



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**UNTERSUCHUNG MOLEKULARER UND ZELLULÄRER
ENTSTEHUNGSMECHANISMEN UV-INDUZierter
HAUTKREBSE
TEILPROJEKT 2: MOLEKULARBIOLOGISCHE PROZESSE
BEI UV-INDUZierten HAUTKREBSEN**

BMU - 2006-686



WIR STEUERN UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN.

BMU – 2006-686

**„Untersuchung molekularer und zellulärer
Entstehungsmechanismen UV-induzierter
Hautkrebse Teilprojekt 2:
Molekularbiologische Prozesse bei UV-induzierten
Hautkrebsen“**

Thomas Schwarz

Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten

Universitätsklinikum

Dormagenstraße 5

48129 Münster

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

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

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2006

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Kurzfassung deutsch	4
Summary	5
Liste der Abkürzungen	5
1. Aufgabenstellung	6
1.1. Darstellung des Gesamtziels des Vorhabens	6
1.2. Wissenschaftliche Arbeitsziele des Vorhabens	8
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	8
3. Stand von Wissenschaft und Technik	9
3.1. Eigene Vorarbeiten	11
4. Ergebnisse	14
4.1 Teilprojekt A: Welche Mechanismen liegen dem protektiven Effekt von IL-12 zugrunde?	14
4.1.1 Induziert IL-12 DNA-Reparatur?	14
4.1.2 Ist der Effekt von IL-12 für Pyrimidindimere spezifisch?	15
4.1.3 Ist der Apoptose-inhibierende Effekt von IL-12 für UVB-Strahlung spezifisch?	15
4.1.4 Induziert IL-12 global genome repair (GGR) oder transcription-coupled-repair (TCR)?	18
4.1.5 Ist der Effekt von IL-12 in Melanozyten bzw. Melanomzellen zu beobachten?	19
4.2 Teilprojekt B: Führt IL-12 zu einer Reduktion des Photokarzinogeneserisikos?	23
4.2.1 Schützt endogenes/konstitutives IL-12 vor UV-induzierten Tumoren?	23
4.2.2 Kann der protektive Effekt durch endogen induziertes IL-12 mediiert werden?	26
4.3 Teilprojekt C: Ist die Regulation der DNA Reparatur individuellen Schwankungen unterlegen und somit als Parameter zur Risikoabschätzung für UV-induzierten Hautkrebs geeignet?	30
5. Diskussion und Ausblick	31
6. Bisherige Publikationen	36
7. Zitierte Literatur	37

Kurzfassung

Bedingt durch die vermehrte UV-Exposition der Bevölkerung nimmt die Zahl der Erkrankungen an Hautkrebs ständig zu. Neben entsprechenden Vorsorgeuntersuchungen wird in Zukunft konsequentem Sonnenschutz besondere Bedeutung zukommen, was die Entwicklung zusätzlicher bzw. alternativer Schutzkonzepte notwendig macht. Grundvoraussetzung dafür sind allerdings genaue Kenntnisse über die molekularen Mechanismen, die der Entstehung von Hautkrebs zugrunde liegen. Ebenso wichtig ist es Personen mit einem besonders hohen Risiko zu identifizieren, um rechtzeitig entsprechende Schutz- bzw. Vorsorgemaßnahmen einzuleiten (Risikoabschätzung). Im Zentrum der Untersuchungen des Vorhabens stand das Zytokin Interleukin-12 (IL-12), da in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass IL-12 in der Lage ist die DNA-Reparatur zu aktivieren. IL-12 scheint in der Tat vor Krebsentstehung zu schützen, da Mäuse, die kein IL-12 produzieren können, ein erhöhtes Risiko aufwiesen, an UV-induziertem Hautkrebs zu erkranken. IL-12 ist in der Lage, DNA Schaden nicht nur in Keratinozyten sondern auch in Melanozyten zu reduzieren, was für die Verhinderung der Entstehung von Melanomen von Bedeutung sein dürfte. Zusätzlich kann IL-12 über die Induktion der DNA-Reparatur die Unterdrückung des Immunsystems durch UV-Strahlung verhindern, was ebenfalls bei der Krebsentstehung von Bedeutung sein dürfte. Diese Untersuchungen zeigen daher Wege für alternative Schutzstrategien gegenüber UV-Strahlung auf, woraus sich neue Schutzkonzepte ableiten lassen. Darüber hinaus scheinen individuelle Unterschiede in der Kapazität der DNA-Reparatur zu bestehen. In wieweit diese als Parameter zur Erfassung des Hautkrebsrisikos herangezogen werden können, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Summary

Because of the extensive exposure of the population to ultraviolet radiation (UV) the incidence of skin cancer is significantly increasing. This applies particularly for malignant melanoma, one of the most aggressive malignancies. Besides prophylactic medical check-ups consequent UV protection will be of utmost importance. This, however, requires the development of new and alternative UV protection concepts. This is in turn critically dependent on detailed knowledge about the molecular mechanisms underlying photocarcinogenesis. The studies focused on the cytokine interleukin-12 (IL-12) since previous investigations indicated that IL-12 exhibits the capacity to induce DNA repair. Indeed, IL-12 appears to protect from photocarcinogenesis since mice deficient in the production of IL-12 have a higher risk to develop UV-induced skin cancer. IL-12 reduces UV-induced DNA damage not only in keratinocytes but also in melanocytes which might be relevant for the prevention of the development of melanoma. In addition, via the induction of DNA repair IL-12 appears to prevent UV-induced immunosuppression which seems to be also relevant in carcinogenesis. Thus, these studies support the development of alternative protection strategies against UV radiation. Furthermore, individual differences in the capacity to repair DNA damage appear to exist. Whether this can be used as a prediction marker for the risk of skin cancer remains to be determined in future studies.

Liste der Abkürzungen

CAT, Chloracetyltransferase; DNA, Desoxyribonukleinsäure; FLIP, *FLICE inhibitory protein*; GTP, Grüne Tee Phenole; IL, Interleukin; α MSH, *alpha-melanocyte stimulating hormone*; NER, Nukleotid-Excisions-Reparatur; PBMC, periphere mononukleäre Zellen; T4N5, T4-Endonuklease-V-Liposomenformulation; TRAIL, *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*; XP, Xeroderma pigmentosum

1. Aufgabenstellung

1.1. Darstellung des Gesamtziels des Vorhabens

In den letzten Jahren ist eine massive Zunahme der durch UVB-Strahlung hervorgerufenen gesundheitlichen Schäden zu beobachten. Dies gilt insbesondere für die extreme Häufung von Hautkrebskrankungen, die in manchen Ländern bereits an 1. bzw. 2. Stelle der Krebsstatistik stehen (Garbe, 1997), wie auch für die Schädigungen des Bindegewebes im Sinne vorzeitiger Hautalterung ("Photoaging"). Zur Photokarzinogenese trägt auch die Unterdrückung des Immunsystems durch UV-Exposition wesentlich bei (Kripke, 1986). Während das "Photoaging" sowohl durch den mittel- (UVB, 290-320 nm) als auch den langwelligen Bereich (UVA, 320-400 nm) verursacht wird, ist der UVB-Anteil für die Entstehung von Hautkrebs (Photokarzinogenese) und die UV-induzierte Immunsuppression von zentraler Bedeutung. Der dramatische Anstieg UV(B)-bedingter Hautschäden ist vorwiegend auf das veränderte Freizeitverhalten bzw. den sorglosen Umgang der Bevölkerung mit Sonnenlicht zurückzuführen. Zusätzlich ist in Zukunft auch mit einer vermehrten UVB-Einstrahlung infolge der Abnahme der Ozonschicht zu rechnen (Slaper et al., 1996). Die Brisanz der Thematik liegt auch darin, dass UV-Strahlung als "ubiquitärer" Umwelteinfluss jeden betrifft, man sich diesem nie gänzlich entziehen kann und darüber hinaus Sonnenexposition subjektiv von der überwiegenden Mehrheit der Bevölkerung als positiv und angenehm bewertet wird. Diese Faktoren machen daher UV-Strahlung zu einem besonderen Umwelteinfluss, zumal auch komplettes Meiden, im Gegensatz zu vielen anderen schädlichen Umwelteinflüssen, mit dem Leben nicht vereinbar wäre, da Sonnenlicht auch positive Effekte ausübt (Vitamin-D Synthese, etc.). Da es daher vollkommen undurchführbar und auch nicht sinnvoll wäre, von Sonnenexposition gänzlich abzuraten, ist es von enormer Bedeutung

1. alternative Strategien zur gezielten Protektion vor den schädigenden UVB-Wirkungen zu entwickeln und
2. Parameter zu finden, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-induziertem Hautkrebs definieren und somit als individuelle Risiko- bzw. Screeningparameter eingesetzt werden können.

Die Kombination konventioneller und alternativer Schutzstrategien sowie eine individuelle Risikoabschätzung würden aktiven UV-Konsum erlauben, ohne dass sich der Einzelne in seinen Aktivitäten und seinem Wohlempfinden eingeschränkt fühlt

und ohne dabei gesundheitliche Schäden davonzutragen. Derzeit wird als erfolgreiche und praktikable protektive Strategie vorwiegend die Anwendung von Sonnenschutzcremes betrachtet. Ohne den Wert von Sonnenschutzmitteln zu schmälern, muss jedoch festgestellt werden, dass auch moderne Sonnenschutzfilter keinen absoluten Schutz gewähren (Wolf et al., 1993), was zeigt, dass die Entwicklung alternativer Protektionsstrategien unerlässlich ist.

Die weitreichendste Wirkung von UVB Strahlung auf zellulärer Ebene ist die Induktion von Schäden in der DNA (Pyrimidindimere, (6-4)-Photoprodukte) (Patrick, 1977). UVB-induzierte DNA-Schäden sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einerseits mediieren sie zahlreiche Effekte von UVB-Strahlung, wie Entzündung (Kibitel et al., 1998) bzw. Immunsuppression (Kripke et al., 1992; Nishigori et al., 1996). Andererseits stellen DNA-Schäden die prinzipielle Basis für maligne Entartung dar. Zellen sind jedoch mit sehr effizienten Reparatursystemen ausgestattet, die DNA-Schäden permanent reparieren. Für UVB-induzierte DNA-Schäden ist die Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) von besonderer Bedeutung. Die Bedeutung des NER wird am besten anhand des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosum (XP) demonstriert, dessen Patienten einen defekten NER aufweisen und bereits im Kindesalter an multiplen Plattenepithelkarzinomen und malignen Melanomen erkranken (Bernburg & Lehmann, 2001).

Bis vor kurzem war man der Ansicht, dass der NER als essentielles Schutzsystem konstitutiv exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt. Unlängst wurde jedoch beschrieben, dass Langzeit-UVB-Bestrahlung eine Unterdrückung des NER verursachen könnte (Mitchell et al., 2001). Wir konnten kürzlich beobachten, dass die einmalige UVB-Bestrahlung humaner Zellen zu einer Reduktion der transkriptionellen Expression bestimmter NER-Komponenten führt (Schwarz et al., 2002). Ob es sich hierbei um ein generelles Phänomen handelt oder individuelle Schwankungen vorliegen, die u. a. das Karzinomrisiko und somit die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber UV-induziertem Hautkrebs determinieren, ist bislang unbekannt und sollte im vorliegenden Projekt bearbeitet werden. Zusätzlich konnten wir beobachten, dass der Immunmodulator Interleukin (IL)-12 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den UVB-induzierten DNA-Schaden in signifikanter Weise reduziert und dies vermutlich über eine Induktion des NER vermittelt wird. Es sollte daher untersucht werden, welche Mechanismen dem Effekt auf die Reduktion des UVB-induzierten DNA-Schadens zugrunde liegen und ob IL-12 das Photokarzinogeneserisiko reduziert. Das Fernziel

der Untersuchungen war die Schaffung der Basis für die Entwicklung alternativer Protektionskonzepte.

1.2. Wissenschaftliche Arbeitsziele des Vorhabens

Im Detail wurde das Forschungsprojekt in drei Teilprojekten bearbeitet:

Teilprojekt A: Welche Mechanismen liegen dem protektive Effekt von IL-12 zugrunde?

