

**Aus dem Institut für Immunologie  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und  
der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg**

**Nachweis früh- und spätapoptotischer Ereignisse in Lymphozyten unter Einfluss physikalischer (UVA-Bestrahlung, Hitzeschock) und physikochemischer (UVA und 8-Methoxypsoralen) Ereignisse. Etablierung eines *in vitro*-Testsystems und Anwendung bei Patienten nach extrakorporaler Photopherese.**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**Dr. med.**

**(doctor medicinae)**

**an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

vorgelegt von Janet Michel

aus Halberstadt

Magdeburg, 24.02.2003

## **Dokumentationsblatt**

### **Bibliografische Beschreibung**

Michel, Janet: Nachweis früh- und spätapoptotischer Ereignisse in Lymphozyten unter Einfluss physikalischer (UVA-Bestrahlung, Hitzeschock) und physikochemischer (UVA und 8-Methoxypsoralen) Ereignisse. Etablierung eines *in vitro*-Testsystems und Anwendung bei Patienten nach Photopherese. -2003. -112 Bl.: 6 Tab., 16 Diag.

### **Kurzreferat**

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten von Patienten mit einem kutanen T-Zell-Lymphom hinsichtlich der Induktion frühapoptotischer Ereignisse in einem Zeitraum bis zu 4 Stunden nach extrakorporaler Photopherese untersucht. Des Weiteren wurde ein *in vitro*-Testsystem zur Analyse der Zeitkinetik und der Abhängigkeit der Apoptoserate von der UVA-Dosis und der 8-Methoxypsoralen-(8-MOP) Konzentration etabliert. Mittels der Durchflusszytometrie wurden die früh- und spätapoptotischen Ereignisse untersucht. Eine Differenzierung der Ereignisse erfolgte mit der alleinigen Annexin V-Färbung (Ann<sup>+</sup>) oder mit der Kombination Annexin V/Propidiumjodid-Färbung (Ann<sup>+</sup>/PI). Mit Hilfe des Bromdesoxyuridineinbaus wurde der prozentuale Anteil von Zellen mit DNA-Strangbrüchen als Merkmal der späten Apoptose bestimmt. Nach Optimierung der *in vitro*-Testbedingungen erfolgten, auf Grund der klinischen Relevanz, die Untersuchungen mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml. Sowohl im *in-vitro* System unter definierten Bedingungen als auch bei der Analyse der Lymphozyten von Patienten nach extrakorporaler Photopherese konnte eine Induktion früh- (1 bis 4 Stunden) und spätapoptotischer (24 Stunden) Ereignisse nachgewiesen werden. Die Hitzebelastung zur Modulation der apoptotischen Ereignisse führte in der vorliegenden *in vitro*-Studie zu keiner Verminderung der UV-induzierten Apoptose. Des weiteren erfolgte die Analyse der Expression des intrazellulären und oberflächlichen Hitzeschockproteins Hsp27 und des Bromdesoxyuridineinbaus in die DNA-Strangbrüche zur Bestimmung und Differenzierung früh- und spätapoptotischer Ereignisse nach UVA-Bestrahlung und/oder Hitzeschock. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl verzögert (24 Stunden nach Belastung) als auch frühzeitig (nach 4 Stunden) der programmierte Zelltod induziert wird.

## **Schlüsselwörter**

Phototherapie, Photopherese, Photochemotherapie, PUVA, 8-Methoxypsoralen, Apoptose, Annexin V, Propidiumjodid, mononukleäre Zellen, Hitzeschockprotein

## Inhaltsverzeichnis

	Dokumentationsblatt	2
	Schlüsselwörter	3
	Inhaltsverzeichnis	4
	Abkürzungsverzeichnis	6
1	Einleitung	8
1.1	Grundlagen der Photobiologie	8
1.1.1	Allgemeine Wirkung der UV-Strahlung	8
1.1.2	UVA und Psoralene	9
1.2	Photobiologie in der Therapie	11
1.2.1	Phototherapie	11
1.2.2	Photochemotherapie	14
1.2.3	Extrakorporale Photoimmuntherapie (ECPI)	18
1.3	Apoptose als möglicher Wirkmechanismus der Photopherese	20
1.3.1	Prinzip der Apoptose	20
1.3.2	Nachweismethoden der Apoptose	21
1.3.3	Die simultane Annexin- und Propidiumjodid-Färbung als Methode zur Messung apoptotischer Zellen	25
1.4	Reparaturmechanismus der Zelle	28
1.4.1	DNA-Schädigung und deren Reparatur	28
1.4.2	Zellschutz gegen UV-Schäden	30
1.4.3	Hitzeschockproteine, Struktur, Funktion	33
1.5	Zielstellung	35
2	Material und Methoden	36
2.1	Probengewinnung/ Untersuchungsmaterial	36
2.1.1	Blutspender	36
2.1.2	Patienten	36
2.2	Reagenzien	38
2.3	Antikörper	39
2.4	Lymphozytenseparation und -kultivierung	40
2.5	Apoptoseinduktion	41
2.5.1	UVA und 8-MOP	41
2.5.2	Hitzeschock	41
2.6	Messung der Apoptoserate	44
2.6.1	Messung der Annexin V-Bindung	44
2.6.2	Messung des Bromdesoxyuridineinbaus	45
3	Ergebnisse	48
3.1	Optimierung der Testparameter	48
3.1.1	Ermittlung der optimalen UVA-Dosis für ein <i>in vitro</i> -Testsystem	48
3.1.2	Ermittlung des Einflusses von 8-MOP in Abwesenheit einer UVA Bestrahlung	51
3.1.3	Ermittlung der 8-MOP Konzentration in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis	54
3.1.4	Kinetik der Apoptoseinduktion unter definierten optimalen Testbedingungen	58
3.2	Einfluss eines Hitzeschocks auf die Apoptoseinduktion	61
3.3	Messung apoptotischer Zellen über die Bestimmung der DNA-Strangbrüche	68
3.4	Quantifizierung der frühen und späten Apoptose in ECPI-behandelten Lymphozyten bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom	72
4	Diskussion	75

4.1	Optimierung der Testparameter des in vitro-Systems zur Erfassung der Apoptoseinduktion	75
4.2	Einfluss des Hitzeschocks auf die Apoptoseinduktion von Lymphozyten	82
4.3	DNA-Fragmente zur Messung apoptotischer Zellen	87
4.4	Messung der apoptotischen Ereignisse bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom nach ECPI	90
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	110
	Erklärung	111
	Lebenslauf	112

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANN <sup>+</sup>	Annexin positiv markiert
ANN <sup>-</sup>	Annexin negativ, d. h. nicht markiert
APAF1	Apoptose aktivierender Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	Onkoprotein, B-Zell-Lymphom/ Leukämie 2
B-CLL	chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
Bax	bcl-2 assoziiertes Protein
BHRF1	bcl-2 homologe Domäne im Epstein-Barr-Virus
BrdU	Bromdesoxyuridin
Br-dUTP	Bromdesoxyuridintriphosphat
CD4	Helfer-/Inducerzellen, Thymozyten, Antigen CD4
CD8	Suppressor-/zytotoxische Zellen, späte Thymozyten, Antigen CD8
CD95	Oberflächenmolekül, Fas
c-myc	Proto-Onkogen
CTCL	Kutanes T-Zell-Lymphom
DEVD-AFC	z-Asp-Gen-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl Cumarin
DNA	desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
ECPI	extrakorporale Photopheresetherapie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Facs	fluorescence-activated cell sorter
Fas-Ligand	Oberflächenmolekül, welches direkt die Apoptose beeinflusst
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL1	Messkanal Fluoreszenz 1 (vermittelte Fluoreszenzintensität Annexin V-FITC)
FL2	Messkanal Fluoreszenz 2 (vermittelte Fluoreszenzintensität Propidiumjodid)
FSC	Vorwärtsstreulicht
HIV	human immunodeficiency virus
HSF	Hitzeschocktranskriptionsfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein

hsp	Hitzeschockprotein-Gene
HCQ	Hydrochloroquine
ICE	Interleukin-converting-enzyme
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
MAF	Makrophagen-aktivierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
5-MOP	5-Methoxypsoralen
8-MOP	8-Methoxypsoralen
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
p21	Inhibitor der Zytokin-abhängigen Kinase
p53	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressorgen
PBS	phosphate-buffered saline
PI	Propidiumjodid
PS	Phosphatidylserine
PUVA-Therapie	Psoralen-UVA-Therapie
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tbc	Tuberkulose
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TMP	Trimethylpsoralen
TUNEL	Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labelling
U1 RNP	U1-Ribonukleäres Protein
UV, (-A, -B, -C)	ultraviolette Strahlung, (-A, -B, -C)
YVAD-AFC	z-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl-Cumarin

# **1 Einleitung**

## **1.1 Grundlagen der Photobiologie**

### **1.1.1 Allgemeine Wirkung der UV-Strahlung**

Das gesamte Sonnenlicht umfasst ein Wellenlängenspektrum von 200 bis 800 nm. Die maximale Energie liegt zwischen 450 bis 500 nm. Die ultraviolette Strahlung wird in drei Arten unterteilt: UVA (320 bis 400 nm) verantwortlich für die sofortige Pigmentierung, UVB (290 bis 320 nm) für Erythembildung und Spätpigmentierung und UVC (200 bis 290 nm) für strahleninduzierte biologische Schädlichkeit mit mutagenen und antimikrobiellen Aktivitäten [1]. Sowohl UVB als auch UVA können tumorinitiierend und tumorprovozierend wirken.

Die UVA-Strahlung kann Substanzen aktivieren, die die Strahlenempfindlichkeit erhöhen und dadurch Basenschädigungen bewirken. In Kombination mit Sauerstoff bildet UVA indirekt Kation-Radikale [7]. Photosensibilisierende Substanzen können die schädigenden Effekte der UVA-Strahlung an Proteinen, Lipiden und der DNA verstärken. Die Energie der UVA-Strahlen kann indirekt auf die DNA übertragen werden. Dies erfolgt in erster Linie durch die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite, die dann Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA hervorrufen. Kann die Zelle diese Schäden nicht reparieren, wird der Zelltod eingeleitet.

Durch die UVB-Strahlung hingegen wird die Bildung von Pyrimidindimeren induziert. Eine direkte Strahlenabsorption der UVB-Strahlung durch die Nucleinsäuren kann zur Dimerisierung von Basen führen, zur Deaminierung, zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen [46, 59]. In Abhängigkeit der Strahlendosis können diese DNA-Schäden repariert werden und die Zellen wachsen weiter. Ist der Schaden sehr ausgeprägt, kann er nicht mehr repariert werden, und die Weitergabe der mutierten Gene wird durch den Zelltod verhindert. Die direkte Strahlenabsorption kann weiterhin eine Schädigung der Zell- und Mitochondrienmembranen hervorrufen [62].

Der Zelltod kann durch zwei Mechanismen ausgelöst werden: der Apoptose (sie entspricht dem programmierten Zelltod und ist ein aktiver Zelltod) und der Nekrose (ein passiver Weg). Häufig wird während der Mitose der Zelltod induziert.

Damit können sich Chromosomenaberrationen während der Zellteilung manifestieren und gewöhnlich zur Nekrose führen. Nekrotische Zellen sind durch einen Verlust der Plasmamembranintegrität gekennzeichnet. Dies hat eine Zellschwellung, eine Dilatation der zytoplasmatischen Vesikel, eine Zerstörung der DNA und die Bildung von „Mikrokernen“ (gebildet aus der Kernmembran und Chromatin- oder Chromosomenfragmenten) zur Folge [62].

### **1.1.2 UVA und Psoralene**

Photosensibilisierende Psoralene sind trizyklische Verbindungen, bestehend aus einem Furan-Ring und einem Cumarin-Molekül. Die meisten Psoralene haben eine Absorptionsgrenze zwischen 250 bis 300 nm. Nach der Absorption eines Photons durch ein Psoralen-Molekül im Grundstadium kann ein Elektron in einen einfach angeregten Zustand versetzt werden. Durch Emission eines Photons oder durch Energieverlust in Form von Wärme gelangt das Psoralen wieder in den Grundzustand. Dreifach angeregte Moleküle entstehen durch Interaktion der einfach geladenen Moleküle und können eine Addition, Dimerisation und/oder Oxidation an Nucleinsäuren, Proteinen und Membranen hervorrufen. Alternativ kann ein Energietransfer vom dreifach geladenen Stadium auf den molekularen Sauerstoff erfolgen und zur Bildung eines hochaktiven, einfach geladenen Sauerstoffmoleküls führen [31].

Auf Grund der Struktur und hydrophoben Eigenschaft reagiert Psoralen mit Nucleinsäuren-Basenpaaren. So entstehen z.B. Thymidin-, Zytosin-, Adeninspsoralenverbindungen. Außerdem reagiert das Urazil der RNA mit Psoralen [27]. Das Psoralen ist eine asymmetrische photoreaktive Substanz mit einer Furan- und einer Pyron-Seite und reagiert bevorzugt mit Thymin [63]. Psoralen kann verschiedene Arten von strahleninduzierten Läsionen auf der DNA hervorrufen, inklusive der Bildung von 3,4- und 4',5'-Monoaddukten, oxidativen Schäden, Cross-links innerhalb der DNA-Stränge und das Entstehen von Pyrimidin-Dimeren [64]. Die Verbindungen zwischen dem 8-MOP und der Kern-DNA werden hauptsächlich mit der 4'5'-Doppelbindung auf der Furan-Seite des Psoralens gebildet. Monoaddukte beziehen die 3,4-Doppelbindung auf der Pyron-Seite des Psoralens mit ein und bilden auch Thymidine und Zytosine, jedoch im kleineren Umfang [27, 31, 63].

Die DNA-Strangvernetzungen hängen von der Psoralenstruktur (lineare Furanocumarine kreuzen effizienter als ringförmige Cumarine), von der Nukleinsäuresequenz der DNA und von der UVA-Dosis und Wellenlänge ab. Es ist beschrieben, dass Längen zwischen 320 bis 400 nm Schäden effektiver als Wellenlängen über 400 nm Strahlenschäden induzieren [31].

Furanocumarine besitzen die Möglichkeit, nach UVA-Aktivierung Ringverbindungen der Pyrimidin-Basen der DNA mit der 3,4- und/oder 4',5'-Doppelbindung zu induzieren, sich kovalent an Proteine und Phospholipide durch Bildung freier Radikale zu binden und Energie zu übertragen, wodurch reaktiver Sauerstoff entsteht und eine Oxidation von Aminosäuren in Proteinen und von ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden stattfindet. Diese Erkenntnisse haben Dall'Àqua *et al.* und De Mol *et al.* in ihren Arbeiten über photobiologische Aspekte von Furanocumarinen beschrieben. Furanocumarine, wie das 8-MOP, produzieren einfach geladenen Sauerstoff, wenn sie an die DNA kovalent gebunden sind. Photoaktivierte Furanocumarine können durch Sauerstoff, welcher sich im Grundstadium befindet, oxidiert werden. Das oxidierte 8-MOP bleibt in organischen Lösungen stabil. Es reagiert jedoch sehr schnell mit ungesättigten Fettsäuren in Liposomenmembranen [51, 84, 85].

8-MOP wird häufig in der PUVA-Therapie (Psoralen+UVA) angewandt, da es sich sowohl an die DNA als auch an Proteine und Lipide von epidermalen Zellen bindet [1].

## 1.2 Photobiologie in der Therapie

### 1.2.1 Phototherapie

Photoreaktionen werden in der Therapie absichtlich und kontrolliert hervorgerufen. Die biologischen Effekte beginnen mit der Absorption der UV-Strahlung oder des sichtbaren Lichtes. Ob eine Interaktion zwischen Licht und Pharmakon stattfinden kann, z.B. in der Haut, ist sowohl von den pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz und den Metaboliten des Pharmakons als auch von den verschiedenen Wellenlängen des Lichtes, die das Organ penetrieren, abhängig. Photoreaktionen stellen in der Haut die Absorption von Licht dar und provozieren biologische Effekte.

Im biologischen System findet man verschiedene Reaktionen zwischen Pharmaka, Proteinen, Lipiden und DNA. Die erste entspricht einer photochemischen, unimolekularen Reaktion, z.B. Neuordnung, Isomerisierung, Spaltung. Die Reaktionsprodukte oder ihre Metabolite zeigen ihre biologische Aktivität in der Interaktion mit einem Rezeptor. So kann eine Reaktion von einem strahleninduzierten Metaboliten und einem Rezeptor eine wichtige Rolle in einem normalen endogenen Prozess spielen. Dies betrifft z.B. die UVB-induzierte Umwandlung des 7-Dehydrocholesterol in das Provitamin D<sub>3</sub>. Durch Spaltung können Radikale gebildet werden. Chlorpromazin wird durch UVA in Phenothiazinradikale gespalten und bindet sich kovalent an Lipide und Proteine. Des Weiteren kennt man Photoreaktionen mit endogenen Molekülen. Beispiel dafür ist die irreversible Bindung von photoaktiviertem Psoralen an DNA nach UVA-Absorption. Dies spielt eine wesentliche Rolle in der PUVA-Therapie (Photochemotherapie). Der dritte Effekt wird durch einen Energietransfer auf endogene Verbindungen induziert. Das einfach geladene Sauerstoffmolekül wird vom <sup>3</sup>O<sub>2</sub> (dreifach geladenes Sauerstoffmolekül) gebildet und wird in der Karzinom-Therapie eingesetzt (Photodynamische Therapie).

Es sind drei verschiedene Arten der Phototherapie [65] und zwei Formen der Photochemotherapie [65, 66] für die Behandlung von mehr als 40 Hauterkrankungen beschrieben. In der Phototherapie findet man die „Breitband“-UVB-Therapie, die „Schmalband“-UVB-Therapie und die UVA-1-Phototherapie.

Die Photochemotherapie teilt sich in die orale und topische PUVA-Therapie ein [65]. In der Breitband-UVB-Therapie emittieren die Lampen das gesamte Spektrum von UVB und einen Großteil der UVA-Strahlung. Häufig werden aktive Agenzien zur Anhebung des therapeutischen Effektes der UVB-Strahlung in die Behandlung mit einbezogen. Kurzfristige Nebenwirkung kann das Erythem sein. Wie bei der ionisierenden Strahlung wird bei der Therapie mit nicht-ionisierender die aktuelle und kumulative Dosis protokolliert (UV-Pass), um Langzeitschäden zu vermeiden.

Tabelle 1: Erkrankungen und Breitband-UVB-Therapie

---

Erkrankungen und Breitband-UVB-Therapie

---

Psoriasis vulgaris  
Atopisches Ekzem  
Prurigo-Krankheiten  
Photodermatosen (Hardening)  
Chronische Urtikaria  
Eosinophile pustuläre Follikulitis  
Parapsoriasis en petit plaque  
chronische Ekzeme [65]

In der „Schmalband“-UVB-Therapie arbeitet man mit einer Wellenlänge von 312 nm.

Tabelle 2: Erkrankungen und Schmalband-UVB-Therapie:

---

Erkrankungen und Schmalband-UVB-Therapie

---

Psoriasis vulgaris  
Subkorneale pustuläre Dermatoze  
Atopisches Ekzem  
Vitiligo  
Photodermatosen [65]

Zwischen 320 nm und 400 nm liegt das Spektrum der UVA-Strahlung. Man teilt es in UVA-1 (340 bis 400 nm) und UVA-2 (320 bis 340 nm). Die Trennung basiert u.a. auf der Erythementstehung bei 340 nm. Zum Anderen existieren zwei photochemische Reaktionen: Wellenlängen unter 340 nm erzeugen eine direkte Reaktion zwischen Photonen und DNA oder Proteinen, hingegen induzieren Wellenlängen größer 340 nm eine sauerstoffabhängige Reaktion.

Weiterhin wird unterschieden zwischen einer UVA-1-Hochdosistherapie und einer Niedrigdosistherapie.

Tabelle 3: Erkrankungen und UVA-1-Therapie:

---

Erkrankungen und UVA-1-Therapie

---

Low-dose:

SLE

Rheumatoide Arthritis

Lokalisierte Sklerodermie

Morphea

High-dose:

Atopisches Ekzem

Sklerodermie

Urtikaria pigmentosa

Granuloma annulare [65]

---

### 1.2.2 Photochemotherapie

In der Antike wurde von Ägyptern und Indern eine Behandlung mit Psoralen, aus Pflanzen gewonnen und Sonnenstrahlung beschrieben [33]. Die Hauptindikation war damals die Vitiligo. In diesem Jahrhundert begann eine umfassende Forschung um das Psoralen in Ägypten. Die aktiven Substanzen wurden von Pflanzen isoliert und kurze Zeit später für die Therapie der Vitiligo angepriesen [32].

Die Photochemotherapie ist eine Behandlung mit photosensibilisierenden chemischen Substanzen in Kombination mit nicht ionisierender elektromagnetischer Strahlung. Psoralene sind die meist eingesetzten Substanzen und werden in mehr als 40 Pflanzen gefunden (z.B. in Limonen, Zitronen, Petersilie, Sellerie, Feigen und Nelken). In alter indischer und buddhistischer medizinischer Literatur wird bereits 1550 v. Chr. die Behandlung der Vitiligo mit schwarzen Samen der *Bavachee* und der *Vasuchika*-Pflanze, heute *Psoralen corylifolia* genannt, beschrieben. Die Patienten aßen diese Präparate oder legten sie auf die Haut und begaben sich in das Sonnenlicht. Nach ungefähr 2 Stunden entwickelte sich eine akut entzündliche Hautreaktion, welche letztendlich eine Repigmentation der weißen Haut hervorrief [32, 33].

In den letzten 25 Jahren stieg das Interesse an dem Gebrauch von Porphyrinen und anderen Tetrapyrrolen in Kombination mit sichtbarem Licht für die Tumortherapie und Behandlung von abnorm proliferierenden Geweben. Die therapeutische Modalität erfordert das Vorhandensein von Sauerstoff und wird deswegen photodynamische Therapie genannt. Das Prinzip besteht darin, dass das Porphyrin durch das Licht aktiviert wird und danach seine Energie auf das Sauerstoffmolekül überträgt. Das jetzt einfach geladene Sauerstoffmolekül wirkt so im biologischen System sehr zerstörend. Gleichzeitig fällt das Porphyrin wieder in seinen Grundzustand und ist bereit für eine neue Aktivierung [1].

Vor ungefähr 50 Jahren führten El Mofty *et al.* das 8-Methoxypsoralen (8-MOP) in die Behandlung der Vitiligo ein. Sie benutzten verschiedene Präparate des Psoralens und verabreichten diese oral, topisch und in anderen Kombinationen und exponierten die Patienten mit natürlichem Sonnenlicht oder mit konventionellen UV-Lampen.

Zwei amerikanische Dermatologen (A. Lerner und Th. Fitzpatrick) entwickelten diese Therapie 1953 weiter und erkannten, dass das langwellige UV-Licht (UVA, 320 bis 400 nm) die größte Effizienz für die Aktivierung des 8-MOP besaß [31, 33].

Von der ersten klinischen Anwendung der ultravioletten Strahlung in Kombination mit Psoralen wird 1969 berichtet, als Vitiligo-Patienten mit 8-MOP und fluoreszierenden Schwarzlicht-Lampen behandelt wurden [32]. Später versuchten 1973 Oberste-Lehn und Born in Deutschland sowie 1974 Parrish *et al.* in den USA, die Psoriasis gleichfalls so zu behandeln [31, 33], als man entdeckt hatte, dass das 8-MOP die S-Phase des Zellzyklus inhibiert [32] und strahleninduzierte Konjugationen zwischen Psoralen und der DNA stattfinden, wodurch eine Senkung der DNA-Proliferation und der Mitoserate erreicht wird [33].

Jetzt ist die Psoralen/UVA (PUVA) Therapie eine häufig angewandte Methode in der Behandlung verschiedenster dermatologischer und nicht dermatologischer Erkrankungen [31], wie z.B. von Psoriasis und Vitiligo [27, 29], von kutanen T-Zell-Lymphomen [27], von atopischer Dermatitis und Mycosis fungoides und Graft-versus-Host-Reaktion [29], vom humanen Squamosa Zellkarzinom [17].

Tabelle 4: Einige Erkrankungen und Indikation zur PUVA-Therapie

Erkrankungen und PUVA-Therapie	
Alopecia areata	Lymphomatoide Papulose
Atopische Dermatitis	Prurigo
Chronische Hyperkeratose	Parapsoriasis en petit plaque
Kontakt-Dermatitis	Pityriasis rubra pilaris
Dyshydrotisches Ekzem	Skleromyxödem
Graft-versus-Host-Reaktion	Urtikaria
Granuloma annulare	Urtikaria pigmentosa
Lichen ruber planus	Chronische Urtikaria
Mycosis fungoides	Pityriasis alba [32, 35, 38]

## PUVA-Behandlung

Die Photochemotherapie mit Psoralenen, trizyklischen aromatischen Verbindungen mit einem Furanocumarin-Ring [27], und langwelliger UV-Strahlung (UVA) wird PUVA-Therapie genannt [37]. Eine Vielzahl von linearen und ringförmigen Furanocumarinen werden für die PUVA-Behandlung benutzt, z.B. 8-Methoxypsoralen (8-MOP), 4,8,5'-Trimethylpsoralen (TMP), 5-Methoxypsoralen (5-MOP) [2].

In der Photochemotherapie findet man verschiedene Therapieansätze, die orale Gabe der Psoralene z.B. 8-MOP, 5-MOP, Trimethylpsoralen (TMP), die örtliche Auftragung des 8-MOP, das PUVA-Bad mit 8-MOP (Balneo-Photochemotherapie) [28]. Die häufigste Kombination der Photochemotherapie, 8-Methoxypsoralen und ultraviolette Strahlung (UVA), wendet man z.B. in der Behandlung der Psoriasis an. Die Aktivierung des Psoralens in Hautzellen führt zu einer DNA-Veränderung, welche für die Effizienz der PUVA-Therapie notwendig ist [27].

Der exakte Wirkmechanismus der PUVA-Therapie ist noch nicht vollständig bekannt. Man fand jedoch heraus, dass die PUVA-Therapie effektiv in der Eliminierung von hyperproliferativen Zellen der Epidermis in Abhängigkeit von p53 und dem Fas/Fas-Liganden ist. Fehlender Fas-Ligand oder Abwesenheit von p53 reduzieren die Apoptoserate [110]. Ultraviolette Strahlung hemmt direkt die antigenpräsentierende Funktion der Langerhans-Zellen oder indirekt die Stimulierung von immunmodulierenden Zytokinen in Keratinozyten [108]. Die frühe Apoptoseinduktion wird durch Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential und konsekutiver Dysfunktion induziert. Die späte Apoptose ist verbunden mit der Caspasenaktivierung [104, 109]. Die PUVA-Therapie reduziert die Anzahl der zirkulierenden T-Helferzellen, die DNA-Synthese und die Zellvermittelte Immunantwort. PUVA reduziert die T-Zellfunktion, verringert die Expression der Adhäsionsmoleküle und vermindert die Zell-Zellinteraktion als wichtiger Bestandteil der Immunantwort, z.B. Interaktion der T-Zelle mit der Antigen-präsentierenden Zelle oder Target-Zelle [83]. Das Absorptionsmaximum des Psoralens liegt zwischen 210 bis 330 nm. Das Spektrum der oralen PUVA-Therapie rangiert zwischen 320 bis 335 nm. Wenn Psoralen-behandelte Haut mit UV-Licht exponiert wird, finden zwei voneinander unabhängige Photoreaktionen statt. Der erste Typ stellt die Sauerstoff-unabhängige Bildung von monofunktionellen und bifunktionellen Addukten der DNA (Zwischenstrangverkreuzungen) dar.

Der zweite Typ ist eine Sauerstoff-abhängige Reaktion, bei welcher durch Energietransfer (auf Sauerstoffmoleküle) gebildete Sauerstoffradikale ( $^1\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ) zusammen mit aktiviertem Psoralen direkt DNA-Schäden erzeugen oder mit anderen Molekülen reagieren und durch diese aktivierten Moleküle indirekt zellschädigend wirken [33].

Phototherapeutika haben einen erheblichen Vorteil gegenüber konventionellen Pharmaka, da die Nebenwirkungen gering sind. Phototherapeutika haben zum Einen ohne Licht keine biologische Aktivität, zum Anderen sind sichtbares Licht oder UVA ohne die phototherapeutischen Medikamente ungefährlich. Oral gegebenes Psoralen wird normalerweise gut absorbiert und der maximale Anstieg im Serum wird nach ungefähr 1 bis 6 Stunden erreicht. Die Haut ist in der ersten bis dritten Stunde nach Inkorporation am empfindlichsten, jedoch besitzt das Psoralen auch noch nach 8 bis 12 Stunden eine Wirkung. 8-MOP wird in der Leber metabolisiert, wo es einem first-pass-Effekt unterliegt [33].

Eine wesentliche Nebenwirkung ist die gesteigerte Photosensibilität der Haut, die für einige Wochen nach der Behandlung beobachtet wurde [1]. UVA und 8-MOP in Kombination können frühe, akute Nebenwirkungen hervorrufen. Psoralen sensibilisiert die Haut für UVA-Strahlung [34], so dass „Verbrennungsreaktionen“ wie Erythem [27, 34], Ödem und Blasenbildung [34] auftreten. Bei unsachgemäßer Anwendung können Hyperpigmentation [27, 28], trockene Haut, Übelkeit und andere gastrointestinale Beschwerden sowie Kopfschmerzen mögliche Nebenwirkungen darstellen [28]. Späte, chronische Nebenwirkungen können die Bildung von nicht-melanozytären Tumoren sowie atypische Hautpigmentationen, vorzeitige Hautalterung, Katarakt und Photokeratokonjunktivitis sein, wenn die festgelegte kumulative PUVA-Dosis überschritten wird ( $>1000 \text{ J/cm}^2$ ) [27, 28, 33]. Des Weiteren wurden vermehrte Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens in PUVA-behandelten Zellen registriert [27]. Für jeden Patienten, der mit einer PUVA-Therapie behandelt wird, wird stets Nutzen und Risiko sorgfältig abgewogen [33].

### 1.2.3 Extrakorporale Photoimmuntherapie (ECPI)

Die Photopherese entspricht der PUVA-Therapie. Sie ist eine extrakorporale Form der Photochemotherapie und basiert auf dem simultanen Einfluss von 8-MOP und UVA auf Leukozyten des Buffy Coats. Der Unterschied zwischen klassischer PUVA-Therapie und Photopherese besteht darin, dass die zirkulierenden T-Zellen und die antigenpräsentierenden Zellen nicht direkt vom photoaktivierten 8-MOP beeinflusst werden [1, 36].

Erkrankungen, die ihren Ursprung in einer expandierenden Population pathogener T-Zellen haben, können effektiv mit einer extrakorporalen Photochemotherapie behandelt werden. Andere Möglichkeiten, die Therapien mit Kortikosteroiden, Antimetaboliten und Cyclosporin A, unterscheiden nicht zwischen pathogenen und benignen T-Zellen und führen somit zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen [36].

In der Photopherese findet das 8-MOP in Kombination mit UVA auf Grund verschiedener Merkmale bevorzugte Anwendung. Zum Ersten ist es in Abwesenheit von Licht ohne biologische Funktion, zweitens hemmt es nach Aktivierung durch ultraviolette Strahlung die Bindung von Molekülen derart, dass eine Zerstörung der Zellfunktion einsetzt. Drittens, UVA kann einfach gefiltert werden und besitzt niedrigere Energien als UVB. Viertens besitzt 8-MOP eine hohe chemotherapeutische Potenz und wird nach einmaliger Aktivierung innerhalb von Mikrosekunden wieder inaktiv [36].

