



Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Induktion der Cyclooxygenase-2-Expression durch UVB-Strahlung in HaCaT-Keratinocyten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Niklas Stephan Fernau

aus Düsseldorf

Düsseldorf

Dezember 2008

Aus dem Institut für umweltmedizinischen Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Das Sonnenlichtspektrum	1
1.2 Wechselwirkung von UV-Strahlung mit biologischen Systemen	2
1.2.1 UV-Strahlung und Haut	2
1.2.2 Photooxidativer Stress	6
1.2.3 Modulation zellulärer Signaltransduktion durch UVA- und UVB-Strahlung	9
1.3 Die Cyclooxygenase-2	10
1.3.1 Generelle Charakteristika	10
1.3.2 Entzündung und Krebs	12
1.3.3 Wege zur Induktion der COX-2-Expression	13
1.4 Mechanismen UV-induzierter Signaltransduktion	16
1.4.1 Photoprodukte	16
1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies	17
1.4.3 Durch oxidativen Stress induzierte Modulation von mRNA-Stabilität und Translationsrate	23
1.5 Fragestellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Zellkultur	27
2.1.1 Anzucht von Zellen	27
2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.1.3 UVB-Bestrahlung von Zellen	29
2.1.4 MTT-Test	30
2.1.5 UVA-Bestrahlung von HeLa-Zellen	31
2.1.6 Bengalrosa/Weißlicht-Behandlung	31
2.1.7 Stimulation mit EGF oder Liganden des Ah-Rezeptors	32

2.1.8	Verwendung von Inhibitoren	32
2.1.9	Proteindepletion mittels siRNA	32
2.1.10	Transfektion mit Luciferase-Reporter-Gen-Plasmiden	34
2.2	Proteinanalytik	35
2.2.1	Protein-Quantifizierung	35
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.3	Western-Blot	37
2.2.4	Immunodetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	38
2.2.5	„Strippen“ von PVDF-Membranen	40
2.2.6	Subzelluläre Proteom-Extraktion	41
2.2.7	Immunpräzipitation (IP) auf EGFR	41
2.2.8	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	42
2.2.9	Immunfluoreszenzmikroskopie	43
2.3	RNA-Analytik	44
2.3.1	RNA-Isolation	44
2.3.2	Quantifizierung von RNA	45
2.3.3	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	45
2.3.4	Agarosegelelektrophorese	47
2.4	Densitometrische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Wirkung von UVB auf HaCaT-Zellen: Toxizität und Induktion der COX-2-Expression	49
3.1.1	Toxizität von UVB-Strahlung für HaCaT-Zellen	49
3.1.2	Charakterisierung der COX-2-Induktion durch UVB in HaCaT-Zellen	50
3.1.3	Vergleich der COX-2-Induktion durch UVB in HFFF2- und HaCaT-Zellen	53
3.2	Die MAP-Kinase p38 und das mRNA-Bindeprotein HuR bei der UVB-induzierten COX-2-Expression	55

3.2.1	p38 ^{MAPK} und UVB-induzierte COX-2-Expression	55
3.2.2	HuR und UVB-induzierte COX-2-Expression	59
3.2.3	UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma	64
3.3	EGF- und Ah-Rezeptor in der Induktion der COX-2-Expression durch UVB	70
3.3.1	Die Rolle des EGF-Rezeptors bei der COX-2-Induktion nach UVB	70
3.3.2	Die Rolle des Ah-Rezeptors bei der COX-2-Induktion nach UVB	81
3.4	Stimulation des EGF-Rezeptors durch UVA	83
4	Diskussion	88
4.1	Die Frage nach dem Zusammenhang von p38 ^{MAPK} und HuR	88
4.2	Substrate von p38 ^{MAPK} und UVB-induzierte COX-2-Expression	90
4.3	Potentielle Ziele posttranskriptioneller Modulation durch HuR nach UVB-Exposition	93
4.4	Zur Rolle der PKC bei der COX-2-Induktion durch UVB	95
4.5	Initiation von Signaltransduktionsprozessen nach UVB-Bestrahlung	96
4.5.1	Zur Rolle des EGF-Rezeptors bei der COX-2-Induktion durch UVB	97
4.5.2	Zur Rolle des Ah-Rezeptors bei der COX-2-Induktion durch UVB	100
4.5.3	DNA-Beschädigung oder Urokaninsäure-Isomerisierung?	101
4.6	Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse zur COX-2-Induktion durch UVB-Strahlung in HaCaT	102
4.7	Zum Zusammenhang von Seneszenz, HuR und COX-2-Induktion	103
4.8	p38 ^{MAPK} , HuR und EGF-Rezeptor als Ansatzpunkte der Präventivmedizin	105
5	Zusammenfassung	108
	Summary	109
6	Literatur	110

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)hydrochlorid
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
AngII	Angiotensin II
AP-1	Aktivatorprotein 1
ARE	AU-reiches Element
ASK1	Apoptosesignal regulierende Kinase 1
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i> -Protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATP γ S	Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i> -Protein
AUF-1/2	AU-bindender Faktor 1/2
bidest.	bidestilliert
BIM I	Bisindolylmaleimid I
BR	Bengalrosa
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cAMP	zyklisches AMP
Cdk1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i> (zyklinabhängige Kinase 1)
CDS	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
Chk 1/2	Checkpoint-Kinase 1/2
COX	Cyclooxygenase
CR1	<i>conserved region 1</i>
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CRM1	<i>chromosomal region maintenance protein 1</i>
CYP1A1	Zytochrom P450 1A1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
γ -GCSH	<i>γ-glutamylcysteine synthetase heavy subunit</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
HDF	humane dermale Fibroblasten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNP A0	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A0
HuR	Hu-Antigen R
IC ₅₀	Konzentration der Substanz, die zu einer 50 %-igen Hemmung des jeweiligen Effektes führt
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
Ktrl.	Kontrolle

Lck	leukozytenspezifische Protein-Tyrosinkinase
LMB	Leptomycin B
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
3-MC	3-Methylcholanthren
MEK 1/2	MAPK/ERK-Kinase 1/2
MK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MKK	MAPK-Kinasen
MKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase <i>oder</i> Magermilchpulver
n. Bestr.	nach Bestrahlung
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
p.a.	pro analysi
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂ /H ₂	Prostaglandin E ₂ /H ₂
PI3K	Phosphoinositid-3'-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i> -Protein
Ras	<i>rat sarcoma</i> -Protein
RBP	RNA-bindendes Protein
rel.	relativ
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)

rpm	Rotationen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SA- β -Gal	seneszenzassoziierte β -Galaktosidase-Aktivität
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS + Tween-20
TIA-1	<i>T cell-restricted intracellular antigen 1</i>
TIAR	<i>TIA-related protein</i>
7TM	Sieben-Transmembrandomänen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Tristetraprolin
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Das Sonnenlichtspektrum

Das Spektrum der elektromagnetischen Strahlung, die im auf die Erdoberfläche treffenden Sonnenlicht enthalten ist (terrestrisches Sonnenspektrum), reicht von ultravioletter (UV-) Strahlung ab einer Wellenlänge von 290 nm über den Bereich des sichtbaren Lichts (VIS) von 400-780 nm bis hin zur infraroten (IR-) Strahlung (**Abb. 1.1**). Letztere macht dabei einen Anteil von über 50 % der auf die Erde treffenden Sonnenenergie aus, der UV-Bereich hingegen nur knapp 7 %.

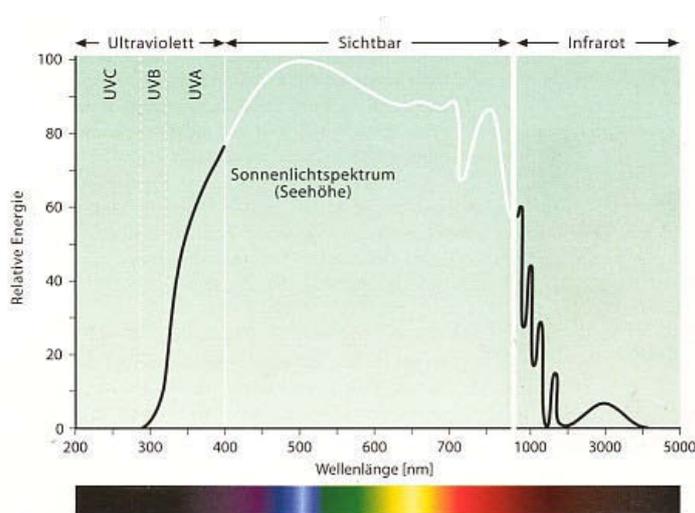
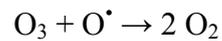
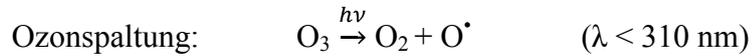
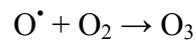
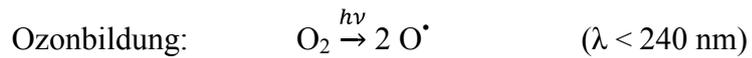


Abb. 1.1: Terrestrisches Spektrum der Sonnenstrahlung. Dargestellt ist die relative Energie in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Elektromagnetische Strahlung einer Wellenlänge von weniger als 290 nm, d.h. vor allem der UVC-Bereich, wird vom Ozon in der Stratosphäre herausgefiltert. UVB und UVA erreichen hingegen die Erdoberfläche. (Quelle: Fritsch, Dermatologie und Venerologie, 2. Aufl. (2004), © Springer-Verlag, mit freundlicher Genehmigung des Verlages sowie von Prof. Dr. P.O. Fritsch)

Dieses Spektrum weicht vor allem im UV-Bereich deutlich von dem vor Eintritt des Sonnenlichtes in die Erdatmosphäre (extraterrestrisches Sonnenspektrum) ab. Bei der UV-Strahlung unterscheidet man zwischen UVA (320-400 nm), genauer UVA-1 (350-400 nm) und UVA-2 (320-350 nm), UVB (280-320 nm) und UVC (200-280 nm). UV-Strahlung mit einer Wellenlänge unter 290 nm, also vor allem UVC aber auch kurzwelligeres UVB, wird in Stratosphäre und Troposphäre durch Sauerstoff und Ozon (O_3) (Konzentrationsmaximum in ca. 25 km Höhe) normalerweise vollständig absorbiert und gelangt nicht bis zur Erdoberfläche.



Anders als UVA- und UVB-Strahlung besitzt die an für sich stark mutagene UVC-Strahlung aus diesem Grund keine physiologische Bedeutung. Im Übrigen würde diese auch schon im Stratum corneum (Hornschicht) der menschlichen Haut nahezu vollständig absorbiert werden. Im Falle von UVB ist zudem die Verminderung der Ozonschicht durch anthropogene Spurengase, vor allem FCKWs (Fluorchlorkohlenwasserstoffe) aber auch Distickstoffoxid (N_2O), welche durch UVC bzw. UVB-Strahlung hochreaktive Cl- bzw. NO-Radikale freisetzen, zu bedenken. Diese Radikale sind im Stande, stratosphärisches Ozon katalytisch abzubauen. Weltweit sind so seit den 70er-Jahren vor allem in höheren Breitengraden bedenklich abgesunkene Ozonkonzentrationen beobachtet worden, was mit einer erhöhten Belastung durch UVB-Strahlung und einem gesteigerten Hautkrebsrisiko einhergeht (Rauterberg und Jung, 1993).

1.2 Wechselwirkung von UV-Strahlung mit biologischen Systemen

1.2.1 UV-Strahlung und Haut

Die menschliche Haut besteht aus einer Oberhaut (Epidermis) und einer Unter- oder Lederhaut (Dermis), welche durch eine Basalmembran voneinander getrennt werden. Unterhalb der Dermis schließt sich das subkutane Fettgewebe an. Die Dermis besteht aus Fibroblasten, Blutkapillaren und der extrazellulären Kollagenmatrix. Die Epidermis besitzt als Ort der direkten Wechselwirkung mit Umwelteinflüssen eine komplexe Struktur aus verschiedensten Zelltypen (**Abb. 1.2**). Den häufigsten Zelltyp stellen dabei die Keratinozyten dar. Sie bilden sozusagen die Matrix für die Einbettung der anderen weitaus weniger häufigen Zelltypen und sind in den vier Schichten der Epidermis, dem Stratum basale, spinosum, granulosum und dem Stratum corneum (Hornschicht) angeordnet. Von der untersten, kontinuierlich proliferierenden Schicht, dem Stratum basale, ausgehend wird ein Keratinozyt

in einem fortwährenden Differenzierungsprozess mit einhergehender Keratin- sowie Lipidsynthese (Lamellenkörper) bis in die oberste, nicht lebende Hornschicht bewegt und dort schließlich abgetragen. Außer den Keratinozyten sind die das Hautpigment Melanin bildenden Melanozyten, die für die Immunantwort der Haut essenziellen Langerhans-Zellen (im Stratum spinosum) und die sensorischen Merkel-Zellen (im Stratum basale) aufzuführen. Die einzelnen Zellen sind dabei u.a. durch Desmosomen miteinander verknüpft und über „Gap Junctions“ zur Zell-Zell-Kommunikation befähigt.

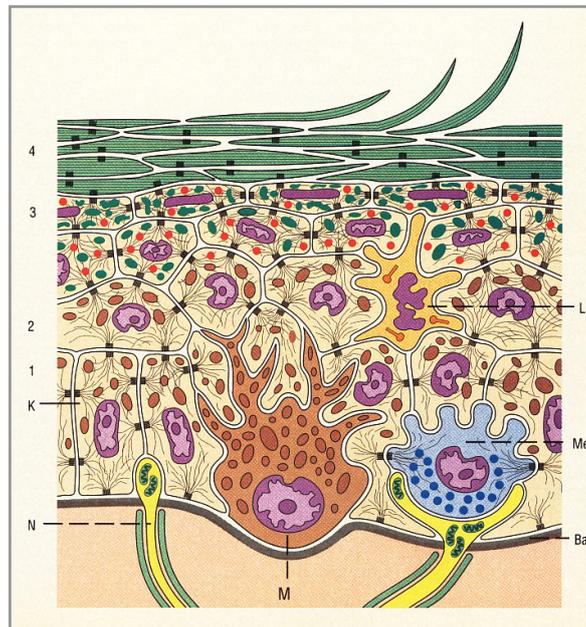


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Epidermis mit vorkommenden Zelltypen. Abkürzungen: K: Keratinozyten, M: Melanozyten, Me: Merkel-Zellen, L: Langerhans-Zellen, N: Nervenendigungen und Ba: Basalmembran. Dargestellt sind desweiteren die Keratinozyten-Schichten: (1) Stratum basale, (2) Stratum spinosum, (3) Stratum granulosum und (4) Stratum corneum (Hornhaut). In grün sind Keratinfasern, in rot Lamellenkörper (lipidhaltig), in dunkelbraun Melanosomen (melaninhaltig) und in schwarz Zell-Zell-Verknüpfungen stilisiert. (Quelle: Welsch: Sobotta, Histologie, 5. Auflage, © Urban & Schwarzenberg Verlag, mit freundlicher Genehmigung des Verlages)

Vor allem UVC- aber auch UVB-Strahlung wird zum Teil bereits durch das Stratum corneum (Hornschicht) reflektiert oder hauptsächlich von Proteinen und Nukleinsäuren absorbiert. In den tieferen Schichten der Epidermis wird die UV-Strahlung weiter durch Streuung oder Absorption abgeschwächt. Absorbierend wirkt dabei an erster Stelle Melanin. Aber auch Nukleinsäuren ($\lambda_{\max} \approx 260 \text{ nm}$) und Proteine (Tyrosin-/Tryptophanreste: $\lambda_{\max} \approx 280 \text{ nm}$; beide nur UVB-Absorption), Lipide, Karotinoide und Porphyrine fungieren als wichtige Chromophore. UVB- wird auf diese Weise insgesamt in der Epidermis wesentlich stärker

abgeschwächt als UVA-Strahlung und erreicht schließlich nur den oberen Bereich der Dermis. UVA-Strahlung vermag hingegen weitaus tiefer vorzudringen (**Abb. 1.3**).