Im Zentrum dieses Teilprojektes stand der von uns unlängst beobachtete Effekt von IL-12, UVB-induzierte DNA-Schäden zu reduzieren und somit den UVB-medierten apoptotischen Zelltod zu unterdrücken. Ziel dieses Teilprojektes war die Aufklärung der molekularen Grundlagen, die diesem Effekt zugrunde liegen.

Teilprojekt B: Verursacht IL-12 bzw. die Induktion von endogenem IL-12 eine Reduktion des Photokarzinogeneserisikos?

Da IL-12 eine signifikante Reduktion des UVB-induzierten DNA-Schadens bewirkt, sollte untersucht werden, ob IL-12 das Risiko, UV-induzierte Hauttumoren zu entwickeln, reduziert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob ein ähnlicher Effekt durch Induktion von endogenem IL-12 im Sinne einer biologischen Chemoprävention erzielt werden kann.

Teilprojekt C: Ist die Regulation der DNA Reparatur individuellen Schwankungen unterlegen und somit als Parameter zur Risikoabschätzung für UV-induzierten Hautkrebs geeignet?

In diesem Teilprojekt sollte untersucht werden, ob eine verstärkte Unterdrückung der NER Komponenten durch UVB-Strahlung bzw. ein vermindertes Ansprechen auf IL-12 an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt ist, bzw. ob damit das individuelle Risiko steigt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Dem vorliegenden Projekt lag primär keine hypothetische Annahme zugrunde, sondern es basierte auf Beobachtungen, die im Rahmen früherer Projekte gewonnen werden konnten. Im Zentrum der Untersuchungen stand die Frage, ob DNA-Reparatursysteme einer Regulation unterliegen, ob sich dies präventiv/therapeutisch einsetzen lässt und ob dies als Parameter zur Definition des individuellen Risikos für Hautkrebs herangezogen werden kann. Alleine die Aufklärung der Frage, auf welche

Weise IL-12 UV-induzierte DNA-Schäden und somit UV-medierten Zelltod verhindert, war für die photobiologische Grundlagenforschung von großem wissenschaftlichem Wert. Es wurde erwartet, dass diese Erkenntnisse eine Basis darstellen, um alternative Strategien zu finden, UV-medierten Zellschaden zu minimieren. In anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe, die über entsprechende strukturelle, personelle und technische Voraussetzungen verfügte, wurden bereits ausreichend Vorkenntnisse erworben, die in das Projekt einfließen konnten.

3. Stand von Wissenschaft und Technik

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

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

Form von Knock-out-Mäusen einen ganz erheblichen Beitrag geleistet (de Boer & Hoeijmakers, 1999).

Da die Ursachen von XP genetische Defekte der einzelnen NER Komponenten sind, ist ein kausaler therapeutischer Ansatz bis heute nicht möglich. Die therapeutischen Maßnahmen beschränkten sich bisher auf die Entfernung der Hauttumoren sowie äußerst konsequenten Sonnenschutz. Ein spektakulärer Durchbruch in der Behandlung von XP Patienten ist durch die Isolierung des bakteriellen Reparaturenzyms T4 Endonuklease V (T4N5) gelungen. Im Gegensatz zum komplexen humanen NER System ist T4N5 alleine in der Lage, UV-induzierte DNA-Schäden zu eliminieren. Dieses Enzym beschleunigt die Reparatur UV-induzierter Pyrimidindimere erheblich. Durch Verpackung von gentechnologisch hergestellter T4N5 in Liposomen wird die Penetration dieses Enzyms in Zellen ermöglicht, wo es die DNA Reparatur erhöht ("exogene" DNA-Reparatur). Mit dieser Strategie ist es möglich, in XP-Zellen DNA-Schäden zu reparieren (Yarosh et al., 1994). Eine internationale Doppelblindstudie über mehrere Jahre, an der auch unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, hat in eindrucksvoller Weise zeigen können, dass durch die lokale Anwendung der T4N5-Liposomenlotion die Frequenz UV-induzierter Hauttumoren und seiner Vorstufen (aktinische Keratosen) bei XP Patienten signifikant reduziert werden konnte (Yarosh et al., 2001).

Man kann davon ausgehen, dass bei extremer Sonnenexposition auch der NER eines gesunden Menschen überfordert ist, was eine nicht ausreichende Reparatur und somit bleibende DNA-Schäden zur Folge hat. In diesem Zusammenhang ergibt sich nun durch die Verfügbarkeit von T4N5 die Möglichkeit, nicht ausreichende endogene DNA-Reparatur auch beim Gesunden exogen zu ergänzen. Ein ähnlicher Ansatz ist durch ein weiteres Reparaturenzym, die Photolyase, gelungen, welches z.B. in Beuteltieren vorkommt. Photolyase erkennt das Photoprodukt in der DNA, bindet daran und spaltet es in Gegenwart von sichtbarem Licht (Photoreaktivierung) (Yasui et al., 1988). Auch wenn Photolyase nicht bei Menschen vorkommt, ist sie in der Lage, DNA-Schäden in humanen Zellen zu reparieren (Steger et al., 2000). T4N5 Endonuklease und Photolyase eignen sich somit DNA-Reparaturleistung zu erhöhen und vom NER nicht erfasste DNA-Schäden zu reparieren. Diese Strategie, auch exogene Reparatur genannt, stellt somit ein alternatives Konzept zum Schutz gegenüber den schädigenden Effekten von UV-Strahlung dar und wird in Zukunft adjuvant

mit konventionellem Sonnenschutz (Sonnenschutzmittel, textiler Sonnenschutz) zu kombinieren sein.

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

Umgekehrt gehen Störungen im Ablauf der Apoptose mit einer Erhöhung des Karzinogeneserisikos einher. Im Gegensatz zu Keratinozyten, die nach UV-Bestrahlung relativ leicht in die Apoptose gehen, sind Melanozyten gegenüber Apoptose relativ resistent (Gilchrest et al., 1999). Dies bedeutet, dass Melanozyten mit geschädigter DNA im Vergleich zu Keratinozyten eine höhere Chance haben zu überleben und somit auch das Entartungspotential steigt, was für die Pathogenese des malignen Melanoms von entscheidender Bedeutung sein dürfte. Die Ursachen für die Apoptoseresistenz von Melanozyten stehen daher im Zentrum der modernen Melanomforschung. Ein alternativer Weg die Melanomgenese zu inhibieren, wäre daher die DNA-Reparatur in Melanozyten zu induzieren bzw. zu beschleunigen. Ob dies möglich ist, sollte im vorliegenden Projekt untersucht werden.

3.1. Eigene Vorarbeiten

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit längerer Zeit mit den Mechanismen, die der UVB-induzierten Apoptose von Keratinozyten zugrunde liegen (Kulms & Schwarz, 2000; Murphy et al., 2001). Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass UVB-induzierter DNA-Schaden ein entscheidendes Kriterium für die Induktion von Apoptose in Keratinozyten darstellt. Reduktion des DNA-Schadens durch exogene Reparatur mittels T4N5 bzw. Photolyase führt zu einer deutlichen Reduktion

der Apoptose (Stege et al., 2000; Kulms et al., 1999; Wolf et al., 2000). Zusätzlich dürften auch Todesrezeptoren, die an der Zelloberfläche exprimiert werden (CD95/Fas, TRAIL-Rezeptoren, TNF-Rezeptoren), beteiligt sein. Es gelang zu zeigen, dass UVB-Strahlung in der Lage ist, den CD95 Rezeptor direkt zu aktivieren (Aragane et al., 1998; Rehemtulla et al., 1997). Eine Inhibition der Signaltransduktion dieses Rezeptors ist mit einer Reduktion der Apoptose assoziiert. DNA-Schaden und Todesrezeptoraktivierung schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus, sondern beide tragen essentiell zur kompletten Umsetzung der Apoptose bei, zumal nur eine Hemmung beider Komponenten mit einer nahezu kompletten Inhibition der Apoptose einhergeht (Kulms et al., 1999).

Vor einiger Zeit konnten mehrere Arbeitsgruppen beobachten, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor κ B*) einen antiapoptotischen Effekt ausübt (Barkett & Gilmore, 1999). Dementsprechend gelang es uns zu zeigen, dass der Entzündungsmediator IL-1, ein starker Aktivator von NF κ B, Keratinozyten vor Todesligand-induzierter Apoptose schützt (Kothny-Wilkes et al., 1998). Diese Beobachtung scheint insofern von praktischer Relevanz, als Tumorzellen *in vivo* von Entzündungszellen, die u.a. IL-1 sezernieren, umgeben sind. Tumorzellen könnten sich somit durch Aktivierung von NF κ B z.B. dem therapeutischen Effekt des Todesliganden TRAIL entziehen. Im Gegensatz zu Ligand-induzierter Apoptose schützt IL-1 nicht vor UV-induzierter Apoptose, sondern führt sogar zu einer Verstärkung des UV-induzierten Zelltodes (Kothny-Wilkes et al., 1999). Welche Mechanismen, dieser ambivalenten Antwort unterliegen, ist nicht bekannt und derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Diese Befunde zeigen jedoch eindeutig, dass UV-induzierte Apoptose von Außen, in diesem Fall durch IL-1, beeinflusst werden kann.

Um weitere Erkenntnisse über die exogene Regulation von UV-induzierter Apoptose zu gewinnen, haben wir den Effekt verschiedener Zytokine auf UV-induzierte Apoptose studiert. In diesem Zusammenhang erscheint IL-12 von besonderem Interesse. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus zwei Ketten p35 und p40 besteht. IL-12 wirkt vorwiegend immunmodulatorisch (Trinchieri, 1998) und hebt u. a. die UV-induzierte Immunsuppression auf (Schwarz et al., 1996). Interessanterweise führt die Vorinkubation von Keratinozytenlinien mit IL-12 zu einer deutlichen Reduktion der UV-induzierten Apoptose. Gleiches konnte für die *in vivo* Situation beobachtet werden, da die intrakutane Injektion von IL-12 mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Sonnenbrandzellen nach UV-Bestrahlung einherging. Über-

raschenderweise war 4 Stunden nach UVB-Bestrahlung der UVB-induzierte DNA-Schaden in den mit IL-12 vorbehandelten Keratinozyten im Vergleich zu nur UVB-bestrahlten Keratinozyten deutlich reduziert. Wurde hingegen die DNA-Extraktion unmittelbar nach UVB-Bestrahlung durchgeführt, war kein Unterschied zwischen un- und IL-12-behandelten Keratinozyten zu beobachten. Da somit ein UVB-filternder Effekt von IL-12 auszuschließen ist, kann dies nur mit einer verstärkten Entfernung von DNA-Schäden durch Induktion von DNA-Reparatur erklärt werden. Diese Vermutung konnte im Comet-Assay bestätigt werden. Aus diesem Grunde wurde der Effekt von IL-12 auf die transkriptionelle Regulation der NER-Komponenten mittels "RNase protection assay" untersucht. Wesentliche Komponenten des NER (XPC, XPG, DDB1, DDB2/p48, RPA) waren in UVB-bestrahlten Zellen reduziert. Dieser Befund ist in Einklang mit den Beobachtungen von Mitchell et al. (2001), die eine Inhibition der DNA-Reparatur durch chronische UV-Bestrahlung vermuten lassen. Beide Befunde widersprechen dem Konzept, dass NER nicht reguliert wird. Zugabe von IL-12 führte zu einer Kompensation des inhibitorischen Effektes, ja sogar zu einer Aufregulierung der NER-Komponenten. Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass IL-12 die Fähigkeit besitzt, den NER zu induzieren. Die Vorbefunde ließen sich somit auf zwei Kernaussagen verdichten:

- UVB-Strahlung unterdrückt NER-Komponenten.
- IL-12 kompensiert diesen Effekt bzw. induziert NER.

Beide Beobachtungen sprachen eindeutig für eine Regulation der endogenen DNA-Reparatur (NER). Daraus ergaben sich folgende zu bearbeitende Fragestellungen:

Welche Mechanismen liegen dem NER-induzierenden Effekt von IL-12 zugrunde?

Lassen sich die bisherigen *in vitro* Beobachtungen von IL-12 auf die *in vivo* Situation übertragen bzw. lässt sich dadurch das Photokarzinogeneserisiko senken?

