) sind der Hauttyp (je heller die Haut, desto höher muss der Faktor sein) (Abbildung 13), die Expositionszeit, die Strahlungsintensität (ortsabhängig) sowie der Sonnenstand entscheidend.



Abbildung 13: Die verschiedenen Hauttypen mit ihren jeweiligen Merkmalen.

Die Art den SPF *in vivo* zu messen/ zu bestimmen ist europaweit geregelt, es gibt dazu eine Guideline der COLIPA (The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) <sup>23</sup>.

### 1.5.5. Der UVA Schutzfaktor (UVA-PF)

Neben dem UVB-Schutz ist auch ein zuverlässiger Schutz vor UVA-Strahlung wichtig. In den letzten Jahren konnte belegt werden, dass UVA durch reaktive Sauerstoffspezies DNA und Zellen schädigt, dass es zur Immunsystemdepression beiträgt und

phototoxische Reaktionen hervorruft<sup>24,25</sup>. Der SPF wird hauptsächlich durch UVB-Wellenlängen beeinflusst und eignet sich deshalb nicht zur Bewertung eines UVA-Schutzes. Dies hat dazu geführt, dass ein neues Logo für Sonnenschutzprodukte kreiert wurde, welches anzeigt, ob eine Schutzleistung im UVA-Bereich vorhanden ist (Abbildung 14).

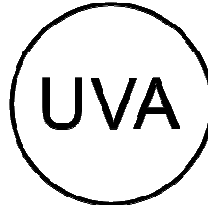


Abbildung 14: Offizielles UVA-Logo der EU-Behörde.

Der UVA-Schutz einer Formulierung kann durch zwei Methoden bestimmt werden: *in vitro* gemäss COLIPA oder *in vivo* gemäss Japan Cosmetic Industry Association (JCIA). Produkte erhalten das UVA-Logo, wenn sie bei der *in vitro* UVA-Schutzwirkung Bestimmungsmethode nach COLIPA<sup>26</sup> einen UVA-PF erreichen, der mindestens ein Drittel ihres SPFs ausmacht und wenn die kritische Wellenlänge höher als 370 nm ist (Details zu dieser Methode siehe Kapitel „Material und Methoden“). Eine weitere Möglichkeit zum Erhalt des UVA-Logos ist das Bestehen der „Persistent Pigment Darkening“-Methode der JCIA.

### 1.5.6. Sonnenschutzformulierungen

Die Grundlage (Vehikel) eines Produktes hat einen grossen Einfluss auf dessen Schutzwirkung. Es gibt Wechselwirkungen zwischen den Filtern und den Vehikelbestandteilen, welche die Mischbarkeit, die Form (z.B. Lotion, Gel, Crème, Spray) und die Viskosität der Formulierung beeinflussen.

Inhaltsstoffe sowie Filter können anhand ihrer Polarität gruppiert werden, wobei die Mischbarkeit sich erhöht je ähnlicher die Polarität der Stoffe ist. Es gibt 1) wasserbasierte, 2) ölbasierte und 3) ethanol/ölbasierte Formulierungen sowie Emulsionen, welche aus einer Wasser- und einer Ölphase bestehen<sup>27</sup>. Durch die Abdeckung eines breiten Polaritätsbereichs ermöglichen Emulsionen eine grosse Flexibilität bei der Auswahl der Filter. Hinzu kommen einfaches Auftragen und ein angenehmes Hautgefühl, wodurch Emulsionen auf dem Markt weit verbreitet sind.

Die Öl-Phase enthält meist zwei bis vier Öle (z.B. C12-15 Alkylbenzoat). Oft sind die UV-Filter in dieser Phase gelöst oder suspendiert. Die Wasserphase besteht hauptsächlich aus Wasser. Weitere Bestandteile sind Emulgatoren und Co-Emulgatoren, häufig Cetylphosphat und Cetylalkohol. Sie sorgen für eine Stabilisierung der Formulierung.

Neben diesen Grundkomponenten kommen zum Teil auch Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel (z.B. Benzylalkohol), sowie teilweise Parfum und Radikalfänger (z.B. Tocopherol) in Sonnenschutzprodukten vor.

Eine wichtige Nebenaufgabe der Formulierungen ist die Pflege der Haut. Wind, Wasser und Sonne trocknen die Haut aus, so dass die Zufuhr von Feuchtigkeit und Lipiden notwendig wird. Das Ausmass der Rehydrierung kann durch die verschiedenen Produkteformen gesteuert werden. Crèmes sind zum Beispiel für trockene, Gels und



Lotionen für normale Hautpartien geeignet. Inhaltsstoffe wie Glycerin, flüssiges Sorbitol und Dexpanthenol dienen der Hautpflege und werden der Wasserphase zugegeben. Das Hautgefühl lässt sich durch Simecicon verbessern.

## **1.6 Auswirkungen ultravioletter Strahlung auf Zellebene**

### **1.6.1. Allgemeines zur Signaltransduktion**

Das reibungslose Zusammenspiel von Zellen im menschlichen Körper und deren adäquate Reaktion auf äussere und innere Einflüsse sind von grösster Bedeutung und müssen einwandfrei koordiniert sein. Die Zellkommunikation beinhaltet einerseits die Weitergabe von Informationen zwischen den Zellen, wie auch deren Weiterleitung vom Äusseren ins Innere der Zellen oder umgekehrt. Diese Informationsweitergabe wird Signaltransduktion genannt. Das Grundprinzip dabei besteht aus der Andockung eines extrazellulären Signalmoleküls an einen Rezeptor, wobei deren Wechselwirkung zu intrazellulären Kaskaden und schliesslich zur Transkription verschiedener Gene führt.

Häufig, auch im Zusammenhang mit Reaktionen auf UV-Strahlung, erfolgt die Signaltransduktion via Transmembranrezeptoren. Dazu gehören die heptahelicale Rezeptoren mit G-Proteinen als Signalübermittler (z.B. Adenylatcyclase-Kaskade und Phospholipase C-Kaskade), Tyrosinkinase-Rezeptoren oder Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen.

### **1.6.2. Durch UV ausgelöste Signalkaskaden**

Ein wichtiger äusserer Reiz, auf den die Körperzellen reagieren müssen, ist die ultraviolette Strahlung. Zu deren schädlichen Auswirkungen gehören beschleunigte Hautalterung, Immunsuppression, Sonnenerythem und Krebsentstehung. Auf Ebene der Hautzellen ruft UV-Strahlung Veränderungen in den Zellwechselwirkungen hervor, indem sie in Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge sowie in die Genregulation eingreift. Dies geschieht über verschiedene Signalkaskaden, welche entweder unabhängig voneinander oder miteinander verbunden ablaufen<sup>28</sup>.

Die Initialisierung dieser Reaktionswege findet oft im Extrazellulärraum durch Andockung von Liganden an ihre spezifischen Rezeptoren statt. Zu diesen Liganden gehören Zytokine und Wachstumsfaktoren. Durch die Entzündungsreaktion, welche nach UV-Einfluss entsteht, werden Zytokine und Chemokine von verschiedenen Zellen in den Extrazellulärraum ausgeschüttet. Von dort ausgehend können die Zytokine via Membranrezeptoren unterschiedliche Signalkaskaden auslösen.

Nachfolgend werden nun ein paar wichtige, durch ultraviolette Strahlung ausgelöste, Kaskaden erläutert.

Der Mitogen- aktivierte Proteinkinase– Weg (MAPK-Weg)

Dieser Reaktionsweg wird durch verschiedene Auslöser wie Zytokine (beispielsweise Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8)), als auch Wachstumsfaktoren wie der „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) gestartet.

Nach Bindung der Liganden auf extrazellulärer Seite kommt es entweder via Rezeptorkinase oder über die Vermittlung durch G-Proteine zur Aktivierung von Rat sarcoma (Ras), Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) und cell division control protein 42 homolog (Cdc42), ebenfalls G-Proteine. Diese haben ihre jeweils individuellen Wege über zwei Kinasefamilien die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK) und die MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK) bis hin zur Aktivierung der drei Familien der MAPK (Abbildung 15).

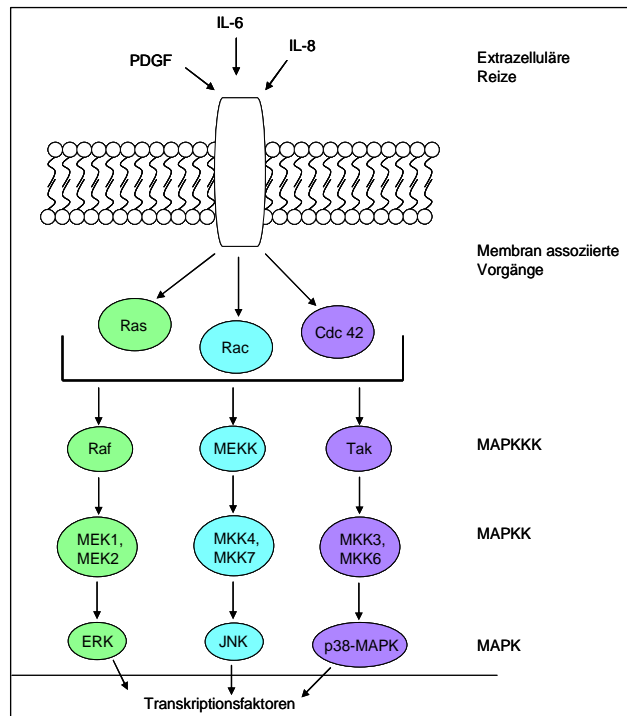


Abbildung 15: MAPK-Weg.

Dazu gehören die Extrazellulärsignal regulierten Kinasen (ERK), die c-jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38-MAPK).

Den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird ebenfalls eine gewisse Rolle als Initiator zugewiesen, wobei sie vom Zytosol aus eingreifen und nicht extrazellulär (Abbildung 16).

Diverse Studien haben diesen Vorgang untersucht, es herrscht allerdings noch Uneinigkeit darüber, auf welche Proteine der MAPK-Kaskade die ROS genau Einfluss nehmen <sup>29,30</sup>.

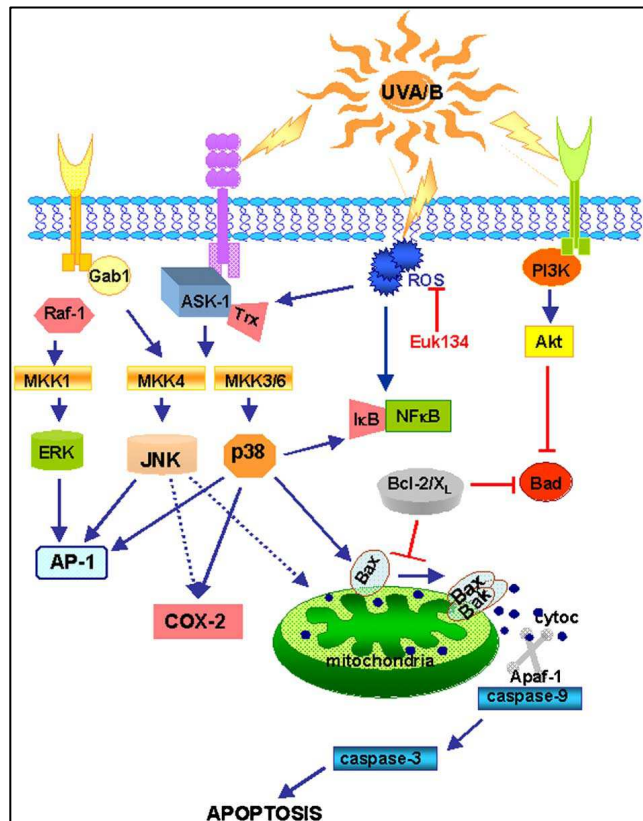


Abbildung 16: Übersicht über verschiedene Kaskaden nach UV-Exposition.

Die Abläufe nach Aktivierung der MAPK sind vielfältig, sehr komplex und miteinander vernetzt. Es finden Regulationen des Zellwachstums, der Zellentwicklung und –differenzierung, der Entzündungsvorgänge, sowie des Zelltodes <sup>28</sup> über eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren statt.

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist das Aktivatorprotein 1 (AP-1). Es wird, wenn auch über verschiedene Wege, bei allen drei MAPK-Familien in die Signalkaskade eingebunden. Neben

Zellwachstum und –proliferation beeinflusst AP-1 auch die Matrix Metalloproteasen (MMP), welche in der Lage sind extrazelluläre Matrixproteine zu zerstören und so die Zelle zu schädigen. Vermehrt exprimiert werden hauptsächlich MMP-1, MMP-3 sowie MMP-9<sup>31</sup>.

Die Cyclooxygenase 2 (COX-2), ein wichtiger Bestandteil der Entzündungsreaktion, zählt ebenfalls zu den durch MAPK gesteuerten Genen. Eine Erhöhung findet über Aktivierung der Transkription<sup>32</sup> und der Stabilisierung der messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA) statt<sup>33</sup>. Damit einhergehend kommt es zur vermehrten Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) Bildung.

Der Transkriptionsfaktor nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB) liegt meist inaktiv im Komplex mit dem inactivator of kappa B (I-κB) im Zytosol vor und besteht jeweils aus einem Dimer von Proteinen der Reticuloendotheliose (Rel)-Familie (meist p65) und der NF-κB-Familie (p52 oder p50)<sup>34</sup>. Durch entsprechende Signale wird I-κB ubiquitiniert, dissoziiert von NF-κB ab, wodurch dieses in Richtung Zellkern diffundiert und dort seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor erfüllt.

Neben den MAPK führen auch Zytokine wie IL-1 und TNF-α, sowie ROS zur Initiierung dieser Kaskade. Wichtige Zielgene sind Bestandteile von Entzündungsprozessen. NF-κB kann die Transkription von Interleukin 8, Interleukin 6, Interferon-γ, sowie der COX-2 erhöhen. Hinzu kommen Gene des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung.

Ausserdem sorgen die MAP-Kinasen dafür, dass das B-cell lymphoma 2-associated X Protein (Bax) vom Cytosol in die Mitochondrien gelangt (Abbildung 16). Dort greift es in den Apoptoseablauf ein (siehe nachfolgendes Kapitel).

### Apoptosewege

Die Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein zentraler Mechanismus um stark beschädigte Zellen zu eliminieren. Auf diese Weise wird verhindert, dass fehlerhafte Informationen an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden oder dass eine unkontrollierte Wucherung durch entartete Zellen erfolgt.

Es existieren zwei Wege um die Apoptose einzuleiten, der extrinsische und der intrinsische Weg (Abbildung 17).

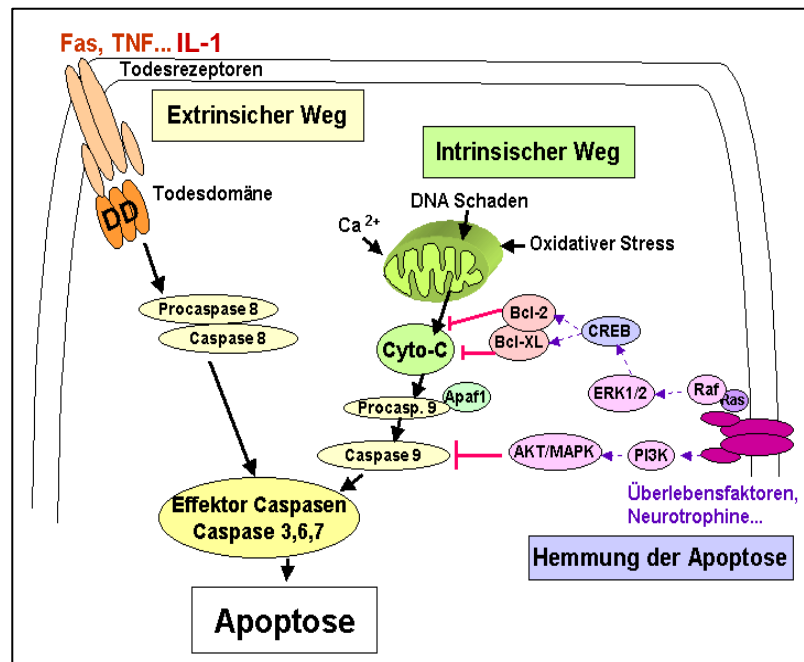


Abbildung 17: Apoptose-Wege.

## 1) Extrinsischer Weg

Wie es der Name bereits sagt, kommen die Signale zur Initiation dieser Kaskade von ausserhalb der Zelle. Die Zytokine Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), TNF-related apoptosis- inducing ligand (TRAIL), Interleukin- 1 (IL-1) sowie das Protein Fas sind wichtige Auslöser. Nach Bindung an die entsprechenden Rezeptoren kommt es zu deren Oligomerisierung und zur Anlagerung verschiedener, im Zytosol vorhandener Effektorproteine, wie beispielsweise Fas-associated protein with death domain (FADD), Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein (TRADD) oder ribosome-inactivating protein (RIP). Die Bestandteile dieses Komplexes interagieren über „death domains“ miteinander und führen zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10. Sie stehen am Beginn der Caspase-Kaskade und schneiden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, welche als Procaspasen inaktiv vorliegen und dann die Apoptose einleiten. Caspasen sind Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum. Sie sind in der Lage Strukturproteine wie Kernmembran und Zytoskelett in der Zelle zu zerstören. Ausserdem kann eine Aktivierung von DNasen herbeigeführt werden, was in einer Degradierung der DNA endet.

## 2) Intrinsischer Weg

Den Ausgangspunkt des intrinsischen Weges stellen die Mitochondrien dar. Zellulärer Stress löst eine Struktur- und Funktionsänderung aus. Dadurch kann es zur Ruptur (Bax permeabilisiert die Membran und das Membranphospholipid Cardiolipin wird durch ROS degradiert) der Membranen kommen, was eine Freisetzung von Cytochrom-c und dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor 1 (Apaf-1) ins Zytosol zur Folge hat. Dort wird ein Proteinkomplex, das Apoptosom, gebildet, welcher die Initiatorcaspase Nummer 9 aktiviert<sup>28</sup>. Die Kaskade endet ebenfalls in einer Umwandlung der Procaspasen 3, 6 und 7 in ihre aktiven Formen, analog dem extrinsischen Weg.

Beide Apoptosewege unterliegen einer differenzierten Steuerung, an welcher verschiedenste pro- oder antiapoptotische Substanzen beteiligt sind.

In den Mitochondrien sind es hauptsächlich die Mitglieder der B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) Familie, welche das Schicksal der Zelle bestimmen. Zu dieser Familie gehören einerseits Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, welche als antiapoptotische Proteine den Zelltod verhindern und die Mitochondrien intakt halten. Entgegengesetzt wirken die proapoptotischen Mitglieder Bax, Bcl-2-Antagonist of cell death (Bad), BCL2-antagonist/killer 1 (Bak), BH3 interacting domain death agonist (Bid), BCL2-like 11 (Bim), BCL2-interacting killer (Bik) und Bcl-X<sub>S</sub>. Sie leiten die Apoptose ein.

Beim extrinsischen Weg spielen Interleukin-3 (IL-3) und der Nervenwachstumsfaktor (NGF) eine Rolle bei der Verhinderung der Apoptose.

Ein zentrales Protein, das in die Entscheidung Zelltod oder Reparatur eingreift, ist p53. Es tritt in Aktion sobald die Zelle gestresst ist, unter anderem auch durch UV-Einwirkung und vor allem wenn DNA-Schäden vorhanden sind. Sobald Letztere einen Schwellenwert erreicht haben, gibt es eine Akkumulation vom p53-Protein im Zellkern und es agiert als Transkriptionsfaktor (Abbildung 18).

Ein Zielgen ist p21. Es kann die Cyclin abhängige Kinase (CDK) hemmen, indem ein Komplex aus CDK2, Cyclin-A oder -E, „proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und p21 selbst entsteht und dieser dann einen Zellzyklusarrest in Phase G1 hervorruft (blau)<sup>35</sup>. Die Zelle hat nun die Möglichkeit die Schäden während diesem Stopp zu

reparieren, danach läuft der Zyklus normal weiter. Aus der Familie der „growth-arrest and DNA damage-inducible“ (Gadd45) ist Gadd45a nach Zusammenlagerung mit anderen Proteinen wie Cyclin-B u.a. für einen Zellzyklusarrest in der Phase G2 zuständig (grün). Auch da können noch Schäden behoben werden.

Sollte sich der vorhandene Schaden als zu gross erweisen, ist p53 für die Einleitung der Apoptose verantwortlich. Dies geschieht durch Erhöhung der Transkription der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie oder auch von Fas und anderen Genen. Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass p53 die Transkription der antiapoptotischen Proteine Bcl-2

und Bcl-X<sub>L</sub> herunterreguliert<sup>35</sup>. Das Onkogen „mouse double minute 2“ (Mdm2) kann einen Anstieg von p53-Protein verhindern, indem es das Protein zur raschen Degradierung durch Proteasome markiert. Mdm2 wird durch Überlebenssignale der Zelle wie durch p53 selbst aktiviert, was einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt.

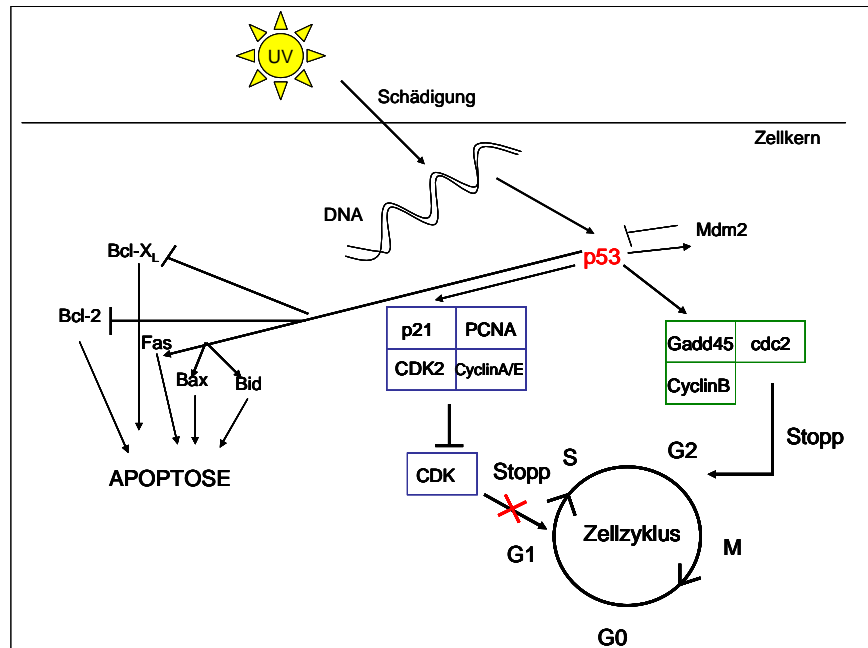


Abbildung 18: Aufgaben von p53 im Zellkern.

Neben den Signalkaskaden gibt es noch zwei weitere zentrale Veränderungen durch ultraviolette Strahlung in den Zellen. Dazu gehören die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die DNA-Veränderungen im Zellkern.

### Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

ROS sind Radikale, zu ihnen gehören zum Beispiel das Superoxid-Anion  $O_2^{\cdot -}$ , sowie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal  $HO^{\cdot}$ . Neben äusseren Einflüssen wie UV-Strahlung, Radio- oder Gammastrahlen können auch ganz gewöhnliche Abläufe im Zellmetabolismus wie die mitochondriale Zellatmung oder Nebenreaktionen von Cytochrom P<sub>450</sub> Erzeuger für ROS und somit von oxidativem Stress sein. Die Menge der internen, normal vorkommenden Radikale ist allerdings viel geringer und der Körper hat seine eigenen Entgiftungsmassnahmen um diese zu beseitigen<sup>12</sup>.

Hauptauslöser der ROS bei der UV-Strahlung ist der UVA-Anteil. Dessen Energie wird in der Zelle von Chromophoren wie Riboflavin, Porphyrinen, Chinonen und auch Hämoglobin und reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren aufgenommen und dann auf Sauerstoff transferiert, wobei das Superoxid-Anion entsteht<sup>4</sup>.

Die Radikale greifen verschiedenste Ziele in der Zelle an. Es kommt zu Veränderungen und Strangbrüchen der DNA (siehe nächstes Kapitel), zu Strukturmodifikationen von Proteinen und von Zellmembranen und auch zur Beeinflussung von Signalkaskaden. Wie bereits in vorherigen Kapiteln erwähnt wurde, spielen die ROS beispielsweise bei dem MAPK-Weg eine Rolle.

## DNA-Schäden

Bei der Schädigung des Erbmateri­als wird zwischen direkten und indirekten DNA-Schäden unterschieden.

Direkte Schäden entstehen durch Photonen der UV-Strahlung, welche die DNA-Struktur direkt verändern und somit schädigen. Die Entstehung der indirekten Schäden erfolgt

über ROS, welche dann die DNA schädigen. Das UVB-Spektrum ist hauptsächlich für die direkten Schäden verantwortlich. Die DNA-Basen sind das zentrale Chromophor für die Absorption von Photonen im Wellenlängenbereich des UVB. Durch die aufgenommene Energie wird ein Elektron auf einen höheren, instabileren Level angehoben. Dadurch entsteht ein reaktives Zwischenprodukt, welches mit anderen Biomolekülen wechselwirken kann<sup>4</sup>. Auf diese Weise werden vorwiegend dimere Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinbasen gebildet. Zu diesen Basenmodifikationen gehören die Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD) und die Pyrimidin (6-4) pyrimidon Photoprodukte mit den entsprechenden Dewar Isomeren. (Abbildung 19).

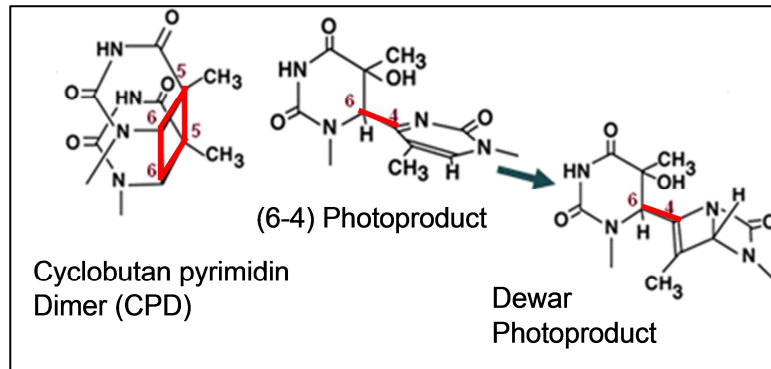


Abbildung 19: Basenmodifikationen an Pyrimidinen durch UV.

Die Entstehung von CPDs ist zwischen zwei Cytosinen, zwischen zwei Thyminen oder auch gemischt möglich (siehe Kapitel 1.8.5). Die (6-4) Photoprodukte entstehen durch eine kovalente Bindung zwischen C6 und C4 Positionen von Pyrimidinen. Sie sind weitaus weniger häufig als die CPD, machen nur etwa einen Fünftel bis einen Zehntel derer Menge aus<sup>4</sup> und werden zudem auch effizienter repariert<sup>36</sup>.

Diese veränderten Basen führen zu einer verdrehten DNA-Struktur, was die Blockierung der Replikation und somit der Zellteilung zur Folge hat. Wird die Replikation des Gens, welches für das Protein p53 kodiert, blockiert, fehlt der Zelle die Möglichkeit den Zellzyklus anzuhalten und beschädigte DNA zu reparieren. Dadurch wird fehlerhafte DNA an die nächste Zellgeneration weitergegeben, es kommt zu Mutationen und allenfalls zu unkontrolliertem Zellwachstum, das schliesslich zur Entstehung von Krebs führt.

Es werden ausserdem verschiedene Signalkaskaden ausgelöst (siehe unten)<sup>36</sup>.

Verschiedene Studien<sup>36-39</sup> zeigen, dass für die indirekt ausgelösten DNA-Schäden vor allem der UVA-Bereich verantwortlich ist. Die Strahlung mit grösserer Wellenlänge ist energieärmer und die DNA absorbiert sie kaum. Wie im Kapitel ROS bereits erwähnt, sind es andere Chromophore, die die Energie von UVA absorbieren und anschliessend Sauerstoffradikale bilden. Letztere sind dann in der Lage oxidative DNA-Schäden, wie auch Strangbrüche hervorzurufen. Der bekannteste und häufigste oxidative Schaden ist das 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxo-Gua). Es wird an der C8-Position der Ringstruktur modifiziert, was zum Verlust der Spezifität der Basenpaarungen, zur Falschablesung von angrenzenden Pyrimidinen oder zur gegenüberliegenden Einfügung von Adenin führen kann. Lange wurde davon ausgegangen, dass 8-Oxo-Gua auch der häufigste durch UVA hervorgerufene DNA-

Schaden ist. Verschiedenste Studien sind allerdings zu dem Schluss gekommen, dass CPD auch bei UVA den grössten Anteil ausmachen <sup>37,40-42</sup>.

Die DNA-Schäden sind ein zentraler Auslöser für die zellulären Signalkaskaden. Die geschädigten Strukturen werden durch Sensorproteine erkannt und via Transduktoren an Effektoren weitergeleitet. Anschliessend werden Zellzyklus-Checkpunkte aktiviert und DNA-Reparaturprogramme gestartet <sup>43</sup>. Die Checkpunkte dienen als interne Überwachungswege, welche bei Vorliegen von DNA-Schäden den Zellzyklus anhalten können.



## 1.7 Zelluläre Marker zur Charakterisierung von UV bedingten Zellschäden

Zu Beginn müssen die Anforderungen, die ein solcher Marker zu erfüllen hat, charakterisiert werden. Eine reproduzierbare Quantifizierung des Markers, ohne personenspezifische Unterschiede bildet die Basis. Ein weiteres, wichtiges Kriterium ist die Spezifität. Im Idealfall soll der Marker spezifisch nur durch ultraviolette Strahlung produziert/ausgeschüttet werden. Ausserdem muss eine Dosis-Wirkungsbeziehung des Markers bestehen.

Nachfolgend werden die Marker nach ihrem Wirkungsort unterteilt.

### 1.7.1. Extrazelluläre Marker

Zu dieser Gruppe gehören alle Substanzen, die von aussen an die Zelle andocken und via Rezeptoren ein Signal ins Zellinnere übertragen, meist über eine komplexe Abfolge von Reaktionen (Tabelle 1).

Die grosse Familie der Zytokine macht den Hauptanteil dieser extrazellulären Liganden aus. Zytokine sind Botenstoffe, die parakrin (auf Zellen in unmittelbarer Umgebung) oder autokrin (auf sich selbst) wirken. Sie können in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine eingeteilt werden. Es sind Polypeptide, die nach Verletzungen, Infektionen oder allgemeinem Stress freigesetzt werden. Zytokine können sich gegenseitig beeinflussen, sowohl additiv, als auch antagonistisch. So verschiedenartig wie sie sind, so unterschiedlich sind auch ihre Wirkungen. Diese reichen von Regulation der Genexpression, über Differenzierung, Proliferation, Migration bis hin zur Apoptose von Zellen<sup>12</sup>.

Ebenfalls ausserhalb der Zelle wirkt die Gruppe der Prostaglandine (PG). Die Cyclooxygenasen bilden diese Gewebshormone aus Fettsäuren. Die Wirkungen der Prostaglandine sind zum Teil gegenläufig. Während PGI<sub>2</sub> gefässerweiternd ist und die Thrombozytenaggregation hemmt, sind andere wie PGE<sub>2</sub> oder Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) gefässverengend und fördern die Zusammenlagerung der Thrombozyten. Zudem tragen sie zur Entzündungsentwicklung bei. Hierbei zentral ist vor allem PGE<sub>2</sub>, welches die Gefässpermeabilität und das Schmerzempfinden erhöht und an der Fieberentstehung beteiligt ist. Diese Effekte werden über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt. PGE<sub>2</sub> eignet sich neben COX-2 aufgrund seiner Relevanz bei Entzündungsprozessen ebenfalls als Marker.

Ihren Wirkungsbereich ausserhalb der Zelle haben auch die Metalloproteasen. Sie spalten Proteinbindungen. Dies geschieht unter Verbrauch eines Wassermoleküls, welches mit Hilfe von Metallkationen in die richtige Position gebracht und dort gehalten wird. Es werden Proteine der extrazellulären Matrix abgebaut, was der Zelle beträchtlichen Schaden zufügt und bis zu deren Zerstörung gehen kann.

Tabelle 1: Beispiele für extrazelluläre Marker

Mögliche Marker
Zytokine → IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, Transforming Growth Factor (TGF-β), Epidermal growth factor (EGF), NGF, Platelet derived growth factor (PDGF), TRAIL u.a.
PGE <sub>2</sub>
MMP → v.a. MMP-3, MMP-7, MMP-9

### 1.7.2. Zytosolische Marker

Im Zytosol lokalisierte Marker sind entweder Bestandteile von den verschiedenen Signalkaskaden, die dort ablaufen, oder aber deren Zielproteine (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beispiele für zytosolische Marker

Mögliche Marker
MAPK → p38-MAPK, ERK und JNK
COX-2
Caspasen
Proteine der Bcl-2-Familie (pro- als auch antiapoptotische)
Akt (Proteinkinase B)
Cytochrom C
Apaf-1

### 1.7.3. Marker im Zellkern

In diese Kategorie gehören alle DNA-Schäden (Tabelle 3). Hier sind die wohl wichtigsten Marker zu finden, nämlich die direkten DNA-Schäden wie die CPD. Sie erfüllen als Einzige das Kriterium der Spezifität, da sie ausschliesslich nach UV-Exponierung gebildet werden.

Es gibt zwei verschiedene Wege wie solche abnormalen DNA-Strukturen gemessen werden. Entweder wird der Schaden direkt quantifiziert oder aber dessen Reparatur. Bei der Suche nach Markern für Zellschäden ist der Nachweis direkter Schädigungen besser geeignet, da auf diese Weise das direkte Ergebnis der UV-Strahlung quantifiziert werden kann.

Auch alle Transkriptionsfaktoren haben ihren Wirkort im Zellkern.

Tabelle 3: Beispiele für Marker im Zellkern

Mögliche Marker
CPD, (6-4) Photoprodukte
DNA Einzel- oder Doppelstrangbrüche
8-Oxo-Gua
p53
NF-κB
AP-1
p21
PCNA
Gadd45
Verschiedene Cycline

## 1.8 Potentiell geeignete Marker zur Charakterisierung von UV bedingten Zellschäden

Aus der Vielfalt der zur Verfügung stehenden Marker wurden die unten beschriebenen Kandidaten zur Charakterisierung von UV bedingten Zellschäden ausgewählt. Aufgrund der unzähligen Abläufe in einer Zelle bei Schädigung entsteht das Endergebnis (Zellschaden) aus vielen kleinen Schritten, welche alle ihren Teil beitragen. Dadurch bietet sich die Analyse eines Sets von verschiedenen Markern mit unterschiedlichen Wirkungsarten an.

Aus dem extrazellulären Bereich wurden die Zytokine Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-8 aufgrund ihrer zentralen Rolle bei Entzündungsvorgängen untersucht.

Als zytosolischer Marker wurde die p38-MAP Kinase ausgewählt. Im Gegensatz zu ERK werden die anderen beiden MAPK JNK und p38 durch UVB wesentlich aktiviert<sup>44</sup>. Ausschlaggebend für die Entscheidung für p38 war dessen wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Apoptose in Keratinozyten<sup>28</sup>.

Es wurden zwei Marker mit Wirkungsort Zellkern in den Versuchen analysiert. Einerseits auf DNA-Ebene die Cyclobutan Pyrimidin Dimere als direkt induzierte Basenmodifikationen. Sie werden spezifisch nach UV-Einfluss gebildet, sind länger persistent als die 6-4 Photoprodukte und tragen somit hauptsächlich zum mutagenen Effekt der UV Strahlung bei<sup>45</sup>. Andererseits der Transkriptionsfaktor p53. Als Wächter des Genoms nimmt dieses Protein eine zentrale Rolle bei allen Arten von Zellschädigungen ein und wird deshalb häufig untersucht.

Nachfolgend werden die untersuchten Marker genauer charakterisiert.

### 1.8.1. Interleukin 1 $\alpha$

Dieses Zytokin ist eines der wichtigsten in der Entzündungsreaktion. Das Protein hat eine Masse von rund 31 Kilodalton (kDa) und eine Länge von 271 Aminosäuren (AS) (Abbildung 20). Es gehört zu der Interleukin 1- Familie, wozu auch Interleukin 1 $\beta$  zählt. Beide Isoformen haben weitestgehend gleiche Funktionen. Die Effekte werden über den Interleukin-1 Rezeptortyp 1 vermittelt. Viele verschiedene Zellarten können IL-1 $\alpha$  bilden. Dazu zählen Epithelzellen wie Keratinozyten und Fibroblasten, Immunzellen wie Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Langerhans-Zellen.

Der Einfluss auf Entzündungen geschieht auf verschiedenen Wegen. Es kommt zu einer Ausschüttung von Chemokinen, welche Immunzellen wie Leukozyten, Neutrophile und Monozyten anlocken. Ausserdem werden Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen vermehrt exprimiert, was eine Verschiebung der entzündungsrelevanten Zellen aus den Gefäßen ins Gewebe zur Folge hat. IL-1 induziert die eigene Produktion, diejenige von IL-8 und TNF- $\alpha$ , sowie COX-2 und Phospholipase A<sub>2</sub> für die Eicosanoidsynthese<sup>46</sup>.

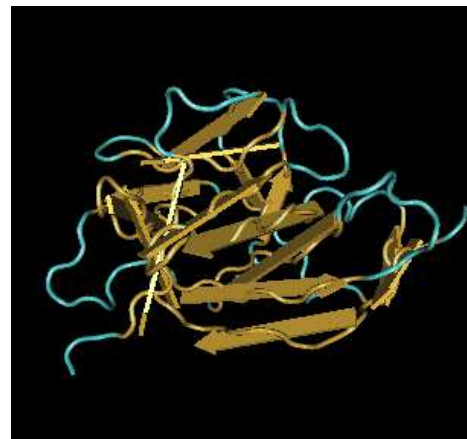


Abbildung 20: Struktur in Lösung von humanem Interleukin 1 $\alpha$  (NMR).

Dieses Zytokin kann auch vasodilatatorisch (gefässerweiternd) wirken, wodurch es zur Hypotension (Blutdruck) kommt, es kann Fieber generieren und die Schmerzempfindlichkeit erhöhen<sup>47</sup>. Gemäss Kupper et al<sup>48</sup> nehmen die mRNA-Level, sowie die Proteinmenge von IL-1 $\alpha$  in Keratinozyten nach UVB-Exposition zu.

### 1.8.2. Interleukin 8

Bei Interleukin 8 handelt sich ebenfalls um ein Protein aus der Gruppe der Zytokine. Es gehört in die Familie der Chemokine, hat eine Masse von 8.4 kDa und ist 72 AS lang (die Vorstufe besteht aus 99 AS). Von einer Vorstufe des Proteins wird eine Aminosäuresequenz abgetrennt um so zur aktiven Form (72 AS) zu gelangen (Abbildung 21). Monozyten, Epithelzellen, dermale Fibroblasten sowie stromale Zellen und Endothelzellen sind in der Lage IL-8 zu produzieren. Das Startsignal dazu liefern Entzündungsstimuli, die Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , ausserdem Lipopolysaccharide (LPS) und allgemeine Zellstressoren.

Das Protein hat vier Cysteine, verbunden über je zwei Disulfidbrücken. Dies verleiht dem Protein seinen basischen Charakter. Bei hohen Konzentrationen liegt das Chemokin als Dimer vor.

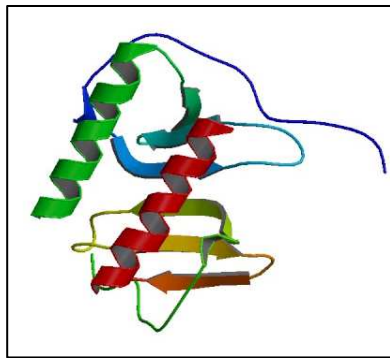


Abbildung 21: Struktur in Lösung von humanem Interleukin 8 (NMR).

Seine Aufgabe besteht in der Rekrutierung verschiedener Immunzellen, hauptsächlich Neutrophile, aber auch Leukozyten (T- und B-Zellen), Basophile und natürliche Killerzellen<sup>49</sup>. Es kommt zu einer Erhöhung von Adhäsionsmolekülen in Endothelien und dadurch zu einer Migration der Immunzellen in das von der Entzündung betroffene Gewebe. Ausserdem werden die Immunzellen aktiviert und setzen Sauerstoffradikale sowie Granula frei. S. Kondo<sup>50</sup> konnte in Keratinozyten eine Erhöhung des mRNA- und des Proteinlevels von IL-8 nach UVB-Einwirkung nachweisen.

### 1.8.3. p38-MAPK

Die p38-MAPK ist eine von drei Mitgliedern der mitogen-aktivierten Proteinkinase, welche zu den Serin-Threonin-Kinasen gehören. Eine Aktivierung kommt durch zweifache Phosphorylierung einer Dreieraminosäuresequenz im Regulationsloop zustande. Im Falle der p38-MAPK besteht die Sequenz aus Threonin, Glycin und Tyrosin, wobei die erste und dritte Aminosäure phosphoryliert werden (Abbildung 22). Bisher sind vier p38-Isoformen bekannt; p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ . Untereinander weisen sie 60% Sequenzhomologie auf, zu den anderen MAPK rund 40%. Jede Isoform weist ein spezifisches Verteilungsmuster auf und ihre Wirkungen sind je nach Zelltyp und Reizart verschieden. Während p38 $\alpha$  und  $\beta$  eher weit verbreitet vorkommen, beschränken sich p38 $\gamma$  eher auf Skelettmuskeln, Herz, Lunge, Thymus und Hoden und p38 $\delta$  auf Lunge, Pankreas, Magen, Leber und Epidermis<sup>51,52</sup>.

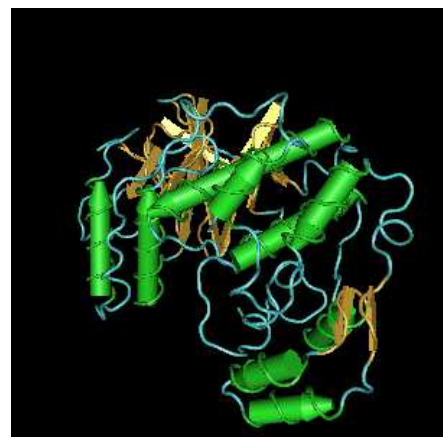


Abbildung 22: Struktur humane, unphosphorylierte p38 MAPK (Röntgendiffraktometrie).

Zu den extrazellulären Stimuli aller Isoformen von p38-MAPK gehören proinflammatorische Zytokine, diverse Wachstumsfaktoren und Stressoren wie ultraviolette Strahlung, oxidativer Stress und hyperosmotischer Schock.

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Wirkungen in Keratinozyten von Interesse. Diverse Forschungsgruppen haben Versuche mit spezifischen Inhibitoren der Isoformen durchgeführt, um deren Beteiligung an verschiedenen Abläufen zu untersuchen. Zusammengefasst konnte eine Beteiligung von p38 $\alpha$  und  $\beta$  bei der Vermittlung von zellulärem Stress in Keratinozyten, sowie bei der Aktivierung verschiedener Gene (z.B. COX-2) nach UV-Einfluss bei HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Weitere Versuche mit differenzierungsfördernden Substanzen und dem Involucrin-Gen liessen den Schluss zu, dass p38 $\delta$  eine zentrale Position bei der Regulierung der epithelialen Differenzierung und Apoptose einnimmt. Für genauere Hinweise zu den Forschungsgruppen und Hemmsubstanzen sei auf den Review von L.R. Eckert et al. verwiesen<sup>51</sup>.

#### 1.8.4. p53

Das 53 Kilodalton grosse Protein mit einer Länge von 393 AS ist der Namensgeber der p53-Familie. Zu dieser gehören ausserdem p63 und p73. Das Protein wurde vor rund 30 Jahren entdeckt und ist seither intensiv untersucht worden<sup>53</sup>. Seine zentrale Rolle als „Wächter des Genoms“ wurde bald erkannt. p53 regelt als Transkriptionsfaktor die Aktivität von Genen im Bereich des Zellzyklus-Checkpoints, der DNA-Reparatur und des Zelltodes. Es wird häufig als Tumorsuppressor bezeichnet, hat es doch die Aufgabe bei DNA-Schäden den Zellzyklus anzuhalten um den Schaden zu reparieren oder in der Zelle bei zu grossen Schädigungen die Apoptose einzuleiten. Dadurch wird verhindert, dass fehlerhafte DNA in die nächste Generation weitergegeben wird und so Mutationen im Genom bestehen bleiben, was zu Tumorbildung führen kann. Der grosse Nutzen dieser enorm wichtigen Aufgabe von p53 wird durch die Tatsache, dass dessen Gen in ganz vielen Krebsarten mutiert ist, noch unterstrichen. Das p53-Gen ist bis zu 50% häufiger mutiert als alle anderen Einzelgene<sup>53</sup>.

Im Gegensatz zu p63 und p73 besitzt p53 eine spezifische zweite DNA-Bindungsdomäne am C-Terminus (Abbildung 23). Durch viele basische Aminosäuren kann sie die DNA strukturabhängig binden, nicht sequenzspezifisch wie die andere Bindungsdomäne, die in allen drei Familienmitgliedern homolog ist. Das bedeutet, sobald die DNA-Struktur durch Schäden verändert ist, kann p53 dies erkennen und schnell darauf reagieren<sup>53</sup>.

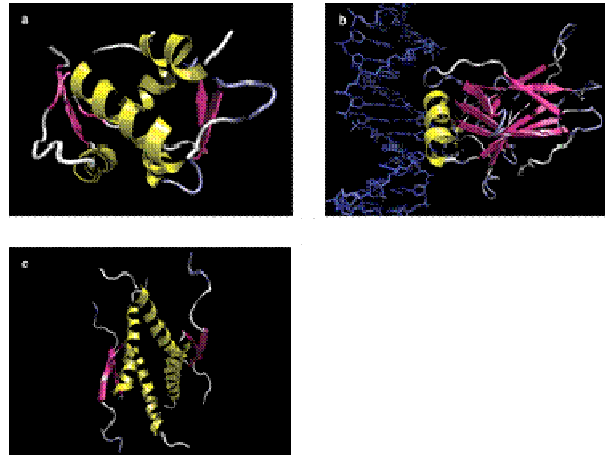


Abbildung 23: Struktur von drei Domänen von p53; a Transaktivierungsdomäne gebunden an Mdm2, b Kristallstruktur der DNA-Bindungsdomäne, c Tetramerisierungsdomäne.