Man fügt dem Buffy Coat eine definierte Menge 8-MOP zu, so dass ein Spiegel von 50 bis 200 ng/ml Blut erreicht wird. Dem Patienten werden kontinuierlich 1,5 Liter Blut entnommen. Das Blut wird in drei Fraktionen, welche den Erythrozyten, den Leukozyten und dem Plasma entsprechen, separiert. Die Erythrozytenfraktion wird dem Patienten zurückgegeben. Der andere Teil wird der UVA-Strahlung ausgesetzt und danach ebenfalls dem Patienten zurück infundiert. In einer Studie von R.L. Edelson wird eine komplette Blockade der T-Zell-Teilung bei einer Dosis von 1 bis 2 J/cm<sup>2</sup> UVA und einer Blutkonzentration von 100 ng/ml von 8-MOP erreicht [36].

Die Photopherese ist eine Standardtherapie in der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms [36]. Andere Indikationen sind die chronische und akute Graft-versus-Host-Erkrankung, die progressive Sklerose [38, 39], Autoimmunerkrankungen [36] (Pemphigus vulgaris [41], Rheumatoide Arthritis [42], systemischer Lupus Erythematoses) sowie das Spätstadium der HIV-Erkrankung [43], die atopische Dermatitis oder die Behandlung von Abstoßungsreaktionen [40, 44], bei Herz-, Nieren- oder Lungentransplantationen [1]. In Erprobung ist die Behandlung von Patienten mit Multipler Sklerose, Myasthenia Gravis sowie von Patienten mit Insulin-abhängigen Diabetes mellitus Typ I [36]. Die einzigen Nebenwirkungen, die in den letzten Jahren beobachtet wurden, sind die passagere Übelkeit und die volumenabhängige Hypotonie bei der Pherese [1].

### **Wirkung von 8-MOP und UVA in der Photopherese**

Das gewünschte Ergebnis der Photopherese-Behandlung ist eine spezifische Suppressionsantwort gegen pathogene T-Zellklone. Der Mechanismus der Photopherese ist sehr vielseitig, um die Antigenität und Immunogenität von UVA bestrahlten Zellen zu beeinflussen. Dabei spielen die Apoptose, die Induktion einer spezifischen Immunantwort, die Zunahme der Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle und die Zytokinfreisetzung eine Rolle. Die Photopherese kann die Antigenpräsentation beeinflussen.

Die heutige Theorie zur Wirkungsweise der extrakorporalen Photopherese geht davon aus, dass durch 8-MOP und UVA in den peripheren T-Zellen einschließlich der Tumorzellklone die Apoptose induziert wird. Monozyten sind deutlich resistenter gegen Apoptose. Sie werden durch Scherkräfte und den wiederholten Kontakt mit der Plastikoberfläche der Bestrahlungskassette aktiviert und differenzieren aus in dendritische Zellen.

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen. Sie können die apoptotischen Zellen phagozytieren und deren aufbereitete Antigenen präsentieren (Peptide pick-up). Zu den Antigenpeptiden zählen auch tumorspezifische wie z.B. Peptide des T-Zellrezeptors des malignen T-Zellklons. Die Antigenpräsentation erfolgt über MHC-Klasse-I-Moleküle gegenüber CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Dadurch wird eine anti-tumorspezifische zytotoxische Immunantwort ausgelöst, die zum Zelltod des pathogenen CTCL-Klons führt. Somit kommt der Ausreifung der peripheren Blutmonozyten zu dendritischen Zellen und der Apoptoseinduktion in den Lymphozyten eine einzelne Rolle bei der extrakorporalen Photopherese zu [30, 111].

## **1.3 Apoptose als möglicher Wirkmechanismus der Photophoresis**

### **1.3.1 Prinzip der Apoptose**

Die Apoptose ist eine aktive Form des programmierten Zelltods, die charakterisiert ist durch eine Abfolge bestimmter morphologischer und biochemischer Veränderungen der Zelle: Zellschrumpfung, Membranzerstörung, Chromatin- und Zytoplasmakondensation und Kernfragmentation [3]. Die Apoptose spielt eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung [8], der immunologischen Reifung [9] sowie bei normalen Gewebeabbau- und Umbauprozessen. Morphologisch ist die Apoptose zunächst als Chromatinkondensation und Zellschrumpfung zu erkennen. Danach bilden sich Ausstülpungen der Zellmembran. Die Zelle beginnt ihren Inhalt in Vesikeln, sogenannten apoptotischen Körperchen, abzustößen. Diese Vesikel werden von Makrophagen erkannt, aufgenommen und phagozytiert. Dabei erkennen die Makrophagen das externalisierte Phosphatidylserin auf der Membran der apoptotischen Zellen [10].

Zu den biochemischen Charakteristika der Apoptose gehören die Aktinpolymerisierung, die zur Membranausstülpung führt. Im Zytoplasma wird ein Verlust von Wasser beobachtet auf Grund der Hemmung des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransportersystems, der Dilatation des endoplasmatischen Retikulums und der erhöhten Aktivität der Transglutaminase [3]. Die zytosolische Konzentration der freien Kalziumionen steigt an. Das Membranpotential der Mitochondrien nimmt deutlich ab. RNA wird verstärkt degradiert. Spezifische Proteasen, wie z.B. die Proteasen der ICE-Familie (Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme) werden aktiviert [11]. Im Kern kommt es zur Proteolyse von Laminin, einem Intermediärfilamentprotein der inneren Kernmembran. Die genomische DNA wird in oligonukleosomale Fragmente von ca. 200 bp (Basenpaare) gespalten [12]. Da die zytoplasmatischen Komponenten und die Kernkomponenten bei der Apoptose immer von einer Membran umgeben sind, gelangen sie nicht in den extrazellulären Raum und können im Gegensatz zur Nekrose keine entzündliche Reaktion hervorrufen. Die Nekrose einer Zelle kann als Folge starker Verletzung auftreten (z.B. Verbrennung, Vergiftung, Sauerstoffmangel, Trauma). In der nekrotischen Zelle kommt es zum Verlust der Plasmamembranintegrität, Mitochondrienschwellung und Kernflockung. Die Zelle schwillt an und setzt bei der unkontrollierten Zellauflösung ihre Zellinhaltsstoffe frei, so dass es zu einer Entzündung kommen kann.

### 1.3.2 Nachweismethoden der Apoptose

Zum Nachweis apoptotischer Zellen bedient man sich ihrer spezifischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften. Zu der morphologischen Nachweismethode gehört die Färbung mit Acridinorange [23, 45] und Ethidiumbromid [45]. Sie dient der Identifikation von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Diese Methode basiert auf Veränderungen der Plasmamembranintegrität im Verlauf des programmierten Zelltodes. Das Acridinorange durchdringt die Plasmamembran und bindet an die DNA. Acridinorange färbt alle vitalen Zellen, jeglichen Alters und Stadium, an. Im Gegensatz dazu kann Ethidiumbromid dies bei intakter Plasmamembran, wie sie lebende Zellen und Zellen in der frühen Apoptose besitzen, nicht. In Abhängigkeit von der Stärke und Farbe des fluoreszierenden Lichtes kann im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop die Apoptoserate von Zellen ausgewertet werden [3]. Die lichtmikroskopische Darstellung erlaubt gleichermaßen die Untersuchung der morphologischen Struktur apoptotischer Zellen. Als Ergebnis findet man folgende Merkmale bei apoptotischen Zellen: Zerstörung der Zellmembran, Kernschrumpfung, Chromatin- und Zytoplasmaverdichtung, Bildung von „Apoptose-Körperchen“. Bei nekrotischen Zellen lassen sich Kernschwellung, Chromatinflockung und die Auflösung der Zellmembran beobachten [3, 22].

Für eine detaillierte Darstellung der Morphologie eignet sich das Elektronenmikroskop. Hier können Veränderungen in der Zelloberfläche inklusive Membranausstülpungen oder der Verlust von Mikrovilli sowie intrazelluläre Veränderungen (z.B. die Chromatinverdichtung, Zytoplasmaveränderung und die Dilatation des endoplasmatischen Retikulums) beobachtet werden [3, 22]. Jede dieser genannten Untersuchungsmethoden zur Bestimmung morphologischer Kriterien hat Vor- und Nachteile. Die Elektronenmikroskopie kann detaillierte Informationen über die Veränderungen in den Zellstrukturen im Zellzyklus geben. Sie besitzt eine hohe Spezifität, da morphologische Veränderungen auf einem subzellulären Niveau untersucht werden können. Für Routineuntersuchungen ist die Elektronenmikroskopie nicht geeignet, da die Untersuchungsvorbereitung sehr aufwendig und zeitintensiv ist und nur eine limitierte Zellzahl untersuchbar ist.

In der Lichtmikroskopie (die älteste Methode zur Bestimmung der Apoptose) hat man durch eine einfache und schnelle technische Vorbereitung der Zellen einen bedeutenden Vorteil. Nachteilig ist die geringere Sensitivität und Spezifität gegenüber der Elektronenmikroskopie. Mit der Licht- und Elektronenmikroskopie sind qualitative und quantitative Aussagen über das Stadium der vitalen oder apoptotischen Zelle möglich [22].

Eine biochemische Nachweismethode zur Bestimmung apoptotischer Zellen ist der Nachweis der DNA-Fragmentierung. Es ist bekannt, dass die Zellen, die in die Apoptose übergehen, ihre DNA in willkürliche oligonukleosomale Fragmente spalten. Die oligonukleosomalen DNA-Fragmente können durch DNA-Farbstoffe, wie Ethidiumbromid oder Propidiumjodid sichtbar gemacht werden.

Die Analyse der oligonukleosomalen Spaltprodukte ist durch die Agarosegel-Elektrophorese möglich. Hier erfolgt eine Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrem Molekulargewicht [4]. Eine weitere Methode zur Markierung oligonukleosomaler Fragmente stellt der durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT)-katalysierte Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) als Nukleotidanalogue dar. Nach Reaktion mit Fluorochrom-markierten Anti-BrdU-Antikörpern ist eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop oder eine Messung am Durchflusszytometer möglich [20, 21, 22].

Eine wesentliche Rolle in der Regulation der Apoptose spielt die Erhöhung des zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ . In ruhenden Zellen ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration niedriger als im extrazellulären Raum. Dieser Zustand wird durch ein energieabhängiges  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystem aufrechterhalten. Das System ist in der Plasmamembran, in den Mitochondrien, im endoplasmatischen Retikulum und im Zellkern lokalisiert. Wird dieses Gleichgewicht durch Antwort auf physiologische/ nichtphysiologische Signale gestört, kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Das Kalzium führt zur Aktivierung der Endonukleasen, die die DNA-Spaltung und somit den Zelltod bewirken können. Weiter wurde herausgefunden, dass die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2-Onkoprotein ebenfalls von den Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängt [14]. Ein weiteres  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges System ist das ATP- und Calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ -System, welches direkt Endonukleasen in apoptotischen Zellen aktiviert. Calmodulin ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein.

Zur Messung des Kalziumstroms und/oder der intrazellulären Kalziumkonzentration werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe wie Quin-2 [13, 24], Fura 2 [13, 22, 24], Indo-1 [13, 22], Fluo-3 [13, 24] und Kalzium-Grün [13, 24] eingesetzt. Quin-2 soll die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zuverlässiger als die anderen Farbstoffe messen können, da es eine hohe Affinität zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzt. Nachteilig sind die zur Messung benötigte Quarzoptik und das Vorhandensein eines relativ kurzen Signalmaximums. Fura 2 besitzt eine höhere Sensitivität als Quin-2. Es hat jedoch eine geringere Affinität zum Kalzium.

Die abgegebenen längeren Wellenlängen erlauben den Gebrauch einer einfachen Glasoptik. Indo-1 wird speziell in der Durchflusszytometrie eingesetzt. Es hat sonst ähnliche Eigenschaften wie Fura 2.

Fluo-3 und Kalzium-Grün haben noch längere Wellenlängen als die o.g. Farbstoffe und können in der Mikroskopie zum Einsatz kommen. Es muss aber erwähnt werden, dass diese Farbstoffe keine absolute selektive Sensitivität zum Kalzium besitzen, sondern auch an andere bivalente Kationen binden können. Ausgewertet werden kann mit Hilfe des Spektralfluorimeters, des Durchflusszytometers und der Fluoreszenzmikroskopie [13].

In den proteolytischen Spaltungen im Rahmen der Apoptose sind die sogenannten Caspasen beteiligt. Caspasen sind Cysteinproteinasen, die Spaltprodukte mit C-terminalen Asp liefern. Eine andere Bezeichnung ist ICE-Proteinase [14]. Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert. Ihre Aktivierung in apoptotischen Zellen erfordert eine proteolytische Spaltung. Das aktive Enzym besteht aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten. Die Caspasen sind wesentlich an der proteolytischen Kaskade beteiligt, die zur Spaltung zahlreicher Zytoskelettproteine, zur Aktivierung zytoplasmatischer Proteine und Kernproteine führt. Substrate der Caspasen sind z.B. Mitglieder der Bcl-2-Familie [25] und der Poly-ADP-Ribose-Polymerase. In der Arbeit von Saeko Tada-Oikawa wurde u.a. die Caspasen-Aktivität nach UVA-Bestrahlung von HL-60-Zellen bestimmt. Zum Nachweis der Caspase wurden YVAD-AFC (z-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl Cumarin) oder DEVD-AFC (z-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl Cumarin) eingesetzt. Diese Produkte sind fluorogene Tetrapeptide, die sich an die Caspasen binden. Durch die Caspasenaktivität wird das fluorogene AFC abgespalten. Somit kann die Aktivität der Proteasen spezifisch mit Hilfe eines Spektralfluorometers bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emission von 505 nm bewertet werden [15].

Die Durchflusszytometrie ist eine geeignete Methode für die Differenzierung verschiedener Zellen und für die zeitgleiche Erfassung biochemischer und morphologischer Parameter. Sie besitzt eine hohe Sensitivität, quantifiziert die gemessene Fluoreszenzintensität und macht eine Untersuchung einer sehr großen Anzahl von Zellen in kürzester Zeit möglich. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einem Flüssigkeitsstrahl der Zellsuspension, bestehend aus einem Probenstrom und einem Hüllstrom, so dass die Zellen nur einzeln nacheinander aus einer Düse austreten können. Die Funktion des Hüllstrahls besteht darin, den Probenstrom exakt vertikal zu einem Laserstrahl aus einem Argon-Laser mit der Wellenlänge von 488 nm auszurichten. Dieser Prozess wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Jede passierende Zelle streut dabei den Laserstrahl je nach ihrer Größe und Granularität. Diese charakteristischen Streulichtsignale werden als Vorwärtslichtstreuung (FSC) und als 90°-Lichtstreuung (Seitwärtsstreulicht, SSC) von Photoverstärkern erfasst. Als Maß für die relative Größe gilt FSC, SSC als Maß für die relative Granularität einer Zelle. Eine Trennung lebender und toter Zellen ist durch die geänderte Lichtstreuung der Zellen, durch Unterschiede in der Zellgröße, Granulierung, Chromatindichte, Plasmamembranpermeabilität oder DNA-Struktur möglich. Ebenso kann eine Abgrenzung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltypen erfolgen. Während in der Apoptose erst spät Funktionsverluste der Membranen registriert werden, können bei der Zellnekrose schon frühzeitig Membranschädigungen und Funktionsstörungen der Zellorganellen festgestellt werden [5]. Des Weiteren nehmen in der Apoptose die Zellgröße ab und die Granulierung zu. Diese zwei Eigenschaften bewirken eine unterschiedliche Lichtstreuung, so dass apoptotische und vitale Zellen voneinander abgegrenzt werden [3]. Die Verringerung des vorwärts gestreuten Lichtes verläuft initial in der Apoptose, nicht parallel mit der Verringerung des rechtwinklig gestreuten Lichtes. Die Nekrose ist durch eine Verminderung der Fähigkeit der Zellen, Licht gleichzeitig in Vorwärtsrichtung und im rechten Winkel zu streuen, charakterisiert [5].

### 1.3.3 Die simultane Annexin- und Propidiumjodid-Färbung als Methode zur Messung apoptotischer Zellen

Durch die Zell- oder Plasmamembran wird jede Zelle gegen die Außenwelt hin abgeschlossen. Zwischen zytoplasmatischem und umgebendem extrazellulären Raum bildet sie eine Barriere. Die Plasmamembran ist physiologisch unsymmetrisch. Man unterscheidet eine plasmatische Seite und die extraplasmatische Seite [14]. An der Innenseite der Plasmamembran befinden sich Phosphatidylserine (PS). Es sind Aminophospholipide.

Bei apoptotischen Zellen gelangen sie an die Außenseite. Annexin V kann sich nur an die Phosphatidylserine binden, die an der Außenseite liegen, da das Annexin V nicht in die Zelle penetriert [6].

**Annexin V:** Annexin V gehört zu einer Gruppe von Kalzium- und Phospholipid-bindenden Annexin V-Proteinen. Das Molekül besteht aus 320 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 35 bis 36 kDa. Das Annexin V hat eine Vielzahl von biologischen Effekten, z.B. Hemmung der Prothrombin-Aktivität, Hemmung der Proteinkinase C sowie der Fähigkeit, als ein Rezeptor für das Hepatitis B Virus Oberflächenantigen zu fungieren. Das Annexin V kann sich nur an Phosphatidylserine binden, die an der extraplasmatischen Seite liegen, da es nicht in die Zelle penetriert. Dies ist bei apoptotischen Zellen der Fall und ermöglicht es Zellen, in der frühen Phase der Apoptose durch das Annexin V anzufärben. In der Durchflusszytometrie wird das Annexin V-FITC wegen der selektiven Affinität zur negativen Ladung der Phospholipide zu deren Darstellung benutzt. Die Bindung von Annexin an die Phospholipide vollzieht sich sehr schnell, ist extrem vom Kalzium abhängig und reversibel, wenn der Ionenbinder EDTA vorhanden ist [6].

**Propidiumjodid:** Ist ein rot fluoreszierendes Molekül, wenn es an ein DNA- oder RNA-Molekül bindet. Propidiumjodid (PI) kann nicht von Zellen aufgenommen werden, deren Plasmamembranfunktion unbeschädigt ist, z.B. von lebenden Zellen oder Zellen in der frühen Apoptose. Demnach lassen sich nur Zellen darstellen, die sich in der Phase der späten Apoptose befinden, die nekrotisch sind oder mechanisch zerstört wurden [5]. Charakteristisch für diese Zellen ist der Verlust der Plasmamembranintegrität [17].

Mit der Annexin/PI-Methode ist eine gleichzeitige Erfassung von frühapoptotischen Ereignissen (ANN<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>) und spätapoptotischen Ereignissen (ANN<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>) möglich. Eine Probenvorbereitung oder Fixierung der Zellen ist nicht notwendig. Die einfache Inkubation in einem Puffer, der mit PI und Annexin-FITC versetzt ist, ermöglicht eine schnelle und einfache Auswertung der Proben mit dem Durchflusszytometer [6]. Man hat zwei Fluoreszenzen (grün 530 nm, rot >600 nm), die die Auswertung der Untersuchungen weiter vereinfachen. Diese Methode zur Untersuchung von Apoptoseraten wird häufig angewandt. Die Doppelmarkierung der Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin und PI und die Messung mit dem Durchflusszytometer sind eine einfache, schnelle und empfindliche Methode zur Bestimmung der Apoptoserate.

Zur Quantifizierung des UV-induzierten Zelltodes in menschlichen Epithelzellen wurde diese Methode von A. Schindel und Kollegen benutzt. Man hat in dieser Arbeit den Einfluss von physiologisch und therapeutisch relevanten Dosen von UVA, UVA-1, UVB, etc. sowie verschiedene Kombinationen von photochemotherapeutischen Konzentrationen von 8-MOP und UVA oder UVB auf die Zellkinetik untersucht. In dieser Studie wurde mit Hilfe der Annexin V-Bindung und PI im Durchflusszytometer die UV-induzierte Zelltodrate der Zellen gemessen [17]. Dieses Beispiel zeigt, dass die Annexin/PI-Methode breite Anwendung bei der Untersuchung des UV-induzierten Zelltodes fand.

Meng und Mitarbeiter untersuchten periphere Blutlymphozyten von gesunden Probanden und Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses, welche mit Hydroxychloroquine (HCQ) in festgesetzten Konzentrationen inkubiert wurden. Zellen in der Apoptose wurden durch standardisierte Methoden (Veränderungen der Morphologie, DNA-Fragmentation) und mit der Durchflusszytometrie identifiziert. In einem *in vitro*-Experiment wurde mit Hilfe der Propidiumjodid-Färbung allein bzw. in Verbindung mit Antikörpern gegen T-Zelloberflächenmarker die Apoptoseinduktion in Lymphozyten untersucht. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Annahme, dass ein Defekt in der Apoptoseregulation eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen spielt. Man ging davon aus, dass der antirheumatische Effekt des HCQ durch Heraufregulierung der Apoptose zu erreichen ist. Dem HCQ war es möglich, die Apoptose in allen T-Zell-Subpopulationen zu induzieren [19].

Um kardiovaskuläre Erkrankungen besser diagnostizieren und effizienter therapieren zu können, haben van Heerde *et al.* die Apoptose, die Ursache für Krankheiten im Herz-Kreislaufsystem sein kann, im kardiovaskulären Gewebe mit verfügbaren Techniken zur Bestimmung und Quantifizierung derselben untersucht. Die Methoden basierten auf der Analyse der Zellmorphologie (Licht- oder Elektronenmikroskopie, DNA-Spaltung). Schwerpunkt ihrer Untersuchung war die Annexin V-Färbung und Messung im Durchflusszytometer [22].

## 1.4 Reparaturmechanismus der Zelle

### 1.4.1 DNA-Schädigung und deren Reparatur

Es gibt allgemein zwei Möglichkeiten, Schäden in der DNA zu erzeugen. Spontanmutationen entstehen mit einer Häufigkeit von 1 pro  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Nukleotide, wobei ein Anstieg im Alter zu verzeichnen ist. Durch Mutagene (Strahlen, chemische Agenzien und Umweltschäden) ausgelöste Mutationen werden als induzierte Mutationen bezeichnet und treten in einer Häufigkeit bis zu 1 pro  $1 \times 10^2$  Nukleotide auf [7, 46]. Mutationen sind stabile und vererbare Veränderungen in der DNA-Basen-Sequenz [59]. Diese Abweichungen werden von Replikations- und Transkriptionenzymen bei der Verarbeitung der Information, d.h. bei der Umschreibung der DNA in die RNA, als Fehler weitergegeben. Man unterscheidet bei den Mutationsarten zwischen Punkt- (eine Base betreffend) und Blockmutationen (mehrere Nukleotide betreffend). Die Basen können eliminiert (Deletion), durch falsche ersetzt (Substitution) oder hinzugefügt (Addition) werden [46]. Der Grad der DNA-Zerstörung hängt von dem Apoptosestadium, vom Zelltyp und von apoptoseinduzierenden Agens ab [5].

Um die genetische Stabilität einer Zelle zu bewahren, braucht es effiziente Reparaturmechanismen sowohl für die spontanen als auch für die induzierten DNA-Läsionen [7].

Tabelle 5: DNA-Schaden und Reparaturverfahren

DNA-Schaden	Reparaturverfahren
Basenverluste	Basenexzisionsreparatur
Basenmodifikation	Nukleotidexzisionsreparatur
Mehrfachschäden in einem Strang	„Mismatch“-Reparatur
fehlerhafte Basenpaarungen	Nicht-homologe Rekombination
DNA-Doppelstrangbrüche	Homologe Rekombination Single strand annealing [69]

Es sind verschiedene Mechanismen zur Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden identifiziert wurden. Die bekannteste ist die Nukleotidexzision. Sie beinhaltet einen Proteinkomplex, welcher einen relativ großen strukturellen DNA-Schaden erkennt und eine Inzision am 5'- und 3'-Ende der zerstörten DNA bewirkt. Daneben gibt es zwei weitere alternative Reparaturmechanismen. Die Photolyasen und DNA-Glykosylasen binden spezifisch an UV-Photoprodukte und reparieren oder initiieren die Reparatur der Schäden. Die Photolyasen arbeiten Licht-abhängig. Diese Reaktion wird Photoreaktivierung genannt. Die Glykosylasen bewirken eine Kerbe in einer Glykosydbindung in Zyklobutan-Pyrimidin-Dimeren und erneuern die „abasic“-Seite. Die entstandene „abasic“-Seite ist Substrat für die Basenexzision [67]. Ein neuerer „Alternativ-Exzision-Reparaturweg“ benötigt die Endonuklease, stimuliert durch Einzelstrangbrüche der DNA [5, 67]. Sie tastet die DNA nach Fehlern ab und spaltet die DNA bevorzugt an Methyl-Gruppen, die sich alle 250 Nukleotide an der DNA befinden. Ist eine falsch gepaarte Base gefunden, erfolgt ein Einschnitt in den zu reparierenden Strang an beiden Seiten der Läsion, um ein Fragment von 24 bis 32 Nukleotiden zu erzeugen. Man nennt diese Strategie auch das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System. An diesen Einzelstrangbruch bindet die Polymerase I, ein Replikationsenzym, welches als Exonuklease das fehlerhafte Nukleotid herausschneidet und als Polymerase mit Orientierung am intakten Strang die richtigen Nukleotide einfüllt. Die Spaltstellen im Einzelstrang werden durch eine Ligase wieder gekittet [42, 59, 61].

Es werden in der Literatur drei effiziente Wege zur Reparatur der Doppelstrang-DNA-Brüche beschrieben. Die homologe Rekombination, die nicht-homologe Rekombination und die nicht-homologe Endverknüpfung. Diese Mechanismen können alle zu einer genetischen Veränderung führen. Die homologe Rekombination entspricht dem Prinzip vom „error-free“-Mechanismus. Monoaddukte werden durch den Nukleotidexzisionsweg bearbeitet. Dieser kann den Schaden direkt durch die DNA-Polymerase  $\eta$  beheben, d.h. dass eine homologe DNA-Strecke benötigt wird und an jeder Seite der Läsion ein Schnitt erfolgt, so dass die geschädigte Sequenz herausgeschnitten werden kann. Die Läsion kann auch durch die Replikationspolymerase mit dem entsprechenden Co-Faktor vermieden werden, indem sie eine Kopie vom unbeschädigten Strang macht. Die nicht-homologe Rekombination, das wichtigste Reparaturverfahren bei Doppelstrangbrüchen, benötigt keine homologe DNA-Sequenz, so dass der „error-prone“-Weg zu einem großen Verlust an Basen (bis zu  $10^6$  Basen) führen kann, da die Polymerase  $\zeta$  an den Läsionen vorbeigeht. Die nicht-homologe Rekombination ist während der gesamten Interphase möglich, die homologe Rekombination jedoch nur in der Synthese-Phase [69].

Der endverbindende Prozess ist sehr effektiv, da die Brüche an den Enden zusammen gehalten werden und mit einem kleinen Energieverbrauch wieder verbunden werden [59, 61, 63].

Das „Single Strand Anneling“ bewirkt durch Exonukleasen einen Abbau der geschädigten Einzelstrangenden und die anschließende Zusammenführung der beiden Doppelstränge. Dieses Verfahren führt zu einem hohen Verlust von DNA-Sequenzen. Die Mismatch-Reparatur wird dann gestartet, wenn bei der Reparatursynthese Fehler unterlaufen sein sollten. Dabei werden Basen als falsch erkannt, wenn sie mit der gegenüberliegenden Base nicht gepaart werden können. Am 5'-Ende nach einer CTAG-Sequenz nahe einer falschen Base schneidet eine Endonuklease den Strang ein und eine Exonuklease baut den Strang mit der falschen Base ab. Die Reparatursynthese erfolgt nach der Matrize des gegenüberliegenden Stranges mit Hilfe einer Polymerase. Ligasen verbinden das neu hergestellte Nukleotid mit dem zu reparierenden Strang [69].

#### **1.4.2 Zellschutz gegen UV-Schäden**

Viele Studien zeigen, dass das p53, bcl-2, bax, c-myc und die Caspasen einen Schwerpunkt in der zellulären Antwort auf UV-Strahlen darstellen.

Das Tumorsuppressorgen p53 ist ein Transkriptionsfaktor und hat letztlich zwei Funktionen: Die erste Aufgabe liegt in der Funktion als Kontrollpunkt für ruhende Zellen im Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus. Hier sind die Zellen unfähig, Schäden zu reparieren. Die zweite Funktion besteht darin, für nicht reparierte Zellen die Apoptose einzuleiten, so dass Zellen mit einem potentiellen Risiko für somatische Mutationen eliminiert werden [47]. Das p53 hat also Einfluss auf die DNA-Reparatur und auf die Apoptose. Werden Zellen niedrigen UV-Strahlendosen ausgesetzt, induziert p53 eine Herunterregulierung der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und von p21<sup>waf1/cip1</sup> (Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase, waf: Wildtyp p53-aktiviertes Fragment) und induziert den Zellzyklus-Stop am Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase. Durch diesen Zeitgewinn kann die DNA-Reparatur gestartet werden, noch bevor die geschädigte DNA auf die Tochterzelle übertragen wird [48, 52]. Eine andere wichtige Rolle des p53-Proteins liegt in der Bewahrung der genomischen Stabilität, nachdem Zellen mit UV-Strahlung belastet wurden.

Die induzierte Apoptose (durch ionisierende Strahlung, Zytostatika oder Wachstumshemmer) in kultivierten Zellen ist von der Funktion des Wildtyp-p53 abhängig [48, 49]. Dieser Wildtyp-p53, ein Phosphoprotein, ist ein Tumorsuppressorgen. Es bindet an DNA-Schäden und initiiert ein gap1-Zellzyklusstop durch Aktivierung von p21. Dieses hemmt die Zyklin-abhängige Kinase, so dass DNA-Reparaturenzyme genügend Zeit für die DNA-Reparatur haben [57]. Hohe UV-Dosen induzieren eine drastische Steigerung von p53, welches eine Senkung des Bax-Proteins bewirkt und die Apoptose triggert.

Das p53 reguliert die Expression von Bcl-2/Bax während des apoptoseinduzierenden Prozesses. Bcl-2-Protein verhindert zum größten Teil die Apoptose, das Bax-Protein bildet mit Bcl-2 ein Dimer, inaktiviert es und führt zur Apoptoseeinleitung in vielen zellulären Systemen [48, 49]. Bax kann somit die Funktion des Bcl-2, die Apoptose zu behindern, hemmen. Wenn Bcl-2 im Überschuss vorhanden ist, dominieren entweder Bcl-2-Bax-Heterodimere oder Bcl-2-Homodimere und fördern ein Überleben der Zellen. Im Gegensatz dazu, wenn Bax-Proteine im Überschuss vorhanden sind, dominieren Bax-Homodimere und induzieren in den Zellen die Apoptose [52].