Ist die DNA-Reparatur individuellen Schwankungen unterworfen und als Risikoparameter für Hautkrebs geeignet?

4. Ergebnisse

4.1. Teilprojekt A: Welche Mechanismen liegen dem protektiven Effekt von IL-12 zugrunde?

4.1.1. Induziert IL-12 DNA-Reparatur?

Um die Frage zu beantworten, ob IL-12 NER induziert, wurde der *shuttle vector assay* benutzt. Dabei werden Plasmidvektoren mit einem Chloracetyltransferase (CAT)-Reportergenkonstrukt, das hinter einem SV40-Promoter kloniert wurde, *in vitro* UVB-Strahlung ausgesetzt. Anschließend werden die Plasmidvektoren mittels Elektroporation in Keratinozytenzelllinien eingebracht. Je mehr DNA-Schäden die UVB-Strahlung im Reporterkonstrukt setzt, umso geringer wird die CAT-Expression nach Transfektion sein (Eller et al., 1997). Je stärker hingegen die DNA-Schäden nach Transfektion in den Wirtszellen repariert werden, umso stärker wird die CAT-Expression wiederhergestellt. Dieses Experiment wurde mit Zellen der Epidermoidkarzinomlinien KB durchgeführt. Wie zu erwarten, war die CAT-Expression in KB-Zellen, die mit UVB-bestrahlten Plasmiden transfiziert wurden, deutlich reduziert. Wurden die Zellen hingegen mit IL-12 behandelt, war die CAT-Expression erhöht (**Abb. 1**), was die Annahme unterstützt, dass IL-12 den NER induziert.

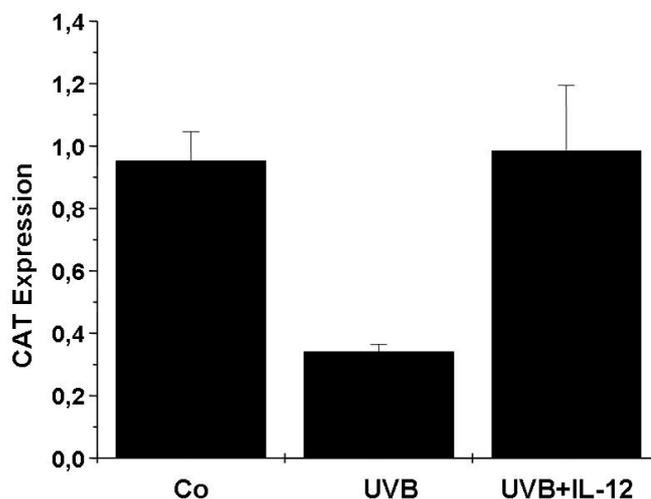


Abb.1: Plasmidvektoren mit einem Chloracetyltransferase (CAT)-Reportergenkonstrukt, das hinter einem SV40-Promoter kloniert wurde, wurde mit 20 mJ/cm² UVB bestrahlt. Anschließend wurden die Plasmide mittels Elektroporation in unbehandelte (UVB) bzw. mit IL-12 (100 ng/ml) vorbehandelte (UVB-IL-12) KB-Zellen transfiziert. Als Kontrolle (Co) wurden Wirtszellen mit unbestrahlten Plasmiden transfiziert. Die CAT-Expression wurde mittels eines CAT-ELISA (Fa. Roche) gemessen.

4.1.2. Ist der Effekt von IL-12 für Pyrimidindimere spezifisch?

Bisher konnten wir mittels Southwestern-Dotblot-Analyse zeigen, dass die Vorbehandlung von Zellen mit IL-12 zu einer Reduktion UV-induzierter Pyrimidindimere führt. Pyrimidin-dimere sind die wichtigsten aber nicht die einzigen Photoprodukte, die nach UVB-Bestrahlung entstehen. Zusätzlich werden (6-4)-Photoprodukte generiert. Mittels spezifischer Antikörper gegen (6-4)-Photoprodukte (Kamiya Biomedical Company) sollte in der Southwestern-Dotblot-Analyse überprüft werden, ob nach Vorbehandlung mit IL-12 auch die Anzahl der (6-4)-Photoprodukte reduziert ist. Sollte IL-12 tatsächlich zu einer Induktion des NER führen, wäre anzunehmen, dass auch (6-4)-Photoprodukte durch IL-12 reduziert werden. Allerdings ergaben sich bei der Durchführung technische Probleme, da sich der Antikörper als sehr „klebrig“ erwies und daher eine extrem hohe unspezifische Färbung ergab, sodass keine Aussage bezüglich des Einflusses von IL-12 auf die Reparatur von (6-4)-Photoprodukten gemacht werden konnte. Im Gegensatz zu UVB schädigt UVA-Strahlung die DNA nicht direkt, sondern indirekt vorwiegend über die Induktion von Singulett-Sauerstoff. Das primäre Produkt der UVA-Schädigung ist 8-Hydroxyguanin (7.8-Dihydro-8-Oxoguanosin), welches nicht durch den NER repariert wird. IL-12 hatte keinen Einfluss auf die Menge von 8-Hydroxyguaninen, was bestätigt, dass der Effekt von IL-12 für den NER spezifisch sein dürfte.

4.1.3. Ist der Apoptose-inhibierende Effekt von IL-12 für UVB-Strahlung spezifisch?

Wir hatten bis zu Beginn des Projektes beobachtet, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die UVB-induzierte Apoptose von Keratinozyten signifikant durch IL-12 reduziert werden kann, was vermutlich auf die erhöhte DNA-Reparatur zurückzuführen ist. Inhibition von apoptotischem Zelltod wird im Allgemeinen als nachteilig betrachtet, da dadurch DNA-geschädigte Zellen überleben und somit ein erhöhtes Risiko für maligne Entartung entsteht (Ziegler et al., 1994). Da die Induktion UV-mediierter Apoptose ein protektiver Vorgang ist, wird sogar nach Strategien gesucht, UV-medierten Zelltod zu induzieren. Wir konnten kürzlich zeigen, dass dies mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 möglich ist. IL-1 schützt Keratinozyten zwar vor Todesligand-induzierter Apoptose, nicht aber vor UV-induzierter Apoptose. Im Gegenteil IL-1 führt sogar zu einer Verstärkung des UV-induzierten Zelltodes (Kothny-Wilkes et al., 1999). Die Aufklärung der diesem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen wird daher zur Entwicklung zukünftiger Protektionsstrategien beitragen,

die das Konzept verfolgen, jene Zellen, die zwar geschädigte DNA tragen aber von alleine nicht in die Apoptose gehen, in den Zelltod zu treiben. Im Rahmen dieses Vorhabens konnten wir zeigen, dass die Verstärkung der UV-induzierten Apoptose durch IL-1 auf eine NFκB-abhängige Unterdrückung der TRAF-Proteine-1, -2 und -6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor*) zurückzuführen ist (Pöppelmann et al., 2005). Es ist bekannt, dass TRAF-Proteine antiapoptotische Aktivität aufweisen. Detailergebnisse sind der Publikation "NFκB-dependent downregulation of TRAF proteins contributes to IL-1-mediated enhancement of UVB-induced apoptosis" erschienen 2005 in *The Journal of Biological Chemistry* (Band 280, Seiten 15635-15643) zu entnehmen.

Im Gegensatz dazu kann die Inhibition der UV-induzierten Apoptose durch IL-12 als vorteilhaft angesehen werden, zumal dieses Phänomen auf eine Reduktion UV-induzierten DNA-Schadens durch IL-12 zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob der Effekt von IL-12 für UVB-induzierte Apoptose spezifisch ist, sollten andere Apoptose-induzierende Stimuli diesbezüglich untersucht werden. Dazu sollten Zellen γ -Strahlung bzw. Chemotherapeutika (Doxorubicin, Cis-Platin) ausgesetzt werden. Die durch diese Einflüsse verursachten Schäden werden nicht durch NER, sondern durch *base excision repair* bzw. homologe Rekombination entfernt (Hoeijmakers, 2001). Sollte der Effekt von IL-12 für NER spezifisch sein, wäre zu erwarten, dass IL-12 z.B. die durch γ -Strahlung induzierte Apoptose nicht reduziert. Dazu sollten Keratinozytenlinien (KB) den unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt werden und nach 16 Stunden die Apoptose gemessen werden. Durch γ -Strahlung induzierter DNA-Schaden wurde nicht beeinflusst, zumal es sich hierbei primär um DNA-Strangbrüche handelt (**Abb. 2**). Der Effekt von IL-12 auf durch Chemotherapeutika induzierten DNA-Schaden war heterogen. Durch Cis-Platin induzierter DNA-Schaden wird zum Teil über den NER repariert, während dies für die meisten anderen Chemotherapeutika nicht gilt. Die Absterberate von mit Cis-Platin behandelten Zellen war deutlich reduziert, wenn die Zellen mit IL-12 vorbehandelt wurden (**Abb. 3**). Im Gegensatz dazu hatte IL-12 keinen Effekt auf die Zytotoxizität von Doxorubicin. Da die Absterberate mit der Menge des durch die Chemotherapeutika induzierten DNA Schadens korreliert, ist dies ein weiterer Hinweis, dass IL-12 ausschließlich den NER induziert.

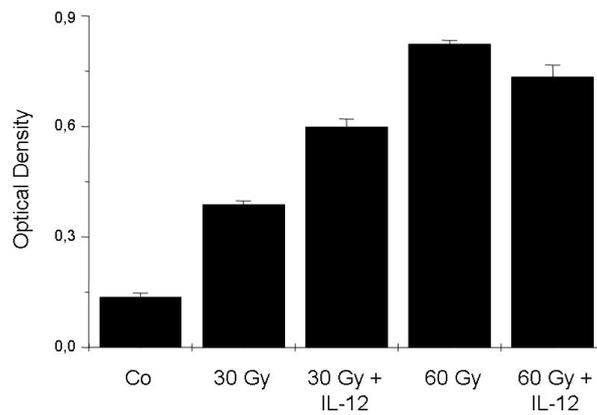


Abb. 2: KB-Zellen wurden 30 bzw. 60 Gy γ -Strahlung ausgesetzt. Jeweils eine Gruppe von Zellen wurde 3 Stunden vor und unmittelbar nach Bestrahlung mit rekombinatem humanem IL-12 (100 ng/ml) inkubiert. 16 Stunden später wurde die Apoptoserate mit einem DNA-Fragmentierungs-ELISA gemessen. Die y-Achse stellt die optische Dichte dar, die mit der DNA-Fragmentierung korreliert.

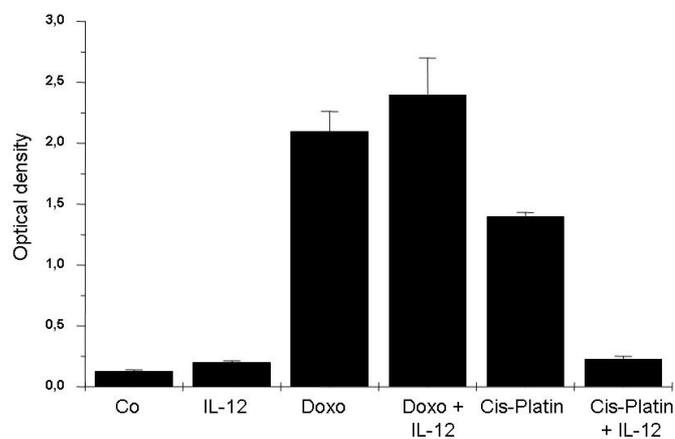


Abb. 3: KB-Zellen wurden mit Doxorubicin (Doxo, 10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Cis-Platin (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Jeweils eine Gruppe wurde zusätzlich mit IL-12 (100 ng/ml) behandelt. 16 Stunden später wurde die Apoptoserate mit einem DNA-Fragmentierungs-ELISA gemessen.