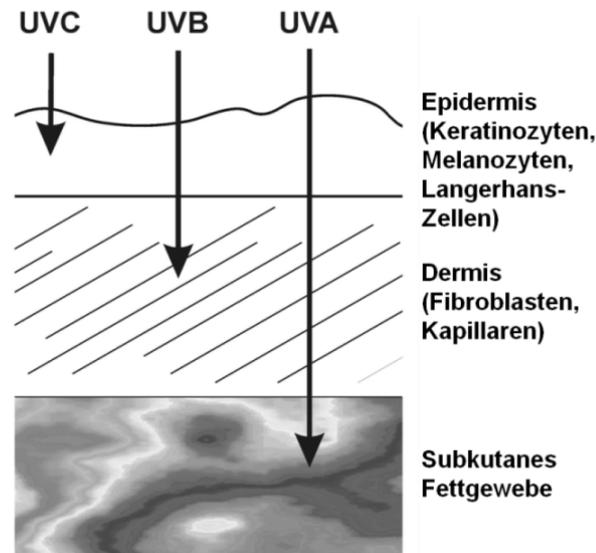


Abb. 1.3: Penetration der Haut durch UV-Strahlung. Zu sehen sind die einzelnen Schichten der Haut – Epidermis, Dermis und subkutanes Fettgewebe – und die Eindringtiefe von Strahlung der unterschiedlichen UV-Bereiche. UVC, das nicht bis zur Erdoberfläche gelangt, würde zum größten Teil bereits im Stratum corneum (Hornhaut) absorbiert. UVB und vor allem UVA vermögen hingegen bis in die Dermis vorzudringen. Im Falle von UVA wird sogar das subkutane Fettgewebe erreicht. (Quelle: Klotz in *Free Radicals and Diseases: Gene Expression, Cellular Metabolism and Pathophysiology*, T. Grune (Ed.), © 2005 IOS Press)

Eine biologische Wirkung elektromagnetischer Strahlung setzt eine Absorption durch Chromophore voraus. Diese Chromophore sind molekulare Strukturen in bioorganischen Verbindungen, welche über ein zu der entsprechenden Strahlungswellenlänge passendes Absorptionsspektrum verfügen. Durch Aufnahme eines elektromagnetischen Quantums („Lichtquants“) geht ein Chromophor in einen elektronisch angeregten Zustand über. Dieser Zustand besitzt lediglich eine Lebensdauer im Mikro- bis Nanosekundenbereich. Die aufgenommene Energie wird sodann einerseits in Form von Wärme, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz abgegeben. Andererseits kann es vor allem bei Chromophoren, welche im UV-Bereich absorbieren, also z.B. DNA, Proteine oder Porphyrine, aufgrund der hohen energetischen Lage des angeregten Zustandes auch zur Bildung von Photoprodukten, z.B. durch Photoadditionen, Isomerisierungen oder elektrozyklische Reaktionen, oder zur strahlungslosen Übertragung der Energie durch Förster-Transfer auf andere Moleküle kommen, welche dadurch chemisch besonders reaktiv werden. Alternativ zu diesem Energietransfer ist auch eine Elektronenübertragung zu oder von anderen Molekülen unter

Erzeugung freier Radikale möglich. Diese Energie- und Elektronentransfers werden unter dem Begriff Photosensibilisierung zusammengefasst.

Im Folgenden wird beispielhaft auf solche Wechselwirkungen von Chromophoren der Haut mit UV-Strahlung eingegangen. Anschließend sind tabellarisch die bedeutendsten daraus resultierenden biologischen Auswirkungen von UVA und UVB-Strahlung auf die Haut angeführt (**Tab. 1.1**).

Das Pigment Melanin ist ein Polymer, das durch enzymatische Oxidation der Aminosäure Tyrosin in Melanozyten gebildet wird. Die Absorption von UV-Licht durch Melanin ist für die Haut ein sehr wirksamer Schutzmechanismus, da hier die Energie des daraus resultierenden elektronisch angeregten Zustandes von Melanin durch sogenannte innere Umwandlung (IC, *internal conversion*) so schnell in Vibrationen des Moleküls, also unschädliche Wärme, umgewandelt wird, dass es nicht als Photosensibilisator zur Erzeugung freier Radikale beitragen kann (Meredith et al., 2004).

Die durch Filaggrinzerfall in der Hornschicht gebildete Urokaninsäure wird durch UV-Bestrahlung von der trans- zur cis-Form isomerisiert. Sie trägt nicht nur deutlich zur UV-Absorption der Haut bei, sondern wird in ihrer cis-Form als Mediator der UV-induzierten Immunsuppression diskutiert (Gibbs et al., 2008).

UVB führt in der DNA unter Erzeugung von Cyclobutanringen (Photoaddition) zur Bildung von Pyrimidindimeren, welche DNA-Replikation und Transkription erheblich beeinträchtigen können. Es sind jedoch Reparaturmechanismen vorhanden, welche zu deren Beseitigung beitragen. Bei der seltenen Erkrankung Xeroderma pigmentosum ist unter anderem der NER (Nukleotidexcisionsreparatur)-Mechanismus gestört, und es kommt in der Folge zu einer übermäßigen Bildung UV-induzierter Hautkarzinome (Dworaczek und Xiao, 2007). Auch UVA fördert, unter anderem über die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Photokarzinogenese (Scharffetter-Kochanek et al., 1997).

Bei der Biosynthese von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) in der Epidermis ist UVB-Strahlung (297 nm) zur elektrozyklischen Öffnung eines Zykhlohexadiens im 7-Dehydrocholesterol zu einem Hexatrien im Prävitamin D₃ unumgänglich. Dies kann im Übrigen auch als der Grund für die Entwicklung hellerer, melaninärmerer und somit UV-durchlässigerer Haut als evolutiven Vorteil bei der einstigen Migration von Menschen aus Afrika in vom Äquator weiter entfernte Gebiete angesehen werden (Hollis et al., 2005).

Tab. 1.1: Wirkung von UVB- und UVA-Strahlung auf die Haut im Vergleich.

UVB (280-320 nm)	UVA (320-400 nm)
· UV-Erythem („Sonnenbrand“)	· (UV-Erythem)
· langfristige Pigmentierung (Anregung der Melaninproduktion, Proliferation von Melanozyten)	· schnelle Pigmentierung (Konformationsänderung des Melanins)
· Photokarzinogenese (DNA-Schäden)	· Photokarzinogenese (oxidative DNA-Schäden)
· (Lichtalterung)	· Lichtalterung, z.B. Elastosis cutis (Zunahme von Elastin in Dermis)
· Vitamin D ₃ -Synthese (in Epidermis)	
· Immunsuppression	

1.2.2 Photooxidativer Stress

Im Folgenden soll die Photosensibilisierung erläutert werden, welche vor allem nach UV-Exposition zur Entstehung oxidativen Stresses hauptsächlich in Form der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Haut führt.

Ein Photosensibilisatormolekül (S) geht durch die Absorption elektromagnetischer Energie ($h\nu$), vor allem im UV-Bereich, vom Singulett-Grundzustand (1S) in einen elektronisch angeregten Singulett-Zustand ($^1S^*$) über, durch strahlungsloses ISC (*Intersystem Crossing*) findet ein Übergang in einen elektronisch angeregten Triplett-Zustand ($^3S^*$) statt (**Abb. 1.4**). An diesem Punkt bestehen prinzipiell mehrere Möglichkeiten. In Typ I-Reaktionen kommt es unter Elektronentransfer zur Erzeugung freier Radikale. So kann ein Elektron vom angeregten Photosensibilisator auf ein Sauerstoffmolekül übertragen werden, so dass sich ein Superoxid-Radikalanion ($O_2^{\cdot-}$) und ein organisches Radikalkation ($S^{\cdot+}$) bilden. Das Superoxid kann dann zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff dismutieren (**Abb. 1.4 A**). Der Photosensibilisator kann auch in einer Typ I-Reaktion mit einem organischen Substrat (S) reagieren und von diesem so ein Elektron abstrahieren. Es entsteht dann wiederum ein reaktives oxidierend wirkendes organisches Radikalkation ($R^{\cdot+}$) und die radikal-anionische Form des Photosensibilisators ($S^{\cdot-}$), welche ihrerseits bereitwillig Sauerstoff zu Superoxid unter Rückgewinnung des Photosensibilisators (1S) zu reduzieren vermag (**Abb. 1.4 B**).

Möglich ist zudem die spinerlaubte Energieübertragung von der angeregten Triplettform des Photosensibilisators ($^3S^*$) auf molekularen Sauerstoff in seinem Triplett-Grundzustand (3O_2) unter Rückführung des Photosensibilisators in seinem Singulett-Grundzustand (1S) und Erzeugung hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs (1O_2). Hier findet also keine Elektronenübertragung unter Bildung freier Radikale statt. Es handelt sich somit um eine Typ II-Reaktion (**Abb. 1.4 A**).

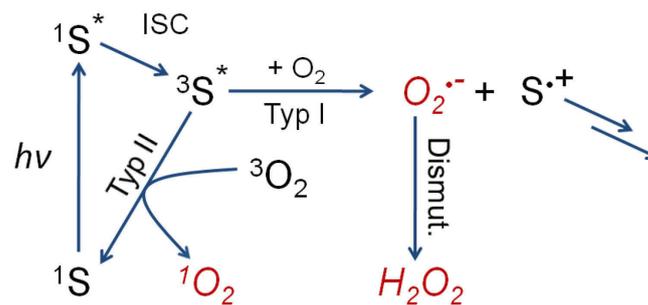
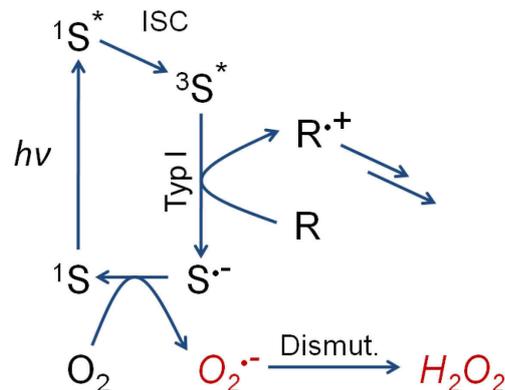
A**B**

Abb.1.4: Photochemische Erzeugung von ROS durch Photosensibilisatoren. Schematisch gezeigt ist (A) die Reaktion des durch elektromagnetische Energie ($h\nu$) elektronisch angeregten Photosensibilisators im Triplettzustand ($^3S^*$) mit molekularem Sauerstoff durch Elektronenübertragung und unter Erzeugung freier Radikale (Superoxid $O_2^{\bullet-}$ und $S^{\bullet+}$) (Typ I-Reaktion) bzw. durch Energietransfer ohne Entstehung freier Radikale (Singulett-Sauerstoff, 1O_2) (Typ II-Reaktion), (B) die Reaktion des angeregten Photosensibilisators nicht mit Sauerstoff, sondern mit einem organischen Substratmolekül (R) unter Elektronenübertragung (Typ I). Es resultiert hier letztlich auch die Bildung von Superoxid und oxidierenden organischen Radikalen ($R^{\bullet+}$). Das nach (A) oder (B) gebildete Superoxid dismutiert in der Folge noch zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff.

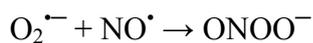
Das in Typ I-Reaktionen gebildete Superoxid disproportioniert zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Reaktion kann durch das Enzym Superoxid-Dismutase

(SOD) katalysiert werden. Desweiteren kann das auf diese Weise erzeugte H_2O_2 in der sogenannten Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen HO^\bullet führen.



Das dafür erforderliche Eisen wird u.a. durch die Häm-abbauende Enzym Hämoxxygenase-1 intrazellulär freigesetzt.

Alle physiologisch relevanten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), also Superoxid, Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikale können somit über die Wirkung von Photosensibilisatoren effektiv photochemisch erzeugt werden. Desweiteren kommt es in diesem Zuge zur Bildung oxidierender organischer Radikalkationen. Zudem kann das photochemisch gebildete Superoxid mit dem Produkt der Stickstoffmonoxid-Synthesen unter Bildung von Peroxynitrit reagieren.



Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) und das so erzeugte Peroxynitrit (ONOO^-) werden als reaktive Stickstoffspezies (RNS) bezeichnet und sind wichtige Mediatoren oxidativen Stresses.

Als Photosensibilisatoren für UVA in vivo werden vor allem (Proto-)Porphyrine und Flavine angenommen. Bei der UVA-Bestrahlung von Zellkulturmedium konnten Mahns et al. (2003) beispielsweise die Bildung von H_2O_2 nachweisen, das durch photochemische Anregung von Riboflavin (Vitamin B_2) (Photosensibilisator), anschließender Abstraktion eines Elektrons von einem Tryptophan-Molekül (Substrat) und Übertragung dieses Elektrons auf molekularen Sauerstoff unter Erzeugung von dismutierendem Superoxid gebildet wird (vgl. **Abb. 1.4 B**). Mögliche Photosensibilisatoren für UVB sind: Tryptophan und Tyrosin, NAD(H), Chinone, Flavine und Porphyrine (Trautinger, 2001). Auch bei UVB-Bestrahlung werden nachweislich in vivo ROS gebildet (z.B.: Masaki et al., 1995; Beak et al., 2004). Abschließend werden zwei Beispiele für die Bedeutung photochemisch erzeugten oxidativen Stresses erläutert.

So kann es zum einen in der Haut nach UV-Einwirkung zu phototoxischen und photoallergischen Reaktionen kommen (Lugović et al., 2007), die mitunter aus der verstärkten intrazellulären Erzeugung von ROS durch exogene aber auch endogene Photosensibilisatoren resultieren (Wondrak et al., 2006). Phototoxische Reaktionen sind in ihrer Erscheinung einem schweren UV-induzierten Erythem vergleichbar. Hier sind die Sensibilisierung durch den für

die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff bekannten diagnostisch genutzten Farbstoff Bengalrosa (Klotz et al., 1999) oder das Antibiotikum Doxycyclin beispielhaft zu nennen. Zu photoallergischen Reaktionen kommt es z.B. durch in bestimmten Gräsern enthaltene Furocoumarine. Hier werden zelluläre Strukturen oxidativ so verändert, dass sie als Antigene Immunreaktionen auslösen.

Zum Anderen wird die sogenannte photodynamische Therapie (PDT) zur gezielten Behandlung von Hauterkrankungen und Hautkrebs eingesetzt (Fritsch et al., 1998). Krebszellen nehmen u.a. aufgrund ihres allgemein stark erhöhten Metabolismus wesentlich mehr δ -Aminolävulinsäure (ALA) auf als andere Zellen und setzen diese zu Protoporphyrin IX, einem Photosensibilisator, um (Peng et al., 1997). Bei Bestrahlung mit Licht wird intrazellulär vornehmlich Singulett-Sauerstoff erzeugt, der letztlich zur Apoptose der entsprechenden Zellen führt (Weishaupt et al., 1976).