Ohne aktivierende Signale liegt das Protein inaktiv vor und wird von Mdm2 auf einem tiefen Expressions-Level gehalten.

### 1.8.5. CPD

Die weitaus häufigsten DNA-Schäden sind die Cyclobutan Pyrimidin Dimere. Diese Konstrukte entstehen durch die direkte Aufnahme von Energie der UVB-Strahlung. Die Doppelbindung zwischen dem C5 und dem C6 Atom in einem Pyrimidin wird durch diese Energieaufnahme gespalten und es bildet sich mit einem im gleichen DNA-Strang benachbarten Pyrimidin ein Cyclobutanring (Abbildung 24). Diese Strukturen sind möglich zwischen zwei Cytosinen (C), zwei Thyminen (T) oder auch gemischt mit Cytosin und Thymin.

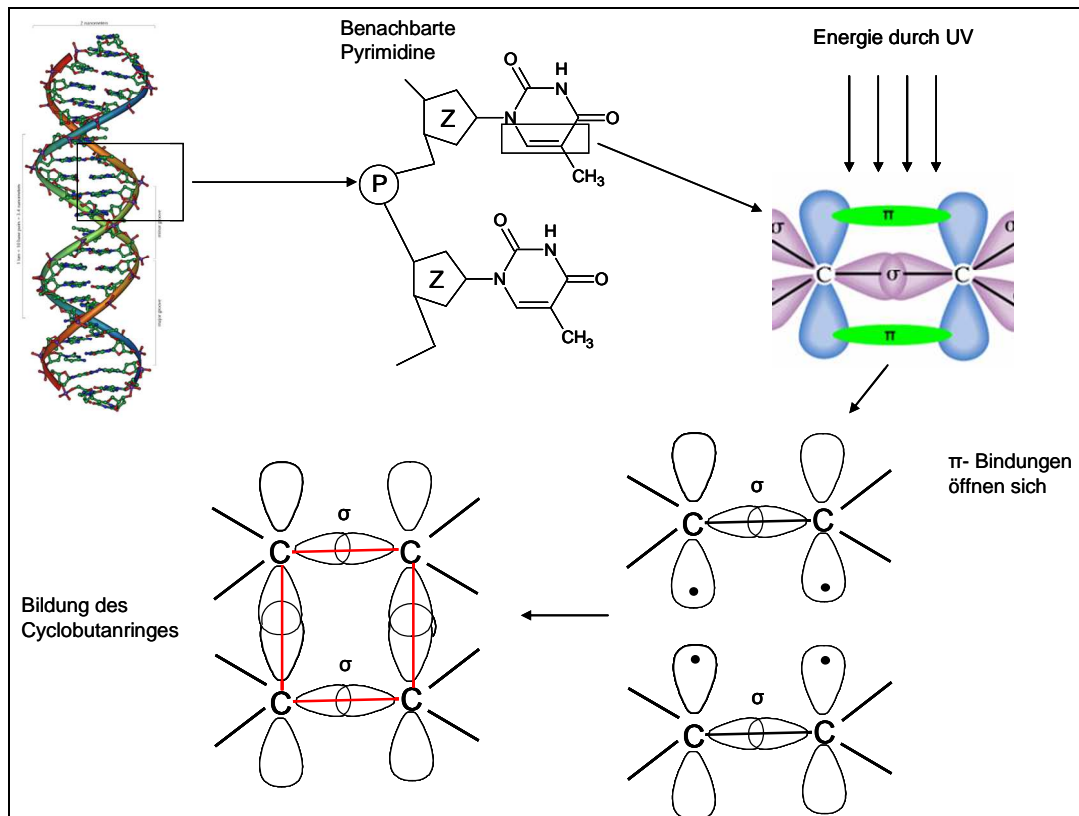


Abbildung 24: Entstehung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren.

Durch die Bildung dieser Dimere kommt es zu einer räumlichen Strukturänderung der DNA, wodurch die Replikation, die Zellteilung, sowie die DNA-Transkription verhindert werden können. Dies führt zu einer gravierenden Störung der Proteintranslation, sowie der Zellvitalität allgemein<sup>36</sup>. Wie im vorherigen Abschnitt über p53 bereits erwähnt wurde, sollten die abnormen DNA-Strukturen von p53 erkannt werden. Es kommt zu einem Anhalten des Zellzyklus, während dem die Zelle die Möglichkeit hat, den Schaden zu beheben. Werden die CPD nicht durch zelleigene Mechanismen repariert, sind entstehende Mutationen ein grosses Problem. Von den möglichen Dimerzusammensetzungen stellen die C-T-Dimere sowie die C-C-Dimere die mutagensten Kombinationen dar. Grund dafür ist die sogenannte „A-Rule“ (Postuliert durch I. Tessman 1976 in einem Abstract des Bacteriophage Meetings in Cold Spring Harbor). Sie besagt, dass die DNA-Polymerase  $\epsilon$ , wenn sie bei Läsionen im Strang ankommt, die sie nicht erkennen kann, gegenüber dieser Stelle automatisch ein Adenin einfügt. Bei T-T-Dimeren ist das kein Problem, da ihr normales Gegenüber immer ein Adenin ist. Betrifft es aber ein Cytosin, so wird anstelle eines Guanins fälschlicherweise ein Adenin eingesetzt, wodurch eine Mutation zustande kommt<sup>35</sup>.

Durch UV-Strahlung ausgelöste Krebszellen weisen im p53-Gen besonders häufig diese sehr mutagenen C-T-Dimere und C-C-Dimere auf <sup>36</sup>.

Lange wurde davon ausgegangen, dass die Cyclobutan Pyrimidin Dimere ausschliesslich durch UVB ausgelöste Schäden sind. Die französische Forschungsgruppe um Thierry Douki, hat jedoch in verschiedenen Arbeiten darlegen können, dass CPD auch durch UVA entstehen und dass sie sogar noch häufiger sind als die 8-Oxo-Gua <sup>37,40-42</sup>. Die Entstehung der Dimere geschieht allerdings nicht über eine direkte Energieaufnahme, da der UVA-Bereich energieärmer ist, sondern über einen Energietransfer via Chromophore durch eine Photosensibilisierung. Die vollständige Charakterisierung dieser UVA-absorbierenden Chromophore ist noch ausstehend.

## 1.9 Forschungsschwerpunkte anderer Gruppen und deren Detektionsmethoden für verschiedene Marker

Es besteht die Möglichkeit die Forschungsarbeit auf einen spezifischen Marker zu konzentrieren um diesen so umfassend wie nur möglich zu charakterisieren. Dabei dürfen allerdings die anderen Marker und die Einbettung in das ganze Kaskadensystem nicht vollständig ausser Acht gelassen werden. Viele Forschungsgruppen fokussieren sich daher auf ein ganzes Set von verschiedenen Markern oder aber auf eine spezifische Kaskade.

Die amerikanische Gruppe um H. Mukhtar und F. Afaq beschäftigt sich mit pflanzlichen Stoffen zur Verhinderung von UV-Zellschäden. Sie verwenden eine Vielzahl verschiedener Marker angefangen bei DNA-Schäden wie CPD und 8-Oxo-Gua, weiter zu COX-2, PCNA, p53, NF- $\kappa$ B und weitere. Die Forscher arbeiten mit künstlichen Hautmodellen und mit Mäusen und machen zum Nachweis der Marker hauptsächlich immunhistochemische Färbungen und Western-Blot-Analysen <sup>54,55</sup>.

Die L'Oréalgruppe aus Frankreich mit L. Marrot, J.R. Meunier und J.P. Belaïdi als Vertreter der Kosmetikindustrie fokussiert sich vermehrt auf die Verhinderung von UV-Schäden durch Sonnenschutzprodukte. Sie befassen sich mit den CPD, p53 und anderen Proteinen in dessen Umfeld (Mdm2, p21, Gadd45) und arbeiten mit Zellkulturen und mit rekonstruierten Hautmodellen. Verschiedenste Detektionsmethoden kommen dabei zur Anwendung. Dazu gehören der Comet Assay, Western-Blot, ELISA, quantitative „Real-time Polymerase-chain-reaction (PCR)“, sowie ein Bioplex Phosphoprotein Assay (basiert auf Beads, die zusammen mit gebundenen Proteinen und Antikörpern via einer sogenannten Luminex-Technologie gemessen werden) <sup>56,57</sup>.

Die Mitglieder des Teams „Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques“ aus Grenoble (F) fokussieren sich auf durch UVA ausgelöste DNA-Schäden. Dazu zählen vor allem die CPD und die 8-Oxo-Gua. Zu deren Quantifizierung nützt die Gruppe um T. Douki vor allem chromatographische Methoden. Eine davon ist die Kombination aus „High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)“ und Massenspektroskopie (MS) → HPLC-MS/MS. Sie ermöglicht eine getrennte Detektion aller verschiedener Dimerkombinationen <sup>58,59</sup>.

Die belgische Gruppe um P. Agostinis und M. Garmyn beschäftigt sich mit den Wegen der intrinsischen Apoptose. Sie versuchen die genauen Abläufe und Zusammenhänge in dieser Kaskade zu erfassen und verwenden dabei Marker wie p38-MAPK, Noxa (pro-apoptotisch aus der Familie der Bcl-2), den „Hypoxia-inducible factor-1“ (HIF-1), p53, „Apoptosis signal regulating kinase-1 (Ask-1), ROS und EGFR. Deren Detektion erfolgt mittels vieler verschiedener Assays wie zum Beispiel ELISA, quantitative RT-PCR, Durchflusszytometrie, Western-Blot, Immunopräzipitation, Immunzytofluoreszenz sowie immunzytochemische Methoden <sup>60,61</sup>.



## 1.10 Ziele

In der Frühphase der Entwicklung von Sonnenschutzprodukten braucht es Hinweise auf die Schutzleistung der Formulierung. Es gibt viele Methoden zur Charakterisierung dieser Schutzleistung, unterteilt in *in vivo* und *in vitro* Methoden.

Die Routinemethode der *in vivo* SPF-Bestimmung (charakterisiert vornehmlich eine UVB-Schädigung) am Menschen birgt Schwierigkeiten wie hohe Kosten, lange Dauer und eine Schädigung der Haut der Probanden. Mit der ebenfalls weit verbreiteten, routinemässig angewendeten *in vitro* UVA-PF-Bestimmung kann die Gesamtheit der Schutzleistung einer Formulierung ebenfalls nicht angegeben werden.

Der SPF (UVB) gibt den Schutz vor einer Erythementstehung an. Der genaue Zusammenhang zwischen Erythem und Hautkrebs ist wissenschaftlich noch nicht geklärt. Ausserdem bestehen Hinweise darauf, dass einige relevante biologische Schädigungen bereits vor der Erythementwicklung entstehen. Darüber hinaus wird die Schutzleistung gegenüber UVA nicht charakterisiert. Es fehlen somit allgemeinere, das ganze UV-Spektrum betreffende Kenngrössen, welche bereits frühe Formen von Schädigungen beschreibt und bei welcher es einen näheren Zusammenhang zur Hautkrebsentstehung gibt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines *in vitro*-Testsystems zur Beurteilung der Schutzleistung einer Formulierung in einem frühen Entwicklungsstadium. Als Modell stehen menschliche Hautzellen zur Verfügung. Dabei sollen direkt auf Zellebene, am zentralen Schadensplatz, ausgewählte Marker evaluiert werden, die die Schutzleistung der Formulierung charakterisieren können. Dieses Set an Markern soll als Kenngrösse für einen molekularen Sonnenschutz verwendet werden können. Als längerfristiges Ziel sollen solche Markersets einerseits das Verständnis der intra- und extrazellulären Abläufe nach UV-Einwirkung fördern, andererseits als Screeninginstrument in der Produktentwicklung dienen.

## 2. Methoden

Eine Liste aller verwendeten Substanzen, Materialien und Gerätschaften inklusive Hersteller und Katalognummer, sowie die Sonnenschutzprodukte mit den Filterzusammensetzungen sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1 Sonnenschutzprodukte

Die Sonnenschutzprodukte wurden dazu verwendet, das *in vitro* Testsystem mit den jeweils gewählten Zellschadenmarker zu validieren. Es wurden dreizehn verschiedene Produkte mit SPFs zwischen 5 und 50+ ausgewählt (Tabelle 4). Acht von dreizehn Produkten waren Handelsware unterschiedlicher Hersteller und fünf weitere waren selbst hergestellte Formulierungen mit spezifischen Filterkompositionen.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Sonnenschutzprodukte.

<b>SPF 50+ *</b>	<b>SPF 50 *</b>
Daylong actinica (Spirig)	Daylong Kids (Spirig)
Ladival Allergische Haut (Stada)	
Ambre Solaire delial (Garnier)	
<b>SPF 36 **</b>	<b>SPF 30+ (Australien) *</b>
Testformulierung UVA+UVB-Filter (Eigenherstellung)	Sport Sunscreen (Cancer Council Australia)
Testformulierung Breitbandfilter (Eigenherstellung)	Hamilton Optimal (Hamilton)
<b>SPF 30 *</b>	<b>SPF 25 *</b>
Nivea Sun DNage (Beiersdorf)	Daylong ultra (Spirig)
<b>SPF 16 **</b>	<b>SPF 10 **</b>
COLIPA High SPF Reference Sunscreen P3 (Eigenherstellung)	Testformulierung UVB-Filter (Eigenherstellung)
<b>SPF 5 **</b>	
Testformulierung UVA-Filter (Eigenherstellung)	

(\* SPF Produktedeklaration; \*\* SPF experimentell bestimmt via BASF-Simulator)

#### 2.1.1. Kategorisierung des SPF

Die europäische Kommission nahm eine Einteilung des SPF in verschiedene Kategorien vor <sup>62</sup>. Dies sollte vor allem den Konsumenten helfen eine Verbindung zwischen dem Zahlenwert des SPF und dessen Schutzwirkung herzustellen. Es existieren vier Kategorien: niedriger Schutz, mittlerer Schutz, hoher Schutz und sehr hoher Schutz. Welche SPF-Bereiche diese jeweils umfassen, ist in Tabelle 2 dargestellt. Für die vorliegende Arbeit wurden die Kategorien leicht modifiziert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Schutzkategorien des SPF

Europäische Kommission		Vorliegende Arbeit	
Kategorie	SPF	Kategorie	SPF
Niedriger Schutz	6 (6-9.9) 10 (10-14.9)	Sehr niedriger Schutz	5
Mittlerer Schutz	15 (15-19.9) 20 (20-24.9) 25 (25-29.9)	Niedriger Schutz	10 16
Hoher Schutz	30 (30-49.9) 50 (50-59.9)	Mittlerer Schutz	25 30
Sehr hoher Schutz	50+ (60 ≤)	Hoher Schutz	30+ 50
		Sehr hoher Schutz	50+

### 2.1.2. UVA-PF Bestimmung der Sonnenschutzprodukte

Zur erweiterten Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten Sonnenschutzprodukte wurde deren UVA-PF nach der offiziellen COLIPA-Methode „Method for *in vitro* determination of UVA protection 2011“ bestimmt. Dazu wurden PMMA-Platten (siehe Kapitel 2.2.1), der Atlas Suntest CPS+, sowie das Spektrometer Labsphere UV 2000S benutzt. Pro Sonnenschutzprodukt standen drei Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platten (50x50 mm) zur Verfügung und pro Platte wurden bei den Transmissionsmessungen fünf Messpunkte erfasst, was in 15 Werten pro Produkt für die Berechnungen resultierte. Pro PMMA-Platte wurden 0.75 mg/cm<sup>2</sup> Substrat aufgetragen, was bei einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> einer Menge von 18.75 mg entspricht.

In einem ersten Schritt wurde eine Referenzprobe erstellt, indem eine PMMA-Platte mit 15 µl Glycerin bestrichen wurde. Darauf folgte die Präparierung der drei PMMA-Platten mit dem jeweiligen Produkt. Der Ablauf war analog demjenigen unter 2.2.1. beschriebenen Prozedere mit Vorsättigung des Fingers und Verteilung des Produktes. Die Platten wurden jeweils vor dem Auftragen des Substrates, danach und nach dessen Verteilung gewogen. Anschliessend wurden diese während 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur äquilibriert um eine Trocknung des Produktes und die Ausbildung eines stabilen Produktfilms zu gewährleisten.

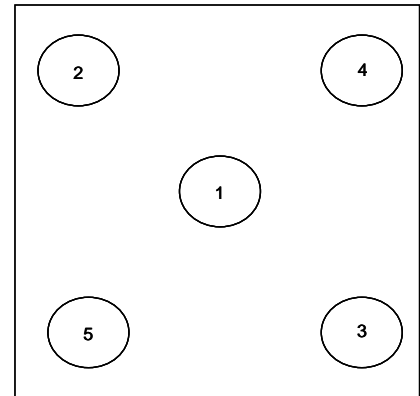


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Transmissionsmesspunkte pro PMMA-Platte.

Nach einer erneuten Gewichtsbestimmung wurde eine spektrale Transmissionsmessung durchgeführt. Mit Glycerin wurde ein Blankwert (Referenzspektrum) erstellt. Wie weiter oben erwähnt, wurde die Transmission pro Platte an fünf verschiedenen Punkten gemessen (Abbildung 25). Es wurde ein UV Spektrum von 290 nm bis 400 nm aufgenommen, welches dann mit Hilfe des C-Koeffizienten mathematisch angepasst worden ist um einen, dem gelabelten SPF der Packung (*in vivo*) angepassten, *in vitro* SPF zu erhalten (Formel 1).

$$\text{SPF}_{in\ vitro,adj} = \text{SPF label} = \frac{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=290nm}^{\lambda=400nm} E(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A_0(\lambda)*C} * d\lambda} \quad (1)$$

$E(\lambda)$  = Erythemales Aktionsspektrum (CIE 1987)

$I(\lambda)$  = Spektrale Bestrahlung der UV-Quelle

$A_0(\lambda)$  = Mittelwert der monochromatischen Absorptionsmessungen pro Platte vor Bestrahlung

$d(\lambda)$  = Wellenlängenschritt von 1 nm

$C$  = Anpassungskoeffizient iterativ bestimmt

In einem weiteren Schritt wurde der  $UVAPF_0$  berechnet, mit dessen Hilfe dann die benötigte UVA-Dosis ( $D$ ) und daraus resultierend die Bestrahlungszeit ermittelt werden konnten (Formel 2).

$$D = UVAPF_0 \times D_0 \quad \text{J/cm}^2 \text{ mit } D_0 = 1.2 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA (fixiert durch COLIPA)} \quad (2)$$

Das verwendete Computerprogramm lieferte nach den Transmissionsmessungen direkt die Zeitdauer der Bestrahlung, berechnet als Mittelwert der  $D$ -Werte aller drei Platten. Diese wurden dann für die angegebene Dauer im Suntest CPS+ bestrahlt, welcher 15 Minuten vor Bestrahlung angeschaltet wurde.

Danach erfolgte eine zweite Transmissionsmessung analog der ersten. Dieses zweite UV-Spektrum wurde wiederum mit dem  $C$ -Koeffizienten mathematisch angepasst und anschliessend der *in vitro* UVAPF berechnet (Formel 3).

$$UVAPF = \frac{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) * I(\lambda) * d\lambda}{\int_{\lambda=320nm}^{\lambda=400nm} P(\lambda) * I(\lambda) * 10^{-A(\lambda)*C} * d\lambda} \quad (3)$$

$P(\lambda)$  = PPD Aktionsspektrum

$I(\lambda)$  = Spektrale Bestrahlung der UV-Quelle

$A(\lambda)$  = Mittelwert der monochromatischen Absorptionsmessungen pro Platte nach Bestrahlung

Sämtliche Spektren wie  $E(\lambda)$ ,  $I(\lambda)$  und  $P(\lambda)$  sind im Appendix I der COLIPA Guideline zu finden <sup>26</sup>.

Der *in vitro* UVAPF des untersuchten Produkts ergab sich aus dem Mittelwert der UVAPFs der drei Einzelplatten.

## 2.2 Bestrahlung

Damit im Labor Bestrahlungsversuche mit Zellkulturen und Hautmodellen unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt werden können, braucht es geeignete Geräte und Lampen, welche das Sonnenlicht möglichst originalgetreu und realitätsnahe nachahmen. Bei diesen künstlichen Strahlungsquellen kann grob zwischen den sogenannten Sonnensimulatoren und den Fluoreszenzlampen unterschieden werden.

Der klassische Sonnensimulator besteht aus einer optisch gefilterten Xenonbogenlampe und weist ein glattes, kontinuierliches Spektrum im UV-Bereich auf. Die Leistung dieser Geräte variiert zwischen 75 Watt und 6 Kilowatt oder mehr. Es werden diverse optische Filter und Spektralspiegel eingesetzt um unerwünschte Strahlungsbereiche herauszufiltern oder zu reflektieren. Dazu gehören häufig der 1 mm dicke Schott Filter Typ WG320 (begrenzt das Wellenlängenspektrum nach unten) und Schott Filter Typ UG5 oder UG11 (absorbieren sichtbares Licht). Die Spektralspiegel entfernen Wellenlängen im sichtbaren und im infraroten Bereich<sup>63</sup>.

Die Fluoreszenzlampen emittieren Strahlung mit Wellenlängen entweder grösstenteils von UVB oder von UVA. Es ist jedoch nicht korrekt von UVA-Lampen oder UVB-Lampen zu sprechen, da bei praktisch allen dieser Lampen auch noch UVB respektive UVA oder gar UVC abgestrahlt wird. Auch hier sind Filter zum Erhalt des gewünschten Spektrums nötig. Die Fluoreszenzlampen werden häufig zur Untersuchung von Effekten eines spezifischen Teils des Spektrums verwendet. Da allerdings von einem Wechselwirken (synergistisch, antagonistisch oder auch additiv) der verschiedenen Wellenlängen im UV-Bereich ausgegangen werden muss, ist es wichtig auch die Wirkungen des ganzen Spektrums im Auge zu behalten, da sich Resultate von Untersuchungen von Teilbereichen dadurch ändern können<sup>64</sup>.

Die beste Annäherung an die Sonne zeigen die Sonnensimulatoren unter der Voraussetzung, dass die geeigneten Filter eingebaut sind.

Ein wichtiger Diskussionspunkt bleiben die zum Teil grossen Unterschiede zwischen Bestrahlungsergebnissen von verschiedenen Labors. Ein Vergleich mit Literaturwerten und Ergebnissen aus anderen Labors kann nur gemacht werden, wenn die Bestrahlungsquellen, die verwendeten Filter und die Dosimeter die gleichen spektralen Charakteristiken aufweisen<sup>65</sup>. Die Voraussetzung dafür ist eine detaillierte Auflistung der verwendeten Gerätschaften und deren Spezifikationen. Für die genaue Charakterisierung eines künstlichen Strahlungsgerätes bedarf es einer jährlichen Kalibration.

Die UV-Exposition der Zellen in vorliegender Arbeit erfolgte in einem Sonnensimulator (Suntest CPS+ der Firma Atlas Material Testing Technology GmbH). Es handelt sich um einen luftgekühlten Xenonstrahler (Leistung 1,1 kW), der Strahlung im Bereich von UV, VIS und IR emittiert. Abbildung 26 zeigt den schematischen Aufbau des Gerätes.

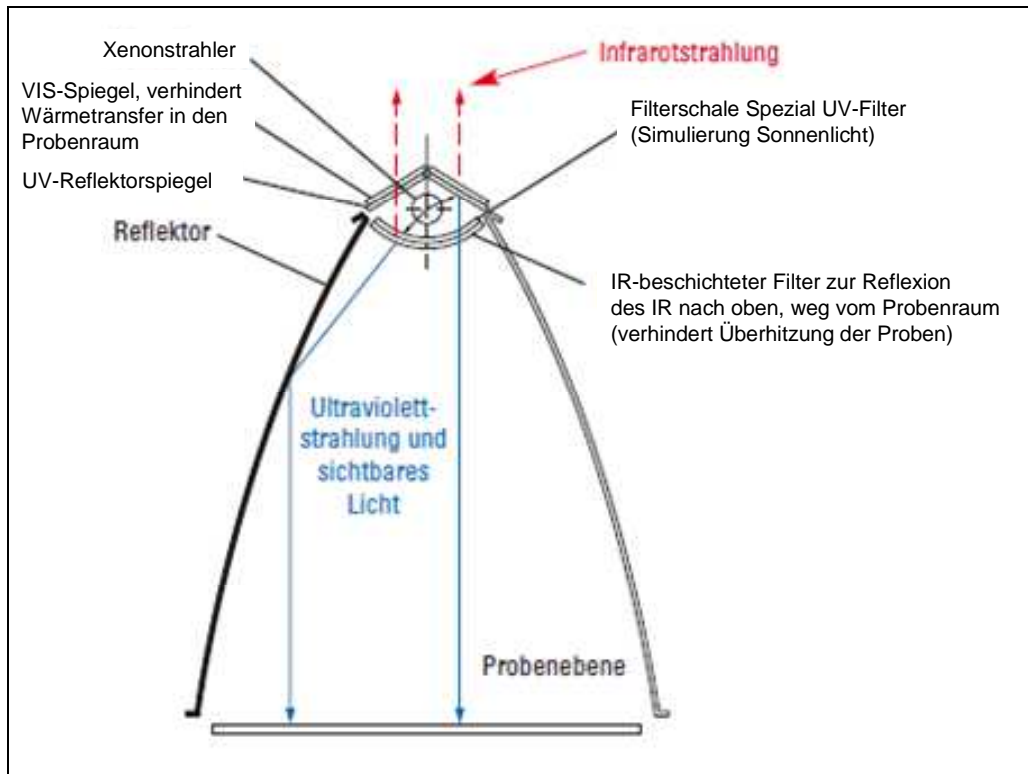


Abbildung 26: Schematischer Aufbau Innenraum Suntest CPS+.

Die Leistung des Xenonstrahlers kann variiert werden. Als Standardeinstellung für die Bestrahlungsversuche wurden  $750 \text{ W/m}^2$  verwendet. Durch diese hohe Leistung wird die gewünschte Bestrahlungsdosis rasch erreicht und eine Trockenlegung der Zellkulturen durch Verdunsten des Puffers kann vermieden werden.

Für die Versuche dieser Arbeit wurde stets der Spezial UV-Filter (Filter B) verwendet, der offiziell für Messungen nach „European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association“ (COLIPA) Standard zugelassen ist. Dieser verhindert, dass Strahlung mit einer Wellenlänge kleiner als  $290 \text{ nm}$  in den Probenraum gelangt und simuliert das natürliche Sonnenlicht.

Die jährliche Kalibrierung der Firma „optocal“ gemäss den Vorgaben der COLIPA ergab folgendes Emissionsspektrum vom Suntest CPS+ (Abbildung 27). Das für die Versuche dieser Arbeit massgebende Spektrum ist jenes von Filter B bei  $750 \text{ W/m}^2$  (dunkelblaue Linie).

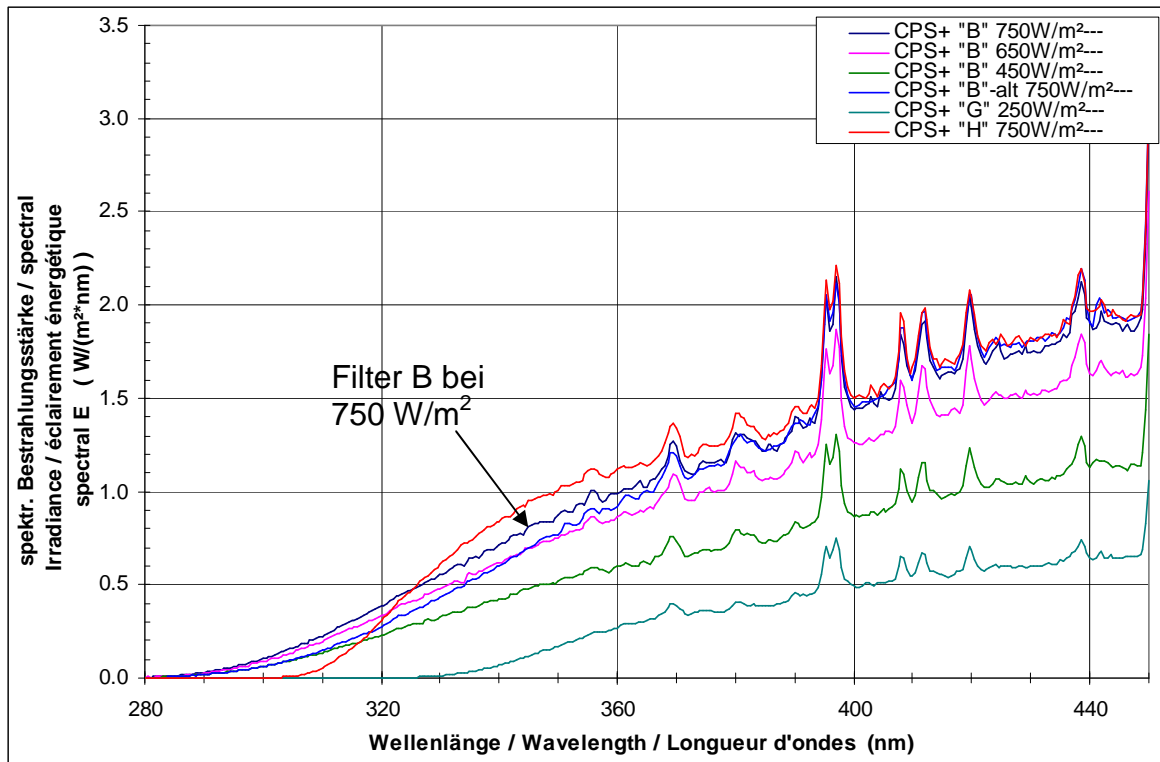


Abbildung 27: Spektrale Bestrahlungsstärken des Suntest CPS+ gemäss Kalibrierung April 2011.

Der grösste Anteil der emittierten Strahlung liegt im VIS-Bereich (nicht dargestellt in Abb. 27); unterhalb von 400 nm ist UVA die Hauptkomponente. Der UVB-Anteil bleibt im Verhältnis zu UVA gering, entsprechend den Strahlungsverhältnissen auf der Erdoberfläche.

Zur Überprüfung der Alltagsrelevanz vom Suntest CPS+, nachfolgend die Gegenüberstellung einiger Strahlungsparameter der Sonne und des verwendeten Sonnensimulators. Ein Vergleich der spektralen Bestrahlungsstärke dieses künstlichen Systems mit derjenigen der Sonne in Albuquerque (USA) und Melbourne (AUS) zeigt, dass die Bestrahlungsstärke des Gerätes etwas höher im Vergleich zur Sonne ist. Das gilt vor allem für den oberen UVA-Bereich (Abbildung 28). Der Kurvenverlauf ist jedoch ähnlich, so dass der Sonnensimulator durchaus ein geeignetes, realitätsnahes Modell darstellt.

Eine Strahlen-Dosis kann entweder in MED oder SED (Standard erythema dose) angegeben werden. Ein MED entspricht gemäss COLIPA einer Energiedosis von  $210 \text{ J}/\text{m}^2$  (Werte beziehen sich ursprünglich auf die DIN-Vorschrift 67501) bzw. ein SED entspricht  $100 \text{ J}/\text{m}^2$ . An einem Sommertag in Europa werden zwischen 30 und 40 SED<sup>63</sup> resp. 14 bis 19 MED erreicht. Messungen in Egerkingen an einem Sommertag (August 2011) bei unbewölktem Himmel ergaben kumuliert etwa 12 MED. Bei Sonnenhöchststand lagen die gemessenen Werte bei 2.7 MED pro Stunde. Die bei den CPD-Versuchen verwendeten  $828 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  (mit neuem Filter B: 34 Minuten und 20 Sekunden) entsprechen 7 MED. Das entspricht ungefähr der Dosis, die sich in der Schweiz nach drei Stunden (Mittagszeit) im Freien akkumuliert. Somit ist auch die Strahlen-Dosis, welche die Zellen im Gerät erhalten, alltagsrelevant.

Während der jährlichen Kalibrierung stellte sich heraus, dass beim Suntest CPS+ und dem verwendeten Filtertyp auch Wellenlängen im Bereich bis 270 nm, also Strahlung aus dem UVC-Bereich, in den Probenraum und somit auf die Zellen ge-

langten. Die Menge ist mit  $5.7 \cdot 10^{-4}$  bis  $3.4 \cdot 10^{-3} \text{ W/m}^2$  gering, ein Einfluss auf sensible biologische Systeme ist aber aufgrund der steigenden Energieintensität mit abnehmender Wellenlänge nicht auszuschliessen. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Problematik auch bei anderen Forschungsgruppen auftritt.

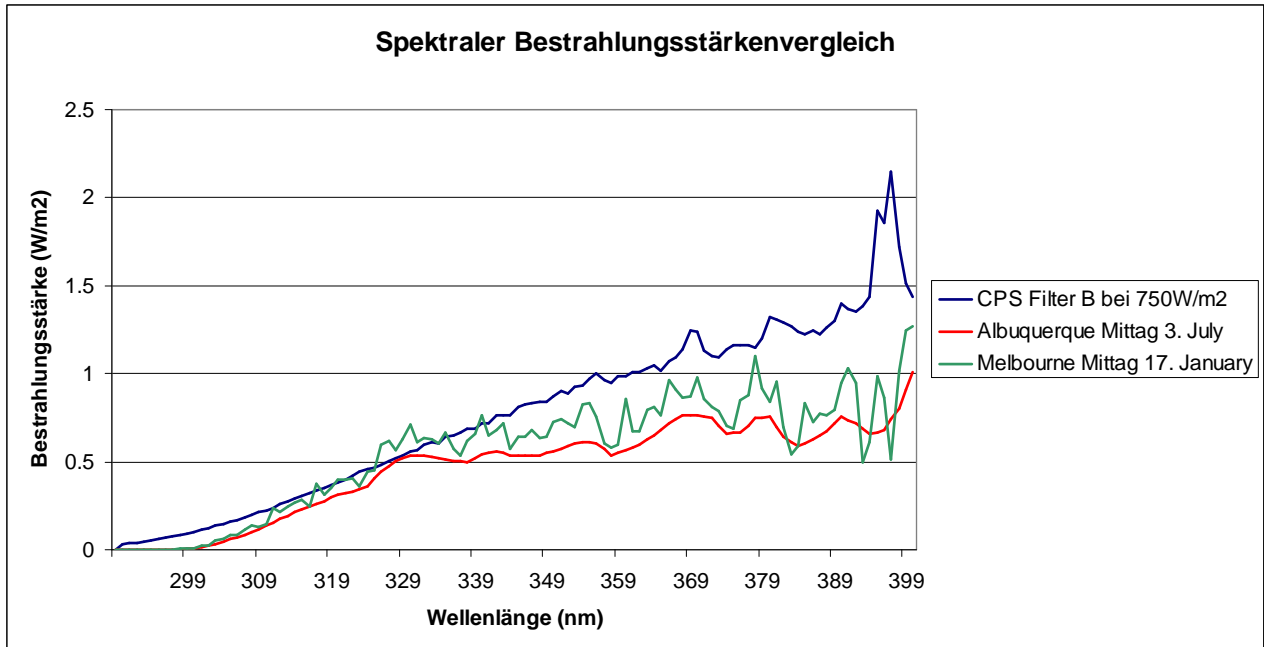


Abbildung 28: Vergleich spektraler Bestrahlungsstärken vom Suntest CPS+ und der Sonne in Albuquerque und Melbourne.

Für alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Marker ist vor allem die UVB-Strahlung Auslöser für deren Bildung und/oder Ausschüttung. Deshalb wurden die jeweiligen Bestrahlungszeiten nur anhand des UVB-Anteils berechnet und alle festgelegten Bestrahlungsdosen ( $\text{mJ/cm}^2$ ) auf UVB bezogen. Gemäss dem letzten Kalibrierungsprotokoll vom April 2011 bedeutet dies:

Die Bestrahlungsdosis für den UVB-Bereich (290-320 nm) betrug im Schnitt  $4.02 \text{ W/m}^2$ .

$4.02 \text{ W/m}^2$  entsprechen  $4.02 \text{ J}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  bzw.  $0.402 \text{ mJ}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$

Sollen die Zellen nun einer Dosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt werden, kann die dafür benötigte Zeit im Bestrahlungsgerät wie folgt berechnet werden:

$$\frac{100 \text{ mJ/cm}^2}{0.402 \text{ mJ}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})} = \text{benötigte Zeit in Sekunden}$$

$$\frac{100 \text{ mJ/cm}^2}{0.402 \text{ mJ}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})} = 248.76 \text{ Sekunden} = 4 \text{ Minuten } 09 \text{ Sekunden}$$

Alle Versuche ab Mitte April 2011 wurden mit dem Wert  $4.02 \text{ W/m}^2$  im UVB durchgeführt. In der Zeit davor befand sich im Suntest CPS+ ein alter Filter B, welcher trotz



gleicher Wattleistung einen tieferen Bestrahlungsstärkenwert von  $2.3 \text{ W/m}^2$  aufwies. Dadurch verdoppelten sich die Bestrahlungszeiten für die gleichen Bestrahlungsdosen beinahe, d.h. um die Proben einer Dosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$  auszusetzen, benötigte man im alten Setup 7 Minuten und 15 Sekunden.

### 2.2.1. Vorbereitung der PMMA-Platten

Als Trägeroberfläche für die verschiedenen Sonnenschutzprodukte wurden Plexiglasplatten (Polymethylmethacrylat  $40 \times 40 \text{ mm}$ ) der Firma Schönberg verwendet. Gemäss COLIPA-Guideline „*In vitro* method for the determination of the uva protection factor and ‚critical wavelength‘ values of sunscreen products“ müssen die Platten UV-transparent, nicht fluoreszierend, photostabil, sowie inert gegenüber allen Bestandteilen der zu testenden Produkte sein. Hinzu kommt, dass eine Seite dieser PMMA-Platten aufgeraut sein muss um das Relief der Haut zu simulieren. Die Firma Schönberg erreicht dies durch Bearbeitung mittels Sandstrahlung, die Platten weisen eine mittlere Oberflächenrauheit ( $S_a$ ) von  $2 \mu\text{m}$  auf.

Bei der Etablierung der Assaybedingungen wurden anstelle von Sonnencreme  $9.6 \mu\text{l}$  Glycerin pro Platte aufgetragen. Dies diente als Blankwert und war für die Einstellungen unabdingbar, da die Platten selber schon einen gewissen, kleinen Teil der UV-Strahlung absorbierten und diese Tatsache bei den Voreinstellungen berücksichtigt werden musste.

Vor dem Auftragen des Sonnenschutzproduktes oder von Glycerin musste ein Finger mit dem jeweiligen Produkt vorgesättigt werden. Das verhinderte, dass das Produkt auf der Haut statt auf der Platte haften blieb. Die Einwaage der Substanz sollte möglichst homogen über die PMMA-Platte verteilt werden um anschliessend ein gleichmässiges Auftragen zu gewährleisten. Es sollten insgesamt  $0.75 \text{ mg/cm}^2$  sein, wobei das bei einer Fläche von  $40 \times 40 \text{ mm}$   $12 \text{ mg}$  Produkt resp.  $9.6 \mu\text{l}$  Glycerol entsprach. Danach wurde alles rasch über die ganze Oberfläche verteilt um eine homogene Produktschicht zu erhalten. Die Platte wurde jeweils vor und nach Produktzugabe gewogen. Vor der Bestrahlung erfolgte während 15 Minuten eine Äquilibrierung im Dunkeln bei Raumtemperatur (für Details siehe COLIPA Guideline Referenz 26).

Eine Besonderheit beim Bestrahlungsvorgang stellte die spezielle Befestigung dar (Abbildung 29), die dazu verwendet wurde, die PMMA-Platten auf den 6-Well-Platten zu fixieren. Dies war aufgrund des Luftstroms der Kühlung vom Xenonstrahler nötig.

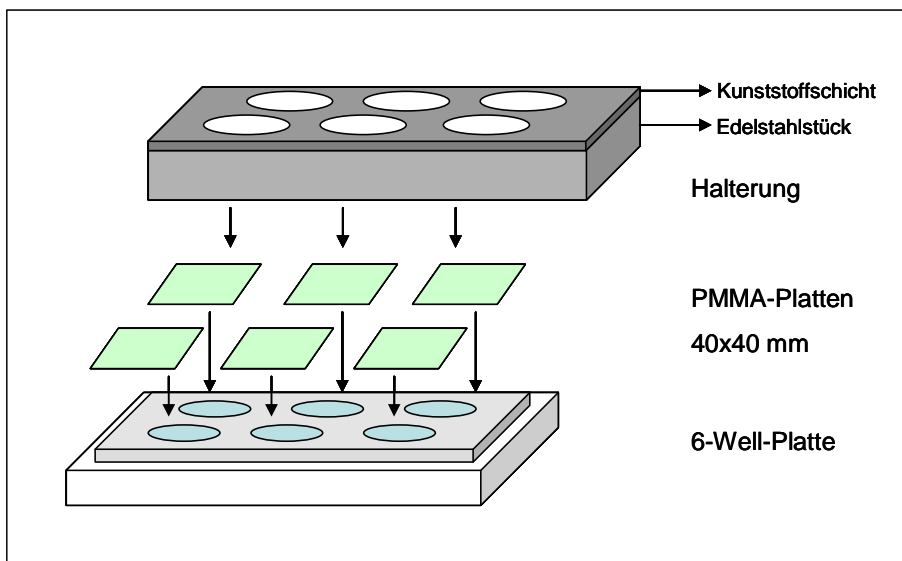


Abbildung 29: Bestrahlungsanordnung.

## 2.2.2. Bestrahlungsablauf

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, pro Well rund  $1.1 \cdot 10^6$  Zellen in 2 ml Kulturmedium und rund acht Stunden kultiviert. Danach ersetzte man das Kulturmedium durch ein Mangelmedium (ohne Zusätze wie Kälberserum oder Wachstumsfaktoren) und belies die Platten über Nacht unter Standardbedingungen im Inkubator. Der Wechsel auf Mangelmedium stellte sicher, dass die Zellen durch das Kulturmedium nicht übermäßige Wachstumsstimuli erhielten, welche dann die Reaktion auf das UV verfälschten. Pro Bedingung (Inkubationszeiten oder Bestrahlungsdosen oder Sonnenschutzprodukte) gab es pro Versuch mindestens Triplikate.

Am zweiten Versuchstag wurde bestrahlt. In jedem Well befanden sich ca. zwei Millionen Zellen, wenn die Zellen gleichmässig und konfluent vorlagen.

Vor der Bestrahlung wurde das Mangelmedium durch 4 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS(+)) pro Well ersetzt um allfällige Interferenzen der Strahlung mit Bestandteilen des Mediums zu vermeiden. Um eine Trockenlegung der Zellen während des Bestrahlungsvorganges zu verhindern, wurde die doppelte Flüssigkeitsmenge pro Well (4 ml statt 2 ml) verwendet.

Die in Abbildung 29 gezeigte Anordnung wurde auf einer Edelstahlplatte im Belichtungsgerät positioniert und für die berechnete Zeit der Strahlung ausgesetzt. Um eine konstante Bestrahlung zu gewährleisten, sollte der Suntest CPS+ rund 15 Minuten vor der Probenexposition gestartet werden. Die Temperatur im Gerät war immer kleiner als  $40^{\circ}\text{C}$ , Messungen der Bodentemperatur (Höhe Edelstahlplatte) waren kleiner als  $37^{\circ}\text{C}$ .

Nach der Bestrahlung wurde das PBS(+) wieder mit 2 ml Mangelmedium pro Well substituiert und die Zellen wurden für einen pro Marker festgelegten Zeitraum im Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: In den Vorversuchen erarbeitete Inkubationszeiten für die jeweiligen Marker, entsprechend dem Zeitpunkt maximaler Reaktion auf UV.

Interleukin 1 $\alpha$	Interleukin 8	p38- MAPK	p53	Cyclobutan Pyrimidin Dimere
24h	24h	30 Min.	6h	2h

## 2.3 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Zelllinien gearbeitet, den Normalen Humanen Epidermalen Keratinozyten (NHEK) und mit Human adult low Calcium high Temperature Keratinozyten (HaCaT). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren (siehe Anhang) unter Standardbedingungen: bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Anteil. Die Medien wurden im Abstand von zwei bis drei Tagen gewechselt.

### Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK)

Die Zellen (PromoCell) stammen von menschlichem Vorhautgewebe, welches bei klinischen Operationen gewonnen wurde. Von der gleichen Firma wurden auch das Kulturmedium und der Detach Kit, bestehend aus einer Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0.025%/0.01%), später (0.04%/0.03%) und einer Trypsin Neutralisierungslösung (TNS) erworben. Dem Basalmedium mussten jeweils noch Wachstumsfaktoren von einem Supplementierungskit zugegeben werden.

Endkonzentrationen dieser Wachstumsfaktoren im Medium:

- Rinderhypophysenextrakt 0.4% (V/V)
- Epidermaler Wachstumsfaktor (menschlicher Herkunft) 0.125 ng/ml
- Humanes Insulin 5 µg/ml
- Hydrocortison 0.33 µg/ml
- Humanes Transferrin 10 µg/ml
- Epinephrin 0.39 µg/ml
- CaCl<sub>2</sub> 0.15mM

Für das Anziehen der Zellen wurden grosse Zellkulturflaschen (150 cm<sup>2</sup>), für die Bestrahlungsversuche 6-Well-Platten verwendet.

Flüssigkeitsmengen für die jeweiligen Behältnisse siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Verwendete Flüssigkeitsmengen für die Kultur der humanen Keratinozyten

	Zellkulturflasche	6-Well-Platte
PBS (Waschen)	12 ml	1 ml
Trypsin	5 ml	0.5 ml
TNS (Stoppen)	5 ml	0.5 ml
Medium	30 ml	2 ml

### Human adult low Calcium high Temperature Keratinozyten (HaCaT)

Diese Zelllinie (Prof. Fusening Universität Heidelberg) ist ebenfalls humaner Herkunft, allerdings spontan immortalisiert, aber nicht tumorigen.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium versetzt mit fötalem Kälberserum (FCS 5%) und PenStrep (1%) diente als Kulturmedium.

Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin 0.1% in PBS(-)/(EDTA) verwendet, gestoppt wurde die Reaktion jeweils mit Medium. Die Flüssigkeitsmengen der jeweiligen Behältnisse sind in Tabelle 8 ersichtlich.