4.1.4. Induziert IL-12 global genome repair (GGR) oder transcription-coupled-repair (TCR)?

Sollte IL-12 zu einer Induktion des NER führen, dürfte der protektive Effekt von IL-12 in Zellen von XP-Patienten nicht zu beobachten sein. Dazu sollen Fibroblasten von XP-Patienten unterschiedlicher Komplementationstypen UVB-Strahlung in Gegenwart oder Absenz von IL-12 ausgesetzt und die Apoptoserate gemessen werden. Fibroblasten von gesunden Probanden sollten als Kontrolle dienen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine Reduktion der Sonnenbrandzellen bzw. eine Reduktion des DNA-Schadens durch IL-12 in *Xpa*-defizienten (-/-)-Mäusen zu beobachten ist. *Xpa*^{-/-} Mäuse sind durch einen Defekt im *XPA*-Gen sowohl im GGR als auch TCR inhibiert (Garssen et al., 2000). Fibroblasten erwiesen sich allerdings als äußerst resistent gegenüber Apoptose, sodass alternativ Untersuchungen mit peripheren mononukleären Zellen von XP-Patienten durchgeführt wurden. Die Inkubation UV-bestrahlter Leukozyten gesunder Probanden mit IL-12 führte zu einer deutlichen Reduktion des DNA-Schadens, wie im Southwestern-Dotblot gezeigt werden konnte, während der Effekt von IL-12 bei Leukozyten von XP-Patienten nicht zu beobachten war (Schwarz et al., 2002).

Eine Reduktion von UV-induzierter Apoptose bzw. von UV-induziertem DNA-Schaden durch IL-12 war in *Xpa*^{-/-} Mäusen nicht zu beobachten. Da diese Tiere über keinen funktionsfähigen NER verfügen, lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass IL-12 seinen Effekt über eine Induktion des NER vermitteln dürfte. Durch Verwendung von *Xpc*^{-/-} Mäusen, die lediglich einen Defekt im GGR aufweisen, sollte überprüft werden, ob IL-12 den TCR beeinflusst. Sollten protektive Effekte in *Xpc*^{-/-} Mäusen nachzuweisen sein, wäre dies ein Hinweis, dass IL-12 den TCR beeinflusst. Die Mäuse sollten im Rahmen einer Kooperation von H. van Steeg, Bilthoven, zur Verfügung gestellt werden. Allerdings kam es dabei zu einer Verzögerung, da der Tierstall, der SPF-Bedingungen aufweist, mehrmals wegen einer Kontamination desinfiziert und somit vorübergehend geschlossen werden musste.

Die Frage, ob IL-12 GGR oder TCR beeinflusst, konnte aber durch ein anderes Experiment indirekt beantwortet werden. UVB-Strahlung induziert eine Depletion der Langerhanszellen in der Epidermis. Da Langerhanszellen die primären Antigen-präsentierenden Zellen der Epidermis sind, erklärt dieses Phänomen zumindest partiell die immunsuppressive Wirkung von UVB-Strahlung. Wir konnten zeigen, dass IL-12 die Depletion von Langerhanszellen verhindert (Schwarz et al., 2005). Dies war

allerdings in *Xpa*^{-/-} Mäusen nicht zu beobachten, was den Schluss zulässt, dass UV-induzierter DNA-Schaden unmittelbar für das Auswandern der Langerhanszellen verantwortlich ist. Dementsprechend konnten die Zellen auch in den regionären Lymphknoten nachgewiesen werden. FACS-Doppelfärbungen zeigten, dass die Mehrzahl dieser Zellen UV-geschädigte DNA aufwies. Wurden die Mäuse mit IL-12 behandelt, war zwar die Anzahl der Langerhanszellen in den Lymphknoten nicht reduziert, sehr wohl aber die Menge des DNA-Schadens. In *Xpa*^{-/-} Mäusen war die Reduktion des DNA-Schadens in den Langerhanszellen durch IL-12 hingegen nicht zu beobachten (Schwarz et al., 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass DNA-Schaden für die Auswanderung der Langerhanszellen unmittelbar verantwortlich ist und IL-12 die Auswanderung durch Reduktion des DNA-Schadens verhindert. Kölgen und Mitarbeiter hatten beobachtet, dass die Auswanderung der Langerhanszellen TCR-abhängig ist (Kölgen et al., 2003). Da IL-12 die Auswanderung verhindert (Schwarz et al., 2005), kann indirekt daraus geschlossen werden, dass IL-12 in jedem Falle TCR induzieren dürfte. Detailergebnisse sind der Publikation "Prevention of UV radiation-induced immuno-suppression by IL-12 is dependent on DNA repair" erschienen 2005 in *The Journal of Experimental Medicine* (Band 201, Seiten 173-179) zu entnehmen.

4.1.5. Ist der Effekt von IL-12 in Melanozyten bzw. Melanomzellen zu beobachten?

Unsere bisherigen Voruntersuchungen wurden lediglich mit Keratinozyten bzw. hämatopoetischen Zellen durchgeführt. Sollte IL-12 tatsächlich zu einer Reduktion des DNA-Schadens über eine Induktion der endogenen Reparatur führen, wäre dies vor allem für Melanozyten von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu Keratinozyten sind Melanozyten nach UVB-Bestrahlung gegenüber Apoptose wesentlich resistenter (Gilchrest et al., 1999). Dies hat zur Folge, dass Melanozyten, auch wenn der DNA-Schaden nicht komplett repariert wurde, im Gegensatz zu Keratinozyten, die nun in die Apoptose getrieben werden, überleben und somit die Basis für maligne Entartung bilden. Eine Strategie, die DNA-Schäden in Melanozyten zu reduzieren, z.B. durch Induktion endogener Reparatur, wäre daher im Hinblick auf Prävention des Melanoms von großer Bedeutung. Um zu überprüfen, ob dies auf IL-12 zutreffen könnte, sollten humane Melanozyten UVB-Strahlung in Gegenwart oder Absenz von IL-12 ausgesetzt und anschließend die Apoptose-Rate sowie die Anzahl der DNA-Schäden bestimmt werden.

Um normale humane Melanozyten in die Apoptose zu treiben, waren höhere UVB-Dosen notwendig als für Keratinozyten. Die Zugabe von IL-12 führte zu einer Reduktion der UV-induzierten Apoptose, was zeigt, dass der Effekt von IL-12 für Keratinozyten nicht spezifisch ist. Ebenso konnte im Southwestern Dotblot beobachtet werden, dass die Menge des UVB-induzierten DNA Schadens in Melanozyten nach Zugabe von IL-12 deutlich reduziert werden kann (**Abb. 4**). Allerdings scheint die Kapazität von IL-12, UVB-induzierten DNA-Schaden zu reduzieren, begrenzt zu sein, da nach höheren UVB-Dosen (35 mJ/cm²) zwar reduzierte aber noch deutliche Mengen an DNA-Schaden zu finden war (**Abb. 4**).

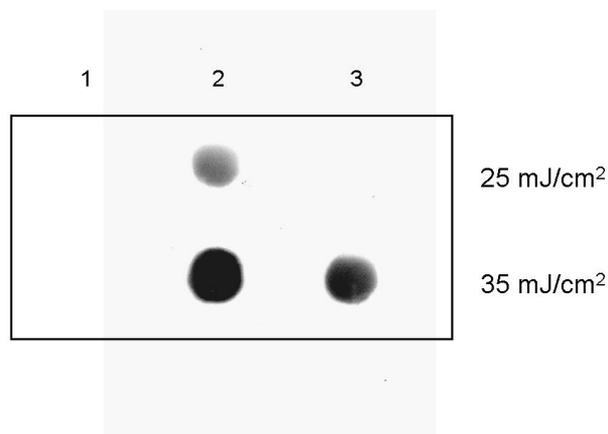


Abb. 4: Humane Melanozyten wurden mit 25 bzw. 35 mJ/cm² UVB (2,3) bestrahlt. 1,5 Stunden vor und unmittelbar nach Bestrahlung wurde rekombinantes humanes IL-12 (100 ng/ml) zugegeben (3). 6 Stunden später wurde DNA extrahiert und die Menge an DNA Schaden im Southwestern Dotblot unter Verwendung eines gegen Pyrimidindimere gerichteten Antikörpers bestimmt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (1).

Es stellte sich nun die Frage, ob ein ähnlicher Effekt wie mit IL-12 auch durch andere Mediatoren hervorgerufen werden kann. Alpha-Melanozyten-stimulierendes-Hormon (α MSH) ist ein Hormon, das die Produktion von Melanin in Melanozyten induziert. α MSH führte zu einer deutlichen Reduktion der UVB-induzierten Apoptose von Melanozyten (Böhm et al., 2005). Dies konnte sowohl in einem DNA-Fragmentierungs-ELISA als auch mit Annexin-V Färbung nachgewiesen werden. Diese Messungen wurden 24 Stunden nach UV-Bestrahlung durchgeführt, sodass nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, dass α MSH lediglich eine Verzögerung des Zelltodes verursacht. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da das Auswachsen von Kolonien UVB-bestrahlter Melanozyten nach drei Wochen in Ge-

genwart von α MSH im Vergleich zu nur UVB-bestrahlten Melanozyten deutlich erhöht war. Der protektive Effekt von α MSH kann nicht durch einen Zellzyklusarrest erklärt werden, da α MSH den Zellzyklus nicht beeinflusst. α MSH verändert auch nicht die Expression von Bcl₂, Bcl_x, Bax, p53, CD95 oder CD95L, so dass der protektive Effekt von α MSH nicht durch eine Veränderung pro- bzw. antiapoptotischer Proteine erklärt werden kann. Soutwestern-Dotblot-Analysen zeigten hingegen, dass α MSH ähnlich wie IL-12 die Menge UVB-induzierten DNA-Schadens deutlich reduziert (Böhm et al., 2005). Dies dürfte ebenfalls auf eine verstärkte Reparatur des DNA-Schadens zurückzuführen sein, zumal die Mengen des DNA-Schadens unmittelbar nach UV-Bestrahlung in der unbehandelten und der α MSH-exponierten Gruppe etwa gleich waren. Dies ließ ähnlich wie bei IL-12 eine Induktion des NER durch α MSH vermuten. Dies konnte durch Verwendung von Fibroblasten von XP-Patienten bewiesen werden. Fibroblasten exprimieren ebenfalls wie Melanozyten Rezeptoren für α MSH. α MSH war in der Lage, normale dermale Fibroblasten vor UVB-induzierter Apoptose signifikant zu schützen, während dieser Effekt in XPA-Fibroblasten nicht zu beobachten war. Dies lässt den Schluss zu, dass der protektive Effekt von α MSH auf eine Induktion des NER zurückzuführen ist. Diese Daten zeigen somit, dass die Induktion des NER nicht auf IL-12 beschränkt ist, sondern auch durch Neuropeptide wie z.B. α MSH induziert werden kann (Böhm et al, 2005). Detailergebnisse sind der Publikation " Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage" erschienen 2005 in *The Journal of Biological Chemistry* (Band 280, Seiten : 5795-5802) zu entnehmen.

Da Melanozyten bzw. Melanomzellen gegenüber UVB-induzierter Apoptose relativ resistent sind, wurde das Zusammenspiel von UVB-Strahlung und von Todesliganden bei der Induktion von Apoptose in Melanomzellen untersucht (Zeise et al., 2004). *Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) ist ein Todesligand, der Apoptose über die Aktivierung der TRAIL-Rezeptoren induziert. TRAIL induziert präferentiell Apoptose in Tumorzellen, nicht aber in normalen Zellen und wurde daher anfangs als das ideale Krebstherapeutikum gehandelt. Interessanterweise sind nicht alle Melanomzellen gegenüber TRAIL sensitiv. Welche Mechanismen dabei zugrunde liegen, ist vollkommen unklar. Im Rahmen der Untersuchungen des Effektes von Mediatoren auf UVB-induzierte Apoptose von Melanomzellen wurde beobachtet, dass TRAIL-resistente Melanomzellen durch sublethale Dosen von UVB-Strahlung gegenüber TRAIL extrem sensitiv werden (Zeise et al., 2004). Zusätzlich

führen die gleichen UVB-Dosen zu einer deutlichen Erhöhung der Sensitivität gegenüber TRAIL in TRAIL-empfindlichen Melanomzellen. FACS-Analysen konnten zeigen, dass dieser Effekt nicht auf eine differentielle Regulation der TRAIL-Rezeptoren zurückzuführen ist. Anhand von zwei selektierten Melanomzelllinien, einer TRAIL-sensitiven und einer -resistenten, konnte gezeigt werden, dass nur die resistente Linie eine Spleissvariante des FLIP Proteins (*FLICE inhibitory protein*) aufweist. Diese Variante vermittelt starke antiapoptotische Aktivität. Überexpression dieser Variante mittels Transfektion wandelte TRAIL-sensitive Zellen in resistente um. UVB-Bestrahlung hatte eine deutliche Reduktion der Expression von FLIP zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expressionsstärke und die Prozessierung von FLIP entscheiden, ob Melanomzellen gegenüber TRAIL resistent oder sensitiv sind. UVB-Strahlung scheint TRAIL-resistente Zellen durch Unterdrückung der Expression von FLIP in sensible umzuwandeln (Zeise et al., 2004). Detaillierergebnisse sind der Publikation "Resistance of human melanoma cells against the death ligand TRAIL is reversed by ultraviolet-B radiation via downregulation of FLIP " erschienen 2004 in *The Journal of Investigative Dermatology* (Band 123, Seiten : 746-754) zu entnehmen.