Bcl-2 ist ein Mitglied einer neuen Klasse von Proto-Onkogenen, die sowohl Inhibitoren als auch Promotoren der Apoptose darstellen [25, 47]. Das Bcl-2 wurde erstmals in Zellen eines B-Zell-Lymphoms beobachtet [49]. Bcl-2 ist im Zytoplasma, im endoplasmatischen Retikulum und an der Außenseite der Mitochondrienmembran lokalisiert [58]. Zu dieser wachsenden Familie der Bcl-2-Proteine zählen bei den Säugetieren Bcl-x, Mcl-1, A1 (antiapoptotische Proteine), Bax, Bik, Bcl-w oder Bad (proapoptotische Proteine). Sie unterscheiden sich in ihren strukturellen Merkmalen. Einige dieser Proteine neigen dazu, Homodimere und Heterodimere zu bilden, d.h. sie dimerisieren mit sich selbst und/oder mit anderen Familienmitgliedern. Das Verhältnis von antiapoptotischen versus proapoptotischen Dimeren ist für die Festlegung des Zellwiderstandes gegen die Apoptose wichtig [52]. Bcl-2-Proteine schützen aber auch Tumorzellen vor der Apoptose [50], wenn diese durch ionisierende Strahlung oder durch DNA-schädigende therapeutische Agenzien induziert wurde [53]. Eine steigende Zahl an Arbeiten zeigen, dass der oxidative Stress eine zentrale Rolle in der Apoptoseregulation darstellt und das Bcl-2-Protein die Funktion eines Antioxidanten besitzt. Man denkt, dass Bcl-2 die Zytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien verhindert, die Bindung des Zytochroms an den Apoptose-aktivierenden Faktor-1 (APAF-1) blockiert und dadurch auch die Apoptose hemmt.

Eine Studie von Tinsley *et al.* hat gezeigt, dass eine Überproduktion des Bcl-2 eine erhöhte Resistenz gegenüber apoptoseinduzierenden Stimuli und ein verbessertes Sepsis-Überleben bewirkt. Weiter wurde eine Hemmung der Kaspasen durch das Bcl-2 gezeigt. Es agiert zum Einen direkt mit den Kaspasen, zum Anderen verhindert es die Kaspasenaktivierung durch Hemmung der Initiation der Apoptosekaskade [25].

Zysteinproteasen können den Ablauf der Apoptose verhindern. Sie werden auch Kaspasen (Zystein-Aspartat-spezifische Proteasen) genannt. Man unterscheidet 15 Kaspasen mit unterschiedlichen Funktionen. Zum Beispiel: Die Apoptose kann Kaspase-3-abhängig und Kaspase-9-unabhängig vorangehen oder auch umgekehrt. In der Studie von Tinsley wurde herausgefunden, dass eine Sepsis viele Lymphozyten-Proteasen aktiviert wie Kaspase-2, -3, -6 und -9, jedoch nicht Kaspase-1 (ein Mitglied der Interleukin-converting Enzymfamilie). Der Grund scheint in der Nichtaktivierung der Kaspase-1 zu liegen, die die Kaspase-1 stimuliert. Sind die Kaspasen einmal aktiviert, so spalten sie eine Vielzahl von Substraten. Es gibt vier bekannte Wege zur Aktivierung der Proteasen. Beim Fas- und TNF-Weg bringen bestimmte Rezeptoren in der Zellmembran das Apoptosesignal in die Zelle und aktivieren die Kaspase 8, die dann andere Kaspasen stimuliert. Der dritte Weg entspricht der direkten Aktivierung der Kaspase-3 (eine hauptblockierende Kaspase).

Das Zytochrom C wird aus den Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt und bindet an den APAF-1. Der APAF-1 bindet an die Kaspase-9 und aktiviert die Kaspasenkaskade. Der Verlust des Mitochondrienmembranpotentials und der Verlust des Zytochrom C soll ein kritischer Moment in der frühen Phase der Apoptose sein [15, 25]. Dies entspricht der vierten Möglichkeit die Apoptose zu verhindern. Hier werden die Kaspasen-2, -3, -6 und -9 aktiviert [25].

C-myc ist ein Proto-Onkogen und es markiert die Apoptose [101]. Myc-Protein antwortet auf die von der extrazellulären Umgebung kommenden Signale. Das myc-Produkt ist ein Transkriptionsfaktor der „Helix-Loop-Helix“-Klasse der DNA-bindenden Proteine. In der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus steht die c-myc-Bildung unter der Kontrolle der Tumorsuppressorgene, unter dem Einfluss des G<sub>1</sub>-Zyklins oder viraler Antigene. Die Überproduktion von c-myc induziert die Apoptose. Eine gleichzeitige Expression von Bcl-2 und dem Onkogen c-myc antagonisieren die Effekte von p53 in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus und in der Apoptose. C-myc zerstört andere Funktionen der genetischen Kontrolle in der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklusses, inklusive der Expression von Zyklin D1 [53].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl Proto-Onkogene, Tumorsuppressorgene als auch Proteasen an der Regulation von Zellzyklus und Apoptoseinduktion beteiligt sind.

### 1.4.3 Hitzeschockproteine, Struktur, Funktion

Hitzeschockproteine (Hsp) repräsentieren eine Proteinfamilie, die im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert sind [54]. Stressproteine werden auch unter normalen Bedingungen während der Differenzierungsphase und Entwicklungsvorgängen exprimiert. Sie sind für eine korrekte Faltung, Zusammenlagerung, Stabilisierung und für den Transport und Abbau von anderen Proteinen notwendig. Bei Krankheiten, Infektionen oder Fehlfunktionen können sie dann vermehrt synthetisiert werden [56]. Zellen, die unter Stress geraten, z.B. durch Veränderungen in ihrer normalen Umgebung, starten eine Stressreaktion. Dies induziert die Synthese von „Schutzproteinen“, bekannt als stressinduzierte- oder Hitzeschockproteine. Die Hauptfunktion dieser Proteine ist der Schutz der Zellen während der Stresszeit. Erreicht der Stress ein sehr hohes Niveau, so ist es den Hitzeschockproteinen nicht mehr möglich, die Zelle zu schützen. Die Synthese wird gestoppt und die Apoptose eingeleitet. Durch einen zu schnellen Stressanstieg wird die unkontrollierte Nekrose gestartet. Hitzeschockproteine entwickeln in den Zellen eine Resistenz gegenüber toxischen Substanzen, eine Thermotoleranz und eine Apoptoseresistenz [55].

Die Hitzeschock-Antwort ist eine schnelle, jedoch nur vorübergehende Reprogrammierung der Zellaktivität, um empfindliche Strukturen vor einer Hitzeschädigung zu bewahren. Sie ermöglicht eine zügige und komplette Wiederherstellung von Zellstrukturen nach der Stresssituation [68].

Man unterscheidet die Hitzeschockproteine anhand ihres Molekulargewichtes und ihrer Funktion [54]. Sie sind phylogenetisch hochkonserviert und universell bei den Organismen zu finden. Bei bestimmten Infektionen (Malaria, Tbc, Q-Fieber, Syphilis, *Helicobacter pylori*, u.a.) ist das Auftreten von spezifischen Anti-Hsp-Antikörpern nachweisbar [56].

Die Hauptchaperone der Hitzeschockproteine können ihre Aufgaben nur in Kooperation mit Helferproteinen („cohort“-Proteine) erfüllen. Die schnelle und kurzzeitige Induktion der Stressproteinsynthese in Stresssituationen wird zum größten Teil von einem spezifischen Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF1) kontrolliert. Es gibt noch andere wichtige HSF. HSF2 ist für die entwicklungsbedingte Hsp-Synthese verantwortlich. HSF3 ist ein Zelltyp-spezifischer HSF, der auch durch Stress, aber mit verzögerter Kinetik aktiviert wird [56].

Die Expression von Hitzeschockproteinen an der Zellmembran von Thymozyten stellt eine frühe Phase der Apoptose dar und wurde durch Poccia und Mitarbeiter in einer Arbeit beschrieben. Die Verschiebung des Hsp auf die Zellmembran ist nicht nur die Konsequenz einer Hsp-Neusynthese, sondern auch Folge einer Membranveränderung. Diese oberflächliche Lokalisation der Hsp könnte eine Rolle in der Antigenpräsentation spielen, in der Bildung von Immunkomplexen, Hsp-Antikörpern und ist Grund für die Bindung zellulärer Antigene während der Zellalterung. Die oberflächliche Expression von Hsp an apoptotischen Zellen begünstigt die Bildung und die Präsentation von Zellabbauprodukten [54].

Hsp27 gehört zu der Familie von kleinen Stressproteinen. Es hat ein Molekulargewicht von 27000 Dalton. Eine Arbeit von Guenal zeigt, dass es dem Hsp27 möglich ist, die Zellen sowohl vor der Apoptose als auch vor der Nekrose zu schützen, wenn Stimuli wie Temperaturwechsel und Wasserstoffperoxid auf embryonale Fibroblasten von Ratten einwirken. Eine Überproduktion hatte in ihrer Versuchsreihe jedoch keinen Effekt auf die Apoptosehemmung [58].

In der Literatur findet man, dass das Hsp27 der Phosphorylierung nach der Zellstimulation durch verschiedene Agenzien, inklusive Hitze und Ischämie, unterliegt. Man hat herausgefunden, dass es eine Resistenzentwicklung bei Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Agenzien bewirken kann [60].

## 1.5 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, Lymphozyten von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom nach ECPI hinsichtlich der Induktion frühapoptotischer Ereignisse zu analysieren. Eine verzögerte Apoptoseinduktion wurde bei der ECPI beschrieben. In dieser Arbeit sollte die Frage nach der unmittelbaren Wirkung der ECPI auf die Lymphozyten geklärt werden. Des Weiteren sollte ein optimiertes *in vitro*-Testsystem etabliert werden, welches geeignet ist, unter therapeutisch relevanten Versuchsbedingungen photoprotektive Effekte, wie Hitzeschockproteine, zu untersuchen und die Frage geklärt werden, ob apoptotische Ereignisse durch Induktion zellprotektiver Hitzeschockproteine beeinflusst werden können. Das *in vitro*-Testsystem sollte weiter der Bestimmung der Zeitkinetik und der UV-Dosis- und 8-MOP-Konzentrationsabhängigkeit der frühen apoptotischen Ereignisse dienen können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probengewinnung/ Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Blutspender**

Im Rahmen der Granulozytenfunktionsdiagnostik wird im Laborbereich der Immunphysiologie des Institutes für Immunologie Blut von Blutspendern aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Medizinischen Fakultät der „Otto-von-Guericke“-Universität Magdeburg verwendet. In dieser Arbeit wurden aus heparinisiertem Vollblut mononukleäre Zellen separiert und bearbeitet.

#### **2.1.2 Patienten**

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Fakultät der „Otto-von-Guericke“-Universität Magdeburg wurde Material von 5 Patienten (54 bis 74 Jahre) mit der Diagnose eines kutanen T-Zell-Lymphoms, die sich der extrakorporalen Phototherapie unterzogen haben, verwendet.

Bei einigen dieser Patienten wurde die Apoptoserate der mononukleären Zellen während mehrerer Zyklen der extrakorporalen Photopherese bestimmt. Die Patienten erhielten keine andere immunmodulatorische Therapie. Die Photopherese wurde an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen (eine Sitzung) unter Standardbedingungen (2 J/cm<sup>2</sup>, 250 ng/ml 8-MOP) an dem Gerät UVAR System (Therakos Inc., West Chester, PA, USA) durchgeführt.

Den Patienten wurde unmittelbar vor der Photopherese heparinisiertes Vollblut entnommen. Die leukozytenreiche Zellsuspension (Buffy Coat) wurde nach der UVA-Bestrahlung direkt aus dem Buffy-Coat-Beutel steril entnommen.

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten.

Patient	Alter/Geschlecht	Photophoresesitzung	Diagnose/Stadium
1	71/m	15+16	CTCL/ III
2	54/m	4+5+7	CTCL/ II
3	65/m	6	CTCL MF II b
4	69/m	7	CTCL/ III
5	72/w	6+7	CTCL/ SS I b

(CTCL kutanes T-Zell-Lymphom, MF Mycosis fungoides, SS Sezary Syndrom)

## **2.2 Reagenzien**

### **Apoptosis Detection Kit (R&D System, Minneapolis, MA, USA)**

Der Kit enthält Annexin V, FITC-markiert, Propidiumjodid und kalziumhaltigen Bindungspuffer.

### **FIX & PERM Cell-Permeabilization Kit („AN DER GRUB“, Wien, Österreich)**

Dieser Kit beinhaltet Fixierungsmedium und Permeabilisierungsmedium. Mit ihm werden zuerst die zu untersuchenden Zellen mit Fixierungsmedium fixiert und im Anschluss daran die Zellmembran mit Permeabilisierungsmedium für Antikörper durchgängig gemacht, um intrazelluläre Strukturen darstellen zu können und dabei die charakteristische Morphologie der Zellen intakt zu lassen.

### **Apo BrdU Kit (Pharmingen, Hamburg, Deutschland)**

### **RPMI-1640 Medium (Seromed/ Biochrom KG, Berlin, Deutschland)**

### **Fetales Kälberserum (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, Deutschland)**

### **Penicillin/ Streptomycin-Lösung (Life technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland)**

### **Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)**

### **PBS Dulbecco`s (Life technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland)**

(8 g/l NaCl; 0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

### **8-Methoxypsoralen (Gernot, Wien, Österreich)**

## 2.3 Antikörper

### Hsp 27

Spezifität:	Anti-Human Hsp27
Klon:	G3.1, StressGen SPA-800
Ig-Klasse:	IgG 1
Konzentration:	1 µg/ml
Herkunft:	monoklonaler Antikörper von der Maus
Lieferant:	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland

### Sekundärantikörper

Spezifität:	Anti-Maus IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> , FITC-markiert
Ig-Klasse:	F(ab') <sub>2</sub> von IgG
Konzentration:	1,4 mg/ml
Herkunft:	Antiserum von der Ziege
Lieferant:	dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

## 2.4 Lymphozytenseparation und -kultivierung

Als Voraussetzung aller funktionellen Untersuchungen wurden aus heparinisierem Vollblut gesunder Probanden die mononukleären Zellen separiert. Zuerst wurden 5 ml Ficoll-Paque-Lösung mit 7 ml Vollblut überschichtet und für 25 Minuten bei einer Drehzahl von 1600 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Lymphozytenring abpipettiert und in entsprechende Rörchen (Volumen 10 ml) verteilt. Danach wurde mit PBS (10 x konzentriertes PBS vor Benutzung 1:10 verdünnt) aufgefüllt, geschwenkt sowie erneut für 15 min zentrifugiert bei einer Drehzahl von 1000 g. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640-Medium, das 10 % fetales Kälberserum enthielt und zusätzlich mit Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) versetzt worden war. Die Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % inkubiert. In dieser Arbeit erfolgte die weitere Verwendung der Zellen für folgende funktionelle Ansätze:

### Hitzeschockprotein-Bestimmungen (Hsp27)

- I. Kontrollen (kein UVA, keine Wärmeeinwirkung)
- II. Proben nur mit UVA-Bestrahlung (2 J/m<sup>2</sup>)
- III. Proben mit nur einer Wärmebelastung von 42 °C über eine halbe Stunde
- IV. Proben mit einer Wärmebelastung von 42 °C über eine halbe Stunde und zusätzlicher UVA-Bestrahlung und 8-MOP Zugabe

### Bestimmung der Apoptoserate (Annexinbindung, Propidiumjodid-Färbung, Bromdesoxyuridineinbau)

- I. Kontrollen (kein UVA, kein 8-MOP)
- II. Proben nur mit UVA-Bestrahlung (0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1,0 J/cm<sup>2</sup>, 2,0 J/cm<sup>2</sup>)
- III. Proben nur mit 8-MOP (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml)
- IV. Proben mit einer Kombination von 8-MOP und UVA

## **2.5 Apoptoseinduktion**

### **2.5.1 UVA und 8-MOP**

Die separierten Lymphozyten wurden in der 1. Testreihe mit verschiedenen UVA-Dosen bestrahlt. Es wurden  $0,5 \text{ J/cm}^2$ ,  $1,0 \text{ J/cm}^2$  und  $2,0 \text{ J/cm}^2$  eingesetzt. Parallel dazu wurde eine Kontrolle unbestrahlter Lymphozyten mitgeführt. Diese mit UVA bestrahlten Zellen wurden in Abständen von 1, 2, 4, 24 und 48 Stunden im Durchflusszytometer analysiert. In einer 2. Versuchsreihe wurden die Zellen eine halbe Stunde vor der Bestrahlung mit 8-MOP behandelt. Diese Substanz dient der Sensibilisierung gegenüber dem UVA-Einfluss. Es kamen verschiedene Konzentrationen (0, 100, 200, 400 ng/ml) zum Einsatz. Jede dieser Konzentrationen wurde mit den oben genannten UVA-Dosen bestrahlt und dann wieder in entsprechenden Zeitintervallen analysiert. Diese Kreuzungstestreihe diente als Grundlage zur Bestimmung der Apoptose unter bestimmten Einflüssen (nur UVA, UVA und 8-MOP, nur 8-MOP) und der Optimierung der UVA-Dosis und der 8-MOP-Konzentration für die Versuchsreihen zur Bestimmung der Hitzeschockproteine und des Bromdesoxyuridineinbaus.

### **2.5.2 Hitzeschock**

Die Lymphozyten wurden bei  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  eine halbe Stunde im Wasserbad gewärmt und dann im Brutschrank bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min aufbewahrt. Danach wurde 8-MOP in einer Konzentration von 200 ng/ml in den Teil der Proben hinzugegeben, welche nach nochmaliger Inkubation für 30 min Dauer mit  $2 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt wurden. Der andere Teil wurde ohne Bestrahlung und 8-MOP-Zugabe analysiert. Die Messungen im Durchflusszytometer wurden in den Abständen 2 Stunden, 4 Stunden und 24 Stunden nach Belastung durchgeführt.

## Probenvorbereitung zur Darstellung der Hitzeschockproteine im Durchflusszytometer

### Zellpermeabilisierung und Fixierung und intrazelluläre Anfärbung

- Hierfür wurde der Zell-Permeabilisierungs- und Fixierungs-Kit („AN DER GRUB“ Bio Research GmbH) verwendet.
- Weiter fanden als primäre Antikörper anti-Hsp27 {Klone: G3.1 Maus} Verwendung.
- Der sekundäre Antikörper wurde von Jackson Immun Research Laboratories, Inc. eingesetzt. Es handelte sich hier um Fluorescein (FITC)-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Ziege Anti-Maus-IgG (H+L-Ketten).

In Anlehnung an die Gebrauchsanweisung der Bio Research GmbH erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung. Zu Beginn der Erstellung der Arbeitsvorschrift wurde eine Optimierung der später verwendeten Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper durchgeführt. Es wurden 50 µl der Lymphozytensuspension (eingestellt auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Medium) in ein 5 ml-Röhrchen gegeben. Im 2. Schritt gab man 100 µl Fixierungsreagenz hinzu und inkubierte dieses Produkt bei Raumtemperatur 15 min. Im Anschluss wurden 2 bis 3 ml PBS hinzugefügt und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Zum Zellpellet werden 100 µl Permeabilisierungsreagenz und primärer Antikörper (20 µl) hinzugegeben (Stammlösung auf 1:20 verdünnen) und dann bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Der nächste Schritt ist ein erneuter Waschvorgang, danach folgen Zusatz von 2 bis 3 ml PBS und Zentrifugation bei 300 x g. Der Überstand wurde abgesaugt, zum Zellpellet gab man 100 µl PBS und sekundären Antikörper (20 µl) hinzu, und dann wurde bei Raumtemperatur 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem nochmaligen Waschvorgang wurden die Zellen in 300 µl Puffer (Cell Wash, Becton Dickinson) resuspendiert. Diese Suspension kann nun bei 2 bis 8 °C im Dunkeln aufbewahrt oder sofort im Durchflusszytometer analysiert werden. Die Messung erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach Färbung.

## **Zellfixierung und Oberflächenanfärbung der Hitzeschockproteine**

- Auch hier wurde der Kit der „AN DER GRUB“ Bio Research GmbH benutzt. Man benötigt nur das Fixierungsmedium.
- Die primären und sekundären Antikörper entsprechen den oben genannten Substanzen.

In dieser Testreihe wurden 50 µl Zellen (eingestellt auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) in jeweils 5 ml Röhrchen verteilt und das Fixierungsmedium (100 µl) hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss gab man 2 bis 3 ml PBS hinzu und zentrifugierte 15 min bei 300 x g. Im nächsten Schritt wurde der Überstand entfernt und zum Zellpellet 100 µl PBS und primäre Antikörper (1:100) sowie sekundäre Antikörper (1:100) hinzu pipettiert. Die anschließende Inkubation erfolgt 15 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Danach gab man 2 bis 3 ml PBS und zentrifugierte nochmals 15 min bei 300 x g. Der vorhandene Überstand wurde abgesaugt und die Zellen resuspendiert in die für die Analyse vorgesehene Lösung (300 µl Cell-Wash). Die Probe konnte bei 2 bis 8 °C im Dunkeln aufbewahrt oder sofort im Durchflusszytometer analysiert werden.

## **Analyse**

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson) mit Hilfe der Software Lysis II. Analysiert wurden jeweils 15000 Zellen. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität im Messkanal FL1. Die Abgrenzung von Hsp-exprimierenden (M2) und nicht exprimierenden Zellen (M1) erfolgte anhand der Markersetzung nach der Messung von Zellen, die entweder nur mit dem Primär- oder nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt worden waren.

Ermittelt wurde der prozentuale Anteil der Hitzeschockprotein-exprimierenden Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität dieser Zellen. Die Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwerte der durchgeführten Einzelversuche und als Standardabweichung.

## **2.6 Messung der Apoptoserate**

### **2.6.1 Messung der Annexin V-Bindung**

Eingesetzt wurde der Apoptosis Detection Kit von R&D Systems. Dieser Kit besteht aus den drei genannten Komponenten: dem Fluorescein-konjugierten humanen Annexin V, dem Propidiumjodid und dem Bindungspuffer. Das Prinzip der Analyse besteht darin, dass die Zellen in der frühen Phase der Apoptose die Phosphatidylserine an der Außenseite der Zellmembran exprimieren, womit sich das Annexin V daran binden kann. In der späten Phase ist die Zellmembran für Propidiumjodid durchlässig. Es bindet sich an die zelluläre DNA. Das Ergebnis präsentiert drei Populationen an Zellen: lebende Zellen, Zellen in der frühen Apoptose und Zellen in der späten Apoptose/Nekrose.

#### **Probenvorbereitung**

- Von den vorbereiteten Lymphozyten ( eingestellt auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden 100  $\mu$ l in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Die Lymphozyten wurden vorab entweder mit verschiedenen UVA-Dosen (0; 0,5; 1,0; 2,0 J/cm<sup>2</sup>) oder mit UVA und 8-MOP (0 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml) vorbehandelt.
- Danach versetzte man die Suspension mit 10  $\mu$ l Annexin V und 10  $\mu$ l Propidiumjodid und inkubierte bei Raumtemperatur 15 min im Dunkeln.
- Im Anschluss musste innerhalb 1 Stunde im Durchflusszytometer gemessen werden. Zur Analyse fügte man 400  $\mu$ l Bindungspuffer hinzu.

## **Analyse der Annexin V-Bindung**

Es wurden 10000 Ereignisse gemessen und mit der Lysis-II-Software am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) analysiert. Im Dotplot von Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht (FSC versus SSC) wurde ein elektronisches Gate gesetzt und die morphologisch intakten Lymphozyten eingegrenzt. In der Dotplot-Darstellung von FL1 (Annexin V-FITC) gegen FL2 (Propidiumjodid) konnten drei Zellpopulationen unterschieden werden.

Im 2. Quadranten stellten sich die Zellen dar, die sowohl mit Annexin als auch mit Propidiumjodid markiert waren, im 3. Quadranten die nichtmarkierten Annexin- und PI-negativen Zellen und im 4. Quadranten diejenigen Zellen, welche Annexin positiv, aber PI negativ waren. Die Ergebnisse der jeweiligen Zellpopulationen wurden als prozentualer Anteil der eingegrenzten Lymphozytenpopulation angegeben.

### **2.6.2 Messung des Bromdesoxyuridineinbaus**

#### **Prinzip**

Der APO-BrdU™ Kit ist ein Kit zur Doppelfärbung von DNA-Strangbrüchen und Gesamtzell-DNA, um apoptotische Zellen im Durchflusszytometer zu finden. Er enthält das Enzym terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT), Bromdesoxyuridin-Triphosphat (Br-dUTP), Fluorescein-markierte anti-BrdU-Antikörper zur Markierung der DNA-Brüche und Propidiumjodid/RNase A-Lösung für die Darstellung der gesamten DNA.

Der Kit besteht aus zwei Teilen:

- Der Teil A besteht aus FITC-markiertem Anti-BrdU-mAb, PI/RNase-Puffer und drei weiteren Puffern zum Waschen, für die Reaktionen und zur Spülung.
- Der Teil B enthält Br-dUTP, negative und positive Kontrollzellen und TdT-Enzym.

Während der Apoptose wird die zelluläre DNA durch Nukleasen in einzelne Fragmente gebrochen. Diese Fragmente können aus den untergegangenen Zellen herausgelöst werden und mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Die DNA von nichtapoptotischen Zellen zeigt in der Elektrophorese kein DNA-Leiter-Muster. Eine große Zahl von DNA-Fragmenten der apoptotischen Zellen haben an ihren Enden hauptsächlich 3'-Hydroxyl-Enden. Diese Tatsache macht man sich zunutze bei der Identifizierung toter Zellen, die mit Br-dUTP markiert werden. Das Enzym TdT katalysiert die Verbindung zwischen Desoxyribonukleosid-Triphosphat und den 3'-Hydroxyl-Enden der doppel- oder einsträngigen DNA. Br-dUTP wird inkorporiert und durch FITC-markierte Anti-Br-dUTP monoklonale Antikörper erkannt. Dies gibt ein starkes Signal im Durchflusszytometer. Nichtapoptotische Zellen nehmen kein Br-dUTP auf.

### **Zellfixation**

Im ersten Schritt wurden 1 bis  $2 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen. Danach gab man 1 x 5 ml Lyselösung hinzu und inkubierte für 15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte ein Waschvorgang mit 5 ml PBS und man wiederholte das Zentrifugieren bei 300 x g. Die Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert und es wurden 5 ml eiskaltes 70 % Ethanol dazugegeben. Die Zellen konnten 30 min auf Eis stehen gelassen oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für einige Tage gelagert werden.

### **Probenvorbereitung**

1. Zunächst erfolgt das Resuspendieren der positiven und negativen Kontrollzellen durch Vortexen. Davon werden 1 ml-Aliquote ( ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ ml ) abgenommen und in Falcon-Röhrchen gegeben. Bei 300 x g wurde dann 5 min zentrifugiert und der 70 % Ethanol-Überstand abgesaugt.
2. Wiederholung der Resuspension der Positiv- und Negativkontrolle sowie der Testzellen in 1 ml Waschpuffer und 1 x waschen. Diesen Vorgang eventuell nochmals durchführen.
3. Jedes Zellpellet wurde in 50  $\mu\text{l}$  DNA-Markierungslösung resuspendiert. Die Markierungslösung enthält TdT-Reaktionspuffer, TdT-Enzym und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verdünnt. Die Lösung ist 24 Stunden haltbar.

4. Für 60 min werden die Zellen mit DNA-Markierungslösung bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
5. In jedes Röhrchen gab man 1 ml Waschpuffer, zentrifugierte und saugte den Überstand ab.
6. Das Zellpellet wurde in 0,1 ml Anti-BrdU-FITC-Antikörperlösung (die Herstellung erfolgte nach den Richtlinien des Herstellers) resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
7. Es wurden 0,9 ml Propidiumjodid/ RNase A-Lösung hinzugegeben.
8. Eine erneute Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln folgte im Anschluss.
9. Die Analyse muss innerhalb von 3 Stunden in der Propidiumjodid/RNase A-Lösung erfolgen.

### **Analyse des Bromdesoxyuridineinbaus**

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACScan (Becton Dickinson) in FL1 (Anti-BrdU-FITC) und FL3 (PI). Gezählt wurden zwischen 7000 und 10000 Zellen. Es war keine Veränderung der Kompensation notwendig. Anhand der positiven und negativen Kontrollzellen wurde in FL3-A versus FL3-W gegatet. Die Y-Achse kennzeichnete die DNA-Pulsfläche, die X-Achse die DNA-Pulslänge. Das Gate zum Ausschluss von Dubletten wurde gesetzt. Dieses überprüfte man mit den Testzellen. Die apoptotischen Zellen analysierte man entweder im Dotplot (FL1 vs FL3) oder im FL1-Histogramm.

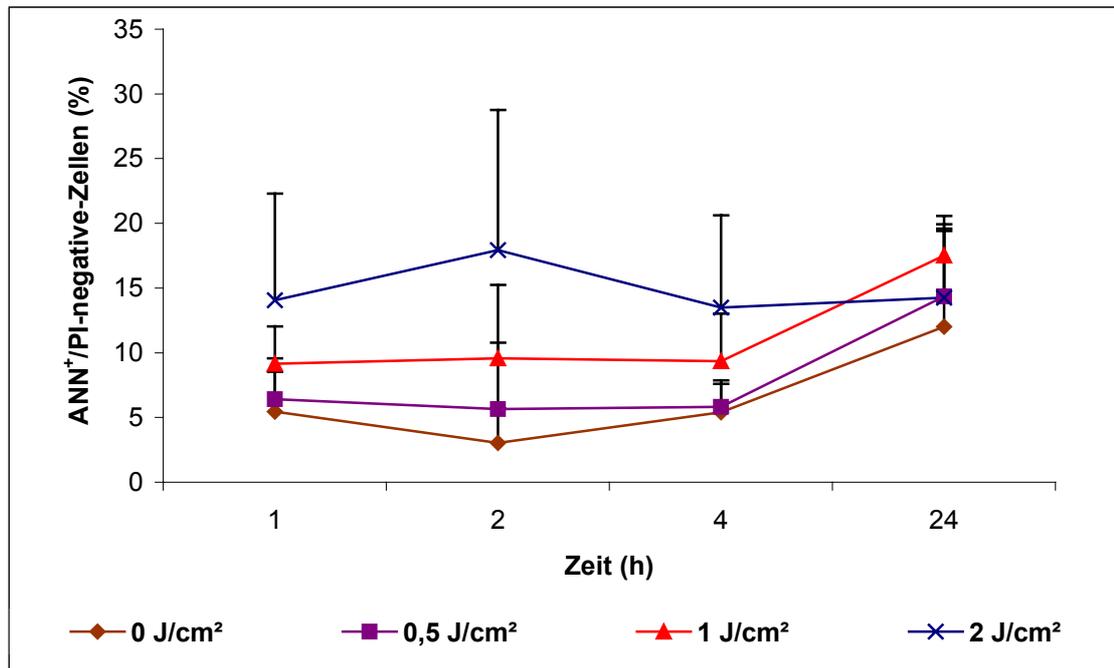
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Optimierung der Testparameter**

##### **3.1.1 Ermittlung der optimalen UVA-Dosis für ein *in vitro*-Testsystem**

Ziel der Versuchsreihen war eine Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur Untersuchung UVA-bedingter Apoptoseinduktion an Lymphozyten des peripheren Blutes. Zunächst wurde die optimale UVA-Dosis für *in vitro*-Testsysteme ermittelt. Dafür bestrahlte man mononukleäre Zellen mit unterschiedlichen UVA-Dosen und ließ die übrigen Testbedingungen (kein Zusatz von 8-MOP und keine Wärmezufuhr) konstant. Eine Kontroll-Lymphozytenpopulation, ohne UV-Bestrahlung, wurde mit den Lymphozyten verglichen, die mit 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> und 2 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt wurden. Diese vier Gruppen wurden in festgelegten Abständen von 1, 2, 4, 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung im Durchflusszytometer analysiert. Zur Bestimmung früh- bzw. spätapoptotischer Zellen wurden die Zellsuspensionen entsprechend mit Annexin und PI angefärbt und die entsprechenden Subpopulationen analysiert. Die Lymphozytenpopulation wurde anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften eingegrenzt.