Tabelle 8: Verwendete Flüssigkeitsmengen für die Kultur der HaCaT-Zellen

	Zellkulturflasche	6-Well-Platte
PBS (Waschen)	12 ml	1 ml
Trypsin	5 ml	0.5 ml
Medium (Stoppen)	10 ml	1 ml
Medium	30 ml	2 ml

### 2.3.1. Vitalitätsbestimmung

Es gibt viele verschiedene Methoden die Vitalität von Zellen zu überprüfen. Es kann grob zwischen direkten und indirekten Bestimmungen unterschieden werden. Bei direkten Bestimmungsmethoden bleiben die Zellen intakt, Beispiele dafür sind Färbungen mit anschließender Detektion im Durchflusszytometer, der Neutralrot-Test sowie die Färbung der Zellen mit Trypanblau. Indirekte Bestimmungen bedingen eine Lyse der Zellen, wie dies beispielsweise beim Tetrazoliumsals-Test oder beim Laktatdehydrogenase (LDH)-Test notwendig ist.

In vorliegender Arbeit kamen als standardisierte Methoden des Labors der Tetrazoliumsals-Test und eine Annexin V /7-AAD-Färbung mit anschließender Durchflusszytometer-Messung zur Anwendung.

#### Zellproliferationskit I mit Tetrazoliumsals

Das gelbe Tetrazoliumsals 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) wird nur in metabolisch aktiven Zellen mit den Cofaktoren Nicotinamadeninucleotid (NADH) und Nicotinamadeninucleotidphosphat (NADPH) zu violetten Formazan-Kristallen umgesetzt, die photometrisch quantifiziert werden können.

Der Test wurde direkt in den 6-Well-Platten durchgeführt. Nach der Bestrahlung und der jeweiligen Inkubationszeit wurden 200 µl MTT-Färbereagens zu den 2 ml Medium der Zellen in den Wells zugegeben und für vier Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Anschliessend wurden 2 ml Solubilisierungslösung (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M Salzsäure) beigefügt um die gebildeten Kristalle aufzulösen. Über Nacht erfolgte eine Inkubation im Brutschrank (Standardbedingungen).

Die Überstände wurden in Falconröhrchen überführt, während fünf Minuten bei 1200rpm zentrifugiert und dann je 200 µl Probe pro Well (96-Well-Platte) gegeben (n=2 oder n=3). Die Platte wurde bei den Wellenlängen 550 nm und 690 nm gemessen.

Proben von unbehandelten Zellen wurden als 100% „lebende Zellen“ gesetzt.

#### Annexin V-FITC /7-amino-actinomycin D (7-AAD)-Färbung

Das Prinzip der Analyse beruht auf der Markierung der Zellen mit den Proteinen Annexin V und 7-AAD. Annexin V bindet in Anwesenheit von Calcium spezifisch und hochaffin an Phospholipide. In der Frühphase der Apoptose wird die Symmetrie der Membranphospholipide gestört und es kommt zu deren Umverteilung bevor später ein Membranintegritätsverlust entstehen kann. Durch diese Umlagerungen gelangen Phospholipide, die sich sonst in der inneren Membran befinden, nach aussen. Dies ermöglicht dem Annexin V daran zu binden und so frühapoptotische Zellen zu markieren. Das Protein ist mit dem Farbstoff FITC gekoppelt und so mittels Durchflusszytometrie messbar.

Das 7-AAD bindet an die DNA-Basenpaare Guanin-Cytosin, welche nach Degradierung der DNA-Stränge bei spät apoptotischen/nekrotischen Zellen entstehen. Da es selbst fluoresziert, ist es an keinen weiteren Farbstoff gekoppelt.

Die zwei Bestandteile dieses Kits von Beckman und Coulter ermöglichen also eine Unterscheidung zwischen früh apoptotischen und spät apoptotischen/nekrotischen Zellen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist in Kapitel 2.4.2. beschrieben.

Nach Ablösung der Zellen aus den 6-Well-Platten wurden die Zellpellets in Bindepuffer aufgenommen, welcher zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Folgende Aufteilungen wurden vorgenommen:

Für den Versuch wurde eine Positivkontrolle benötigt. Dafür wurde das Pellet einer mit UV bestrahlten Probe in 480 µl (Überschuss 80 µl) Bindepuffer suspendiert. Davon wurden je 100 µl in vier FACS-Röhrchen pipettiert. Beim ersten Röhrchen blieb nur die Zellsuspension, beim Zweiten wurden 10 µl Annexin V-FITC zugegeben, beim Dritten 20 µl 7-AAD und beim Letzten 10 µl Annexin V-FITC plus 20 µl 7-AAD. Diese Färbungen dienen der Definierung der Einstellungen, dem Einrichten der Quadranten des Dot-Plots (Abbildung 30 C).

Für die Negativkontrolle wurde das Pellet einer unbestrahlten Probe in 240 µl Bindepuffer (40 µl Überschuss) aufgenommen und davon zwei Aliquote gemacht. Einmal nur die Zellsuspension und in der zweiten Probe zusätzlich 10 µl Annexin V-FITC und 20 µl 7-AAD.

Die Pellets aller anderen Proben wurden in 120 µl Bindepuffer (20 µl Überschuss) suspendiert und davon 100 µl in ein Röhrchen gegeben plus zusätzlich 10 µl Annexin V-FITC und 20 µl 7-AAD.

Anschliessend wurden alle FACS-Röhrchen für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Zum Schluss, um eine genügende Flüssigkeitsmenge pro Röhrchen zu erhalten, wurden zu jeder Probe noch 400 µl Bindepuffer auf Eis zupipettiert. Danach erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Die Messprotokolle enthielten folgende Plots (nähere Beschreibung in Kapitel 2.6.):

Drei Dot Plots; einmal mit Forward Scatter linear (Y-Achse) gegen Side Scatter linear (X-Achse) A, einmal ein Density Plot mit Forward Scatter linear gegen Side Scatter linear B und ein Dot Plot Kanal 4 mit 7-AAD (Y-Achse) gegen Kanal 1 mit FITC (X-Achse) C (Abbildung 30).

Als vitale Zellen wurden ausschliesslich die Zellen im Quadranten I3 (Abbildung 30 C Quadrant unten links) gezählt. Die Summe der Zellen in den anderen drei Quadranten ergaben den Anteil tote Zellen.

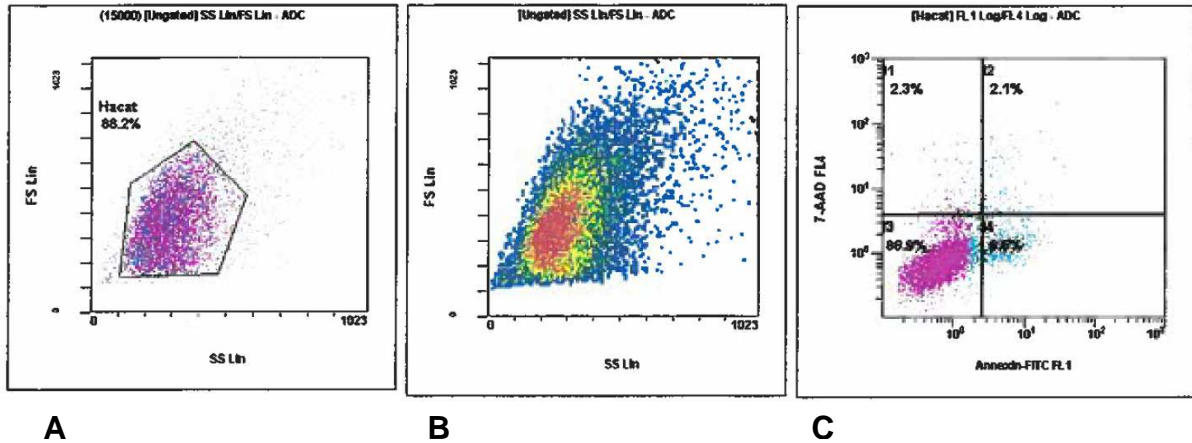


Abbildung 30: Darstellungsart in Form von Dot Plots: A Forward Scatter lin. gegen Side Scatter lin.; B Density Plot; C Kanal 4 (7-AAD) gegen Kanal 1 (FITC).

Ausserdem zwei Histogramm Plots; einmal Anzahl Events (Zellen) auf der Y-Achse gegen den Kanal 1 FITC auf der X-Achse und einmal Anzahl Events (Zellen) auf der Y-Achse gegen den vierten Kanal 7-AAD auf der X-Achse (Abbildung 31).

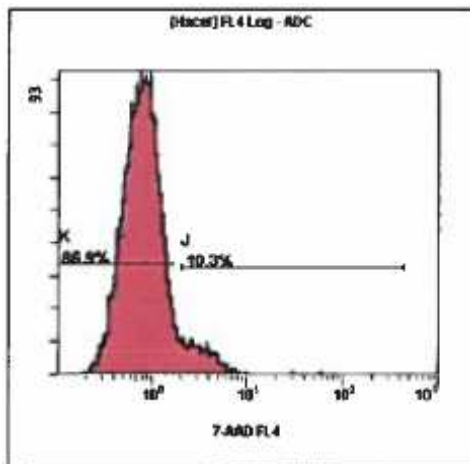


Abbildung 31: Beispiel für eine Histogramm Plot Darstellung.

## 2.4 Assaytechniken

### 2.4.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das immunologische Nachweisverfahren verschiedener Substanzen wie zum Beispiel Proteine, Toxine, Viren und andere beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Varianten des ELISA Assays verwendet. Einerseits der sogenannte Sandwich-ELISA (Abbildung 32), andererseits der indirekte ELISA (Abbildung 33). Beim Sandwich-ELISA wird die Mikrotiterplatte mit einem ersten Antikörper (a) überzogen, sogenanntes Coating, und die freien Stellen werden mit einer Lösung aus fötalem Kälberserum blockiert. Danach werden die zu detektierenden Substanzen (Antigene) dazugefügt, welche durch den Antikörper spezifisch gebunden werden (b). Überschüssige Antigene werden weg-gewaschen und ein zweiter Antikörper wird beigefügt, der sich an eine andere Stelle des Antigens anheftet. Dieser Antikörper wird oder ist bereits mit einem Enzym gekoppelt (c1) oder es wird ein Dritter mit Enzym versehener dazugefügt (c2). Nach Zugabe des Substrates, setzt das Enzym dieses um und eine Farbreaktion oder eine Fluoreszenz wird auslöst (d1 und d2).

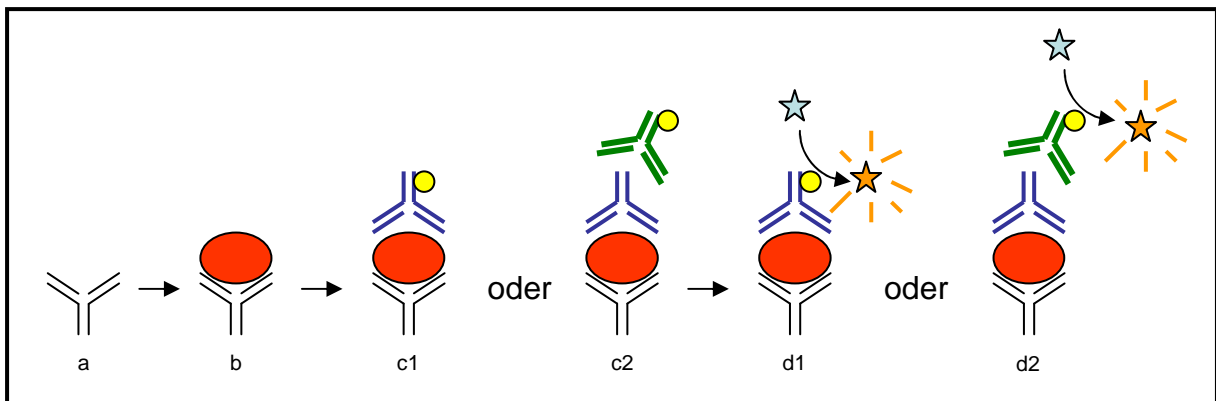


Abbildung 32: Funktionsprinzip Sandwich-ELISA.

Die Technik des indirekten ELISAs wurde beim Nachweis von CPDs verwendet. Dort wird nicht das Antigen, sondern ein für das Antigen spezifischer Antikörper nachgewiesen. Der erste Schritt besteht darin das Antigen an die Mikrotiterplatte zu binden (a), danach wird der erste Antikörper dazugegeben (b). Überschüsse werden weg-gewaschen bevor der Zweite, verknüpft mit einem Enzym, hinzugefügt wird (c). Die Zugabe eines Substrates führt auch hier zu einer Farb- oder Fluoreszenzreaktion (d).

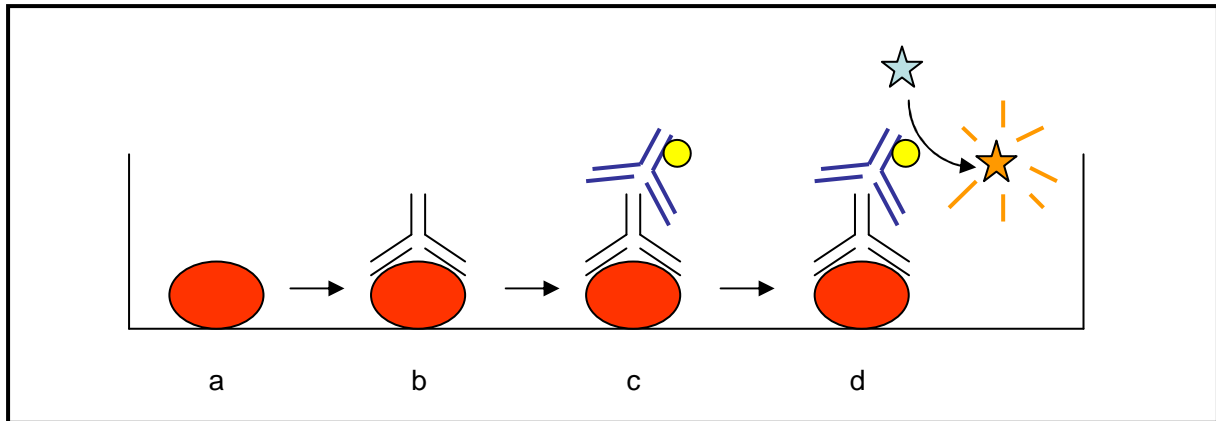


Abbildung 33: Funktionsprinzip des indirekten ELISA.

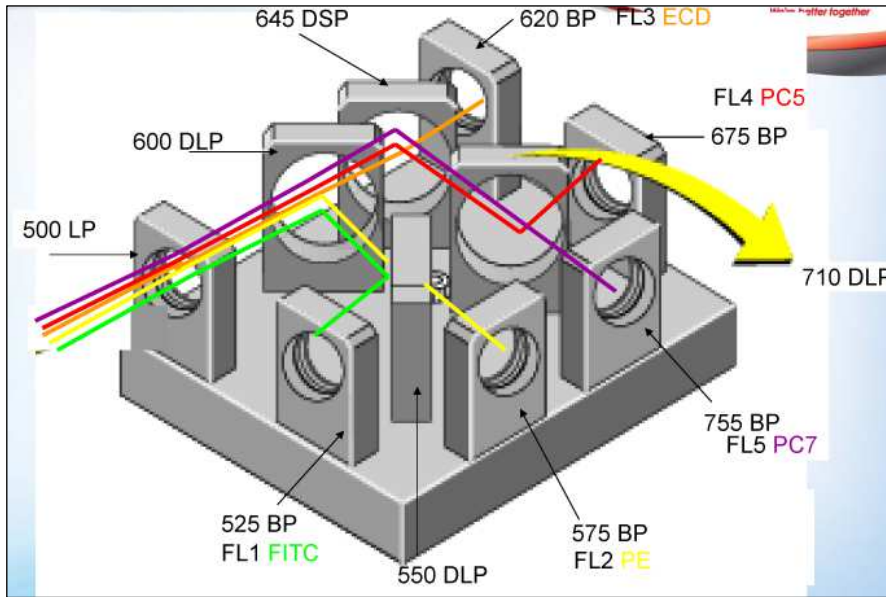
### 2.4.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Die zweite, neben ELISA genutzte Assaytechnik ist die Durchflusszytometrie (Aufbau siehe Abbildung 35). Zellen werden zentriert und aufgereiht, dann passieren sie im Detektorfeld einen Laserstrahl, dabei werden ihre Streulichteigenschaften erfasst. Dies ermöglicht eine Klassifizierung der Zellen anhand ihrer Grösse/ Oberflächenmerkmale und ihrer Granularität (mehr Granula bedeuten eine grössere Streuung). Die Grösse wird im Forward Scatter, die Granularität im Side Scatter erfasst. Zellen können auch mit Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann die Fluoreszenz gemessen werden. Dieses Prinzip wurde in vorliegender Arbeit angewendet.

Zentrale Bestandteile eines Durchflusszytometers:

- Fluidik      Mit Hilfe eines Probenpuffers werden die Zellen transportiert und durch Zugabe einer Hüllflüssigkeit (Sheath) hydrodynamisch fokussiert. Das heisst sie werden einzeln aufgereiht (Prinzip Perlenschnur) und treten dann in die Flusskammer ein.
- Laser        Verschiedene Lasertypen sind möglich, Geräte sind meist mit einem oder zwei Lasern ausgestattet. Gebräuchliche Laser sind Diodenlaser (rot), Argon-Ionen-Laser (blau), He-Ne-Laser (rot) oder auch UV-Laser.
- Optik        Zuständig einerseits für die Fokussierung des Lasers auf die Flusszelle und andererseits für das Einfangen des Streulichtes/Fluoreszenz der Zellen. Ersteres geschieht über ein Linsensystem und Letzteres wird mit Hilfe von Filtern und sogenannten Photomultiplier Tubes erreicht. Die Filter trennen das gestreute Licht in die einzelnen Farben auf und die Photomultiplier Tubes wandeln die ankommenden Photonen der jeweiligen Farbe in ein elektronisches Signal um. Jede Farbe wird in einem separaten Kanal erfasst (Abbildung 34).





LP: Longpassfilter  
 DLP: Dichromatischer Longpassfilter  
 DSP: Dichromatischer Shortpassfilter  
 BP: Bandpassfilter

Abbildung 34: Laser Filterblock mit den fünf Farberfassungskanälen ECD, PC5, PC7, PE und FITC.

- **Elektronik** Die Bestandteile der Elektronik haben die Aufgabe das optische Signal in ein elektronisches Signal, hier Spannungsimpulse, umzuwandeln. Anschliessend werden die Daten an den Computer weitergegeben.
- **Computer** Abschliessende Bearbeitung und Darstellung der Daten; Regulierung der Feineinstellungen.

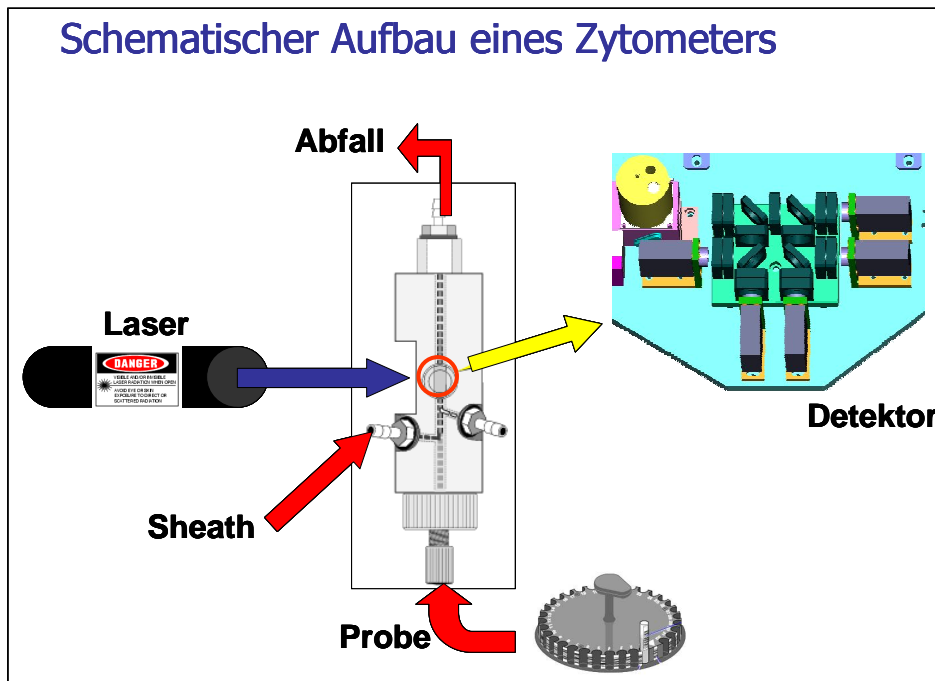


Abbildung 35: Schematischer Aufbau eines Zytometers.

Das für die Versuche verwendete Durchflusszytometer war der Cytomics FC 500 der Firma Beckman and Coulter. Es ist mit zwei Lasern ausgestattet, einem 488 nm Argon-Ionen-Laser und einem 635 nm Diodenlaser und ist in der Lage mit den fünf vorhandenen Kanälen fünf Fluoreszenzen gleichzeitig zu messen.

## 2.5 Interleukin 1 $\alpha$

### 2.5.1. Sandwich-ELISA für Interleukin 1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )

Es wurde mit dem DuoSet Kit von R&D Systems gearbeitet, das neben Antikörpern und Enzymen auch Standards enthielt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Mikrotiterplatten 96-Well Maxisorp von NUNC wurden mit dem Mausantikörper (100  $\mu$ l) gegen humanes IL-1 $\alpha$  gecoatet und über Nacht inkubiert. Danach erfolgten ein Waschzyklus (3x waschen mit Puffer) und die Blockierung der freien Stellen (Antigene ohne Primärantikörper) mit bovinem Serumalbumin (BSA) 1% für eine Stunde. Nach einem erneuten Waschzyklus wurden 100  $\mu$ l Probe (Zellkulturüberstand) oder Standard zugegeben. Anschliessend folgten eine Inkubation während zwei Stunden, ein Waschzyklus, sowie das Beifügen des biotinylierten Ziegenantikörpers gegen humanes IL-1 $\alpha$  (Detektionsantikörper) 100  $\mu$ l pro Well ebenfalls für zwei Stunden. Nach einem weiteren Waschzyklus wurde das Enzym (eine Meerrettichperoxidase konjugiert mit Streptavidin) zupipettiert. Das Volumen der Enzymlösung betrug ebenfalls 100  $\mu$ l pro Well, allerdings verkürzte sich die Inkubationsdauer auf 20 Minuten. An den letzten Waschzyklus anschliessend wurden 100  $\mu$ l Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat zugegeben. Die Substratumsetzung resultierte in einem blauen Farbumschlag. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50  $\mu$ l 1M Salzsäure verwendet, was zu einem Farbwechsel zu gelb führte. Analysiert wurde die Platte mit dem Photometer  $\mu$ Quant Microplate MQX 200 bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm (Eliminierung von Interferenzen der Platte).

Für genauere Informationen über Vorgehen und Material ist das zum Kit gehörige Protokoll zu beachten.

## 2.6 Interleukin 8

### 2.6.1. Sandwich-ELISA für Interleukin 8 (IL-8)

Auch für diesen ELISA wurde ein Kit benutzt, das Development Kit Human IL-8 von PeproTech mit Antikörpern, Enzym und Standards. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die 96-Well-Platte wurde mit 100 µl des aufgereinigten Kaninchenantikörpers gegen humanes IL-8 ge-coated und über Nacht inkubiert. Nach dem Waschzyklus mit Puffer (3x waschen) wurden eine Stunde lang allfällige, freie Stellen mit BSA-Lösung 1% blockiert. Nach einem erneuten Waschzyklus wurden 100 µl Probe (Zellkulturüberstand) oder Standard pro Well zugefügt. Zwei Stunden später erfolgten ein weiterer Waschzyklus und die Zugabe von einem biotinylierten Kaninchenantikörper gegen humanes IL-8 (100 µl), sowie eine Inkubation für zwei Stunden. Der Waschzyklus wurde danach wiederholt und pro Well kam ein Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (100 µl) für 30 Minuten dazu. An den letzten Waschzyklus schlossen sich die Substratumsatzung, wie bei IL-1 $\alpha$  mit TMB, und das Stoppen der Reaktion mit 50 µl 1M Salzsäure an. Die Messwellenlänge im Photometer betrug 405 nm und die Referenzwellenlänge 650 nm.

Auch hierzu sind genauere Angaben im Protokoll des Kits zu finden.

## 2.7 p38-MAPK

### 2.7.1. p38-MAPK-ELISA

#### Proteinisolierung für den p38-MAPK-ELISA

Vor der Durchführung des p38-MAPK-ELISAs mussten die Proteine aus den abgetrennten Zellen herausgelöst werden. Die Zellpellets wurden mit je 1 ml kaltem PBS (-) versetzt, in ein Eppendorftube überführt und während sieben Minuten bei 2000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und zum Rest 200 µl Zellextraktionspuffer zugegeben. Der Puffer bestand aus 2133 µl M-PER (Proteinextraktionsreagens), 357 µl Protease Inhibitor Cocktail (7-fach konzentriert) und 10 µl Natriumorthovanadatlösung (in Wasser). Auf das erste Vortexen folgte eine dreissigminütige Inkubation auf Eis mit zwischenzeitlichem vortexen. Anschliessend wurden die Proben für zehn Minuten bei 10'600rpm und 4°C zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 150 µl entnommen und mittels Bradford Assay die Proteinkonzentrationen bestimmt.

#### Quantifizierung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit einem Biophotometer der Firma Eppendorf. Die verschiedenen Proben mussten auf eine Proteinkonzentration genormt werden um anschliessend die Assayergebnisse direkt vergleichen zu können.

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden das Coomassie Plus Reagens, sowie Albumin als Standard verwendet. Die Substanzen sind Teil des Coomassie Plus (Bradford) Assay Kits. Als Erstes wurden acht Standardkonzentrationen hergestellt (Verdünnungen mit M-PER) und mittels Bradford-Programm des Biophotometers eine Standardkurve erstellt. Dann wurden in Kuvetten jeweils 50 µl Proteinlösung mit 1.5 ml Coomassie Plus Reagens gemischt, während zehn Minuten inkubiert und danach gemessen. Das Programm rechnete die Konzentrationen direkt aus.

Das Vorgehen kann detaillierter im Instruktionsmanual des Kits (Thermo Scientific) nachgelesen werden.

#### Sandwich-ELISA für doppelt phosphorylierte (pTpY180/182) p38-MAPK

Für diesen ELISA wurde das Immunoassay Kit von Invitrogen verwendet, es handelte sich dabei um einen Festphasen-Sandwich-ELISA. Der primäre spezifische p38-MAPK-Antikörper liegt bereits an die Mikrotiterplatte gebunden vor. Von Proben und Standards wurden Duplikate gemessen.

Von den Proben (1:10 verdünnt mit Diluent Puffer), sowie den Standards und Kontrollen wurden jeweils 100 µl pro Well pipettiert. Danach wurde die Platte mit Klebefolie verschlossen und bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Versuchstag erfolgte ein Waschzyklus mit Puffer (4x waschen), danach die Zugabe von 100 µl Detektionsantikörper pro Well. Der Detektionsantikörper erkennt p38-MAPK, welche am Threonin 180 und am Tyrosin 182 phosphoryliert sind. Die Inkubation dauerte eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschliessend wurden erneut ein Waschzyklus durchgeführt und 100 µl Meerrettichperoxidase mit gekoppeltem Kaninchenanti IgG zugegeben. Dieser IgG-Peroxidase-Komplex bindet an die Detektionsantikörper. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden ein Waschzyklus durchgeführt und 100 µl der Substratlösung beigefügt, wodurch es zu einem Farbumschlag zu

blau kam. Entgegen dem Versuchsmanual musste die Reaktion bereits nach sechs Minuten anstatt nach 30 Minuten mit Stopplösung unterbrochen werden. Erfahrungsgemäss lagen die Konzentrationen an doppelt phosphorylierter p38-MAPK im oberen Konzentrationsbereich der Standards und der Farbwechsel zeigte sich somit rasch. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Gemessen wurde die Platte danach im Photometer bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm.

### **2.7.2. Messung von phosphorylierter p38-MAPK mittels FACS**

Nach dem Ernten der Zellen, wurden die Zellpellets in 1 ml PBS(-) resuspendiert und 100 µl Formaldehyd 10% zugegeben. Bei 37°C im Wasserbad wurden die Proben auf diese Weise zehn Minuten fixiert. Es erfolgte eine einminütige Abkühlung der Falconröhrchen auf Eis, bevor 9 ml kaltes Methanol pro Probe zugegeben wurden. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen in der Flüssigkeit resuspendiert und auf zwei Röhrchen pro Probe aufgeteilt, da es pro Gefäss nicht mehr als  $5 \cdot 10^5$  Zellen haben sollte. Danach wurden die Röhrchen entweder bei -20°C bis zur Analyse gelagert oder aber direkt weiterverwendet. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1200rpm wurden die Pellets mit 2 ml Inkubationspuffer (0.5 g BSA in 100 ml PBS(-)) gewaschen. Es folgten eine erneute Zentrifugation und die Aufnahme der Zellen in 90 µl Inkubationspuffer. In diesem Puffer wurden die Zellen während zehn Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Anschliessend wurden 10 µl (alte Version Antikörper) respektive 2 µl (neuer Antikörper) eines Mausantikörpers gegen doppelt phosphorylierte (Threonin 180, Tyrosin 182) p38-MAPK zugegeben. Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und stammte von der Firma Beckman und Coulter, die während des Versuchszeitraumes die Konzentration des Antikörpers erhöhte, worauf nur noch 2 anstelle von 10 µl benötigt wurden. Bei dem Fluoreszenzfarbstoff handelte es sich um Alexa Fluor® 488, das über den FITC-Kanal (Kanal 1) detektiert wurde.

Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen erneut mit 2 ml Inkubationspuffer gespült, zentrifugiert und für die Messung in 500 µl PBS(-) aufgenommen.

Im Protokoll zur Erfassung der Messungen wurden folgende Darstellungen gewählt:

- Zwei Dot Plots; einmal mit der Darstellung Forward Scatter linear (Y-Achse) gegen Side Scatter linear (X-Achse) und einmal einen sogenannten Density Plot mit Side Scatter linear (Y-Achse) gegen Forward Scatter linear (X-Achse).
- Zusätzlich ein Histogramm Plot, welcher die Anzahl Events (Zellen) auf der Y-Achse zeigt und auf der X-Achse den Kanal 1 (FITC) in logarithmischer Darstellung.

Die Messung wurde nach Erreichen von 15'000 Zellen (Counts) gestoppt.

## 2.8 p53

### 2.8.1. p53-ELISA

#### Proteinisolierung für den p53-ELISA

Für eine Quantifizierung des phosphorylierten p53-Proteins, mussten die Proteine aus den Zellen extrahiert werden. Die nach Trypsin-Behandlung abgelösten und zentrifugierten Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS(-) gewaschen. Anschliessend erfolgte die Zugabe von 200 µl M-PER und 29 µl Protease Inhibitor. Das Gemisch wurde im Thermomixer bei 22°C, 400rpm für zehn Minuten inkubiert und anschliessend während 15 Minuten bei 12'100rpm zentrifugiert um den Zelldebris abzutrennen. Vom Überstand dieser Lösung wurden 180 µl entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

#### Quantifizierung der Proteine

Die Proteinquantifizierung erfolgte analog dem unter 2.7.2. beschriebenen Vorgehen.

#### Sandwich-ELISA für phosphoryliertes p53-Protein

Das p53 pan ELISA-Kit von Roche ermöglicht die Quantifizierung von phosphoryliertem, also aktiviertem, p53 Protein in Zelllysaten.

Alle Bestandteile inklusive Mikrotiterplatte waren im Kit enthalten. Die Platten waren mit Streptavidin gecoated und der biotinmarkierte monoklonale Mausantikörper (anti-p53) wurde vorgängig daran gebunden. Entgegen der im Manual empfohlenen Lyse der Zellen mit RIPA Puffer, erfolgte diese gemäss der weiter oben erwähnten Methode mit M-PER (Kapitel 2.7.1.). Die eingefrorenen Proteinlösungen wurden jeweils mit Inkubationspuffer vom Kit verdünnt, so dass sich pro Well der Mikrotiterplatte 5 µg Protein befanden.

Der erste Schritt im Protokoll umfasste die Pipettierung von 100 µl Probe respektive Standard pro Well. Dazu kamen 100 µl des peroxidase markierten Detektionsantikörpers (polyklonaler Schafantikörper gegen humanes p53) verdünnt mit Inkubationspuffer. Danach wurde die Platte während zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300rpm) inkubiert. Die Standards und die Proben wurden jeweils in Duplikaten geführt. Anschliessend wurden ein Waschzyklus mit Puffer (5x waschen) durchgeführt und pro Well 200 µl der TMB-Substratlösung zugegeben. Nach intensiver Blaufärbung (18 Minuten) wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung abgebrochen und die Platte bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm gemessen.

## 2.9 Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD)

### 2.9.1. CPD-ELISA

#### DNA-Isolierung

Für die Untersuchung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren musste nach der Bestrahlung die DNA aus den Zellen isoliert werden. Dazu wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit von der Firma Qiagen verwendet.

Nach dem Ernten der Zellen aus den Wells mit Hilfe von Trypsin wurden die Zellpellets in 200 µl PBS(-) aufgenommen und in ein 1.5 ml Eppendorftube überführt. Gemäss DNeasy Blood & Tissue Handbook 07/2006 (Seiten 25-27) folgte die Zugabe von Proteinase K, AL Puffer, Ethanol, AW 1 und AW 2 Puffer mit dazwischenliegenden Zentrifugier- oder Vortexschritten. Einzige Abweichung vom Protokoll: Anstelle der Zugabe von AE Puffer wurden 200 µl ultra pure Wasser zugefügt. Ausserdem wurde der letzte Waschschrift nicht wiederholt wie unter Punkt 8 im Handbuch vorgeschlagen.

#### Quantifizierung der DNA

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit einem Biophotometer der Firma Eppendorf. Die verschiedenen Proben mussten auf eine DNA Konzentration genormt werden um anschliessend die Assayergebnisse direkt vergleichen zu können.

Es wurden Messungen mit Gemischen aus jeweils 5 µl DNA-Lösung mit 45 µl nukleasefreiem Wasser (während 30 Sekunden gevortext) via gespeichertes Messprogramm für doppelsträngige DNA gemacht.

#### Indirekter ELISA für Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD)

Für diesen ELISA gab es kein fertiges Kit, die Substanzen sowie ein Protokoll wurden zusammengestellt.

Die Wells einer Mikrotiterplatte wurden mit 50 µl einer Lösung aus Protaminsulfat in PBS 0.001% gefüllt und für etwa sieben Stunden bei 40°C im Trockenschrank inkubiert (bessere Anhaftung doppelsträngiger DNA). Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser, wurden 100 µl der Proben pro Well pipettiert, jeweils ein Duplikat pro Probe. Die Platte wurde über Nacht erneut bei 40°C im Trockenschrank inkubiert.

Es folgte ein Waschzyklus (5x waschen) mit einer Mischung aus PBS/Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester (Tween-20) 0.05%, bevor dann die freien Stellen für zehn Minuten mit einer BSA-Lösung 4% blockiert wurden. Anschliessend an einen weiteren Waschzyklus, wurden 100 µl des monoklonalen Mausantikörpers (1 µg/ml) gegen Thymindimere (Klon H3) pro Well zugefügt. Dieser primäre Antikörper wurde während einer Stunde mit der gebundenen DNA (Antigen) inkubiert. Darauf folgten ein Waschzyklus und das Hinzufügen des biotinylierten Ziegenantikörpers gegen Maus Immunglobuline (100 µl/Well) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS. Nach einer weiteren Stunde wurde erneut gewaschen und die Extravidin-Peroxidase (100 µl/Well) wurde dazu pipettiert. Ihre Verdünnung betrug 1:250 in PBS mit Tween-20 0.05%. Dreissig Minuten später erfolgte der letzte Waschzyklus und pro Well kamen 100 µl TMB dazu. Nach der Blaufärbung (zwei Minuten), die durch Zugabe von

2M Salzsäure zu gelb wechselte, wurde die Platte im ELISA-Reader bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm gelesen.

### 2.9.2. Messung von CPDs mittels FACS

Die Pellets der abgeernteten Zellen wurden mit jeweils 1 ml kaltem PBS(-) gewaschen und während vier Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Danach erfolgte eine zehninütige Fixierung der Zellen mit 1 ml Formaldehyd 4% pro Probe bei Raumtemperatur. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellets in 1 ml kaltem Ethanol 70% resuspendiert. Während zwei Stunden wurden die Proben dann auf Eis inkubiert, bis sie nachher entweder bei -20°C zwischengelagert oder direkt weiterverwendet wurden.

Das weitere Vorgehen bestand aus erneuter Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen in 1 ml eines Gemisches bestehend aus Triton X-100 0.5%/ 2M HCl. Dies diente der Permeabilisierung der Zellen, sowie der Denaturierung der DNA. Nach einer zehninütigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation und die Proben wurden mit je 1 ml Tris-Base-Lösung (ph=10) neutralisiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Zellen wurden mit 1 ml PBS(-) gewaschen.

Anschliessend erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (siehe CPD-ELISA-Assays). Die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets wurden in 100 µl einer PBT/FCS-Lösung (mit 2 µl Antikörper/ml) aufgenommen (PBT=PBS+Tween 0.05%). Nach einer Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln folgten zwei Waschzyklen mit je 1 ml PBS(-). Dann wurden die Zellen in jeweils 100 µl PBT/FCS-Lösung mit 1 µl/ml sekundärem Antikörper (Kaninchen Fab-Fragment gegen Maus IgG konjugiert mit dem Farbstoff FITC) suspendiert und wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschzyklen mit je 1 ml PBS(-) wurden die Proben schliesslich in 500 µl PBS(-) aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer gemessen.

Die Protokolle enthielten die gleichen Darstellungsplots wie bei der Messung der p38-MAPK.

Zusammenfassend sind in Tabelle 9 die verwendete Zelllinie und die Assaytechnik, die beim jeweiligen Marker zum Einsatz kamen, angegeben.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Testsysteme bei den jeweiligen Markern.

	HNK-Zellen	HaCaT-Zellen	ELISA-Assay	FACS-Assay
Interleukin 1α	<b>X</b>		<b>X</b>	
Interleukin 8	<b>X</b>		<b>X</b>	
p38-MAPK		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
p53	<b>X</b>		<b>X</b>	
Cyclobutan Pyrimidin Dimere		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>



## 3. Resultate

### 3.1 Vitalitätsexperimente

Die Vitalität der beiden verwendeten Zelllinien (siehe Kapitel 2.3.) wurde bei ansteigenden Bestrahlungsdosen bestimmt. Dadurch konnte die Dosis eruiert werden, bei welcher noch eine genügende Anzahl vitaler Zellen vorhanden war um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Diese Grenze wurde auf eine Mortalitätsrate von 20 bis maximal 30% festgelegt. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Zelllinien differierten auch deren maximal tolerierte Strahlungsdosen.

Für die Vitalitätsbestimmung wurden der Tetrazoliumsalz-Test (MTT) sowie eine Annexin V-FITC/7-amino-actinomycin D (7-AAD)-Färbung ausgewählt.

#### 3.1.1. Normale humane Keratinozyten (HNK)

Aus früheren Experimenten des Labors (Resultate nicht dargestellt) ging hervor, dass die HNK, verglichen mit HaCaT-Zellen, die empfindlichere Zelllinie sind. Die Spanne der untersuchten Bestrahlungsdosen reichte von 50 bis 300 mJ/cm<sup>2</sup>.

Vor der Messung der Vitalität wurden die Zellen nach der Bestrahlung für sechs Stunden inkubiert. Der MTT-Test lieferte durch die photometrische Quantifizierung jeweils optische Dichten (OD) als Ergebnis. Die Vitalität der Zellen wurde relativ zu der Kontrolle (unbestrahlte Zellen) bestimmt. Die drei OD-Werte der Kontrollen (Triplikate) pro Versuch wurden gemittelt und mit 100% lebende Zellen gleichgesetzt, wodurch anschliessend die OD der restlichen Proben in Prozente umgerechnet werden konnten.

Die Mittelwerte aller Einzelversuche der jeweiligen Bestrahlungsdosis sind in Abbildung 36 dargestellt.

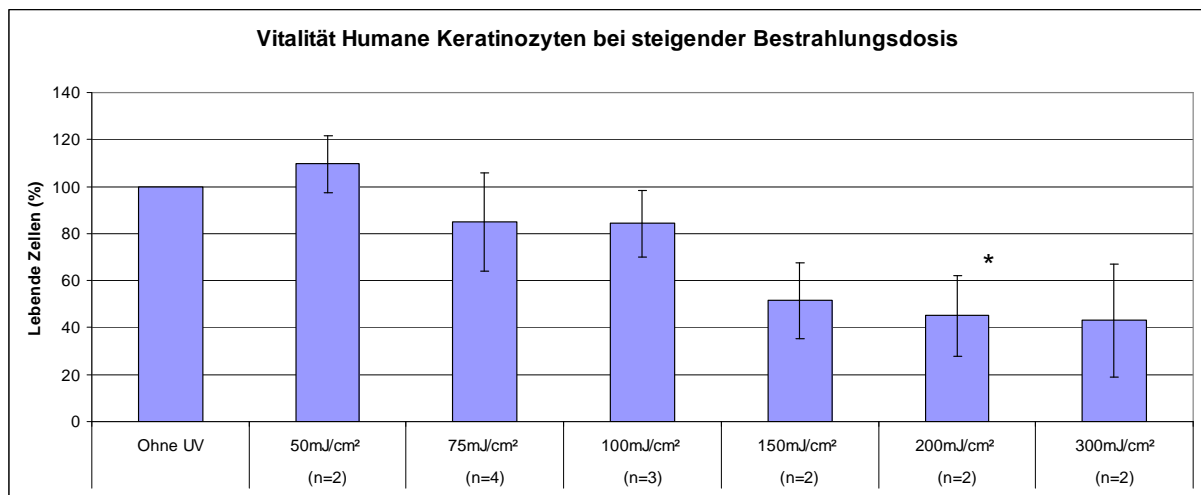


Abbildung 36: Vitalität von HNK bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels MTT-Test (n gibt die Anzahl Experimente pro Mittelwert an). Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von dem Balken „Ohne UV“.

Die Balken zeigen einen Vitalitätsrückgang der Zellen, je höher die Bestrahlungsdosis war, welcher sie ausgesetzt wurden. Bei 50 und 75 mJ/cm<sup>2</sup> wurde die oben festgelegte maximale Mortalitätsrate noch nicht erreicht. Es ist ein Abfall der Vitalität von ca. 80% auf 50% zwischen 100 mJ/cm<sup>2</sup> und 150 mJ/cm<sup>2</sup> zu erkennen.

Die Ergebnisse der Vitalitätsquantifizierung mittels Durchflusszytometer unterscheiden sich von denjenigen des MTT-Tests. Auch bei der Messmethode Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach der Bestrahlung für sechs Stunden inkubiert. Pro Bestrahlungsdosis standen jeweils die Zellen von sechs Wells zur Verfügung, wobei dann immer die Zellen von 2 Wells vereint wurden. Dies führte pro Versuch erneut zu Triplikaten. Diese Aufkonzentrierung war nötig, weil eine genügende Anzahl Zellen pro Probe für eine FACS-Analyse technisch erforderlich ist. Beim MTT hingegen wurde der Zellrasen im Well belassen, wodurch Verluste bei der Ablösung der Zellen wegfielen. Die Abbildung 37 zeigt die Mittelwerte der beiden durchgeführten Versuchsserien.

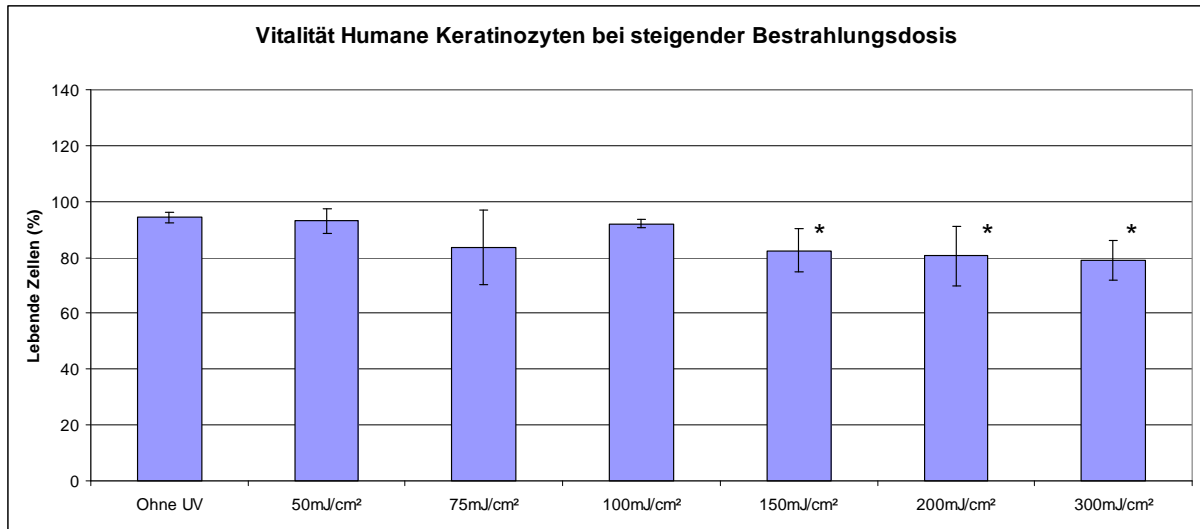


Abbildung 37: Vitalität von HNK bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels Annexin V-FITC/7-AAD-Färbung (n=2). Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von dem Balken „Ohne UV“.

Bei diesem Assay ist der Effekt auf die Zellvitalität bei verschiedenen Bestrahlungsdosen gering. Ein statistischer Vergleich (ungepaarter t-Test mit  $\alpha=5\%$ ) der Werte der jeweiligen Bestrahlungsdosis mit denjenigen der Kontrolle ergibt keinen signifikanten Unterschied bis zu der Dosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$ . Dies ändert sich ab einer Dosis von  $150 \text{ mJ/cm}^2$ . Die Zellvitalität differiert ab dieser Dosis signifikant (gekennzeichnet mit \*) von den unbestrahlten Zellen mit P-Werten von 0.0311, 0.0448 respektive 0.0101 für  $300 \text{ mJ/cm}^2$ . Ein derart deutlicher Vitalitätsabfall wie in Abbildung 36 war nicht zu beobachten.