1.2.3 Modulation zellulärer Signaltransduktion durch UVA- und UVB-Strahlung

Bekanntermaßen führt UV-Strahlung in der Haut nicht nur zur bloßen Schädigung zellulärer Komponenten und Apoptose etwa durch oxidativen Stress, sondern auch über die Einleitung von Signaltransduktionsprozessen letztlich zu einer Steigerung der Expression bestimmter Proteine. Anzuführen sind hier mehrere Matrixmetalloproteinasen (MMPs), welche über den Abbau extrazellulärer Matrix in der Dermis zur Faltenbildung der Haut führen und zudem die Metastasierung beim Hautkrebs fördern. So wird die Kollagenase (MMP-1)-Expression u.a. durch UVA-Exposition erhöht (Scharffetter et al., 1991; Brenneisen et al., 2002). Die Expression des für den Xenobiotika-Metabolismus sehr bedeutsamen hydroxylierenden Enzyms Zytochrom P450 (CYP) 1A1 wird durch UVB-Strahlung induziert (Fritsche et al., 2007). Das Häm abbauende Enzym Hämoxygenase-1 wird durch UVA induziert (Keyse & Tyrrell, 1989). Die Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche allgemein eine entscheidende Rolle in Entzündung (Haut: UV-Erythem) und Tumorgenese (Haut: Photokarzinogenese) spielt, kann in ihrer Expression sowohl durch UVA als auch UVB induziert werden (Mahns et al., 2004).

Im Falle des UV-Erythems der Haut führt UV-Exposition mitunter zu oxidativem Stress (ROS) und DNA-Schädigung. Die dadurch aktivierten Signaltransduktionskaskaden haben schließlich die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren zur Folge. Dies sind namentlich Histamin, Serotonin, IL-1 und, als Resultat der COX-2-Aktivität, Prostaglandine (Hawk et al.,

1983). In der Folge kommt es zur Chemotaxis von Leukozyten, Expression von Adhäsionsmolekülen an Keratinozyten und Gefäßzellen und in positiver Rückkopplung zu erhöhter Interleukinausschüttung. Es resultiert eine entzündliche Reaktion hauptsächlich der Epidermis und oberen Dermis. Die COX-2 stellt hier also ein zentrales Enzym dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die nach UVB-Bestrahlung zur Induktion ihrer Expression führende Signaltransduktion untersucht werden.

1.3 Die Cyclooxygenase-2

1.3.1 Generelle Charakteristika

Die Cyclooxygenasen (67-72 kDa), auch Prostaglandin H₂-Synthasen (PGH-Synthasen) genannt, wurden in den 1970er-Jahren erstmals aus Samenblasen von Schweinen und Rindern aufgereinigt. Sie sind homodimere Glykoproteine, welche die Umsetzung des von der Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Membranphospholipiden freigesetzten Arachidonats in einer zweistufigen Reaktion zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) katalysieren (**Abb. 1.5**). Bei dieser Umsetzung handelt es sich um den kritischen, da geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Prostaglandin-Biosynthese. Zunächst wird dabei durch Addition zweier Sauerstoffmoleküle an ein Arachidonatmolekül letzteres mit einer Hydroperoxyl- sowie einer Cycloperoxylfunktion versehen (Cyclooxygenaseaktivität des Enzyms). Dieses Oxidationsprodukt wird als Prostaglandin G₂ bezeichnet, wird aber nicht freigesetzt. Es folgt dann im zweiten Schritt die Reduktion der Hydroperoxylfunktion zur Hydroxylfunktion unter Erzeugung des PGH₂ (Peroxidaseaktivität des Enzyms).

PGH₂ wird von jeweils zelltypspezifischen Prostaglandin- und Thromboxan-Synthasen zu den Prostaglandinen D₂, E₂, F_{2α}, I₂ (Prostacyclin) sowie Thromboxan A₂, die sezerniert werden und als Gewebshormone fungieren, weiter umgesetzt. Sie binden an spezifische 7TM-Rezeptoren der Zytoplasmamembranen in bestimmten Organen und führen über heterotrimere GTP-bindende Proteine zu einer Zu- oder Abnahme des cAMP-Spiegels oder einer Zunahme des IP₃-Spiegels. Folglich kommt es in beiden Fällen auch zu einer Veränderung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Prostaglandine und Thromoxane regulieren verschiedene physiologische Funktionen wie Blutplättchenaggregation (Thromboxan A₂ und Prostacyclin) und Gefäßdilatation/-konstriktion. Prostacyclin und vor allem PGE₂ sind wichtige Mediatoren bei Entzündungsprozessen.

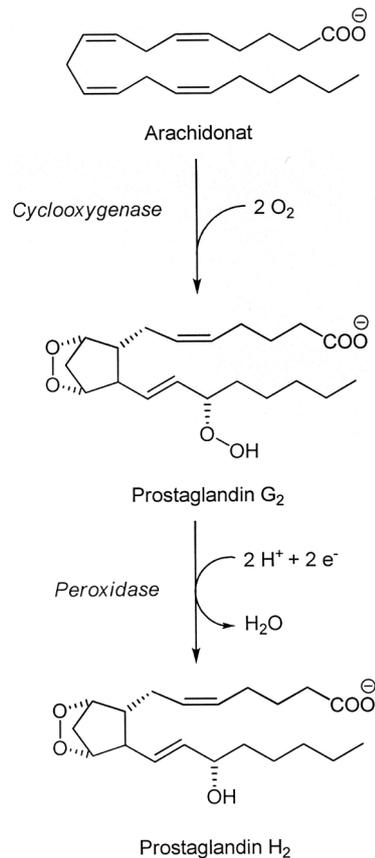


Abb. 1.5: Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität der Cyclooxygenasen. Zunächst werden zwei Sauerstoffmoleküle durch die Cyclooxygenase-Aktivität des Enzyms an ein Arachidonat-Molekül unter Bildung des Prostaglandins G₂ addiert. Dabei entstehen eine Hydroperoxy- und eine Cycloperoxyfunktion. Im zweiten Schritt wird die Hydroperoxyfunktion dann durch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms zur Hydroxyfunktion reduziert. Es bildet sich das Prostaglandin H₂, welches von verschiedenen Enzymen weiter zu anderen Prostaglandinen und Thromboxan A₂ umgesetzt wird.

Die Cyclooxygenasen (COX) sind in der Kernhülle und dem endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und über membranständige α -Helices jeweils an der Membrannenseite verankert. Man unterscheidet drei Isoformen: COX-1, COX-2 und COX-3. Während COX-1 und COX-2 ubiquitär sind, wird COX-3 beim Menschen hauptsächlich in der Großhirnrinde und im Herzen exprimiert und ist eine Variante von COX-1, die durch alternatives Spleißen derselben mRNA erzeugt wird (Chandrasekharan et al., 2002). Die Cyclooxygenase-1 (COX-1) wird konstitutiv exprimiert und ist wichtig für die Produktionen von Prostaglandinen, welche normale physiologische Funktionen wie die Regulation der Nierendurchblutung oder die Aufrechterhaltung des Magenschleims kontrollieren. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird auf einem separaten Gen kodiert und ist im Gegensatz zur COX-1 normalerweise nur in sehr geringen Mengen vorzufinden, in ihrer Expression jedoch vielfältig induzierbar. Die

sogenannten nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) inhibieren sowohl COX-1 als auch COX-2. Zu nennen sind hier beispielsweise Aspirin und Ibuprofen, welche durch kovalente Modifikation eines Serinrestes den hydrophoben Kanal zum reaktiven Zentrum für das Substrat Arachidonat blockieren. Es gibt jedoch auch selektive COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib.

COX-2 spielt wie bereits angedeutet eine überragende Rolle im Entzündungsgeschehen. Ursache von Entzündungen sind endogene oder exogene Noxen physikalischer (z.B. UV), chemischer (z.B. Allergene) oder biologischer Art (z.B. Bakterien). Ein in proinflammatorischem Gewebe erhöhter COX-2-Spiegel führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Prostaglandinen. Diese haben im Zusammenspiel mit anderen Mediatoren zum einen durch Verengung der Venolen Hyperämie (übermäßiges Blutangebot) im betroffenen Bereich zur Folge und führen dort zum anderen zu einer Permeabilitätserhöhung der Gefäßwände und zu Blutstau und ermöglichen somit zytokinvermittelte Infiltration vor allem mit phagozytierenden Immunzellen. Es kommt also zur Entzündung und Sanierung des betroffenen Bereichs durch Beseitigung der geschädigten Zellen. Entzündliche Prozesse werden jedoch auch mit der Entstehung und Wachstum von Krebs in Zusammenhang gebracht.

1.3.2 Entzündung und Krebs

Einerseits wirken sich chronische Entzündungen in vielerlei Hinsicht förderlich auf Entstehung und Wachstum bestimmter Tumoren aus. Andererseits führen aber auch onkogenetische Veränderungen zu einer entzündungsähnlichen, die Entwicklung mancher Tumorarten unterstützenden Mikroumgebung. So können die für Entzündungen charakteristischen Mediatoren und zellulären Adhäsionsmoleküle auch in der unmittelbaren Umgebung von Tumoren vorgefunden werden (Mantovani et al., 2008). Dadurch kommt es mitunter zu einer Förderung von Angiogenese (Gefäßbildung) und Metastasierung sowie zu einer Veränderung des betroffenen Gewebes in der Reaktion auf Hormone und Chemotherapeutika. Die molekularen Zusammenhänge entzündlicher und tumorbildender Prozesse sind Gegenstand intensiver Untersuchungen und Ausgangspunkt neuartiger Ansätze in Diagnose und Therapie. Beispielsweise ist in zahlreichen malignen und prämaligen Geweben ein erhöhter COX-2-Spiegel zu finden. Gesteigerte COX-2-Aktivität fördert die Karzinogenese, indem sie eine Reihe von in diesem Zusammenhang wichtigen Prozessen wie etwa Immunfunktion oder Xenobiotika-Metabolismus beeinflusst (Dannenbergh et al., 2001).

Selektive COX-2-Hemmer wie Celecoxib werden daher mittlerweile als unterstützende Chemotherapeutika erprobt (Subbaramaiah et al., 2003). Desweiteren ist beispielsweise ein bei Entzündungen anzutreffender Abwehrmechanismus gegen infektiöse Mikroben, nämlich die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) durch Enzyme wie NADPH-Oxidase oder die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) zu nennen (Rakoff-Nahoum, 2006). Diese Enzyme werden durch typische entzündungsassoziierte Signalwege reguliert. Die reaktiven Spezies, ROS und RNS, sind für ihre DNA-lädierende Wirkung bekannt (Hussain et al., 2003). Im Falle einer chronischen Entzündung wird somit dauerhaft eine mutagene, die Tumorentstehung unterstützende Umgebung geschaffen.

1.3.3 Wege zur Induktion der COX-2-Expression

Bei der COX-2 handelt es sich anders als bei der konstitutiv exprimierten COX-1 um ein induzierbares Enzym. Die Stimuli, die zu einer solchen Induktion führen, sind ebenso wie die beteiligten Signaltransduktionsprozesse vielfältig. In **Abb. 1.6** sind auszugsweise einige Stimuli und Signalkaskaden schematisch dargestellt, die zur Induktion der COX-2-Expression in karzinogenen und inflammatorischen Prozessen führen.

Erhöhte COX-2-Expression im Zusammenhang mit Krebs

In (prä-) malignen Geweben sind im Allgemeinen erhöhte COX-2-Spiegel zu finden (Dannenberg et al., 2001). Dies ist sowohl auf gesteigerte Transkription als auch auf erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen (Shao et al., 2000; Dixon et al. 2000). Die Transkription der COX-2 wird dabei über Proteinkinase C (PKC)- und Ras-vermittelte Signalkaskaden unter Beteiligung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) verstärkt (Subbaramaiah & Dannenberg, 2003). Im Falle von PKC sind beispielsweise die chemotherapeutischen Taxane (Zhang et al., 1998) als Stimuli zu nennen. Im Falle von Ras ist beispielhaft der erhöhte COX-2-Spiegel in Brustkrebszellen aufgrund einer ErbB2-Überexpression (stromaufwärts von Ras) zu erwähnen (Subbaramaiah et al., 2002). Die COX-2-Promotoraktivität wird in Krebszellen von einigen Transkriptionsfaktoren moduliert. Darunter befinden sich das Aktivatorprotein 1 (AP-1), der Nukleäre Faktor κ B (NF- κ B) oder auch der Nukleäre Faktor Interleukin -6 (NF-IL6) (Smith et al., 2000; Subbaramaiah et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor p53 inhibiert hingegen in seiner Wildtypform die COX-2-Transkription durch kompetitive Bindung an die

TATA-Box des COX-2-Promotors (Subbaramaiah et al., 1999). Der Tumorsuppressor p53 liegt in Tumoren sehr häufig in mutierter Form vor.

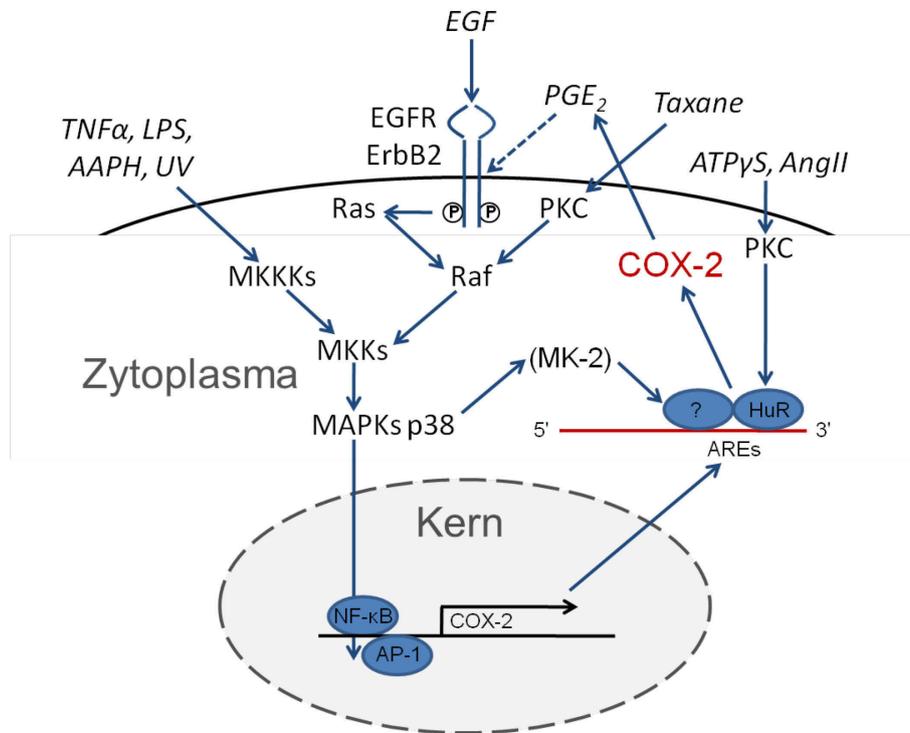


Abb. 1.6: Beispiele für zur Induktion der COX-2-Expression führende Signalkaskaden. Es kann bei unterschiedlichen Stimuli -Zytokine, Pathogene, Oxidanzien, Wachstumsfaktoren- sowohl zu einer transkriptionellen Steigerung durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1 kommen als auch zu einer posttranskriptionellen Modulation in Form einer mRNA-Stabilisierung etwa durch das RNA-Bindeprotein HuR. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Stimulation des EGF-Rezeptors mit EGF führt in Verbindung mit TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*) (Liu et al., 2007) oder Angiotensin II (Pham et al., 2008) zu einer synergetischen COX-2-Expression und ist für die Tumorgenese von Bedeutung. Interessanterweise wurde zudem gefunden, dass eine indirekte Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch Prostaglandin E₂ über den Prostaglandin E-Rezeptor 4 (EP4) in einer positiven Rückkopplung die COX-2-Expression in humanen Cholangiokarzinomzellen induziert (Xu et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PGE₂ über cAMP-Bildung zu einer gesteigerten COX-2-Expression führen kann (Maldev et al., 2000).

Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass die COX-2-Expression auch posttranskriptionell reguliert werden kann. Die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) ihrer mRNA weist sogenannte AU-reiche Elemente (AREs) auf, welche destabilisierend wirken. Durch die Bindung

bestimmter RNA-Bindeproteine kann die mRNA stabilisiert werden. Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 nach Behandlung mit Gallensäure und Ceramiden verursacht so, neben einer Steigerung der Transkription, auch eine Stabilitätserhöhung der COX-2-mRNA (Zhang et al., 2000). Taxane führen nicht nur zu einer transkriptionellen Verstärkung der COX-2-Expression über MAPKs, sondern auch unter Beteiligung von PKC, p38^{MAPK}, ihrem Substrat, der MAPK-aktivierten Proteinkinase-2 (MK-2), und dem ARE-Bindeprotein HuR zu einer Stabilitätserhöhung der COX-2-mRNA (Subbaramaiah et al., 2003). Auch in humanen Dickdarmkrebszellen wird die COX-2-mRNA-Stabilität durch HuR-Bindung an AREs der 3'-UTR der mRNA gesteigert (Dixon et al., 2001).

In Krebszellen ist häufig ein erhöhter HuR-Spiegel vorzufinden, der mit einer gesteigerten COX-2-Expression korreliert. Beispielsweise konnte dies für Brust- (Denkert et al. 2004) oder Prostatakrebszellen (Barbisan et al., 2008) gezeigt werden. Desweiteren wurde eine Zunahme der Menge des für gewöhnlich hauptsächlich im Nukleoplasma lokalisierten HuR (Fan & Steitz, 1998) im Zytoplasma mit einem erhöhten COX-2-Spiegel in Zusammenhang gebracht, so z.B. von Erkinheimo et al. (2003) in Eierstockkrebszellen.

Induktion der COX-2-Expression in proinflammatorischen Prozessen

Verschiedene Stimuli wie das Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder das Pathogen Lipopolysaccharid (LPS) steigern über die Aktivierung der MEK-Kinase 1-MKK-MAPK-Signalkaskade oder Stimulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Transkription der COX-2 (Surh et al., 2001). LPS vermag außerdem über p38^{MAPK} eine Stabilisierung der COX-2-mRNA zu bewirken (Lugo et al., 2007). Das Peroxyl-Radikale bildende AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)hydrochlorid) führt in HaCaT-Zellen über die MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38 zur Induktion der COX-2-Expression (Cui et al., 2004). Sowohl UVA- (Soriani et al., 1998) als auch UVB-Strahlung (Buckman et al., 1998) induzieren in menschlichen Keratinozyten die COX-2-Expression. p38^{MAPK} wird durch UVA (Klotz et al., 1999) sowie UVB (Huang et al., 1997) aktiviert und ist beispielsweise zusammen mit der Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3K)-Kaskade für die UVB-induzierte Verstärkung der COX-2-Transkription unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 von entscheidender Bedeutung (Bachelor et al., 2005). Das ATP-Analogon ATP γ S (Adenosin-5'-O-(3-thio)triphosphat) (Doller et al., 2007) sowie Angiotensin II (Doller et al., 2008) führen über PKC α - bzw. δ -Aktivierung in humanen Mesangialzellen zu einer Phosphorylierung nukleären HuRs und in der Folge zu seiner Translokation ins Zytoplasma mit dortiger Bindung und Stabilisierung von COX-2-

mRNA. Über die Beteiligung ARE-bindender Proteine (AREBPs) bei der p38^{MAPK}-vermittelten mRNA-Stabilisierung ist nicht viel bekannt. Im Falle des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins A0 (hnRNP A0), einem MK-2-Substrat, konnte dies bereits für COX-2-mRNA bei der Behandlung von RAW264-Makrophagen mit LPS gezeigt werden (Rousseau et al., 2002).

Wie deutlich geworden sein sollte, haben die mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 und das ARE-Bindeprotein HuR besondere Bedeutung im Zusammenhang mit der Expression der COX-2. Im Folgenden wird erläutert, wie UV-Strahlung zelluläre Signaltransduktion stimulieren kann, um Orientierung für die in dieser Arbeit zu untersuchende UVB-induzierte Expression der COX-2 zu schaffen.

1.4 Mechanismen UV-induzierter Signaltransduktion

Es sind anderes als beispielsweise im Falle von Wachstumsfaktoren und Zytokinen für UV-Strahlung keine direkten zellulären Rezeptoren bekannt, die durch Konformationsänderung oder Dimerisierung zu einer Initiation entsprechender Signaltransduktionsprozesse führen. Es besteht aber zum einen die Möglichkeit der Bildung von Photoprodukten, welche dies zu bewirken vermögen. Zum anderen kann auch die Erzeugung oxidativen Stresses durch Photosensibilisierung zu einer oxidativen direkten oder indirekten Beeinflussung von Signaltransduktionskomponenten führen.

1.4.1 Photoprodukte

UV-induzierte Signaltransduktion kann durch die photochemische Bildung molekularer Strukturen initialisiert werden, welche in irgendeiner Form an Komponenten von Signaltransduktionskaskaden binden können.

Die UV-induzierte Bildung von Photoprodukten der DNA kann nach Bindung bestimmter Proteine wie ATR (*ATM- and Rad3-related*; Unsal-Kaçmaz et al., 2002) an die Läsion die Auslösung von Signaltransduktion verursachen, die in einen Zellzyklusarrest zwecks Verlängerung der für die Reparatur vor der nächsten Zellteilung zur Verfügung stehenden Zeit und zudem in die Rekrutierung der entsprechenden enzymatischen Reparaturmaßnahmen einmünden. Dies sind allgemeine Mechanismen, wie sie auch bei Beschädigung der DNA durch andere Noxen zu finden sind. Beispielsweise führen die Checkpoint-Kinasen Chk1 und

Chk2 nach DNA-Beschädigung und Aktivierung durch ATR bzw. ATM zu einer Phosphorylierung der Proteinphosphatase cdc25C (*cell division cycle 25 homolog C*) am Ser-216 und somit zu deren Inaktivierung (Blasina et al., 1999; Furnari et al., 1999). In der Folge kommt es nicht mehr zu einer Dephosphorylierung entsprechender zyklinabhängiger Kinasen durch cdc25C und somit zu einem Verharren in der G₂-Phase. Eine kritische, zentrale Rolle für die Einleitung des Zellzyklusarrestes zur DNA-Reparatur aber auch der Apoptose zu stark genetisch geschädigter Zellen spielt der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 (Levine, 1997), welcher nach DNA-Beschädigung an Ser-15 (durch ATR oder ATM) und -20 (durch ATR und Chk2) phosphoryliert wird und in der Folge von seinem negativen Regulator MDM2 (*mouse double minute 2*) dissoziiert (Chehab et al., 1999). Das Gen von p53 ist das häufigste in humanen Tumoren mutierte Gen und weist bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988) zwei typischerweise auch durch UV-Exposition entstehende Punktmutationen auf (Henseleit et al., 1997).

Der AhR (Arylhydrocarbon-Rezeptor) ist ein zytoplasmatischer Rezeptor für (halogenierte) polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. So ist ein Ligand des AhR das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, welches auch als Sevesogift bekannt wurde. Der AhR transloziert nach Aktivierung typischerweise in den Kern, wo er als Transkriptionsfaktor fungiert. Durch UVB-Strahlung kommt es (*ex vitro*) zu Photoreaktionen der Aminosäure Tryptophan. Es entsteht u.a. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), bei dem es sich um einen hochaffinen Liganden des AhR handelt (Rannug et al., 1987; Rannug et al., 1995). Es wurde kürzlich gezeigt, dass der AhR eine Rolle in der UVB-induzierten Expression von CYP1A1 sowie der Cyclooxygenase-2 spielt (Fritsche et al., 2007).

1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Eine andere Möglichkeit der Einleitung UV-induzierter Signaltransduktion verläuft über die Generierung oxidativen Stresses durch Photosensibilisierung. Die so erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) können einerseits entweder direkt sogenannte redoxsensitive Transkriptionsfaktoren wie den nukleären Faktor κ B (NF- κ B) (Schreck et al., 1991) oder das Aktivatorprotein 1 (AP-1) (Abate et al., 1990) oxidativ aktivieren. Andererseits können ROS aber vor allem durch Modulation der Aktivität weiter stromaufwärts gelegener Signaltransduktionskomponenten, also von Proteinkinasen, zu einer Expressionssteigerung bestimmter Gene führen.

Dabei kann eine Signaltransduktionskaskade direkt oder indirekt durch ROS beeinflusst werden. Bei der direkten Beeinflussung wirken ROS oxidierend auf Komponenten der Signalkaskade ein und verändern so deren Aktivität. Bei der indirekten Beeinflussung hingegen oxidieren sie bestimmte Moleküle (z.B. Lipidperoxidierung). Die entstandenen Reaktionsprodukte (z.B.: 4-Hydroxynonenal) wechselwirken in der Folge mit Komponenten der Signalkaskade und beeinflussen so deren Aktivität (Dwivedi et al., 2007). Dies kann prinzipiell jeweils entweder inhibitorische oder stimulatorische Auswirkungen auf die betrachteten Transduktionsprozesse haben (Klotz, 2005). Im Folgenden sind zunächst bekannte Beispiele „oxidativer Angriffe“ von ROS auf molekulare Strukturen angeführt, welche zur Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden führen können. Anschließend wird näher auf Proteinkinasen eingegangen, die besonders bekannt für eine auf diese Weise durch ROS modulierte Aktivität sind.

Initiation von Signaltransduktion durch ROS

- PTPasen

Das häufigste Ziel für die Einwirkung von ROS auf Signaltransduktionsprozesse sind Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPasen). Diese können sowohl eine Deaktivierung membranständiger Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs), welche sich nach Ligandenbindung (dimerisieren und phosphorylieren), als auch von zytosolischen tyrosinphosphorylierten Kinasen bewirken. Ihre Inaktivierung kann somit zu einer Aktivierung der kontrollierten Kinasen führen. So ist beispielsweise die Inaktivierung der PTP-1B mit resultierender Aktivierung des EGF-Rezeptors nach UVA-Bestrahlung zu nennen (Gross et al., 1999; von Montfort et al., 2006a) oder die einer JNK-Phosphatase durch Arsenit mit entsprechender Aktivierung der MAPK JNK (Cavigelli et al., 1996). Es gibt zwei Gruppen von PTPasen: Zum einen die klassischen PTPasen, die an Tyrosinresten dephosphorylieren, und zum anderen die dualen Phosphatasen, welche sowohl Serin-/Threonin- als auch Tyrosin-Phosphataseaktivität aufweisen. Alle PTPasen besitzen in ihrem reaktiven Zentrum jedoch eine essenzielle Cystein-Thiolatgruppe zum nukleophilen Angriff auf das Phosphoratom der zu entfernenden Phosphatgruppe des Tyrosinrestes. Diese Gruppe weist eine besonders hohe Elektronendichte auf und wird daher beispielsweise von H_2O_2 (Sullivan et al., 1994), $^1\text{O}_2$ (von Montfort et al., 2006b) aber auch Peroxynitrit (Takakura et al., 1999) bereitwillig oxidiert und somit inaktiviert.

- Gluthation

γ -Glutamylcysteinylglycin oder Gluthation (GSH) ist das häufigste, in millimolaren Konzentrationen vorkommende, niedermolekulare Thiol eukaryotischer Zellen. Seine Thiolfunktion kann beispielsweise durch ROS zur Sulfensäure oxidiert werden. Die resultierende Gluthation-Sulfensäure und andere Oxidationprodukte wie S-Nitrosogluthation sind im Stande Cystein-Thiolgruppen von Proteinen reversibel zu glutathionylieren und so deren Aktivität zu modulieren. Zu nennen sind hier beispielsweise mehrere Proteinkinase C (PKC)-Isoformen (Chu et al., 2001) sowie auch die PTP-1B (Barrett et al., 1999).

- Thioredoxin

Das kleine Protein Thioredoxin (Trx; 12 kDa) ist eine redoxensitive Protein-Disulfidreduktase, die in ihrem aktiven Zentrum ein Cysteinpaar enthält, das normalerweise unter NADPH-Verbrauch enzymatisch im reduzierten Zustand gehalten wird. Steigt die ROS-Konzentration in der Zelle jedoch über einen kritischen Wert an, so liegt das Cysteinpaar in oxidiertem Zustand vor. Trx ist beispielsweise für seine Bindung an die MAPK-Kinase-Kinase ASK1 (Apoptosesignal regulierende Kinase 1) bekannt, die es auf diese Weise inhibiert wird. Ist Trx wie beschrieben inaktiviert, liegt diese Kinase also in ihrer aktiven Form vor und kann stromabwärts zur Phosphorylierung der MAPKs p38 und JNK führen (Saitoh et al., 1998). Zudem wurde nachgewiesen, dass Trx die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B inhibiert (Schenk et al., 1994)

ROS-regulierte Proteinkinasen

- Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) werden durch extrazelluläre Bindung spezifischer Liganden aktiviert und in der Folge tyrosinphosphoryliert. Die phosphorylierten Tyrosinreste im Zellinneren fungieren anschließend als Bindestellen für unterschiedliche Adaptermoleküle, welche wiederum die Aktivierung von Proteinkinasen und somit die Einleitung entsprechender Signaltransduktionskaskaden verursachen. Als RTKs sind vor allem der Insulinrezeptor sowie der EGF-Rezeptor zu nennen. Nach Bindung seines Liganden kommt es zu einer Aktivierung des EGFR (180 kDa) durch Homodimerisierung und Tyrosinphosphorylierung in trans. Dies führt so beispielsweise über das membranassoziierte

GTP-bindende Protein Ras zu einer über die MAP-Kinasen ERK 1/2 verlaufenden Signaltransduktion. Letztlich resultiert dies in einer Stimulation von Zellwachstum und Proliferation. Beim EGFR ist weiterhin bekannt, dass er nach Aktivierung durch Ligandenbindung und Auslösen entsprechender Signaltransduktionskaskaden internalisiert und lysosomal abgebaut wird.

Es ist jedoch bekannt, dass RTKs auch in der Signaltransduktion jenseits ihrer spezifischen Liganden von Bedeutung sind (Weiss et al., 1997). Der EGFR wurde beispielsweise mit der Initiierung UV-induzierter Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht. Eine Aktivierung des EGFR durch (reversible) Inaktivierung negativ regulierender Phosphatasen wurde besonders deutlich nach UVC-Bestrahlung nachgewiesen (Knebel et al., 1996). Auch für UVB ist die Möglichkeit einer EGFR-Phosphorylierung gezeigt (Xu et al., 2006) und die Bedeutung der H_2O_2 -Bildung dafür verdeutlicht worden (Peus et al., 1999). Außer der oxidativen Inaktivierung EGFR-regulierender Phosphatasen wurde eine durch H_2O_2 -verursachte Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Src mit resultierender Phosphorylierung des EGFR berichtet (Chen et al., 2001).

- Proteinkinase C (PKC)

Die Proteinkinase C tritt in einigen Isoformen auf. Man unterscheidet die klassischen Isoformen α , $\beta 1$, $\beta 2$ und γ , die durch die sekundären Botenstoffe Ca^{2+} und Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden, die neuartigen Isoformen δ , ϵ , η , θ und μ , welche nur durch DAG aktivierbar sind, und die atypischen Isoformen ζ und λ , die weder durch Ca^{2+} noch durch DAG aktiviert werden. Die EGFR-abhängige Phospholipase \mathcal{P} (PLC γ) hydrolysiert nach Aktivierung PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) und DAG. IP₃ führt in der Folge zu einer verstärkten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder den Mitochondrien. Ca^{2+} bindet an zytosolische PKC und verursacht so eine Translokation dieser zur Innenseite der Zytoplasmamembran, wo PKC mit DAG wechselwirken kann. PKC ist für eine Aktivierung unter Bedingungen oxidativen Stresses bekannt (Abdelmohsen et al., 2008). Denkbar ist beispielsweise eine Beeinträchtigung der Membranintegrität durch Lipidperoxidation und ein dadurch verursachtes Einströmen von Ca^{2+} ins Zytosol (Klotz, 2005). PKC führt über die Phosphorylierung von Ras oder Raf zu einer Aktivierung der MAPK-Signalkaskade.