Das Diagramm 1 zeigt einen Vergleich der Zellen in der frühen Phase der Apoptose in Abhängigkeit von der UVA-Dosis. Die photosensibilisierende Substanz 8-MOP wurde nicht zugegeben.

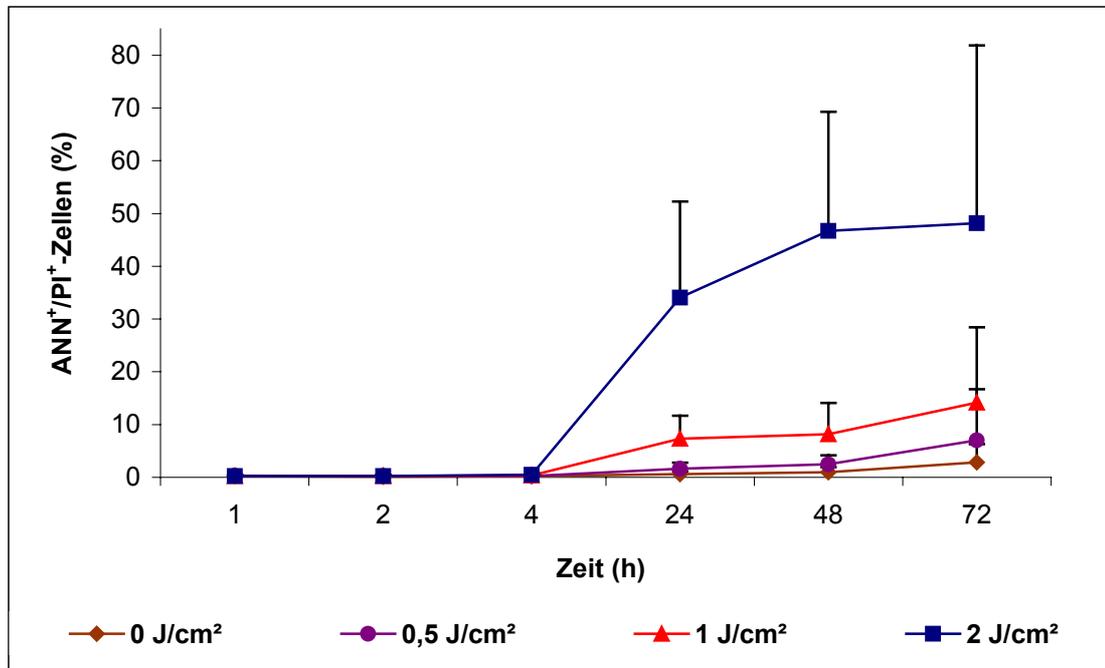


**Diagramm 1: Abhängigkeit des Prozentsatzes frühapoptotischer Zellen von der UVA-Dosis.** Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Bluts wurden mit verschiedenen UVA-Dosen bestrahlt (0,5; 1; 2 J/cm<sup>2</sup>). Nach einem Zeitraum von 1, 2, 4 oder 24 h wurde der Prozentsatz frühapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid-negativer Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Die Eingrenzung der Lymphozytenpopulation erfolgte anhand ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Das Diagramm 1 zeigt, dass eine Abhängigkeit zwischen der UVA-Dosis und dem Anteil frühapoptotischer Ereignisse der Lymphozyten besteht. Bereits eine Stunde nach Bestrahlung mit 2 J/cm<sup>2</sup> wurden 13,5 % frühapoptotische Zellen gemessen, während die unbestrahlte Kontrolle nur 5,4 % Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid-negative Lymphozyten aufwies. Die übrigen Werte lagen entsprechend der UVA-Dosis darunter: bei 1 J/cm<sup>2</sup> bis 9,3 %, bei 0,5 J/cm<sup>2</sup> bis 5,8 %. Eine weitere wesentliche Zunahme der frühapoptotischen Ereignisse war nicht zu beobachten. Im Zeitraum von 2 bis 4 Stunden bleibt der Prozentsatz annähernd auf gleichem Niveau. Nach 24 Stunden ist der Unterschied zwischen den UVA-Dosen nicht mehr deutlich erkennbar. Die Zellen weisen unabhängig von der vorangegangenen Strahlenbelastung eine frühe Apoptoserate von durchschnittlich 15 % auf. Im Vergleich dazu zeigten unbestrahlte Zellen eine Apoptoserate von 12 %.

Im gleichen Versuchsansatz wurde der Prozentsatz spätapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/

Propidiumjodid<sup>+</sup>-Ereignisse gemessen. Das Diagramm 2 stellt eine Zusammenfassung derjenigen Versuchsreihen dar, bei denen die späte Phase der Apoptose untersucht wurde. Auf den Zusatz von 8-MOP wurde verzichtet, um zunächst eine optimale UVA-Dosis zu bestimmen.



**Diagramm 2: Abhängigkeit des Prozentsatzes spätapoptotischer Zellen von der UVA-Dosis.** Es wurden isolierte mononukleäre Zellen mit unterschiedlichen UVA-Dosen (0,5; 1; 2 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Nach einem Zeitabstand von 1, 2, 4, 24, 48 und 72 Stunden wurde in diesem Versuchsansatz der Prozentsatz spätapoptotischer Annexin- und Propidiumjodid positiver Lymphozyten im Durchflusszytometer analysiert. Zur Eingrenzung dieser Zellen wurden ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Im Zeitraum von 1 Stunde bis 4 Stunden waren unabhängig von der Bestrahlungsdosis keine spätapoptotischen Zellen messbar. Ein deutlicher Effekt der UVA-Dosis auf die späte Apoptose war in dieser Versuchsreihe bei der UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> 24 Stunden nach UVA-Bestrahlung zu verzeichnen. Zwischen 4 und 24 Stunden ist ein im Verhältnis zu den übrigen Kurvenverläufen bei einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> ein wesentlich steilerer Kurvenanstieg zu erkennen. Der Anteil spätapoptotischer Zellen beträgt 34,1 %. Dieser Effekt unterlag aber auch großen Schwankungen. Nach 72 Stunden erreichte die Zahl spätapoptotischer Zellen nur noch einen Anstieg auf 48,2 % und damit, in dem Zeitraum zwischen 48 und 72 Stunden, einen flacheren Kurvenverlauf.

Die Bestrahlungsdosen  $0,5 \text{ J/cm}^2$  und  $1 \text{ J/cm}^2$  haben 72 Stunden nach Belastung einen geringeren Einfluss auf die Apoptose.

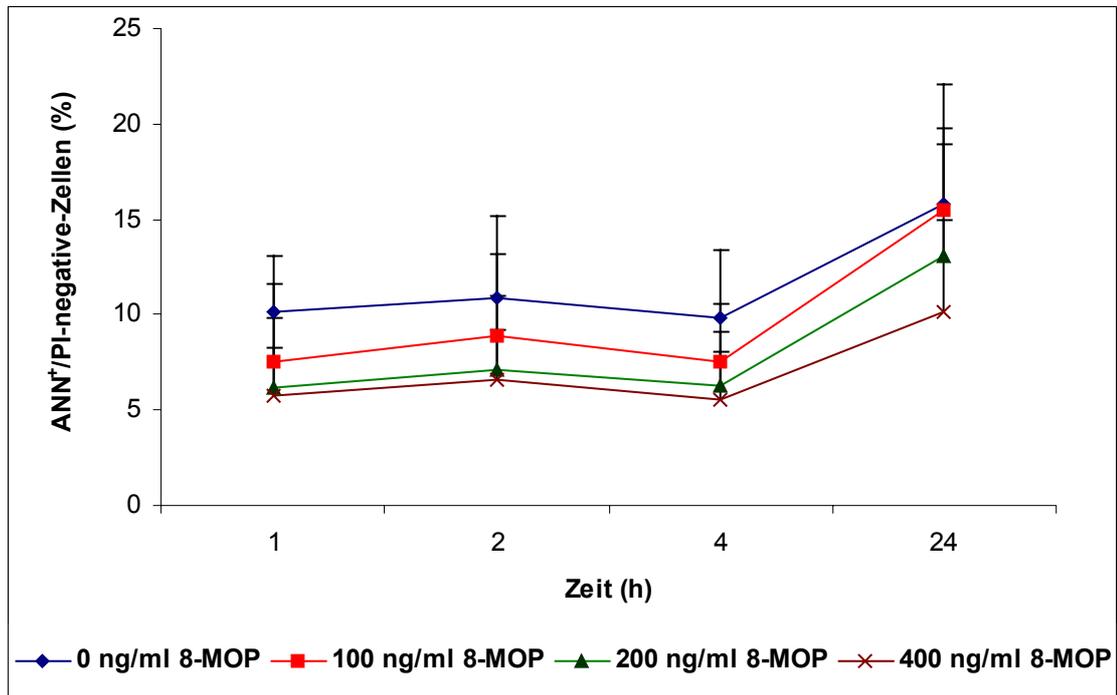
Bei  $1 \text{ J/cm}^2$  (14,2 %) wurde ein etwa doppelt so hoher Prozentsatz als bei  $0,5 \text{ J/cm}^2$  (7,1 %) gemessen. In der Kontrollgruppe betrug der Prozentsatz spätapoptotischer Zellen 2,9 %.

Beide Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die UVA-Dosis von  $2 \text{ J/cm}^2$ , im gegebenen Versuchsansatz, die maximale Wirkung auf die Lymphozyten aufweist. Da diese Strahlungsdosis auch im therapeutisch relevanten Bereich liegt, wurde sie für die Folgeuntersuchungen ausgewählt.

### **3.1.2 Ermittlung des Einflusses von 8-MOP in Abwesenheit einer UVA Bestrahlung**

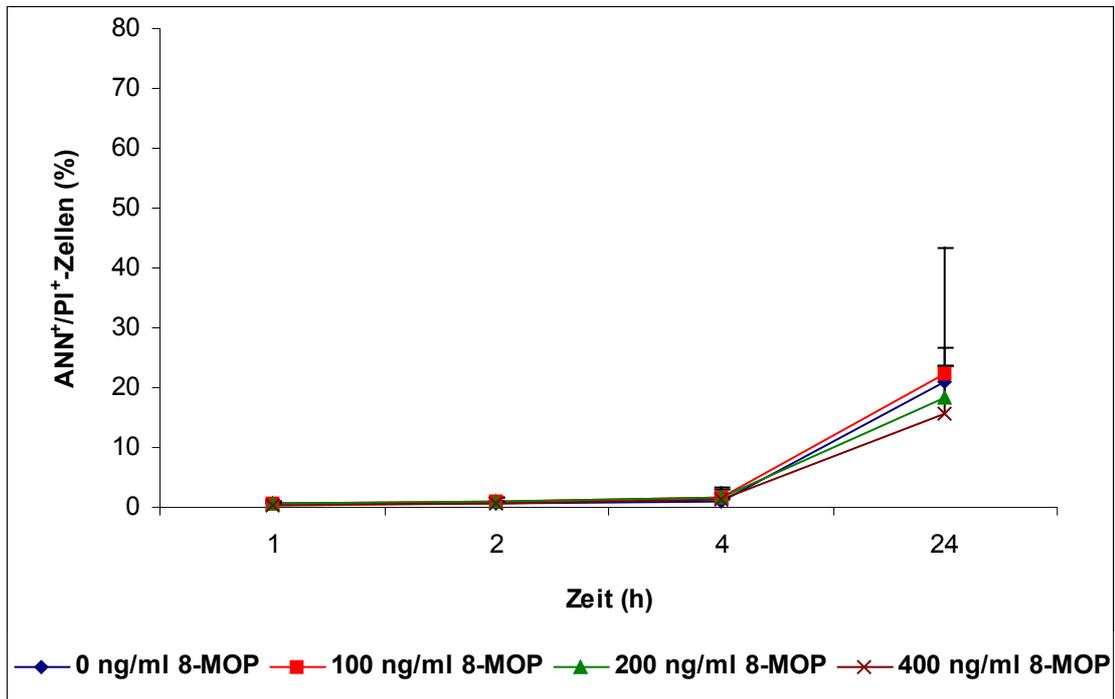
8-Methoxypsoralen wird bei photochemischen Reaktionen als Photosensibilisator eingesetzt und findet häufig in der PUVA-Therapie (Psoralen und UVA) Anwendung.

Im zweiten Untersuchungsschritt ist die Wirkung von 8-MOP allein auf die Apoptoseinduktion untersucht wurden. Das 8-MOP bindet sich sowohl an die DNA als auch an Proteine und Lipide von epidermalen Zellen. In Anlehnung an die in der Therapie eingesetzten Konzentrationen, wurden 8-MOP-Konzentrationen von 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml im Vergleich zum Versuchsansatz ohne 8-MOP untersucht.



**Diagramm 3: Auswirkung der 8-MOP-Konzentration auf den Prozentsatz frühapoptotischer Zellen in der Beobachtungszeit von 1 bis 24 Stunden nach 8-MOP-Zugabe. Die isolierten mononukleären Zellen wurden mit verschiedenen 8-MOP-Konzentrationen versetzt, und nach einem Zeitraum von 1, 2, 4 und 24 Stunden wurde der Prozentsatz frühapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid-negativer Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchen.**

Das Diagramm 3 zeigt, dass im Zeitraum von 1 bis 4 Stunden in der frühapoptotischen Phase kein deutlicher Effekt des 8-MOP ohne zusätzliche Bestrahlung erkennbar ist. Die Zahl der frühapoptotischen Ereignisse bleibt im Durchschnitt in den einzelnen Versuchsreihen gleich hoch. Zum Beispiel wurden 6,1 % apoptotische Zellen 1 Stunde und 6,2 % 4 Stunden nach Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP gemessen. Des Weiteren ist ein sehr gleichmäßiger, flacher Anstieg im Zeitraum von 4 bis 24 Stunden nach 8-MOP-Zusatz in allen Versuchsreihen erkennbar. Zwischen den eingesetzten 8-MOP-Konzentrationen gibt es keinen Unterschied. Durchschnittlich wurde nach 24 Stunden ein prozentualer Anteil frühapoptotischer Zellen von 13,6 % gemessen. Analog zur frühapoptotischen Analyse wurde der mögliche Einfluss verschiedener 8-MOP-Konzentrationen (0 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml) auf die späte Apoptose zu den Zeitpunkten 1 bis 24 Stunden nach Zugabe des 8-Methoxypsoralens gemessen.



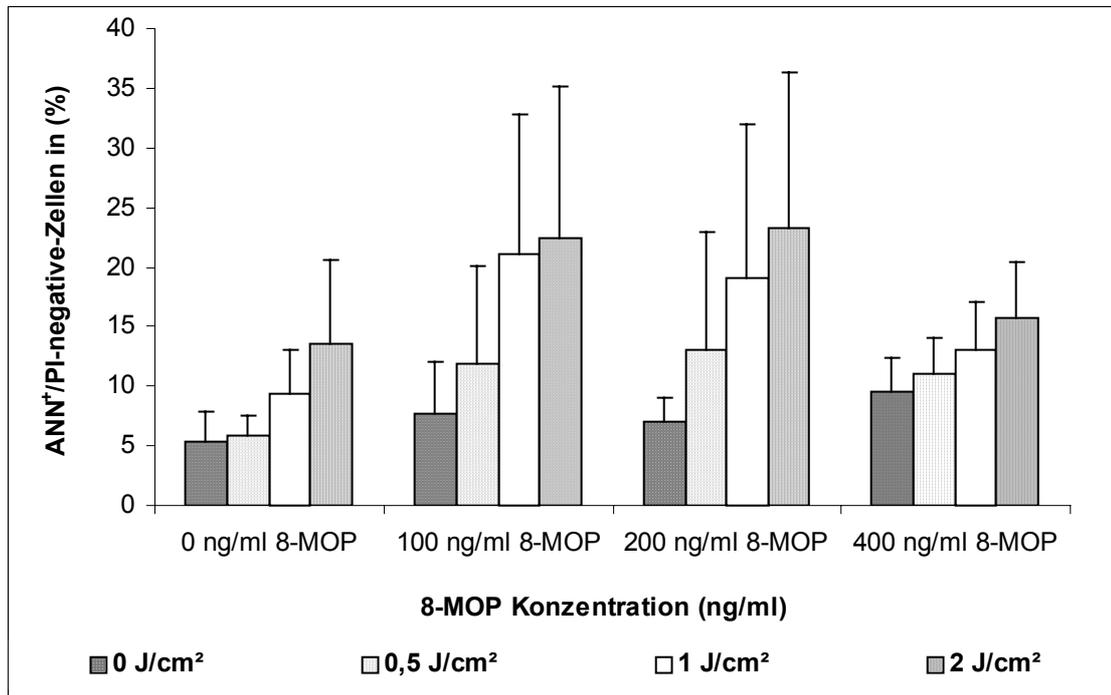
**Diagramm 4:** Auswirkung der 8-MOP-Konzentration auf die Zahl der spätapoptotischen Lymphozyten in der Beobachtungszeit von 1 bis 24 Stunden. Die isolierten mononukleären Zellen wurden mit verschiedenen 8-MOP-Konzentrationen versetzt und nach einem Zeitraum von 1, 2, 4 und 24 Stunden wurde der Prozentsatz spätapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid<sup>+</sup>-Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchen.

In den ersten 4 Stunden nach 8-MOP-Applikation konnten keine späten Apoptoseereignisse festgestellt werden. Im Zeitraum zwischen 4 und 24 Stunden konnte ein gleichmäßig steiler Anstieg in allen Reihen der späten Apoptose nach Zusatz der verschiedenen 8-MOP Konzentrationen gemessen werden. Dieser hatte in der Messung 24 Stunden nach Applikation Maximalwerte erreicht. Diese betragen in der Kontrollgruppe 20,9 % spätapoptotischer Zellen und in der mit 100 ng/ml 8-MOP-behandelten Gruppe 22,5 %. Der prozentuale Anteil spätapoptotischer Zellen nach Gabe von 200 ng/ml lag bei 18,2 %. In der Messreihe nach Zusatz einer 8-MOP-Konzentration von 400 ng/ml wurde ein etwas geringerer Prozentsatz von 15,7 % gemessen.

In der Zusammenfassung kann gesagt werden, dass keine deutlichen Unterschiede in der Apoptoseinduktion nach Gabe verschiedener 8-MOP-Konzentrationen und 8-MOP-freier Inkubation festgestellt wurden. Diese Aussage besitzt sowohl für die frühe als auch für die späte Apoptose Gültigkeit.

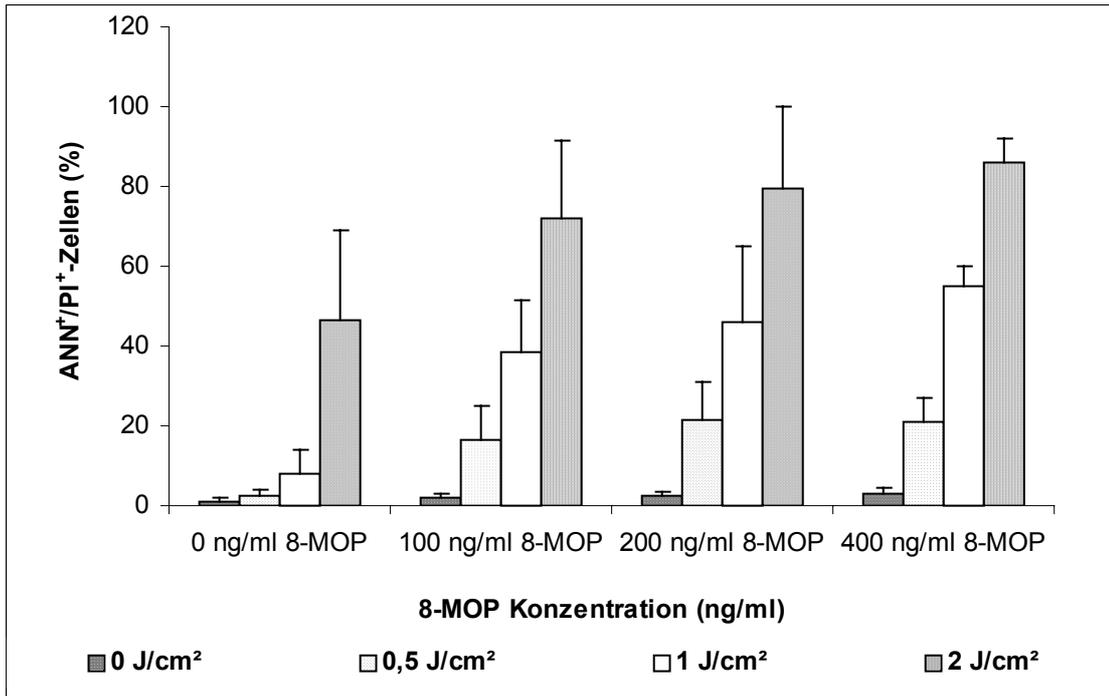
### **3.1.3 Ermittlung der 8-MOP Konzentration in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis**

In der Behandlung einer Vielzahl von Hauterkrankungen finden sogenannte Photosensibilisatoren eine breite Anwendung: z.B. 5-MOP, 8-MOP, 4,8,5'-Trimethylpsoralen (TMP). Wie in den Diagrammen 3 und 4 gezeigt, weist 8-MOP ohne Vorhandensein von ultravioletter Strahlung keinen wesentlichen Effekt auf eine Apoptoseinduktion auf. Zur Klärung der optimalen *in vitro*-Versuchsbedingungen mit maximalen Effekten auf eine Apoptoseinduktion wurde die Psoralen-Konzentration in Abhängigkeit von der UVA-Dosis ermittelt. Dazu wurden exemplarisch 2 Zeitpunkte ausgewählt: 4 Stunden für den Nachweis frühapoptotischer Ereignisse (da hier eine deutliche Differenz zwischen der UVA-Dosis 0 J/cm<sup>2</sup> und 2 J/cm<sup>2</sup> mit der geringsten Schwankungsbreite zu verzeichnen war; siehe Diagramm 1) und 48 Stunden (da hier ein Plateau erreicht wurde und nach 72 Stunden keine wesentliche Steigerung der Apoptoserate mehr erkennbar war; siehe Diagramm 2) zum Nachweis spätapoptotischer Ereignisse.



**Diagramm 5: Abhängigkeit des Prozentsatzes frühapoptotischer Zellen von der UVA-Dosis und der 8-MOP-Konzentration.** Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mit verschiedenen 8-MOP-Konzentrationen behandelt und mit unterschiedlichen UVA-Dosen bestrahlt. Zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Exposition wurde die Zahl frühapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/PI-negativer Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Im Diagramm 5 ist ein maximaler Anstieg des Prozentsatzes frühapoptotischer Zellen bei einer 8-MOP Konzentration von 200 ng/ml mit Zunahme der UVA-Dosis zu verzeichnen. Es wurden Werte von 13,1 % bei 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 19 % bei 1 J/cm<sup>2</sup> und bis 23,3 % bei 2 J/cm<sup>2</sup> registriert. Vergleichsweise niedriger lagen die Werte bei 100 ng/ml 8-MOP (11,9 % bei 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 21 % bei 1 J/cm<sup>2</sup>, bis 22 % bei 2 J/cm<sup>2</sup>). Bei 400 ng/ml 8-MOP (11 % bei 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 13,5 % bei 1 J/cm<sup>2</sup>, bis 15,7 % bei 2 J/cm<sup>2</sup>) war keine weitere Steigerung der Rate frühapoptotischer Zellen festzustellen. Allerdings zeigen die Messergebnisse unter Einsatz von 400 ng/ml 8-MOP im Vergleich zu 100 ng/ml und 200 ng/ml 8-MOP geringere Schwankungen. Für die folgenden Untersuchungen wurden deshalb die optimalen Testbedingungen von 200 ng/ml 8-MOP und 2 J/cm<sup>2</sup> gewählt, da sich unter diesen Voraussetzungen für die Messung der frühen apoptotischen Ereignisse deutliche Effekte erzielen ließen.



**Diagramm 6: Abhängigkeit des Prozentsatzes spätapoptotischer Zellen von der UVA-Dosis und der 8-MOP-Konzentration.** Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mit verschiedenen 8-MOP-Konzentrationen behandelt und mit unterschiedlichen UVA-Dosen bestrahlt. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Exposition wurde die Zahl spätapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 6 Versuchen.

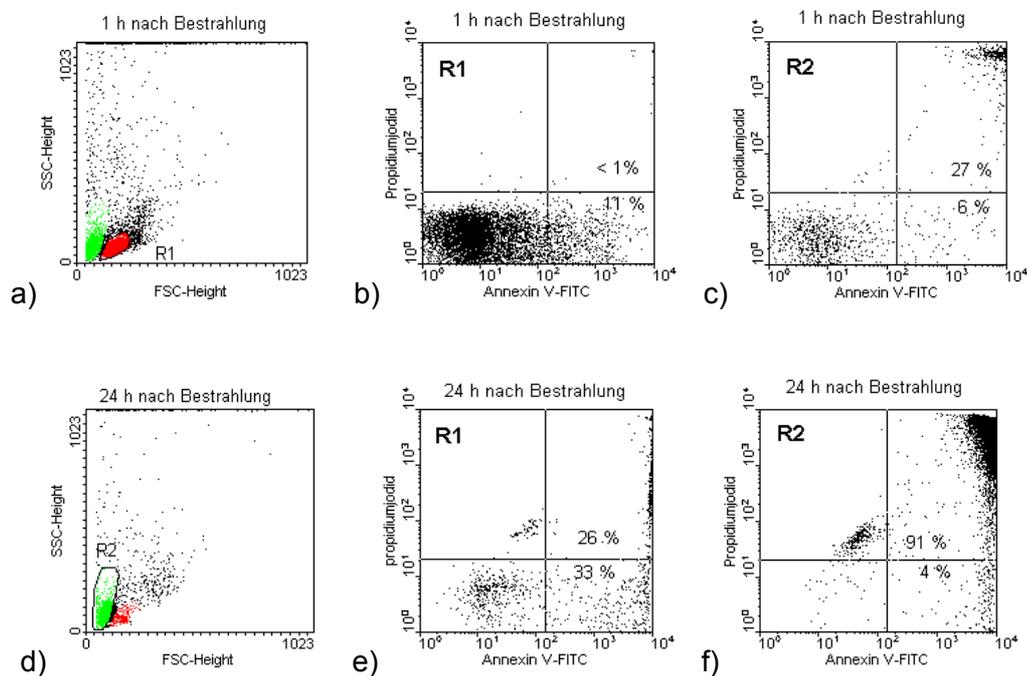
Im gleichen Versuchsansatz wurde der Prozentsatz spätapoptotischer, Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid<sup>+</sup> doppelt positiver Zellen bestimmt. Mit der höchsten 8-MOP-Konzentration (400 ng/ml) und UVA-Belastung (2 J/cm<sup>2</sup>) wurde ein maximaler Effekt erzielt. Die Zahl der spätapoptotischen Zellen betrug 86 %. Bei 200 ng/ml 8-MOP und 2 J/cm<sup>2</sup> wurde im Vergleich zum zuvor Genannten ein Anteil von 80 % an spätapoptotischen Zellen registriert, bei 100 ng/ml 8-MOP und 2 J/cm<sup>2</sup> 72 % gemessen. Im Gegensatz dazu wurden ohne 8-MOP und 2 J/cm<sup>2</sup> 46 % spätapoptotische Zellen gemessen. In der Kontrollgruppe ohne Bestrahlung lag die Zahl der apoptotischen Zellen bei 0 J/cm<sup>2</sup> und den verschiedenen 8-MOP-Mengen jeweils unter 3,2 %. Bei einer Strahlungs-dosis von 0,5 J/cm<sup>2</sup> betrug der maximale Prozentsatz spätapoptotischer Zellen 48 Stunden nach Exposition 21 % bei einem Zusatz von 200 und 400 ng/ml 8-MOP. Nach der Bestrahlung mit 1 J/cm<sup>2</sup> UVA wurde ein prozentualer Anteil spätapoptotischer Zellen von 38,3 % (100 ng/ml 8-MOP), von 48 % (200 ng/ml 8-MOP) bzw. von 56 % (400 ng/ml 8-MOP) gemessen.

Auch in dieser Versuchsreihe wurde die geringste Schwankungsbreite der Werte bei der Konzentration von 400 ng/ml 8-MOP beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Im Bereich von 0,5 bis 2 J/cm<sup>2</sup> kommt es zu einer dosisabhängigen Zunahme des Prozentsatzes apoptotischer Zellen. Der Photosensibilisator 8-MOP verstärkt diesen Effekt im Konzentrationsbereich von 100 bis 400 ng/ml. Die maximale Induktion frühapoptotischer Ereignisse nach 4 Stunden wurde bei einer Bestrahlungsdosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml erzielt (23,3 %). Der größte Prozentsatz spätapoptotischer Zellen wurde 48 Stunden nach Bestrahlung mit ebenfalls 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Zugabe von 400 ng/ml gemessen (86 %). Bei gleicher UVA-Dosis, aber der geringeren 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml betrug der Anteil spätapoptotischer Zellen 80 %. In den therapeutischen Ansätzen werden Konzentrationen von 200 ng/ml und Dosen von 2 J/cm<sup>2</sup> angewandt. Aus diesen Gründen wurde für das optimierte *in vitro*-Testsystem die Konzentration von 200 ng/ml 8-MOP und eine Bestrahlungsdosis von 2 J/cm<sup>2</sup> gewählt.

### 3.1.4 Kinetik der Apoptoseinduktion unter definierten optimalen Testbedingungen

Als Versuchsbedingungen werden die ermittelte optimale UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> sowie die 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml eingesetzt. Das Diagramm 7 zeigt eine Gegenüberstellung der Streulichteigenschaften sowie der Annexin- und Propidiumjodidfärbung zu dem frühen Zeitpunkt 1 Stunde nach Bestrahlung und zu dem späten Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung anhand eines ausgewählten Beispiels.