TRAIL dürfte aber auch eine Rolle bei der Entstehung von nicht-melanozytärem Hautkrebs spielen. Da TRAIL primär transformierte Zellen in die Apoptose treibt, normale Zellen aber schont, wurde untersucht, ob chronische UV-Bestrahlung die Expression von TRAIL unterdrückt. In Biopsien akuter UV-Bestrahlung (Sonnenbrand, polymorphe Lichtdermatose) war die Expression von TRAIL nicht verändert. Im Gegensatz dazu fand sich eine deutlich niedrigere Expression in Hautbiopsien chronisch UV-bestrahlter Areale älterer Personen (Ständer & Schwarz, 2005). Zusätzlich war TRAIL in aktinischen Keratosen, Basaliomen bzw. Plattenepithelkarzinomen fast überhaupt nicht exprimiert. Diese Untersuchungen lassen daher vermuten, dass chronische UVB-Bestrahlung die Expression von TRAIL unterdrückt und somit die Entstehung von Hauttumoren unterstützen könnte (Ständer & Schwarz, 2005). Detaillierergebnisse sind der Publikation "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer" erschienen 2005 in *The American Journal of Dermatopathology* (Band 27, Seiten : 116-121) zu entnehmen.

4.2. Teilprojekt B: Führt IL-12 zu einer Reduktion des Photokarzinogeneserisikos?

4.2.1 Schützt endogenes/konstitutives IL-12 vor UV-induzierten Tumoren?

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten vor einigen Jahren nachweisen, dass neben Makrophagen und dendritischen Zellen auch Keratinozyten die Fähigkeit besitzen, IL-12 zu sezernieren (Aragane et al., 1994; Müller et al., 1994). Es ist allerdings bis dato ungeklärt, ob die Produktion von IL-12 durch Keratinozyten *in vivo* von biologischer Relevanz ist. Aufgrund unserer bisherigen Beobachtungen wäre es daher vorstellbar, dass durch die konstitutive Produktion von IL-12 in der Epidermis die DNA-Reparatur induziert wird. Somit würde die endogene IL-12-Produktion einen protektiven Effekt vermitteln. Ob dies der Fall ist, sollte anhand von IL-12-defizienten (IL-12^{-/-}) Mäusen überprüft werden. IL-12^{-/-} Mäuse und Wildtypkontrollmäuse sollten unterschiedlichen Dosen von UVB-Strahlung ausgesetzt, 16 Stunden später Biopsien entnommen und die Anzahl der Sonnenbrandzellen evaluiert werden. Sollte die konstitutive IL-12-Produktion einen protektiven Effekt ausüben, müsste die Anzahl der Sonnenbrandzellen in IL-12^{-/-} Mäusen erhöht sein. IL-12^{-/-} Mäuse wiesen eine deutlich höhere Anzahl von Sonnenbrandzellen auf, was die dem Experiment zugrunde liegende Hypothese bestätigte (Schwarz et al., 2002).

Um zu überprüfen, ob IL-12^{-/-} Mäuse eine erhöhte Inzidenz von UV-induzierten Hauttumoren aufweisen, wurden die Tiere nach einem etablierten Regime für 6 Monate einer UVB-Strahlung ausgesetzt (Beissert et al., 1999). Initial wurden 5 kJ/m² UVB appliziert, die Dosis wurde stufenweise bis auf 20 kJ/m² gesteigert. Nach etwa 200 Tagen traten die ersten Tumoren auf. Eine Kaplan-Meier Analyse ergab für IL-12^{-/-} Mäuse ein signifikant erhöhtes Risiko UV-induzierte Tumoren zu entwickeln (**Abb. 5A**). Zusätzlich war die Anzahl der Tumoren in den IL-12^{-/-} Mäusen deutlich erhöht (**Abb. 5B**).

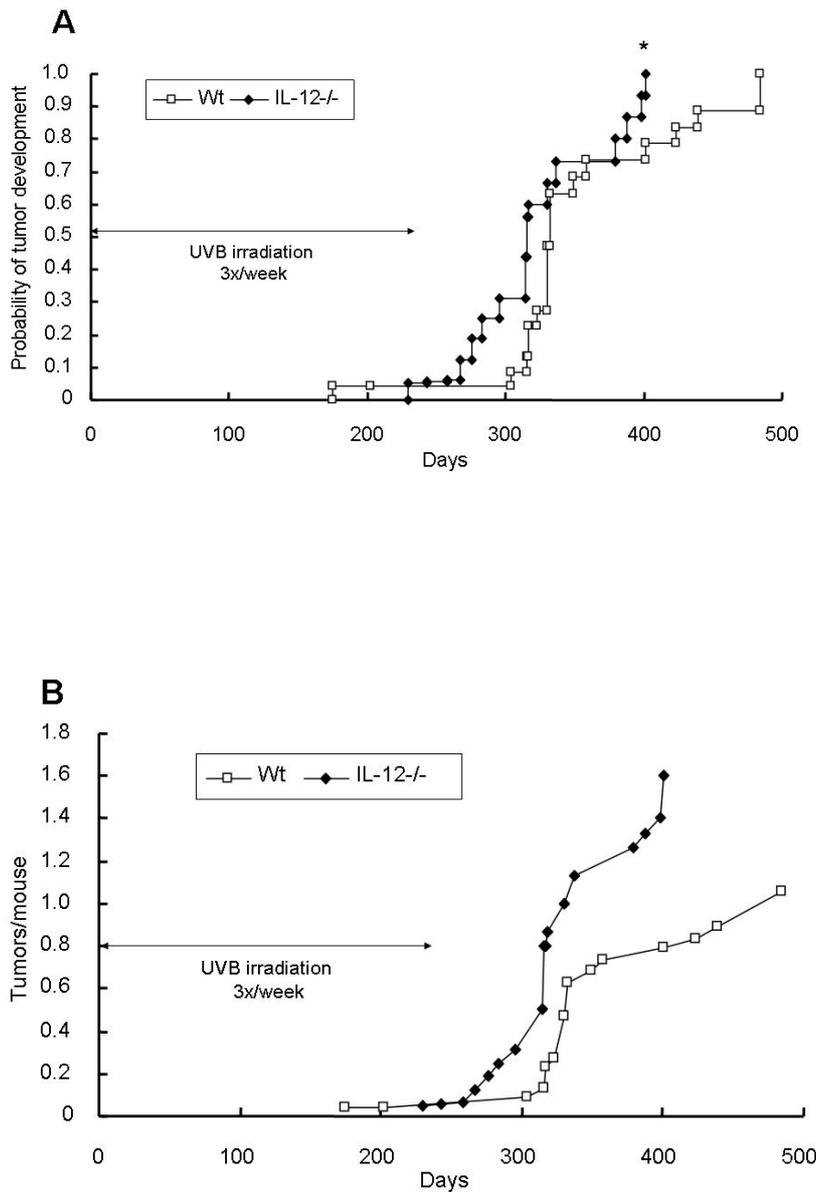


Abb. 5: IL-12^{-/-} und Wildtypmäuse (C57BL/6, Wt) wurden mit 5 kJ/m² UVB 3x pro Woche am rasierten Rücken bestrahlt. Die Dosis wurde stufenweise bis auf 20 kJ/m² gesteigert. Die Mäuse wurden wöchentlich auf die Entwicklung von Hauttumoren untersucht. Die Wahrscheinlichkeit Tumoren zu entwickeln, wurde mit der Kaplan-Meier Analyse bestimmt (**A**). Zusätzlich wurde die durchschnittliche Anzahl der Tumoren pro Maus für jede Gruppe wöchentlich bestimmt (**B**). * p = 0,033

Tumoren, die in den IL-12^{-/-} Mäusen entstanden, wiesen ein deutlich aggressiveres Wachstumsverhalten auf. Wurden diese Tumoren in immundefiziente *nu/nu* Mäuse transplantiert, wuchsen diese wesentlich rascher als jene Tumoren, die in UVB-bestrahlten Wildtypmäusen entstanden (**Abb. 6**).

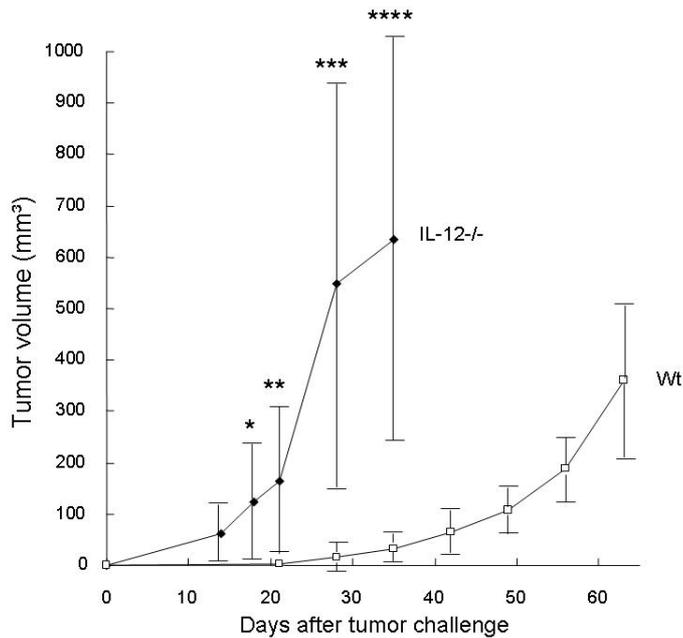


Abb. 6: UVB-induzierte Tumoren wurden von IL-12^{-/-} bzw. Wildtyp (Wt)-Mäusen entnommen. Tumoren mit einem Durchmesser von 3 mm wurden in immundefiziente *nu/nu* Mäuse subcutan transplantiert. Das Wachstum jedes Tumors wurde wöchentlich überprüft und das mittlere Tumolvolumen planimetrisch bestimmt.

*, ** p < 0,0001; ***, **** p < 0,00001

Das aggressivere Wachstumsverhalten der Tumoren der IL-12^{-/-} Mäuse konnte auch in einem elektrophysiologischen Assay nachgewiesen werden. Dieser Assay misst die Zerstörung eines Nierenepithelzellrasens durch Tumorzellen. Je aggressiver die eingesäten Tumorzellen diesen Zellrasen durchdringen, umso größer ist die Reduktion der transepithelialen Spannung bedingt durch das Öffnen der Zellverbindungen (*tight junctions*) des Zellrasens. Die Reduktion der transepithelialen Spannung war signifikant stärker ausgeprägt, wenn Tumorzellen von IL-12^{-/-} Mäusen als von Wildtypmäusen eingesät wurden (**Abb. 7**). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass eine IL-12-Defizienz mit einem erhöhten Risiko UV-induzierten Hautkrebs zu entwickeln, einhergeht. Umgekehrt kann vermutet werden, dass eine Überexpression von IL-12 vor UV-induziertem Hautkrebs schützen könnte.