- MAP-Kinasen (mitogen-aktivierte Proteinkinasen)

Eine Aktivierung der MAP-Kinasen durch H₂O₂ (Guyton et al., 1996; Wang et al., 1998) ¹O₂ (Klotz et al., 1997; Klotz et al., 1999) und andere ROS ist wohlbekannt. Die ersten Vertreter der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) wurden Ende der 80er-Jahre entdeckt. Charakteristisch ist für MAPKs allgemein eine Kaskade dreier Kinasen. Die MAPKs werden dabei durch MAPK-Kinasen (MKKs) aktiviert, die wiederum durch MKK-Kinasen phosphoryliert werden (MKKKs). Diese MKKKs werden wiederum zumeist durch kleine GTP-bindende Proteine aktiviert. Weiterhin ist den MAPKs gemein, dass sie durch die MKKs doppelt an einem Threonin- und einem Tyrosinrest phosphoryliert werden, und ihrerseits prolingerichtete Serin-/Threonin-Kinasen sind. Zunächst wurden die sogenannten Extrazellulärsignal-regulierten Kinasen (ERKs) bekannt (Gomez et al., 1991). Diese werden in Folge der Bindung von Insulin oder Mitogenen wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (also extrazellulären Stimuli) an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) aktiviert und führen hauptsächlich zur Stimulation von Zellwachstum und Proliferation etwa über Aktivierung entsprechender Transkriptionsfaktoren wie Sap-1 oder Elk-1 oder eine Erhöhung der Translationsrate. Ihre Vertreter sind ERK 1 und ERK 2 (44/42 kDa) und werden von den MAPK/ERK-Kinasen (MEK) 1/2 in dem Motiv Thr-*Glu*-Tyr phosphoryliert. Ihre Aktivität nimmt dadurch um den Faktor 1000 zu (Chen et al., 2001). MEK 1/2 werden ihrerseits von der MKKK Raf, einer Ser/Thr-Kinase, phosphoryliert und diese schließlich von Ras, einem kleinen GTP-bindenden Protein, aktiviert. Zu dieser Gruppe von MAPKs wird auch ERK 5 gerechnet, welche ein zu ERK 1/2 ähnliches Aktivierungsmuster aufweist.

Wenig später wurden zwei weitere MAPK-Gruppen entdeckt, die im Gegensatz zu den ERKs hauptsächlich durch Stressstimuli wie z.B. UVC-Strahlung (Derijad et al., 1994) oder Lipopolysaccharid (LPS) (Han et al., 1994) aktiviert werden, und daher als SAPKs (stressaktivierte Proteinkinasen) bezeichnet wurden. Dies sind die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) mit 10 Isoformen (46-54 kDa), aus drei Genen *jnk-1* bis *jnk-3* durch alternatives Spleißen gebildet (Gupta et al., 1996), und die p38-MAPKs mit den Isoformen α bis δ (38-43 kDa) (Ono & Han, 2000). JNK werden im Motiv Thr-*Pro*-Tyr phosphoryliert, die p38^{MAPK} hingegen bei Thr-*Gly*-Tyr. JNK werden vornehmlich von MKK 4 und 7 phosphoryliert, p38^{MAPK} von MKK 3 und 6. Diese werden wiederum von unterschiedlichen MKKKs, welche beispielsweise durch die GTP-bindenden *cdc42* (*cell division cycle 42*) oder Rac stimuliert werden, aktiviert. Die JNK beeinflussen vor allem die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein 1 (AP-1) (Komplex aus c-Jun und c-Fos) oder

p53 und werden daher vornehmlich mit Apoptose- und Differenzierungsprozessen assoziiert. p38^{MAPK} führt ebenfalls zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder ATF-2 (Aktivierender Transkriptionsfaktor 2) und steht über die gesteigerte Expression von Proteinen wie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) oder der COX-2 mit inflammatorischen Prozessen im Zusammenhang. p38^{MAPK} kann zudem auch weitere Kinasen, vor allem die MAPK-aktivierten Proteinkinasen-2 und 3 (MK-2/3) aktivieren. Nicht zuletzt ist p38^{MAPK} bekannt für ihre Fähigkeit der posttranskriptionellen Regulation inflammatorischer Gene und zwar sowohl auf Ebene der Stabilität als auch der Translation entsprechenden mRNAs (Dean et al., 2004).

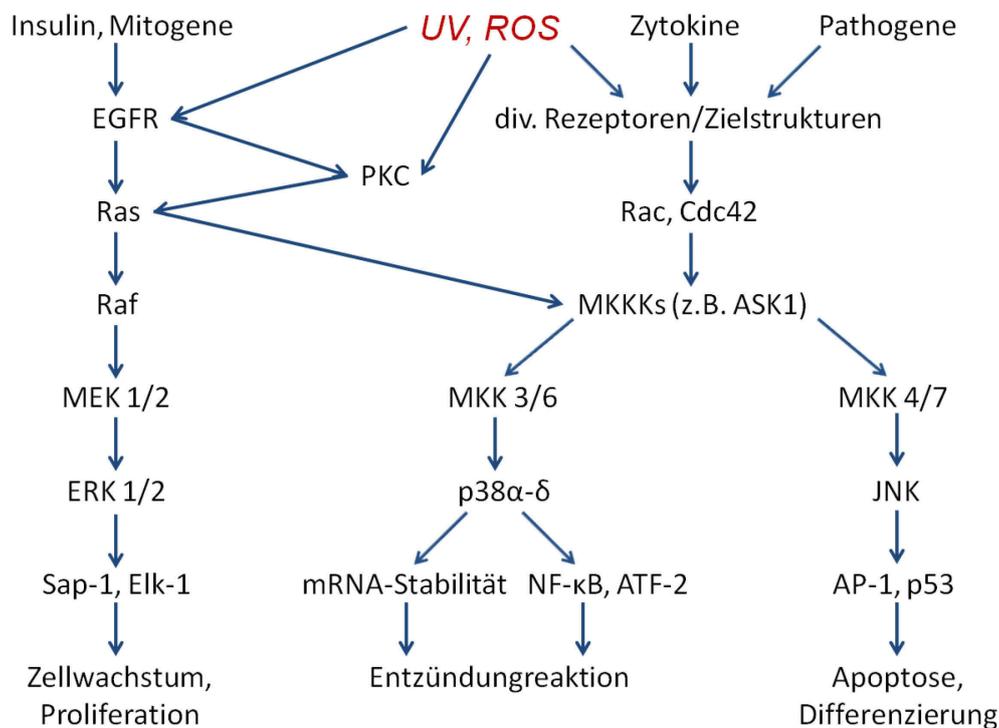


Abb. 1.7: EGF-Rezeptor, Proteinkinase C und mitogen-aktivierte Proteinkinasen bei der Signaltransduktion unter Bedingungen oxidativen Stresses, wie sie etwa durch nach UV-Bestrahlung intrazellulär erzeugte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vorzufinden sind. Nähere Erläuterungen dazu im Text.

Die Erläuterungen zu EGF-Rezeptor, Proteinkinase C und den mitogen-aktivierten Proteinkinasen sowie ihr Zusammenhang in Bezug auf die ROS/UV-induzierte Signaltransduktion ist in **Abb. 1.7** schematisch zusammengefasst.

1.4.3 Durch oxidativen Stress induzierte Modulation von mRNA-Stabilität und Translationsrate

ROS können, wie im Falle der $p38^{MAPK}$, nicht nur auf transkriptioneller Ebene die Genexpression als Antwort der Zelle auf oxidativen Stress ändern, sondern auch posttranskriptionell. Der Begriff posttranskriptionell umfasst dabei alle Schritte von der Transkription, d.h. der Erzeugung der unprozessierten Prä-mRNA, über deren Spleißen und Reifung (5'-Kappe und Polyadenylierung am 3'-Ende) und den Transport ins und im Zytoplasma bis zur Translation in Polysomen bzw. Abbau der mRNA in P-bodies (*processing bodies*) und Exosomen (Moore, 2005).

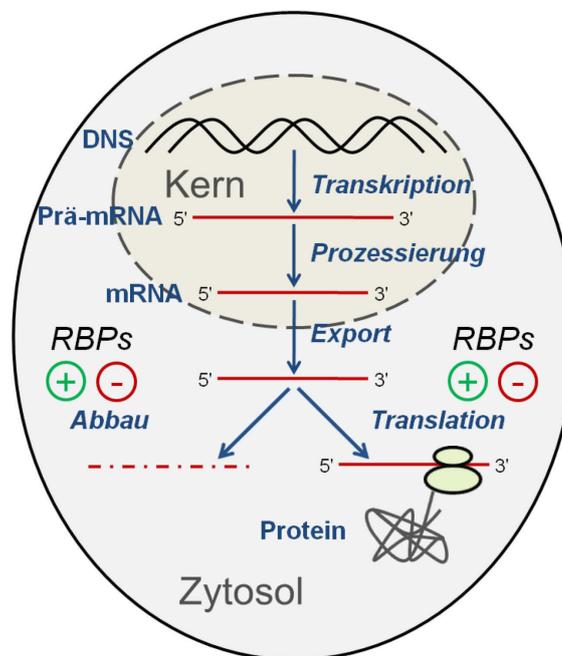


Abb. 1.8: Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch RNA-Bindeproteine. RNA-bindende Proteine (RBPs) können einerseits den Abbau verschiedener mRNAs fördern (+) oder hemmen (-) und andererseits die Translationsrate dieser mRNAs erhöhen (+) oder vermindern (-). Es resultiert eine posttranskriptionelle Modulation der Expression entsprechender Proteine wie etwa der COX-2. Außerdem dargestellt sind die vorhergehenden Schritte der Transkription, Prozessierung und des Exports der mRNA ins Zytoplasma, welche prinzipiell auch Ansatzpunkte posttranskriptioneller Modulation sind.

Dabei sind als direkt mit der mRNA wechselwirkende Mediatoren der ROS-induzierten posttranskriptionellen Regulation sowohl die sogenannten mikroRNAs (Bhattacharyya et al., 2006; Sunkar et al., 2006) als auch die mRNA-bindenden Proteine (RBPs) bekannt. Wichtig sind hier vor allem die sogenannten TTR-RBPs (*turnover and translation regulatory RBPs*) die durch ihre Bindung an Ziel-mRNAs zu einer Regulation ihrer Abbau- oder

Translationsrate führen und somit die Genexpression deutlich und innerhalb kürzester Zeit beeinflussen können (**Abb. 1.8**).

Diese TTR-RBPs, im Folgenden kurz als RBPs bezeichnet, sind in ihrer posttranskriptionellen Wirkung stark von der gebundenen Ziel-mRNA abhängig. Je nachdem kann ein und dasselbe RBP entweder positiv oder negativ auf den Abbau- oder Translationsprozess der entsprechenden mRNA einwirken. RBPs wechselwirken zudem häufig untereinander, so können sie bei der gleichen Bindesequenz kompetitiv oder kooperativ interagieren. Ein Beispiel für eine kompetitive Wechselwirkung ist das von HuR und dem AU-bindenden Faktor 1 (AUF-1) u.a. an p21-mRNA (Lal et al., 2004). Desweiteren kann ein RBP die Expression eines anderen RBPs durch Binden seiner mRNA beeinflussen, wie dies der Fall ist bei der Stabilitätserhöhung von β -Catenin-mRNA durch HuR (López de Silanes et al., 2003). Es werden im Folgenden die verschiedenen Möglichkeiten der durch oxidativen Stress induzierten posttranskriptionellen Wirkung von RBPs exemplarisch verdeutlicht.

- Förderung des mRNA-Abbaus

Als RBPs, welche den Abbau von mRNAs fördern, sind neben AUF-1 besonders KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) und Tristetraprolin (TTP) zu nennen. Diese binden in der AU-reichen Sequenz in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von mRNAs wie IL-8 (Winzen et al., 2007). Für TTP konnte zudem die Bindung an COX-2-mRNA nachgewiesen werden (Boutaud et al., 2003). Im Falle von KSRP ist weiterhin gezeigt worden, dass es mit mRNA-stabilisierenden RBPs um die Bindestelle konkurrieren kann, so z.B. mit HuR um die Bindung an iNOS-mRNA (Linker et al., 2005). Aufgrund der Bindung dieser RBPs kommt es sowohl zur Aktivierung von PARN (Poly-(A)-Ribonuklease) als auch zur Rekrutierung der entsprechenden mRNAs zum Exosom und somit insgesamt zu deren beschleunigtem 3'→5'-Abbau (Lai et al., 2003; Gherzi et al., 2004). KSRP kann beispielsweise von p38^{MAPK} phosphoryliert und inaktiviert werden (Briata et al., 2005), TTP von MK-2 (Stoecklin et al., 2004), einem p38^{MAPK}-Substrat. Es resultiert eine Dissoziation von den entsprechenden mRNAs und somit ihre Stabilisierung.

- Stabilisierung der mRNA

Als mRNA stabilisierendes RBP ist vor allem Hu-Antigen R (HuR), ein Vertreter der Hu-Proteinfamilie, aufzuführen. Dieses 36 kDa-Protein ist im Gegensatz zu den anderen neuronenspezifischen Mitgliedern (HuB/Hel-N1, HuC und HuD) der zum Drosophila-Protein ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) homologen Familie von RBPs ubiquitär (Ma et al., 1996). Es ist hauptsächlich nukleär lokalisiert, transloziert jedoch beispielsweise nach UVC-Bestrahlung (Wang et al., 2000b) oder H₂O₂-Behandlung (Abdelmohsen et al., 2007) ins Zytoplasma, und stabilisiert dort eine Vielzahl von mRNAs durch Bindung an die destabilisierend wirkenden AREs der 3'-UTR. Zu den von HuR stabilisierten mRNAs gehören die von p21 (Wang et al., 2000b), iNOS (Linker et al., 2005), COX-2 (Subbaramaiah et al., 2003), γ -GCSH (Song et al., 2005) oder die des Urokinase-Plasminogen-Aktivators und seines Rezeptors (Tran et al., 2003). Die durch oxidative Stimuli induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma kann z.B. von p38^{MAPK} (Subbaramaiah et al., 2003; Song et al., 2005) oder PKC α abhängig sein (Doller et al., 2007). Zudem wurde eine durch p38^{MAPK} vermittelte Bindung an die mRNAs von COX-2 (Subbaramaiah et al., 2003) oder γ -GCSH (Song et al., 2005) gezeigt.

- Förderung der mRNA-Translation

HuR ist nicht nur für seine mRNA stabilisierende Wirkung bekannt, sondern führt z.B. bei p53 UVC-induziert (Mazan-Mamczarz et al., 2003) zu einer gesteigerten Translationsrate der mRNA. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich bei CAT-1 (Kationischer Aminosäure-Transporter 1) der die Translationsrate steigernde Effekt von HuR nach Arsenitbehandlung aus der Konkurrenz mit einer translationshemmenden mikroRNA um die Bindestelle auf der mRNA ergibt (Bhattacharyya et al., 2006).