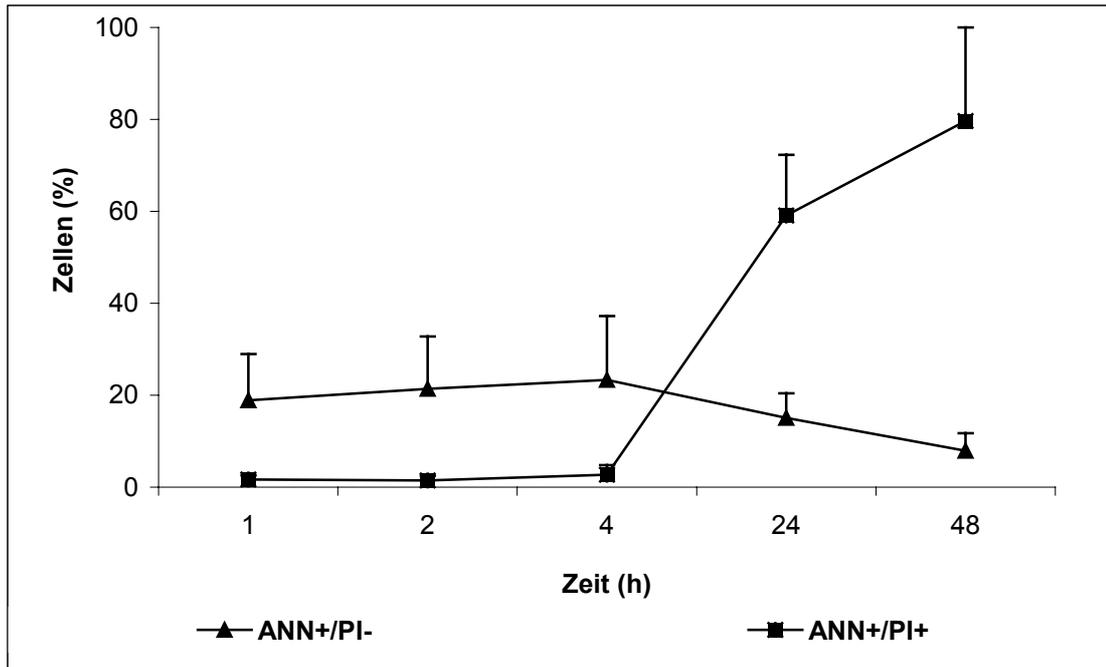


**Diagramm 7: Analyse der frühen und späten Apoptose der Lymphozyten 1 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und Belastung mit 200 ng/ml 8-MOP; a, d, Vorwärts-(FCS) vs Seitwärts-(SSC) Lichtstreuung; b, c, e, f Dot plots der Annexin V-Markierung (FL1) und Propidiumjodid-Markierung (FL2); R1 = Region der intakten Lymphozyten; R2 = Region, typisch für die späte Apoptose.**

Die Zellschrumpfung und der Anstieg der Granularität sind Merkmale der Apoptose. Die Zellverkleinerung wird im FSC-Strahlengang und die Zunahme der Granulierung im SSC-Strahlengang des Durchflusszytometers analysiert. Deswegen wurden Veränderungen der Scatteigenschaften anhand eines ausgewählten Beispiels veranschaulicht. Eine Stunde nach der Bestrahlung findet man hauptsächlich morphologisch intakte Lymphozyten. Diese wurden eingegrenzt und mit R1 bezeichnet (Diag.7a).

Nach 24 Stunden nimmt der Prozentsatz an Zellen zu, die eine Zellschrumpfung und eine Zunahme der Granularität erfahren haben (R2, Diag.7d). Grenzt man die Zellen der Region R1 (intakte Zellen) ein, so erkennt man einen offensichtlichen Anstieg der Annexin V-Bindung (33 %) und der Annexin V-/Propidiumjodid-Doppelbindung (26 %) nach 24 Stunden (Diag.7e).

Grenzt man die Zellen in der Region R2 ein, findet man einen deutlichen Anstieg der Annexin V/Propidiumjodid doppelt angefärbten Lymphozyten auf 91 % nach 24 Stunden (Diag.7f). Die einfache Färbung mit Annexin V zeigt keinen Effekt (6 % vs 4 % Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> negativ im Vergleich 1 und 24 Stunden nach Belastung). Dies veranschaulicht, dass diese Zellpopulation in der Region R2 fast ausschließlich nur Zellen in der späten Phase der Apoptose beinhaltet. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen auf der Induktion frühapoptotischer Ereignisse lag, wurden im folgenden ausschließlich die morphologisch intakten Zellen in der Region R1 eingegrenzt und ausgewertet. Die sich anschließende Untersuchung verfolgte das Ziel, eine genaue Zeitkinetik der Induktion der Apoptose zu ermitteln. Gemessen wurden die vitalen Zellen (unterer linker Quadrant ANN<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), die Annexin V-Bindung als Marker der frühen Apoptose (der untere rechte Quadrant ANN<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) und die Annexin V-/Propidiumjodid-Doppelfärbung als Marker der späten Apoptose (oberer rechter Quadrant ANN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Eine Stunde nach der Strahlen- und Psoralenexposition findet man den größten Teil der Zellpopulation (ca. 70 %) im unteren linken Quadranten. Der Anteil spätapoptotischer Zellen liegt unter 1 %. Dies bedeutet, dass anfänglich ein hoher Prozentsatz der Zellen morphologisch intakt ist und eine intakte Zellmembran aufweist und somit Annexin-negativ/Propidiumjodid-negativ ist. Je größer der zeitliche Abstand nach der Behandlung mit 200 ng/ml und 2 J/cm<sup>2</sup> wird, desto mehr verschiebt sich die Zellpopulation in den oberen rechten Quadranten. Hier befinden sich die Zellen, die eine gestörte Zellmembran aufweisen und sich in der späten Phase der Apoptose befinden (26 % bei R1) nach 24 Stunden. Annexin kann sich an die Zellmembran binden und Propidiumjodid in das Zellinnere eindringen.



**Diagramm 8: Induktion der Apoptose unter definierten Bedingungen (2 J/cm<sup>2</sup> UVA und 200 ng/ml 8-MOP) in Abhängigkeit von der Zeit. Darstellung der frühen (ANN<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) und späten Apoptose (ANN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Mittelwert und Standardabweichung aus 6 Versuchen.**

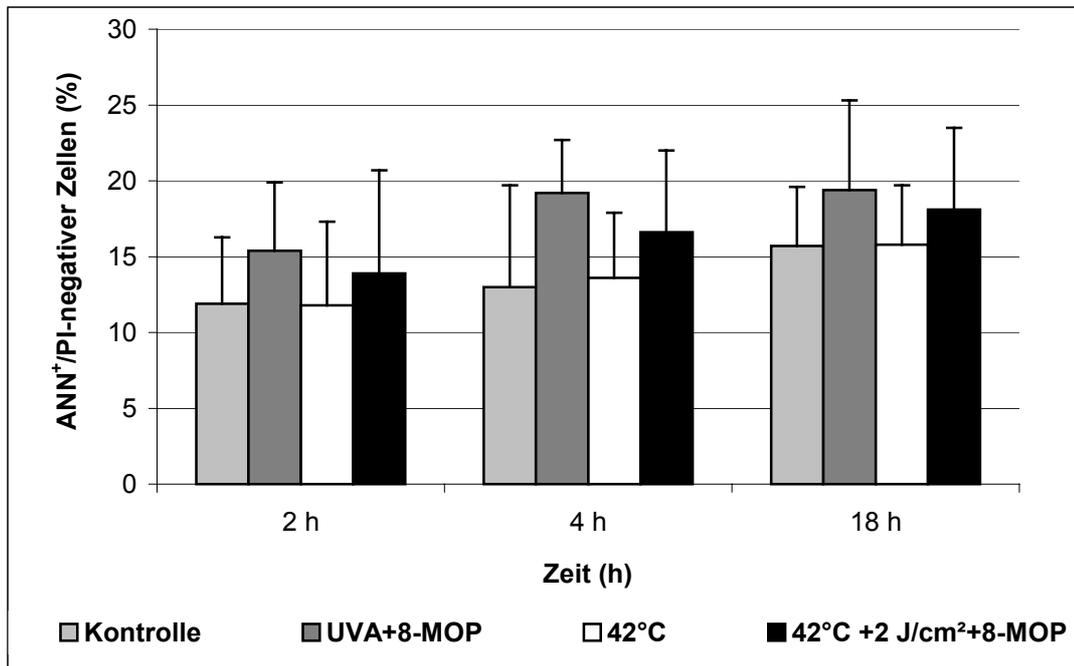
Im Diagramm 8 wird erkennbar, dass unter definierten Bedingungen (200 ng/ml 8-MOP und 2 J/cm<sup>2</sup> UVA) ein kontinuierlicher sehr flacher Anstieg in der frühen Phase der Apoptose von 19 % beim Zeitpunkt 1 Stunde bis zu einem Wert von 23 % apoptotischer Zellen bei 4 Stunden erfolgt. Danach ist wieder ein stetiger Abfall zu verzeichnen. Nach 24 Stunden beträgt der Wert der frühapoptotischen Zellen 15 % und der Wert der spätapoptotischen Zellen 59 %. In der Gruppe der spätapoptotischen Zellen ist ein sprunghafter Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen zu verzeichnen (von 2,7 % vier Stunden nach Belastung auf 59 %). Nach 48 Stunden erreicht die Zahl der Annexin<sup>+</sup>/Propidiumjodid<sup>+</sup>-Zellen einen maximalen Wert von 80 %. Nach Behandlung der Zellen mit 200 ng/ml 8-MOP und Bestrahlung mit 2 J/cm<sup>2</sup> UVA überwiegen in den ersten 4 Stunden die frühapoptotischen Zellen. Einen sprunghaften Wechsel verzeichnet man nach 4 Stunden, denn dann ist das Verhältnis umgekehrt. Man findet einen wesentlich höheren Prozentsatz spätapoptotischer Zellen gegenüber der Abnahme des Anteils frühapoptotischer Zellen. In der untersuchten Zellgruppe lassen sich nach mehr als 4 Stunden nach Belastung zunehmend mehr in ihrer Zellmorphologie zerstörte Zellen als intakte Zellen nachweisen. Es ist ein Behandlungseffekt erkennbar.

## **3.2 Einfluss eines Hitzeschocks auf die Apoptoseinduktion**

### **Messung der Annexin V-Bindung und PI-Färbung apoptotischer Zellen**

Die Hitzeschockantwort von Zellen und Organismen ist ein hoch konservierter Reaktionsmechanismus in Stresssituationen. Es ist bekannt, dass eine hyperthermische Behandlung eine Hitzeschockantwort auslöst und Zellen vor UVB-induzierten Strahlenschäden schützen kann.

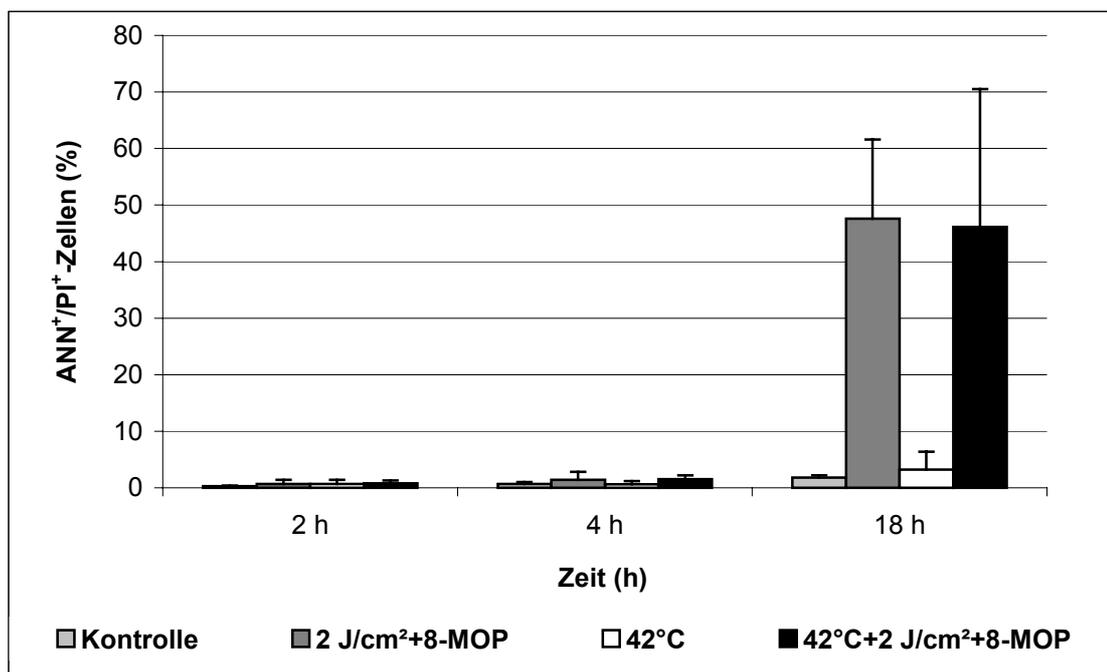
In der folgenden Versuchsreihe wurde eine Hitzeschockreaktion der isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes ausgelöst und deren Einfluss auf die UVA-induzierte Zellapoptose untersucht. Die Zellen wurden entsprechend mit einer UVA-Bestrahlung von  $2 \text{ J/cm}^2$ , einem Hitzeschock von  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  über 30 min und der Kombination von 30 Minuten Hitzeschock bei  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  und anschließender Bestrahlung ausgesetzt. Danach wurden eine Analyse im Durchflusszytometer vorgenommen.



**Diagramm 9: Beeinflussung der UVA-induzierten frühapoptotischen Ereignisse durch Hitzeschock. Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden entweder mit einer UVA-Dosis 2 J/cm<sup>2</sup> und Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP oder mit einer Wärmezufuhr von 42 °C über 30 min oder mit der Kombination dieser Stressgrößen behandelt. Zum Zeitpunkt 2, 4 und 18 Stunden nach Exposition wurde die Zahl frühapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/PI-negativer Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichung aus 6 Versuchen.**

Im Diagramm 9 ist erkennbar, dass unter den gewählten physikalischen Stressbedingungen der Prozentsatz frühapoptotischer Zellen in dem Zeitraum 2 bis 18 Stunden nach Exposition zwischen 12 % und 19 % schwankt und keinen substantiellen Veränderungen unterliegt. Die Zahl der frühapoptotischen Zellen in der Kontrollgruppe und in der Population unter Hitzebelastung von 42 °C beträgt 2 Stunden nach Behandlung jeweils 12 %, 4 Stunden danach 13 % in der Kontrollgruppe und 13,6 % unter Hitzebelastung und erreicht einen Wert von jeweils 16 % nach 18 Stunden. Somit führt ein Hitzeschock nicht zu einer Zunahme frühapoptotischer Zellen. Die UVA-Bestrahlung führt zu einer erhöhten Rate frühapoptotischer Zellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle: 15 % vs 12 % nach 2 Stunden, 19 % vs 13 % nach 4 Stunden und 19 % vs 16 % nach 18 Stunden. Die Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 42 °C und anschließender Bestrahlung bewirkt eine geringgradige Verminderung der Induktion frühapoptotischer Ereignisse.

Nach 2 Stunden beträgt die Apoptoserate 14 %, nach 4 Stunden 17 % und nach 18 Stunden 18 %. Das Ausgangsniveau unbestrahlter Zellen und nur hitzeschockbehandelter Zellen wurde dabei nicht erreicht. Die Hitzeschockbehandlung zeigt somit die Tendenz, UVA-induzierte frühapoptotische Ereignisse in geringfügigem Maße zu vermindern.

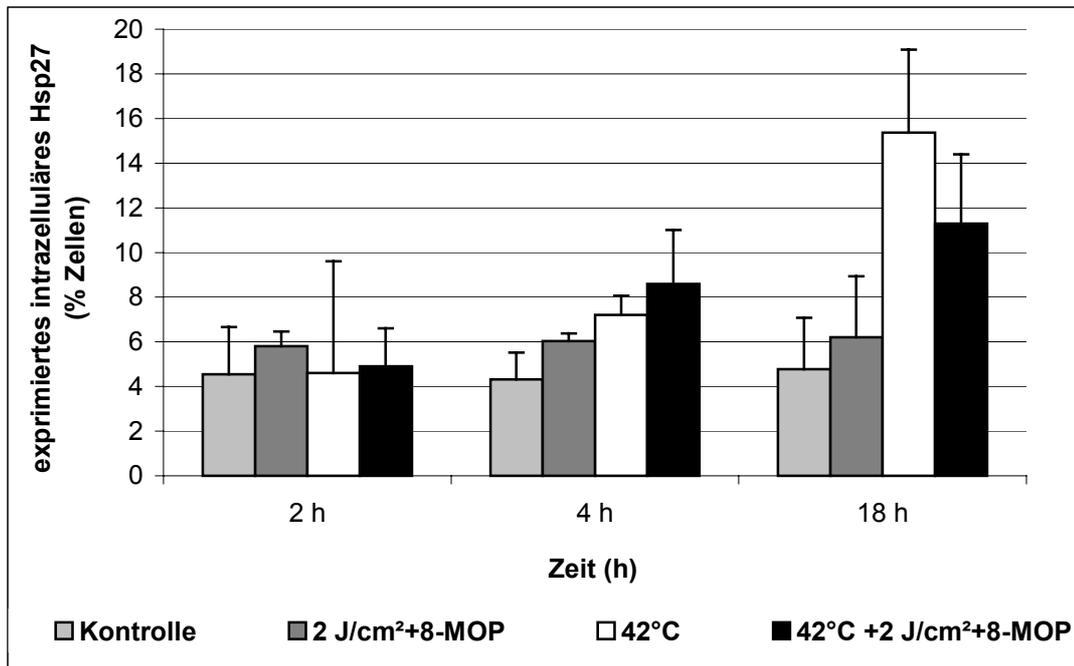


**Diagramm 10: Beeinflussung der UVA-induzierten spätapoptotischen Ereignisse durch Hitzeschock.** Isolierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden entweder mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP, mit einer Wärmezufuhr von 42 °C über 30 min und mit der Kombination dieser Stressgrößen behandelt. Zum Zeitpunkt 2, 4 und 18 Stunden nach Exposition wurde die Zahl spätapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-Lymphozyten am Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Im Vergleich zum Diagramm 9 zum Nachweis frühapoptotischer Zellen findet man im Diagramm 10 einen gravierenden Unterschied. Zu den Zeitpunkten 2 und 4 Stunden nach Exposition ist ein ähnlich niedriger Prozentsatz spätapoptotischer Zellen in allen Versuchsansätzen zu verzeichnen. Die Werte liegen alle um 1 %. Nach 18 Stunden kann ein nur sehr flacher Anstieg der spätapoptotischen Zellen in der Kontrollgruppe auf einen Wert von 2 % und der mit Wärme behandelten Zellen auf 3 % gemessen werden.

Hingegen ein sprunghafter Anstieg bei der UVA-bestrahlten Population (47 %) und der kombiniert belasteten Gruppe (46 %) zu verzeichnen ist. Die Hitzeschockbehandlung der mononukleären Zellen vor einer anschließenden UVA-Bestrahlung zeigt somit keinen Effekt auf den Prozentsatz spätapoptotischer Annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-Zellen.

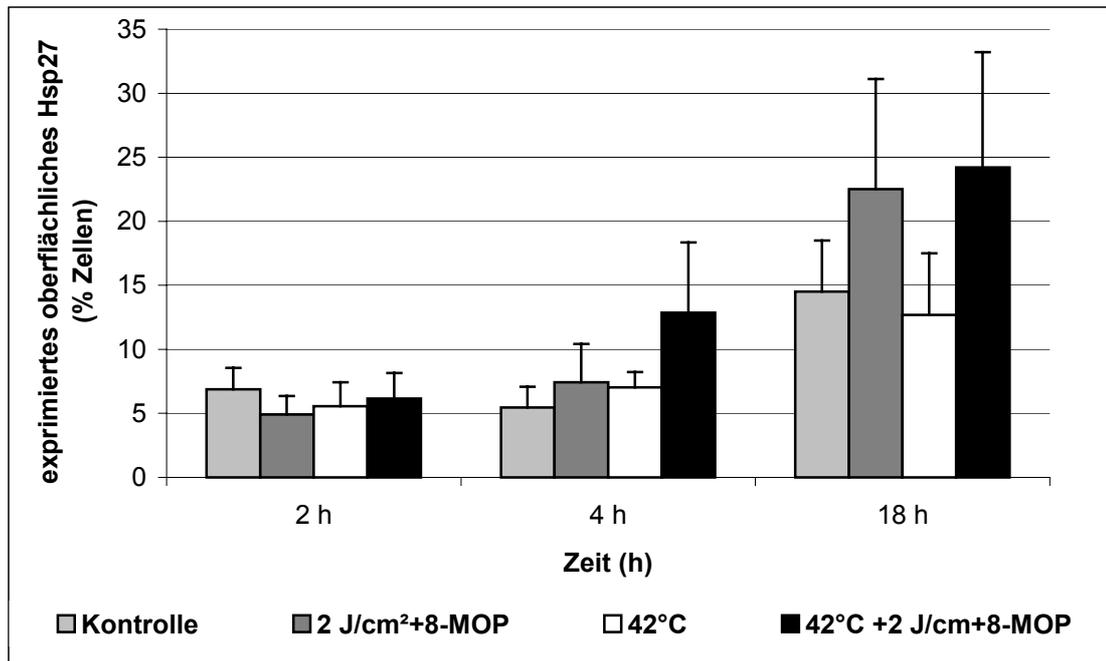
Die Ergebnisse beruhen möglicherweise auf der Wirkung von Hitzeschockproteinen. Die Proteine haben in kompensierten Stresssituationen einen zellprotektiven Effekt. Man findet sie in dieser Situation intrazellulär. Dagegen in der zunehmend dekompenzierten Stresssituation, in der Phase der Apoptose, gelangen sie an die Oberfläche der Zellen. Am Ende der Apoptose, in der Nekrose/Zellzerstörung, sind alle Hitzeschockproteine auf der Zelloberfläche. Das niedrigmolekulare Hsp27 spielt eine wesentliche Rolle bei einer sogenannten Hitzeschockresistenz. Wir untersuchten deshalb die Expression des Hitzeschockproteins Hsp27 nach UVA-Bestrahlung, nach Hitzeschock bzw. der Kombination dieser Stressfaktoren.



**Diagramm 11:** Darstellung der Expression des intrazellulären Hitzeschockproteins Hsp27 2, 4 und 18 Stunden nach UVA-Exposition (2 J/cm<sup>2</sup>) und Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP, nach Wärmebelastung mit 42 °C über 30 min und der kombinierten Behandlung der isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Die Zellen wurden permeabilisiert und mit monoklonalen Anti-Hsp27-Antikörpern inkubiert. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer. Ermittelt wurde der prozentuale Anteil der Hsp27 exprimierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Im Diagramm 11 ist nach Hitzeschockbelastung oder nach Hitzeschock mit anschließender UVA-Bestrahlung ein Anstieg des intrazellulären Hitzeschockproteins Hsp27 zu verzeichnen. Durch die einfache UVA-Bestrahlung ist im Vergleich zu den übrigen Belastungsformen ein wesentlich geringerer prozentualer Anstieg vorhanden. Im Verlauf ist ein Anstieg von 5,8 % Hsp nach 2 Stunden auf 6,2 % nach 18 Stunden erkennbar.

Vergleichsweise dazu steigt unter einfacher Hitzebelastung (42 °C über einen Zeitraum von 30 min) die Zahl-Hsp27 exprimierender Zellen sprunghaft an: von 4,6 % nach 2 Stunden über 7 % nach 4 Stunden auf 15,4 % nach 18 Stunden. Bei der doppelten Belastung ist ähnlicher Weise ein solcher Anstieg, von 5 % über 8,6 % auf 11,3 % vorhanden.



**Diagramm 12:** Darstellung des oberflächlichen Hitzeschockproteins Hsp27 2, 4 und 18 Stunden nach UVA-Exposition ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) und Zusatz von  $200 \text{ ng/ml}$  8-MOP, nach Wärmebelastung mit  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  über 30 min und der kombinierten Behandlung der isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer. Ermittelt wurde der prozentuale Anteil der Hitzeschockprotein exprimierenden Zellen. Dargestellt wurden die Ergebnisse von 6 Versuchen und die Standardabweichung.

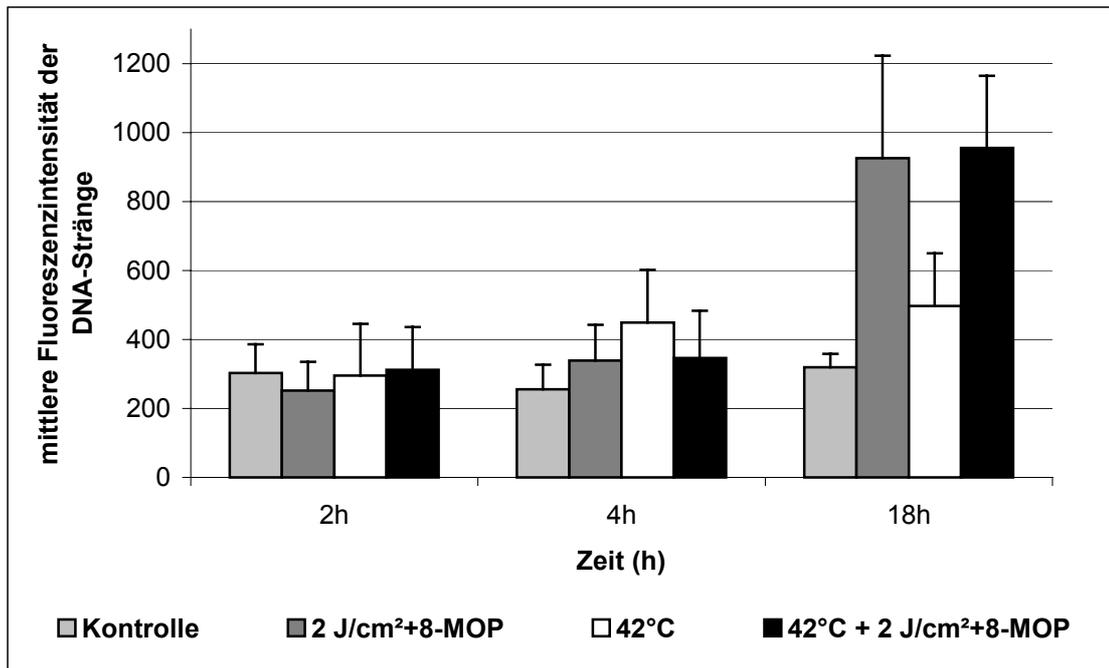
Es ist beschrieben, dass während der Apoptoseinduktion Hitzeschockproteine auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können. Deshalb wurde der gleiche Versuchsansatz mit nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Diagramm 12 dargestellt. Der prozentuale Anteil von Zellen mit markiertem oberflächlichem Hitzeschockprotein zeigt in dieser Versuchsreihe einen sprunghaften Anstieg unter allen Belastungen 18 Stunden nach Exposition sowie unter Kontrollbedingungen ohne Belastung.

Nach der UVA-Bestrahlung steigt die Zahl der Zellen von  $5 \%$  2 Stunden nach Belastung auf  $23 \%$  18 Stunden nach Belastung an. Genauso deutlich ist dies bei der doppelten Belastung zu erkennen. Der Anteil Hsp27-exprimierender Zellen steigt von  $6,2 \%$  2 Stunden auf  $24 \%$  18 Stunden nach Belastung an. Im Vergleich dazu findet sich unter der einfachen Hitzebelastung ein geringerer Anstieg von  $5,6 \%$  auf  $13,7 \%$ .

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass unter allen physikalischen Bedingungen ein Anstieg Hsp27-exprimierender Zellen zu verzeichnen ist. Die größte Menge von intrazellulärem Hsp27 ist unter der einfachen Hitzebehandlung vorhanden. Die Expression von Hsp27 könnte somit auch eine zellprotektive Wirkung haben, da die Apoptoserate nach alleiniger Hitzebelastung im wesentlichen unbeeinflusst bleibt (Diagramm 9 und 10). Dies zeigt sich ebenfalls in dem geringen Prozentsatz der Zellen mit oberflächlichen Hsp27-Protein unter Wärmeeinfluss gegenüber den prozentualen Anteilen unter UVA und bei der doppelten Belastung. Der höchste Anteil von Zellen mit Oberflächen-Hsp27-Expression ist nach UVA und Hitzeschock zu verzeichnen. Je mehr oberflächliches Hsp27 und je geringer das intrazelluläre Hsp27 desto geringer ist möglicherweise die zellprotektive Wirkung und mehr apoptotische Zellen treten auf.

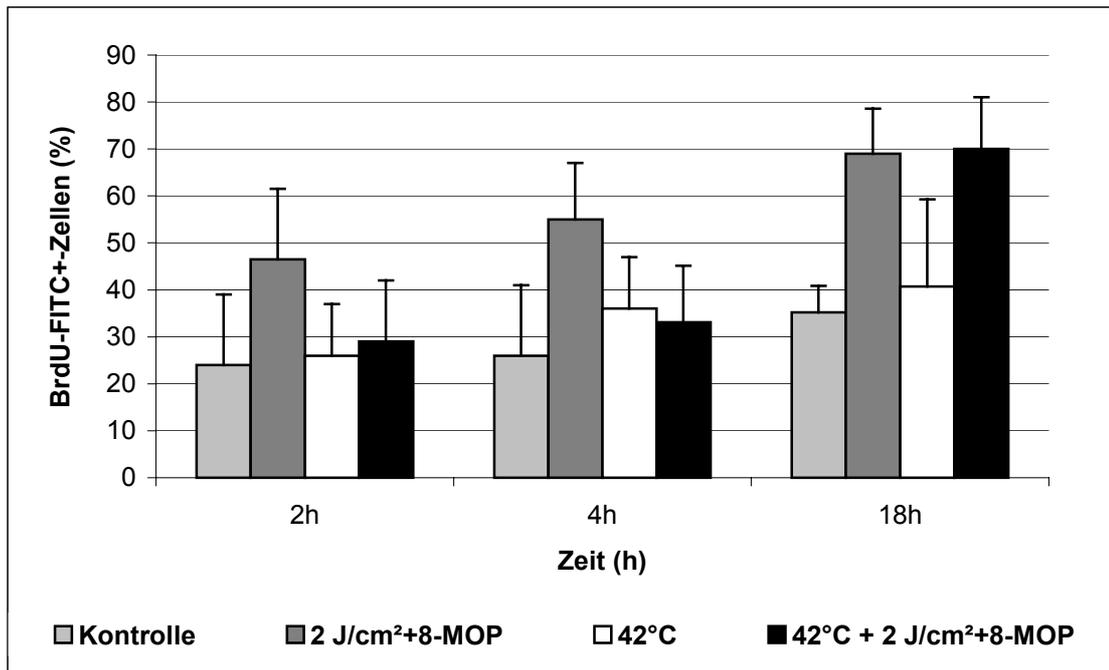
### **3.3 Messung apoptotischer Zellen über die Bestimmung der DNA-Strangbrüche**

Zur Bestimmung der Apoptose wurde ein weiteres Testverfahren angewandt. Während der Apoptose wird die zelluläre DNA in mehrere einzelne Fragmente gespalten. Die DNA-Fragmentenden der apoptotischen Zellen weisen 3'-Hydroxyl-Enden auf. Diese können mit Brom-dUTP markiert werden. Diese Markierung wird anschließend mit FITC-markierten Antikörpern sichtbar gemacht, die gegen Bromdesoxyuridin gerichtet sind. Die Menge der vorhandenen DNA-Strangbrüche nach Einwirkung von ultravioletter Strahlung mit einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> UVA, nach Hitzebelastung mit 42 °C über 30 min und der kombinierten Exposition ist in dem folgenden Abschnitt untersucht worden.



**Diagramm 13:** Darstellung der DNA-Fragmente nach Behandlung von isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes durch UVA-Exposition (2 J/cm<sup>2</sup>) und Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP, nach Wärmebelastung mit 42 °C über 30 min und der kombinierten Stresseinwirkung. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität der FITC-markierten Anti-Br-dUTP-AK im Durchflusszytometer. Ermittelt wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der DNA-Strangbrüche. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 6 Versuchen.

Die mittlere Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Anzahl der DNA-Strangbrüche pro Zelle. Zum Zeitpunkt 18 Stunden nach UVA und kombinierter Belastung wurde die stärkste mittlere Fluoreszenz gemessen. Die Werte steigen bei der alleinigen UVA-Bestrahlung von 252 nach 2 Stunden auf einen Wert von 926 nach 18 Stunden. Unter doppelter Belastung wurde ein Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität von 312 nach 2 Stunden auf 956 nach 18 Stunden festgestellt. Nach beiden Stresssituationen finden sich analog auch die meisten apoptotischen Zellen. Durch Hitzebelastung steigt der Anteil der DNA-Fragmente nur auf das 1,7-fache des Ausgangswertes von 295 nach 2 Stunden auf 497 nach 18 Stunden. Die Zahl der apoptotischen Zellen ist vergleichsweise auch geringer als unter Bestrahlung und kombinierter Belastung. Das folgende Diagramm zeigt dazu den Vergleich zum prozentualen Anteil der Zellen mit DNA-Strangbrüchen, also der apoptotischen Zellen.