#### Konklusion:

Beide Analysenmethoden zeigen einen Vitalitätsverlust bei schrittweiser Erhöhung der Bestrahlungsdosis. Der Anteil vitaler Zellen ist bei hohen Dosen mit der Annexin-Färbung höher verglichen mit jenem beim MTT-Test. Wie im Kapitel „2. Methoden“ bereits erwähnt, quantifizieren die beiden Assays unterschiedliche Abläufe im Apoptosegeschehen. Beim MTT wird die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt, bei der Annexin-Färbung die Umlagerung von Phospholipiden und die Degradierung der DNA-Stränge. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zelle nicht mehr metabolisch aktiv ist, aber noch nicht mit der Umlagerung und der Degradierung begonnen hat. Das würde erklären, warum die Mortalitätsrate beim MTT früher, also bei tieferen Bestrahlungsdosen, ansteigt. Um Messungen mit einem zu hohen Anteil toter Zellen zu ver-

hindern, wurde die Dosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$  als maximale Bestrahlungsdosis für humane normale Keratinozyten ausgewählt.

### 3.1.2. Human adult low Calcium high Temperature Keratinozyten (HaCaT)

Aus Vorversuchen (Resultate nicht gezeigt) wurde die Erkenntnis gewonnen, dass diese Zelllinie schneller wächst als HNKs und auch weniger empfindlich ist. Aus diesem Grund wurden  $828 \text{ mJ/cm}^2$  als höchste Bestrahlungsdosis verwendet. Die Inkubationsdauer nach der Bestrahlung betrug bei den HaCaT-Zellen zwei Stunden. Die Dreifachbestimmung pro Experiment und Bestrahlungsdosis wurde beibehalten. Die prozentualen Mittelwerte über alle Versuchsserien sind in Abbildung 38 dargestellt.

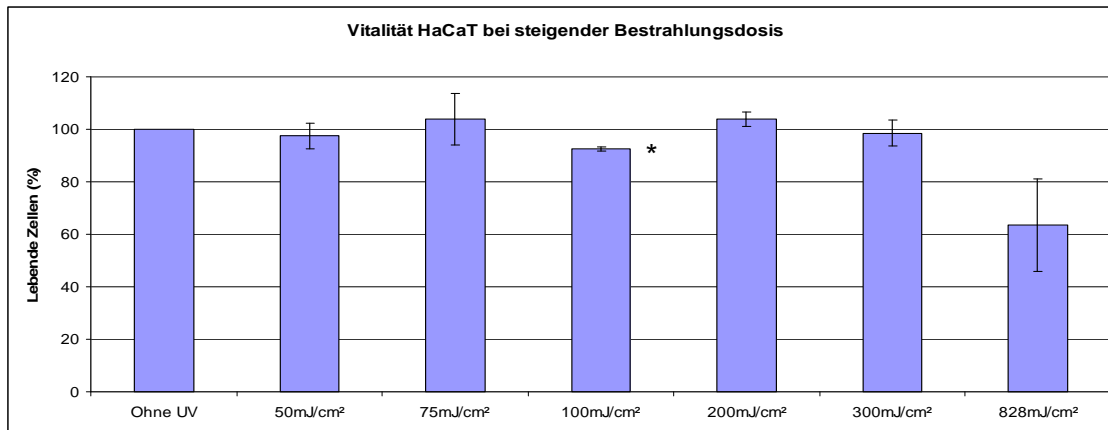


Abbildung 38: Vitalität von HaCaT bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels MTT-Test ( $n=2$  bei allen Dosen ausser bei  $828 \text{ mJ/cm}^2$ , dort  $n=4$ ). Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von dem Balken „Ohne UV“.

Die Vitalität bleibt konstant zwischen 90% und 100% bis es bei  $828 \text{ mJ/cm}^2$  zu einem Rückgang auf ca. 60% kommt. Die dargestellten Resultate bestätigen die grössere Robustheit dieser Zelllinie gegenüber den HNK. Die Variabilität innerhalb der Versuche mit einer Dosis von  $828 \text{ mJ/cm}^2$  ist grösser als bei den anderen Stärken.

Der Vitalitätsverlauf der HaCaT Zellen bei ansteigender Bestrahlungsdosis ist zwischen den beiden Analysemethoden ähnlicher als das bei den HNK der Fall war, wie in Abbildung 39 ersichtlich.

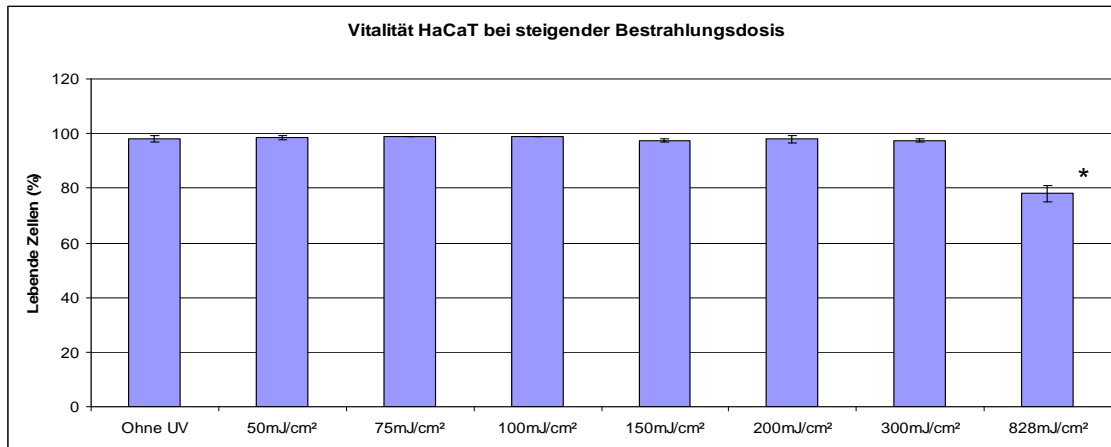


Abbildung 39: Vitalität von HaCaT bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels Annexin V-FITC/7-AAD-Färbung mit n=2 pro Mittelwert. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von dem Balken „Ohne UV“.

Die Anzahl lebender Zellen bleibt bis zur Bestrahlungsdosis von 300 mJ/cm<sup>2</sup> konstant bei annähernd 100%, bis sie dann bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> auf etwa 75% abfällt. Bei 75 und 100 mJ/cm<sup>2</sup> ist die Standardabweichung nicht ersichtlich, weil bei beiden Versuchsserien der gleiche Wert gemessen wurde und die Abweichung somit Null beträgt.

#### Konklusion:

Die Resultate der beiden Assays stimmen gut überein. Bis 300 mJ/cm<sup>2</sup> bleibt die Vitalität der Zellen unverändert bei annähernd 100%. Es ist eine hohe Bestrahlungsdosis von 828 mJ/cm<sup>2</sup> (alte Lampe 1h Bestrahlung, neue 30 Min.) notwendig um eine erhöhte Mortalitätsrate der Zellen zu provozieren. Die HaCaTs sind deutlich widerstandsfähiger als die HNK.

Die bei beiden Assays beobachtete grössere Standardabweichung bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> könnte von der Beobachtung herrühren, dass diese UVB-Dosis einem Schwellenwert der von diesen Zellen tolerierten Strahlung entspricht. Bei einzelnen Experimenten reichen die 828 mJ/cm<sup>2</sup> aus um das Apoptoseprogramm zu initiieren, bei anderen geschieht dies noch nicht. Ein wichtiger Faktor dabei ist der Allgemeinzustand der Zellen. Dadurch ergibt sich dann eine höhere oder geringere Anzahl vitaler Zellen. Trotz dieser Schwankungen stieg die Mortalitätsrate der HaCaT nicht über 30%, weshalb die 828 mJ/cm<sup>2</sup> als maximale Bestrahlungsdosis in den nachfolgenden Versuchen verwendet wurden.

### 3.2 Interleukin 1 $\alpha$

Zytokine werden bei Entzündungsprozessen von diversen Hautzellen gebildet und ausgeschüttet. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich diese Proteingruppe auch als Marker für durch UV-Bestrahlung hervorgerufene Zellschäden eignet.

In mehreren Versuchen mit verschiedenen Bestrahlungsdosen wurden die Interleukin 1 $\alpha$ -Konzentrationen im Zellüberstand von HNK bestimmt. Die Bestrahlungsdosen reichten von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bis maximal 100 mJ/cm<sup>2</sup> (siehe Kapitel 3.1.). Vor der Aufarbeitung der Zellüberstände und der IL-1 $\alpha$  Konzentrationsbestimmung mittels ELISA wurden die Zellen nach der Bestrahlung jeweils für eine Dauer von 24 Stunden im Inkubator unter Standardbedingungen belassen. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse von acht Versuchen mit variierenden Bestrahlungsdosen (n=3 bei den Versuchen im Jahr 2008, n=6 bei denjenigen im Jahr 2009).

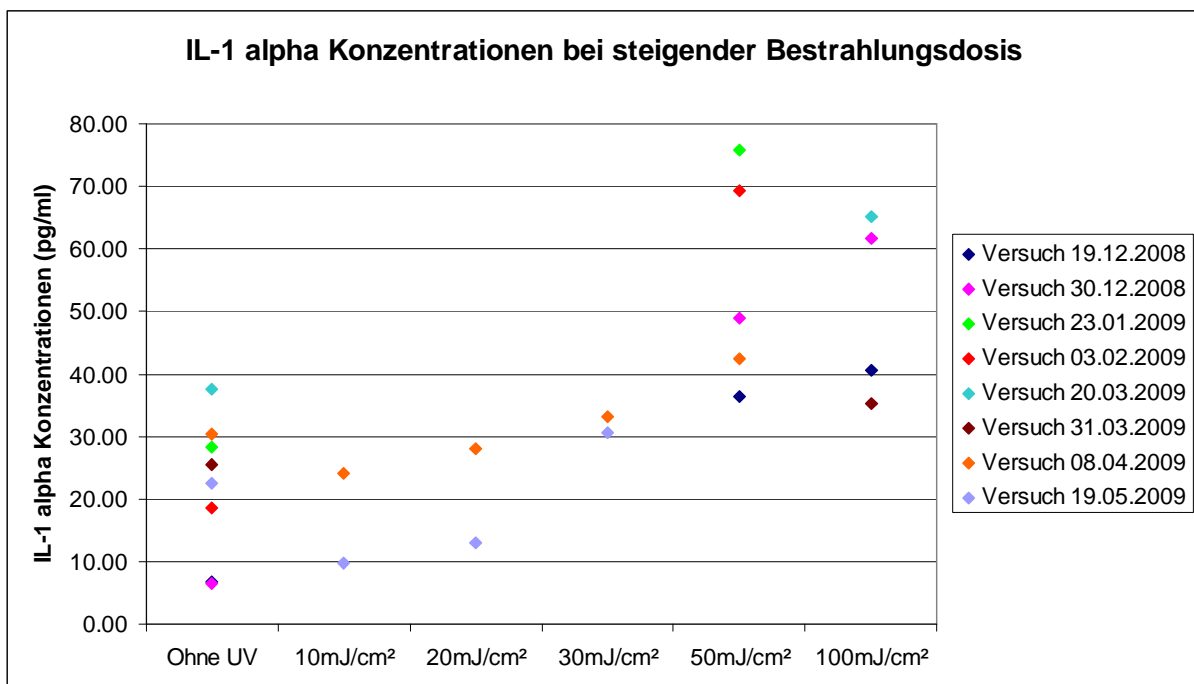


Abbildung 40: Interleukin 1 alpha Konzentrationen in HNK-Überständen bei steigender Bestrahlungsdosis.

Auf der Abbildung ist zu erkennen, dass es zwischen den Messpunkten der gleichen Bestrahlungsdosis und auch bei der unbestrahlten Kontrolle zum Teil beträchtliche Varianzen gibt. Diese Schwankungen reichen bis zu einer Verdoppelung der IL-1 $\alpha$  Konzentrationen in verschiedenen Einzelversuchen; bei 50 mJ/cm<sup>2</sup> wurden unter anderem Werte von 36 pg/ml und 76 pg/ml gemessen. Ähnliches gilt für die unbestrahlten Zellen (Negativkontrollen), ihre Werte liegen zwischen 6.5 und 37.6 pg/ml. Das Mitteln der jeweiligen Messpunkte pro Parameter und deren Darstellung inklusive Standardabweichung verdeutlicht diese Schwankungen noch (Abbildung 41).

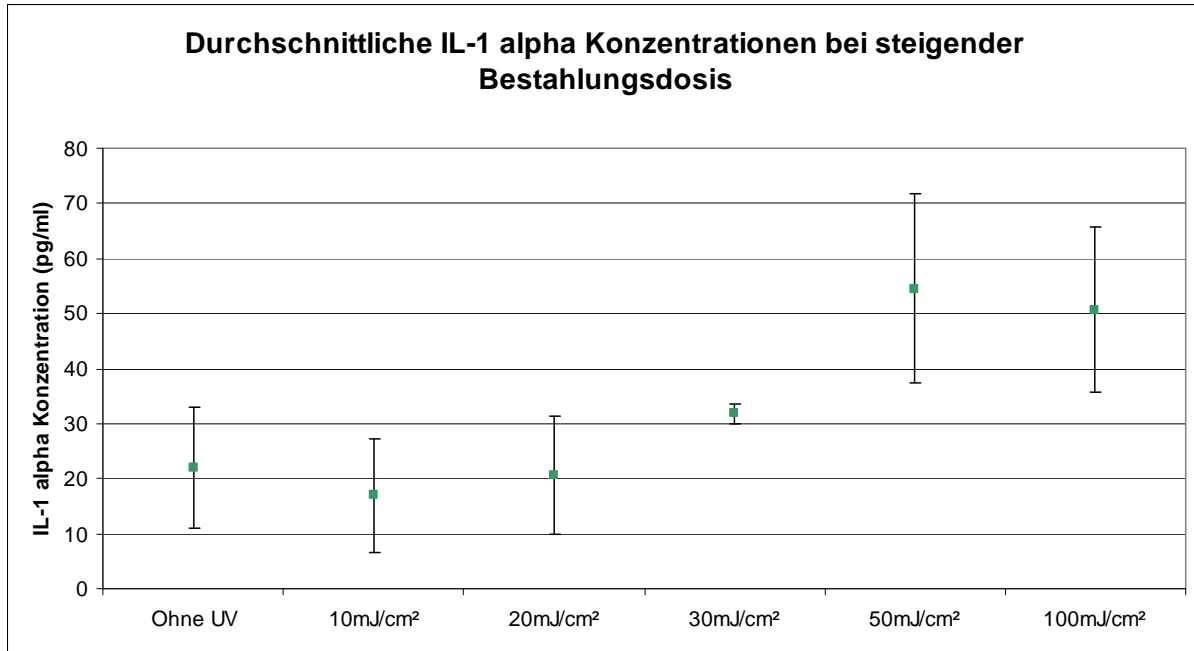


Abbildung 41: Durchschnittliche Interleukin 1 alpha Konzentrationen bei steigender Bestrahlungsdosis.

Bis 30 mJ/cm<sup>2</sup> ist keine eindeutige Konzentrationszunahme ersichtlich, bei 50 und 100 mJ/cm<sup>2</sup> konnte eine erhöhte IL-1 $\alpha$ -Ausschüttung von durchschnittlich über 50 pg/ml detektiert werden, was etwa einer Verdoppelung der Ausgangskonzentration entspricht.

Um eine Vorstellung von der Änderung der einzelnen Werte relativ zur Negativkontrolle zu erhalten, wurden bei jedem Versuch Faktoren berechnet, wobei die Negativkontrolle auf 1 gesetzt wurde. Die Durchschnitte dieser Änderungen pro Bestrahlungsdosis sind in Abbildung 42 dargestellt.

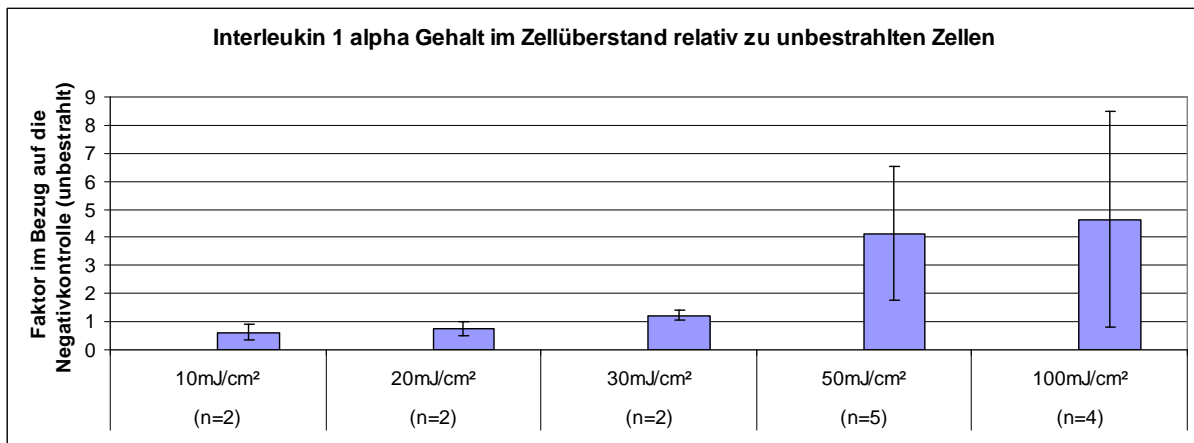


Abbildung 42: Durchschnittliche Veränderungen des Interleukin 1 alpha Gehaltes bei einzelnen Bestrahlungsdosen im Bezug auf die Negativkontrolle.

Grundsätzlich ist eine vier- bis fünffache Zunahme der Interleukin 1 $\alpha$ -Konzentration nach Bestrahlung mit 50-100 mJ/cm<sup>2</sup> messbar. Die Streuung zwischen den einzelnen Versuchen ist allerdings so gross, dass die Resultate nicht verwertbar sind.

Zur Überprüfung, ob die verwendete Versuchsanordnung allenfalls limitierend ist, bzw. ob die Zellen überhaupt in der Lage sind höhere Mengen an Interleukin 1 $\alpha$  auszuschütten, wurden zusätzlich Experimente mit ausgewählten chemischen Substanzen anstelle von UV als Stressor für die Zellen durchgeführt. Bei den Stoffen handelte es sich um Benzalkoniumchlorid und Triethanolamin<sup>66</sup>.

Statt der Bestrahlung mit UV wurde den Zellüberständen Benzalkoniumchlorid oder Triethanolamin zugegeben und nach 24 Stunden wurde die Interleukin 1 $\alpha$ -Konzentration bestimmt. Die Evaluierung verschiedener Konzentrationen der Reizsubstanzen (Ergebnisse nicht dargestellt) ergab die deutlichste Response bei 50 $\mu$ M Benzalkoniumchlorid respektive 100mM Triethanolamin. Die Ergebnisse bei diesen Konzentrationen sind in Abbildung 43 zusammengefasst.

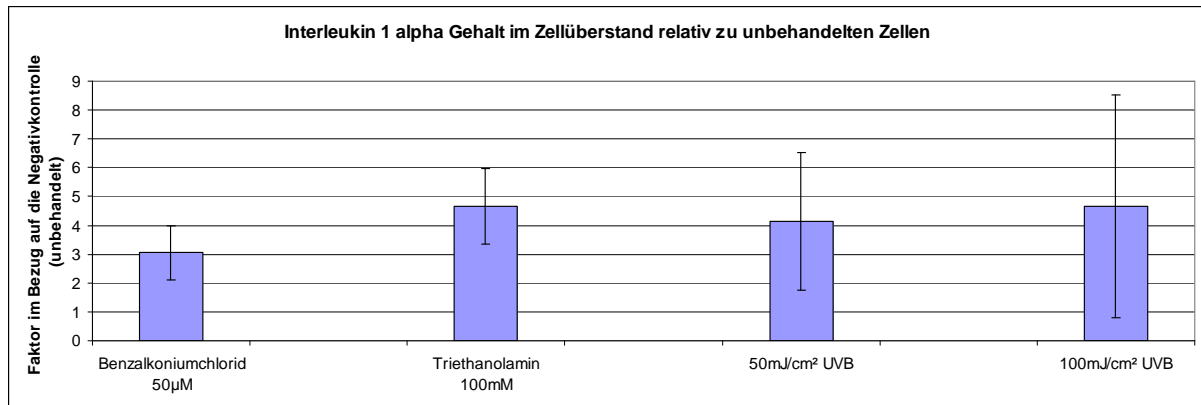


Abbildung 43: Durchschnittliche Veränderungen des IL-1 alpha Gehaltes nach Zugabe von Benzalkoniumchlorid resp. Triethanolamin im Bezug auf die Negativkontrolle (n=6 in einem Versuch). Zum Vergleich rechts die Balken nach Bestrahlung mit 50 resp. 100 mJ/cm<sup>2</sup>.

Die relativen Veränderungen im Bezug auf die Negativkontrolle liegen im Bereich derjenigen, die nach 50 und 100 mJ/cm<sup>2</sup> Bestrahlung ermittelt wurden, allerdings ist die Streuung hier geringer.

Die in den Zellüberständen detektierten absoluten Mengen an Interleukin 1 $\alpha$  nach Zugabe dieser Substanzen sind mit 617 pg/ml bei Triethanolamin und 404 pg/ml bei Benzalkoniumchlorid (Daten nicht graphisch dargestellt) elf respektive sieben Mal höher als nach UV-Bestrahlung. Das Ergebnis zeigt, dass die verwendeten HNK nach einem starken Reiz grössere Mengen Interleukin 1 $\alpha$  ausschütten, dies aber bei den Bestrahlungsdosen, welche maximal verwendet werden können, nicht der Fall ist.

#### Konklusion:

Die von den Keratinozyten maximal ausgeschütteten Interleukin 1 $\alpha$ -Mengen nach UV-Exposition liegen bei durchschnittlich 55 pg/ml. Es besteht die Schwierigkeit, dass Mehrfachmessungen von Parametern in wiederholten Einzelversuchen sehr unterschiedliche Ergebnisse liefern, was zu einer grossen Streuung führt.

Versuche mit Zytokinen in Verbindung mit UV-Bestrahlung wurden vor allem in den achtziger und neunziger Jahren durchgeführt. In Tabelle 10 sind die Arbeiten von einigen Gruppen zusammengefasst. Die Betrachtung der jeweils gemessenen IL-1 $\alpha$

Konzentrationen lässt auch hier sehr unterschiedliche Ergebnisse erkennen. Während Forschungsgruppen um L. Feldmeyer<sup>67</sup> und C. Augustin<sup>68</sup> Konzentrationen im Bereich zwischen 350 und 500 pg/ml detektieren konnten, erhielten andere wie S. Kondo<sup>69</sup> oder C. Cohen<sup>70</sup> ähnliche Konzentrationen wie in der vorliegenden Arbeit. Die Resultate von B. Eberlein-König<sup>71</sup> deuten eine mögliche Wellenlängenabhängigkeit der IL-1 $\alpha$  Ausschüttung mit Präferenz im UVB-Bereich (kurze Wellenlängen) an. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird vor allem durch die Verwendung verschiedener Modelle (unterschiedliche Zelllinien vs. Hautmodelle) und insbesondere Strahlungsquellen erschwert. Speziell in dieser Zeit wurden oftmals noch Fluoreszenzlampe als UV-Quellen benutzt. Diese emittierten einerseits meist auch beträchtliche Mengen an UVC und andererseits waren die UVB-Dosen zum Teil derart hoch (z.B. bei<sup>68</sup>), dass sie weit entfernt von den maximal möglichen Tagesdosen für einen Menschen (Europa: ca. 20 MED = 4200 J/m<sup>2</sup>) lagen und somit gar keine Relevanz mehr aufwiesen. Aufgrund dieser Tatsachen ist ein Direktvergleich der Ergebnisse kaum möglich.

Weiterführende Experimente mit chemischen Stressoren lieferten zwischen 7- und 11-fach höhere absolute Interleukinkonzentrationen. Dies lässt die Vermutung zu, dass ultraviolette Strahlung in der verwendeten Dosis nicht einen geeigneten Reiz darstellt um eine ausgeprägte Ausschüttung von IL-1 $\alpha$  hervorzurufen. IL-1 $\alpha$  ist kein optimaler Marker für diese Fragestellung, weil es eine zu hohe Variabilität gibt, weil keine eindeutige Dosis-Wirkungsrelation besteht und weil die totalen IL-1 $\alpha$ -Konzentrationen sehr klein sind. Hinzu kommt, dass sich eine Zytokinausschüttung nach einem UV-Reiz nicht deutlich von der Zytokinausschüttung nach anderen Reizen/Stressoren unterscheidet und dadurch die UV-Spezifität fehlt.



Tabelle 10: Übersicht über die Resultate von IL-1 alpha Bestimmungen anderer Forschungsgruppen.

Author und Jahr	Modell	UV-Quelle	Assay	Ergebnis: IL-1 $\alpha$ Konzentration
C. Augustin et al 1997	Skin equivalent (normal human fibroblasts and keratinocytes)	UVB-Lampe Spectrolinker XL 100 UV Crosslinker	Enzyme amplified sensitivity immunoassay, Endogen USA Messung nach 24h	Von 0-2 J/cm <sup>2</sup> UVB gibt es einen Anstieg des IL-1 $\alpha$ von 50 auf 491 pg/ml
C. Cohen et al 1994	Episkin, <i>in vitro</i> cell culture epidermis	Fluoreszenzlampe, 270-380 nm UVB	Enzyme Immuno-Assay, Amersham International Zeitpunkt der Messung unbekannt	Wert aus Grafik abgelesen. Ohne UV ca 45 pg/ml 250 mJ/cm <sup>2</sup> ca 55 pg/ml 500 mJ/cm <sup>2</sup> ca 105 pg/ml
B. Eberlein-König et al 1998	SCL II cells derived from human squamous cell carcinoma	Monochromator, Messungen bei 280 $\pm$ 5 nm, 290 $\pm$ 5 nm, 300 $\pm$ 5 nm, 310 $\pm$ 5 nm und 320 $\pm$ 5 nm	ELISA Quantikine human IL-1 $\alpha$ immunoassay, R&D Systems Messung nach 24h	Ohne UV 16.3 $\pm$ 1.2 pg/ml 280 $\pm$ 5 nm 0.5 mJ/cm <sup>2</sup> 37.7 $\pm$ 10.2 pg/ml 1 mJ/cm <sup>2</sup> 171.6 $\pm$ 86.8 pg/ml 2 mJ/cm <sup>2</sup> 249.5 $\pm$ 68.5 pg/ml 290 $\pm$ 5 nm 0.5 mJ/cm <sup>2</sup> 18.3 $\pm$ 4.0 pg/ml 1 mJ/cm <sup>2</sup> 54.0 $\pm$ 24.5 pg/ml 2 mJ/cm <sup>2</sup> 151.3 $\pm$ 7.0 pg/ml Höhere Wellenlängen kein Unterschied zur Negativkontrolle
L. Feldmeyer et al 2007	Human primary keratinocytes	UVB, Gerät nicht spezifiziert	ELISA, R&D Systems Messung nach 24h	50 mJ/cm <sup>2</sup> UVB 332 pg/ml
S. Kondo et al 1994	Newborn foreskin primary keratinocytes	Polychromatische Fluoreszenzlampe 280-320 nm (UVB)	ELISA Quantikine, R&D Systems Messung nach 6h, 12h und 24h	30 mJ/cm <sup>2</sup> UVB Ohne UV 6.7 $\pm$ 1.5 pg/ml 6h 14.4 $\pm$ 3.3 pg/ml 12h 52.6 $\pm$ 4.4 pg/ml 24h 60.2 $\pm$ 6.1 pg/ml

### 3.3 Interleukin 8

Zeitgleich zu den Experimenten mit Interleukin 1 $\alpha$  wurde auch die Ausschüttung des Zytokins Interleukin 8 untersucht. Initial wurde die Reaktion der Zellen auf verschiedene Bestrahlungsdosen erfasst. Die Inkubationsdauer nach der Bestrahlung bis zur Quantifizierung der Zytokinmenge in den Zellüberständen betrug, wie bei IL-1 $\alpha$ , 24 Stunden. In Abbildung 44 sind die IL-8 Konzentrationen bei den jeweiligen Bestrahlungsdosen dargestellt.

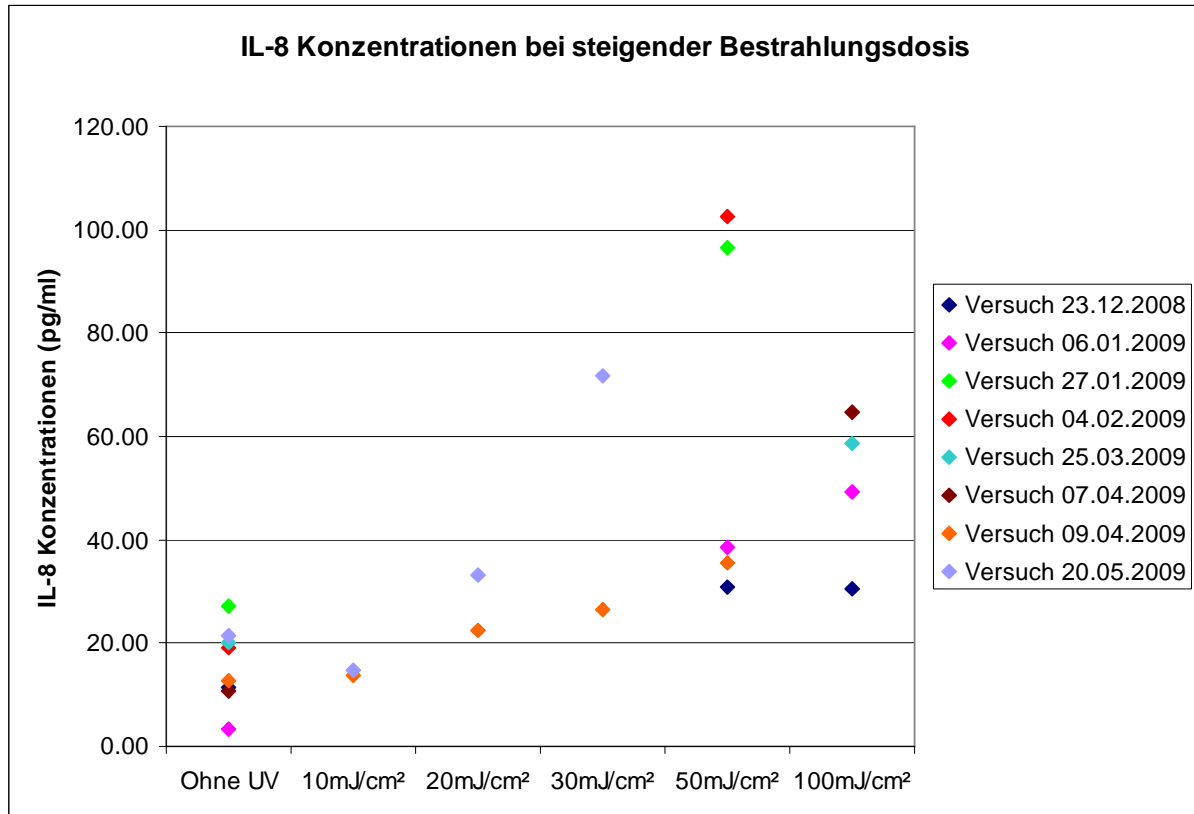


Abbildung 44: Interleukin 8 Konzentrationen in HNK-Überständen bei steigender Bestrahlungsdosis.

Die höchste, gemessene Konzentration beträgt 103 pg/ml. Die Varianz der Werte ist teilweise gross, vor allem die Werte bei einer Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> weisen Unregelmässigkeiten auf. Dies zeigt sich auch bei der Negativkontrolle ohne UV, die Ergebnisse liegen zwischen 3 pg/ml und 27 pg/ml.

Die Bildung von Mittelwerten über alle Einzelversuche lässt eine Konzentrationszunahme von IL-8 ab 20 mJ/cm<sup>2</sup> (28 pg/ml) bis hin zu 50 mJ/cm<sup>2</sup> auf 61 pg/ml erkennen (Abbildung 45). Doch wie bereits bei Interleukin 1 $\alpha$  relativieren die grossen Standardabweichungen diesen Anstieg und lassen keine eindeutige Aussage zu.

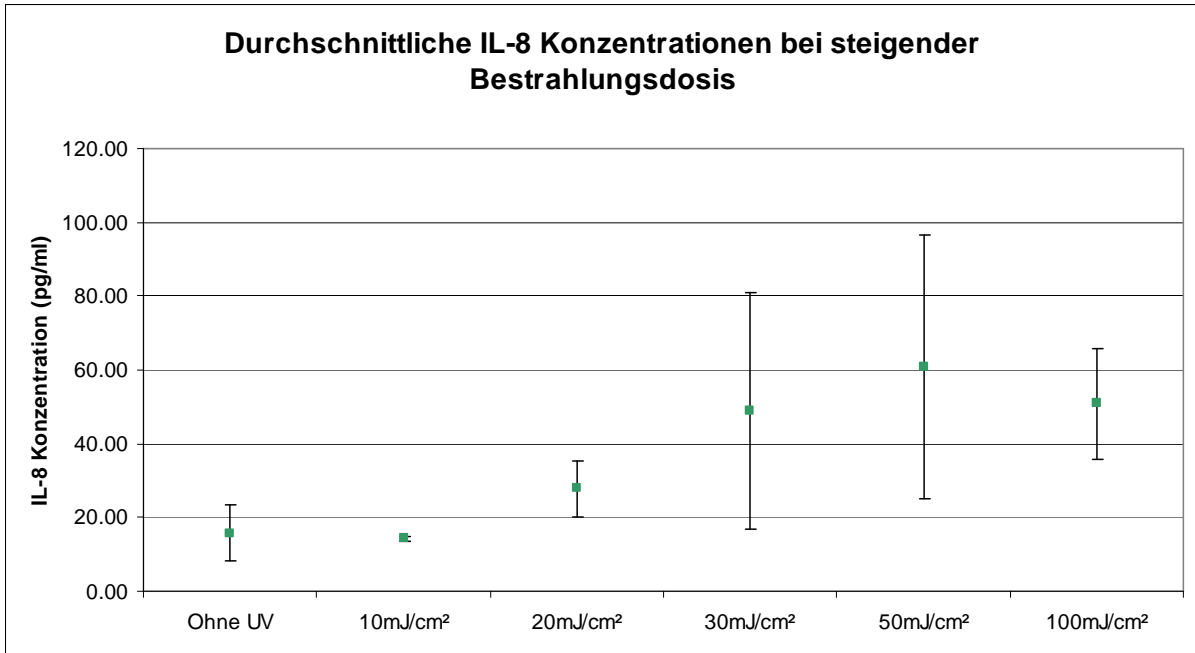


Abbildung 45: Durchschnittliche Interleukin 8 Konzentrationen bei steigender Bestrahlungsdosis.

Die relativen Änderungen zu der Negativkontrolle sind in Abbildung 46 dargestellt. Es ist eine Bestrahlungsdosis abhängige Zunahme der IL-8 Konzentration bis zu einem sechsfachen der Negativkontrolle zu erkennen, allerdings erneut mit hohen Standardabweichungen. Ein Vergleich der Werte bei 10 mJ/cm<sup>2</sup> mit denjenigen bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> in einem ungepaarten t-Test resultierte in einen P-Wert von 0.2469, der in Verbindung mit dem Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) von 5% anzeigt, dass sich die Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden.

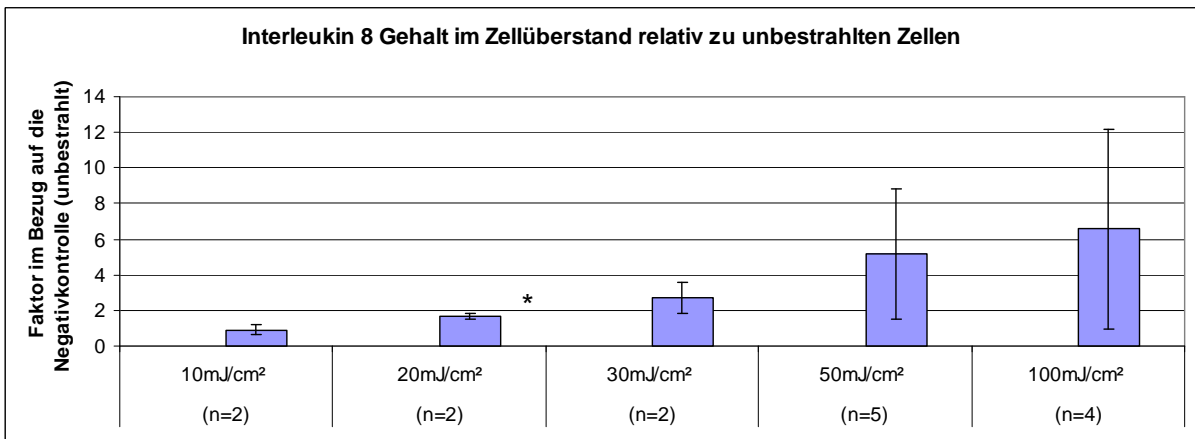


Abbildung 46: Durchschnittliche Veränderungen des IL-8-Gehaltes bei einzelnen Bestrahlungsdosen im Bezug auf die Negativkontrolle. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

## Konklusion:

Auch bei diesem Zytokin zeigten sich Schwankungen im Bereich der Ergebnisse, wie bei Interleukin 1 $\alpha$ . Die ausgeschütteten IL-8 Mengen erreichen bei 60 pg/ml ein Maximum, die Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten ist gross.

Die Gruppe um N. Bechetoille <sup>72</sup> publizierte im Jahr 2007 Ergebnisse über die Bestrahlung von Hautäquivalenten mit 500 mJ/cm<sup>2</sup> UVB, wobei unter anderem auch die Interleukin 8 Konzentrationen bestimmt wurden. Sie quantifizierten einen Anstieg von 30 pg/ml (ohne UV) auf 60 pg/ml. Als UV-Quelle diente der Suntest CPS+, mit welchem auch in vorliegenden Experimenten bestrahlt wurde. Basierend auf dieser Publikation kann geschlossen werden, dass selbst mit einer fünffachen UVB-Dosis, verglichen mit den 100 mJ/cm<sup>2</sup> dieser Arbeit, keine höhere IL-8 Ausschüttung provoziert werden kann. Auch wenn die verwendeten Modelle unterschiedlich sind (Hautäquivalent vs. Zellkultur), wurden doch ähnliche Ergebnisse erhalten. Aus diesen könnte vermutet werden, dass eine IL-8 Response von 60 pg/ml bereits das Maximum darstellt. Experimente von Kondo et al. von 1993 <sup>50</sup> ergaben allerdings bereits bei 30 mJ/cm<sup>2</sup> (mit UVB-Fluoreszenzlampe nach 24h) IL-8 Mengen von 173.4  $\pm$  34.1 pg/ml, was wiederum gegen diese Annahme spricht. Die Daten aus der Literatur sind uneinheitlich, wodurch ein Vergleich zu den eigenen Daten nicht möglich ist.

Die vorliegenden Resultate lassen keine zuverlässige Bestimmung des Verlaufs der Interleukin 8 Ausschüttung bei steigenden Bestrahlungsdosen zu. Da auch bei diesem Marker die UV-Spezifität nicht gegeben ist, wurde die Arbeit mit Zytokinen als mögliche Gruppe von Markern nicht weiterverfolgt.

### 3.4 p38 – MAPK

Für die Analyse der p38-MAPK wurden HaCaT-Zellen verwendet. Die maximale Bestrahlungsdosis, der diese Zellen ausgesetzt werden können, beträgt  $828 \text{ mJ/cm}^2$  (siehe Kapitel 3.1).

Durch die Phosphorylierung zweier Aminosäuren (Thr 180 und Tyr 182) wird dieser Marker in die aktive Form gebracht. Diese Aktivierung wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert und via Durchflusszytometer quantifiziert.

#### 3.4.1. Kinetik Experimente

Da diese Phosphorylierung ein rascher und reversibler Vorgang ist, war es wichtig den Zeitpunkt maximaler p38-Aktivierung zu finden. Zu diesem Zweck wurde die Kinetik dieser Reaktion untersucht. Dabei wurden die Zellen mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt und nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer aufgearbeitet.

Nach der Antikörpermarkierung der Zellen standen pro Inkubationsdauer sechs Proben zur Verfügung, deren Fluoreszenzintensitäten mit dem Durchflusszytometer quantifiziert wurden. Im Gegensatz zu den Messungen der Zytokine waren bei der p38-MAPK keine Standardlösungen vorhanden, weshalb keine absolute Bestimmung des aktiven Markers gemacht werden kann. Es erfolgte eine relative Quantifizierung im Bezug auf die unbestrahlte Negativkontrolle, deren mittlere Fluoreszenzintensität als 100% festgelegt wurde.

Die Mittelwerte über die Einzelversuche sind in Abbildung 47 zusammengestellt.

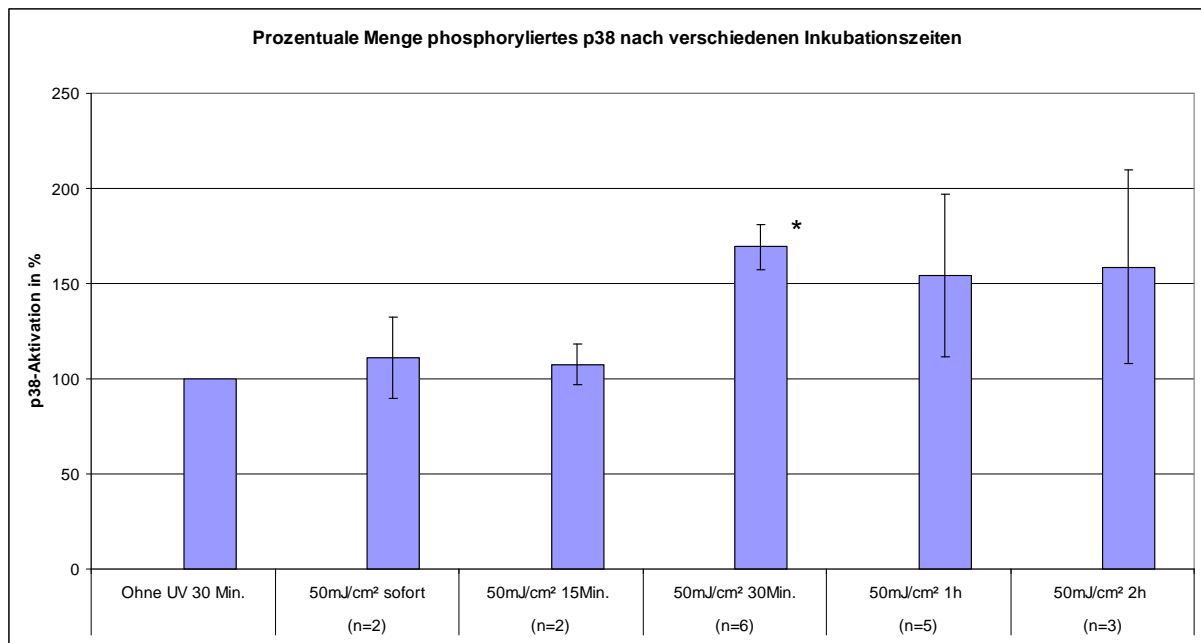


Abbildung 47: Menge an phosphoryliertem p38 relativ zu unbestrahlten Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Aufgrund der Zuordnung der 100% zu den unbestrahlten Zellen fehlt dort die Standardabweichung.

Der grösste Anstieg der Menge an aktivierter p38-MAPK auf 170%, im Bezug auf die unbestrahlten Kontrollen, war nach 30 Minuten detektierbar. Auch nach einer und nach zwei Stunden konnten ähnlich hohe Werte gemessen werden. Es wurden die dreissig Minuten als Inkubationszeit gewählt. Dies hauptsächlich aufgrund der grös-

seren Konstanz zwischen den einzelnen Experimenten (geringere Standardabweichung).

### 3.4.2. Dosisabhängigkeitsexperimente

Anschliessend an die Kinetikversuche wurden die Mengen an aktiviertem p38 bei steigenden Bestrahlungsdosen bestimmt. Die Zellen wurden mit Dosen zwischen 20 und 828 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt, während 30 Minuten inkubiert und danach mit Antikörper markiert.

Der Plot in Abbildung 48 zeigt überlappende Fluoreszenzsignale von einzelnen, repräsentativen Proben. Die X-Achse ist logarithmisch und gibt die Fluoreszenz an, die Y-Achse gemessene Counts, also für das Gerät mit den gewählten Einstellungen zählbare Zellen. Die violette Kurve (1) stellt das Signal einer Probe ohne Antikörper dar. Sie dient dazu festzustellen, ob die Proben ohne Antikörper bereits eine Eigenfluoreszenz aufweisen, was in diesem Beispiel nicht der Fall ist, weil die Kurve keine Rechtsverschiebung zeigt und im Intensitätsbereich von 10<sup>0</sup>, also 1 liegt. Darauf folgt in blassrosa (2) die Kurve der unbestrahlten Zellen, der Negativkontrolle. Anschließend sind von links nach rechts die Signalkurven der mit steigender Bestrahlungsdosis behandelten Zellen zu sehen. In dunkelgrün (3) 50 mJ/cm<sup>2</sup>, in hellgrün (4) 75 mJ/cm<sup>2</sup>, dann in orange (5) 100 mJ/cm<sup>2</sup> und zum Schluss in hellblau (6) 200 mJ/cm<sup>2</sup> und rot (7) 828 mJ/cm<sup>2</sup>. Die Kurven verschieben sich immer weiter nach rechts, was eine Zunahme der Fluoreszenz und somit der aktiven p38-MAPK bedeutet.