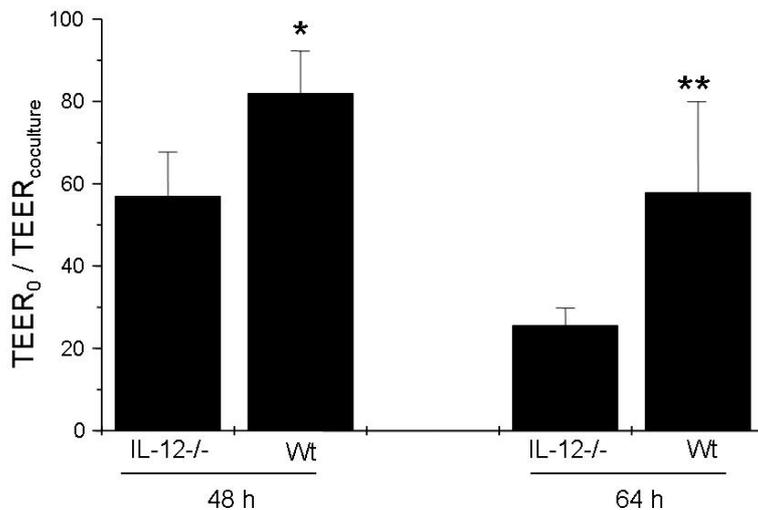


Abb. 7: Tumorzellen wurden sowohl von IL-12^{-/-} als auch von Wt-Mäusen gewonnen. Tumorzellsuspensionen wurden auf Nierenepithelzellrasen ausgesät und anschließend die Veränderung der transepithelialen Spannung bestimmt. Die Werte der y-Achse stellen den Quotienten der Spannungen vor und nach Einsäen der Tumorzellen dar. Je niedriger der Quotient liegt, umso stärker ist das Invasionsverhalten der eingesäten Tumorzellen.

* $p = 0,014$ ** $p = 0,04$

4.2.2 Kann der protektive Effekt durch endogen induziertes IL-12 mediert werden?

Die praktische Anwendung von IL-12 im Sinne eines prophylaktisch/therapeutischen Schrittes wird nur im Rahmen einer topischen Applikation möglich sein, da eine intrakutane Injektion, wie in den Tierversuchen vorgesehen, nicht realisierbar ist. Aber auch bei der topischen Applikation sind Probleme abzusehen, zumal die Penetration von IL-12 als hochmolekulare Substanz nicht unproblematisch und außerdem IL-12 als heterodimeres Zytokin in seinen Herstellungskosten extrem teuer ist. Da Keratinozyten die Fähigkeit besitzen, IL-12 zu produzieren, sollte überprüft werden, ob die Induktion von endogenem IL-12 einen ähnlichen protektiven Effekt ausüben kann wie die exogene Applikation. Eine ähnlich erfolgreiche Anwendung wurde unlängst bezüglich Interferon- γ mit Imiquimod realisiert (Sauder, 2000).

Neben den konventionellen Schutzmaßnahmen (Sonnenschutzcremes, textiler Sonnenschutz, etc.) gewinnt in der Prävention von UV-induzierten Hautschäden die Chemoprävention immer mehr an Bedeutung. Darunter versteht man Prävention

durch diätetische bzw. medikamentöse Maßnahmen. Gerade die diätetischen Maßnahmen stoßen in der Bevölkerung auf große Resonanz. In diesem Zusammenhang erscheint grüner Tee, der vor allem in den asiatischen Ländern sehr populär ist, von potentiell Interesse (Yang & Wang, 1993). Die chemopräventive Wirkung von grünem Tee wird auch durch einige epidemiologische Studien belegt (Katiyar et al., 1996). In einer kürzlich publizierten Studie zeigte sowohl die systemische als auch die topische Applikation von grünem Tee bzw. der darin enthaltenen Phenole (*green tea phenols*, GTP) im Tiermodell eine Reduktion der Sonnenbrandzellen nach UV-Bestrahlung (Elmets et al., 2001). Interessanterweise war auch eine Reduktion des UV-induzierten DNA-Schadens zu beobachten. Da ein UV-filternder Effekt von grünem Tee ausgeschlossen werden konnte, sind diese Ergebnisse nur durch eine Verstärkung der DNA-Reparatur zu erklären. Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob der protektive Effekt von grünem Tee indirekt auf die Wirkung von IL-12 zurückzuführen ist. Dazu sollten Keratinozyten mit GTP (Mitsui Norin Company, Shizuoka, Japan) stimuliert und anschließend die Freisetzung von IL-12 überprüft werden. Zusätzlich sollte der Effekt von GTP auf UVB-induzierte Apoptose und DNA-Schaden untersucht werden. GTP beinhalten (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin, (-)-Epicatechin-3-Gallate und (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (95%-ige Reinheit).

Inkubation von Keratinozyten bzw. von aus *buffy coat* mittels Dichtegradienten-zentrifugation gewonnenen Makrophagen mit GTP führte zu einer Induktion von IL-12. Allerdings waren die freigesetzten Mengen vor allem von Keratinozyten sehr gering und befanden sich im unteren Detektionsbereich des eingesetzten ELISAs (**Abb. 8**).

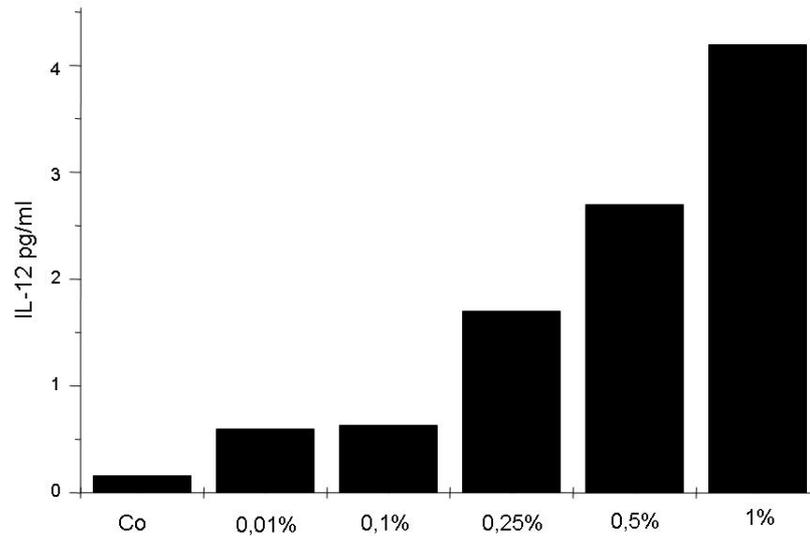


Abb. 8: Normale humane Keratinozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von GTP inkubiert und 12 Stunden später die Überstände gewonnen. Die Menge von freigesetztem IL-12 wurde mittels ELISA bestimmt.

Nach Inkubation mit GTP war die Absterberate nach UV-Bestrahlung deutlich reduziert (Matsui et al., 2003), was in Einklang mit den Beobachtungen von Elmets und Mitarbeitern (2001) steht. KB-Zellen wurden mit UVB bestrahlt und zusätzlich unterschiedlichen Konzentrationen von GTP ausgesetzt. Die Absterberate wurde durch Annexin V Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Messung bestimmt. GTP führten in dosisabhängiger Weise zu einer Reduktion des UVB-induzierten Zelltodes (**Abb. 9**). Diese Daten konnten auch mit anderen Todesdetektionssystemen wie z.B. DNA-Fragmentierungs-ELISA bestätigt werden.

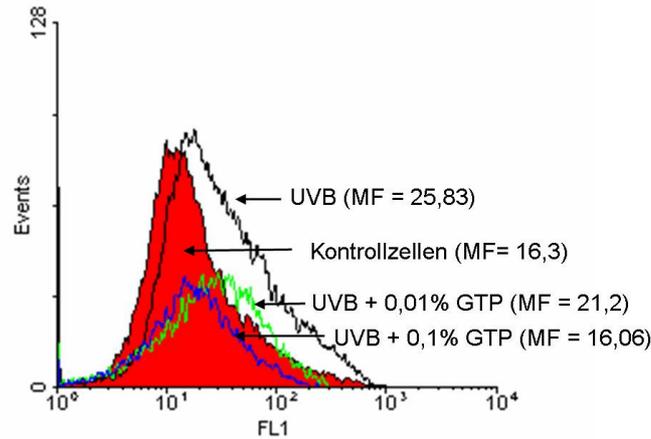


Abb. 9: Normale humane Keratinozyten wurden mit UVB (30 mJ/cm^2) bestrahlt. Unmittelbar nach Bestrahlung wurden GTP (0,1%, 0,01%) zugegeben. 16 Stunden später wurde die Apoptoserate nach Annexin V Färbung durchflusszytometrisch gemessen. (MF, mean fluorescence intensity).

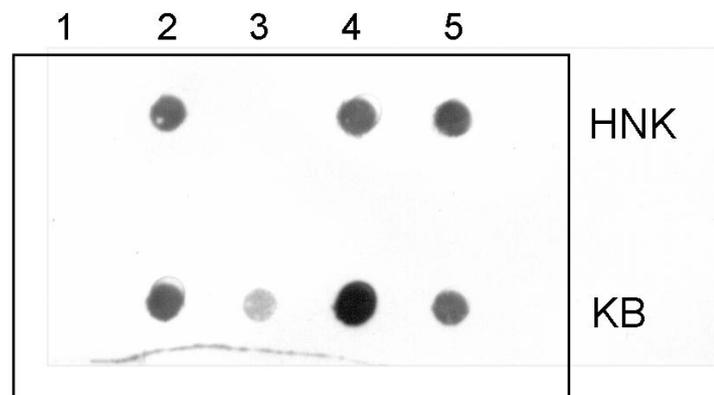


Abb. 10: Normale humane Keratinozyten (HNK) und KB-Zellen wurden mit 15 (2,3) bzw. 25 mJ/cm^2 UVB (4,5) bestrahlt. Unmittelbar nach Bestrahlung wurden GTP (0,5%) (3,5) zugegeben. 3,5 Stunden später wurde DNA extrahiert und die Menge an DNA Schaden im Southwestern Dotblot unter Verwendung eines gegen Pyrimidindimere gerichteten Antikörpers bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (1).

Im Southwestern Dotblot konnte ebenfalls eine Reduktion des UV-induzierten DNA-Schadens nach Zugabe von GTP beobachtet werden (**Abb. 10**). Immunhistochemische Analysen waren nicht möglich, da GTP eine braune Eigenfarbe aufwei-

sen, so dass dieser Farbhintergrund mit der braunen Anfärbung des DNA-Schadens in den Zellkernen stark interferierte.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass GTP IL-12 induzieren, UV-induzierte Apoptose verhindern und UV-induzierten DNA-Schaden reduzieren. Da IL-12 DNA-Reparatur induziert, ist die Spekulation nahe liegend, dass GTP den Effekt auf UV-induzierte Apoptose und DNA-Schaden über die Freisetzung von IL-12 mediiert. Sollte dies der Fall sein, müsste der Effekt von GTP durch Blockade von IL-12 zu verhindern sein. Die Ergebnisse von Neutralisationsversuchen mit IL-12-Antikörpern waren jedoch nicht eindeutig, so dass derzeit versucht wird, IL-12 mittels siRNA-Technologie zu blockieren.

4.3. Teilprojekt C: Ist die Regulation der DNA Reparatur individuellen Schwankungen unterlegen und somit als Parameter zur Risikoabschätzung für UV-induzierten Hautkrebs geeignet?

Ziel dieses Teilprojektes war es festzustellen, ob die Regulation der DNA Reparatur bzw. das Ansprechen auf IL-12 als Risikoparameter für Hautkrebs dienen kann. Die Frage, ob die DNA-Reparatur individuellen Schwankungen unterliegt, sollte an Material von gesunden Probanden überprüft werden. Da die Gewinnung von Keratinozyten eine Hautbiopsie erfordern würde, dies ethisch schlecht vertretbar ist und auch die Menge des Materials limitiert wäre, sollten diese Untersuchungen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus dem Blut durchgeführt werden. In Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass der Effekt von UVB bzw. IL-12 auf NER-Komponenten auch in hämatopoetischen Zellen nachzuweisen ist. PBMC wurden mittels Dichtgradientenzentrifugation gewonnen, nach Waschen in gepufferter Kochsalzlösung resuspendiert und mit UVB bestrahlt. 3,5 Stunden später wurde DNA extrahiert und die Menge UVB-induzierten DNA Schadens im Southwestern Dotblot analysiert. Der Zeitpunkt von 3,5 Stunden wurde deshalb gewählt, weil wir aus Voruntersuchungen wussten, dass zu diesem Zeitpunkt ein wesentlicher Teil der Pyrimidindimere durch den NER bereits entfernt wurde. Die Intensität der jeweiligen Dots war deutlich mit der Stärke der UVB-Strahlung korreliert. Bei allen Proben war eine Reduktion des DNA-Schadens nach 3,5 Stunden zu beobachten. Es lagen auch deutliche interindividuelle Schwankungen vor, was für eine unterschiedliche individuelle Reparaturkapazität spricht (Abb. 11). Allerdings stellte sich heraus, dass der Southwestern Dotblot als semiquantitatives Verfahren nicht sensitiv genug ist, um quantitative Aussagen zuzulassen. Gleiches galt für die Induktion der DNA-Reparatur

durch IL-12, obwohl eine Reduktion des DNA-Schadens beobachtet werden konnte, was die dem Antrag zugrunde liegende Hypothese, dass IL-12 DNA-Reparatur induziert, weiter bestätigt.