**Diagramm 14: Induktion der Apoptose an isolierten mononukleären Zellen unter definierten Bedingungen: 1) 2 J/cm<sup>2</sup> UVA und 200 ng/ml 8-MOP, 2) Hitzebelastung 42 °C über 30 min und 3) kombinierte Exposition. Darstellung des prozentualen Anteils BrdU-FITC<sup>+</sup>-Zellen mit DNA-Strangbrüchen nach einem Zeitabstand von 2, 4 und 18 Stunden. Mittelwert und Standardabweichung von n=6.**

Das Diagramm 14 zeigt den Prozentsatz der vorhandenen apoptotischen Zellen in Abhängigkeit von den Stresssituationen Hitzeschock und UVA-Bestrahlung über den Zeitraum 2, 4 und 18 Stunden nach Belastung auf. Es zeigt sich ein treppenförmiger Anstieg der apoptotischen Zellen unter UVA-Bestrahlung von 46 % nach 2 Stunden über 55 % nach 4 auf 69 % nach 18 Stunden. Unter der kombinierten Belastung zeigt sich ein flacher Anstieg von 30 % auf 33 % im Zeitraum 2 bis 4 Stunden nach Behandlung. Anschließend steigt der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen sprunghaft auf 70 % an. Die mit Wärme behandelten Zellen gehen zu einem geringeren Prozentsatz in die Apoptose über. Nach 2 Stunden befinden sich 26 % der Zellen in der spätapoptotischen Phase und nach 18 Stunden nur 41 %. Mit der Methode der Messung der DNA-Strangbrüche als einem Merkmal der späten Apoptose konnte somit ein übereinstimmendes Ergebnis ermittelt werden im Vergleich zur Annexin-/Propidiumjodidfärbung (siehe Diagramm 9 und 10).

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass nach UVA-Bestrahlung im Vergleich zur Kombination die Menge der DNA-Fragmente am größten ist und somit mehr Zellen apoptotisch sind. Ein Hitzeschock allein hat kaum Einfluss auf die Apoptoseinduktion, da unter der alleinigen Hitzeeinwirkung im Vergleich zur Kontrolle nur eine geringfügige Zunahme der DNA-Fragmente und somit apoptotische Zellen gemessen wurden. Die alleinige Bestrahlung mit einer Dosis von  $2 \text{ J/cm}^2$  UVA führt zu einer deutlichen Apoptoseinduktion 18 Stunden nach Belastung. Eine vorherige Hitzebelastung der Zelle vor Bestrahlung zeigt nach 2 und 4 Stunden einen protektiven Effekt. Nach 18 Stunden ist die Apoptoserate der bestrahlten Zelle und der mit Hitzeschock und UVA-Strahlung behandelten Zelle gleich.

### **3.4 Quantifizierung der frühen und späten Apoptose in ECPI-behandelten Lymphozyten bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom**

Die extrakorporale Photopherese beruht auf der *ex vivo*-Einwirkung von 8-MOP und UVA-Licht auf die Leukozyten des peripheren Blutes. Es wird angenommen, dass die Induktion des programmierten Zelltods einen möglichen Wirkmechanismus der extrakorporalen Photoimmuntherapie darstellt. In dem optimierten *in vitro*-Testsystem konnten wir sowohl frühe als auch späte apoptotische Ereignisse an Leukozyten nach UVA-Bestrahlung in Anwesenheit von 8-MOP nachweisen. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob an Lymphozyten nach extrakorporaler Photopherese früh- und spätapoptotische Ereignisse nachweisbar sind. In der vorliegenden Studie wurden Lymphozyten von Patienten (n=9) mit einem kutanen T-Zell-Lymphom, die mit einer ECPI behandelt wurden, hinsichtlich früh- und spätapoptotischer Ereignisse untersucht. Die Kinetik der Apoptoseinduktion wurde durch die Doppelfärbung Annexin V und Propidiumjodid analysiert. Im Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtdiagramm wurden die morphologisch intakten Zellen eingegrenzt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität (FL-1: Annexin-FITC; FL-2: Propidiumjodid) dieser Zellen analysiert.

Nicht bestrahlte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Diese zeigten annähernd einen gleichmäßigen Anstieg an Annexin-positiven Zellen von 12 % auf 20 % apoptotischer Zellen in einem Zeitraum bis 20 Stunden nach Isolierung aus dem heparinisierten Blut.

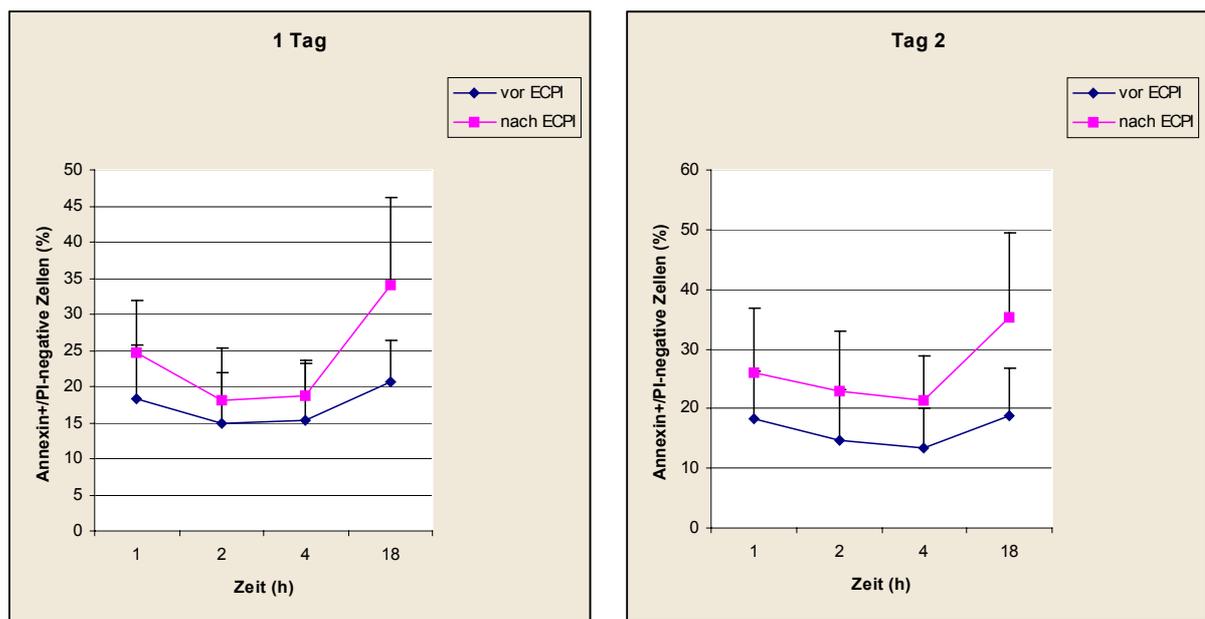
ECPI-behandelte Zellen zeigten eine Induktion der frühen Apoptose nach 1 Stunde im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. 20 Stunden nach ECPI-Behandlung wurde ein sehr deutlicher Anstieg ANN<sup>+</sup>/PI-negativer frühapoptotischer Zellen gemessen (20 % unbehandelte Zellen vs 34 % ECPI-behandelte Zellen, Diagramm 15).

Bei der Quantifizierung der spätapoptotischen Zellen durch ANN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-Doppelfärbung fand man keinen substantiellen Anstieg in dem Zeitraum 1 und 2 Stunden nach Behandlung. Der prozentuale Anteil spätapoptotischer Zellen lag 1 Stunde nach Behandlung bei 0,43 % und nach 2 Stunden bei 0,65 %. Nach 4 Stunden hingegen konnte eine Steigerung der apoptotischen Zellen auf 1,41 % nachgewiesen werden.

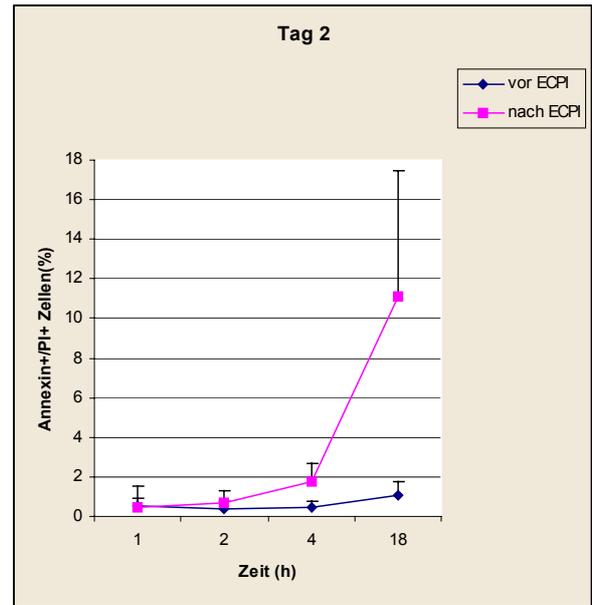
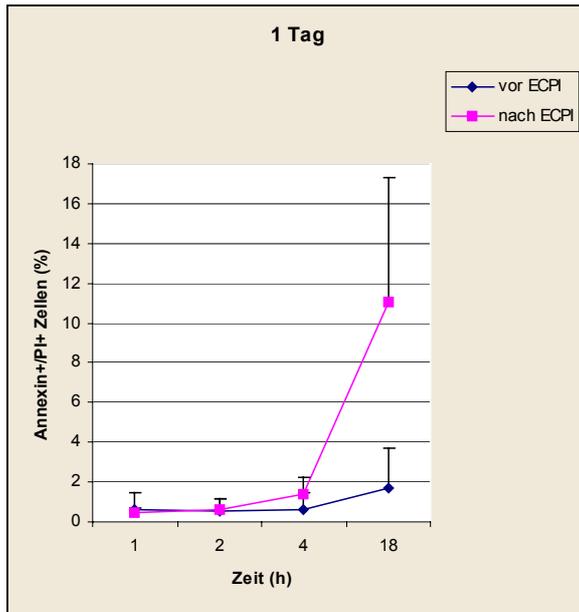
20 Stunden nach Beendigung der Behandlung zeigte der prozentuale Anteil der spätapoptotischen Zellen einen sprunghaften Anstieg (1 % bei den unbehandelten Zellen vs 12 % der ECPI-behandelten Zellen, Diagramm 16). Früh- und spätapoptotische Zellen setzen sich sowohl aus den nur Annexin-gefärbten Zellen als auch aus den mit Annexin/Propidiumjodid doppelt gefärbten Zellen zusammen. In der Summe sind das mehr als 40 % Annexin-positive Zellen.

Die Photopherese wird gewöhnlich an 2 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und entspricht dann einer ECPI-Behandlung. In den Untersuchungen konnten keine Unterschiede zwischen dem 1. und 2. Tag in den Annexin V bzw. Annexin V/Propidiumjodid doppelt gefärbten Zellen gefunden werden (Diagramm 15, 16).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in den *in vitro*-Testsystemen gleiche Effekte in der frühen und späten Apoptose an Lymphozyten wie in der *ex vivo*-Situation der ECPI messbar sind.



**Diagramm 15:** Darstellung des Prozentsatzes frühapoptotischer Lymphozyten von Patienten welche der ECPI an zwei aufeinanderfolgenden Tagen unterzogen wurden. Unbehandelte Zellen (die Kontrollgruppe) wurden aus heparinisiertem Blut vor der ECPI-Behandlung isoliert. Danach erfolgte die Bestrahlung der Restzellen mit einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> UVA. Zur Bestimmung der frühapoptotischen Zellen wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V versetzt und der durchflusszytometrischen Analyse unterzogen (AnnexinV-positiv/Propidiumjodid-negative Zellen, Ann<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>). Die Analyse erfolgte 1, 2, 4 und 18 Stunden nach der ECPI-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von einer Patientengruppe, n=9.



**Diagramm 16:** Darstellung des Prozentsatzes spätapoptotischer Lymphozyten von Patienten, welche der ECPI an zwei aufeinanderfolgenden Tagen unterzogen wurden. Die spätapoptotischen Zellen wurden mit FITC-markiertem Annexin V und Propidiumjodid in einer Doppelfärbung analysiert (Annexin V-positiv/Propidiumjodid-positive Zellen, Ann<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Die Analyse erfolgte 1, 2, 4 und 18 Stunden nach der ECPI-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von einer Patientengruppe, n=9.

## 4 Diskussion

### 4.1 Optimierung der Testparameter des *in vitro*-Systems zur Erfassung der Apoptoseinduktion

Die Apoptose ist eine aktive Form des Zelltodes, welche durch spezifische morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert wird. Sie wird von der Zellnekrose unterschieden. Die Apoptose spielt eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung, in der Entwicklung und Erhaltung des Immunsystems, in der T-Zell-vermittelten Immunreaktion und im normalen Wechsel der Zelldifferenzierung [70]. Optimierte und konkrete Testparameter zur Bestimmung der Apoptoserate sind notwendig, um *in vivo*-Prozesse mit einem *in vitro*-System vergleichen und Unterschiede oder Ähnlichkeiten feststellen zu können.

Zur Ermittlung optimaler Testparameter für ein *in vitro*-Testsystem wurden zunächst aus heparinisiertem Vollblut gesunder Probanden mononukleäre Zellen separiert und zur Ermittlung einer optimalen UVA-Dosis mit unterschiedlichen UVA-Dosen bestrahlt. Zum Vergleich lag eine Kontrollgruppe ohne Bestrahlung vor. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte im Zeitintervall von 1 bis 48 Stunden mittels durchflusszytometrischer Analyse. Die Durchflusszytometrie ist ein bedeutendes diagnostisches Werkzeug in der klinischen Immunologie und Hämatologie [86]. Durch ein elektronisches Gate wurden die morphologisch intakten Zellen eingegrenzt. In der Darstellung FL1 (Annexin V-FITC) gegen FL2 (Propidiumjodid) können früh- und spätapoptotische Zellen unterschieden werden. Spätapoptotische Zellen stellen diejenigen Zellen dar, die sowohl ANN<sup>+</sup>- und PI<sup>+</sup>-markiert sind und frühapoptotische Zellen, die nur Annexin V-FITC gebunden hatten. Es gibt viele verschiedene durchflusszytometrische Methoden zum Nachweis der Apoptose, z.B. Acridinorange-Färbung, Färbung mit Ethidiumbromid sowie die 7-AAD Fluoreszenzemission [96].

In dieser Arbeit wurden die Annexinbindung und die Propidiumjodidfärbung zum Nachweis der Apoptose genutzt, da diese etablierte Methode eine sehr schnelle und einfache Technik zur Apoptosebestimmung darstellt. Das Annexin V bindet sich an die Phosphatidylserine, welche an der Außenseite der Zellmembran exprimiert werden [22].

Das Annexin ist Mitglied einer großen Familie von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen und Phospholipid-bindenden Proteinen. Bei Vorhandensein einer physiologischen Kalziumionen-Konzentration besitzt das Annexin eine hohe Affinität zu den negativ geladenen Phospholipiden, z. B. den Phosphatidylserinen [87]. Das Propidiumjodid kann in der späten Phase in die Zelle eindringen und sich an die zelluläre DNA binden. Diese Methode zur Bestimmung der Apoptoserate in humanen Lymphozyten wird häufig angewandt, z.B. bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener Wirkstoffe wie Glucokortikoide [77], Cyclohexamid, Actinomycin D, Dexamethason, Etoposide [102] und Hydroxychloroquine [19]. Mit dieser Methode wurden bereits erfolgreich physikalische Einflüsse, wie der UV-Strahlung [17, 83] und der Temperatur [98], gemessen. Des Weiteren findet die Annexin V-Färbung Anwendung bei Untersuchung von glatten Muskelzellen der Gefäße hinsichtlich der Apoptoseinduktion und Thrombinbildung [101], bei der Bestimmung der Hitzeschock-induzierten Apoptose in Osteoblasten [98], bei der Bestimmung von Apoptosemarkern bei kardiovaskulären Erkrankungen [22] und beim Monitoring der Apoptoserate CD4+ T-Helferzellen bei HIV-Infizierten [26]. Am Model der Sepsis-induzierten Apoptose von T-Zellen bei Mäusen wurde die Methode der Annexin V-Bindung ebenfalls erfolgreich eingesetzt [25].

In unserem *in vitro*-Testsystem konnte 4 Stunden nach der UVA-Bestrahlung mit einer UVA-Dosis von  $2 \text{ J/cm}^2$  bei Analyse der frühapoptotischen Ereignisse ein sehr hoher Wert mit geringerer Schwankungsbreite gemessen werden. Der höchste prozentuale Anteil spätapoptotischer Ereignisse wurde ebenfalls bei einer UVA-Dosis von  $2 \text{ J/cm}^2$  gemessen. Danach war nur noch ein Plateau zu verzeichnen. T-Zell-Klone die krankheitsrelevant sind werden in die Apoptose getrieben und induzieren eine neue Immunantwort über antigenpräsentierende Zellen, so dass abregulierende Klone neu auftreten.

Yoo *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit die Apoptoseinduktion in mononukleären Zellen von Patienten mit Sezary-Syndrom und den Einfluss der extrakorporalen Photopherese im Vergleich zur *in vitro*-PUVA-Therapie (8-MOP-Konzentration:  $300 \text{ ng/ml}$ , UVA-Dosis  $2 \text{ J/cm}^2$ ). Sie stellten fest, dass das 8-MOP allein keine Wirkung, jedoch in Kombination mit der ultravioletten Strahlung einen apoptotischen Effekt besitzt.

Mehr als 60 % der Zellen zeigten 24 Stunden und 84 % der Zellen zeigten 48 Stunden nach der PUVA-Behandlung einen Abfall des Vorwärtstreulichtes (FSC) und einen Anstieg des Seitwärtstreulichtes (SSC), welche charakteristische Merkmale der Apoptose bei der durchflusszytometrischen Analyse darstellen. Unter *in vitro*-Testbedingungen wurden ähnliche Ergebnisse im Vergleich zwischen PUVA und ECPI ermittelt.

Yoo *et al.* vermuteten, dass TNF- $\alpha$  die Apoptose in verschiedenen Zell-Linien inklusive den Tumor-Zellen induziert. Sie stellten einen signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion bei den Monozyten nach der ECPI fest. TNF- $\alpha$  macht die Monozyten gegenüber der PUVA-Therapie resistenter. Man vermutet, dass der Tumornekrosefaktor die Apoptose induziert und somit die therapeutische Effizienz der ECPI beeinflusst [70]. Die ECPI induziert keine Zerstörung von Leukozyten in numerisch relevanter Zahl und ist unwirksam bei einem B-Zell-Lymphom.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde in der vorliegenden Arbeit die alleinige Wirkung des 8-Methyloxypsoralens untersucht. Das 8-MOP gilt als photosensibilisierende Substanz. 30 min vor der Analyse wurden die verschiedenen 8-MOP Konzentrationen (100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml) den einzelnen Proben zugegeben. Zum Vergleich diente eine Zellsuspension ohne 8-MOP. Die Wirkung des 8-MOP auf den Prozentsatz frühapoptotischer Zellen in den ersten 4 Stunden nach Belastung zeigt unter den einzelnen Konzentrationen keine wesentliche Veränderung. Bei der Analyse der spätapoptotischen Zellen fällt auf, dass im Zeitraum 4 bis 24 Stunden ein Anstieg des prozentualen Anteils spätapoptotischer Zellen zu verzeichnen ist. Dies kann möglicherweise auf den natürlichen Zelltod zurückzuführen sein, der trotz Zugabe eines serumhaltigen Mediums und einer Antibiose (Penicillin und Streptomycin) aufgrund mechanischer Zellschädigungen während der Zellseparation und Probenvorbereitung zur Analyse abgelaufen ist. Andererseits geht ein geringer Anteil nicht stimulierter Lymphozyten *in vitro* auch unter optimalen Kulturbedingungen spontan in Apoptose.

In der Studie von Vowels *et al.* wurden T-Lymphozyten und Monozyten mit unterschiedlichen UVA-Dosen bestrahlt. Sie fanden heraus, dass mit einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> UVA allein 24 Stunden nach Belastung DNA-Schäden hervorgerufen werden, jedoch die alleinige Gabe von 8-MOP keinen Effekt hat [82].

Urano *et al.* stellten fest, dass die einfache 8-MOP-Behandlung keinen Effekt auf die Oberflächenmoleküle der peripheren mononukleären Zellen des Blutes bewirkt, aber 8-MOP zusammen mit UVA einen Abfall der Expression des CD4-Moleküls hervorruft [83]. Das 8-MOP potenziert den UV-Effekt [78, 87, 92].

Die Wirkung verschiedener 8-MOP-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UVA-Dosis wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Die mononukleären Zellen wurden 30 min vor der UVA-Bestrahlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des 8-MOP versetzt. Gewählt wurden 8-MOP-Konzentrationen von 100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml. Danach erfolgte eine Bestrahlung mit 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> und 2 J/cm<sup>2</sup>. Verglichen wurde mit einer Kontrollgruppe ohne 8-MOP-Zusatz und ohne UVA-Bestrahlung. Die Analyse erfolgte ebenfalls mittels Annexin V-Bindung im Durchflusszytometer. Bei einer 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml und einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> wurden die meisten prozentualen frühapoptotischen Ereignisse gemessen. Bei der Analyse der spätapoptotischen Ereignisse wurden die höchsten Werte bei einer 8-MOP-Konzentration von 400 ng/ml und einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> erhalten. Der Wert des prozentualen Anteil spätapoptotischer Zellen lag mit 80 % bei 200 ng/ml und gleicher UVA-Dosis nur geringfügig unter dem Prozentsatz bei 400 ng/ml 8-MOP.

In einer Studie von Moor *et al.* wurden ebenfalls verschiedene 8-MOP-Konzentrationen und ihre Wirkung bei einer UVA-Dosis von 1 J/cm<sup>2</sup> verglichen. In ihrer Arbeit wurden Zellen von Mäusen mit T-Zell-Lymphom behandelt. In dieser Arbeit wurde, mittels der Analyse der 8-MOP-Photoaddukte und der MHC-Klasse I-Analyse (Immunopräzipitation) mit steigender 8-MOP-Konzentration eine Zunahme der apoptotischen Zellen gemessen. Bei einer 8-MOP-Konzentration von 50 ng/ml wurden 36 % apoptotische Zellen, bei 100 ng/ml 46 % apoptotische Zellen und bei 200 ng/ml und einer UVA Dosis von 1 J/cm<sup>2</sup> 56 % apoptotische Zellen gemessen [81]. Vowels *et al.* stellten in ihrer Arbeit fest, dass 24 Stunden nach Behandlung von T-Lymphozyten bzw. mononukleären Zellen mit einer Konzentration von 200 ng/ml 8-MOP und einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> ein sprunghafter Anstieg an apoptotischen Zellen zu verzeichnen war. Der ermittelte Wert lag bei ihren Untersuchungen bei 80 % apoptotische Zellen. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und durch Agarose-Gel-Elektrophorese nach DNA-Extraktion [82].

In den Photochemotherapien wurden in der Regel eine UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und eine 8-MOP-Konzentration zwischen 200 und 300 ng/ml eingesetzt [86], so z.B. auch in der Therapie des Sezary-Syndroms [82], des kutanen T-Zell-Lymphoms [81], der Mycosis fungoides [93] und der Psoriasis [66].

In einer vierten Versuchsreihe, in welcher die Zeitkinetik unter definierten Bedingungen (200 ng/ml und eine UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup>) untersucht wurde, konnten die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden. Im Vergleich mit der *ex vivo*-Patientenstudie kann festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil frühapoptotischer Zellen nach ECPI mit Werten zwischen 18 % und 35 % gegenüber der *in vitro*-Studie (23 %) höhere Werte aufwies. Dieser Unterschied kann möglicherweise auf eine erhöhte mechanische Belastung unter ECPI-Therapie oder auf pathologische Veränderungen der Zellen auf Grund der vorliegenden Grunderkrankung zurückzuführen sein.

Vowels *et al.* untersuchten in einer weiteren Arbeit Monozyten von Patienten mit CTCL und systemischer Sklerose. *Ex vivo*-Versuche verglichen die Monozyten von Patienten vor und nach ECPI. Die ECPI induzierte einen signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -Synthesesteigerung. Der Anstieg der TNF- $\alpha$ -Produktion kann als Folge der ECPI gewertet werden und ist bedeutend für die Behandlung des CTCL und der systemischen Sklerose. Beim CTCL kann es verschiedene Anti-Tumor-Effekte auslösen und bei der systemischen Sklerose kann TNF- $\alpha$  die Kollagensynthese unterdrücken und die Kollagenase-Produktion aktivieren [73].

Marks *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen ähnliche Ergebnisse. Bei einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Konzentration 300 ng/ml waren 48 Stunden nach Exposition über 61 % der Lymphozyten von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom apoptotisch. Die Zellen zeigen nach einer UVA-8-MOP-Behandlung rupturierte Zellmembranen, DNA-Schäden und eine Verminderung von NAD und ATP mit Anstieg der Poly-(ADP-Ribose)-Synthetase, stellen die makromolekulare Synthese ein und die Funktion der Zellmembran wird geschädigt [78]. Marks und Fox konnten weiterhin die charakteristischen morphologischen Veränderungen und die DNA-Fragmentation, durch Endonukleasen hervorgerufen, nachweisen. Des Weiteren findet eine Störung des Kalzium-Ionen-Transportes durch Zerstörung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Kanals statt. Die Kalziumtransport-ATPase kann das Kalzium nicht mehr aktiv aus der Zelle heraus befördern. Der Kalziuminflux vor dem Zellmembranfunktionsverlust kann einen Auslöser der Apoptose darstellen [92]. Der programmierte Zelltod wird ebenfalls durch die Zerstörung lebensnotwendiger Zellkomponenten, wie Bcl-2, der Kernmembran, des U1-RNP (U1-Ribonukleäres Protein, beeinflusst die RNA-Verkettung) oder der Protein-Phosphatase 2A induziert [66].

Breuckmann *et al.* untersuchten den Einfluss der UVA-1-Strahlung auf Lymphozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis. Sie konnten mittels Immunhistochemie in Hautbiopsaten zeigen, dass unter UV-Strahlung die Konzentration des Apoptoseinhibitors Bcl-2 abnahm und die des Tumorsuppressorgens p53 zunahm. Dies bewirkte einen Regredienz der Lymphozyteninfiltration in die Haut und ein Abnahme der Anzahl der T-Zellen (CD3+). Das p53 wirkt dem Bcl-2 entgegen und induziert die Apoptose durch einen Zellteilungsstopp am Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase. Kann der chromosomale Schaden nicht repariert werden, wird der programmierte Zelltod induziert. Die Balance zwischen der bcl-2 und p53-Genexpression spielt eine entscheidende Rolle in der Apoptoseinduktion, die zu einem signifikantem Abfall an korrespondierenden T-Zellen führt und zum Heilungsprozess der Hauterkrankung beiträgt [16].

Es ist bekannt, dass die UVA-Strahlung Einzelstrangbrüche der DNA humaner Zellen induziert. Vowels *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass bei einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> die größte Anzahl an DNA-Brüchen hervorgerufen wird. Wenn Zellen zusätzlich mit 300 ng/ml 8-MOP inkubiert wurden, erreichte Vowels das Maximum an Einzelstrangbrüchen bereits mit einer Dosis von 1,5 J/cm<sup>2</sup>. Vowels führt weiter aus, dass die Einzelstrangbrüche nicht mit der Apoptoserate korrelieren, da 50 % mehr Zellen apoptotisch unter der Kombinationsbehandlung von 8-MOP und UVA vs UVA allein gemessen wurden. Er vermutet, dass einige Zellen in der Lage sind, die DNA-Einzelstrangbrüche zu reparieren und somit nicht in die Apoptose übergehen. 8-MOP, ein DNA-Quervernetzer, welches Mono- und Biaddukte (Zwischenstrangverkreuzungen) bildet, bewirkt, dass eine effektive Reparatur der DNA nicht möglich ist und die Zellen in die Apoptose übergehen. Vowels fand eine Korrelation zwischen der 8-MOP-Konzentration, der UVA-Dosis und dem prozentualen Anteil apoptotischer Zellen gegenüber einem bestimmten Niveau an DNA-Schäden, wo die Apoptoseschwelle erreicht und der programmierte Zelltod getriggert wird. Die Kombination 2 J/cm<sup>2</sup> UVA und 200 ng/ml 8-MOP hat einen verzögerten Einfluss auf die Apoptoseinduktion, da die Zellpopulation nach 48 Stunden apoptotisch wird [82].

Die relevante UVA-Dosis in der ECPI liegt bei 2 J/cm<sup>2</sup>. Proteine binden an 8-MOP und werden durch verschiedene reaktive-Sauerstoffmetabolite geschädigt: direkte Oxidation der Aminosäureverbindungen und der Proteine. Reinheckel *et al.* testeten verschiedene 8-MOP Konzentrationen (0, 50, 200, 400 ng/ml) und UVA-Dosen (0, 0,5, 1, 2 J/cm<sup>2</sup>) in einem *in vitro*-Experiment. Sie bestimmten die totale antioxidative Kapazität. Diese war bei einer UVA-Dosis von 1 J/cm<sup>2</sup> und 2 J/cm<sup>2</sup> reduziert. Der antioxidative Status war ebenso unter Zugabe des 8-MOP reduziert.

Der größte Effekt war bei den Konzentrationen von 50 und 200 ng/ml 8-MOP, welche auch den therapeutischen Konzentrationen entsprechen, gemessen worden [95].

Johnson *et al.* untersuchten humane T-Lymphozyten und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden und Keratinozyten. Die Analyse der Apoptose erfolgte durch Bestimmung der DNA-Fragmente mit der TUNEL-Technik sowie der Veränderungen der Zellmorphologie mit der Durchflusszytometrie und durch Bestimmung des sub-G<sub>1</sub>-DNA-Peaks. Die PUVA-behandelten Lymphozyten zeigten einen verlangsamten Ablauf des Zellzyklus 24 Stunden nach Behandlung. Die S-Phase ist extrem verzögert, der S-Peak wird erst 14 und 24 Stunden nach der Behandlung erreicht. Der G<sub>2</sub>-Peak wird erst 4 Tage nach Behandlung gefunden vs 10 h G<sub>2</sub>- und S-Phase. In der Kontrollgruppe wird G<sub>2</sub> nach 14 Stunden und G<sub>1</sub> nach 24 Stunden erreicht. Dies würde bedeuten, dass durch die PUVA-Therapie der Zellzyklus blockiert wird und die Zellen in der späten S-Phase oder in der G<sub>2</sub>-Phase oder zu einem früheren Zeitpunkt in die Apoptose übergehen. Die T-Lymphozyten-Proliferation *in vitro* wird durch eine relevante PUVA-Dosis und 8-MOP-Konzentration (10 bis 500 ng/ml 8-MOP, 0,5 bis 2 J/cm<sup>2</sup> UVA) gehemmt. Im Vergleich dazu werden die Keratinozyten in ihrem Wachstum irreversibel gehemmt, sind aber voll lebensfähig. Über mehrere Tage waren die Zellen vergrößert und synthetisierten spezifische Proteine, wie Keratin 1 und Transglutaminase [94].