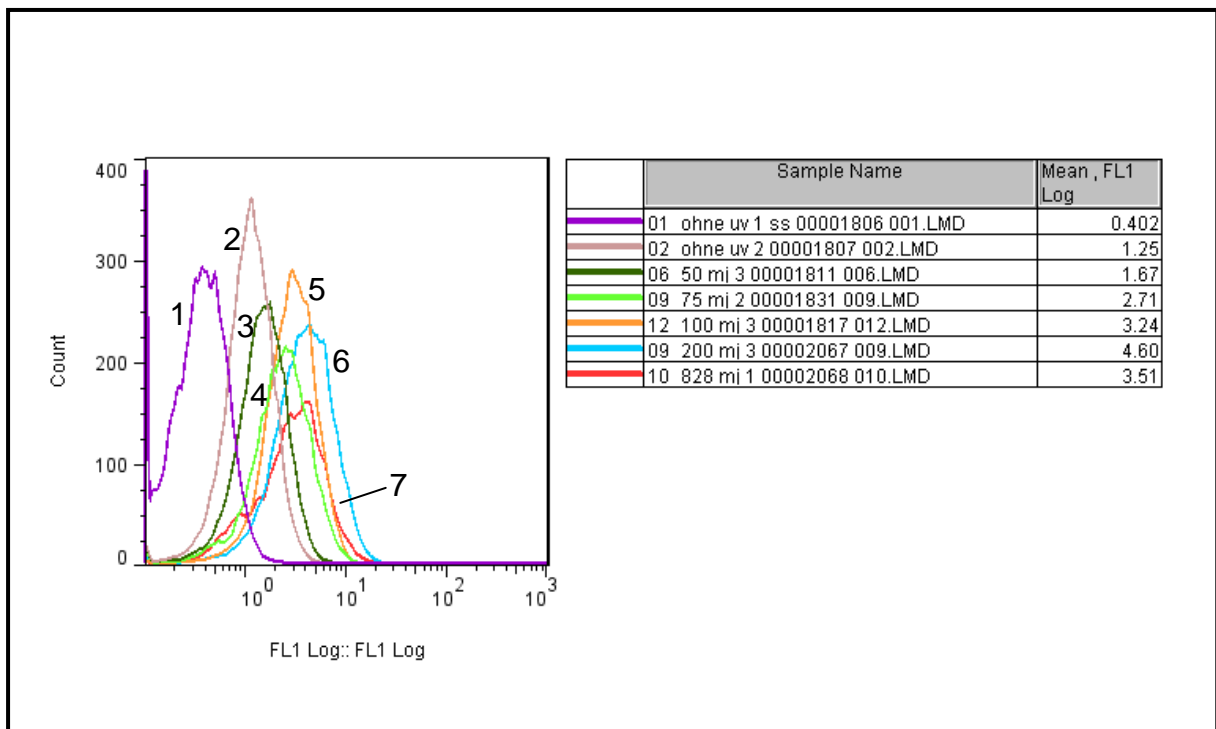


Abbildung 48: Signal-Overlay von repräsentativ ausgewählten Proben der Dosisabhängigkeitsmessungen von p38.

Die Werte ganz rechts in der Tabelle stellen die Fluoreszenzintensitäten ausgedrückt in Zahlen (arbitrary units) dar; diese Werte wurden als Grundlage für die Umrechnung in Prozente verwendet. Die sechs Ergebnisse pro Bestrahlungsdosis und Versuch wurden gemittelt und im Verhältnis zur Negativkontrolle in Prozente umgewandelt.

Die Experimente dienten zum einen der Untersuchung, ob eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit besteht und zum anderen der Bestimmung der Bestrahlungsdosis, die die grösste Menge an aktivem p38 auslöst. In Abbildung 49 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefasst. Dargestellt sind Faktoren im Bezug auf die Negativkontrolle (nicht dargestellt, gleich 1), um welche sich der p38-Gehalt bei gegebener Bestrahlungsdosis änderte.

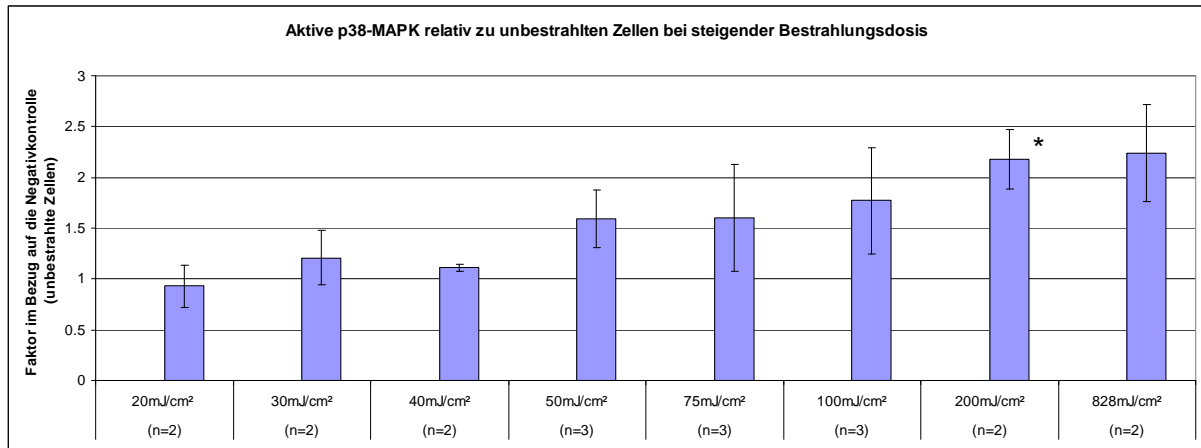


Abbildung 49: Durchschnittliche Veränderung der p38 Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Mit zunehmender Bestrahlungsdosis vergrössert sich der Faktor (Menge aktiver p38-MAPK) bis zu einem Maximum von etwa 2.2. Neben dem FACS-Assay wurde als zweite Methode ein ELISA-Assay verwendet.

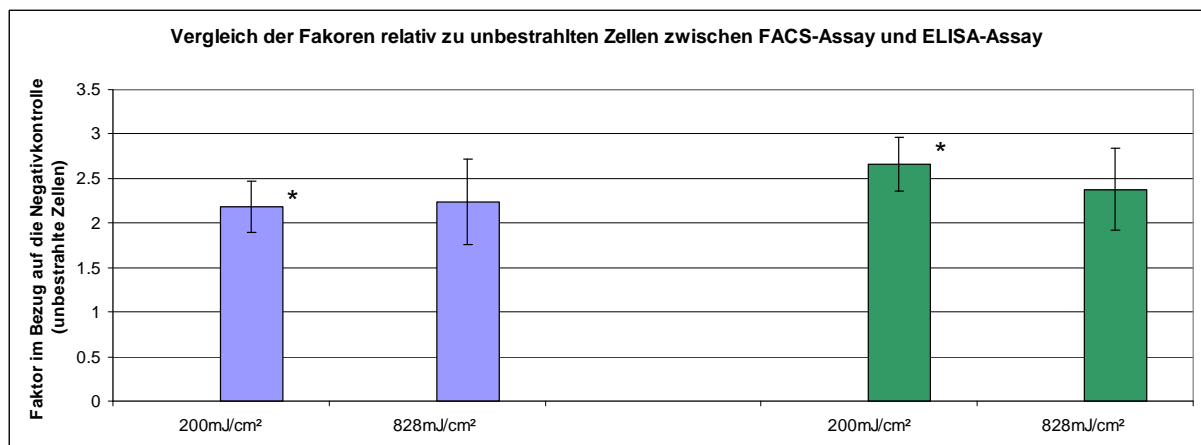


Abbildung 50: Faktorenvergleich zwischen dem FACS-Assay (lila Balken) und dem ELISA-Assay (grüne Balken) bei 200 und 828 mJ/cm². Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Wie aus Abbildung 50 ersichtlich, ergab die Verwendung des ELISA-Assays vergleichbare Resultate. Die bei den CPD beobachtete, höhere Sensitivität des ELISAs gegenüber der Durchflusszytometertechnik (siehe Kapitel 3.6.) konnte in vorliegendem Fall nicht bestätigt werden. Deshalb wurde der ursprünglich verwendete FACS-Assay beibehalten.

Aufgrund der kleineren Mortalitätsrate und den konstanteren Ergebnissen aus den Mehrfachmessungen wurde die Dosis von 200 mJ/cm² derjenigen von 828 mJ/cm² vorgezogen.

Aus den Kinetik- und den Dosisabhängigkeitsexperimenten konnten Erkenntnisse über die optimalen Konditionen für eine maximale Aktivierung der p38-MAPK gewonnen werden. In nachfolgenden Versuchen wurden die Zellen einer Bestrahlungsdosis von 200 mJ/cm<sup>2</sup> UVB ausgesetzt und anschliessend während 30 Minuten bei Standardbedingungen inkubiert.

### 3.4.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten

Die maximal detektierte Steigerung der p38-Aktivierung betrug Faktor 2.2 ± 0.29. Folgende Produkte wurden für weiterführende Experimente ausgewählt: Daylong actinica SPF 50+, Ambre Solaire SPF 50+, Daylong ultra SPF 25, COLIPA P3 SPF 16 und UVA-Filter (Eigenherstellung) SPF 5 (Liste sämtlicher, in dieser Arbeit verwendeten Sonnenschutzprodukte mit einer Auflistung der darin enthaltenen Filter siehe Anhang).

Es wurden relative Quantifizierungen in Form von Faktoren verwendet. Die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsserien sind in Abbildung 51 zusammengefasst.

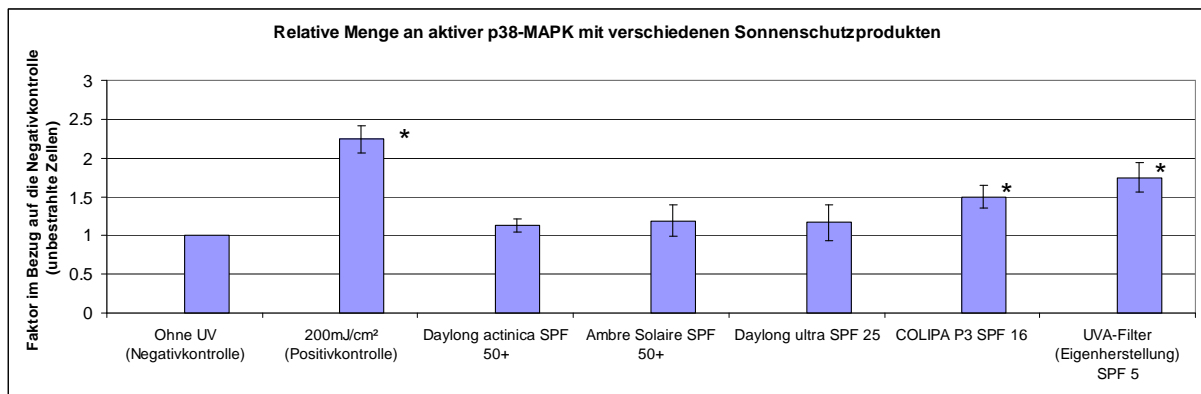


Abbildung 51: Menge an aktiver p38-MAPK bei 200 mJ/cm<sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Die Menge phosphorylierter p38-MAPK liegt bei allen Produkten zwischen derjenigen der Negativkontrolle und jener der Positivkontrolle.

Alle Sonnenschutzprodukte unterscheiden sich signifikant (ungepaarter t-Test) von der Positivkontrolle (Tabelle 11).

Tabelle 11: P-Werte von ungepaarten, zweiseitigen t-Tests aus Vergleichen der Positivkontrolle mit einzelnen Sonnenschutzprodukten.

Positivkontrolle vs. Daylong actinica SPF 50+	Positivkontrolle vs. Ambre Solaire SPF 50+	Positivkontrolle vs. Daylong ultra SPF 25	Positivkontrolle vs. COLIPA P3 SPF 16	Positivkontrolle vs. UVA-Filter SPF 5
P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0004	P=0.0056

Die graphisch dargestellten Faktoren aus Abbildung 51 sind in Tabelle 12 nochmals in Form von Prozentwerten zusammengestellt. Eine Gruppierung der Produkte anhand ihrer SPF-Werte mit Hilfe dieser Prozentzahlen ist schwierig.



Tabelle 12: Mittelwerte der aktiven p38 nach Bestrahlung mit 200 mJ/cm<sup>2</sup>.

200mJ/cm <sup>2</sup> Positivkontrolle	Daylong actinica SPF 50+	Ambre Solaire SPF 50+	Daylong ultra SPF 25	COLIPA P3 SPF 16	UVA-Filter SPF 5
224%	113%	119%	117%	150%	175%

Die P-Werte aus einem statistischen Vergleich (t-Test,  $\alpha=5$ ) der Produkte untereinander sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: P-Werte eines Vergleiches der verschiedenen Sonnenschutzprodukte mittels t-Test.

	Ambre Solaire	Daylong ultra	COLIPA P3	UVA-Filter
Daylong actinica	P=0.6574	P=0.8101	P=0.0187	P=0.0064
Ambre Solaire		P=0.9024	P=0.1001	P=0.0252
Daylong ultra			P=0.1071	P=0.0289
COLIPA P3				P=0.1436

Daylong Actinica, Ambre Solaire und Daylong ultra unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander, sie sind jedoch alle verschieden vom Produkt mit dem UVA-Filter. Die COLIPA P3 Formulierung hebt sich lediglich von Daylong actinica ab.

#### Konklusion:

Der Durchflusszytometer-Assay lieferte reproduzierbare Ergebnisse mit einer maximal gemessenen Steigerung der Menge an aktivem p38 um den Faktor 2.2. Ähnliche Resultate werden in der Literatur berichtet. Bei Shimizu et al. 1999<sup>44</sup> wurden HaCaT-Zellen mit einer UVB-Lampe und einer Dosis von 250 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt und zwei Stunden nach Bestrahlung mittels Western-Blot Analyse eine Zunahme an aktivierter p38-MAPK um den Faktor 3 detektiert.

Die Western-Blot Analyse ist eine häufig verwendete Quantifizierungsmethode in der Literatur bei Experimenten zur p38-Aktivierung mittels ultravioletter Strahlung. Oftmals werden lediglich die Blots dargestellt und dazu keine Werte oder Faktoren relativ zu einer Kontrolle („fold-changes“). Dadurch ist ein Direktvergleich mit den vorliegenden Werten des FACS-Assays oftmals nicht möglich. Vorteile der aktuelleren Messtechnologie mittels Durchflusszytometer sind die schnellere Durchführung sowie der direkte Erhalt von Fluoreszenzwerten aus lebenden Zellen. Dadurch erübrigt sich die Auswertung (z.B. mit Densitometrie, Strahlungsmessungen etc.) der Blots und die anschließende Umwandlung in Zahlenwerte.

Eine Arbeit aus dem Jahre 2008 von C. Cao et al.<sup>73</sup> gibt zusätzlich zu den Blots auch „fold changes“ von Kinetikversuchen mit phospho-p38 an. Dort wurden dendritische Zellen (isoliert aus Mäusehaut) mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> aus UVB-Lampen bestrahlt. Nach 15 Minuten konnte eine 3-fache Steigerung der aktiven p38-MAPK detektiert werden, nach 30 Minuten eine 4,5-fache und nach 60 Minuten eine 7-fache. Offensichtlich sind die Zellen von Cao et al. sensitiver gegenüber UV als die in vorliegender Arbeit verwendeten humanen Zellen und es handelt sich um einen anderen Zelltyp.

Die Experimente mit Sonnenschutzprodukten unterschiedlichen SPFs lieferten folgende Erkenntnisse:

Sämtliche Produkte unterscheiden sich in ihren Ergebnissen signifikant von der Positivkontrolle (ohne Produkt), was belegt, dass die Verwendung eines Produktes unabhängig der Höhe von dessen SPF bereits einen Schutz für die Zellen darstellt. Die Methode ist ungeeignet um Produkte mit geringen SPF-Unterschieden zu differenzieren. Eine statistisch relevante Unterscheidung zwischen Produkten mit hohem und mittlerem SPF von denjenigen mit ganz tiefem SPF ist jedoch möglich (Tabelle 4, z.B. Daylong actinica, Ambre Solaire und Daylong ultra versus UVA-Filter).

### 3.5 p53

Für die Versuche mit p53 als Marker wurden humane normale Keratinozyten (HNK) mit einer maximalen Bestrahlungsdosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$  eingesetzt. Das p53-Protein wurde mit einem ELISA-Assay quantifiziert.

HaCaT-Zellen sind im p53-Gen mutiert<sup>74</sup>, wodurch sie sich nicht für die Untersuchung von p53 eignen.

#### 3.5.1. Kinetik Experimente

Auch bei p53 wurde die Kinetik der vorhandenen Proteinkonzentration nach Reizeinfluss genauer untersucht. Dafür wurden die Zellen mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt und nach verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet. Die Standards im verwendeten ELISA-Kit zur p53-Quantifizierung ermöglichten die Bestimmung absoluter Proteinkonzentrationen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Einzelversuche wurden die Proteinkonzentrationen in Procente umgewandelt mit der Negativkontrolle als 100%. Die Mittelwerte der zwei Versuchsserien bei den jeweiligen Zeiten sind in Abbildung 52 zusammengefasst.

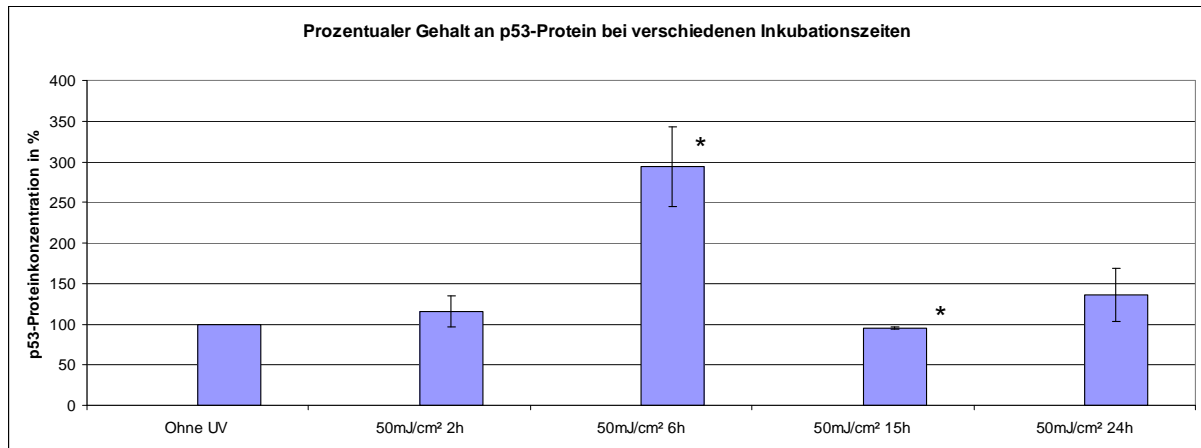


Abbildung 52: Prozentualer p53-Protein Gehalt nach verschiedenen Inkubationszeiten (n=2). Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Die deutlichste Konzentrationszunahme um einen Faktor von 3 konnte nach sechs Stunden Inkubationszeit nachgewiesen werden. Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass das Protein nach einem Reiz zuerst gebildet werden muss. Die dafür benötigte Zeit ist länger als die Dauer der Phosphorylierungsreaktion bei der p38-MAPK, gemäss Literatur liegt das Maximum der p53-Ausschüttung zwischen fünf und 24 Stunden<sup>(75-77)</sup>.

Für die folgenden Versuche wurden die Zellen nach der Bestrahlung während sechs Stunden inkubiert, bevor die Proteindetektion erfolgte.

#### 3.5.2. Dosisabhängigkeitsexperimente

Um die Entwicklung der p53-Proteinkonzentrationen bei steigender Bestrahlungsdosis zu eruieren, wurden die Zellen mit unterschiedlicher Dosis bestrahlt. Nach einer sechsständigen Inkubationsphase wurden dann die Proteine extrahiert und das p53-Protein in diesem Gemisch quantifiziert.

Insgesamt wurden drei Bestrahlungsdosen getestet, 50 mJ/cm<sup>2</sup>, 75 mJ/cm<sup>2</sup> und 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Die dabei nachgewiesenen p53-Konzentrationen sind in Form von Faktoren relativ zur Negativkontrolle in Abbildung 53 dargestellt.

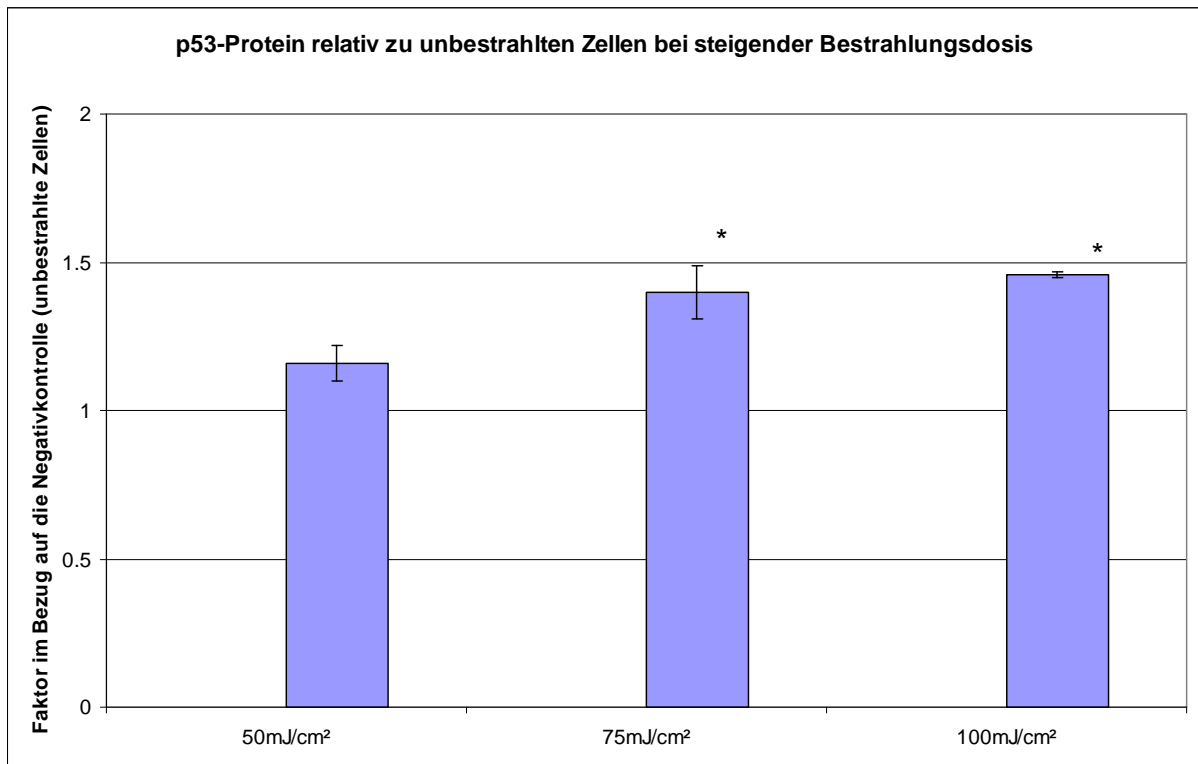


Abbildung 53: Durchschnittliche Veränderung des p53-Proteingehaltes relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Die Veränderungen im Vergleich zu der Negativkontrolle sind bei allen Bestrahlungsdosen eher gering. Eine Steigerung der p53-Proteinkonzentration um knapp den Faktor 1.5 bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> entspricht unter diesen experimentellen Bedingungen der maximal gemessenen Response. Trotz der praktisch identischen Ergebnisse bei 75 und 100 mJ/cm<sup>2</sup> wurde die höhere Bestrahlungsdosis für die folgenden Experimente ausgewählt. Dies ermöglichte die Ausnützung der maximal tolerierten UVB-Dosis dieser Zelllinie.

Die aus den Vorversuchen resultierenden Bedingungen für eine maximale p53-Proteindetektion waren eine Inkubationsdauer von sechs Stunden nach einer Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup>.

### 3.5.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten

Die maximale Zunahme an p53 nach UV-Exposition um den Faktor  $1.5 \pm 0.01$  liegt in einem ähnlichen Bereich wie die 2.2-fache Steigerung der p38-MAPK. Für weiterführende Experimente wurden vier verschiedene Sonnenschutzprodukte ausgewählt, deren SPF sich möglichst deutlich voneinander unterschieden. Aus diesem Grund wurden Daylong actinica (SPF 50+), Daylong Kids (SPF 50), COLIPA P3 Standard (SPF 16), sowie das UVA-Filter Produkt mit SPF 5 näher betrachtet. In Abbildung 54 sind die absoluten p53-Konzentrationen aus drei voneinander unabhängigen Versuchsserien pro Produkt dargestellt.

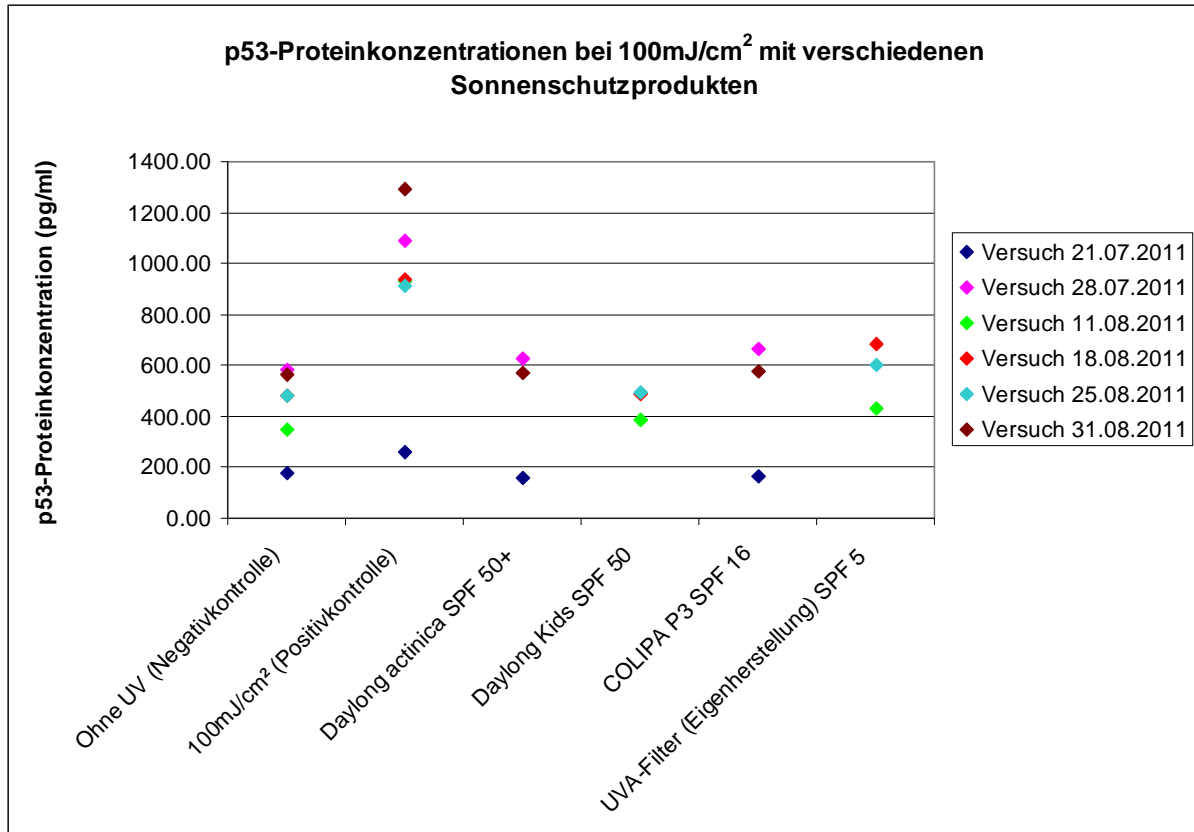


Abbildung 54: Detektierte p53-Proteinkonzentrationen mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten nach Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup>.

Die Anzahl Messpunkte der Kontrollen unterscheidet sich von derjenigen der analysierten Produkte, da bei jedem durchgeführten Versuch jeweils beide Kontrollen mitgemessen wurden. Die Konzentrationen aus den einzelnen Versuchen liegen auf einem ähnlichen Niveau, einzig die Werte vom ersten Versuch am 21.07.2011 sind bedeutend tiefer.

Die Versuchsdurchführung, sowie die Quantifizierungsmethode waren in allen Experimenten identisch, weshalb die verwendeten Zellen als Ursprung dieser niedrigeren Konzentrationen angesehen werden müssen. Aus einem nicht offensichtlichen Grund, reagierten die Zellen auf die Bestrahlung nicht mit einer vergleichbaren Menge an p53-Protein wie bei den anderen beiden Experimenten.

Eine Umrechnung der Konzentrationen in Prozentwerte und die anschließende Mittelwertberechnung lässt einen besseren Vergleich der Produkte untereinander, wie auch zu den Kontrollen, zu. Durch diesen Schritt zeigte sich, dass die relativen Verhältnisse der Punkte des fraglichen Experimentes (vom 21.07.2011, blaue Raute) in etwa denjenigen der anderen Punkte untereinander (intraexperimentell) entsprachen. Die Prozentwerte der Versuchserie vom 21.07.11 liegen auf einem ähnlichen Niveau wie diejenigen vom 28.07. und 31.08.11, auch wenn sich die absoluten p53-Konzentrationen auf einem tieferen Niveau befanden.

In Abbildung 55 sind diese Verhältnisse zusammengestellt.

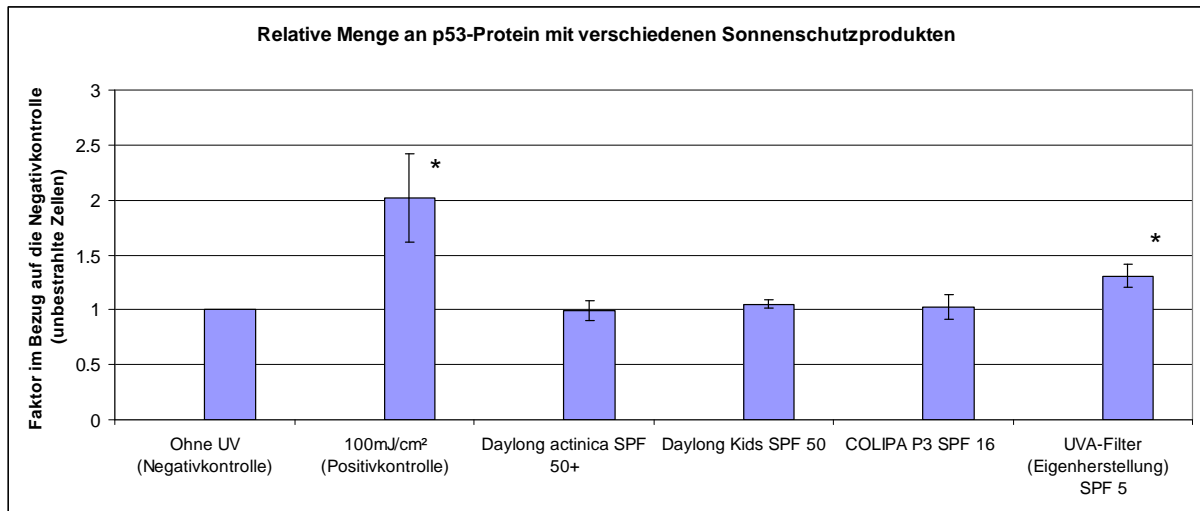


Abbildung 55: Menge an p53-Protein bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Es sind kaum Unterschiede zwischen den p53-Proteinmengen mit den verschiedenen Produkten erkennbar, der Level ist vergleichbar mit der nicht bestrahlten Negativkontrolle. Einzig das Produkt mit dem UVA-Filter weist einen leicht höheren Wert auf und unterscheidet sich mit P-Werten kleiner als 0.0347 (t-Test mit Signifikanzniveau 5%) signifikant von den anderen drei Formulierungen. Zusätzlich zu diesen Abklärungen erfolgte ein Vergleich der Positivkontrolle mit jedem der Produkte. Das Ergebnis belegt, dass sich Daylong actinica (P=0.0038), Daylong Kids (P=0.0048), COLIPA P3 (P=0.0050) sowie UVA-Filter (P=0.0219) alle mindestens signifikant davon unterscheiden.

#### Konklusion:

Die Bestimmung der p53-Proteinmengen mit dem verwendeten p53-ELISA ist reproduzierbar. Die maximale Response nach Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB entsprach einer Zunahme der p53-Proteinkonzentration um den Faktor 1.5 bis 2.

Die Gruppe Marrot et al. untersucht ebenfalls, welchen Einfluss UV-Strahlung auf Zellkulturen, Hautäquivalente und menschliche Haut hat. Sie analysieren verschiedene Marker, darunter auch DNA-Schäden und p53. In einer Arbeit aus dem Jahre 2010<sup>57</sup> bestimmten sie unter anderem die p53-Proteinmenge in Keratinozyten nach verschiedenen UV-Dosen mittels des oben erwähnten p53-ELISAs. Die Quantifizierung erfolgte nach 5 und nach 24 Stunden. Als Strahlungsquelle diente ein Sonnensimulator von Oriol mit einer Xenonbogenlampe. In Tabelle 14 sind die von ihnen gemessenen p53-Konzentrationen nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer in Form von relativen Prozentwerten dargestellt, wobei die unbestrahlten Zellen als 100% festgelegt wurden. Eine Bestrahlungszeit von 15 Minuten entsprach nach Angaben der Gruppe 3500 J/m<sup>2</sup> (350 mJ/cm<sup>2</sup>) UVB und 42'750 J/m<sup>2</sup> (4'275 mJ/cm<sup>2</sup>) UVA.

Tabelle 14: Aus Grafik abgelesene Prozentwerte der Veränderung der p53-Konzentrationen relativ zu unbestrahlten Zellen nach verschiedener Bestrahlungsdauer, L. Marrot et al 2010 (Abbildung 4) <sup>57</sup>.

	Nach 5h	Nach 24h
5 Minuten Bestrahlung	170%	190%
10 Minuten Bestrahlung	230%	330%
15 Minuten Bestrahlung	340%	340%
20 Minuten Bestrahlung	440%	440%

Die von den Zellen erhaltene UVB-Dosis nach 5 Minuten mit dem Oriel-Sonnensimulator entspricht ungefähr den in dieser Arbeit verwendeten 100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. Die Ergebnisse dort sind mit einem „fold change“ von 1.7 vergleichbar mit den Faktoren von 1.5 bis 2 dieser Experimente.

Eine Vielzahl der in der Literatur zu findenden Arbeiten zu p53 beschäftigt sich mit dessen Quantifizierung in menschlichen Hautbiopsien mit Hilfe von immunhistochemischen Techniken. Die Ergebnisse sind meistens als „Prozent positive Zellen für p53“ angegeben. Diese Analysen lassen sich daher nicht direkt mit den vorliegenden absoluten Werten vergleichen.

Ein Beispiel für Experimente mit Hautbiopsien ist die Arbeit von H. Bäckvall et al. <sup>75</sup> von 2002. Sie arbeiteten mit Hautbiopsien von Menschen verschiedener Altersgruppen und Häufigkeit der Sonnenexposition. Die Biopsien wurden entweder ohne oder mit Sonnenschutzprodukt (SPF 15) bestrahlt und nach verschiedenen langen Inkubationszeiten immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurde unter anderem die Menge an p53-Protein quantifiziert. Als Strahlungsquelle diente der Sonnensimulator SUPUVASUN 3000. Die Biopsien wurden einer Dosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB und 63.75 J/cm<sup>2</sup> UVA ausgesetzt. Die Resultate sind in Tabelle 15 dargestellt.

Eine Schwierigkeit bei Experimenten mit menschlicher Haut sind die oftmals erheblichen, interindividuellen Unterschiede, was sich auch bei einzelnen Resultaten in Tabelle 15 zeigt. Wie bereits weiter oben erwähnt, lassen sich diese Ergebnisse nicht direkt mit den Werten der vorliegenden Arbeit vergleichen. Werden jedoch Verhältnisse zwischen den 4h-Werten ohne Schutz und den unbestrahlten Zellen gebildet, erhält man Werte wie 5.5, 4.0 und 5.3. Diese geben an, wie viel mehr p53-positive Zellen in bestrahlten Biopsien im Vergleich zu unbestrahlten vorhanden sind. Diese Steigerungen sind in einer vergleichbaren Größenordnung wie die Ergebnisse dieser Arbeit. Das lässt die Vermutung zu, dass Hautbiopsien bei UV-Exposition bezüglich p53 vergleichbar reagieren wie Zellkulturen.

Eine weitere Erkenntnis kann im Hinblick auf die mit Sonnenschutzprodukt SPF 15 geschützten Biopsien gewonnen werden. Die 4h-Werte unterscheiden sich kaum von denjenigen der unbestrahlten Hautstücke, was eine Schutzwirkung des Produktes beweist. Dies entspricht den Resultaten aus Abbildung 55, auch dort konnte in den mit Sonnenschutzprodukt behandelten Proben kein wesentlicher p53-Anstieg beobachtet werden.

Tabelle 15: Ausschnitt aus Tabelle 1 der Arbeit von H. Bäckvall et al 2002<sup>75</sup>.

Hautmerkmale der Biopsien Anzahl Individuen	Inkubationsdauer	% p53-positive Zellen mit UV	% p53-positive Zellen mit UV+ Sonnenschutzprodukt
Nicht sonnenexponiert < 30 Jahre n= 5	0h	unbestrahlt 3.5 ± 2.3	3.5 ± 2.3
	4h	19.3 ± 16.0	4.2 ± 3.8
	24h	7.3 ± 8.5	2.6 ± 2.1
	48h	6.5 ± 5.8	1.4 ± 0.5
Nicht sonnenexponiert > 60 Jahre n= 4	0h	unbestrahlt 5.5 ± 2.9	5.5 ± 2.9
	4h	22.2 ± 7.4	7.9 ± 0.9
	24h	23.3 ± 7.7	5.1 ± 2.0
	48h	10.3 ± 6.5	6.0 ± 2.8
Chronisch sonnenexponiert > 60 Jahre n= 5	0h	unbestrahlt 7.3 ± 3.9	7.3 ± 3.9
	4h	38.6 ± 21.3	5.9 (nur 1 Wert)
	24h	21.2 ± 10.8	13.2 (nur 1 Wert)
	48h	14.5 ± 12.0	3.4 (nur 1 Wert)

Die Aussagen, welche nach Experimenten mit Sonnenschutzprodukten unterschiedlichen SPF's gemacht werden konnten, können wie folgt zusammengefasst werden:

Wie bei der p38-MAPK unterscheiden sich alle Produkte signifikant von der Positivkontrolle, was bedeutet, dass sämtliche Produkte, egal mit welchem SPF, der Zelle einen Schutz bieten. Dieser Schutz ist bei den Produkten Daylong actinica, Daylong Kids und COLIPA P3 so umfassend, dass die p53-Konzentrationen praktisch denjenigen von unbestrahlten Zellen entsprechen. Von den vier getesteten Produkten hebt sich nur dasjenige mit dem UVA-Filter signifikant von den anderen ab. Der vorliegende Assay vermag somit Sonnenschutzprodukte mit ganz tiefem SPF von den restlichen zu trennen, aber eine weitere Aufteilung ist nicht möglich.



### 3.6 Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD)

Bei den CPD handelt es sich um den einzigen, in dieser Arbeit untersuchten Marker, der ausschliesslich unter UV-Einfluss gebildet wird. Diese UV-Spezifität ist ein wichtiges Kriterium für einen potenziellen Marker.

HaCaT Zellen mit einem experimentell ermittelten Bestrahlungsmaximum von  $828 \text{ mJ/cm}^2$  dienen als Modell. Für die CPD-Bestimmung wurden zwei verschiedene Assays entwickelt/etabliert und verwendet. Einerseits ein indirekter ELISA und andererseits ein Durchflusszytometer-Assay. Nachfolgend sind die Ergebnisse der beiden Analyse-Techniken separat beschrieben.

#### 3.6.1. Kinetik Experimente ELISA

In der Literatur gibt es verschiedene Angaben über den zeitlichen Verlauf der Entstehung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren. Es gibt Gruppen, die mit der Quantifizierung der CPDs sofort nach Bestrahlung beginnen (<sup>78,79</sup>) oder erst nach 12 bis 24 Stunden (<sup>54,80</sup>). Min et al <sup>81</sup> und Katiyar et al <sup>82</sup> untersuchten den zeitlichen Verlauf der Dimerentstehung.

Die Ermittlung des richtigen Zeitpunktes zwischen maximaler Menge CPD und Beginn der nachfolgenden DNA-Reparatur erfolgte anhand von kinetischen Experimenten. Die getesteten Inkubationszeiten lagen zwischen zwei und fünfzehn Stunden um einen möglichst breiten Zeitbereich abzudecken. Bei der Detektion der Dimere stand kein Standard zur Verfügung, wodurch keine absolute Quantifizierung gemacht werden konnte. Die Dimermenge wurde relativ zu derjenigen der Zellen ohne UV (Negativkontrolle) ermittelt. Die photometrisch bestimmten optischen Dichten (OD) der Prüflösungen wurden in Prozente umgewandelt. Als 100%-Basis dienen die OD-Werte der Negativkontrolle. Abbildung 56 zeigt die Mittelwerte.

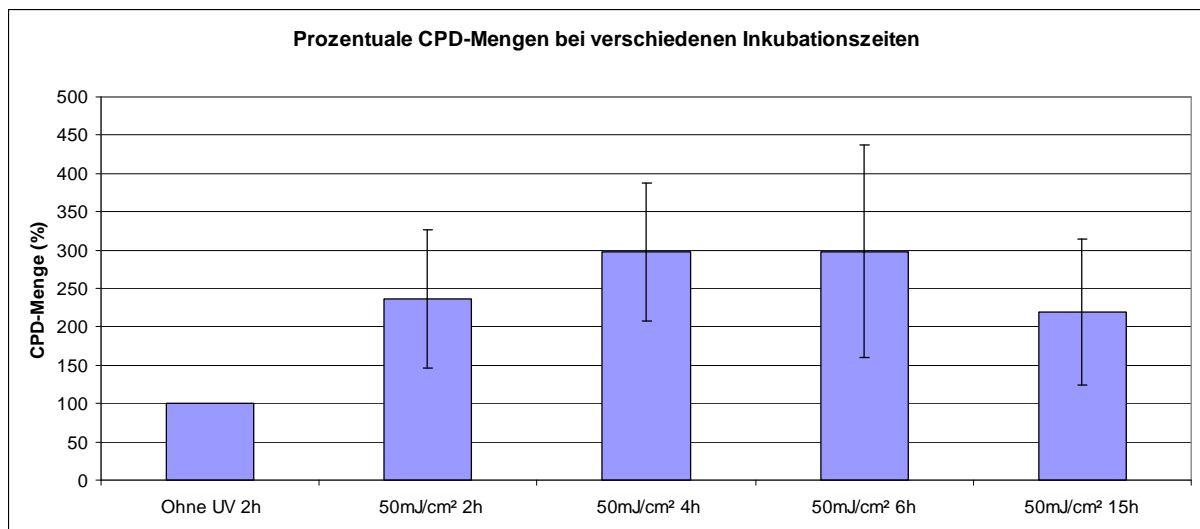


Abbildung 56: Prozentuale Menge an CPD nach verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt mittels ELISA (n=2).

Zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten gibt es unter Berücksichtigung der Standardabweichungen nur geringe Unterschiede. Die Dimere sind bereits nach zwei Stunden detektierbar und bleiben dann bis mindestens fünfzehn Stunden nach Bestrahlung bestehen. Dies deutet auf keine unmittelbare Reparatur hin. Die Inkubationsdauer wurde auf zwei Stunden festgelegt.

### 3.6.2. Dosisabhängigkeitsexperimente ELISA

Nach der Festlegung der Inkubationsdauer musste zusätzlich noch die Bestrahlungsdosis, welche die grösste Menge an CPD-Bildungen zur Folge hatte, ermittelt werden. Dazu wurde die CPD-Entstehung bei steigender Bestrahlungsdosis gemessen. Die Dosen reichten von 20 mJ/cm<sup>2</sup> bis 828 mJ/cm<sup>2</sup>. Pro Versuch und Parameter wurden Dreifachbestimmungen (Triplikate) durchgeführt.

In Abbildung 57 sind die gemittelten CPD-Mengen in Form von Faktoren relativ zur Negativkontrolle (gleich 1) bei den jeweiligen Bestrahlungsdosen dargestellt.

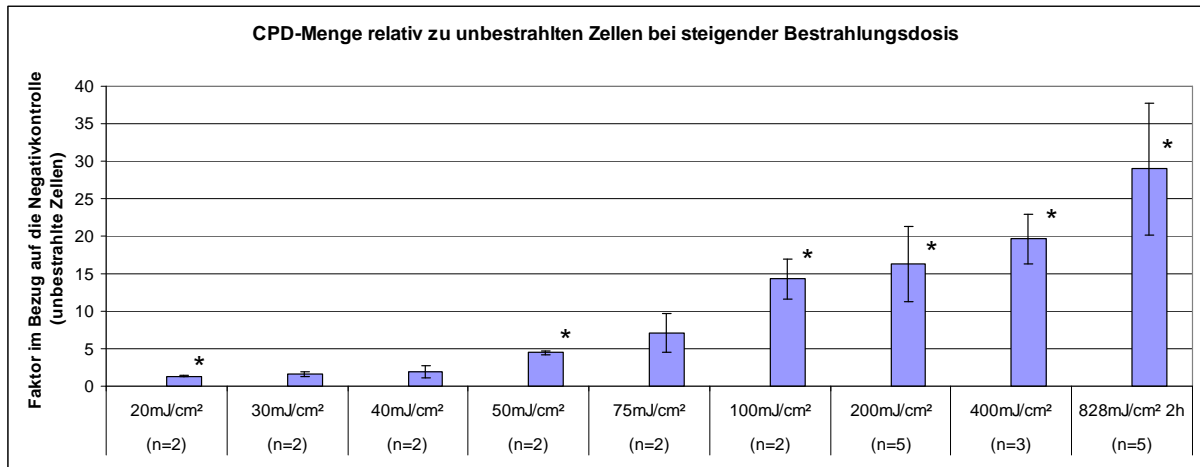


Abbildung 57: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels ELISA. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Es liegt eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit vor; eine Zunahme der Bestrahlungsdosis hat eine vermehrte Dimerbildung zur Folge. Bis zu einer Dosis von 40 mJ/cm<sup>2</sup> ist keine eindeutige Veränderung der Anzahl Dimere im Bezug auf unbestrahlte Zellen wahrzunehmen. Höhere Bestrahlungsdosen bewirken eine ausgedehnte Schädigung der DNA. Bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> wird eine Vermehrung der CPD um knapp Faktor 30 erreicht.

In zusätzlichen Experimenten wurde untersucht, wie die Kurve weiterverläuft. Eine weitere Erhöhung der Bestrahlungsdosis war nicht sinnvoll: Höhere UV-Dosen führen zur Überschreitung des festgelegten Mortalitätslimits. Die Dosis von 828 mJ/cm<sup>2</sup> wurde beibehalten, aber die anschliessende Inkubationszeit erhöht. Ergebnisse dazu sind in Abbildung 58 erneut in Form von Faktoren relativ zur Negativkontrolle zu sehen.