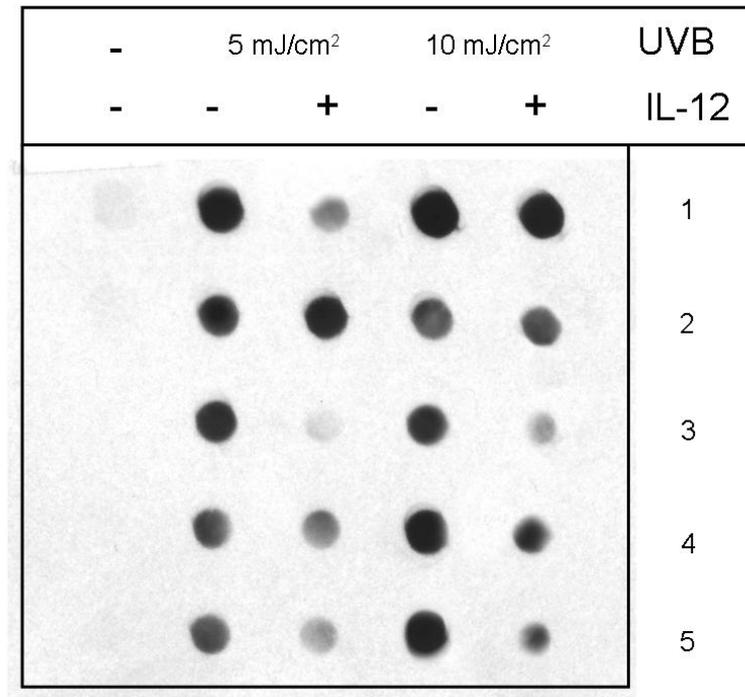


Abb. 11: Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden von gesunden Probanden (1-5) mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in gepufferter Kochsalzlösung resuspendiert und mit UVB (5 mJ/cm², 10 mJ/cm²) bestrahlt. 1,5 Stunden vor und unmittelbar nach Bestrahlung wurde rekombinantes humanes IL-12 (100 ng/ml) zugegeben. 3,5 Stunden nach Bestrahlung wurde DNA extrahiert und die Menge an DNA-Schaden im Southwestern Dotblot unter Verwendung eines gegen Pyrimindimere gerichteten Antikörpers bestimmt.

5. Diskussion und Ausblick

Das vorliegende Vorhaben beruht auf der Beobachtung, dass das Zytokin IL-12 DNA-Reparatur induziert (Schwarz et al., 2002). Dies war insofern eine überraschende Beobachtung, als man bis zu diesem Zeitpunkt davon ausging, dass die endogene Reparatur, der NER, als essentielles Reparatursystem konstitutiv exprimiert wird und somit keiner Regulation unterliegt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Barbara Gilchrest konnten erstmals zeigen, dass der NER durch DNA-Bruchstücke induziert werden kann (Eller et al., 1997). Die Beobachtung, dass der NER induzierbar bzw. einer exogenen Regulation unterliegt, hat für die praktische

Photobiologie besondere Implikationen. Steigerung der DNA-Reparatur mit dem Fernziel UV-induzierte DNA-Schäden auf ein Minimum zu reduzieren, ist eine wesentliche Strategie innovativen Sonnenschutzes. Es ist bereits möglich DNA-Schaden durch Applikation exogener z.B. bakterieller DNA-Reparaturenzyme zu reduzieren (Yarosh et al, 1994). Ähnliches wurde auch für das Reparaturenzym Photolyase berichtet (Stege et al., 2000). Dies ist insofern eine wichtige Strategie, zumal wir wissen, dass konventioneller Sonnenschutz durch die durchaus wirksamen Sonnenschutzmittel nicht 100%-ig ist. Eine Induktion der endogenen Reparaturmechanismen, insbesondere des NER, würde daher eine neue Säule des alternativen Sonnenschutzes darstellen.

Die Beobachtung, dass der NER einer Regulation unterliegt, lässt daher auch vermuten, dass individuelle Unterschiede in der Reparaturkapazität bestehen. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Reparaturkapazität mit zunehmendem Alter abnimmt (Goukassian et al., 2000). Umso wichtiger erscheint es, nach Strategien zu suchen, dies zu kompensieren.

Es war daher das Ziel dieses Projektes, die Mechanismen aufzuklären, auf welche Weise IL-12 den NER induziert und ob endogenes IL-12 vor der Entstehung von UV-induziertem Hautkrebs schützt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Kapazität, UV-induzierten DNA-Schaden zu reparieren, einer individuellen Schwankung unterliegt, mit dem Fernziel dies als Risikoparameter für UV-induzierten Hautkrebs zu nützen.

Das vorliegende Projekt konnte die anfangs doch sehr überraschende Beobachtung, dass IL-12 den NER induziert, weiter bestätigen. Der Effekt von IL-12 auf die DNA-Reparatur scheint für den NER spezifisch zu sein, zumal IL-12 keinen Effekt auf durch UVA- bzw. γ -Strahlung induzierten DNA-Schaden hat. Diese Schäden werden durch andere Reparaturmechanismen z.B. *base excision repair* repariert. Es bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten zu zeigen, ob auch diese Reparaturmechanismen einer Regulation unterliegen. Der Effekt von IL-12 ist nicht für Keratinozyten spezifisch, da die Reduktion UV-induzierten DNA-Schadens auch in peripheren mononukleären Zellen und in Melanozyten beobachtet werden konnte.

So faszinierend die topische Applikation von IL-12 als alternative Protektionsstrategie gegenüber UVB-Strahlung erscheinen mag, muss doch kritisch zur Kennt-

nis genommen werden, dass IL-12 für die topische Applikation nicht besonders geeignet sein dürfte. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, das aus zwei Ketten p35 und p40 besteht und eine Größe von etwa 70 kD aufweist. Die Penetration eines solch großen Moleküls nach topischer Applikation erscheint problematisch. Als Alternative erscheint die Induktion von endogenem IL-12. Es war daher das Ziel dieses Vorhabens zu klären, ob endogenes IL-12 vor Photokarzinogenese schützt. Dazu wurden IL-12^{-/-} Mäuse verwendet.

Diese Mäuse produzieren kein funktionelles IL-12, da sie nicht in der Lage sind die p40-Kette dieses heterodimeren Zytokins zu exprimieren. IL-12^{-/-} Mäuse wiesen eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Keratinozyten (Sonnbrandzellen) nach UVB-Bestrahlung auf (Schwarz et al., 2002). Da die Menge des DNA-Schadens der wesentliche Faktor ist, ob eine Zelle in die Apoptose geht oder nicht, konnte daraus geschlossen werden, dass IL-12^{-/-} Mäuse DNA-Schaden weniger effizient reparieren als Wildtyp-Kontrollmäuse. Um zu überprüfen, ob endogenes IL-12 vor Photokarzinogenese schützt, wurden IL-12^{-/-} Mäuse einer chronischen UVB-Bestrahlung für 6 Monate ausgesetzt. Es wurde ein Regime gewählt, das innerhalb von etwa 6 bis 8 Monaten Hauttumoren induziert. IL-12^{-/-} Mäuse entwickelten Hauttumoren nicht nur früher, sondern wiesen auch eine durchschnittlich höhere Anzahl an Tumoren auf. Zusätzlich war das Wachstumsverhalten jener Tumoren, die aus IL-12^{-/-} Mäusen gewonnen wurden, wesentlich aggressiver. Dies konnte sowohl *in vivo* durch Transplantation in immundefizienten *nu/nu* Mäuse als auch *in vitro* mittels eines elektro-physiologischen Zellinvasionsassays nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen daher, dass endogenes IL-12 vor Photokarzinogenese schützt. Ob eine Überexpression von IL-12 die Inzidenz von UVB-induzierten Tumoren reduziert, könnte nur durch Bestrahlung von transgenen Mäusen, die IL-12 selektiv in der Epidermis exprimieren, überprüft werden. Allerdings stehen diese Mäuse nicht zur Verfügung, da die selektive Überexpression von zwei Proteinen, IL-12 ist ja ein heterodimeres Zytokin, nicht einfach ist. Es existiert derzeit lediglich eine transgene Maus, die in der Epidermis die p40 Kette überexprimiert (Kopp et al., 2001). Allerdings sind diese Tiere für unsere Fragestellung ungeeignet, da die selektive Expression von p40 zur Bildung von p40 Homodimeren führt, die keine agonistische sondern antagonistische Wirkung ausüben (Germann et al., 1995)

Eine der essentiellen Funktionen von IL-12 ist die Induktion von Immunantworten. Es wird daher vermutet, dass die Überexpression von IL-12 die Induktion von

Autoimmun- bzw. Entzündungsreaktionen zur Folge haben könnte. Neutralisation von IL-12 ist daher eine aktuelle Strategie immunmedierte Erkrankungen wie z.B. die Psoriasis vulgaris zu behandeln (Nestle & Conrad, 2004). Es stellt sich daher die Frage, ob topische Applikation von IL-12 nicht die Gefahr der Induktion von Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen birgt. Dies ist insofern berechtigt, als die Epidermis ein Organ ist das eine Tendenz zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen aufweist. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass alleine die Überexpression eines einzigen costimulatorischen Moleküls ausschließlich in der Epidermis zur Induktion von systemischer Autoimmunität führt. Transgene Mäuse, die das costimulatorische Molekül CD40-Ligand in der basalen Epidermis exprimieren, entwickeln innerhalb weniger Monate eine systemische Autoimmunerkrankung mit Nieren- und Lungenbeteiligung vergleichbar einem systemischen Lupus erythematosus (Mehling et al., 2001). Aus diesem Grunde war es nahe liegend zu untersuchen, ob nicht andere Mediatoren ebenfalls die Eigenschaft aufweisen, den NER zu induzieren.

Nachdem wir zeigen konnten, dass der Effekt von IL-12 nicht für Keratinozyten spezifisch, sondern auch in Melanozyten zu beobachten ist, waren wir interessiert, den Effekt von α MSH auf den NER zu überprüfen. α MSH ist ein Proopiomelanocortin, das die Melanogenese induziert. Zusätzlich wird vermutet, dass α MSH das Überleben bzw. die Proliferation von Melanozyten unterstützt. α MSH reduzierte signifikant den UVB-induzierten DNA-Schaden in Melanozyten. Dies ist vermutlich auf eine Induktion des NER zurückzuführen, da dieser Effekt von α MSH in Fibroblasten von XP-Patienten nicht zu beobachten war. In Kontrollfibroblasten war der Effekt von α MSH hingegen zu beobachten. Dies zeigt zusätzlich, dass der Effekt von α MSH nicht nur auf Melanozyten beschränkt ist, sondern auch andere Zellen betrifft, die α MSH-Rezeptoren exprimieren. Da Keratinozyten ebenfalls α MSH-Rezeptoren exprimieren, ist anzunehmen, dass α MSH die gleichen Effekte wie IL-12 *in vivo* ausüben dürfte. Im Gegensatz zu IL-12 ist α MSH, was die potentielle praktische Anwendung betrifft, ein wesentlich unproblematischerer Mediator, da es keine proinflammatorische bzw. Autoimmunität-induzierende Aktivität aufweist und zusätzlich als relativ kleines Molekül wesentlich geeigneter für eine topische Applikation erscheint.