- Hemmung der mRNA-Translation

Sogenannte Stress-Granula (SGs) sind transiente stressinduzierte Foci translatorischer Hemmung im Zytoplasma (Kedersha und Anderson, 2002). Untranslatierte mRNAs werden hier aufbewahrt, bis sie schließlich entweder zwecks Translation zu den Polysomen oder zu den P-bodies transportiert werden, wo ihre 5'-Kappen entfernt und sie in 5'→3' -Richtung abgebaut werden. TIA-1 und TIAR werden unter Bedingungen oxidativen Stresses zur Aggregation in SGs veranlasst. Es wird angenommen, dass sie in diesen SGs für die

Translationsunterdrückung vieler ROS-regulierter mRNAs wie TNF- α (Piecyk et al., 2000) oder COX-2 (Tong et al., 2007) mitverantwortlich sind. Für HuR wurde nicht nur eine Steigerung der Translationsrate, sondern auch eine Hemmung der Translation z.B. bei den mRNAs von p27 (Kullmann et al., 2005) oder Wnt5a (Leanderson et al., 2006) nachgewiesen, bei denen es an der 5'- bzw. 3'-UTR bindet.

1.5 Fragestellung

Das induzierbare Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) spielt aufgrund seiner Schrittmacherfunktion bei der Prostaglandinbiosynthese eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen und wird darüberhinaus mit der Entstehung und Entwicklung verschiedener Krebsformen in Zusammenhang gebracht. UVB- sowie UVA-Strahlung führt in menschlichen Keratinozyten zur Induktion der COX-2-Expression. Zwar befassen sich zahlreiche Untersuchungen mit der transkriptionellen Regulation der COX-2-Synthese (z.B. Tang et al., 2001b) und einige wenige mit der UVB-induzierten Modulation auf posttranskriptioneller Ebene, doch sind die Mechanismen dieser Regulation noch nicht erschöpfend geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der molekulare Mechanismus der Induktion der COX-2-Bildung durch UVB in menschlichen HaCaT-Keratinozyten untersucht. Dabei sollte geklärt werden,

- 1.) welche Bedeutung die durch UV-Strahlung aktivierte Kinase p38^{MAPK} für die UVB-induzierte Stimulation der Expression der COX-2 hat,
- 2.) ob mRNA bindende Proteine wie HuR oder hnRNP A0 an der UVB-induzierten Stimulation der COX-2-Bildung beteiligt sind,
- 3.) inwiefern bekanntermaßen durch UV-Strahlung aktivierbare zelluläre Rezeptorsysteme (EGF-Rezeptor, Ah-Rezeptor) die Induktion der COX-2 modulieren.

2 Material und Methoden

Zur Herstellung der verwendeten Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q- bzw. Direct-Q[®] UV-Anlage (Millipore, Eschborn) benutzt. Alle nicht aufgeführten Geräte entsprachen den allgemeinen Laborstandards. Bei den Einmalgebrauchsmaterialien der Zellkultur handelte es sich um solche der Fa. Greiner Bio-One (Frickenhausen).

2.1 Zellkultur

2.1.1 Anzucht von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien untersucht. Diese sind in **Tab 2.1** aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Name der Zelllinie	Beschreibung	Referenz/Bezugsquelle
HaCaT	immortalisierte humane Keratinozyten aus der distalen Peripherie eines Melanoms	Prof. P. Boukamp, Heidelberg, über P. Brenneisen und E. Fritsche, Düsseldorf (Boukamp et al., 1988)
HaCaT VSV-G	stabil mit pCLIP.THPC (Leervektor) transfizierte HaCaT-Zellen, geneticinresistent	E. Fritsche, Düsseldorf (Fritsche et al., 2007)
HaCaT EM140 N3	stabil mit pCLIP.THPC transfizierte HaCaT-Zellen mit nicht depletierender shRNA-Sequenz	E. Fritsche, Düsseldorf (Fritsche et al., 2007)
HaCaT VSV-G N1 (AhR-KO-HaCaT)	stabil mit pCLIP.THPC transfizierte HaCaT-Zellen mit AhR-gerichteter shRNA-Sequenz	E. Fritsche, Düsseldorf (Fritsche et al., 2007)
HFFF2	humane fötale Vorhautfibroblasten	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC-Nr.: 86031405)
HeLa	humane Cervixepithel-Karzinomzellen	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (ECACC-Nr.: 93021013)

Zum Waschen kultivierter Zellen wurde PBS (*Phosphate buffered saline*) der Zusammensetzung 140 mM NaCl; 11,5 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4 verwendet.

HaCaT-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 g Glucose/l (PAA), das mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (PAA), 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAXTM-I) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) und Penicillin/Streptomycin (100 Units/ml bzw. 0,1 mg/ml) (PAA) supplementiert war (Komplettmedium), in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert.

Zum Passagieren und zur Aussaat auf Kulturschalen wurden die Zellen nach Erreichen einer 90-100 %-igen Konfluenz mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (PAA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach ca. 10 Minuten mit Komplettmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in entsprechender Verdünnung auf Kulturflaschen und -schalen überführt.

Die Anzucht von AhR-KO-HaCaT-Zellen und der dazugehörigen Kontrollzellen HaCaT VSV-G und EM140 N3 erfolgte entsprechend. Zudem wurden dem Komplettmedium 150 mg/l Geneticin (G-418; Roche, Basel, Schweiz) zur Selektion hinzugefügt. HFFF2- und HeLa-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie HaCaT-Zellen. Die Trypsinierung wurde hingegen in ca. 5 Minuten vorgenommen.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s. **Kap. 2.1.1**) wurde die Zellsuspension zentrifugiert, das Zellpellet in Einfriermedium (Komplettmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in speziellen Kryogefäßen (Greiner) bei -80 °C eingefroren. Dabei wurden die Zellen einer 175 cm²-Kulturflasche jeweils auf 4 Kryogefäße aufgeteilt.

Eingefrorene Zellen wurden aufgetaut und umgehend in eine 75 cm²-Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde nach 2 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.1.3 UVB-Bestrahlung von Zellen

Zur Bestrahlung wurden die auf Kulturschalen ausgesäten zu ca. 90 % konfluenten Zellen 24 Stunden zuvor mit PBS gewaschen und in Kompletmedium ohne FCS inkubiert (Serumdepletion). Am nächsten Tag wurden nach Waschen mit PBS die Zellen mit PBS bedeckt und mit einer Lampe aus 4 TL20W/12RS-UV-Röhren (Philips, Eindhoven, Niederlande) bestrahlt, welche den größten Teil ihrer Energie im UVB-Bereich ($\lambda = 280\text{-}320\text{ nm}$) emittieren und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 310\text{ nm}$ aufweisen. Das Spektrum der Röhren ist in **Abb. 2.1** gezeigt.

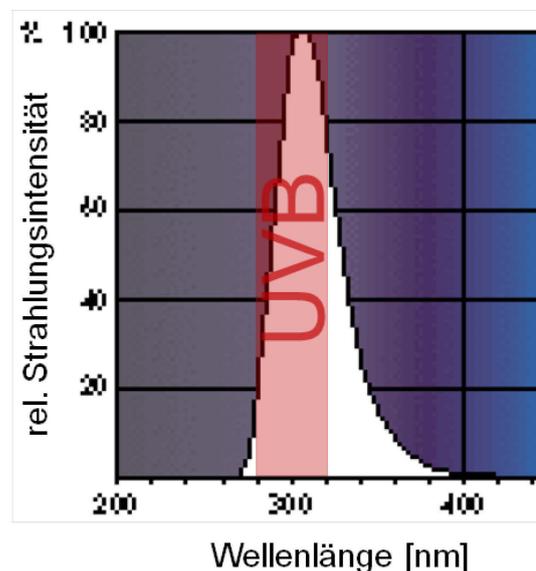


Abb. 2.1: Spektrum der TL20W/12RS-UV-Röhren. Rot markiert der UVB-Bereich ($\lambda = 280\text{-}320\text{ nm}$). Anmerkung zum UVA-Anteil der Lampe ($\lambda = 320\text{-}400\text{ nm}$): Eine UVA-Dosis von 30 J/cm^2 entspricht vom Ausmaß ihrer physiologischen Wirkung her in etwa einer UVB-Dosis von 100 J/m^2 (Faktor 3000). In Anbetracht dessen ist der Anteil der mitemittierten UVA-Strahlung an den hier nach UVB-Bestrahlung untersuchten Prozessen wohl vernachlässigbar. (Quelle: modifiziert aus Datenblatt des Herstellers)

Nach Verbleib unter der Lampe für eine der gewählten Dosis entsprechende Zeit wurden die Zellen in Kompletmedium ohne FCS bis zu ihrer Lyse nach Waschen mit PBS belassen.

Die Strahlungsintensität der Lampe wurde regelmäßig mit einem UV-Meter des Typs 585 200 000 (Waldmann, Villingen-Schwenningen) ermittelt und die für eine bestimmte Dosis benötigte Expositionszeit nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Expositionszeit [s]} = \text{Dosis [J/m}^2\text{]} / (10 \times \text{Strahlungsintensität (TL01-Wert) [mW/cm}^2\text{]})$$

In der TL01-Einstellung misst das UV-Meter die Strahlungsintensität im Wellenlängenbereich 310-315 nm (Schmalband). Die zur Berechnung verwendete Strahlungsintensität wurde durch Mittelwertbildung gleichmäßig verteilter Messpunkte im inneren Strahlungsfeld der Lampe ermittelt, wobei weitestgehende Homogenität und Konstanz des Strahlungsfeldes festgestellt werden konnte. Das verwendete UV-Meter wies für Messwerte im UVB-Bereich eine Toleranz von ca. $\pm 10\%$ (Herstellerangaben) auf.

2.1.4 MTT-Test

(Viabilitätsbestimmung)

Die auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesäten und zu ca. 90 % konfluenten HaCaT-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosisreihen (s. **Kap.2.1.3**) je mit 100 μ l MTT-Lösung versetzt. Nach 2-4 Stunden (0-2 Stunden: MTT-Konzentration steigt steil an, danach nur noch flach) im Inkubator wurde je 1 ml Stopplösung hinzugefügt. Die aus MTT in lebenden Zellen reduktiv gebildeten violetten Formazan-Kristalle wurden gründlich suspendiert und, wenn möglich, gelöst. Die erhaltenen Lösungen/Suspensionen wurden gegebenenfalls noch soweit mit Isopropanol (p.a.) verdünnt, bis alle Kristalle in Lösung gingen und Absorptionswerte im linearen Messbereich des UV-VIS-Spektrometers ermittelt werden konnten. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Als Leerwert wurde eine parallel behandelte, jedoch zellfreie Kulturschale verwendet. Die berechneten Wellenlängendifferenzen (evtl. korrigiert um den Verdünnungsfaktor) wurden auf den Wert unbestrahlter Zellen normiert und als Viabilität bezeichnet.

MTT-Lösung

5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-
tetrazoliumbromid in PBS

Stopplösung

0,04 M HCl in Isopropanol

2.1.5 UVA-Bestrahlung von HeLa-Zellen

Am Abend vor der Bestrahlung wurden die auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesäten 80-100 % konfluenten HeLa-Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht serumdepletiert, d.h. in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte gegebenenfalls 1 Stunde vor Bestrahlung eine Präinkubation mit 100 μM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder mit PBS, Dulbecco's PBS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) (wie PBS, s. **Kap. 2.1.1**, mit zusätzlich ca. 0,9 mM Ca^{2+}) oder phenolrot- und serumfreiem DMEM (Sigma-Aldrich) bedeckt, mittels einer UVA 700-Lampe (Waldmann, Villingen-Schwenningen) einer UVA-Dosis von 30 J/cm^2 ausgesetzt und sodann umgehend in 2x Laemmli-Probenpuffer (s. **Kap. 2.2.2** für entsprechenden 4x Puffer) bei Raumtemperatur lysiert. Diese Lysate wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und vor der SDS-PAGE (s. **Kap. 2.2.2**) 5 Minuten bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ aufgeköcht.

Die verwendete UVA 700-Lampe weist ein Strahlungsspektrum im Bereich von $\lambda = 320\text{-}450$ nm mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 365$ nm (UVA-1-Bereich) auf. Um eine homogene UVA-Exposition der HeLa-Zellen zu gewährleisten, wurde ein motorbetriebener Drehteller als Unterlage für die Kulturschalen bei der Bestrahlung verwendet. Es wurde der Abstand der Lampe zu diesem Drehteller so justiert, dass eine mittlere Strahlungsintensität zwischen 40 und 44 mW/cm^2 gemessen wurde.

2.1.6 Bengalrosa/Weißlicht-Behandlung

(Erzeugung von Singulett-Sauerstoff)

Auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm ausgesäte zu 80-100% konfluente HeLa-Zellen wurden über Nacht serumdepletiert. Die Zellen wurden gegebenenfalls mit 100 μM Na_3VO_4 für 1 Stunde präinkubiert, sodann zweimal mit PBS gewaschen, mit 300 nM Bengalrosa in PBS versetzt und für 10 Minuten mit einer kommerziell erhältlichen 500 W-Halogenlampe aus einer Distanz von 70 cm bestrahlt. Es schloss sich gegebenenfalls eine weitere Inkubation mit 100 ng/ml EGF für 15 Minuten an. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 2x Laemmli-Probenpuffer (vgl. **Kap. 2.2.2**) lysiert Die Lysate wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt und vor der SDS-PAGE (s. **Kap. 2.2.2**) 5 Minuten bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt.

2.1.7 Stimulation mit EGF oder Liganden des Ah-Rezeptors

Die zu ca. 90 % konfluenten Zellen wurden 24 Stunden vor Behandlung serumdepletiert (HeLa-Zellen nur über Nacht). Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF; R&D Systems, Minneaapolis, USA) wurde stets in einer Endkonzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Als Kontrolle dienten dabei 10 mM Essigsäure + 0,1 % (w/v) BSA (jeweils in der EGF-Stammlösung enthalten). Als Liganden des AhR-Rezeptors wurden 100 nM 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) und 1 oder 10 µM 3-Methylcholanthren (3-MC) (jeweils finale Konzentrationen, Stammlösungen in DMSO) verwendet. Die AhR-Liganden wurden freundlicherweise von Dr. E. Fritsche, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Inkubiert wurde jeweils in Kompletmedium ohne FCS und zwar im Falle von EGF, sofern nicht anders vermerkt, für 5 Minuten und im Falle der AhR-Liganden bis zur Lyse. HeLa-Zellen wurden gegebenenfalls auch mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) einer Endkonzentration von 125 µM in phenolrot- und serumfreiem DMEM (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten inkubiert.

2.1.8 Verwendung von Inhibitoren

Um den Einfluss der Inhibitoren SB202190 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Leptomycin B (Calbiochem, Schwalbach), Genistein (Sigma-Aldrich), AG1478 (Calbiochem), U0126 (Calbiochem), Staurosporin (Calbiochem), Bisindolylmaleimid I (Calbiochem) zu untersuchen, wurden die Zellen für mindestens 30 Minuten mit dem entsprechenden Inhibitor in Kompletmedium ohne FCS präinkubiert. Nach der jeweiligen Behandlung erfolgte bis zum Zeitpunkt der Lyse eine Postinkubation mit dem entsprechend konditionierten, d.h. schon für die Präinkubation verwendeten, Medium.

2.1.9 Proteindepletion mittels siRNA

Die Transfektion von Zellen mit einer bestimmten synthetischen siRNA (*small interfering RNA*) führt dazu, dass die mRNA ihres Zielgens abgebaut und somit eine Verringerung in der Menge des entsprechenden Proteins erreicht wird. Der Anti-Sense-Strang dieser kleinen doppelsträngigen RNAs wird in der Zelle in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. RISC, mit seiner Helikase- und Nuklease-Aktivität, bindet dann an die dazugehörige komplementäre Ziel-mRNA. In der Folge kommt es zum raschen Abbau der mRNA durch den RISC-Komplex und intrazelluläre Nukleasen.