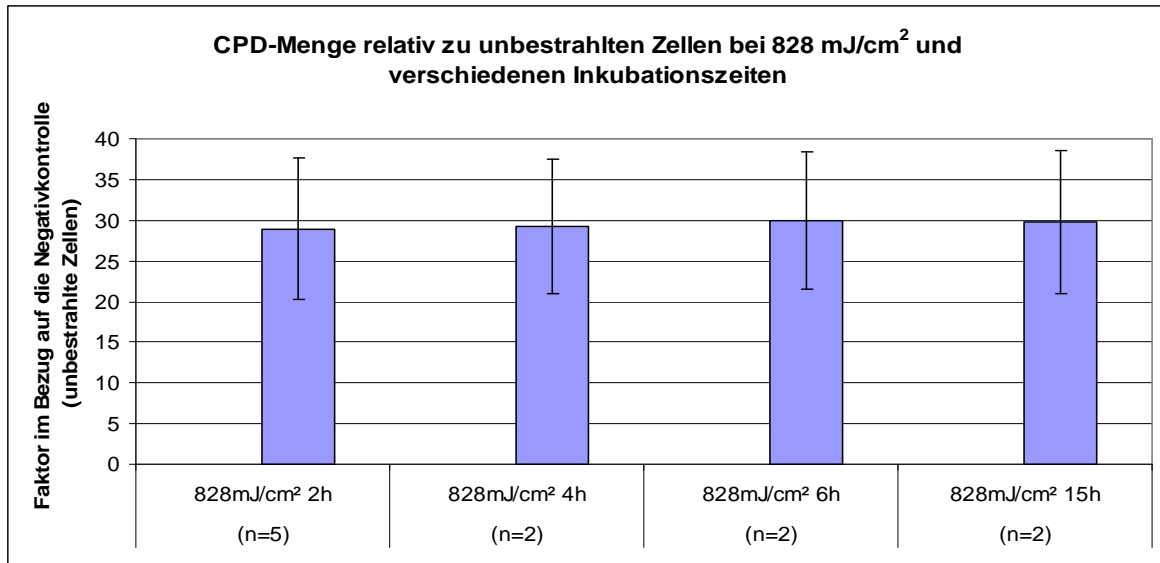


Abbildung 58: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Die Experimente zeigen eine unveränderte Menge an CPDs bei Verlängerung der Inkubationsdauer nach Bestrahlung. Die gegebenen Bedingungen führten zu einem erhöhten Zellsterben (Ergebnisse nicht dargestellt). Daraus entstand die Vermutung, dass die zelleigenen Reparaturmechanismen zum Erliegen kommen und dadurch der Level der Dimere konstant bleibt.

Die Ergebnisse der Vorversuche der CPD-Quantifizierung mittels ELISA Assay zeigen eine maximale CPD-Detektion nach einer Bestrahlung der Zellen mit 828 mJ/cm<sup>2</sup> und einer anschließenden zweistündigen Inkubation.

### 3.6.3. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten ELISA

Es wurden dreizehn Produkte untersucht, acht Handelswareprodukte (zwei davon in Australien) und fünf selber hergestellte Entwicklungsformulierungen (Produktliste inklusive enthaltener Filterkompositionen siehe Anhang).

Mit jedem Produkt wurden fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die pro Versuch gemessenen ODs wurden, wie in den Vorversuchen, in Prozent umgerechnet. Die Mittelwerte aller fünf Versuchsserien sämtlicher Produkte sind in Abbildung 59 zusammengestellt (Da die Positivkontrolle bei jedem Einzelversuch als Referenz mitbestimmt wurde, setzt sich der Mittelwert aus erheblich mehr Einzelwerten zusammen).

Die Handelsprodukte und der COLIPA Standard dienen der Überprüfung, ob Unterschiede zwischen Produkten mit verschiedenen SPF sichtbar sind. Die vier experimentellen Formulierungen hatten den Zweck die Auswirkungen von spezifisch unterschiedlichen Filterkombinationen (UVA-Filter vs. UVB-Filter vs. Breitbandfilter) auf die Dimermenge zu eruieren. Dadurch sollte die Aussage, dass die CPD hauptsächlich durch UVB entstehen<sup>(36)</sup>, überprüft werden.

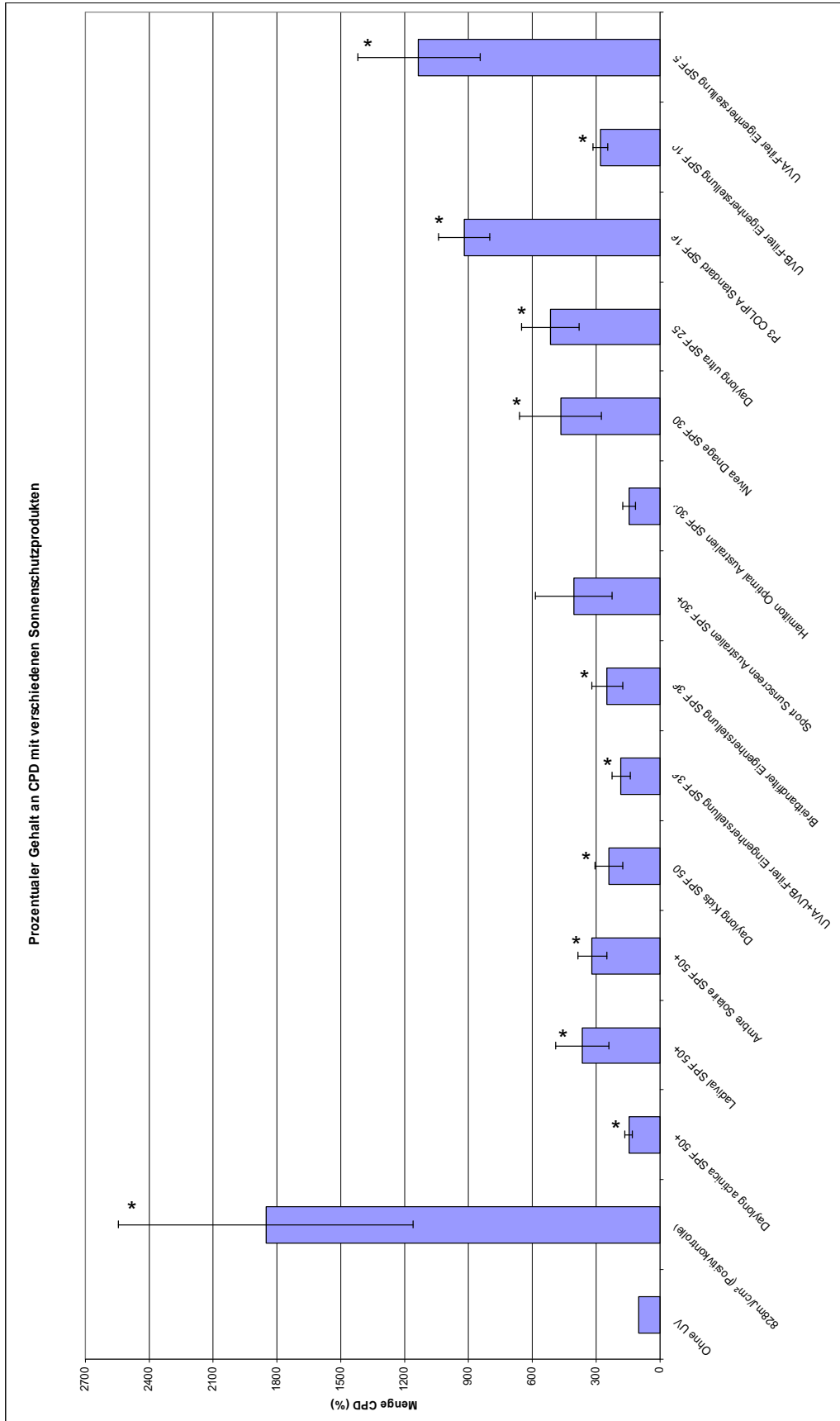


Abbildung 59: CPD bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten, ELISA-Assay. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Die Anzahl Dimere, die nach Bestrahlung mit jedem der Sonnenschutzprodukte gemessen wurde, liegt zwischen derjenigen der Negativkontrolle und derjenigen der Positivkontrolle. Sie unterscheiden sich gemäss t-Test zudem alle signifikant ( $\alpha = 5\%$ ) von der Positivkontrolle ( $P$  immer kleiner als 0.0282), was bedeutet, dass alle untersuchten Produkte einen Schutz gegen die Entstehung von CPD aufweisen, unabhängig von der Höhe des angegebenen SPFs.

Die Abbildung 59 zeigt zudem, dass Unterschiede zwischen Produkten mit unterschiedlichem SPF bestehen. Das Produkt mit dem UVA-Filter mit dem niedrigsten SPF weist klar die grösste Menge an Dimeren auf. Auf der anderen Seite haben die Produkte mit sehr hohem SPF bezüglich der CPD-Bildung grösstenteils eine gute Schutzkapazität.

### 3.6.4. Kinetik Experimente FACS

Die Zellen wurden einer Dosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt und während unterschiedlicher Dauer inkubiert. Wie bereits bei der FACS-Quantifizierung von p38 (Kapitel 3.4.) wurden immer die Zellen aus zwei Wells vereint. Die Menge an CPDs wurde für jede Inkubationszeit zweimal in unabhängigen Versuchen bestimmt. Die Mittelwerte dieser zwei Versuchsreihen sind in Abbildung 60 aufgeführt.

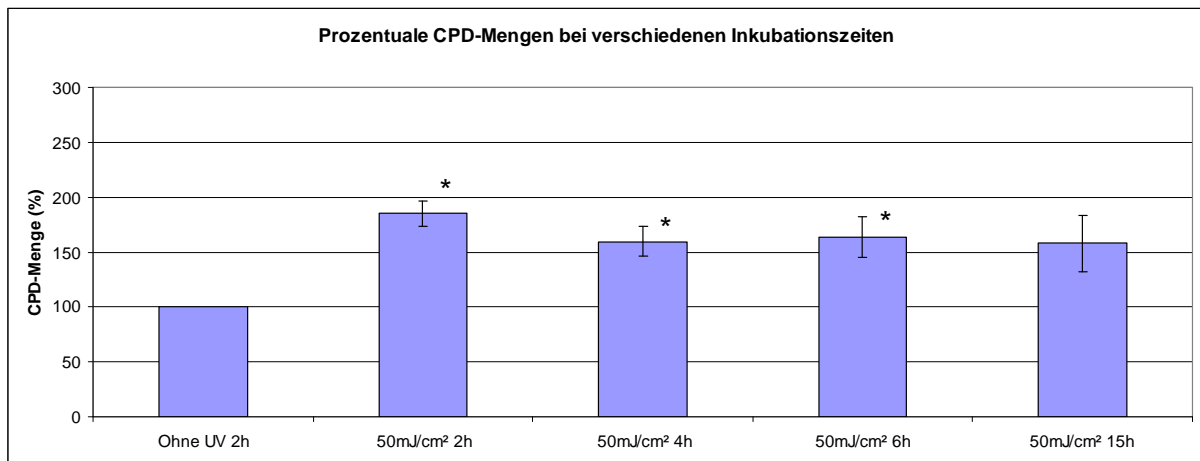


Abbildung 60: Prozentuale Menge an CPD nach verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt mittels FACS. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten sind gering. Die FACS-Methode bestätigt die Ergebnisse des ELISA-Assays. Die Inkubationsdauer von zwei Stunden wurde bei dieser Messtechnologie beibehalten.

### 3.6.5. Dosisabhängigkeitsexperimente FACS

Die Zellen wurden steigenden Bestrahlungsdosen ausgesetzt und nachfolgend die Entstehung der Dimere gemessen. Für die Überprüfung eines Dosis-Wirkungszusammenhangs galten die gleichen Voraussetzungen wie unter 3.6.2., die Dosen variierten zwischen  $20 \text{ mJ/cm}^2$  und  $828 \text{ mJ/cm}^2$ .

In Abbildung 61 sind die Ergebnisse in Form von gemittelten Faktoren der einzelnen Bestrahlungsstärken relativ zur Negativkontrolle (gleich 1) dargestellt.

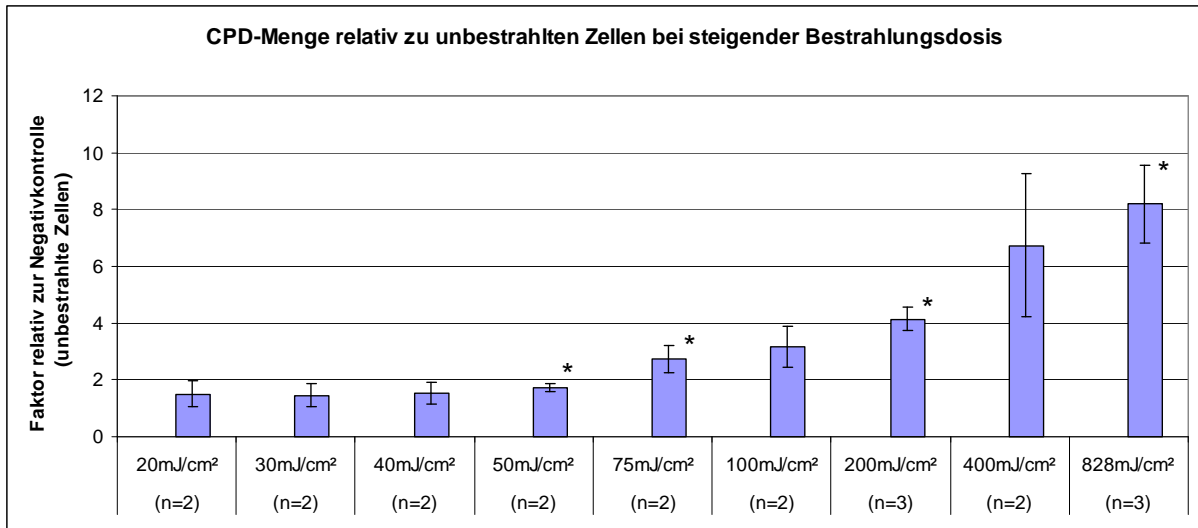


Abbildung 61: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels FACS. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.

Es ist ebenfalls eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit zu erkennen. Mit dem Durchflusszytometer konnte eine zunehmende Fluoreszenz bei steigender Bestrahlungsdosis gemessen werden, gleichbedeutend mit einer erhöhten Menge an CPD. Bis 50 mJ/cm<sup>2</sup> bleiben die CPD auf dem Ausgangslevel der Negativkontrolle, danach steigt ihre Anzahl kontinuierlich bis zu einer Dosis von 828 mJ/cm<sup>2</sup> an. Die Gesamtsteigerung der CPD-Bildung fällt bei diesem Assay geringer aus, sie beträgt ca. das Achtefache im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen (ELISA knapp dreissigfache Zunahme). Es besteht wieder die Tendenz, dass die Standardabweichung grösser wird, je höher die Bestrahlungsstärke ist.

Auf eine Weiterverfolgung des Kurvenverlaufs wurde verzichtet, da eine Verlängerung der Inkubationszeit möglicherweise zu einem vermehrten Zellsterben geführt hätte, wodurch zu wenig Zellen für eine aussagekräftige Messung zur Verfügung gestanden hätten.

Die Vorversuche haben bestätigt, dass die Bedingungen für eine maximale CPD-Detektion beim FACS-Assay, sowie beim ELISA-Assay kongruent waren. Aufgrund der Vorversuche wurde die Inkubationsdauer auf zwei Stunden nach einer Bestrahlung mit 828 mJ/cm<sup>2</sup> festgelegt.

### 3.6.6. Hauptversuche mit Sonnenschutzprodukten FACS

Die zur Analyse verwendeten Sonnenschutzprodukte entsprachen den dreizehn in Abbildung 59 gezeigten Produkten. Sie wurden in fünf voneinander unabhängigen Versuchsserien getestet. Die Mittelwerte der fünf Prozentwerte für jedes Produkt sind in Abbildung 63 dargestellt.

Die mit der FACS-Technik gemessenen CPD-Mengen mit den jeweiligen Produkten sind allesamt geringer als beim ELISA.

Noch immer unterscheiden sich die Dimer-Mengen aller Produkte signifikant von derjenigen der Positivkontrolle. Die P-Werte sind alle kleiner als 0.0001, ausser derjenige des Produkts mit dem UVA-Filter, welcher 0.0031 beträgt.

Die Ergebnisse einer Versuchsserie mit vier Produkten wurden ausgewählt um einen Fluoreszenzsignal-Overlay zu erstellen, der in Abbildung 62 zu sehen ist. Die vier Produkte decken den untersuchten SPF-Bereich ab. In violett (1) und dunkelblau (2)

sind die Kontrollen dargestellt, einmal ohne Antikörper (violett) und einmal mit Antikörper unbestrahlt (dunkelblau). Mit diesen Kurven praktisch identisch ist in hellgrün (3) das Produkt Daylong actinica SPF 50+. Die geringe Fluoreszenz deutet auf eine kleine Menge Dimere hin. Weiter rechts und somit mehr Fluoreszenz aufweisend, ist in orange (4) die Signalkurve von Nivea SPF 30. Darauf folgen das COLIPA Standard Produkt SPF 16 in hellblau (5), sowie UVA-Filter SPF 5 in rot (6). Die grösste Fluoreszenzintensität und somit die eindeutig höchste CPD-Menge weist die Positivkontrolle ohne Produkt in dunkelgrün (7) auf. In diesem Signal-Plot sind also zunehmende Fluoreszenzintensitäten bei kleiner werdendem SPF zu erkennen, was sich in Rechtsverschiebungen der Kurven äussert.

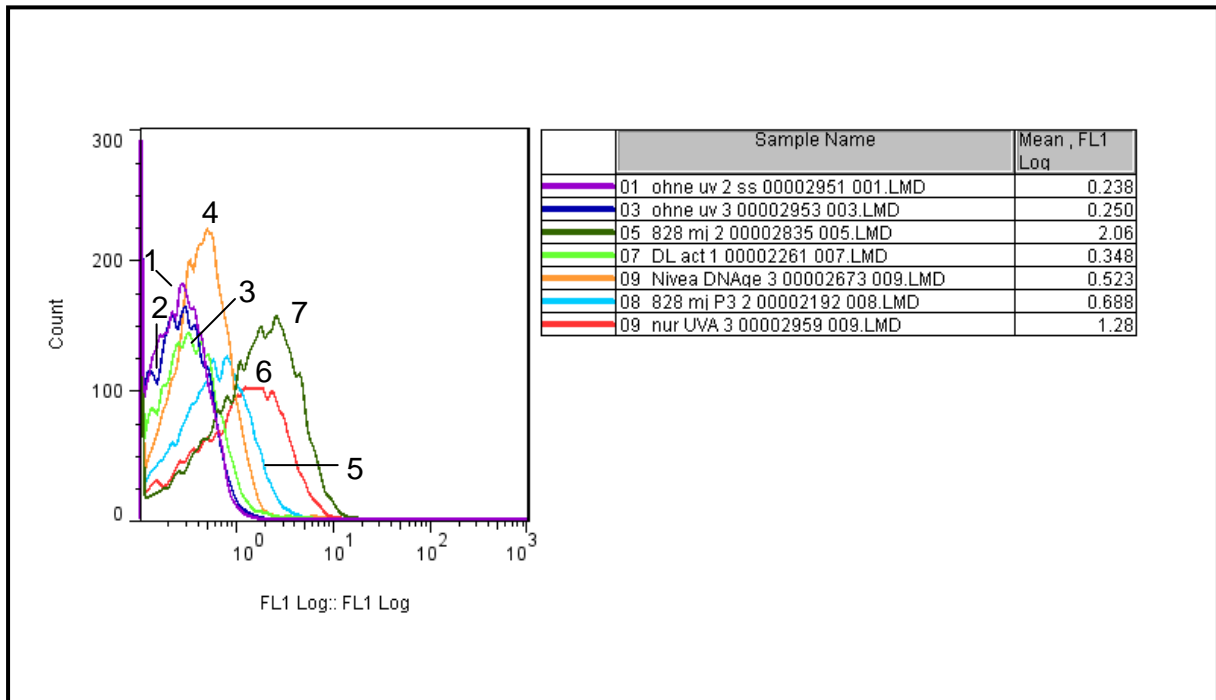


Abbildung 62: Signal-Overlay repräsentativ ausgewählter Proben von vier Sonnenschutzprodukten der CPD-Quantifizierung mittels FACS.

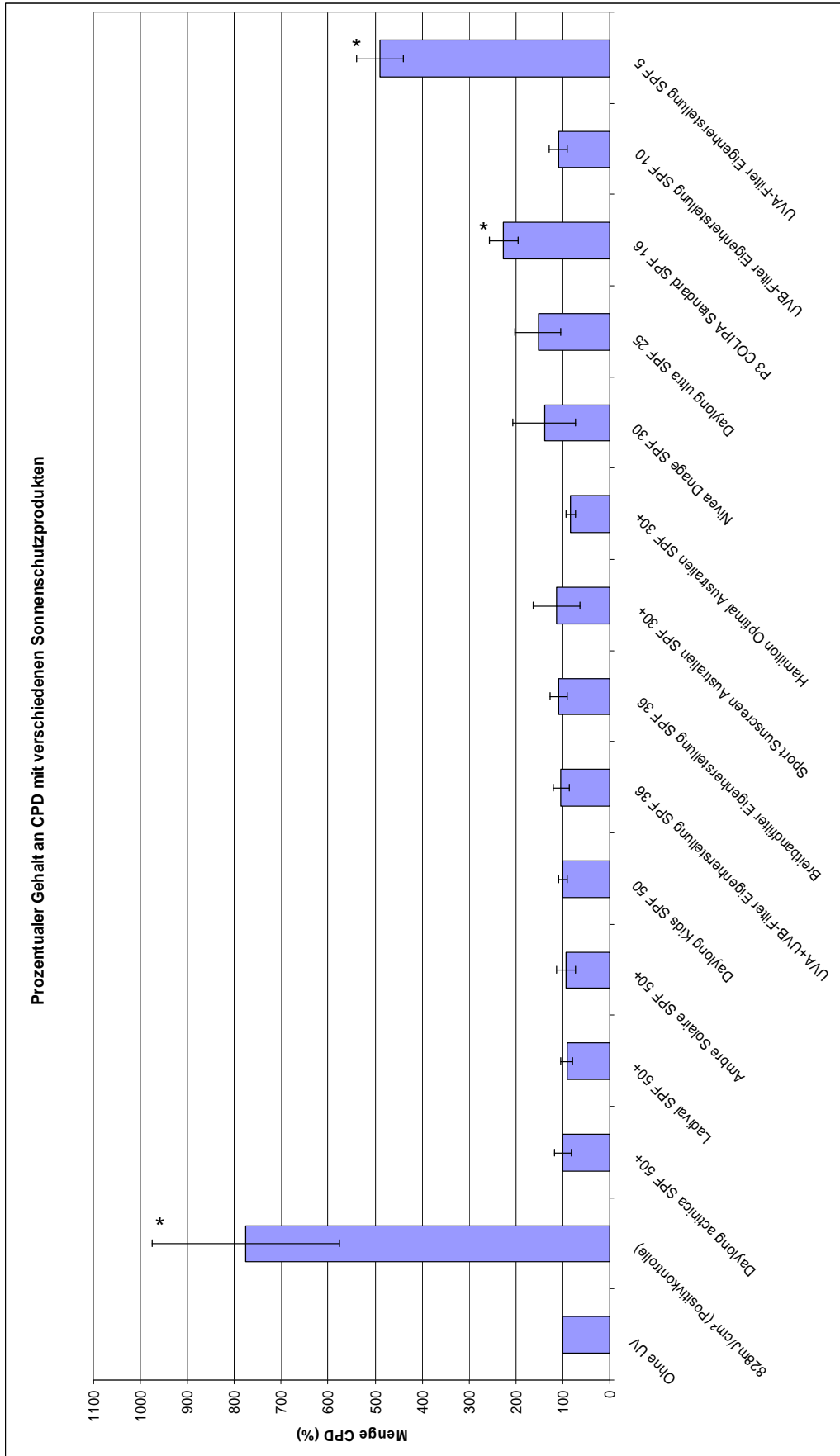


Abbildung 63: CPD bei 828 mJ/cm<sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten, FACS-Assay. Die mit \* gekennzeichneten Balken unterscheiden sich statistisch signifikant von der Negativkontrolle „Ohne UV“.



Konklusion der Ergebnisse von ELISA und FACS:

Die Cyclobutan Pyrimidin Dimere lieferten die bisher aussagekräftigsten Resultate von allen getesteten Markern. Die Dimere, als UV spezifischer Marker, liessen sich nach Bestrahlung um ein Vielfaches steigern, was die Möglichkeit zur Evaluierung vieler verschiedener Sonnenschutzprodukte eröffnete.

Es konnten zwei funktionierende Assays entwickelt werden, die beide reproduzierbare, in ihrer Aussage vergleichbare Resultate lieferten. Der ELISA-Assay weist eine höhere Sensitivität auf als der FACS-Assay, er detektierte grössere Mengen an CPD und war ausserdem in der Lage auch kleinere Unterschiede zwischen den Produkten sichtbar zu machen. Die Schwierigkeit beim Durchflusszytometerassay bestand darin, die Antikörper in den Zellkern zu bringen ohne die Zellen zu schädigen/ zu lysieren. Es besteht die Möglichkeit, dass nicht genügend Antikörper in den Kern gelangten und somit nicht alle vorhandenen Dimere quantifiziert werden konnten.

Wie im Kapitel „Einleitung“ unter 1.7.3. bereits erwähnt, gibt es zwei Möglichkeiten CPD-Dimere zu untersuchen. Entweder wird deren Entstehung nach UV-Exposition quantifiziert, wie in der vorliegenden Arbeit oder aber deren Reparatur. In der Literatur sind Arbeiten zu beiden Techniken zu finden. Wie auch schon beim Marker p53 arbeiten viele Gruppen für die Bestimmung der Dimere mit Hautbiopsien menschlicher oder tierischer Herkunft und messen darin die CPD mittels immunhistochemischen Methoden. Die Ergebnisse sind oftmals in Form von „Prozent CPD-positive Zellen“ angegeben. In einer Arbeit von F. Afaq et al aus dem Jahr 2010<sup>55</sup> wurden SKH-1 hairless Mäuse mit oder ohne Granatapfel fruchtextrakt einer Dosis von 180 mJ/cm<sup>2</sup> UVB (von UVB-Lampen mit 20% UVA-Anteil) ausgesetzt und nach 24h wurde in Hautbiopsien der Anteil CPD-positiver Zellen bestimmt. Die Kontrolle ohne UV enthielt etwa 5% CPD-positive Zellen, bestrahlte Zellen ohne Extrakt etwa 75% und bestrahlte Zellen mit Extrakt etwa 25%. Der Unterschied der CPD-Menge zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen betrug Faktor 15, mit Fruchtextrakt war es dreimal weniger. Eine im Vergleich zu den 828 mJ/cm<sup>2</sup> UVB dieser Arbeit 4.5-fach geringere UVB-Dosis scheint bei Mäusen auszureichen um eine ähnliche Steigerung der CPD-Menge hervorzurufen (Faktor 15 versus Faktor 30 (ELISA) od. Faktor 8 (FACS)). Dies korreliert mit der bereits bei p38-MAPK gemachten Beobachtung (Ergebnisse C. Cao<sup>73</sup>), wo ebenfalls geringere UV-Dosen zu einer ähnlich hohen Response führten. Insgesamt scheinen Mäuse sensibler auf ultraviolette Strahlung zu reagieren als menschliche Zellen.

Ausschnitte aus Arbeiten von SK. Katiyar et al 2000<sup>82</sup> und MJ. Mabruk 2009<sup>83</sup> sind in den Tabelle 16 und 17 dargestellt. Beide Gruppen bestimmten in menschlichen Hautbiopsien die CPD-positiven Zellen nach Bestrahlung mit vier respektive drei MED und anschliessender verschieden langer Inkubationsdauer. Als Strahlungsquelle dienten einerseits Westinghouse FS20 Lampen (UVA 43%, UVB 54% und UVC 3% der Energie) und andererseits bei Mabruk ein 1000W Sonnensimulator von Oriol.

Tabelle 16: Anzahl CPD-positive Zellen (%) in Kinetikversuchen Katiyar et al. (2000)<sup>82</sup>.

	30 Min.	6h	24h	48h	72h
SK. Katiyar et al. (4 MED)	55 ± 12	68 ± 12	70 ± 15	72 ± 12	38 ± 10

Tabelle 17: Anzahl CPD-positiver Zellen (%) in Kinetikversuchen Mabruk et al. (2009) <sup>83</sup>.

	4.5h	9h	24h	33h	48h	72h
MJ. Mabruk et al. (3 MED)	140.24 ± 24.19	119.05 ± 33.55	60.35 ± 5.2	47.14 ± 14.71	43.26 ± 5.76	7.66 ± 10.83

Werte von unbestrahlten Zellen fehlen bei Mabruk, bei Katiyar konnten in Zellen ohne UV keine CPD nachgewiesen werden. In beiden Arbeiten ist ein zeitabhängiger Rückgang der CPD-positiven Zellen zu erkennen, wahrscheinlich hervorgerufen durch Reparaturvorgänge. Bei den Experimenten von Mabruk scheint diese Reaktion früher einzusetzen, da bereits nach 24h nur noch halb so viele CPD-positive Zellen zu detektieren sind, wie nach 9h. Bei Katiyar halbierte sich die Menge zwischen 48h und 72h. Diese Unterschiede in der Kinetik sowie jene in der absoluten Menge (Mabruk misst in der Anfangsphase 2-3x mehr CPD-positive Zellen als Katiyar) sind wohl auf die interindividuellen Unterschiede und allenfalls auf die unterschiedlichen Strahlungsquellen zurückzuführen.

Yarosh et al. verglichen 2002 <sup>84</sup> in einem Review verschiedene Methoden zur CPD-Detektion. Darunter befand sich auch ein ELISA-Assay mit HaCaT-Zellen. Das Ergebnis stellten sie in Form von optischen Dichten bei 405 nm dar. Nach einer Bestrahlung mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB konnte eine OD von etwa 0.56 gemessen werden, bei unbestrahlten Zellen waren es etwa 0.04 (geschätzt, abgelesen aus Grafik). Angaben über die Art der Strahlungsquelle und die Inkubationsdauer nach Bestrahlung sind nicht vorhanden. Die durchschnittliche Zunahme an CPD nach UV-Exposition wurde mit Faktor 19.3 angegeben. Das ist eine relativ hohe Steigerung für eine doch verhältnismässig geringe UVB-Dosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup>. Bei den Dosisabhängigkeitsexperimenten dieser Arbeit konnte bei 30 mJ/cm<sup>2</sup> noch keine erhöhte CPD-Menge im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit ist aufgrund der fehlenden Angaben jedoch schwierig. Falls die von Yarosh verwendete Strahlungsquelle auch UVC emittierte, könnte ein solches Resultat dadurch erklärt werden. Hinzu kommt der Punkt, dass die photometrische Quantifizierung bei verschiedenen Anregungswellenlängen erfolgte (450 nm/540 nm versus 405 nm bei Yarosh).

Die Experimente mit den selbst hergestellten Formulierungen haben bestätigt, dass die Cyclobutan Pyrimidin Dimere hauptsächlich durch UVB entstehen. Aus diesem Grund wies das UVB-Filter-Produkt mit dem relativ niedrigen SPF von 10 eine geringe CPD-Entstehung auf. Ein potenter UVB-Schutz kann die CPD-Bildung auf ein tiefes Niveau reduzieren. Umgekehrt bestätigte die Formulierung mit den reinen UVA-Filtern mit ihrer schwachen Schutzkapazität diese Annahme.

Die Möglichkeit zur Gruppierung der Sonnenschutzprodukte anhand ihres SPFs ist je nach Assay unterschiedlich. Mit dem weniger sensitiven FACS-Assay ist eine Unterscheidung zwischen Produkten mit hohem oder mittlerem SPF und solchen mit tiefem SPF möglich. Eine Trennung von Produkten mit hohem SPF von denjenigen mit mittlerem SPF ist schwierig, da mit dem Assay keine kleinen Differenzen detektiert werden können.

Abbildung 64 zeigt mögliche Gruppierungen, die anhand der gemessenen CPD-Mengen der Produkte gemacht werden können. Alle Produkte innerhalb eines Kreises sind gleich, das heisst sie unterscheiden sich in t-Tests mit einem Signifikanzniveau von 5% nicht signifikant voneinander (Tabelle mit P-Werten siehe Anhang).

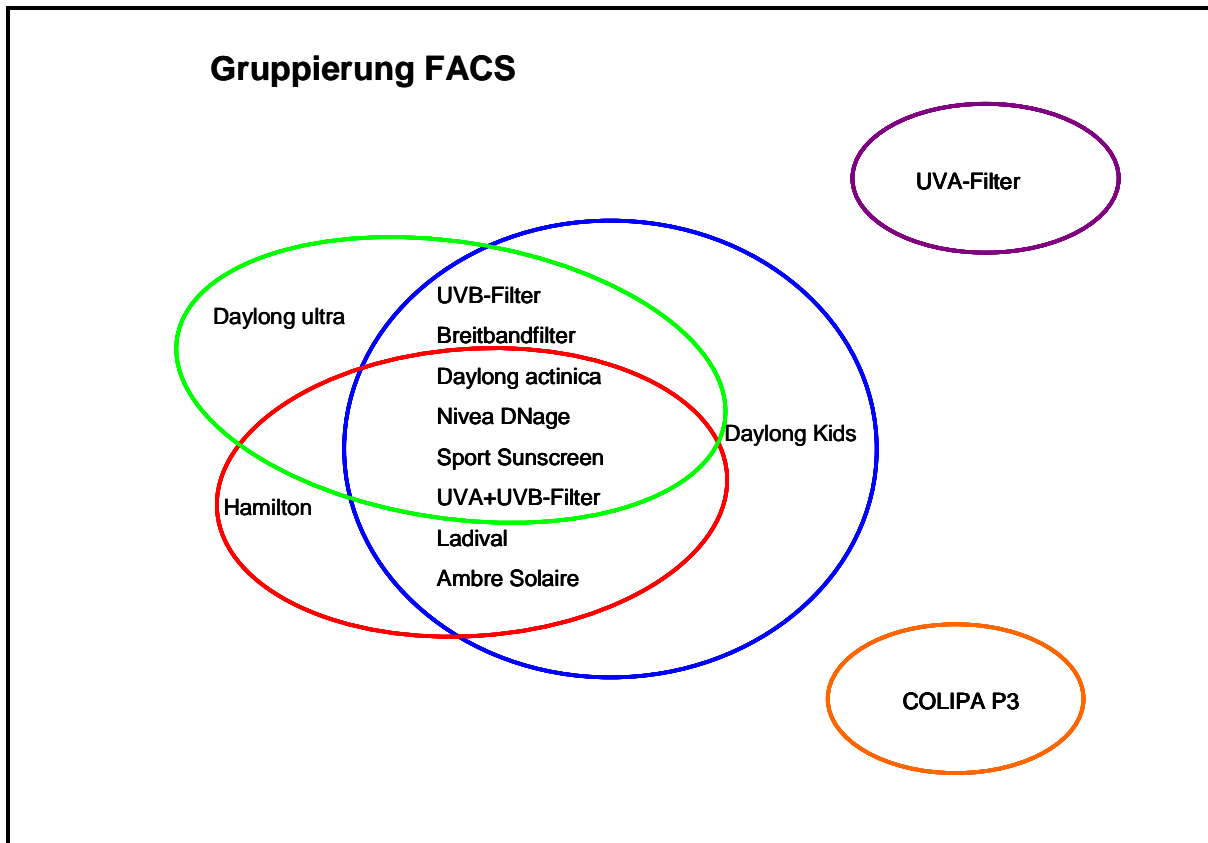


Abbildung 64: Gruppierungen von Sonnenschutzprodukten, deren CPD-Mengen sich nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden lassen. Produkte innerhalb eines Kreises unterscheiden sich nicht signifikant.

Es gibt demnach drei Hauptgruppen, eine mit dem UVA-Filter-Produkt (sehr tiefer SPF), eine mit dem COLIPA Standard P3 (tiefer SPF) und der ganze Rest (mittlere bis sehr hohe SPF). In der letzten Gruppe sind weitere Unterteilungen möglich, diese sind jedoch hinsichtlich des SPFs der Produkte zu wenig eindeutig.

Die beim ELISA-Assay beinahe dreissigfache Steigerung der CPD-Menge nach Bestrahlung ermöglichte eine umfassende Evaluierung diverser Sonnenschutzprodukte mit unterschiedlichen SPFs. Kleine Unterschiede zwischen einzelnen Produkten sind besser sichtbar. Das bedeutet einerseits, dass teilweise auch Produkte mit hohem SPF von denjenigen mit mittlerem SPF unterschieden werden können, andererseits macht es eine Gruppierung, wie in Abbildung 65 ersichtlich, noch etwas komplexer. Die Durchführung eines statistischen Vergleichs ( $\alpha=5\%$ ) der CPD-Mengen eines jeden Produkts mit allen anderen, ergab Gruppierungen wie sie in Abbildung 65 zu sehen sind. Produkte innerhalb des gleichen Kreises unterscheiden sich, bezüglich ihrer CPD-Menge, nicht statistisch signifikant voneinander (Tabelle mit P-Werten siehe Anhang).

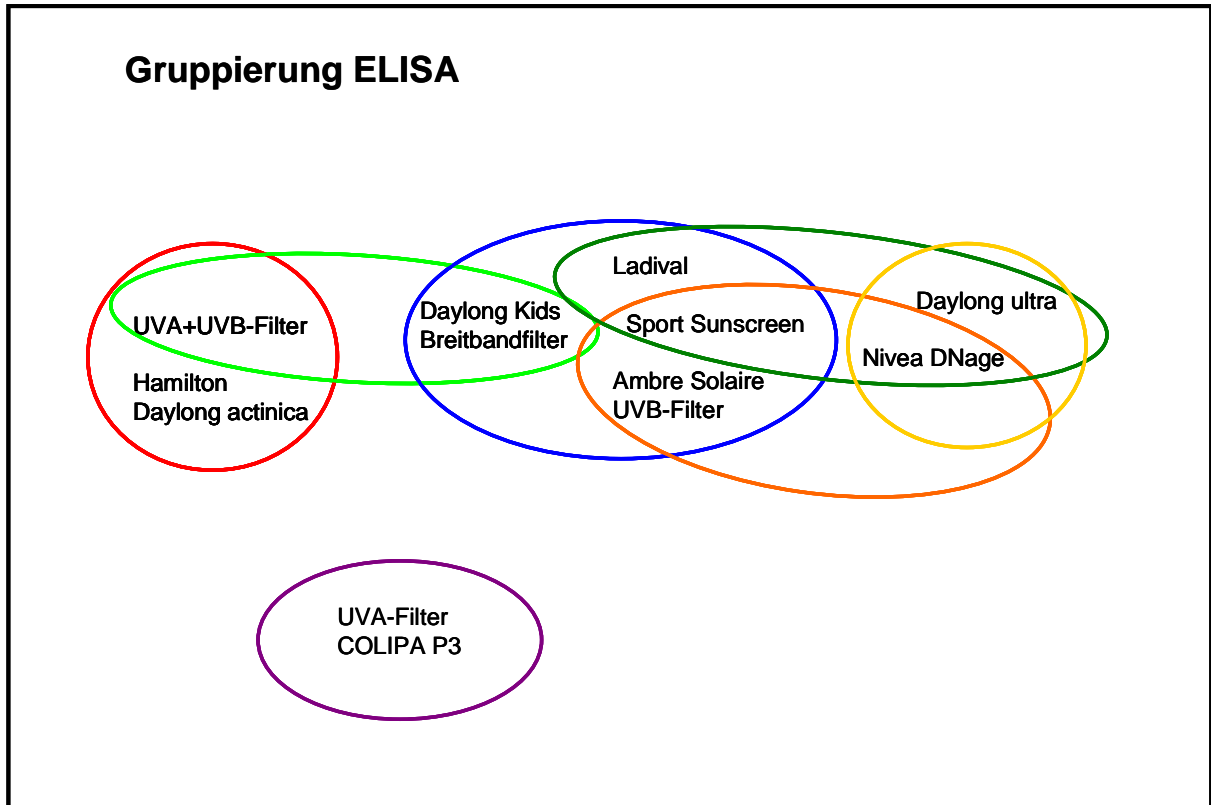


Abbildung 65: Gruppierungen von Sonnenschutzprodukten, deren CPD-Mengen sich nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden lassen. Produkte innerhalb eines Kreises unterscheiden sich nicht signifikant.

Insgesamt sind sieben Gruppen vorhanden, wobei diese allenfalls auf vier Hauptgruppen reduziert werden können. Als erste Hauptgruppe gibt es links in rot Sonnenschutzprodukte mit hohem bis sehr hohem SPF, dann kommt im blauen Kreis (Mitte) eine zweite, heterogene Gruppe mit Produkten mit hohem und sehr hohem SPF, im gelben Kreis rechts sind die Produkte mittleren SPFs und unten zum Schluss in violett die Produkte mit tiefem bis sehr tiefem SPF.

### 3.7 Kenngrößenvergleich von Sonnenschutzprodukten

Das Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach einem Marker, der als Ergänzung zum SPF als Kennwert der Schutzfunktion eines Produktes eingesetzt werden kann. Der SPF-Wert hängt von der Bestimmungsmethode ab. Es kann grosse Diskrepanzen von ein und demselben Produkt geben, je nachdem, ob der SPF *in vitro* oder *in vivo* bestimmt wurde. Darüber hinaus wird festgestellt, dass die Ergebnisse auch von Labor zu Labor beträchtlich schwanken<sup>(85,86)</sup>. Aus diesen Gründen wäre eine neue Kenngrösse, die die Schutzfunktion eines Produktes umfassend angibt, höchst wünschenswert.

Um einen Kenngrößenvergleich zu ermöglichen, wurde von allen dreizehn verwendeten Sonnenschutzprodukten der UVA-PF gemäss der COLIPA Guideline „Method for *in vitro* determination of UVA protection“ von 2011 bestimmt. Dabei wird bei den Berechnungen der Bestrahlungszeit auch ein *in vitro* SPF<sub>adj.</sub> vom Computer errechnet (siehe Formel 1, Kapitel 2.1.2.).

Der BASF Sunscreen Simulator ( <http://www.personal-care.basf.com/europe/by-market-segment/sun-care/basf-sunscreen-simulator> ) ist ein Hilfsmittel zur Abschätzung des SPFs mittels Eingabe der prozentualen Mengen der Filter einer Formulierung. Der Simulator errechnet *in silico* den SPF dieser Formulierung.

Von allen in der vorliegenden Arbeit getesteten Produkten wurden folgende Kenngrößen für einen Vergleich mit den CPD-Werten ermittelt: der BASF *in silico* SPF, der BASF UVA-PF und die im Labor ermittelten Werte *in vitro* SPF<sub>adj.</sub> (Computer) und UVA-PF (Werte siehe Tabelle 18).

(Für die bei den UVA-PF Bestimmungen erhaltenen Absorptionsdiagramme jedes Produktes siehe Anhang).

Tabelle 18: Verschiedene Kenngrößen der Sonnenschutzprodukte mit der Rangierung (rote Werte).

	Deklariertes SPF (auf Packung)	<i>in vitro</i> SPF <sub>adj.</sub> (Labor)	Ranking	<i>in vivo</i> SPF (BASF)	Ranking	CPD-Menge in % (ELISA)	Ranking	CPD-Menge in % (FACS)	Ranking	UVA PF (Labor)	Ranking	UVA PF (BASF)	Ranking
Daylong actinica	50+	143.4	1	70.9	2	146	2	99	4	11.72	7	10.90	8
Ambre Solaire	50+	27.7	5	58.8	3	318	7	93	3	22.51	1	22.80	3
Ladival	50+	21.3	9	74.7	1	364	8	91	2	18.09	4	25.00	2
Daylong Kids	50	65.1	2	50.3	4	240	4	100	5	18.51	3	19.30	4
Hamilton Optimal	30+	47.1	3	24.0	9	144	1	83	1	4.61	10	4.60	10
Sport Sunscreen	30+	15.5	10	19.1	10	405	9	113	9	2.80	11	3.40	11
Breitbandfilter (eigen)	36	28.6	4	35.9	6	249	5	110	7	14.94	6	16.40	6
UVA+UVB-Filter (eigen)	36	27.1	6	36.0	5	184	3	103	6	10.94	8	11.10	7
Nivea DNage	30	26.5	8	34.6	7	467	10	139	10	16.44	5	18.70	5
Daylong ultra	25	26.7	7	30.6	8	515	11	152	11	10.31	9	8.40	9
COLIPA P3	16	9.7	12	12.1	11	920	12	226	12	2.29	12	2.50	12
UVB-Filter (eigen)	10	10.7	11	10.0	12	279	6	110	7	1.00	13	1.10	13
UVA-Filter (eigen)	5	3.5	13	5.1	13	1134	13	489	13	19.00	2	26.20	1

Pro Kenngrösse (Spalte) wurden die Produkte rangiert (Ränge in rot dargestellt). Die Kriterien für die Rangierung waren wie folgt: Beim SPF und UVA-PF sollte der Wert möglichst hoch sein, beispielsweise beim UVA-PF (Labor) erhielt Ambre Solaire mit einem Wert von 22.51 Rang 1. Bei der CPD-Menge mit ELISA und FACS erhielt das Produkt mit dem geringsten Prozentsatz an CPD die beste Rangierung, also z.B. Hamilton Optimal mit 144% CPDs (ELISA) Rang 1 und das UVA-Schutz Produkt mit 1134% (ELISA) nur Rang 13.