Zusammenfassend lassen sich die Untersuchungen dieses Projektes auf folgende Aussagen verdichten: a) NER ist exogen induzierbar. Dies stellt eine bisher nicht bekannte neue Strategie für UV-Protektion dar. b) Die Induktion des NER ist

nicht auf IL-12 beschränkt. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, für welche endogenen aber auch exogenen Substanzen dies ebenfalls zutrifft.

Aufgrund der Beobachtung, dass der NER einer Regulation unterliegt, war es nahe liegend zu untersuchen, ob der NER individuellen Schwankungen unterliegt bzw. ob dies als Parameter für das Risiko Hautkrebs zu entwickeln herangezogen werden kann. Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass der NER konstitutiv exprimiert wird und daher keinen Schwankungen unterliegt, konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass offensichtlich der NER bei verschiedenen Individuen unterschiedlich ausgeprägt ist. Allerdings erwies sich der in diesem Projekt eingesetzte Southwestern Dotblot als nicht geeignet, geringe quantitative Unterschiede zu detektieren, zumal es sich hierbei lediglich um ein semiquantitatives Verfahren handelt. Es wurde beobachtet, dass die Kapazität des NER mit zunehmendem Alter abnimmt (Goukassian et al., 2000). Diese Untersuchungen inklusive jener dieses Vorhabens zeigen daher, dass die Kapazität des NER prinzipiell geeignet erscheint, als prädiktiver Parameter für das Hautkrebsrisiko zu fungieren. Allerdings müssen dazu in Zukunft geeignete Testsysteme etabliert werden, die nicht nur sehr sensitiv sind sondern auch leicht handhabbar sind. Ohne diese beiden Voraussetzungen, dies gilt insbesondere für die Anwendbarkeit, da ein solcher Test als Screeningverfahren eingesetzt werden müsste, scheint die praktische Anwendung limitiert. Es ist zukünftigen Vorhaben vorbehalten, diese Voraussetzungen zu schaffen. Sollte dies gelingen, wäre dies ein erheblicher Beitrag, UV-induziertem Hautkrebs, der in einigen Ländern bereits an erster Stelle der Krebsstatistik steht, in prophylaktischer und prädiktiver Weise entgegenzutreten.

6. Bisherige Publikationen

Matsui, MS., A. Schwarz, D. Gan, T. Mammone, N. Gross, S. Staender, T. Schwarz: Polyphenols extracted from green tea reduce UV-induced apoptosis of keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121: 192 (2003 abstr)

Zeise, E., M. Weichenthal, T. Schwarz, D. Kulms: Resistance of human melanoma cells against the death ligand TRAIL is reversed by ultraviolet-B radiation via downregulation of FLIP. *J. Invest. Dermatol.* 123: 746-754 (2004)

Pöppelmann, B., K. Klimmek, E. Strozyk, R.Voss, T. Schwarz, D. Kulms: NFκB-dependent downregulation of TRAF proteins contributes to IL-1-mediated enhancement of UVB-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280: 15635-15643 (2005)

Schwarz, A., A. Maeda, K. Kernebeck, H. van Steeg, S. Beissert, T. Schwarz: Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J. Exp. Med.* 201: 173-179 (2005)

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

Ständer, S., T. Schwarz: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer. *Am. J. Dermatopathol.* 27: 116-121 (2005)

7. Zitierte Literatur

(eigene Arbeiten mit * gekennzeichnet)

- *Aragane Y, Riemann H, Bhardwaj RS, Schwarz A, Sawada Y, Yamada H, Luger TA, Kubin M, Trinchieri G, Schwarz T. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol.* 1994; 153:5366-5372
- *Aragane, Y., A. Schwarz, T.A. Luger, K. Ariizumi, A. Takashima, T. Schwarz: Ultraviolet light suppresses interferon- γ induced interleukin 7 release from murine keratinocytes by interfering with interferon regulatory factors. *J. Immunol.* 1997; 158: 5393-5399
- *Aragane Y, Kulms D, Metze D, Kothny G, Pöppelmann B, Luger TA, Schwarz T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (FAS/APO-1) independently from its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* 1998; 140:171-182.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999; 18:6910-6924.
- *Beissert S, Bluestone JA, Mindt I, Voskort M, Metze D, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Reduced UV-induced carcinogenesis in mice with a functional disruption in B7-mediated costimulation. *J Immunol.* 1999; 163: 6725-6731.
- Berneburg M, Lowe JE, Nardo T, Araujo S, Fousteri MI, Green MH, Krutmann J, Wood RD, Stefanini M, Lehmann AR. UV damage causes uncontrolled DNA breakage in cells from patients with combined features of XP-D and Cockayne syndrome. *EMBO J.* 2000; 19:1157-66.
- Berneburg M, Lehmann AR. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet.* 2001; 43:71-102.
- *Böhm, M., Wolff , Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, Schwarz T, Schwarz A. Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5795-5802.

- de Boer J, Hoeijmakers JH. Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair. *Biochimie*. 1999;81: 127-37.
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. 1999; 13:768-785.
- Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79: 2018-22.
- Eller MS, Maeda T, Magnoni C, Atwal D, Gilchrest BA. Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 12627-12632
- Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 44: 425-32.
- Garbe C. Epidemiologie des Hautkrebses. In: Dermatologische Onkologie. C. Garbe, R. Dummer, R. Kaufmann, W. Tilgen (Hrsg.). Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1997; 4: 40-56.
- Germann T, Rude E, Mattner F, Gately MK. The IL-12 p40 homodimer as a specific antagonist of the IL-12 heterodimer. *Immunol Today*. 1995; 16: 500-1.
- Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1341-1348.
- Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrest BA. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J*. 2000; 14:1325-34
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411: 366-374.
- Katiyar SK, Mukhtar H. Tea in chemoprevention of cancer: Epidemiologic and experimental studies. *Int J Oncol*. 1996; 8: 221-238.
- Kibitel J, Hejmadi V, Alas L, O'Connor A, Sutherland BM, Yarosh D. UV-DNA damage in mouse and human cells induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Photochem Photobiol*. 1998;67: 541-6.

Kölgen, W., H. van Steeg, G.T. van der Horst, J.H. Hoeijmakers, W.A. van Vloten, F.R.de Gruijl, and J. Garssen. Association of transcription-coupled repair but not global genome repair with ultraviolet-B-induced Langerhans cell depletion and local immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 121: 751-756.

Kopp T, Kieffer JD, Rot A, Strommer S, Stingl G, Kupper TS. Inflammatory skin disease in K14/p40 transgenic mice: evidence for interleukin-12-like activities of p40. *J Invest Dermatol.* 2001;117: 618-26

*Kothny-Wilkes G, Kulms D, Pöppelmann B, Luger TA, Kubin M, Schwarz T. Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1998; 273: 29247-29253.

*Kothny-Wilkes G, Kulms D, Luger TA, Kubin M, Schwarz T. Interleukin-1 protects transformed keratinocytes from TRAIL- and CD95- but not from ultraviolet radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999; 274: 28916-28921.

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

Kripke ML. Immunology and photocarcinogenesis. New light on an old problem. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1986; 14: 149-155.

Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB. Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992; 89: 7516-7520.

*Kulms D, Pöppelmann B, Schwarz T. Ultraviolet radiation-induced interleukin 6 release in HeLa cells is mediated via membrane events in a DNA damage independent way. *J Biol Chem.* 2000; 275: 15060-15066.

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

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

- *Mehling, A., K. Loser, G. Varga, D. Metzger, T.A. Luger, T. Schwarz, S. Grabbe, S. Beissert: Overexpression of CD40L in murine epidermis results in chronic skin inflammation and systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2001; 194: 615-628.
- Mitchell DL, Byrom M, Chiarello S, Lowery MG. Effects of chronic exposure to ultraviolet B radiation on DNA repair in the dermis and epidermis of the hairless mouse. *J Invest Dermatol.* 2001; 116: 209-215.
- Müller G, Saloga J, Germann T, Bellinghausen I, Mohamadzadeh M, Knop J, Enk AH. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1799-1805.
- *Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol.* 2001; 10: 155-160.
- Nestle FO, Conrad C. The IL-12 family member p40 chain as a master switch and novel therapeutic target in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2004;123: xiv-xv.
- *Neuner P, Charvat B, Knobler R, Kirnbauer R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. Cytokine release by peripheral blood mononuclear cells is affected by 8-methoxypsoralen plus UV-A. *Photochem Photobiol.* 1994;59: 182-8.
- Nishigori C, Yarosh SB, Ullrich SE, Vink AA, Bucana CB, Roza L, Kripke ML. Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 10354-10359.
- Patrick MH. Studies on thymine-derived UV photoproducts in DNA--I. Formation and biological role of pyrimidine adducts in DNA. *Photochem Photobiol.* 1977; 25, 357-372.
- *Pöppelmann, B., K. Klimmek, E. Strozzyk, R. Voss, T. Schwarz, D. Kulms: NFκB-dependent downregulation of TRAF proteins contributes to IL-1-mediated enhancement of UVB-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 15635-15643.
- Rehmtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit VM. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J Biol Chem.* 1997; 272: 25783-6.
- Sauder DN. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43: S6-11.

- *Schwarz, A., R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T.A. Luger, T. Schwarz: UVB induced apoptosis of keratinocytes. Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor α in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol.* 1995; 104: 922-927.
- *Schwarz A., Grabbe St, Aragane Y, Sandkuhl K, Riemann H, Luger TA, Kubin M, Trinchieri G, Schwarz T. IL-12 prevents ultraviolet-B induced local immunosuppression and breaks ultraviolet-B induced tolerance. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1187-1191.
- *Schwarz, A., S. Ständer, M. Berneburg, M. Böhm, D. Kulms, H. van Steeg, K. Große-Heitmeyer, J. Krutmann, T. Schwarz: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 26-31.
- *Schwarz, A., A. Maeda, K. Kernebeck, H. van Steeg, S. Beissert, T. Schwarz: Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J Exp Med* 2005; 201: 173-179.
- *Simon, M.M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, Ch. Krone, T.A. Luger, M. Jäättelä, T. Schwarz: Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. *J Clin Invest* 1995; 95: 926-933
- Slaper H, Velders GJM, Daniel JS, de Gruijl FR, van der Leun JC. Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna convention achievements. *Nature.* 1996; 384: 256-258.
- *Ständer, S., T. Schwarz: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed in normal skin and cutaneous inflammatory diseases, but not in chronically UV-exposed skin and non-melanoma skin cancer. *Am J Dermatopathol.* 2005; 27: 116-121.
- Steger H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, Krutmann J. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 1790-1795.
- Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70: 83-243.
- Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol.* 1999; 73: 329-68.

- Wolf P, Cox P, Yarosh DB, Kripke ML. Sunscreens and T4N5 liposomes differ in their ability to protect against ultraviolet-induced sunburn cell formation, alterations of dendritic epidermal cells, and local suppression of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 1995; 104: 287-292.
- Wolf P, Maier H, Mullegger RR, Chadwick CA, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, Hofer A, Smolle J, Horn M, Cerroni L, Yarosh D, Klein J, Bucana C, Dunner K Jr, Potten CS, Honigsmann H, Kerl H, Kripke ML. Topical treatment with liposomes containing T4 endonuclease V protects human skin in vivo from ultraviolet-induced upregulation of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha. *J Invest Dermatol.* 2000;114: 149-56.
- Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 1038-1049.
- Yarosh D, Bucana C, Cox P, Alas L, Kibitel J, Kripke M. Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 103: 461-468.
- Yarosh D, Klein J, O'Connor A, Hawk J, Rafal E, Wolf P. Effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. Xeroderma Pigmentosum Study Group. *Lancet.* 2001; 357: 926-929.
- Yasui A, Takao M, Oikawa A, Kiener A, Walsh CT, Eker AP. Cloning and characterization of a photolyase gene from the cyanobacterium *anacystis nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 1988; 25: 4447-4463.
- *Zeise E, Weichenthal M, Schwarz T, Kulms D. Resistance of human melanoma cells against the death ligand TRAIL is reversed by ultraviolet-B radiation via downregulation of FLIP. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 746-754.
- Ziegler A, Jonason JS, Leffel DW, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372: 773-776.