Es wurden 125.000 HaCaT-Zellen je Kulturschale mit 6 cm Durchmesser ausgesät (morgens). Das Auszählen der Zellen erfolgte dabei mittels einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld) Das für eine bestimmte Zellzahl benötigte Volumen wurde dabei wie folgt ermittelt:

$$\text{Volumen [ml]} = \text{Zellzahl} / (2.500 \times \text{Summe der Zellen der 4 Eckquadrate})$$

Abends, ca. 32 Stunden später, und bei einer Konfluenz von ca. 25 % wurde mit PBS gewaschen und mit je 1 ml OptiMEM[®] I + GlutaMAX[™]-I (Gibco) versetzt. Es wurde sodann je 1 ml Transfektionsmischung tropfenweise hinzugegeben. Diese wies folgende Zusammensetzung auf:

1000	μl	OptiMEM [®] I + GlutaMAX [™] -I	
20	μl	Oligofectamine [™] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)	
15	μl	siRNA (20 μM; Qiagen), d.h. 150 nM final (s. Tab 2.2)	oder
4	μl	siRNA (insg. 20 μM; Dharmacon), d.h. insg. 40 nM final (s. Tab. 2.2)	oder
		keine siRNA	

und wurde zuvor nach gründlichem Mischen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In **Tab. 2.2** sind die benutzten spezifischen siRNAs (Qiagen, Hilden; Dharmacon, Lafayette, USA) sowie die zugehörigen Kontroll-siRNAs aufgeführt und beschrieben. Zudem ist jeweils die Sequenz ihres Sense-Strangs wiedergegeben.

Tab.2.2: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs. (alle mit humanen Zielsequenzen)

Bezeichnung (Quelle)	Beschreibung	Sense-Sequenz(en) (5'→3')
Ktrl. (Qiagen)	nicht depletierende Kontrollsequenz	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UUU
HuR#1 (Qiagen)	Sequenz im kodierenden Bereich von HuR	GAG GCA AUU ACC AGU UUC A
HuR#2 (Qiagen)	Sequenz im 3'-UTR-Bereich von HuR	UCU UAA GUU UCG UAA GUU A
Ktrl. (Dharmacon)	nicht depletierende Kontrollsequenz	UGG UUU ACA UGU CGA CUA A

hnRNP A0 (Dharmacon)	Mischung aus vier verschiedenen Sequenzen in hnRNP A0	1 GAG GAU AUC UAC UCC GGU G 2 GAU UCG GCU UCG UGU AUU U 3 CCG AGA UUA UUG CCG ACA A 4 GUG GGA GCG ACU ACG GUA A
----------------------	---	--

Am nächsten Morgen (nach 12-16 Stunden) wurde je 1,5 ml Komplettmedium dazugegeben und am Abend (nach ca. 24 Stunden) nach Waschen mit PBS mit Komplettmedium versetzt. Am Morgen darauf, ca. 24 Stunden vor der Behandlung, wurden die Zellen serumdepletiert. Die Lyse der Zellen nach den entsprechenden Experimenten erfolgte schließlich am nächsten Tag abends, also ca. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion.

2.1.10 Transfektion mit Luciferase-Reportergen-Plasmiden

Es wurde entweder mit 0,75 µg des Plasmids pGL3 oder 0,75 µg des Plasmids pGL3-COX-2P (**Abb. 2.2**) und jeweils 0,1 µg des Plasmids pRL-SV40 (Renilla-Konstrukt) pro Kulturschale mit 3,5 cm Durchmesser mit 50 % konfluenten HaCaT-Zellen transfiziert (s. **Tab. 2.3**). Als Transfektionsreagenz wurde SuperFect[®] (Qiagen) verwendet. Dabei wurde nach Versetzen von 100 µl serumfreiem, nicht supplementiertem Medium (vgl. **Kap. 2.1.1**) noch mit 4,25 µl Transfektionsreagenz vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

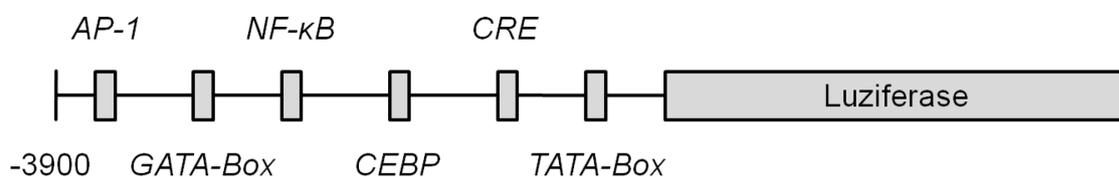


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des verwendeten Luciferase-Reportergen-Konstruktes. Aufgeführt sind die Bindestellen von Transkriptionsfaktoren auf der Promotorsequenz der Cyclooxygenase-2.

Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit je 1,9 ml Komplettmedium ohne FCS versetzt, und die Transfektionsmischung wurde tropfenweise hinzugegeben. Nach ca. 24 Stunden wurde UVB-bestrahlt und nach weiteren 16 Stunden und Waschen mit PBS mit je 100 µl 1x PLB (*passive lysis buffer*) (aus dem Kit) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte mittels Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Madison, USA) gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung eines Microplate Luminometer LB 96 V-Injektors (EG&G Berthold, Bad Wildbad)

Tab. 2.3.: Liste der benutzten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle/Referenz
pGL3	kodiert <i>Photinus pyralis</i> -Luziferase, Amp- Resistenz	Promega, Madison, USA
pGL3-COX-2P	kodiert <i>Photinus pyralis</i> -Luziferase durch COX-2-Promotor reguliert, Amp-Resistenz	J. Pfeilschifter, Frankfurt a. M. (Doller et al., 2008)
pRL-SV40	kodiert <i>Renilla reniformis</i> -Luziferase durch SV40-Promotor reguliert, Amp-Resistenz	Promega, Madison, USA

2.2 Proteinanalytik

2.2.1 Protein-Quantifizierung

Proteine wurden nach Lowry et al. (1951) quantifiziert. Dazu wurden die mit 0,5%-iger wässriger SDS-Lösung auf Eis erzeugten und bei -20 °C aufbewahrten Zelllysate zunächst sonifiziert und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, 4 °C) von Zelltrümmern bereinigt. Bei der folgenden Quantifizierung der Proteinkonzentrationen fand die Methode nach Lowry Verwendung, und zwar in Form des D_c Protein-Assays (Bio-Rad, Hercules, USA) in 96-well-Platten nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die Absorption bei $\lambda = 630 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{max.}} = 750 \text{ nm}$) in einem MRX ELISA-Reader (Dynex Technologies, Berlin) bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus dieser Absorption wurde mittels der bei jeder Messung mit BSA-Standardlösungen (0-5 mg/ml in 0,5 mg/ml-Schritten) erzeugten Eichgeraden ermöglicht. In der Regel wurden je Probe 20 µg Gesamt-Protein mit 4x Laemmli-

Probenpuffer verdünnt und in die SDS-PAGE eingesetzt (für Untersuchungen zur Cyclooxygenase-2: 30 µg). Eine solche, soeben beschriebene Protein-Quantifizierung wurde für die Westernblot-Analysen (s. **Kap. 2.2.2** bis **2.2.4**) aller Experimente mit HaCaT-, HaCaT-AhR-KO- und HFFF2-Zellen nicht aber im Falle von HeLa-Zellen vorgenommen.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde ein diskontinuierliches Gelelektrophorese-System nach Laemmli bestehend aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proteine und einem Trenngel zur Auftrennung dieser verwendet. Bei der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) liegen die aufzutrennenden Proteine aufgrund von Komplexbildung mit SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert und proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ geladen vor. Ihre elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit durch die Maschen des Polyacrylamidnetzes wird daher lediglich durch ihr Molekulargewicht bestimmt.

Nach Aufkochen der Proben in Laemmli-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock wurden diese zusammen mit 7 µl Dual Color-Protein-Größenstandard (Bio-Rad, #161-0374) aufgetragen. Als Positivkontrolle für COX-2 wurde Lysat unstimulierter HCA-7-Zellen eingesetzt. Die Elektrophorese wurde vertikal mit einer Novex Mini Cell-Apparatur (Invitrogen, Carlsbad, USA) in SDS-PAGE-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel (im Sammelgel) bzw. 35 mA (im Trenngel) durchgeführt.

4x Laemmli-Probenpuffer

250	mM	Tris-HCl (pH 8)
20 %	(w/v)	Glycerol
5 %	(w/v)	SDS
0,01 %	(w/v)	Bromphenolblau
100	mM	DTT (Dithiothreitol)

SDS-PAGE-Laufpuffer (pH 8,3)

50	mM	Tris
383	mM	Glycin
0,1 %	(w/v)	SDS

Trenngel, 10 % (w/v) Acrylamid

27 %	(v/v)	bidest. H ₂ O
40 %	(v/v)	Lsg. #1
33 %	(v/v)	Lsg. #3
0,025 %	(v/v)	TEMED (Tetramethyldiamin)
0,31 %	(v/v)	APS

Sammelgel, 5 % (w/v) Acrylamid

62 %	(v/v)	bidest. H ₂ O
20 %	(v/v)	Lsg. #2
17 %	(v/v)	Lsg. #3
0,067 %	(v/v)	TEMED
0,83 %	(v/v)	APS

Lsg. #1 (Laufpuffer) (2,5x)

1,87	M	Tris-Phosphorsäure (pH 8,9)
0,25 %	(w/v)	SDS

Lsg. #2 (Sammelgelpuffer) (5x)

300	mM	Tris-Phosphorsäure (pH 6,7)
0,5 %	(w/v)	SDS

Lsg. #3 (Acrylamid-Stammlösung) (Roth, Karlsruhe)

30 %	(w/v)	Acrylamid
0,8 %	(w/v)	N,N'-Methylenbisacrylamid

APS

10 %	(w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
------	-------	------------------------

2.2.3 Western-Blot

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine von SDS-Polyacrylamidgelen (s. **Kap. 2.2.2**) auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen kamen Novex Mini Cell-Tank-Blot-Apparaturen (Invitrogen) zum Einsatz. Desweiteren wurden Gel-Blotting-Papiere (Roth) und HybondTM-P

PVDF-Membranen (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, UK) in den Maßen des Trenngels (9 x 7 cm) benötigt. Die Blotting-Papiere und entsprechende Schwämme wurden mindestens 15 Minuten in Blot-Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membranen wurden für 20 s mit Methanol (p.a.) versetzt und sodann für mindestens 30 Minuten vor dem Blotten in Transferpuffer belassen.

Das Zusammensetzen einer Tank-Blot-Kassette wurde dann wie folgt vorgenommen:

Kathode → 2 Schwämme → 1 Blotting-Papier → Trenngel #1 → Membran #1 → 1 Blotting-Papier → (1 Schwamm → 1 Blotting-Papier → Trenngel #2 → Membran #2 → 1 Blotting-Papier →) ausreichend Schwämme → Anode.

Beim Aufbau wurde insbesondere darauf geachtet, dass die PVDF-Membran luftblasenfrei auf dem Gel positioniert wurde. Um eventuell verbliebene Luftblasen zu entfernen, wurde zudem die zusammengesetzte, mit Transferpuffer befüllte Tank-Blot-Apparatur wiederholt auf den Labortisch geklopft. Der Elektrotransfer der Proteine wurde für 3 Stunden bei 25 V Spannung oder über Nacht bei 12 V durchgeführt.

Blot-Transferpuffer (pH 8,5)

25	mM	Tris
192	mM	Glycin
20 %	(v/v)	Methanol

2.2.4 Immunodetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die PVDF-Membranen wurden nach dem Tank-Blotting für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C mit 5 % (w/v) MMP (Magermilchpulver), 5 % (w/v) BSA (Rinderserumalbumin) (für hnRNP A0-Antikörper) oder 3 % BSA (für Phospho-Tyrosin-Antikörper) in TBS-T-Puffer geblockt. Zunächst wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C oder im Falle des α -Tubulin-, GAPDH- oder HuR-Antikörpers alternativ auch für 3 Stunden bei Raumtemperatur mit verdünntem primären Antikörper (s. **Tab. 2.4**) inkubiert. Um unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde dreimal ca. 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper-HRP-Konjugat (s. **Tab. 2.4**) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBS-T-Puffer (3-4x ca. 10 min) wurde das auf

der Membran nachzuweisende Protein über die Aktivität der an den Sekundärantikörper gebundenen HRP (Meerrettich-Peroxidase) detektiert. Hierzu fand das ECL-System SuperSignal[®] West Pico (Pierce, Rockford, USA) Anwendung. Im Falle der Cyclooxygenase-2 wurde hingegen SuperSignal[®] West Femto (Pierce) benutzt. Der Gebrauch erfolgte jeweils nach den Herstellerangaben, die Dokumentation über die Exposition von Hyperfilm[™] ECL Chemilunineszenz-Filmen (Amersham) in entsprechenden Kassetten.

TBS-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl

TBS-T-Puffer

0,1 % (v/v) Tween-20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat) in TBS-Puffer

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit benötigte Antikörper. (alle in TBS-T verdünnt) Die primären und sekundären Antikörper wurden bei Cayman (Ann Arbor, USA), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Chemicon (Temecula, USA), Cell Signaling Technology (Beverly, USA), Santa Cruz (Heidelberg), Abcam (Cambridge, USA), Upstate (Lake Placid, USA), Biosource (Karlsruhe), Amersham (Piscataway, USA) und Dianova (Hamburg) erworben. Soweit nicht hinter der Verdünnung des Primärantikörpers in Klammern vermerkt, wurden die Sekundärantikörper so verwendet wie bei ihnen vermerkt. AK: Antikörper, MMP: Magermilchpulver, BSA: Rinderserumalbumin.

Primärer AK gegen	Hersteller/Spezies	Reaktionsbedingungen
COX-2	Cayman (#160112)/Maus	1:1000 in 5 % MMP (sek. AK: 1 % MMP)
α -Tubulin	Sigma-Aldrich (#T-5168)/Maus	1:3000 in 1% MMP
GAPDH	Chemicon (#MAB374)/Maus	1:16.000 in 5 % MMP
Phospho-p38 ^{MAPK} (T180/Y182)	Cell Signaling (#9211)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP (sek. AK: nur TBS-T)
hnRNP A0	Santa Cruz (#sc-38258)/Ziege	1:500 in 5 % MMP
HuR	Santa Cruz (#sc-5261)/Maus	1:1000 in 5 % MMP
HDAC1	Santa Cruz (#sc-7872)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP (sek. AK: nur TBS-T)
β -Catenin	Abcam (#ab16051)/Kaninchen	1:4000 in 5 % MMP

Phospho-Tyrosin	Upstate (#05-321)/Maus	1:1000 in 3 % BSA (sek. AK: 3 % BSA)
Total-EGFR	Cell Signaling (#2232)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y845)	Cell Signaling (#2231)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y992)	Cell Signaling (#2235)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y1045)	Cell Signaling (#2237)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y1068)	Cell Signaling (#2234)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y1086)	Biosource (#44-790)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y1148)	Biosource (#44-792)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Phospho-EGFR (Y1173)	Biosource (#44-794)/Kaninchen	1:1000 in 5 % MMP
Total-ERK 1/2	Cell Signaling (#9102)/Kaninchen	1:1000 in 5 % BSA (sek. AK: nur TBS-T)
Phospho-ERK 1/2 (T185/Y187)	Cell Signaling (#9101)/Kaninchen	1:1000 in % BSA (sek. AK: nur TBS-T)
Sekundärer AK gegen		
Anti-Maus	Amersham (#NA931V)/Schaf	1:5000
Anti-Kaninchen	Dianova (#111-035-144)/Ziege	1:4000 in 5 % MMP
Anti-Ziege	Santa Cruz (#sc-2020)/Esel	1:2000 in 1% MMP

2.2.5 „Strippen“ von PVDF-Membranen

(Entfernen von gebundenen Antikörpern)

Die von gebundenen Antikörpern zu reinigenden Membranen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde dreimal für ca. 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und erneut geblockt (s. **Kap. 2.2.4**).