Die Unterschiede zwischen dem im Labor ermittelten *in vitro* SPF<sub>adj.</sub> und dem *in silico* SPF von BASF sind zum Teil gross, besonders bei Ladival mit einem deklarierten SPF von 50+. Beim *in silico* SPF von BASF gehört es mit einem Wert von ca. 75 zu den Produkten mit der höchsten Rangierung der untersuchten Kenngrösse, beim *in vitro* SPF mit 21 jedoch nur zum Mittelfeld. Umgekehrt verhält es sich mit Hamilton Optimal (deklarierter SPF von 30+). Das Produkt schneidet mit einem BASF SPF von 24 und Rang 9 eher bescheiden ab, beim *in vitro* SPF (Labor) mit einem Wert von 47 und Rang 3 ist es jedoch hoch rangiert. Die vorliegende Produktauswahl bestätigt die erwähnten, bestehenden Schwierigkeiten auf dem Gebiet der SPF-Bestimmung. Die beiden verwendeten Assays zur Quantifizierung der Dimere stimmen in der Rangierung der Produkte ziemlich gut überein. Einzig die Produkte Ambre Solaire und Ladival haben beim ELISA-Assay eine tiefere Rangierung verglichen mit dem FACS-Assay.

Ein Vergleich der Rangierung der beiden UVA-PF (Labor vs. BASF) zeigt eine relativ gute Übereinstimmung.

Konklusion:

Sonnenschutzprodukte können sehr unterschiedlich bewertet werden je nachdem welche Kenngrösse zu deren Beurteilung verwendet wurde. Ein Produkt kann einen hohen UVB-Schutz aufweisen, gleichzeitig aber kaum gegen UVA schützen oder umgekehrt. Ein ideales Sonnenschutzprodukt ist eine Formulierung, die über den gesamten Bereich einen zuverlässigen Schutz bietet. Bis jetzt sind zur Bewertung von Produkten mehrere Testparameter (SPF und UVA-PF) nötig, da noch kein Marker gefunden wurde, der die UVB- und die UVA-Schutzkapazität gleichzeitig bestimmen kann.

Bei der Gegenüberstellung von verschiedenen Kenngrössen ergibt sich wenig Übereinstimmung in der Rangierung der Produkte.

Die Quantifizierung der Cyclobutan Pyrimidin Dimere ist wie die SPF-Bestimmung auf den UVB-Schutz ausgerichtet. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Marker zusätzlich zum SPF zur Evaluierung von Sonnenschutzprodukten beigezogen werden könnte. Zur Verwendung als umfassender Marker, der die Schutzkapazität für den UVA- und den UVB-Bereich beschreibt, ist dieser DNA-Schaden allerdings nicht geeignet.

## 4. Gesamtdiskussion

Die weltweit steigenden Hautkrebsraten der letzten Jahre zeigen die Notwendigkeit und Wichtigkeit einer umfassenden Sonnenprotektion auf. Der kausale Zusammenhang zwischen ultravioletter Strahlung und nichtmelanomartigen Hautkrebstypen ist gegeben<sup>87,88</sup>. Weitere biologisch relevante und schädliche Einflüsse wie Immunsuppression, Hautalterung, DNA-Schäden und das allgemeine Sonnenerythem gilt es zu verhindern.

Der Schutz vor UV-Strahlung basiert auf drei Säulen: Meidung der Sonne, Tragen von schützender Kleidung und Kopfbedeckung und Verwendung von Sonnenschutzprodukten. Die Verwendung von Sonnenschutzprodukten ist, obwohl weniger effektiv, weit verbreitet und populär. Bis in die neunziger Jahre fokussierte sich der Sonnenschutz auf den UVB-Bereich, es galt: erfolgreicher Sonnenschutz = Vermeidung eines Sonnenerythems. Im letzten Jahrzehnt vergrößerte sich das Wissen auf diesem Gebiet und die Relevanz von UVA wurde erkannt<sup>5</sup>. Trotz der geringeren Energieintensität von UVA, verglichen mit UVB, (siehe „Die Sonne“), bestehen rund 95% der Energie der auf der Erde ankommenden UV-Strahlung aus UVA. Dessen Einfluss auf die Carcinogenese<sup>89</sup>, sowie bei der Immunsuppression<sup>90</sup> wurde in diversen Studien belegt.

Diese Entwicklungen führten zu Modifizierungen der Sonnenschutzprodukte. Bestanden diese früher hauptsächlich aus Filtern, die zwar einen guten UVB-Schutz gewährleisten, aber nur schlechten bzw. gar keinen UVA-Schutz, so wurden nun umfassende, zuverlässigere Filterkombinationen inklusive Breitbandfiltern und potenten UVA-Filtern verwendet. Im Laufe der Jahre konnten die schädlichen Einflüsse von UV auf den Körper besser und genauer charakterisiert werden und der Forschung gelang es, vertieftes Wissen über den Ablauf der Carcinogenese sowie die beeinflussenden Faktoren zu generieren. Dadurch ergaben sich neben der früheren Hauptaufgabe „Erythemvermeidung“ neue, zentrale Aufgaben, die ein Sonnenschutzprodukt erfüllen sollte. Dazu gehört die Verhinderung der Entstehung von Hautkrebs und einer Immunsuppression.

Die Frage, ob heutige Produkte in der Lage sind diese Anforderungen zu erfüllen, ob deren Effizienz ausreicht, wurde und wird weltweit diskutiert. Bezüglich Hautkrebsverhinderung muss zwischen den verschiedenen Hautkrebsarten unterschieden werden. Es gibt Studien, welche die Verhinderung von Hautkrebs durch die Verwendung von Sonnenschutzprodukten belegen<sup>91-93</sup>, aber auch solche, die zu einem gegenteiligen Schluss kommen, nämlich dass durch die Verwendung von Sonnenschutzprodukten vermehrt Hautkrebs auftritt<sup>94,95</sup>. Der Mini-Review von Autier aus dem Jahre 2007 gibt eine Übersicht über verschiedene Studien<sup>96</sup>. Auch die Review-Arbeit von ME. Burnett und SQ. Wang von 2011<sup>18</sup> beschäftigt sich mit der Wirksamkeitsdiskussion und dazu noch mit weiteren Kontroversen zu Sonnenschutzprodukten (z.B. Vitamin D Mangel, Sicherheit von Nanopartikeln und anderen Inhaltsstoffen). Eine Schwierigkeit, die sich bei der Beantwortung der Frage „Wirksamkeit gegen Hautkrebsentstehung“ stellt, ist das Konsumentenverhalten. Sonnenschutzprodukte werden oftmals nicht in der Menge aufgetragen, mit welcher sie im Labor getestet werden. Anstelle der von der EU empfohlenen  $2 \text{ mg/cm}^2$  werden meist nur zwischen einem Drittel und einem Fünftel dieser Menge verwendet<sup>96</sup>, was zu einer deutlichen Reduktion des effektiven SPFs führt. Eine weitere Beobachtung zeigt, dass die Benützung von Sonnenschutzprodukten, v.a. jene mit hohem SPF, häufig unvernünftig langes, exzessives Sonnenbaden zur Folge hat<sup>96</sup>. Durch ein derartiges Verhalten

wird die insgesamt absorbierte UV-Dosis erhöht, was zu vermehrten Hautschäden führt und möglicherweise die Entstehung von Hautkrebs beschleunigt.

Durch den oben erwähnten Wandel von einem reinen UVB-Schutz zu einem gesamtheitlichen, UV-übergreifenden Sonnenschutz wurde in den vergangenen Jahren die Kritik am SPF, als alleinigen Indikator, immer lauter<sup>97</sup>. Der „Sun Protection Factor“ wird weltweit verwendet um die Effektivität eines Sonnenschutzproduktes bei der Verhinderung eines Erythems anzugeben.

Der SPF und damit verbunden die Erythementstehung werden hauptsächlich durch Wellenlängen im UVB-Bereich beeinflusst (Ref 23), UVA-Wellenlängen tragen nur wenig dazu bei. Dies führt dazu, dass die Schutzkapazität eines Produktes im UVA-Bereich mit der Kenngrösse SPF nicht definiert wird.

Als ein weiterer Kritikpunkt wird angeführt, dass mit dem SPF weitere, biologisch relevante Endpunkte wie DNA-Schäden, Immunsuppression, Zerstörung der Hautstrukturen etc. nicht berücksichtigt und beschrieben werden können. Die Verhinderung der Erythementstehung gilt zwar als wichtiger Punkt, trotzdem widerspiegelt diese die vielfältigen, durch UV hervorgerufenen Reaktionen im Körper nicht ausreichend. Auch der Zusammenhang zwischen Erythementstehung und Krebsentstehung ist nicht endgültig geklärt. Hinzu kommt die Tatsache, dass verschiedene biologische Schädigungen bereits auftauchen, bevor die Erythemschwelle überschritten wird<sup>82,98</sup>.

Damit begann die Suche nach alternativen Kenngrössen zur Charakterisierung der Sonnenschutzleistung eines Produktes. Verschiedene Ansätze wurden verfolgt:

Im Jahr 1997 veröffentlichten HN. Ananthaswamy et al.<sup>99</sup> im Nature Medicine Resultate zu Bestrahlungsexperimenten mit Mäusen. Sie untersuchten zuerst die zeitliche Entstehung von p53-Mutationen im Krebsentwicklungsprozess bei chronisch bestrahlten Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass die p53-Mutationen zeitlich früher detektiert wurden, als dass die Krebsentstehung einsetzte.

Anschliessend wurden in weiteren Versuchen zwei Sonnenschutzprodukte (SPF 15) auf ihre Fähigkeit getestet, solche p53-Mutationen zu verhindern. Die Produkte waren in der Lage vor diesen Mutationen zu schützen. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die p53-Mutationen als frühe Endpunkt-Marker im Photocarcinogenese-Prozess dienen könnten. Sie machten den Vorschlag zusätzlich zum SPF einen sogenannten Mutationsschutzfaktor (MPF) für Sonnenschutzprodukte einzuführen. Er soll die Effektivität der Produkte, p53-Mutationen zu verhindern, angeben. Dieser Ansatz des MPFs weist durchaus eine Relevanz auf, da Mutationen im p53-Gen bei 50% der epithelialen Krebsarten auftreten<sup>36,100</sup>. Aufgrund der aufwändigen, nicht in jedem Labor vorhandenen Methodik via polymerase chain reaction (PCR) und single-strand conformation polymorphism (SSCP) Analyse, sowie Nukleotidsequenzierung eignet sich dieser Ansatz nicht unbedingt als Standardmethode.

Lens et al.<sup>101</sup> führten eine *in vivo* Studie durch, in welcher sie die p53-Expression im Zellkern nach UV-Bestrahlung in menschlicher Epidermis quantifizierten. Bei den Studienteilnehmern wurden Hautareale mit Sonnenschutzprodukt (SPF 15) und ohne Produkt bestrahlt. Anschliessend wurden Hautbiopsien mittels Saugblasenmethode gewonnen und die p53-Expression mittels Immunhistochemie bestimmt. Die p53-Expression in Biopsien mit Sonnenschutzprodukt war geringer. Es wurde der „p53 labeling index“ berechnet: Ohne Sonnenschutzprodukt 0.052 gegen 0.006 mit SPF 15. Die Studie konnte eine Schutzwirkung des Produktes mit SPF 15 vor einer gesteigerten p53-Expression und somit vor UV induzierten DNA-Schädigungen nach-



weisen. Die Gruppe schlug die Verwendung des „p53 labeling index“ für die Effektivitätsbestimmung von Sonnenschutzprodukten vor.

Eine publizierte Arbeit von T. Herrling et al. aus dem Jahr 2006<sup>102</sup> beschäftigt sich mit dem Schutz vor freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Auf Biopsien von Schweinehaut wurden Formulierungen mit unterschiedlichen UV-Filtern aufgetragen, diese bestrahlt und darin anschliessend die freien Radikale via Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie bestimmt. Ein sogenannter Radikalsonnenschutzfaktor (RSF) ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen der Anzahl freier Radikale in ungeschützter Haut und der Anzahl freier Radikale in geschützter Haut. Der RSF ist eine weitere interessante Kenngrösse und Radikale sind an vielen schädigenden Abläufen in der Haut, wie Hautalterung, Faltenbildung, sowie DNA- und Membranschädigungen, beteiligt<sup>103</sup>. Trotzdem wäre eine Kenngrösse mit einem direkteren Zusammenhang zur Carcinogenese noch hilfreicher. Hinzu kommt, dass der experimentelle Aufbau mit den verwendeten Geräten nur wenigen Laboren weltweit zur Verfügung steht.

Ein weiterer Ansatz bestand in der Untersuchung der Immunsuppression. Bereits in den Neunzigerjahren wurde deutlich, dass der Schutz vor Immunsuppression durch den SPF nicht genügend gut charakterisiert werden kann. Als einer der Ersten charakterisierte LK. Roberts 1996<sup>104</sup> den Immunschutzfaktor „immune protection factor“ (IPF). Er definierte ihn analog zum SPF als Verhältnis zwischen der minimalen immunsuppressiven Dosis geschützter Haut und der minimalen immunsuppressiven Dosis ungeschützter Haut. Im Verlauf der letzten Jahre wurden viele Experimente zum oder mit dem IPF gemacht. Es wurde versucht den IPF mit dem SPF zu korrelieren. Daraus ergaben sich Ergebnisse mit zum Teil konträren Aussagen. Diese Schwierigkeiten kommen von den unterschiedlichen Experimentendesigns, den verschiedenen Auswertungsarten, sowie anderen Primär-Parametern, wie zum Beispiel ungleiche Definitionen von „Immunsuppression“. Einige Gruppen erfassen die Kontakthypersensitivität, andere arbeiten mit der DTH „delayed-type hypersensitivity“; dadurch wird eine einheitliche Definition und Erfassung des IPF erschwert. Das Konsensus Paper von A. Fourtanier et al.<sup>105</sup> fasst die Erkenntnisse einer Expertengruppe, von einer von L'Oréal initiierten Diskussionsrunde, zu diesen Schwierigkeiten zusammen.

Die UV-spezifischen DNA-Schäden wurden ebenfalls als Alternative zum SPF in Betracht gezogen. In den meisten Fällen werden die CPD, als häufigster und am längsten persistierender Schaden, quantifiziert. Die Art und Weise wie die Forschungsgruppen zu dem sogenannten DNA-Schutzfaktor (DNA-PF) gelangen, ist allerdings sehr unterschiedlich. V. Bissonauth et al.<sup>78</sup> berechneten in einer ihrer Arbeiten aus dem Jahr 2000 den DNA-PF, indem sie die CPD-Frequenz in einer ungeschützten Biopsie (künstliche Haut) durch die CPD-Frequenz in einer geschützten Hautbiopsie teilten. Mit dieser Berechnung erhielten sie einen DNA-PF von 1 bis 2 für ein Sonnenschutzprodukt mit dem SPF von 30.

Eine Arbeit aus dem Jahr 2011 von S. Mouret et al.<sup>58</sup> zeigt eine differente Vorgehensweise. Die Gruppe quantifizierte in Dosis-Wirkungsexperimenten (UV-Dosen) die Menge an TT-CPDs (Thymindimere) in der DNA von menschlichen Hautbiopsien. Durch Erstellen einer linearen Regression konnte die Anzahl DNA-Läsionen pro UV-Dosiseinheit ermittelt werden. Es wurden Biopsien mit und ohne Sonnenschutzprodukt bestrahlt. Insgesamt wurde der DNA-PF von drei Referenzformulierungen P2 und P3 (COLIPA-Standards mit SPF 16) sowie JCIA PPD (mit SPF 3.8-4.3) und von

einem Handelsprodukt mit SPF 50+ bestimmt (Tabelle 19). Der DNA-PF eines Produktes ergab sich aus dem Verhältnis der Schadenmenge in ungeschützter Haut zur Schadenmenge in geschützter Haut. Es wurden folgende Durchschnittswerte der DNA-PFs ermittelt:

Tabelle 19: DNA-PF-Werte verschiedener Formulierungen aus S. Mouret et al. (2011) <sup>58</sup>.

	UVA-Bestrahlung	UVB-Bestrahlung
P2 (SPF 16)	2.0 ± 0.5	7.3 ± 3.0
P3 (SPF 16)	1.1 ± 0.3	18.0 ± 10.8
JCIA PPD (SPF 3.8-4.3)	2.2 ± 0.4	6.7 ± 3.5
Handelsware (SPF 50+)	15.7 ± 8.5	24.6 ± 17.2

Die DNA-PFs von Bissonauth und Mouret sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedlich bestrahlt wurde. Bissonauth verwendete simuliertes Sonnenlicht (UVA und UVB), während Mouret die CPD-Entstehung bei UVB und UVA separat bestimmte. Beide Gruppen konnten jedoch eine Schutzwirkung der verwendeten Produkte mit Hilfe des DNA-PFs belegen.

Unabhängig von der Bestimmungsart des DNA-PFs, welche auch von der Quantifizierungsmethode der CPDs abhängt, bietet dieser einen wichtigen Vorteil gegenüber dem SPF. Der direkte Zusammenhang zur Photocarcinogenese ist bei DNA-Schäden eher gegeben als bei der Erythementstehung.

Bei der Suche nach alternativen Kenngrößen zur Charakterisierung der Sonnenschutzleistung eines Produktes gibt es einige interessante Ansätze mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen. Allerdings wurden in keinem der oben beschriebenen Versuche mehrere Produkte mit unterschiedlichen SPFs untersucht. Dadurch ist die Beurteilung der Eignung der Kenngrößen als zusätzliche Charakterisierung von Sonnenschutzprodukten nicht möglich. Es fehlt die Bestimmung der Kenngrößenwerte von mehreren Produkten mit unterschiedlicher Schutzleistung, d.h. unterschiedlichen SPFs.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin ein *in vitro*-Testsystem mit einem oder mehreren geeigneten Markern für „durch UV hervorgerufene Zellschäden“ zu entwickeln, mit dessen Hilfe Sonnenschutzformulierungen zusätzlich charakterisiert werden können. Der experimentelle Aufbau der Versuche bestehend aus Keratinozyten in 6-Well-Platten, darüberliegenden PMMA-Platten mit aufgetragenem Produkt und die UV-Einwirkung von oben wurde in dieser Form noch von keiner anderen Forschungsgruppe verwendet.

Durch die Komplexität der Abläufe in lebenden Zellen nach erfolgter Schädigung wurden Markerkandidaten mit verschiedenen Wirkorten untersucht. Dazu gehörten die Familie der Zytokine (extrazellulär), die p38-MAPK (Zytosol) sowie p53 und die Cyclobutan Pyrimidin Dimere (Kern).

## Zytokine

Die Markergruppe der Zytokine, stellvertretend untersucht mit Interleukin 1 $\alpha$  und Interleukin 8, lieferte keine aussagekräftigen Resultate. Die grosse Variabilität zwischen den Einzelversuchen verunmöglichte eine vertiefte Analyse. Zudem waren die ausgeschütteten Interleukinmengen nach UV-Einfluss verglichen mit jenen nach einem chemischen Stimulus eher gering. Ultraviolette Strahlung ist in den hier verwendeten Experimenten kein effizienter Auslöser für eine ausgeprägte Zytokinausschüttung. Die Daten aus der Literatur sind uneinheitlich. Es existieren Arbeiten mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die auf die Verwendung verschiedener Modelle und Strahlungsquellen zurückzuführen sind. (siehe Kapitel 3.2). Versuche mit mehreren Produkten mit verschiedenen SPFs gibt es nicht.

## p38-MAPK

Bei den Versuchen mit der p38-MAPK kamen fünf verschiedene Sonnenschutzprodukte zum Einsatz. Mit dem verwendeten Durchflusszytometerassay konnten Produkte mit hohem und mittlerem SPF von Produkten mit sehr tiefem SPF unterschieden werden. Alle fünf Produkte wiesen eine signifikante Schutzwirkung verglichen mit der ungeschützten Positivkontrolle auf. Die Detektion einer maximalen Steigerung der aktivierten p38-MAPK nach UV-Einfluss von Faktor 2.2 lag im ähnlichen Grössenbereich wie Ergebnisse anderer Forschungsgruppen<sup>44</sup>.

## p53

Ähnliche Resultate wie bei p38 konnten mit dem Marker p53 erhalten werden. Die Evaluierung vier verschiedener Sonnenschutzprodukte mittels ELISA-Assay ermöglichte eine Trennung der Produkte mit sehr tiefem SPF von allen anderen Produkten. Die vier Produkte stellten, verglichen mit der ungeschützten Positivkontrolle, einen signifikanten Schutz dar. Bei drei Produkten war dieser so effizient, dass die gemessene p53-Proteinmenge praktisch identisch mit derjenigen von unbestrahlten Zellen war. Die maximale Response der Zellen nach UV-Exposition lag zwischen 1.5 und 2. Vergleichbare Steigerungen zwischen 1.7<sup>57</sup> und 4-5<sup>75</sup> sind in der Literatur zu finden.

## CPD

Es konnten zwei verschiedene Nachweismethoden entwickelt und verwendet werden, von denen die sensitivere Methode (ELISA) eine maximale Steigerung der CPD-Menge nach UV-Einfluss um den Faktor 30 und die andere (FACS) um den Faktor 8 detektierte. Die Cyclobutan Pyrimidin Dimere als einzige UV-spezifische Marker liessen eine Untersuchung von insgesamt dreizehn Sonnenschutzprodukten zu. Mit Hilfe des ELISA-Assays können bessere Klassifizierungen der Sonnenschutzprodukte anhand ihrer SPFs gemacht werden. Es ergeben sich Aufteilungen in 1) Produkte mit sehr hohem/hohem SPF, 2) Produkte mit mittlerem SPF und 3) Produkte mit tiefem/sehr tiefem SPF.

In Tabelle 20 ist ein Vergleich der DNA-PF Werte von Produkten dieser Arbeit (SPF 30/25) und demjenigen von V. Bissonauth et al.<sup>78</sup> (SPF 30) dargestellt. Je höher ein DNA-PF, desto besser ist der Schutz vor CPD-Bildung eines Produktes. Die in Tabelle 20 zusammengefassten Ergebnisse weisen auf eine bessere Schutzwirkung der Produkte aus der vorliegenden Arbeit hin, trotz ähnlichem SPF aller Produkte. Es besteht die Möglichkeit, dass das von Bissonauth verwendete Produkt tatsächlich

eine schlechtere Performance aufweist. Allerdings könnte der Unterschied auch auf die verhältnismässig hohen UV-Dosen von Bissounath (1000-6000 kJ/m<sup>2</sup> simulated sunlight, also UVB+UVA vs. 8.28·10<sup>-8</sup> kJ/m<sup>2</sup> UVB) zurückzuführen sein, welche die normale Schutzkapazität des Produktes überstiegen haben könnten.

Tabelle 20: Vergleich von DNA-PF Werten Produkte Bissonauth vs. Produkte aus vorliegender Arbeit

	Produkt V. Bissonauth SPF 30	Nivea DNage SPF 30	Daylong ultra SPF 25
DNA-PF	1-2	3.97 (ELISA) 5.58 (FACS)	3.6 (ELISA) 5.1 (FACS)

Durch die speziellen Filterzusammensetzungen der Eigenformulierungen (reine UVB-Filter versus reine UVA-Filter versus Filterkombinationen) konnte zudem bestätigt werden, dass CPD hauptsächlich durch UVB-Strahlung entstehen.

Bei drei der fünf untersuchten Markern konnten *in vitro*-Testsysteme entwickelt und damit auch Sonnenschutzprodukte auf ihre Effektivität bei der Verhinderung eines Zellschadens untersucht werden. Im Gegensatz zu den bisher publizierten Arbeiten anderer Gruppen wurden verschiedene Produkte mit unterschiedlicher Schutzleistung (SPFs von 5 bis 50+) und unterschiedlichen Filterkombinationen getestet. Im Hinblick auf eine Klassifizierung der verschiedenen Produkte anhand ihrer SPFs waren hauptsächlich die UV-spezifischen CPD erfolgreich. Mit den Quantifizierungsmethoden für p38-MAPK und p53 war eine Unterscheidung von Produkten mit deutlich verschiedenen SPFs, wie zum Beispiel SPF 50+ gegen SPF 5, möglich. Dagegen konnte bei den DNA-Schäden mit dem sensitiven ELISA-Assay eine Trennung in sehr hoher/hohes SPF, mittlerer SPF und tiefer/sehr tiefer SPF erreicht werden.

Bei den CPD wurde zusätzlich zum ELISA eine Durchflusszytometer-Methode entworfen, welche die erhaltenen Resultate und Tendenzen, wenn auch mit geringerer Sensitivität, bestätigte. Diese direkte Gegenüberstellung der Resultate von zwei Assays eines Markers mit so vielen Testprodukten ist neu.

Was die Einführung einer relevanteren Kenngrösse als der SPF betrifft, so konnte weder in vorliegender Arbeit noch sonst in der Literatur bisher eine geeignete Alternative gefunden werden. In Kapitel 3.7 wurden die Schwierigkeiten bezüglich der SPF-Bestimmung bereits angesprochen. Mittels CPD-Quantifizierung gelingt zwar eine Klassifizierung der Sonnenschutzprodukte anhand ihrer SPFs, weshalb diese durchaus zusätzlich zum SPF zur Charakterisierung eines Produktes hinzugezogen werden kann. Es ist denkbar, das in Form eines DNA-PFs zu tun, sofern eine Vereinheitlichung von dessen Erfassung und Definition erreicht werden kann. Speziell mit Fokus auf den näheren Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Krebsentstehung, wäre ein solcher Zusatz wichtig und hilfreich. Genau wie der SPF sind die Dimere jedoch hauptsächlich bezeichnend für UVB-Strahlung. Das Kriterium einer umfassenden UV-Spezifität (UVA+UVB) der neuen Kenngrösse wird dadurch weiterhin nicht erfüllt.

Die Suche nach einem Parameter, der die Effizienz eines Sonnenschutzproduktes im UVA- und UVB-Bereich beschreibt und dabei noch die wichtigen Faktoren in der Carcinogenese berücksichtigt, bleibt auch in der Zukunft bestehen. Durch die Komplexität der Abläufe in Zellen nach UV-Einfluss dürfte es unmöglich sein, einen einzigen Marker zu finden, der allen diesen Reaktionen Rechnung trägt. Es steht jedoch

ausser Frage, dass der SPF den Entwicklungen und Erkenntnissen der letzten Jahre nicht mehr genügend Rechnung trägt und deshalb einem geeigneteren Parameter Platz machen sollte. Mit der Einführung des UVA-Logos gibt es zwar neben dem SPF nun auch Informationen zum Schutz im UVA-Bereich, trotzdem wäre die Quantifizierung der Schutzfunktion über den ganzen UV-Bereich (UVB+UVA) in einem einzigen Parameter wünschenswert.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Melanominzidenzrate weltweit zwischen 1998-2002.....	8
Abbildung 2:	Wellenlängenspektrum des Sonnenlichts (mit Relevanz für die Erde).....	9
Abbildung 3:	Eindringtiefe UV-Strahlung.....	11
Abbildung 4:	Schematischer Hautaufbau, Querschnitt.....	14
Abbildung 5:	Basaliom.....	16
Abbildung 6:	Spinaliom.....	16
Abbildung 7:	Melanom.....	17
Abbildung 8:	Melaninsynthese; DCT (DOPAchrom Tautomerase),TYRP1 (Tyrosinase-related Protein 1).....	18
Abbildung 9:	Absorptionsvergleich physikalische und chemische Filter.....	22
Abbildung 10:	Strukturformel und Absorptionsspektrum von Parsol.....	23
Abbildung 11:	Strukturformel und Absorptionsspektrum von Uvinul MC 80.....	23
Abbildung 12:	Strukturformel und Absorptionsspektrum von Tinosorb M.....	24
Abbildung 13:	Die verschiedenen Hauttypen mit ihren jeweiligen Merkmalen.....	25
Abbildung 14:	Offizielles UVA-Logo der EU-Behörde.....	26
Abbildung 15:	MAPK-Weg.....	29
Abbildung 16:	Übersicht über verschiedene Kaskaden nach UV-Exposition.....	29
Abbildung 17:	Apoptose-Wege.....	30
Abbildung 18:	Aufgaben von p53 im Zellkern.....	32
Abbildung 19:	Basenmodifikationen an Pyrimidinen durch UV.....	33
Abbildung 20:	Struktur in Lösung von humanem Interleukin 1 $\alpha$ (NMR).....	37
Abbildung 21:	Struktur in Lösung von humanem Interleukin 8 (NMR).....	38
Abbildung 22:	Struktur humane, unphosphorylierte p38 MAPK (Röntgendiffraktometrie).....	38
Abbildung 23:	Struktur von drei Domänen von p53; a Transaktivierungsdomäne gebunden an Mdm2, b Kristallstruktur der DNA-Bindungsdomäne, c Tetramerisierungsdomäne.....	39
Abbildung 24:	Entstehung von Cyclobutan Pyrimidin Dimeren.....	40
Abbildung 25:	Schematische Darstellung der Transmissionsmesspunkte pro PMMA-Platte.....	45
Abbildung 26:	Schematischer Aufbau Innenraum Suntest CPS+.....	48
Abbildung 27:	Spektrale Bestrahlungsstärken des Suntest CPS+ gemäss Kalibration April 2011.....	49
Abbildung 28:	Vergleich spektraler Bestrahlungsstärken vom Suntest CPS+ und der Sonne in Albuquerque und Melbourne.....	50
Abbildung 29:	Bestrahlungsanordnung.....	51
Abbildung 30:	Darstellungsart in Form von Dot Plots: A Forward Scatter lin. gegen Side Scatter lin.; B Density Plot; C Kanal 4 (7-AAD) gegen Kanal 1 (FITC).....	56
Abbildung 31:	Beispiel für eine Histogramm Plot Darstellung.....	56

Abbildung 32: Funktionsprinzip Sandwich-ELISA. ....	57
Abbildung 33: Funktionsprinzip des indirekten ELISA. ....	58
Abbildung 34: Laser Filterblock mit den fünf Farberfassungschanälen ECD, PC5, PC7, PE und FITC. ....	59
Abbildung 35: Schematischer Aufbau eines Zytometers. ....	59
Abbildung 36: Vitalität von HNK bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels MTT-Test. ....	67
Abbildung 37: Vitalität von HNK bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels Annexin V-FITC/7-AAD-Färbung. ....	68
Abbildung 38: Vitalität von HaCaT bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels MTT-Test ....	69
Abbildung 39: Vitalität von HaCaT bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels Annexin V-FITC/7-AAD-Färbung mit n=2 pro Mittelwert. ....	70
Abbildung 40: Interleukin 1 alpha Konzentrationen in HNK-Überständen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	71
Abbildung 41: Durchschnittliche Interleukin 1 alpha Konzentrationen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	72
Abbildung 42: Durchschnittliche Veränderungen des Interleukin 1 alpha Gehaltes bei einzelnen Bestrahlungsdosen im Bezug auf die Negativkontrolle. ....	72
Abbildung 43: Durchschnittliche Veränderungen des IL-1 alpha Gehaltes nach Zugabe von Benzalkoniumchlorid resp. Triethanolamin im Bezug auf die Negativkontrolle (n=6 in einem Versuch). Zum Vergleich rechts die Balken nach Bestrahlung mit 50 resp. 100 mJ/cm <sup>2</sup> . ....	73
Abbildung 44: Interleukin 8 Konzentrationen in HNK-Überständen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	76
Abbildung 45: Durchschnittliche Interleukin 8 Konzentrationen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	77
Abbildung 46: Durchschnittliche Veränderungen des IL-8-Gehaltes bei einzelnen Bestrahlungsdosen im Bezug auf die Negativkontrolle. ...	77
Abbildung 47: Menge an phosphoryliertem p38 relativ zu unbestrahlten Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten. ....	79
Abbildung 48: Signal-Overlay von repräsentativ ausgewählten Proben der Dosisabhängigkeitsmessungen von p38. ....	80
Abbildung 49: Durchschnittliche Veränderung der p38 Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	81
Abbildung 50: Faktorenvergleich zwischen dem FACS-Assay (lila Balken) und dem ELISA-Assay (grüne Balken) bei 200 und 828 mJ/cm <sup>2</sup> . ....	81
Abbildung 51: Menge an aktiver p38-MAPK bei 200 mJ/cm <sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten. ....	82
Abbildung 52: Prozentualer p53-Protein Gehalt nach verschiedenen Inkubationszeiten (n=2) ....	85
Abbildung 53: Durchschnittliche Veränderung des p53-Proteingehaltes relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis. ....	86
Abbildung 54: Detektierte p53-Proteinkonzentrationen mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten nach Bestrahlung mit 100 mJ/cm <sup>2</sup> . ....	87

Abbildung 55: Menge an p53-Protein bei 100 mJ/cm <sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten.....	88
Abbildung 56: Prozentuale Menge an CPD nach verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt mittels ELISA (n=2).....	91
Abbildung 57: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels ELISA.....	92
Abbildung 58: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei 828 mJ/cm <sup>2</sup> nach verschiedenen Inkubationszeiten.....	93
Abbildung 59: CPD bei 828 mJ/cm <sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten, ELISA-Assay.....	94
Abbildung 60: Prozentuale Menge an CPD nach verschiedenen Inkubationszeiten bestimmt mittels FACS.....	95
Abbildung 61: Durchschnittliche Veränderung der CPD-Menge relativ zu unbestrahlten Zellen bei steigender Bestrahlungsdosis bestimmt mittels FACS.....	96
Abbildung 62: Signal-Overlay repräsentativ ausgewählter Proben von vier Sonnenschutzprodukten der CPD-Quantifizierung mittels FACS.....	97
Abbildung 63: CPD bei 828 mJ/cm <sup>2</sup> mit verschiedenen Sonnenschutzprodukten, FACS-Assay.....	98
Abbildung 64: Gruppierungen von Sonnenschutzprodukten, deren CPD-Mengen sich nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden lassen. Produkte innerhalb eines Kreises unterscheiden sich nicht signifikant.....	101
Abbildung 65: Gruppierungen von Sonnenschutzprodukten, deren CPD-Mengen sich nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden lassen. Produkte innerhalb eines Kreises unterscheiden sich nicht signifikant.....	102



## Quellenverzeichnis Abbildungen

- Abb.1 PDF Krebs in der Schweiz Stand und Entwicklung von 1983 bis 2007 Abbildung G 4.4.6 Seite 39; In Quellenverzeichnis (1)  
Quelle: NICER, KKR, CI-Five Vol.9
- Abb.2 Broschüre Sonnenschutz der schweizerischen Krebsliga 2009 Abbildung Seite 4
- Abb.3 <http://www.unserehaut.de/php/popup/hautquerschnitt.html>
- Abb.4 Buch Der Körper des Menschen von A. Faller, 13. Auflage 1999, Seite 665  
Abbildung 16.1
- Abb.5 <http://www.hautarzt-basel.ch/basaliom.html>
- Abb.6 Ausschnitt aus Abbildung von  
<http://martinhempel.ch/hauterkrankungen/hautkrebs/spinaliom/index.html>
- Abb.7 Ausschnitt aus Abbildung 4 von <http://melanoma.at/>
- Abb.8 Modifizierte Figure 1 von  
[http://www.nature.com/jid/journal/v127/n4/fig\\_tab/5700683f1.html](http://www.nature.com/jid/journal/v127/n4/fig_tab/5700683f1.html)
- Abb.9 [http://www.mycpss.com/critical\\_wavelength.php](http://www.mycpss.com/critical_wavelength.php) (2011)
- Abb.10 <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/4-tert-BUTYL-4'-METHOXY-DIBENZOYLMETHANE.htm> und Absorptionsspektrum Spirig
- Abb.11 [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_DE\\_CB6430971.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB6430971.htm) und Absorptionsspektrum Spirig
- Abb.12 Von Technical Datasheet Tinosorb M Broad-spectrum UV absorber Seite 2 und Absorptionsspektrum Spirig
- Abb.13 Broschüre Sonnenschutz der schweizerischen Krebsliga 2009 Abbildung Seiten 10 und 11
- Abb.14 <http://de.wikipedia.org/wiki/Sonnencreme>
- Abb.15 Eigene Darstellung, Anstoss von Paper L. Rittié 2002 Seite 708 und KEGG
- Abb.16 Aus Z. Assefa 2005 Seite 101 Fig. 2
- Abb.17 [http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/felderhoff-mueser-ursula-2003-12-04/HTML/felderhoff-mueser.html\\_537047e6.png](http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/felderhoff-mueser-ursula-2003-12-04/HTML/felderhoff-mueser.html_537047e6.png)
- Abb.18 Eigene Darstellung

- Abb.19 Modifiziert von [http://www.cosmobio.co.jp/export\\_e/products/antibodies/products\\_cac\\_20080404.asp?entry\\_id=3597](http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/antibodies/products_cac_20080404.asp?entry_id=3597)
- Abb.20 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=82998>
- Abb.21 <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1IL8>
- Abb.22 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi> (2011)
- Abb.23 Modifiziert von <http://afallahi.com/myresearch/gipson3.htm>
- Abb.24 Eigene Darstellung mit Elementen von [http://sitemaker.umich.edu/gemini/search\\_images&findAll=true&mode=list&recordID=1119391](http://sitemaker.umich.edu/gemini/search_images&findAll=true&mode=list&recordID=1119391)
- Abb.25 Eigene Darstellung
- Abb.26 Modifiziert von Suntest Xenon-Prüfgeräte Prospekt von Atlas, Seite 6
- Abb.27 Aus Exceltabelle des Kalibrierungsprotokolls 2011 von optocal
- Abb.28 Eigene Darstellung
- Abb.29 Eigene Darstellung
- Abb.30 Spirig Pharma AG, Egerkingen
- Abb. 31 Spirig Pharma AG, Egerkingen
- Abb.32 Modifiziert von <http://de.wikipedia.org/wiki/ELISA>
- Abb.33 Eigene Darstellung, Anstoss von <http://de.wikipedia.org/wiki/ELISA>
- Abb.34 Skript Grundlagen der Durchflusszytometrie Teil 1, Einführung und Überblick von Beckman Coulter von A. Böhmler und L. Gnägi Weber, Seite 36
- Abb.35 Skript Grundlagen der Durchflusszytometrie Teil 1, Einführung und Überblick von Beckman Coulter von A. Böhmler und L. Gnägi Weber, Seite 4
- Abb.36-65 Eigene Darstellungen

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiele für extrazelluläre Marker .....	35
Tabelle 2:	Beispiele für zytosolische Marker .....	36
Tabelle 3:	Beispiele für Marker im Zellkern .....	36
Tabelle 4:	Zusammenstellung der verwendeten Sonnenschutzprodukte.....	44
Tabelle 5:	Schutzkategorien des SPF .....	45
Tabelle 6:	In den Vorversuchen erarbeitete Inkubationszeiten für die jeweiligen Marker, entsprechend dem Zeitpunkt maximaler Reaktion auf UV. ....	52
Tabelle 7:	Verwendete Flüssigkeitsmengen für die Kultur der humanen Keratinozyten .....	53
Tabelle 8:	Verwendete Flüssigkeitsmengen für die Kultur der HaCaT-Zellen ...	54
Tabelle 9:	Übersicht über die verwendeten Testsysteme bei den jeweiligen Markern. ....	66
Tabelle 10:	Übersicht über die Resultate von IL-1 alpha Bestimmungen anderer Forschungsgruppen. ....	75
Tabelle 11:	P-Werte von ungepaarten, zweiseitigen t-Tests aus Vergleichen der Positivkontrolle mit einzelnen Sonnenschutzprodukten.....	82
Tabelle 12:	Mittelwerte der aktiven p38 nach Bestrahlung mit 200 mJ/cm <sup>2</sup> . ....	83
Tabelle 13:	P-Werte eines Vergleiches der verschiedenen Sonnenschutz- produkte mittels t-Test. ....	83
Tabelle 14:	Aus Grafik abgelesene Prozentwerte der Veränderung der p53- Konzentrationen relativ zu unbestrahlten Zellen nach verschiedener Bestrahlungsdauer, L. Marrot et al 2010.....	89
Tabelle 15:	Ausschnitt aus Tabelle 1 der Arbeit von H. Bäckvall et al 2002 <sup>75</sup> ....	90
Tabelle 16:	Anzahl CPD-positive Zellen (%) in Kinetikversuchen Katiyar et al. (2000) <sup>82</sup> .....	99
Tabelle 17:	Anzahl CPD-positiver Zellen (%) in Kinetikversuchen Mabruk et al. (2009) <sup>83</sup> .....	100
Tabelle 18:	Verschiedene Kenngrößen der Sonnenschutzprodukte mit der Rangierung (rote Werte).....	103
Tabelle 19:	DNA-PF-Werte verschiedener Formulierungen aus S. Mouret et al. (2011) <sup>58</sup> .....	108
Tabelle 20:	Vergleich von DNA-PF Werten Produkte Bissonauth vs. Produkte aus vorliegender Arbeit .....	110

## 5. Anhang

### Material

#### Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Absauganlage	Vacunsafe comfort	IBS Integra Biosciences, Zizers CH
Belichtungsgerät	Suntest CPS+	Atlas, Chicago USA
Drucker (Waage)	LC-P45	Mettler Toledo, Nänikon CH
Drucker (Biophotometer)	Thermo Printer DPU-414-30-B	Seiko Instruments Inc., Torrance USA
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500 MPL	Beckman Coulter, Fullerton USA
Inkubator	NU 4850E	NuAire Inc., Plymouth USA
Inkubator	6101H-1NEW	Napco
Laminar Flow	AURA VE 190	Ehret, Emmendingen D
Laminar Flow	Scanlaf Safe 1800	Scanlaf, Lynge DK
Lichtmikroskop	DM IL	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar D
Magnetrührer/Heizplatte	REC-G	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br. D
Mikrozentrifuge	ScanSpeed mini	LaboGene ApS, Lynge DK
pH-Meter	Expandable ion analyzer EA 940	Orion Research Inc., Boston USA
Photometer (ELISA Reader)	µQuant Microplate Spectrometer MQX 200	Bio-Tek Instruments Inc., Winooski USA
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg D
Spektrometer	Labsphere ultraviolet transmittance analyzer UV-2000S	Labsphere Inc., North Sutton USA
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg D
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 1028H	Bandelin electronic, Berlin D
Vortex	Vortex-Genie 2 G560E	Scientific Industries Inc., New York USA
Waage	AT460 Delta Range	Mettler Toledo, Nänikon CH
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach D
Wasserbad	Thermomix 1441	B. Braun,
Zellzählgerät	TC 10 automated cell counter	Bio Rad Laboratories, Hercules CA
Zentrifuge	Biofuge fresco Heraeus Instruments	Kendro Laboratory Products, Osterode D
Zentrifuge	Megafuge 1.0 Heraeus Instruments	Kendro Laboratory Products, Osterode D

Substanzen

Substanz	Qualität	Katalognummer	Hersteller
Albumin, bovine serum	Minimum 98%	A7030	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Benzalkoniumchlorid	purum	12060	Fluka Chemie AG, Basel CH
Cell Lab SC Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Alexa Fluor 488	Clone 28B10	A88932	Beckman&Coulter Inc., Brea USA
CertiPUR Pufferlösung	pH 4.01	199001	Merck KGaA, Darmstadt D
CertiPUR Pufferlösung	pH 7.00	199002	Merck KGaA, Darmstadt D
CertiPUR Pufferlösung	pH 9.00	199003	Merck KGaA, Darmstadt D
Complete Mini, EDTA-freie, Protease Inhibitor Cocktail Tabletten		11 836 170 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim D
Daylong SPF15		Lot. F024	Eigenproduktion (Spirig)
Daylong extreme Optimierung		K416-2/047.000	Eigenproduktion (Spirig)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Pulver)	Low glucose	D2902	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (flüssig)	Low glucose	D6046	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS), GIBCO	(-)	14090-326	Invitrogen Ltd., Paisley UK
DPBS, GIBCO	(+)	14040-224	Invitrogen Ltd., Paisley UK
DPBS, GIBCO	10x (-)	14200-091	Invitrogen Ltd., Paisley UK
Essigsäure	Puriss. p.a.	45730	Fluka Chemie AG, Basel CH
Ethanol absolut	HPLC	05250602	Biosolve B.V., Valkenswaard NL
Ethanol 96% v/v	analytical grade, ACS, Ph. Eur., USP	ET00142500	Scharlab S.L. the lab sourcing group, Barcelona E
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz dihydrat (EDTA)	99%+	E5134	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D

Foetales Rinderserum, GIBCO	EU approved Origin	10106-151	Fluka Chemie AG, Basel CH
Formalin Lösung neutral gepuffert 10%		HT501128	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Glycerol	>99%	G-8773	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Keratinocyten Basal Medium 2		C-20211	PromoCell, Heidelberg D
Methanol	HPLC	C17C11X	Lab-Scan Analytical Sciences, Bangkok TH
Monoclonal anti-thymine dimer clone H3	Purified mouse Immunoglobulin	T1192	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent		78503	Thermo Scientific, Rockfort USA
Natriumorthovanadat		450243	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Nuclease-freies Wasser		129114	Qiagen GmbH, Hilden D
Pen Strep (Aliquots), GIBCO		15140-122	Invitrogen Ltd., Paisley UK
Phosphate buffered Saline (PBS) mit EDTA			Eigenherstellung
Phospho-p38 MAP Kinase (T180/Y182) Alexa Fluor 488		A24063	Beckman&Coulter Inc., Brea USA
Polyoxyethylensorbitan monolaurat (Tween 20)		P-5927	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D
Probumin (BSA)	Diagnostic grade	82-045-1	Millipore, Kankakee USA
Protaminsulfat vom Lachs	Grade X	P4020	Sigma-Aldrich Chemie AG, Steinheim D
Rabbit F(ab') <sub>2</sub> Anti-Mouse IgG (H+L)-FITC		732878	Beckman&Coulter Inc., Brea USA
Salzsäure rauchend 37%	puriss p.a.	84422	Fluka Chemie AG, Basel CH
Salzsäure 2 mol/L	volumetric solution	35327	Fluka Chemie AG, Basel CH
Salzsäure 1M	Volutmetric Solution Reag. Ph. Eur.	35328	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze D
Supplement-Pack/Keratinocyte Growth Medium 2		C-39011	PromoCell, Heidelberg D

TC 10 Trypanblau Färbung 0.4%		1450013	Bio Rad Laboratories, Hercules CA
TNS (Trypsin neutralizing solution) 0.05%		C-41100	PromoCell, Heidelberg D
Triethanolamin		902505	BASF, Ludwigshafen D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Puffer)	Ultra	93362	Fluka Chemie AG, Basel CH
Triton X-100		93418	Fluka Chemie AG, Basel CH
Trypanblau 0.2% in PBS(-)			Eigenherstellung 18.4.08 RU
Trypsin/EDTA 0.04%/0.03%		C-41000	PromoCell, Heidelberg D
Trypsin/EDTA 2 0.025%/0.01%		C-41002	PromoCell, Heidelberg D
Trypsin, GIBCO 10x; 2,5%		15090-046	Invitrogen Ltd., Paisley UK
Wasser	Ultra pure		Eigenproduktion
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin flüssig Substrat	Supersensitive for ELISA	T4444	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim D