Nach der Photopherese werden die peripheren Blutlymphozyten wieder reinfundiert und wesentlich schneller durch das Makrophagensystem eliminiert und haben eine geringere Chance, mit anderen Immunmodulatoren zu reagieren. Wenn ein Teil dieser Zellen einige Tage überlebt, ist es denkbar, dass sie Signalproteine induzieren. Diese Vermutung stellt eine Hypothese dar, die in Zukunft getestet werden sollte. In der Arbeit von Enomoto wird festgestellt, dass die Lymphozyten Immunmodulatoren, z.B. Zytokine freisetzen und durch eine veränderte Expression der Membranrezeptoren die Immunreaktion modulieren. Er vermutet, dass die Lymphozyten nach der PUVA-Therapie verändert und geschädigt sind, so dass sie in ihrer Funktionskapazität und der Expression von Membranmolekülen eingeschränkt sind [80].

Vermes stellt fest, dass die Rate der *in vitro*-Apoptose und sekundären Nekrose von normalen B-Lymphozyten vermutlich höher ist als von normalen T-Zellen und B-CLL-Zellen im Kulturmedium. B-CLL-Lymphozyten sind durch die Überexpression von bcl-2-Gene gegenüber der Apoptose geschützt [77].

## 4.2 Einfluss des Hitzeschocks auf die Apoptoseinduktion von Lymphozyten

Hitzeschockproteine werden in jedem Organismus vom Bakterium bis zur menschlichen Zelle synthetisiert, als Antwort auf eine Vielzahl von Stresssituationen, wie der Hyperthermie, der Hypoxie, der Ischämie, während des oxidativen Stresses, durch die Wirkung freier Radikale oder durch Hemmung des Energiemetabolismus bei Entzündungsreaktionen. Hitzeschockproteine sind im endoplasmatischem Retikulum, in den Mitochondrien, im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Auf der Basis ihres Molekulargewichtes und ihrer Aminosäuresequenz werden sie in verschiedene Typen unterteilt [89, 90].

In dieser Arbeit haben wir den direkten Hitzeeinfluss sowie den Einfluss der UVA-Bestrahlung und die kombinierte Stresseinwirkung auf die Apoptoseinduktion analysiert und verglichen. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden aus dem Blut gesunder Probanden separiert und für die weiteren Abläufe vorbereitet. Die Lymphozyten wurden entweder mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einem Zusatz von 200 ng/ml 8-MOP belastet oder einer Hitzebelastung von 42 °C über einen Zeitraum von 30 min behandelt. Ein weiterer Versuchsansatz bestand aus der kombinierten Stresssituation, wobei die Zellen vor Bestrahlung mit der Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und der 8-MOP-Gabe über einen Zeitraum von 30 Minuten der Hitze von 42 °C ausgesetzt wurden. Die Analyse der früh- und spätapoptotischen Ereignisse erfolgte mit der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden vorher mit Annexin V-FITC markiert und mit Propidiumjodid gefärbt. Der prozentuale Anteil frühapoptotischer Zellen war bei der UVA-behandelten Zellpopulation gegenüber der Kombination, mit UVA und 8-MOP und Hitzeeinwirkung, sowie gegenüber der einfachen Hitzebelastung und der Kontrollgruppe am größten. Der Prozentsatz frühapoptotischer Ereignisse zeigte einen Abfall, beginnend von der kombinierten Behandlung, der alleinigen Hitzebelastung bis zur Kontrollgruppe.

Bei der Analyse der spätapoptotischen Ereignisse stellten wir einen ähnlichen, aber wesentlich deutlicheren Unterschied fest. Die UVA-behandelten Zellen zeigten den größten Prozentsatz spätapoptotischer Zellen. Unter dem Einfluss der kombinierten Stressbelastung wurde ein etwas geringerer Teil spätapoptotischer Zellen im Vergleich zur UVA-behandelten Zellgruppe gemessen.

Die alleinige Hitzebelastung bewirkte scheinbar im Verhältnis zu den Zellpopulationen, die mit ultravioletter Strahlung und mit UVA-Strahlung und Hitze behandelt wurden, einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Apoptoseinduktion. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen zeigte ein deutlich niedrigeres Niveau.

Es gibt viele Möglichkeiten, den Nachweis der Apoptose zu führen und den Prozentsatz apoptotischer Ereignisse zu bestimmen. Die durchflusszytometrische Analyse [17], der Nachweis morphologischer Veränderungen mit dem Licht- und Elektronenmikroskop [18, 22, 99], der DNA-Fragmentnachweis [55, 78, 87], Acridinorange-Färbung [45], Western-Blot-Analyse [55, 99] sowie die Bestimmung der Hitzeschockproteinexpression [58, 89].

In dieser Arbeit wurde parallel zur Apoptoseinduktion die Expression des Hitzeschockproteins Hsp27 untersucht. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob durch einen Hitzeschock die UVA-induzierte Apoptose in Lymphozyten moduliert werden kann. Das Hsp27, ein niedrigmolekulares Hitzeschockprotein, spielt eine wesentliche Rolle im Anstieg der Thermoresistenz [89]. Man stellte fest, dass unter der alleinigen Hitzebelastung der größte Prozentsatz (15,4 % nach 18 Stunden) intrazellulären Hsp27 synthetisiert wurde. Der Einfluss der kombinierten Stressfaktoren zeigt einen geringeren Anteil von 11,3 % intrazellulärem Hsp27 und die einfache UVA-Bestrahlung induziert einen noch geringeren Anstieg von Hsp27 auf 6,2 % nach 18 Stunden.

Die Hsp27-Expression an der Zelloberfläche zeigt ein reziprokes Ergebnis. Es wird ein geringer Prozentsatz von an der Zelloberfläche befindlichem Hsp27 unter Hitzebelastung im Vergleich zur doppelten Stresssituation und zur einfachen UVA-Bestrahlung ermittelt, wobei mehr oberflächliches Hsp27 durch die Kombination als durch die UVA-Strahlung exprimiert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die ermittelten Werte der früh- und spätapoptotischen Ereignisse, die durch den Einfluss der physikalischen Faktoren hervorgerufen wurden. Das lässt vermuten, dass die Anwesenheit des intrazellulären Hsp27 die Apoptoseinduktion durch die Hyperthermie hemmt. Die Menge des intrazellulären Hsp27 scheint jedoch nicht auszureichen zur Hemmung der Apoptoseinduktion, welche durch die doppelte Belastung (Hitze und UVA+8-MOP) oder durch die einfache UVA-Bestrahlung hervorgerufen wird. Die entstandenen Zellschäden sind scheinbar zu groß, als dass das Hitzeschockprotein einen hinreichenden zellprotektiven Einfluss ausüben kann. Das an die Zelloberfläche gelangte Hsp besitzt keine schützende Funktion mehr.

Die Hitzeschockproteinexpression in den Zellkulturen bewirkt vermutlich eine Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion, welche durch Hitze oder andere Umweltveränderungen hervorgerufen werden kann. Sie bewirken eine Induktion der verzögerten Stressantwort oder einen Abfall der Apoptoseinduktion.

Das Hsp27 bewirkt eine Hemmung der Apoptose, welche durch Etoposide, Actinomycin D und Camptothecin nach Hitzeeinfluss verstärkt wird [90]. Poccia stellt fest, dass die Hitzeschockproteine, ausgehend von zellulären Veränderungen, an zelluläre Antigene binden. Diese oberflächenexprimierten Hitzeschockproteine an apoptotischen Zellen können Einfluss auf den Prozess und die Präsentation von Zell-Abfall-Produkten nehmen. Hitzeschockproteine haben eine strenge Proteinbindungskapazität, einige Hitzeschockproteine werden zur Zelloberfläche transportiert, nachdem sie andere Proteine gebunden haben. Des Weiteren wird behauptet, dass das HSP die Antigenpräsentation von viralen und Tumor-Antigenen modulieren [54].

In einer Studie von Hashiguchi *et al.* wurden polymorphonukleare Leukozyten von Patienten hinsichtlich der Hitzeschockproteinexpression nach einem Trauma untersucht. Sie fanden heraus, dass in der akuten Phase die Hsp-Expression von Hsp27, Hsp70 und Hsp90 in der Patientengruppe signifikant höher war als in einer entsprechenden gesunden Kontrollgruppe. Sie machten das vermehrte Vorhandensein der Hsp für eine Regulation der Funktion der polymorphonuklearen Zellen verantwortlich [89].

Hsp27 kann die Apoptose durch die Aktivierung des p53 und den Abfall des Mitochondrienmembranpotentials nicht verhindern. Die Hsp27-Expression bewirkt einen Anstieg des Glutathions und schützt die Zellen dadurch vor oxidativem Stress oder vor der TNF- $\alpha$ -induzierten Zellnekrose [58, 90].

Boreham *et al.* untersuchten die durch Hitze und Strahlen induzierte Apoptose an menschlichen Lymphozyten *in vitro*. Sie stellten fest, dass eine Hitzeeinwirkung von 42 °C über eine Zeit von bis zu 90 min keine Apoptose induziert, jedoch Temperaturen von über 43 °C für 30 min und länger induzierten die Zellapoptose. Sie zeigten auch, dass eine radioaktive Strahlung von nicht mehr als 0,05 Gy schon die Apoptoseinduktion auslöst.

Des Weiteren fand Boreham heraus, dass der Hitzeschock von 42 °C über 30 min eine Thermotoleranz gegenüber Temperaturen größer 42 °C induziert und zunächst eine Empfindlichkeitssteigerung und anschließend einen zellprotektiven Effekt der Hitzeschockbehandlung gegenüber der durch radioaktive Strahlung hervorgerufenen Apoptose induziert.

In dieser Studie wurde nach 48 Stunden kein Anstieg der apoptotischen Zellen unter alleiniger Hitzebelastung von 42 °C über den Wert der Kontrolle erzielt. Dieses Ergebnis wurde auch in der vorliegenden Arbeit erzielt. Die Hyperthermie ist bekannt für die Apoptoseinduktion in verschiedenen Zellreihen. Boreham vermutet eine Schwelle bei der Hitzebelastung, ab der die Apoptose induziert wird. Nicht bei Temperaturen  $\leq 42$  °C, aber  $\geq 43$  °C. Radioaktive Strahlung induziert scheinbar immer eine Apoptose ohne erkennbare Induktionsschwelle. Die Autoren vermuten, dass Hitze Schäden an den Zellmembranen und radioaktive Strahlung Schäden an der DNA induziert. Die Ursache, dass die Hitze zunächst die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der radioaktiven Strahlung anhebt, liegt daran, dass sie zunächst als Sensibilisator agiert. Nach 24 Stunden sind die Zellen nicht mehr empfindlich und entwickelten eine Radio-Resistenz [97].

Samali *et al.* behaupten, dass Hitzeschock-behandelte Zellen oder thermotolerante Zellen eine größere Resistenz gegenüber Umweltveränderungen besitzen. Der Temperatureinfluss von 42 °C über eine Stunde induziert die Synthese von Hitzeschockproteinen, Hsp27, Hsp70, Hsp90. Die so behandelten Zellen waren resistenter gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen, wie Etoposide und Camptothecin (zwei Topoisomerasehemmer) oder Actinomycin D. Samali vermutet, dass der Einfluss der Tumorsuppressorgene von *abl*, *bcl-2*, *myc* oder *p53* ebenfalls eine Rolle spielt [55]. *Bcl-2* und *Hsp27* schützen Zellen vor der Apoptose und Nekrose. Der *Bcl-2*-Schutz wird nicht durch einen negativen Effekt der durch *p53* aktivierten Gene *bax* oder *waf1* vermittelt, sondern er wird durch einen Abfall des Mitochondrienmembranpotentials und durch morphologische Veränderungen verringert. *Hsp27* hemmt die Apoptose, welche durch Temperaturwechsel hervorgerufen wird. Eine Überexpression von *Hsp27* hat keinen Effekt auf die Apoptose. *Hsp 27* gehört zur Gruppe der niedrigmolekularen Proteine. Die *Hsp27*-Synthese wird durch Hitze induziert und stimuliert. Die Zellen, die dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ausgesetzt sind, zeigen eine Steigerung der intrazellulären Konzentration der reaktiven Sauerstoffmetabolite und induzieren Veränderungen der strukturellen Zellorganisation und die Phosphorylierung des *Hsp27*.

Der zellprotektive Effekt des Hsp27 gegenüber der TNF- $\alpha$ -Einwirkung, kann auf eine Steigerung der Glutathione zurück geführt werden. Bcl-2 schützt die Zellen vor der Apoptose auf einem anderen Weg. Es reguliert die Apoptose auf dem mitochondrialen Level durch einen antioxidativen Weg. Es minimiert die Bildung der reaktiven Sauerstoffmetabolite [58].

Mayetin *et al.* untersuchten den Hitzeeinfluss auf Keratinozyten unter UVB-Bestrahlung. 60 min vor der UVB-Bestrahlung erfolgte die Hitzeschockbelastung mit Temperaturen von 42 °C und 40 °C. Hitze allein, in Abwesenheit der UVB-Strahlung, hat keinen wesentlichen Effekt auf die Apoptose der Keratinozyten. Ähnliche Ergebnisse mit Lymphozyten wurden in dieser Arbeit mit der UVA-Strahlung ermittelt. Ein milder Hitzeschock kann die Keratinozyten vorübergehend vor der UVB-Strahlung schützen. Es wird vermutet, dass die induzierte Thermotoleranz temperaturabhängig ist und eine aktive mRNA- und Proteinsynthese erfordert [100].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen in der Literatur korrelieren. Die Hitzebelastung kann strahleninduzierte apoptotische Veränderungen in den verschiedenen Zelltypen beeinflussen.

### 4.3 DNA-Fragmente zur Messung apoptotischer Zellen

Die Veränderungen der Kern-DNA sind ein Schlüsselmerkmal der Apoptose. Während der Apoptose wird eine Endonuklease aktiviert, welche die DNA in multiple Fragmente von 180 bis 200 Basenpaaren schneidet. Diese DNA-Fragmente können durch die Agarose-Gel-Elektrophorese dargestellt werden. Die DNA-Fragmentenden weisen 3'-Hydroxyl-Enden auf. Diese können durch modifizierte Nukleotide, wie Biotin, Digoxigenin oder Fluoreszein-markiertes dUTP angefärbt werden. Diese Reaktion erfordert Enzyme wie die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) oder die DNA-Polymerase. Die ISEL-Technik (*in situ* nick end labelling) benötigt die DNA-Polymerase. Die TUNEL-Technik entspricht dem TdT-vermittelten X-dUTP nick end labelling [22]. Die TUNEL-Technik analysiert DNA-Fragmente durch Markierung und Fluoreszenz der Fragmente in intakten Kernen [103].

Die Messung apoptotischer Zellen erfolgte in dieser Arbeit durch die Markierung der 3'-Hydroxyl-Enden der DNA-Fragmente mit Brom-dUTP. Die mononukleären Zellen wurden aus dem peripheren Blut gesunder Probanden separiert und den gleichen physikalischen Stresssituationen unterzogen (2 J/cm<sup>2</sup> UVA und 200 ng/ml 8-MOP, 42 °C über 30 min, Kombination beider Faktoren) wie in den vorherigen Testreihen. Die Analyse der Fluoreszenzintensität der FITC-markierten Anti-Brom-dUTP-Antikörper erfolgte im Durchflusszytometer. Es konnte festgestellt werden, dass durch die doppelte Belastung der höchste Prozentsatz an BrdU-FITC-markierten Zellen gemessen wurde. Unter UVA-Bestrahlung wurden nur geringfügig weniger BrdU-FITC-markierte Zellen gemessen. Das gleiche Verhältnis wurde bei der Anzahl an DNA-Strangbrüchen festgestellt. Die alleinige Hitzebelastung zeigt einen geringeren Anteil an DNA-Strangbrüchen im Vergleich zu den Zellen, die mit UVA-Strahlung oder der Kombination der physikalischen Einflüsse behandelt wurden.

Man kann vermuten, dass unter der doppelten Stressbelastung ein größerer DNA-Schaden induziert wird als mit der einfachen UVA-Bestrahlung oder der Hitzebelastung. Das gleiche Verhältnis wird in der Analyse der früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Annexin V-Bindung nach dem Einfluss der Hitze und UVA-Belastung gefunden. Reziproke Werte lassen sich bei der Analyse der intrazellulären Hitzeschockproteinexpression und analoge Verhältnisse bei der Analyse der oberflächlichen Hitzeschockproteine finden.

Ein Ansteigen des p53 induziert einen Arrest des Zellzyklus und startet die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) oder die Apoptose. Li und Ho stellten fest, dass die Stressantwort der Zellen auf die UV-Strahlung von der UV-Dosis abhängt und eine DNA-Reparatur nach niedriger Bestrahlungsdosis stattfindet und nach höherer UV-Belastung die Apoptose induziert wird. Beide Mechanismen sind von der Funktion des Wild-Typ-p53 abhängig. UV-Strahlung bewirkt die Bildung von Cyclobutanpyrimidin-Dimeren und Photoprodukten, welche zu Mutationen und in Folge zu Karzinomen durch die DNA-Schädigung führen. Das p53 ist das Schlüsselement während der Stressantwort. Das p53 bewirkt sowohl eine Steigerung der NER als auch die Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von der UV-Dosis. Die induzierte DNA-Reparatur-Antwort ist p53-abhängig. Des Weiteren beobachteten sie, dass der p53-Wild-Typ für die Hitzeschock- und UV-Strahlung-induzierte DNA-Schädigung erforderlich ist [48].

Marks *et al.* stellten fest, dass das UVA-Licht selbst zytotoxische Eigenschaften besitzt und durch das 8-Methoxypsoralen dieser Effekt potenziert wird. In ihren Untersuchungen analysierten sie die Lebensfähigkeit von Lymphozyten unter dem Einfluss von UVA-Dosen zwischen 0,1 bis 10 J/cm<sup>2</sup> und 8-MOP-Konzentrationen zwischen 10 und 300 ng/ml. Sie untersuchten die peripheren Blutlymphozyten 2 Stunden nach UVA-Bestrahlung und 8-MOP-Belastung. Die Belastung mit einer UVA-Dosis von 3 J/cm<sup>2</sup> wies nur einen minimalen Anstieg des zytotoxischen Effektes gegenüber einer UVA-Dosis von 1 oder 2 J/cm<sup>2</sup> auf. Des Weiteren stellten sie fest, dass eine Erhöhung der 8-MOP-Konzentrationen auf 50 ng/ml ebenfalls keinen weiteren wesentlichen Anstieg der Zytotoxizität bewirkten. Dabei fanden sie heraus, dass ein Maximum des prozentualen Anteils an DNA-Einzelstrangbrüchen mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Konzentration von 300 ng/ml erreicht (70 % vs 60 % ohne 8-MOP vs 70 % nach 5 J/cm<sup>2</sup>) wurde. Weitere Steigerungen der UVA-Dosis bewirkten keinen weiteren wesentlichen Anstieg, ein Plateau wurde erreicht. Die Analyse der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels einer fluorimetrischen Methode. Dabei stellten sie einen Anstieg der Poly-(ADP-Ribose)-Synthetaseaktivität von peripheren Blutlymphozyten fest. Zusammen mit diesem Anstieg, den DNA-Schäden und der Adenin-Nukleotid-, NAD- und ATP-Erschöpfung wird ein lymphozytotoxischer Effekt durch die extrakorporale Photochemotherapie erreicht. Diese Effekte stimulieren möglicherweise immunologische Mechanismen [78].

Abschließend kann festgestellt werden, dass eine Korrelation zwischen vorhandenem DNA-Schaden und prozentualem Anteil spätapoptotischer Zellen besteht. Mit Zunahme der DNA-Fragmente steigt der Anteil apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der physikalischen Einflussgrößen (Temperatur, UVA-Strahlung und kombinierte Belastung mit beiden Größen). In der Zusammenschau mit den zuvor durchgeführten Methoden zum Nachweis des Einflusses physikalischer Größen auf die Zellen, stellt der DNA-Fragmentnachweis eine geeignete Methode zur Beurteilung der strahleninduzierten apoptotischen Veränderungen dar. Bei gleichen *in vitro*-Testbedingungen werden mit einer anderen Methode die zuvor erzielten Ergebnisse bestätigt.

#### **4.4 Messung der apoptotischen Ereignisse bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom nach ECPI**

In der Phototherapie werden zwei Methoden am häufigsten angewandt: 1) die Phototherapie mit der Kombination UVB und sichtbares Licht (verschiedene Wellenlängen). Sie wird ohne weiteren Zusatz zur Behandlung der Psoriasis bevorzugt benutzt, 2) die Photochemotherapie mit der Kombinierung UVA-Strahlung und Psoralen als Photosensibilisator [71]. Das systemisch disseminierte kutane T-Zell-Lymphom ist gegenüber der Chemotherapie und der Strahlentherapie resistent [72]. Die extrakorporale Phototherapie ist eine effektive, gut tolerierte und etablierte Methode in der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms [73]. Sie findet ebenfalls Anwendung in der Therapie der systemischen Sklerose [73, 74], der Psoriasis, der Vitiligo und anderer Dermatosen [71] sowie der Graft-versus-Host-Reaktion [75].

Zur Beurteilung der *in vitro*-Testergebnisse in Bezug auf die Wirkung von 8-MOP und der UVA-Bestrahlung auf die früh- und spätapoptotischen Ereignisse wurde ein Vergleich mit einem *ex vivo*-Testsystem herangezogen. In dieser Arbeit wurde eine Patientengruppe gewählt, welche an einem T-Zell-Lymphom erkrankt ist. Sie profitieren von einer PUVA/ECPI-Therapie. Als ein Wirkmechanismus der extrakorporalen Photochemotherapie wird die Apoptoseinduktion in Lymphozyten diskutiert. In unserer Untersuchung wurden deshalb Lymphozyten vor und nach extrakorporaler Photopherese hinsichtlich einer Apoptoseinduktion untersucht.

Die Annexin V-Bindung und die Propidiumjodidfärbung wurden zur Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Ereignisse simultan herangezogen. Zuvor wurden morphologisch intakte Lymphozyten elektronisch eingegrenzt. In diesem Teil der Untersuchung werden die frühapoptotischen Lymphozyten unmittelbar nach der ECPI-Behandlung bestimmt. Die Bestimmung des Anstieges frühapoptotischer Annexin V-positiver Lymphozyten unmittelbar eine Stunde nach ECPI kann auf den direkten Effekt der ECPI-Behandlung zurückgeführt werden. Marks *et al.* haben Patienten mit CTCL untersucht, welche mit UVA und 8-MOP an zwei aufeinanderfolgenden Tagen alle 4 Wochen über 6 Monate behandelt wurden. Marks stellte fest, dass mit einer Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> UVA und einem Zusatz von 8-MOP der DNA-Schaden nach 2 Stunden kleiner ist als 24 Stunden nach Therapie.

Dies könnte bedeuten, dass die frühe DNA-Schädigung auf eine Vielzahl biochemischer Ergebnisse zurückzuführen ist, die einen irreversiblen Zellschaden hervorrufen und die DNA-Reparatur ohne Effekt bleibt [78].

Bladon und Tayler untersuchten T-Lymphozyten von 11 Patienten, wobei 6 an einem T-Zell-Lymphom, 4 an der Graft-versus-Host-Reaktion und einer an der Sklerodermie erkrankt waren, während drei verschiedener Phasen der ECPI-Behandlung: unmittelbar vor der ECPI-Therapie, nach UVA-Bestrahlung und vor Reinfusion ohne *in vitro*-Kultivierung. Sie demonstrierten einen signifikanten Anstieg der frühapoptotischen Marker: Dazu wurden Annexin V, das die Phosphatidylserine auf der Außenseite der Membran bindet, Apoptest™, eine zellgängige Probe, welche Veränderungen der Chromatintextur feststellt und Carboxy-SNARF-1-AM, welches den intrazellulären pH-Wert bestimmt, verwendet [74].

Eine *in vitro*-Studie von Godar *et al.* untersuchte transformierte T- und B-Lymphozyten (von Patienten mit T-Zell-Leukämie, T- oder B-Zell-Lymphom). Dabei konnte gezeigt werden, dass UVA1 auf 2 verschiedenen Wegen Apoptose induziert: die verzögerte und die sofortige Apoptoseinduktion [18]. 20 Stunden nach ECPI wurde ein deutlicherer Anstieg apoptotischer Ereignisse in der Annexin V-/Propidiumjodid-Doppelfärbung, als Marker der späten Apoptose/Nekrose, als zum Zeitpunkt der frühen Apoptose festgestellt. Diese Messungen lassen vermuten, dass der Anstieg apoptotischer Ereignisse 20 Stunden nach ECPI nicht nur als direkter Effekt der UVA-Bestrahlung und 8-MOP-Behandlung zu werten ist. Diese Beobachtung der verzögerten Apoptose in Lymphozyten nach ECPI stimmt mit anderen Untersuchungen überein. Yoo *et al.* untersuchten mononukleäre Zellen von Patienten mit Sezary Syndrom. In der durchflusszytometrischen Analyse der ECPI- und PUVA-behandelten peripheren Blutlymphozyten stellten sie einen signifikanten Anstieg apoptotischer Lymphozyten 24 Stunden nach den Behandlungen fest. Diese Zellpopulation zeigte typische apoptotische morphologische Veränderungen, welche unter anderem mittels der Durchflusszytometrie (Zellschrumpfung), der Agarose-Gel-Elektrophorese (DNA-Fragmentation), der Elektronenmikroskopie (Kernkondensation und Blasenbildung im Zytoplasma) untersucht wurden [70, 80].

Die Kaskade von voraus gehenden präapoptotischen Ereignissen, welche zum irreversiblen programmierten Zelltod führen, ist nicht bekannt. Eine mögliche Hypothese des klinischen Effektes der ECPI ist, dass die initiale Photomodifikation der Proteine, Lipide und der DNA zu einer zellulären Stressantwort und zu Reparaturmechanismen führt.

Godar *et al.* beschreibt in einer Arbeit verschiedene kinetische Mechanismen der Apoptoseinduktion. Die unmittelbar ca. eine halbe Stunde nach der photodynamischen oder UVA 1-Therapie induzierte Apoptose wird durch einfach geladenen Sauerstoff hervorgerufen, der die mitochondrialen Megaporen öffnet und ist ein präprogrammierter Zelltod. Die mittelbare Apoptoseinduktion erfolgt zwischen 30 min und 4 Stunden nach Applikation einer hohen Dosis UVB und UVC und wird durch eine Rezeptorkreuzvernetzung an der Plasmamembran hervorgerufen. Sie ist ebenfalls ein präprogrammierter Zelltod. Die verzögerte Apoptose wird durch eine zusätzliche DNA-Schädigung bedingt und durch Röntgenstrahlung, PUVA, UVC, UVB und UVA induziert [66]. Ist der Reparaturprozess nicht erfolgreich, geht ein nicht geringer Prozentsatz der Zellen in die Apoptose unmittelbar nach der ECPI über. Diese apoptotischen Zellen werden durch die an die Außenseite der Zellmembran gelangten Phosphatidylserine erkannt und von Phagozyten entfernt [76, 79].

Durch ultraviolette Strahlung veränderte Proteine sind Voraussetzung für die Bildung neuer Antigene. Frühapoptotische Zellen kommen bald nach ECPI vor und könnten eine Rolle bei der Induktion einer spezifischen Immunantwort spielen. Die Aktivierung von Monozyten nach ECPI wird durch die Aufregulation der MHC-Klasse-I-Expression und durch einen Anstieg der Zytokinproduktion angezeigt [80, 81]. In der Effektor-Phase der spezifischen Immunantwort findet eine Apoptose von fast allen Lymphozyten 24 bis 48 Stunden nach ECPI statt. Es gibt einige Arbeiten über die Induktion der frühen Apoptose bei ECPI-behandelten Lymphozyten. Die Ergebnisse der frühen und späten Apoptose lassen sich direkt nicht vergleichen, da Apoptosebeginn und Verlauf in den Zellen nicht synchronisiert ablaufen.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse stimmen mit anderen Berichten über Patienten, welche sich einer ECPI-Therapie unterzogen, überein. Die früh- und spätapoptotische Phase zusammengefasst ergab in unseren Untersuchungen mehr als 40 % Annexin V-positive Zellen. In den Studien von Schindl *et al.* und Yoo *et al.* wird berichtet, dass 50 % ECPI-behandelte Zellen charakteristische Streulichteigenschaften von apoptotischen Zellen zeigten [17, 70]. Der unterschiedliche Prozentsatz von apoptotischen Zellen in diesen Studien kann seine Ursache in den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden haben. Die Messung mit Annexin V wurde zur Bestimmung frühapoptotischer Ereignisse und das elektronische „Gaten“ zum Einschließen morphologisch intakter Zellen herangezogen.

Verschiedene Methoden der Apoptosemessung wie Annexin V-Bindung, Markierung der DNA-Strangbrüche und die Lichtstreuung können direkt nicht verglichen werden, da sie unterschiedliche apoptotische Merkmale untersuchen (Membranveränderungen, DNA und morphologische Veränderungen) und verschiedene Methoden (unfixierte und fixierte Zellen) zur Grundlage haben. Das Grundniveau der Annexin V-Bindung in unbehandelten Lymphozyten liegt zwischen 12 und 20 % [88]. In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird die Annexin V-Bindung an Phosphatidylserinen an reifen vitalen B-Zellen demonstriert. Diese Phosphatidylserine, exponiert an der Mehrzahl von nichtapoptotischen Zellen *in vivo*, spielen eine Rolle in der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung [91].

Die meisten Studien, welche über die Apoptoseinduktion nach ECPI berichten, basieren auf einer Gesamtlmphozytenpopulation. Es wird berichtet, dass kultivierte, reife periphere Blut-T- und B-Zellen unterschiedliche Reaktionen in der *in vitro*-Apoptose und sekundären Nekrose zeigen. Normale B-Zellen zeigen eine höhere Zell-Todes-Rate als normale T-Lymphozyten. Dies wird durch eine Annexin V-Bindung und Propidiumjodid-Färbung gezeigt [77].

In unserer Arbeit lag das Ergebnis bei über 40 % an Annexin V gebundenen Lymphozyten nach ECPI-Behandlung. Frühapoptotische T- und B-Zellen wurden dabei zusammengefasst. T-Zell-Subpopulationen wurden in unserer Arbeit nicht erfasst. Andere Autoren fanden keine Unterschiede zwischen verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (CD4+ und CD8+) nach ECPI. Im Vergleich sind Monozyten resistenter gegenüber der Apoptoseinduktion durch ECPI [70, 73].

Hinsichtlich der Frage, ob die Apoptose ein Wirkmechanismus der ECPI ist, haben Vowels *et al.* [82] eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Prozentsatz apoptotischer Zellen und der UVA-Dosis und der 8-MOP-Konzentration *in vitro* beschrieben. Eine Studie von A. Schindl stellte ebenfalls eine Korrelation zwischen steigender UVA-Dosis (zwischen 1 J/cm<sup>2</sup> und 16 J/cm<sup>2</sup>) bei konstanter 8-MOP-Konzentration (100 ng/ml) und Zunahme des prozentualen Anteils apoptotischer Annexin V-positiver und Propidiumjodid-positiver Zellen fest. Es wurden Zelllinien (A 431) von Patienten mit humanem Squamosa Zell-Karzinom untersucht [17].