#### Laborzubehör/ sonstiges Material

Gegenstand	Spezifikation	Katalognummer	Hersteller
Corning® Clear Flat Bottom Polystyrene TC-Treated Microplates	96 Well, 5 per Bag, with Lid, Sterile	3598	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell USA
Corning® Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap	75cm <sup>2</sup>	430641	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell USA
Corning® Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap	150cm <sup>2</sup>	430825	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell USA
Corning® Filter System	500ml, 0.22µm PES, sterilizing, low protein binding Sterile, 1 System per Bag	431097	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell USA
Costar® Clear TC-Treated Multiple Well Plates	6 Well, Bulk Packed, Sterile	3506	Corning Incorporated Life Sciences, Lowell USA
Einmal-Küvetten Plastibrand	1,5ml halbmikro PS 12,5 x 12,5 x	7590 15	Brand GmbH+ Co KG,

	45mm		Wertheim D
NUNC Culture Dish Nunclon	35x10mm	153066	Thermo Fisher Scientific, Roskilde DK
NUNC F96 MicroWell™ Plates	96 Well, MaxiSorp, Pinchbar Design Polystyrene. Ex- ternal dimensions 128 x 86 mm	439454	Thermo Fisher Scientific, Roskilde DK
NUNC Multidish Nunclon	48 Well	150687	Thermo Fisher Scientific, Roskilde DK
Plexiglas (PMMA)- Platten	Größen 5x5cm oder 4x4cm		Schönberg GmbH&Co. KG, Hamburg- Schnelsen D
TC 10 System Sample Slide	Dual Chamber	145-0011	Bio Rad Labora- tories, Hercules CA
Test Tube (Flow Cy- tometer)	12 x 75 mm, Blue (pkg of 250)	2523749	Beckman Coul- ter, Inc., Brea USA
UVette	220-1600nm, 50- 2000µl, RNase- /DNA-/Protein-free	952010051	Eppendorf AG, Hamburg D

### Zellen

Zellart	Ausgangspassage	Katalognummer	Hersteller
Human adult low calcium tempera- ture keratinocytes (HaCat)			Prof. Fusening, Heidelberg D
Normal Human Epidermal Kerati- nocytes foreskin (NHEK)	Passage nach Auf- tauen P2; > 500,000 cryopre- served cells / 1 ml Cryo-SFM,	C-12001	PromoCell, Hei- delberg D



ELISA- und andere Kits

<b>Kit</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
Annexin V-FITC/ 7-AAD Kit	IM3614	Beckman&Coulter Inc., Brea USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	11 465 007 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim D
Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	23236	Thermo Scientific, Rockfort USA
DNeasy Blood&Tissue Kit (50 und (250)	69504	Qiagen GmbH, Hilden D
DuoSet Human IL-1 $\alpha$ /IL-1F1	DY200	R&D Systems, Minneapolis USA
ELISA Development Kit Human IL-8	900-K18	PeptoTech EC Ltd, London UK
Quick Start Bradford Protein Assay Kit 3	500-0203	Bio Rad Laboratories, Hercules CA
p53 pan ELISA (96 tests)	11 828 789 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim D
p38-MAPK (pTpY180/182) Immunoassay Kit	KHO0071	Invitrogen Ltd Paisley UK

## Verwendete Produkte mit ihren Inhaltsstoffen

### Daylong actinica SPF 50+

- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Ethylhexyltriazon (EHT)
- Isoamyl-p-methoxycinnamat (IMC)
- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- Methylene-bis-benzotriazolyltetramethylbutylphenol (MBBT)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)

Tinosorb S  
Uvinul T 150  
Neo Heliopan E1000  
Uvinul MC80  
Tinosorb M  
Neo Heliopan 357



### Ladival Sonnenschutz Gel, Allergische Haut SPF 50+

- Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)
- Octocrylen (OC)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)
- Diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoat (DHHB)
- Diethylhexylbutamidotriazon (DBT)
- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Phenylbenzimidazol Sulfonsäure (PBSA)
- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)

Eusolex T2000  
Neo Heliopan 303  
Neo Heliopan 357  
Uvinul A Plus  
Uvasorb HEB  
Tinosorb S  
Neo Heliopan Hydro  
Uvinul MC80



### Ambre Solaire delial, UVSensitiv Sonnenmilch SPF 50+

- Octocrylen (OC)
- Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)
- Drometrisoltrisiloxan (DTS)
- Terephthalylidencampher Sulfonsäure (TDSA)

Neo Heliopan 303  
Eusolex T2000  
Neo Heliopan 357  
Mexoryl XL  
Mexoryl SX



### Daylong Kids SPF 50

- Diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoat (DHHB)
- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Methylene-bis-benzotriazolyltetramethylbutylphenol (MBBT)
- Ethylhexyltriazon (EHT)

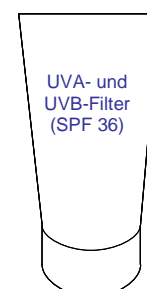
Uvinul A Plus  
Uvinul MC80  
Tinosorb S  
Tinosorb M  
Uvinul T 150



### Testformulierung Eigenherstellung UVA+UVB-Filter SPF 36

- Diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoat (DHHB)
- Diethylhexylbutamidotriazon (DBT)
- Ethylhexyltriazon (EHT)

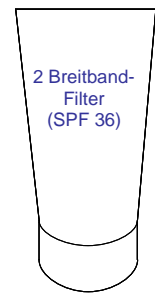
Uvinul A Plus  
Uvasorb HEB  
Uvinul T 150



**Testformulierung** Eigenherstellung **Breitbandfilter** SPF 36

- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Benzophenon-4 (BP4)

Tinosorb S  
Uvinul MS-40



**Sport Sunscreen**, Cancer Council Australia SPF 30+

- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- Zinkoxid (ZnO)
- 4-Methylbenzylidencampher (MBC)

Uvinul MC80  
Neo Heliopan MBC



**Hamilton Optimal** SPF 30+

- Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)
- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- 4-Methylbenzylidencampher (MBC)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)

Eusolex T2000  
Uvinul MC80  
Neo Heliopan MBC  
Neo Heliopan 357



**Nivea Sun DNAge** Anti-Age Face Sun cream SPF 30

- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)
- Octocrylen (OC)
- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Titandioxid (TiO<sub>2</sub>)
- Diethylhexylbutamidotriazon (DBT)
- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)

Neo Heliopan 357  
Neo Heliopan 303  
Tinosorb S  
Eusolex T2000  
Uvasorb HEB  
Uvinul MC80



**Daylong ultra** SPF 25

- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)
- bis-Ethylhexyloxyphenolmethoxyphenyltriazin (BEMT)
- Ethylhexyltriazon (EHT)

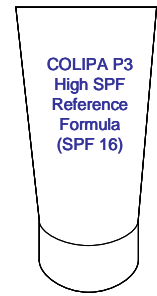
Uvinul MC80  
Neo Heliopan 357  
Tinosorb S  
Uvinul T 150



**COLIPA High SPF Reference Sunscreen P3 SPF 16**

- Ethylhexylmethoxycinnamat (EHMC)
- Butylmethoxydibenzoylmethan (BMDM)
- Phenylbenzimidazol Sulfonsäure (PBSA)

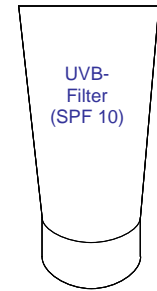
Uvinul MC80  
Neo Heliopan 357  
Neo Heliopan Hydro



**Testformulierung Eigenherstellung UVB-Filter SPF 10**

- Diethylhexylbutamidotriazon (DBT)
- Ethylhexyltriazon (EHT)

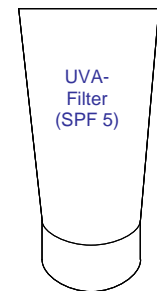
Uvasorb HEB  
Uvinul T 150



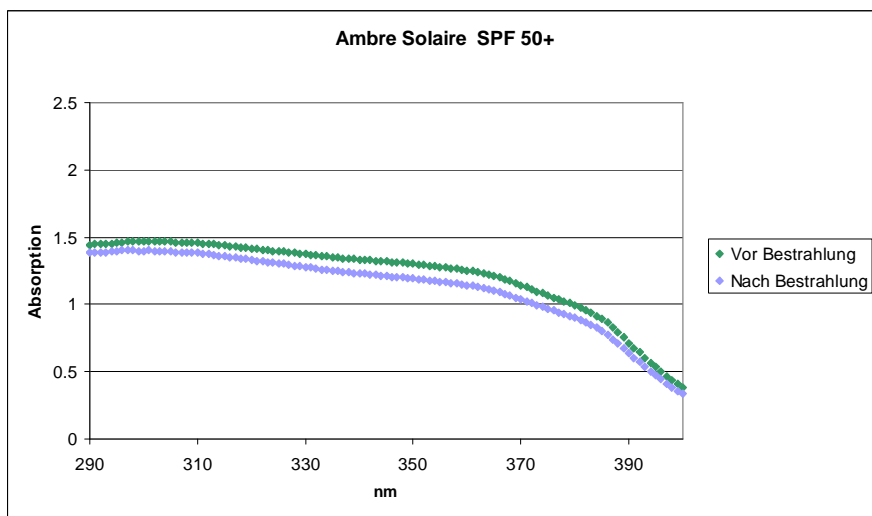
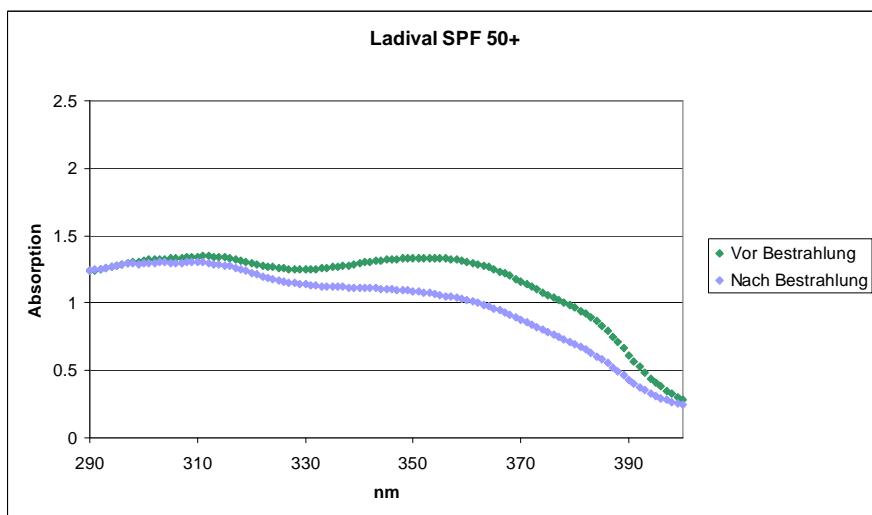
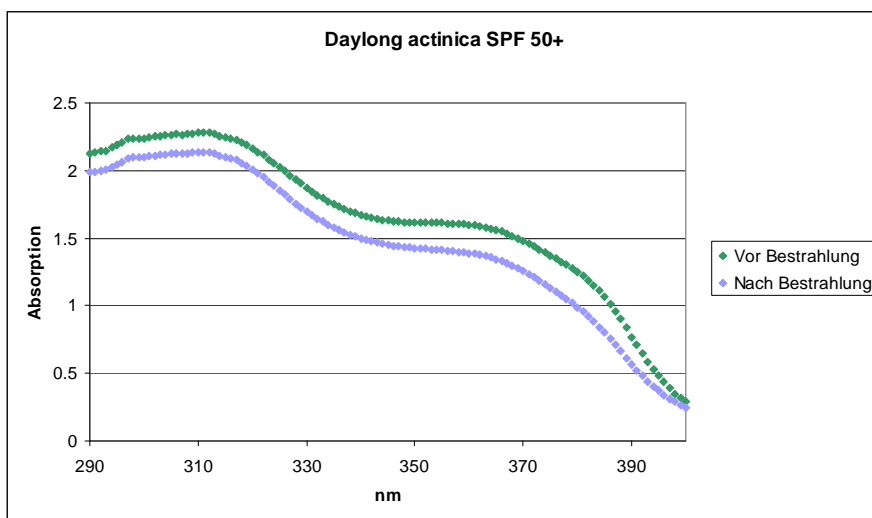
**Testformulierung Eigenherstellung UVA-Filter SPF 5**

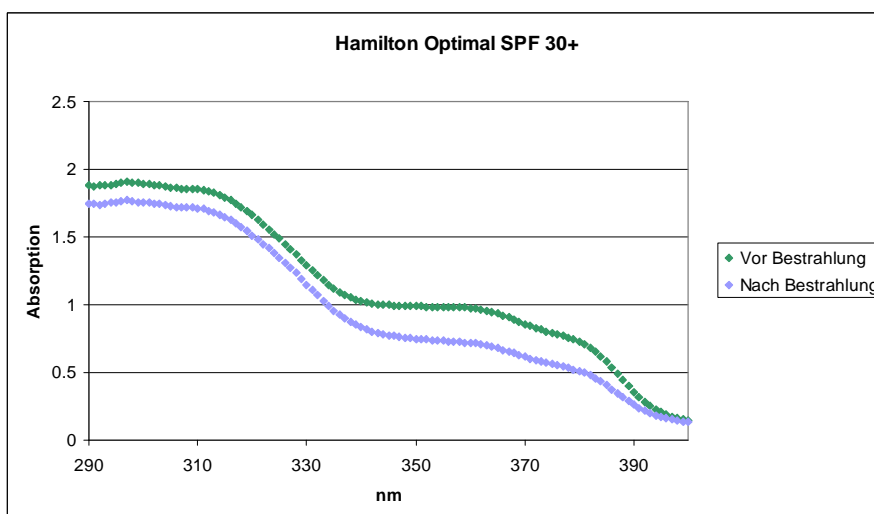
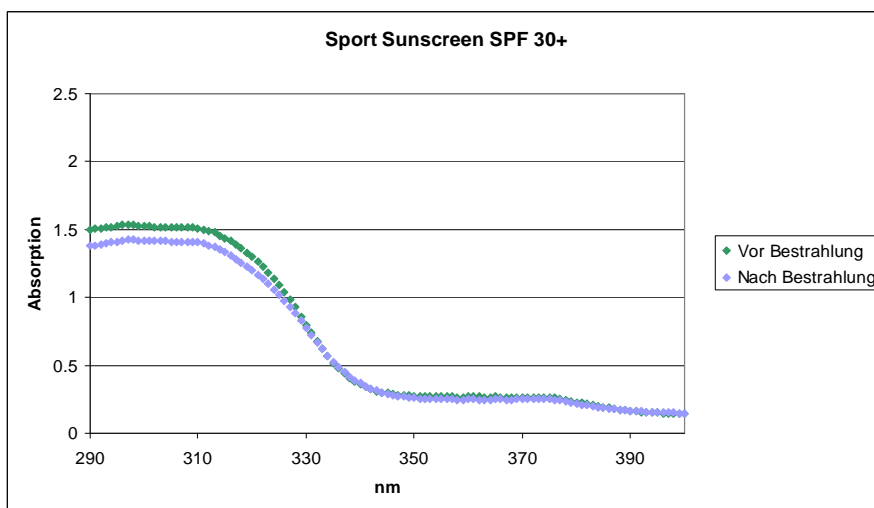
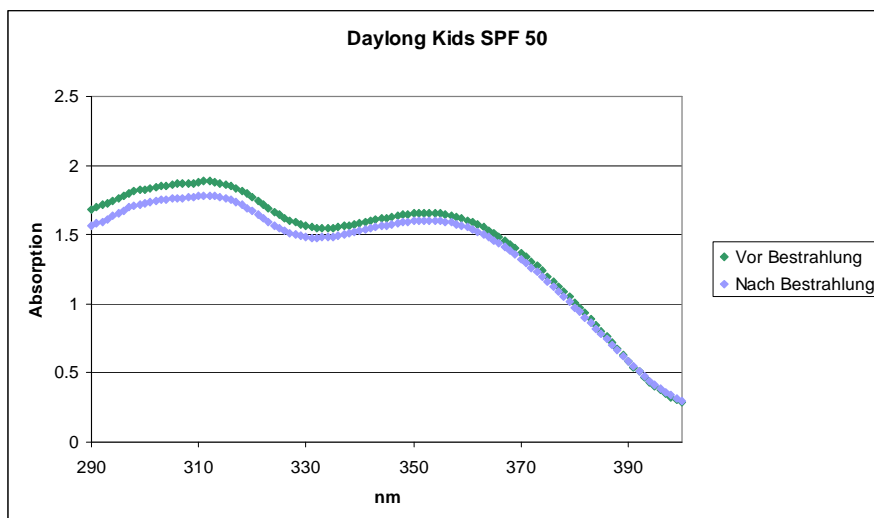
- Diethylaminohydroxybenzoylhexylbenzoat (DHHB)

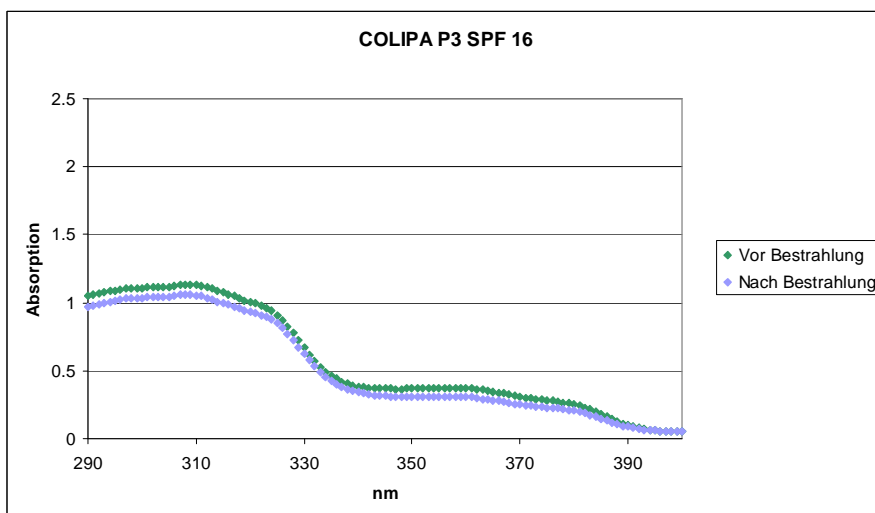
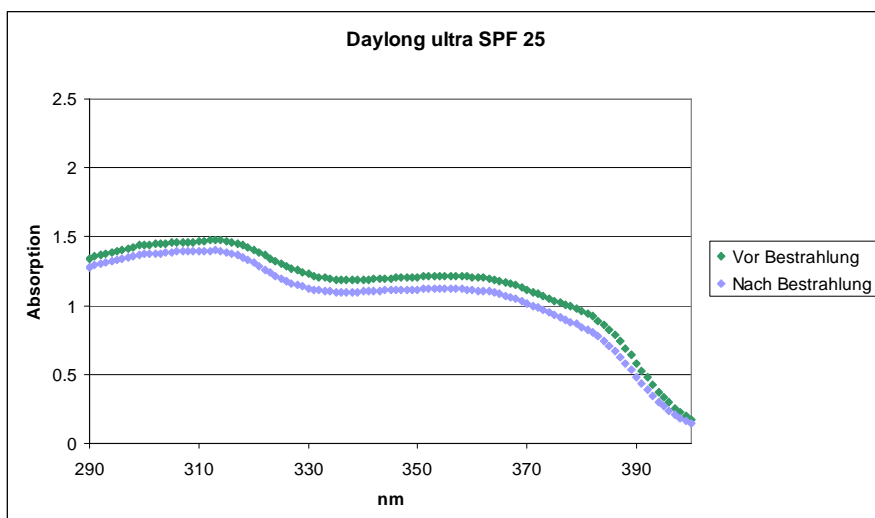
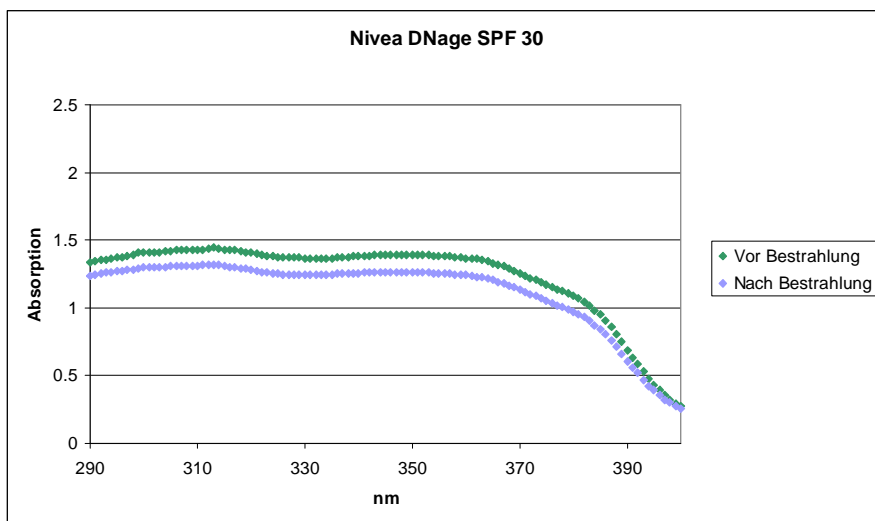
Uvinul A Plus

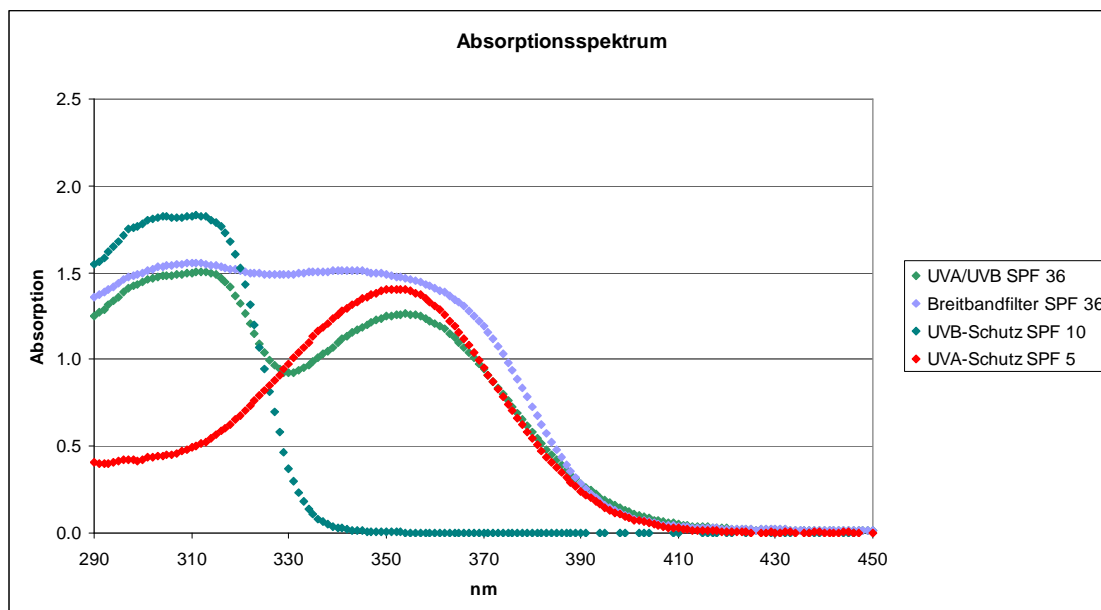


## Absorptionsdiagramme der Produkte bei der UVA-PF-Bestimmung











## P-Werte aus den t-Tests zwischen jeden einzelnen Sonnenschutzprodukten

### FACS

FACS	Ladival	Ambre Solaire	Daylong Kids	UVA+UVB-Filter	Breitband-filter	Sport Sunscreen	Hamilton Optimal	Nivea Dnage	Daylong ultra	COLIPA P3	UVB-Filter	UVA-Filter
Daylong actinica	<b>P=0.4192</b>	<b>P=0.6299</b>	<b>P=0.9137</b>	<b>P=0.7428</b>	<b>P=0.3901</b>	<b>P=0.5775</b>	<b>P=0.1038</b>	<b>P=0.2369</b>	<b>P=0.0516</b>	P<0.0001	<b>P=0.3954</b>	P<0.0001
Ladival		<b>P=0.8408</b>	<b>P=0.2252</b>	<b>P=0.2511</b>	<b>P=0.0957</b>	<b>P=0.3717</b>	<b>P=0.2724</b>	<b>P=0.1553</b>	P=0.0263	P<0.0001	<b>P=0.1085</b>	P<0.0001
Ambre Solaire			<b>P=0.5032</b>	<b>P=0.4390</b>	<b>P=0.2164</b>	<b>P=0.4382</b>	<b>P=0.3235</b>	<b>P=0.1831</b>	P=0.0370	P<0.0001	<b>P=0.2246</b>	P<0.0001
Daylong Kids				<b>P=0.7642</b>	<b>P=0.3403</b>	<b>P=0.5904</b>	P=0.0214	<b>P=0.2379</b>	P=0.0475	P<0.0001	<b>P=0.3551</b>	P<0.0001
UVA+UVB-Filter					<b>P=0.5863</b>	<b>P=0.6838</b>	<b>P=0.0557</b>	<b>P=0.2814</b>	<b>P=0.0670</b>	P<0.0001	<b>P=0.5823</b>	P<0.0001
Breitband-filter						<b>P=0.8789</b>	P=0.0192	<b>P=0.3709</b>	<b>P=0.1028</b>	P<0.0001	<b>P=0.9740</b>	P<0.0001
Sport Sunscreen							<b>P=0.2241</b>	<b>P=0.5156</b>	<b>P=0.2515</b>	P=0.0030	<b>P=0.8928</b>	P<0.0001
Hamilton Optimal								<b>P=0.1006</b>	P=0.0141	P<0.0001	P=0.0248	P<0.0001
Nivea Dnage									<b>P=0.7270</b>	P=0.0304	<b>P=0.3802</b>	P<0.0001
Daylong ultra										P=0.0221	<b>P=0.1092</b>	P<0.0001
COLIPA P3											P=0.0001	P<0.0001
UVB-Filter												P<0.0001

### ELISA

ELISA	Ladival	Ambre Solaire	Daylong Kids	UVA+UVB-Filter	Breitband-filter	Sport Sunscreen	Hamilton Optimal	Nivea Dnage	Daylong ultra	COLIPA P3	UVB-Filter	UVA-Filter
Daylong actinica	<b>P=0.0049</b>	<b>P=0.0008</b>	<b>P=0.0138</b>	<b>P=0.1073</b>	<b>P=0.0166</b>	<b>P=0.0149</b>	<b>P=0.9005</b>	<b>P=0.0056</b>	<b>P=0.0003</b>	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Ladival		<b>P=0.4879</b>	<b>P=0.0847</b>	<b>P=0.0158</b>	<b>P=0.1132</b>	<b>P=0.6912</b>	<b>P=0.0051</b>	<b>P=0.3421</b>	<b>P=0.1031</b>	P<0.0001	<b>P=0.1786</b>	P=0.0006
Ambre Solaire			<b>P=0.1205</b>	<b>P=0.0075</b>	<b>P=0.1865</b>	<b>P=0.3290</b>	<b>P=0.0011</b>	<b>P=0.1310</b>	<b>P=0.0179</b>	P<0.0001	<b>P=0.3357</b>	P=0.0003
Daylong Kids				<b>P=0.1407</b>	<b>P=0.8529</b>	<b>P=0.0917</b>	<b>P=0.0167</b>	<b>P=0.0355</b>	<b>P=0.0032</b>	P<0.0001	<b>P=0.2748</b>	P=0.0001
UVA+UVB-Filter					<b>P=0.1265</b>	<b>P=0.0296</b>	<b>P=0.1289</b>	<b>P=0.0117</b>	<b>P=0.0007</b>	P<0.0001	P=0.0047	P<0.0001
Breitband-filter						<b>P=0.1117</b>	<b>P=0.0189</b>	<b>P=0.0435</b>	<b>P=0.0045</b>	P<0.0001	<b>P=0.4340</b>	P=0.0002
Sport Sunscreen							<b>P=0.0131</b>	<b>P=0.6100</b>	<b>P=0.3055</b>	P=0.0007	<b>P=0.1640</b>	P=0.0013
Hamilton Optimal								<b>P=0.0056</b>	<b>P=0.0003</b>	P<0.0001	P=0.0002	P<0.0001
Nivea Dnage									<b>P=0.6581</b>	<b>P=0.0020</b>	<b>P=0.0607</b>	P=0.0025
Daylong ultra										<b>P=0.0010</b>	<b>P=0.0050</b>	<b>P=0.0024</b>
COLIPA P3											P<0.0001	<b>P=0.1628</b>
UVB-Filter												P=0.0002

Die Produktvergleiche mit den P-Werten in den blau hinterlegten Feldern ergaben in einem t-Test mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha=5\%$  keinen signifikanten Unterschied zwischen den jeweils getesteten Sonnenschutzprodukten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Bundesamt für Statistik, National Institute for Cancer Epidemiology and Registration & Schweizer Kinderkrebsregister. Krebs in der Schweiz, Stand und Entwicklung von 1983-2007. 1-96.2011.  
Ref Type: Generic
2. Polefka, T. G., Meyer, T. A., Agin, P. P. & Bianchini, R. J. Effects of solar radiation on the skin. *J. Cosmet. Dermatol.* 11, 134-143 (2012).
3. Svobodova, A., Walterova, D. & Vostalova, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 150, 25-38 (2006).
4. Griffiths, H. R., Mistry, P., Herbert, K. E. & Lunec, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 35, 189-237 (1998).
5. de Gruijl, F. R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol* 15, 316-320 (2002).
6. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 298-308 (2004).
7. Roberts, J. E. Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *Eye Contact Lens* 37, 246-249 (2011).
8. Beisert, S. & Loser, K. Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 84, 29-34 (2008).
9. Ulrich, C. *et al.* Prevention of non-melanoma skin cancer in organ transplant patients by regular use of a sunscreen: a 24 months, prospective, case-control study. *Br. J. Dermatol.* 161 Suppl 3, 78-84 (2009).
10. Mutschler, E. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, (2001).
11. Faller, A. & Schünke, M. *Der Körper des Menschen.: Einführung in Bau und Funktion.* Thieme, (1999).
12. Löffler, G. & Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer, (2002).
13. Kindl, G. & Raab, W. *Licht und Haut: Bräunung, Lichtschutz, Pflege : ein Leitfaden für die Beratung in der Praxis.* Govi-Verl., (1988).
14. Sutherland, B. M. *et al.* Repair of cyclobutyl pyrimidine dimers in human skin: variability among normal humans in nucleotide excision and in photorepair. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18, 109-116 (2002).
15. Hoffmann, K., Laperre, J., Avermaete, A., Altmeyer, P. & Gambichler, T. Defined UV protection by apparel textiles. *Arch. Dermatol.* 137, 1089-1094 (2001).
16. Wamer, W. G., Yin, J. J. & Wei, R. R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 851-858 (1997).
17. Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L. & Kriehuber, R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology* 296, 27-36 (2012).

18. Burnett, M. E. & Wang, S. Q. Current sunscreen controversies: a critical review. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 27, 58-67 (2011).
19. Loden, M. *et al.* Sunscreen use: Controversies, challenges and regulatory aspects. *Br. J. Dermatol.* (2011).
20. Janjua, N. R., Kongshoj, B., Andersson, A. M. & Wulf, H. C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22, 456-461 (2008).
21. Schlumpf, M. *et al.* Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *Int. J. Androl* 31, 144-151 (2008).
22. McKinlay, A. F. & Diffey, B. L. A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. *CIE-Journal* 6, 17-22 (1987).
23. Colipa, CTFA SA, JCIA & CTFA International Sun Protection Factor (SPF) test method. *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* (2006).
24. Fourtanier, A., Moyal, D. & Seite, S. UVA filters in sun-protection products: regulatory and biological aspects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 81-89 (2012).
25. Meloni, M., Farina, A. & de, S. B. Molecular modifications of dermal and epidermal biomarkers following UVA exposures on reconstructed full-thickness human skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 439-447 (2010).
26. COLIPA In vitro Photoprotection Methods Task Force Method for in vitro determination of UVA protection. *Colipa Guideline 2011* (2011).
27. Surber, C., Pittelkow, M. & Lautenschlager, S. Photoprotection in transplant recipients. *Curr. Probl. Dermatol.* 43, 171-196 (2012).
28. Assefa, Z., Van, L. A., Garmyn, M. & Agostinis, P. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1755, 90-106 (2005).
29. Gross, S. *et al.* Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 26378-26386 (1999).
30. Tobiume, K. *et al.* ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222-228 (2001).
31. Rittie, L. & Fisher, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 1, 705-720 (2002).
32. Rundhaug, J. E. & Fischer, S. M. Cyclo-oxygenase-2 plays a critical role in UV-induced skin carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 84, 322-329 (2008).
33. Bachelor, M. A. & Bowden, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin. Cancer Biol.* 14, 131-138 (2004).
34. Cooper, S. J. & Bowden, G. T. Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets.* 7, 325-334 (2007).
35. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert. Rev. Mol. Med.* 4, 1-22 (2002).
36. Marrot, L. & Meunier, J. R. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, S139-S148 (2008).

37. Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J. & Sage, E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 42, 9221-9226 (2003).
38. Latonen, L. & Laiho, M. Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta* 1755, 71-89 (2005).
39. Meunier, J. R., Sarasin, A. & Marrot, L. Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for in vitro testing. *Photochem. Photobiol.* 75, 437-447 (2002).
40. Cadet, J., Sage, E. & Douki, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res.* 571, 3-17 (2005).
41. Courdavault, S. *et al.* Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells. *Mutat. Res.* 556, 135-142 (2004).
42. Mouret, S. *et al.* Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 13765-13770 (2006).
43. Barzilai, A. & Yamamoto, K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 3, 1109-1115 (2004).
44. Shimizu, H. *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *J. Invest Dermatol.* 112, 769-774 (1999).
45. Courdavault, S. *et al.* Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* 4, 836-844 (2005).
46. Dinarello, C. A. The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 517-531 (1994).
47. Feldmeyer, L., Werner, S., French, L. E. & Beer, H. D. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 638-644 (2010).
48. Kupper, T. S., Chua, A. O., Flood, P., McGuire, J. & Gubler, U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J. Clin. Invest* 80, 430-436 (1987).
49. Harada, A., Mukaida, N. & Matsushima, K. Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases. *Mol. Med. Today* 2, 482-489 (1996).
50. Kondo, S., Kono, T., Sauder, D. N. & McKenzie, R. C. IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J. Invest Dermatol.* 101, 690-694 (1993).
51. Eckert, R. L. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J. Invest Dermatol.* 120, 823-828 (2003).
52. Efimova, T. p38delta mitogen-activated protein kinase regulates skin homeostasis and tumorigenesis. *Cell Cycle* 9, 498-05 (2010).
53. Johnson, J., Lagowski, J., Sundberg, A. & Kulesz-Martin, M. P53 family activities in development and cancer: relationship to melanocyte and keratinocyte carcinogenesis. *J. Invest Dermatol.* 125, 857-864 (2005).
54. Afaq, F., Zaid, M. A., Khan, N., Dreher, M. & Mukhtar, H. Protective effect of pomegranate-derived products on UVB-mediated damage in human reconstituted skin. *Exp. Dermatol.* 18, 553-561 (2009).

55. Afaq, F., Khan, N., Syed, D. N. & Mukhtar, H. Oral feeding of pomegranate fruit extract inhibits early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *Photochem. Photobiol.* 86, 1318-1326 (2010).
56. Marrot, L., Belaidi, J. P. & Meunier, J. R. Importance of UVA photoprotection as shown by genotoxic related endpoints: DNA damage and p53 status. *Mutat. Res.* 571, 175-184 (2005).
57. Marrot, L. *et al.* In vitro tools for photobiological testing: molecular responses to simulated solar UV of keratinocytes growing as monolayers or as part of reconstructed skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 448-458 (2010).
58. Mouret, S. *et al.* Assessment of the photoprotection properties of sunscreens by chromatographic measurement of DNA damage in skin explants. *Photochem. Photobiol.* 87, 109-116 (2011).
59. Mouret, S., Leccia, M. T., Bourrain, J. L., Douki, T. & Beani, J. C. Individual Photosensitivity of Human Skin and UVA-Induced Pyrimidine Dimers in DNA. *J. Invest Dermatol.* (2011).
60. Nys, K. *et al.* A p38(MAPK)/HIF-1 pathway initiated by UVB irradiation is required to induce Noxa and apoptosis of human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* 130, 2269-2276 (2010).
61. Van, L. A. *et al.* Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1361-1371 (2006).
62. European Commission European Commission Recommendation on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto. *Official Journal of the European Union* 39-43 (2006).
63. Diffey, B. L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28, 4-13 (2002).
64. Maguire, A., Lyng, F. M. & Walsh, J. E. Solar simulated radiation induced cell death depends on spectral distribution and irradiance but not output delivery. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 140, 147-157 (2010).
65. Grof, P., Ronto, G. & Sage, E. A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight. *J. Photochem. Photobiol. B* 68, 53-59 (2002).
66. Muller-Decker, K., Furstenberger, G. & Marks, F. Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: a possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 99-108 (1994).
67. Feldmeyer, L. *et al.* The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr. Biol.* 17, 1140-1145 (2007).
68. Augustin, C., Collombel, C. & Damour, O. Measurements of the protective effect of topically applied sunscreens using in vitro three-dimensional dermal and skin equivalents. *Photochem. Photobiol.* 66, 853-859 (1997).
69. Kondo, S., Sauder, D. N., Kono, T., Galley, K. A. & McKenzie, R. C. Differential modulation of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human epidermal keratinocytes by UVB. *Exp. Dermatol.* 3, 29-39 (1994).
70. Cohen, C., Dossou, K. G., Rougier, A. & Roguet, R. Episkin: An in vitro model for the evaluation of phototoxicity and sunscreen photoprotective properties. *Toxicol. In Vitro* 8, 669-671 (1994).
71. Eberlein-Konig, B., Jager, C. & Przybilla, B. Ultraviolet B radiation-induced production of interleukin 1alpha and interleukin 6 in a human squamous carcinoma cell line is wavelength-dependent and can be inhibited by pharmacological agents. *Br. J. Dermatol.* 139, 415-421 (1998).

72. Bechetoille, N. *et al.* Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Tissue Eng* 13, 2667-2679 (2007).
73. Cao, C. *et al.* EGFR activation confers protections against UV-induced apoptosis in cultured mouse skin dendritic cells. *Cell Signal.* 20, 1830-1838 (2008).
74. Lehman, T. A. *et al.* p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14, 833-839 (1993).
75. Backvall, H., Wassberg, C., Berne, B. & Ponten, F. Similar UV responses are seen in a skin organ culture as in human skin in vivo. *Exp. Dermatol.* 11, 349-356 (2002).
76. Liu, M., Dhanwada, K. R., Birt, D. F., Hecht, S. & Pelling, J. C. Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* 15, 1089-1092 (1994).
77. Marrot, L., Belaidi, J. P. & Meunier, J. R. Comet assay combined with p53 detection as a sensitive approach for DNA photoprotection assessment in vitro. *Exp. Dermatol.* 11 Suppl 1, 33-36 (2002).
78. Bissonauth, V. *et al.* The efficacy of a broad-spectrum sunscreen to protect engineered human skin from tissue and DNA damage induced by solar ultraviolet exposure. *Clin. Cancer Res.* 6, 4128-4135 (2000).
79. Enk, C. D. *et al.* Photoprotection by Cichorium endivia extracts: prevention of UVB-induced erythema, pyrimidine dimer formation and IL-6 expression. *Skin Pharmacol. Physiol* 17, 42-48 (2004).
80. El-Mahdy, M. A. *et al.* Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. *Photochem. Photobiol.* 84, 307-316 (2008).
81. Min, W. *et al.* Inhibitory effects of Baicalin on ultraviolet B-induced photo-damage in keratinocyte cell line. *Am. J. Chin Med.* 36, 745-760 (2008).
82. Katiyar, S. K., Matsui, M. S. & Mukhtar, H. Kinetics of UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in human skin in vivo: an immunohistochemical analysis of both epidermis and dermis. *Photochem. Photobiol.* 72, 788-793 (2000).
83. Mabruk, M. J. *et al.* Investigation of the effect of UV irradiation on DNA damage: comparison between skin cancer patients and normal volunteers. *J. Cutan. Pathol.* 36, 760-765 (2009).
84. Yarosh, D. B. *et al.* Measurement of UVB-Induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression. *Methods* 28, 55-62 (2002).
85. Osterwalder, U. & Herzog, B. Sun protection factors: world wide confusion. *Br. J. Dermatol.* 161 Suppl 3, 13-24 (2009).
86. Sayre, R. M., Stanfield, J., Bush, A. J. & Lott, D. L. Sunscreen standards tested with differently filtered solar simulators. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 17, 278-283 (2001).
87. de Gruijl, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer* 35, 2003-2009 (1999).
88. English, D. R., Armstrong, B. K., Krickler, A. & Fleming, C. Sunlight and cancer. *Cancer Causes Control* 8, 271-283 (1997).
89. Agar, N. S. *et al.* The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4954-4959 (2004).

90. LeVee, G. J., Oberhelman, L., Anderson, T., Koren, H. & Cooper, K. D. UVA II exposure of human skin results in decreased immunization capacity, increased induction of tolerance and a unique pattern of epidermal antigen-presenting cell alteration. *Photochem. Photobiol.* 65, 622-629 (1997).
91. Green, A. *et al.* Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 354, 723-729 (1999).
92. Huncharek, M. & Kupelnick, B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies. *Am. J. Public Health* 92, 1173-1177 (2002).
93. van der Pols, J. C., Williams, G. M., Pandeya, N., Logan, V. & Green, A. C. Prolonged prevention of squamous cell carcinoma of the skin by regular sunscreen use. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 2546-2548 (2006).
94. Westerdahl, J., Ingvar, C., Masback, A. & Olsson, H. Sunscreen use and malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 87, 145-150 (2000).
95. Wolf, P., Quehenberger, F., Mullegger, R., Stranz, B. & Kerl, H. Phenotypic markers, sunlight-related factors and sunscreen use in patients with cutaneous melanoma: an Austrian case-control study. *Melanoma Res.* 8, 370-378 (1998).
96. Autier, P., Boniol, M. & Dore, J. F. Sunscreen use and increased duration of intentional sun exposure: still a burning issue. *Int. J. Cancer* 121, 1-5 (2007).
97. Bernerd, F., Vioux, C., Lejeune, F. & Asselineau, D. The sun protection factor (SPF) inadequately defines broad spectrum photoprotection: demonstration using skin reconstructed in vitro exposed to UVA, UVB or UV-solar simulated radiation. *Eur. J. Dermatol.* 13, 242-249 (2003).
98. Kelly, D. A. *et al.* Sensitivity to sunburn is associated with susceptibility to ultraviolet radiation-induced suppression of cutaneous cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 191, 561-566 (2000).
99. Ananthaswamy, H. N. *et al.* Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat. Med.* 3, 510-514 (1997).
100. Brash, D. E. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet.* 13, 410-414 (1997).
101. Lens, M., Bielfeldt, S., Bataille, V. & Wilhelm, K. P. p53 labeling index in assessing the efficacy of a sunscreen in protection against UV-induced damage. *Int. J. Dermatol.* 47, 1234-1239 (2008).
102. Herrling, T., Jung, K. & Chatelain, E. Radikal Skin/Sun Protection Factor RSF - Protection against UV-induced free radicals in skin. *SÖFW-Journal* 132, 24-30 (2006).
103. Darr, D. & Fridovich, I. Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest Dermatol.* 102, 671-675 (1994).
104. Roberts, L. K. *et al.* Ultraviolet spectral energy differences affect the ability of sunscreen lotions to prevent ultraviolet-radiation-induced immunosuppression. *Photochem. Photobiol.* 63, 874-884 (1996).
105. Fourtanier, A. *et al.* Measurement of sunscreen immune protection factors in humans: a consensus paper. *J. Invest Dermatol.* 125, 403-409 (2005).

## 7. Lebenslauf

### Personalien

Name	Walter Nicole
Geburtsdatum	3. Mai 1983
Heimatort	Löhningen SH
Zivilstand	ledig

### Ausbildung

2006-2007	Assistenzjahr Universität Basel/ Apotheke Dr. Noyer AG, Filiale Marktgass-Passage, Marktgass-Passage 3, 3011 Bern
2006	Diplomarbeit bei der Firma Pentapharm in Aesch BL
2004-2006	Fachstudium Pharmazie Universität Basel
2002-2004	Grundstudium Pharmazie Universität Bern
1998-2002	Gymnasium Lerbermatt
1996-1998	Untergymnasium Köniz
1994-1996	Sekundarschule Spiegel (5.-6. Klasse)
1990-1994	Primarschule Spiegel (1.-4. Klasse)

### Berufliche Tätigkeiten

Seit 1.11.2012	Apothekerin 50% in der Wegmühleapotheke Ostermundigen
1.4.-31.5.2012	Apothekerin 40% in der Sonnenapotheke Köniz
1.4.-3.5.2012	Apothekerin 40% in der Pfauenapotheke Zofingen
2008-2012	Doktorandin bei Spirig Pharma AG in Egerkingen
2007-2008	Springer-Apothekerin im Kanton Bern bei den Dr. Bähler Apotheken und Drogerien.
20.-26.10.2007	Ferienvertretung in der Schwanenapotheke Thun
2005	Ferienaushilfe in der Schloss Apotheke, Marktgasse 10, 3177 Laupen



2004                                      Ferienaushilfe in der Apotheke Dr. Noyer AG, Markt-  
gasse 65, 3011 Bern

### **Weiterbildung während der Dissertation**

2009-2011                              Seminar "Wirkstofftransport durch Membranen" der Universi-  
tät Basel bei Prof. Dr. G. Imanidis, Basel

17.-24.07.2010                        16<sup>th</sup> World Congress of basic and clinical pharmacology  
(WorldPharma 2010), Kopenhagen

2009                                      Internal seminar on genomic instability and DNA repair der  
Universität Basel bei Prof. Dr. P. Schär, Basel

23.+24.04.2009                        Durchflusszytometrie der PromoCell Academy, Heidelberg

27.03.+04.04.2009                    Effizient Recherchieren- Literatursuche ohne Zeitverlust des  
Advanced Study Centre der Universität Basel, Basel

09.10.2008                              SUNTEST-Workshop der Firma Atlas, Önsingen