Die analysierten Daten zeigen, dass die ECPI-behandelten Zellen charakteristische DNA-Defekte und morphologische Veränderungen aufweisen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Induktion der frühen Apoptose in Lymphozyten eine Stunde nach ECPI als direkter Effekt der UVA- und 8-MOP-Behandlung gewertet werden kann. Ein signifikanter Anstieg der Annexin V-Bindung und Annexin V/Propidiumjodid-Doppelfärbung wurde 20 Stunden nach der extrakorporalen Photochemotherapie als verzögerte Apoptose beobachtet. Zukünftige Untersuchungen sollten den Ablauf der frühen Apoptoseinduktion nach ECPI, besonders der T-Zellen untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Die extrakorporale Photoimmuntherapie (ECPI) ist eine etablierte Behandlungsmethode bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom. Die molekularen und zellulären Mechanismen der Wirkung des Photosensibilisators 8-Methoxypsoralen in Kombination mit ultravioletter Strahlung (UVA) auf die peripheren Blutleukozyten sind teilweise noch unverstanden. Ein wichtiger Effekt der Therapie scheint die veränderte Antigenität und Immunogenität der behandelten Zellen zu sein. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die extrakorporale Photoimmuntherapie einen verzögerten programmierten Zelltod humaner Zellen induziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand einerseits darin, in Lymphozyten von Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom die Induktion frühapoptotischer Ereignisse 2 bis 4 Stunden nach ECPI zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur Untersuchung der Zeitkinetik sowie der Dosis- und Konzentrationsabhängigkeit der frühen apoptotischen Ereignisse. Mit Hilfe dieses optimierten Testsystems sollte die Frage beantwortet werden, ob unter *in vitro*-Bedingungen die apoptotischen Ereignisse durch eine Induktion zellprotektiver Hitzeschockproteine moduliert werden können.

Zur Ermittlung der früh- und spätapoptotischen Ereignisse benutzten wir die durchflusszytometrische Analyse. Annexin V-FITC/Propidiumjodid-Färbung ermöglicht die Abgrenzung frühapoptotischer Zellen (nur Annexin-Färbung) von spätapoptotischen Zellen (Annexin V/Propidiumjodid-Doppelfärbung). Der prozentuale Anteil von Zellen mit DNA-Strangbrüchen als Merkmal der späten Apoptose wurde mittels des Bromdesoxyuridin-Einbaus bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die optimalen Testbedingungen für das *in vitro*-Testsystem ermittelt. Bei einer 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml und einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> wurden 23,3 % frühapoptotische und 80 % spätapoptotische Zellen gemessen. Bei der doppelten 8-MOP-Konzentration 400 ng/ml und gleicher UVA-Dosis wurden in der frühen Apoptose geringere und in der späten Phase höhere Effekte gemessen. Auf Grund der therapeutischen Relevanz erfolgten die weiteren Untersuchungen mit einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und einer 8-MOP-Konzentration von 200 ng/ml.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Studie unter definierten Bedingungen (2 J/cm<sup>2</sup> und 200 ng/ml 8-MOP) korrelierten mit den Ergebnissen bei der Analyse der früh- und spätapoptotischen Ereignisse bei Patienten nach extrakorporaler Photopherese. Man fand ebenso bei einer UVA-Dosis von 2 J/cm<sup>2</sup> und 200 ng/ml 8-MOP als auch unter der extrakorporalen Therapie ein ähnliches Ergebnis (frühe Apoptose (4 h): 35% vs späte Apoptose (18 h): 11%). Zwischen dem 1. und 2. Tag der Untersuchung wurden keine Unterschiede in der Annexin V- bzw. Annexin V/Propidiumjodid-Doppelfärbung gefunden. Des Weiteren wurde versucht, die früh- und spätapoptotischen Ereignisse durch einen vorangegangenen Hitzeschock (30 min, 42 °C) zu modulieren. Dabei wurde die stärkste Apoptoseinduktion bei der alleinigen UVA-Bestrahlung mit 19 % frühapoptotischer vs 47 % spätapoptotischer Ereignisse gemessen. Nach der kombinierten Belastung, UVA und Hitze, fand man einen prozentualen Anteil frühapoptotischer Zellen von 18 % vs 46 % spätapoptotischer Zellen. Der Hitzeschock allein bewirkte einen deutlich geringeren Effekt (ANN<sup>+</sup>-Zellen: 13,6 % vs ANN<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>-Zellen: 3,2 %). Die Hitzebelastung führte im verwendeten Testsystem nicht zu einer Verminderung der UVA-induzierten Apoptose. Parallel dazu wurde die Expression des Hitzeschockproteins Hsp27 untersucht. Die Hitzebehandlung resultierte in einer verstärkten intrazellulären Hsp-Expression. Die Expression von Oberflächen-Hsp trat demgegenüber vermehrt nach UVA-Bestrahlung auf und korrelierte folglich mit der Apoptoseinduktion.

Die dargestellten Ergebnisse stellen einen weiteren Schritt zur Aufklärung des Wirkmechanismus der extrakorporalen Photopherese dar. Wir konnten zeigen, dass nicht nur verzögert (24 Stunden), sondern auch frühzeitig (nach 1 bis 4 Stunden) der programmierte Zelltod induziert wird. Das etablierte *in vitro*-Testsystem mit den therapeutisch relevanten Versuchsbedingungen ist gut geeignet zur Untersuchung von potentiell photoprotektiven Effekten, wie Hitzeschock oder antioxidativen Substanzen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Beijersbergen van Henegouwen, G.M.J.: Medicinal photochemistry. Phototoxic and phototherapeutic aspects of drugs. *Advances in drug research*, 29. 81-163 (1997)
- [2] Gasparro, F.P.: Psoralen photochemistry. In: Gasparro, F.P.: *Extracorporeal photochemotherapy: Clinical aspects and the molecular basis for efficacy*. pp. 13-36. CRC Press. Boca Raton 1994
- [3] Gorman, A., J. McCarthy, D. Finucane, W. Reville, T.G. Cotter: Morphological assessments of apoptosis. In: Fesus, L., Z. Nemes, L. Piredda, A. Madi, M. diRao, M. Piacentini: *Measurements of the induction activity and products of tissue. Transglutaminase in cells undergoing apoptosis*. Vol.3. pp 3-19. Portland Press Ltd London 1996
- [4] Wolfe J.T., J.H. Pringle and G.M. Cohen: Assays for the measurement of DNA fragmentation during apoptosis. In: Fesus, L., Z. Nemes, L. Piredda, A. Madi, M. diRao, M. Piacentini: *Measurements of the induction activity and products of tissue. Transglutaminase in cells undergoing apoptosis*. Vol.3. pp 53-69. Portland Press Ltd London 1996
- [5] Darzynkiewicz Z., X. Li: Measurements of cell death by flow cytometer. In: Fesus, L., Z. Nemes, L. Piredda, A. Madi, M. diRao, M. Piacentini: *Measurements of the induction activity and products of tissue. Transglutaminase in cells undergoing apoptosis*. Vol.3. pp 71-105. Portland Press Ltd London 1996
- [6] Seamus J.M., Ch.P.M. Reutelingsperger, D.R. Green: Annexin V: A specific probe for apoptotic cells. In: Fesus, L., Z. Nemes, L. Piredda, A. Madi, M. diRao, M. Piacentini: *Measurements of the induction activity and products of tissue. Transglutaminase in cells undergoing apoptosis*. Vol.3. pp 107-119. Portland Press Ltd London 1996

- [7] Griffiths H.R., P. Mistry, K.E. Herbert, J. Lunec: Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 35(3). 189-237(1998)
- [8] Haanen C, I. Vermes: Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *E J Gynecol Obstet Biol Reprod*: 64. 129-133 (1996)
- [9] Cohen J.J., R.C. Duke: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann Rev Immunol Today*, 10. 267-293 (1992)
- [10] Savill J, V. Fadok, P. Henson, C. Haslett: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14. 131-136 (1993)
- [11] Los M., M. Van de Grean, L.C. Penning, H. Schenk, M. Westendorp, P.A. Baeuerle, W Droge, PH Krammer, W Fiers, K Schulze-Osthoff: Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature*: 375. 81-83 (1995)
- [12] Aastado J.P.: Apoptosis: function and regulation. *Rev Immunol*: 147. 443-456 (1996)
- [13] McConkey, D.J.: Calcium flux measurement in cell death. In: Fesus, L., Z. Nemes, L. Piredda, A. Madi, M. diRao, M. Piacentini: Measurements of the induction activity and products of tissue. Transglutaminase in cells undergoing apoptosis. Vol.3. pp132-145. Portland Press Ltd London 1998
- [14] Kleinig, H., U. Maier: Zellbiologie. pp. 117-119. pp. 228-234. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Jena. Lübeck. Ulm 1999
- [15] Tada-Oikawa S., S. Oikawa, S. Kawanishi: Role of Ultraviolet A-Induced Oxidative DNA damage in apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential and Caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 247. 693-696 (1998)
- [16] Breuckmann, F., C. Pieck, A. Kreuter, M. Bacharach-Buhles, H.G. Mannherz, P. Altmeyer, G. von Kobyletzki. Opposing effects of UVA1 phototherapy on the expression of bcl-2 and p53 in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 293. 178-183 (2001)

- [17] Schindl A., G. Klosner, H. Hönigsmann, G. Jori, P.C. Calzavara-Pinton, F. Trautinger: Flow cytometric quantification of UV-induced cell death in a human squamous cell carcinoma-derivate cell line: dose and kinetic studies. *J Photochem Photobiol B.* 44. 97-106 (1998)
- [18] Godar D.E.: UVA1 Radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol.* 112. 3-12 (1999)
- [19] Meng X.W., J.M. Feller, J. Ziegler, S.M. Pittmann, Ch. Ireland: Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment *in vitro* with hydroxychloroquine. *Arthritis Rheum.* 40. 927-935 (1997)
- [20] Li, X., Z. Darzynkiewicz: Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif.* 28. 571-579 (1995).
- [21] Li, X., F. Traganos, M.R. Melamed, Z. Darzynkiewicz: Single step procedure for labelling DNA strand breaks with fluorescein- or BODIPY-conjugated deoxynucleotides. Detection of apoptosis and bromdesoxyuridine incorporation. *Cytometry* 20. 172-180 (1995).
- [22] van Heerde, W.L., S. Robert-Offermann: Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res.* 45. 549-559 (2000)
- [23] Horton, J., A. Milner, T. Horton, P. Ritchie, D. Gascoyne, T. Hewson, E. Hammond, Ch. Gregory, R. Grand: Apoptosis-specific protein (ASP) identified in apoptotic *Xenopus thymus* tumor cells. *Dev Immunol.* 5. 333-348 (1998)
- [24] Oliver, A.E., G.A. Baker: Effects of temperature on calcium-sensitive fluorescent probes. *Biophys J.* 78. 2116-2126 (2000)
- [25] Tinsley, K.W., S. Cheng, T. Buchmann, K. Chang, J. Hui, P. Swanson, I. Karl, R. Hotchkiss: Caspase-2, -3, -6 and -9, but not Caspase-1, are activated in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *Shock.* 13. 1-7 (2000)

- [26] Wasmuth, J-Ch., K.H. Klein, F. Hackbarth, J.K. Rockstroh, T. Sazerbach, U. Spengler: Prediction of imminent complications in HIV-1-infected patients by markers of lymphocyte apoptosis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23. 44-51 (2000)
- [27] Gasparro, F.P., B. Liao, P.J. Foley, X.M. Wang, J.M. McNiff: Psoralen photochemotherapy, clinical efficacy and photomutagenicity: The role of molecular epidemiology in minimizing risks. *Environ Mol Mutagen*. 31. 105-112 (1998)
- [28] Lowe N.J., V. Chizhevsky, H. Gabriel: Photo(chemo)Therapy: general principles. *Clin Dermatol*. 15. 745-752 (1997)
- [29] McClelland P.B., P. Morgan, E.E. Leach, J. Shelk: Psoralen Photochemotherapy. *Dermatol Nurs*. 9/6. (1997)
- [30] Berger, C.L., D. Hanlon, D. Kanada, M. Girardi, R.L. Edelson: Transimmunization, a novel approach for tumour immunotherapy. *Transfus Apheresis Sci*. 26(3). 205-216 (2002)
- [31] Bethea D., B. Fullmer, S. Syed, G. Seltzer, J. Tiano, C. Rischko, L. Gillepsie, D. Brown, F. Gasparro: Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Sci*. 19. 78-88 (1999)
- [32] Roelandts R.: The history of photochemotherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 8. 184-9 (1991)
- [33] Gupta A.K., T.F. Anderson: Psoralen photochemotherapy. *J Am Acad Dermatol*. 17. 703-34 (1987)
- [34] Beakha, G.J., G. Lefkovits: Psoralen phototherapy and phototoxicity. *Ann Plastic Surg* 14. 458-61 (1985)
- [35] Abdullah, A.N., K. Keczkcs: Cutaneous and ocular side effects of PUVA photochemotherapy-a 10-year follow-up Study. *Clin Exp Dermatol*. 14. 421-4 (1989)

- [36] Edelson, R.L.: Photopheresis: a clinically relevant immunobiologic response modifier. *Ann N Y Acad Sci* 30. 154-64 (1991)
- [37] McNeely, W., K.L. Goa: 5-Methoxypsoralen. A review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Drugs*. 56. 667-90 (1998)
- [38] Kanekura, T., S. Fukumaru, S. Matsushita, K. Terasaki, S. Mizoguchi, T. Kanzaki: Successful treatment of scleroderma with PUVA therapy. *J Dermatol* . 23(7). 455-9 (1996)
- [39] Rook, A.H., B. Freundlich, G.T. Nahass, R. Washko, B. Macelis, M. Skolnicki, P. Bromley, W.K. Witmer, B.V. Jegasothy: Treatment of autoimmune disease with extracorporeal photochemotherapy: progressive systemic sclerosis. *Yale J Biol Med*. 62(6). 639-45 (1989)
- [40] Owsianowski, M., H. Gollnick, W. Siegert, R. Schwerdtfeger, C.E. Orfanos: Successful treatment of chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photopheresis. *Bone Marrow Transplant* 14(5). 845-8 (1994)
- [41] Rook, A.H., P.W. Heald, G.T. Nahass, W. Macey, W.K. Witmer, G.S. Lazarus, B. V. Jegasothy: Treatment of autoimmune disease with extracorporeal photochemotherapy: pemphigus vulgaris - preliminary report. *Yale J Biol Med*. 62(6). 647-52 (1989)
- [42] Malawista, S.E., D. Trock, R. L. Edelson: Photopheresis for rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 30. 217-26 (1991)
- [43] Schoppelrey H.P., R. Breit: UV-therapy in HIV-infected patients. *Hautarzt* 50(9). 643-8 (1999)
- [44] Oesterwitz H., D. Schoz, J. Kaden, G. May, M. Mebel, R. Schirro, W. Blank: Photochemical donor pretreatment in clinical kidney transplantation - preliminary report. *Urol Res*. 15. 211-3 (1987)

- [45] Coven T.R., I.B. Walters, I. Cardinale, J.G. Krueger: PUVA-induced lymphocyte apoptosis: Mechanism of action in psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 15. 22-27 (1999)
- [46] Hirsch-Kaufmann, M., M. Schweiger: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. pp. 98-103. pp. 118-132. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York 1992
- [47] Wang, Y., B. Rosenstein, S. Goldwyn, X. Zhang, M. Lebwohl, H. Wie: Differential regulation of p53 and Bcl-2 expression by ultraviolet A and B. *J Invest Dermatol.* 111. 1998
- [48] Li, G., V.C. Ho.: p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol.* 139. 3-10 (1998)
- [49] Dibbert, B. und H.-U. Simon: Die molekularen Mechanismen der Apoptose, Bericht von der vierten Europakonferenz über Apoptose. *Dtsch. med. Wschr.* 122. 523-526 (1997)
- [50] Nylandsted J., M. Rohde, K. Brand, L. Bastholm, F. Elling, M. Jaattela: Selective depletion of Heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumour-specific death program that is independent of caspase and bypass Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci.* 97(14). 7871-7876 (2000)
- [51] Dall'Aqua, F., G. Rodighiro: Biological and medicinal aspects of Furocoumarins (psoralens and angelicins). In: Bensassons, R.V., G. Jori, E.J. Land, T.G. Truscott: *Primary photo-processes in biology and medicine*. pp 277-295. Plenum Press, New York 1985
- [52] Basu A., S. Haldar: The relationship between Bcl-2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod.* 4 (12). 1099-1109 (1998)
- [53] Chiarugi V., M. Ruggiero: Role of three cancer „master genes“, p53, bcl-2 and c-myc on the apoptotic process. *Tumouri* 82 (3). 205-209 (1996)

- [54] Poccia, F., P. Piselli, S. Vendetti, S. Bach, A. Amendola, R. Placido, V. Colizzi: Heat-shock protein expression on the membrane of T-cells undergoing apoptosis: Immunology. 88. 6-12 (1996)
- [55] Afshin Samali, Th.G. Cotter: Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. Exp Cell Res. 223. 163-170 (1996)
- [56] Fracella F. und L. Rensing: Stressproteine in Biologie und Medizin. Aktuelle Ergebnisse und Entwicklungen von der Cold Spring Harbor Tagung 1994. Biomol im Dialog Nr.7/8 (1994)
- [57] Gordon S.A., R.A. Hoffman, R.L. Simmons, H.R. Ford: Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis. Arch Surg 132. 1277-82 (1997)
- [58] Guenal I., C. Sidoti-de Fraise, S. Gaumer, B. Mignotte: Bcl-2 and Hsp 27 act at different levels to suppress programmed cell death. Oncogene 15. 347-60 (1997)
- [59] McGregor, W.G.: DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis. J Investig Dermatol Symp Proc. 4. 1-5 (1999)
- [60] Medina, R., L. Cantley, K. Spokes and F.H. Epstein: Effect of water diuresis and water restriction on expression of HSP-27, -60, and -70 in rat kidney. Kidney Int. 50. 1191-1194. (1996)
- [61] Dahm-Daphi, J., E. Dikomey, I. Brammer: DNA-repair, cell-killing and normal tissue damage. Strahlentherapie und Onkologie. 174. 8-11 (1998)
- [62] Cohen-Jonathan, E., E.J. Bernhard, W.G. McKenna: How does radiation kill cells? Cur Opin Chem Biol. 3. 77-83 (1999)
- [63] Barre, F.X., U. Asseline, A. Harel-Bellan: Asymmetric recognition of psoralen interstrand cross-links by the nucleotide excision repair and the error-prone repair pathway. J Mol Biol. 286. 1379-87 (1999)

- [64] Averbeck, D., M. Dardalhorn, N. Magana-Schwencke, L. Borges, M., V. Meniel: New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesion in DNA. *J Photochem Biol B.* 14. 47-63 (1992)
- [65] Morison, W.L.: Phototherapy and Photochemotherapy: an update. *Seminars in Cutan Med Surg.* 18. 297-306 (1999)
- [66] Godar, D.E.: Light and death: photons and apoptosis. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 4. 17-23 (1999)
- [67] Yasui, A., S.J. McCready: Alternative repair pathways for UV-induced DNA damage. *BioEssays* 20. 291-297 (1998)
- [68] Nover, L.: 125 years of experimental heat shock research; historical roots of a discipline. *Genetics of stress response. Genome.* 31. 668-670 (1989)
- [69] Distel, L.V.R., H. Schüßler: Molekulare und zelluläre Grundlagen stochastischer Strahlenwirkungen. *Röntgenpraxis.* 53. 110-119 (2000)
- [70] Yoo, E. K., A. Rook, R. Elenitsas, F. Gasparro, B. Vowels: Apoptosis induction by ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol.* 107. 235-242 (1996)
- [71] Hönigsmann, H.: Phototherapy and Photochemotherapy. *Sem Dermatol.* 9. 84-90 (1990)
- [72] Edelson, R., C. Berger, F. Gasparro, B. Jegasothy, P. Heald, B. Wintroub, E. Vonderheid, R. Knobler, K. Wolff, G. Plewig, G. McKiernan, I. Christiansen, *et al.*: Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N Eng J Med.* 316. 297-303 (1987)
- [73] Vowels, B.R., M. Cassin, M. H. Boufal, L.J. Walsh, A.H. Rook: Extracorporeal photochemotherapy induces the production of Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  by monocytes: Implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 98. 686-692 (1992)

- [74] Bladon, J., P. C. Taylor: Extracorporeal photopheresis induces apoptosis in the lymphocytes of cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease patients. *Br J Haematol.* 107. 707-711 (1999)
- [75] Gerber, M., B. Gmeinhardt, B. Volc-Platzer, H. Greinix, R. Knobler: Complete remission of lichen-planus-likier graft-versus-host disease (GVHD) with extracorporeal photochemotherapy (ECP). *Bone Marrow Transplant.* 19. 517-519 (1997)
- [76] Savill, J., V. Fadok, P. Henson, Ch. Haslett: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today.* 14. 131-136 (1993)
- [77] Vermes, I., C. Haanen, D.J. Richel, M.R. Schaafsma, E. Kalsbeek-Batenburg, C.P.M. Reutlingsperger: Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Hematol.* 98. 8-13 (1997)
- [78] D. Marks, St.P. Rockmann, M.A. Ozimski, R.M. Fox: Mechanisms of lymphocytotoxicity induced by extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Investig.* 86. 2080-2085 (1990)
- [79] Fadock, V.A., J. Savill, Ch. Haslett, D. Bratton, D. Douerty, P. Cambell, P. Henson. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* 149. 4029-4035 (1992)
- [80] Enomoto, D.N.H. *et al.*: Extracorporeal photochemotherapy (photopheresis) induces apoptosis in lymphocytes: a possible mechanism of action of PUVA therapy: *Photochem Photobiol.* 65. 177-179 (1997)
- [81] Moor, A.C.E., I.M. Schmitt, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, S. Chimenti, R.L. Edelson, F.P. Gasparro: Treatment with 8-MOP and UVA enhances MHC class I synthesis in RMA cells: preliminary results. *J Photochem Photobiol B.* 29. 193-198 (1995)

- [82] Vowels, B.R., E.K. Yoo, F.P. Gasparro: Kinetic analysis of apoptosis induction in human cell lines by UVA and 8-MOP. *Photochem Photobiol.* 63. 572-576 (1996)
- [83] Urano K., T. Matsuyama, R. Urano, I. Matsuo, S. Habu: PUVA suppress the expression of cell adhesion molecules of lymphocytes. *Exp. Dermatol.* 4. 36-41 (1995)
- [84] Dall'Aqua, F., S. Caffirie, G. Rodighiero: Photoreactions of furocoumarins (psoralens and angelicans). In: Bensasson, R.V., G. Jori, Land, E.J., Truscott, T.G.: *Primary photo-processes in biology and medicine*. pp. 259-272. Plenum Press, New York 1985
- [85] De Mol, N.J. G.M.J. Beiersbergen van Henegouwen, B. Weeda, C.N. Knox, G.Truscott: Photobinding of psoralens to bacterial macromolecules *in situ* and induction of genetic effect in a bacterial test system. Effect of singled oxygen diagnostic aids D<sub>2</sub>O and DABCO. *Photochem Photobiol*, 44. 747-755 (1986)
- [86] Sailer, B.L., J.A. Steinkamp, H.A. Crissmann: Flow cytometric fluorescence lifetime analysis of DNA-binding probes. *Eur J Histochem.* 42. 19-27 (1998)
- [87] Tokura, Y., R.L. Edelson, F.P. Gasparro: Formation and removal of 8-MOP-DNA photoadducts in keratinocytes: Effects of calcium concentration and retinoids. *J Invest Dermatol.* 96. 942-949 (1991)
- [88] Koester, St. K., P. Roth, W. Mikulka, S.F. Schlossmann, Ch. Zhang, W. Bolton: Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry.* 29. 306-312 (1997)
- [89] Hashiguchi, N., H. Ogura, H. Tanaka, T. Koh, M. Aoki, T. Shiozaki, T. Matsuoka, T. Shimazu, H. Sugimoto: Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients. *J Trauma.* 50. 102-107 (2001)

- [90] Punitzki, M., L. Fesüs: Heat Shock and Apoptosis. The two defence systems of the organism may have overlapping molecular elements. *Ann N Y Acad Sci.* 851. 67-74 (1998)
- [91] Dillon, S.R., M. Mancini, A. Rosen, M.S. Schissel: Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B Cell receptor activation: *J Immunol.* 164. 1322-1332 (2000)
- [92] Marks, D. and R. Fox: Mechanisms of photochemotherapy-induced apoptotic cell death in lymphoid cells. *Biochem Cell Biol.* 69. 754-760 (1991)
- [93] Miracco, C., P. Rubegni, G. de Aloe, G. Dásenzo, C. Mazzatenta, M.M. de Santi, M. Fimiani: Extracorporeal photochemotherapy induces apoptosis of infiltrating lymphoid cells in patients with mycosis fungoides in early stages. A quantitative histological study. *Br J Dermatol.* 137. 549-557 (1997)
- [94] Johnson, R., L. Staiano-Coico, L. Austin, I. Cardinale, R. Nabeya-Tsukifuji, J.G. Krueger: PUVA treatment selectively induces a cell cycle block and subsequent apoptosis in human T-Lymphocytes. *Photochem Photobiol.* 63. 566-571 (1996)
- [95] Reinheckel, Th., M. Bohne, W. Halangk, W. Augustin, H. Gollnick: Evaluation of UVA-mediated oxidative damage to proteins and lipids in extracorporeal photoimmunotherapy. *Photochem Photobiol.* 69. 566-570 (1999)
- [96] Schmid, I., Ch.H. Uittenbogaart, B. Keld, J.V. Giorgi: A rapid method for measuring apoptosis and dual-colour immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods.* 170. 145-157 (1994)
- [97] Boreham, D.R., J.-A. Dolling, S.R. Maves, S Miller, D.P. Morrison, R.E.J. Mitchel: Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes. *Biochem Cell Biol.* 75. 393-397 (1997)
- [98] Li, S., S. Chien, P-I. Brånemark: Heat shock induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res.* 17. 891-899 (1999)

- [99] Aragane, Y., D. Kulms, D. Metze, G. Wilkes, B. Pöppelmann, Th.A. Luger, Th. Schwarz: Ultraviolet light induces apoptotic via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol.* 140. 172-182 (1998)
- [100] Maytin, E.V., J.M. Wimberly, K.S. Kane: Heat shock modulates UVB-induced cell death in human epidermal keratinocytes: Evidence for a hyperthermia-inducible protective response. *J Invest Dermatol.* 103. 547-553 (1994)
- [101] Flynn, P.D., Ch. Byrene, T.P. Baglin, P.L. Weissberg, M.R. Bennett: Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood.* 89. 4378-4384 (1997)
- [102] Martin, S.J., Ch.P.M. Reutlingsberger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C.A.A. van Schie, D. LaFace, D.R. Green: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl: *J. Exp. Med.* 182. 1545-1556 (1995)
- [103] Garland, J.M., A. Halestrap: Energy metabolism during apoptosis. *J Biol Chem.* 272. 4680-4688 (1997)
- [104] Bladen, J., P.C. Tayler: Extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell-lymphoma and graft-versus-host disease induces both immediate and progressive apoptotic processes. *Br J Dermatol.* 146(1). 59-68 (2002)
- [105] Kwok, Y.K., A.V. Anstey, J.L. Hawk: Psoralen photochemotherapy (PUVA) is only moderately effective in widespread vitiligo: a 10-year retrospective study. *Clinic Exp Dermatol.* 27(2). 104-110 (2002)
- [106] Furlong, T.W. Leisenring, R. Storb, C. Anasetti, F.R. Appelbaum, P.A. Carpenter, H.J. Deeg, K. Doney, H.P. Kiem, R.A. Nash, J.E. Sanders, R. Witherspoon, D. Thompson, P.J. Martin: Psoralen and ultraviolet A irradiation (PUVA) as therapy for steroid-resistant cutaneous acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 8(49). 206-212 (2002)

- [107] Housman, T.S., J.M. Rohrback, A.B. Fleischer, S.R. Feldmann: Phototherapy utilization for psoriasis declining in the United States. *JAAD*. 42(4). 557-559 (2002)
- [108] Malina, L.: Effect of ultraviolet radiation on the immune system and the effect of exogenous photochemoprotective agents on the ultraviolet radiation induced immunosuppression. *Cas Lek Cesk*. 141(11). 338-342 (2002)
- [109] Canton, M., S. Caffieri, F. Dall'Acqua, F. Di Lisa: PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore. *FEBS Lett*. 522(1-3). 168-172 (2002)
- [110] Santamaria, A.B., D.W. Davis, D.X. Nghiem, D.J. McConkey, S.E. Ullrich, M. Kapoor, G. Lozano: p53 and Fas ligand are required for psoralen and UVA-induced apoptosis in mouse epidermal cells. *Cell Death Differ*. 9(5). 549-560 (2002)
- [111] Girardi, M., J. Schecher, E. Glusac, C. Berger, R. Edelson: Transimmunization and the evolution of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus Apheresis Sci*. 26(3). 181-190 (2002)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Ehemann für die geduldige und tatkräftige Hilfe von Beginn bis zur Fertigstellung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. rer. nat. Struy, Institut für Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und Prof. Dr. med. Gollnick, Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und für die Förderung der Arbeit.

Mein Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Gerber für die hilfreiche Betreuung, zeitliche und organisatorische Unterstützung und die vielen wissenschaftlichen Hinweise.

Ebenfalls danke ich den MitarbeiterInnen des Labors Immunphysiologie vom Institut der Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Nachweis früh- und spätapoptotischer Ereignisse in Lymphozyten unter Einfluss physikalischer (UVA-Bestrahlung, Hitzeschock) und physikochemischer (UVA und 8-Methoxypsoralen) Ereignisse. Etablierung eines *in vitro*-Testsystems und Anwendung bei Patienten nach extrakorporaler Photopherese

in dem Institut für Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Struy,  
Herrn Prof. Dr. med. Gollnick,  
Frau Dr. rer. nat. A. Gerber

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt wurden.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Schaffhausen, den 07.12.2003

## Lebenslauf

Janet Michel, geborene Rasch, geboren am 01.02.1974 in Halberstadt als Tochter von Johann Rasch und Heidemarie Rasch, geborene Wilkerling.

1980 - 1990	Polytechnische Oberschule Blankenburg
1990 - 1992	Erweiterte Oberschule „Am Thie“, Blankenburg
1992 - 1999	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät,
17.08.1994	Physikum an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät
29.08.1995	1. Staatsexamen an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät
08.09.1997	2. Staatsexamen an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät
13.05.1999	Erteilung der vorläufigen Approbation nach § 10 Absatz 4 Bundesärzteordnung
01.10.1999 - 30.09.2000	Ärztin im Praktikum im Akademischen Lehrkrankenhaus der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Klinikum „Dorothea Erxleben“ Quedlinburg gGmbH/Unfallchirurgie
01.10.2000 - 30.03.2001	Ärztin im Praktikum im Akademischen Lehrkrankenhaus der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Klinikum „Dorothea Erxleben“ Quedlinburg gGmbH/Radiologische Praxis Dr. med. Hintner
01.04.2001	Approbation als Ärztin

01.04.2001 - 10.05.2002 Assistenzärztin im Akademischen Lehrkrankenhaus der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, St. Salvator-Krankenhaus Halberstadt/Radiologische Fachabteilung

seit 15.05.2002 Assistenzärztin im Kantonsspital Schaffhausen, Schweiz/  
Radiologische Fachabteilung