Stripping-Puffer

25 mM Glycin-HCl (pH 2)
1 % (w/v) SDS

2.2.6 Subzelluläre Proteom-Extraktion

Es wurde das ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction-Kit (S-PEK) (Calbiochem, Schwalbach, #539790) den Angaben des Herstellers entsprechend verwendet. Auf diese Weise war es möglich, Proteinfractionen folgender subzellulärer Kompartimente zu gewinnen: 1. Zytosol, 2. Membranen und Organellen, 3. Kern und 4. Zytoskelett. Das Prinzip der Fraktionierung bestand dabei in der Nutzbarmachung der differentiellen Löslichkeit von Proteinen unterschiedlicher Zellkompartimente durch die Verwendung verschiedene Detergenzien enthaltener Extraktionspuffer. Die Fraktionen wurden bei -80 °C aufbewahrt und vor dem Einsatz in die SDS-PAGE sonifiziert. Die Fraktionen (2) und (4) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

2.2.7 Immunpräzipitation (IP) auf EGFR

Die auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 9,4 cm ausgesäten zu 90 % konfluenten HaCaT-Zellen wurden für 24 Stunden serumdepletiert, mit PBS gewaschen, mit PBS bedeckt und UVB-bestrahlt bzw. scheinbestrahlt. Anschließend wurde in Komplettmedium ohne FCS für 30 Minuten im Inkubator belassen. Alternativ wurde mit EGF behandelt, indem das Medium entfernt und gegen EGF-haltiges, ebenfalls serumfreies ersetzt und 30 Minuten inkubiert wurde. Nach Absaugen des Mediums wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen und jeweils mit 250 µl IP-Lyispuffer (kalt) versetzt. Die Zellen wurden auf Eis abgeschabt, in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -80 °C über Nacht eingefroren. Die wiederaufgetauten Lysate wurden dann nach Vortexen durch Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm, 4 °C) von Zelltrümmern gereinigt und einer Protein-Quantifizierung nach Lowry unterzogen (s. **Kap. 2.2.1**). Je 200 µg Gesamt-Protein wurden sodann in Mikroreaktionsgefäßen mit IP-Lyispuffer (kalt) auf gleiches Volumen gebracht und mit je 2 µg EGFR-Antikörper (Santa Cruz; #sc-03) bzw. Luziferase-Antikörper (Sigma, #L-0159) als Negativ-Kontrolle 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 20 µl Protein A-Agarose-Suspension (Upstate) in IP-Lyispuffer wurde über Nacht im Überkopffrotator bei 4°C durchmischt. Die Beads wurden anschließend abzentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, 4°C) und einmal mit IP-Lyispuffer und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese in je 100 µl 4x Laemmli-Probenpuffer (s. **Kap. 2.2.2**) wiederaufgenommen, für 5 Minuten im Heizblock aufgeköcht (95 °C) und auf Eis abgeschreckt. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 Minute wurden die Überstände in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Jeweils 50 µl

dieser Überstände wurden dann in die SDS-PAGE mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis (s. **Kap. 2.2.2** bis **2.2.4**) eingesetzt.

IP-Lysispuffer

20	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	mM	EGTA
1 %	(w/v)	Triton X-100
2,5	mM	Na-Pyrophosphat
1	mM	β -Glycerophosphat
1	mM	Na-Orthovanadat

frisch hinzugegeben:

1	μ g/ml	Leupeptin
1	mM	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
1	μ g/ml	Aprotinin

2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Kompetitiver ELISA auf Prostaglandin E₂

Es wurde das Prostaglandin E₂ EIA-Kit in der Strip Plate-Version (Cayman, Ann Arbor, USA, #514010) gemäß den Angaben des Herstellers zur Detektion von PGE₂ in HaCaT-Zellüberständen benutzt. Die Überstände wurden dabei 1:10 mit serumfreiem Komplettmedium verdünnt eingesetzt.

Sandwich-ELISA auf Total- und Phospho-ERK 1/2 (T185/Y187)

Es wurden die Immunoassay-Kits ERK1/2 (Total) (Biosource, Karlsruhe; #KHO0081) und ERK1/2* [pTpY185/187] (Biosource, #KHO0091) entsprechend den Herstellerangaben zur Detektion der entsprechenden Proteinspiegel in HeLa-Zellen verwendet. Die Zelllysate wurden zu diesem Zwecke 1:50 verdünnt eingesetzt.

2.2.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfärbung von HuR

HaCaT-Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm auf runden Objektgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % für 24 Stunden serumdepletiert. Nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB wurden die Zellen für die gewünschte Zeit im Inkubator belassen und nach zweimaligem Waschen mit PBS (vollständiges Entfernen nach dem zweiten Waschschrift) unter langsamem Schwenken mit 1 ml 4 % Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Alle nun folgenden Inkubations- und Waschschriffe wurden aus Gründen der mechanischen Empfindlichkeit der fixierten Zellen bei vorsichtigem Schwenken durchgeführt. Die Fixierungen wurden dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und in PBS bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu mehreren Tagen aufbewahrt. Es wurde sodann mit 3 % (w/v) ZNS (Ziegennormalserum) + 0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS für ein 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $400 \mu\text{l}$ HuR-Antikörper (Santa Cruz, #sc-5261/Maus), 1:250 verdünnt in 1 % ZNS in PBS, inkubiert. Hingegen wurde eine Kontrolle für die Spezifität des verwendeten Sekundäntikörpers bei der untersuchten Zelllinie lediglich in PBS belassen. Danach wurde dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $400 \mu\text{l}$ des fluoreszenzmarkierten Alexa Fluor[®] 488 Anti-Maus-Antikörpers (Invitrogen, #A11001) 1:500 in PBS verdünnt, versetzt. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 Minuten mit PBS wurden die Objektgläschen mit den fixierten und immunmarkierten Zellen mittels Pro Long[®] Gold anti fade reagent with DAPI (Invitrogen) auf Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden bei 1000-facher Vergrößerung unter einem BX60-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) betrachtet.

Immunfärbung von EGFR und Phospho-Tyrosin

HaCaT-Zellen wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm auf runden Objektgläschen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 % für 24 Stunden serumdepletiert. Nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB oder Inkubation mit 100 ng/ml EGF für 15 Minuten wurden die Zellen für die gewünschte Zeit im Inkubator belassen und nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS, mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es wurde dann dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit eiskaltem Methanol für 10 Minuten bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit der Blocklösung (3 % ZNS + 0,3 % (v/v) Triton X-

100 in PBS) versetzt. Anschließend wurde eine Cofärbung mit den Antikörpern Total-EGFR (Cell Signaling, #2231/Kaninchen) und Phospho-Tyrosin (Upstate, #05-321/Maus) vorgenommen. Dazu wurde in einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:1500 in 1 % ZNS in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit PBS wurde für 1 Stunde bei 37 °C mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor® 546 Ziege-Anti-Kaninchen (Invitrogen, #A-11010) und 488 Ziege-Anti-Maus (#A-11001) in einer Verdünnung von 1:800 bzw. 1500 in PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen für dreimal 15 Minuten mit PBS wurden die Objektgläschen mit den fixierten und immunmarkierten Zellen mittels Pro Long® Gold anti fade reagent with DAPI (Invitrogen) auf Objektträger aufgebracht. Die Proben wurden bei 250-facher Vergrößerung unter einem Observer D1 (Carl Zeiss, Göttingen) oder bei 1000-facher Vergrößerung unter einem BX60-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) betrachtet.

2.3 RNA-Analytik

2.3.1 RNA-Isolation

Isolation mittels Trizol

Nach Waschen mit PBS wurden die auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesäten HaCaT-Zellen mit je 400 µl Trizol-Reagenz (Roth) auf Eis lysiert, abgeschabt, in Mikroreaktionsgefäße überführt und erst einmal bei -80 °C eingefroren. Alternativ wurde unmittelbar mit 1/2 Vol. Chloroform versetzt und nach kräftigem Schütteln für ca. 20 Minuten mit 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in neue Reaktionsgefäße transferiert, die untere, organische verworfen. (Ab diesem Zeitpunkt wurden im weiteren Verlauf stets sterile Mikroreaktionsgefäße und gestopfte Pipettenspitzen verwendet) Zur RNA-Fällung wurde mit 1 Vol. sterilem Isopropanol gemischt und über Nacht oder 1 Stunde bei -30 °C belassen. Nach 45 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit je 1 ml kaltem, sterilem 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 2 Minuten und Verwerfen des Überstandes, wurde noch einmal kurz zentrifugiert und der restliche Ethanol möglichst vollständig abpipettiert. Nach ca. 10 Minuten Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur wurden die Pellets in 20 µl RNase-freiem Wasser gründlich resuspendiert und zum Lösen für 2 Minuten bei 65 °C erhitzt. Es wurde bei -80 °C eingefroren oder direkt mit der RNA-Quantifizierung (s. **Kap. 2.3.2**) begonnen.

Total-RNA und -Protein-Isolation

Es wurde das Kit Nucleo Spin[®] RNA/Protein (Macherey-Nagel, Düren, #740 933.50) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Es wurde jedoch zur Erhöhung der Ausbeute vor der RNA-Elution von der Säule 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C eingefroren oder direkt quantifiziert (s. **Kap. 2.3.2**). Das ausgefällte Proteinpellet wurde abweichend vom Herstellerprotokoll zwecks Protein-Quantifizierung (s. **Kap. 2.2.1**) mit 0,5 % SDS resuspendiert und in die SDS-PAGE eingesetzt (s. **Kap. 2.2.2**)

2.3.2 Quantifizierung von RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben wurde nach geeigneter Verdünnung eine photometrische Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm vorgenommen. Für die Konzentrationsberechnung wurden die erhaltenen Absorptionswerte mit einem Faktor von 40 $\mu\text{g/ml}$ multipliziert und um den Verdünnungsfaktor korrigiert. Zudem wurde die Reinheit der isolierten RNA durch gleichzeitige Messung der Absorption bei 280 nm und Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm bestimmt. Werte unter 1,7 ließen dabei auf Verunreinigungen mit Protein schließen.

2.3.3 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Reverse Transkription (RT)

Es wurde das Omniscript[®] RT-Kit (Qiagen, Hilden, #205113) zur Umschreibung der isolierten Gesamt-RNA in cDNA (*complementary DNA*) verwendet. Hierfür wurden pro 20 μl -Ansatz 1 μg Gesamt-RNA und aus dem Kit RNase-freies Wasser, 1x RT-Puffer, je 500 μM dNTPs und 1 Unit Reverse Transkriptase vermischt. Desweiteren wurden 10 μM Oligodesoxythymidin (dT₁₆, Invitrogen) sowie 1 Unit RNaseOUT[™] RNase-Inhibitor (Invitrogen) hinzugefügt. Sodann wurde für 1 Stunde bei 37 °C im Thermocycler T-Personal (Biometra, Göttingen) inkubiert und die erhaltene cDNA bei 4 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch Polymerase-Kettenreaktion wurden Zielsequenzen auf der erzeugten cDNA exponentiell in einem T-Personal-Thermocycler (Biometra) amplifiziert. Dafür wurden pro 20

μ l-Ansatz 2 μ l RT-Produkt mit doppelt-autoklaviertem bidest. Wasser und mit 1x PCR-Puffer und 1 Unit *Taq*-DNA-Polymerase aus einem Qiagen-Kit (#201205) vereinigt. Außerdem wurden je 200 μ M dNTPs (Amersham) und je 1 (für GAPDH) oder 1,5 μ M (für COX-2) der jeweiligen Primer (10 μ M in 10 mM Tris-HCl pH 8; Invitrogen) zugegeben. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der untenstehenden **Tab 2.5** zu entnehmen. Für COX-2 bzw. GAPDH waren mit den verwendeten Primern PCR-Produkte der Fragmentgrößen 539 bzw. 420 Basenpaare zu erwarten.

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete PCR-Primer.

Primer	Sequenz (5'→3')
5'-COX-2 (CDS)	GCA GTT GTT CCA GAC AAG CA
3'-COX-2 (CDS)	CAG GAT ACA GCT CCA CAG CA
GAPDH sense	GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT
GAPDH antisense	AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG

Die Primer für die Amplifikation der Sequenz aus COX-2 binden im kodierenden Bereich (CDS) der COX-2-cDNA. Die PCRs auf COX-2 und GAPDH wurden nach den in **Tab 2.6** bzw. **2.7** aufgeführten Thermocycler-Programmen durchgeführt:

Tab. 2.6.: PCR-Programm für COX-2 (CDS).

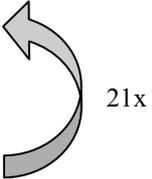
PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
Aktivierung	95,0	2 min
Denaturierung	95,0	30 s
Annealing	60,0	30 s
Elongation	72,0	1 min
Finale Extension	72,0	10 min



30x

Tab. 2.7: PCR-Programm für GAPDH.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
Aktivierung	94,0	2 min
Denaturierung	94,0	30 s
Annealing	60,0	30 s
Elongation	72,0	45 s
Finale Extension	72,0	5 min



2.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen in der netzartigen Struktur von Agarosegelen hängt von ihrer Basenpaarzahl aber auch ihrer Konformation (z.B. bei Plasmiden) ab. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates weist DNA eine zu ihrer Basenpaarzahl proportionale negative Ladung auf und bewegt sich somit Richtung Anode. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse der RT-PCR-Produkte (s. **Kap. 2.3.3**) verwendet.

Zum Gießen der Agarosegele wurde 1,5 % (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) suspendiert und durch Aufkochen mit einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60 °C wurden noch 4 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und emittiert so bei UV-Bestrahlung im sichtbaren Bereich ($\lambda_{\text{max.}} \approx 450$ nm).

Nach Versetzen mit DNA-Probenpuffer wurden die RT-PCR-Produkte in horizontalen, TAE-Puffer befüllten Gelkammern bei 80 V Spannung der Elektrophorese unterzogen. Als Größenstandard wurde GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Zur Dokumentation der Gele diente eine FluoroChem™ 8900-Anlage (Alpha Innotech, San Leandro, USA).

TAE-Puffer (pH 8)

40	mM	Tris
20	mM	Essigsäure
1	mM	EDTA

5x DNA-Probenpuffer

10	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
1	mM	EDTA
30 %	(v/v)	Glycerol
0,25 %	(w/v)	Bromphenolblau

2.4 Densitometrische Auswertung

Zur densitometrischen Auswertung von RT-PCR-Agarosegelen und Chemilumineszenzfilmen fand die Analyse-Funktion „Spot Denso“ des Programms AlphaEaseFC (FluorChem 8900) (Alpha Innotech) Anwendung. Die erhaltenen Werte für COX-2 wurden dabei stets auf die Werte der entsprechenden Ladekontrolle normiert. Die so errechneten Quotienten wurden wiederum auf einen bestimmten Quotienten bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von UVB auf HaCaT-Zellen: Toxizität und Induktion der COX-2-Expression

3.1.1 Toxizität von UVB-Strahlung für HaCaT-Zellen

Zum Zwecke der Bestimmung der für HaCaT-Zellen toxischen UVB-Dosen wurden HaCaT-Keratinocyten mit Dosen bis zu 10.000 J/m^2 bestrahlt. 8 Stunden nach Exposition wurde mittels eines MTT-Tests die Viabilität in Abhängigkeit von der verwendeten UVB-Dosis bestimmt. Wie **Abb. 3.1** zu entnehmen ist, fällt die so ermittelte Viabilität bis zu einer Dosis von ca. 300 J/m^2 recht steil bis auf etwa 60 % ab, dann aber bis zu einer Dosis von 1000 J/m^2 nur noch vergleichsweise schwach auf etwa 50 %. Bei 10.000 J/m^2 beträgt sie schließlich nahezu 0 %. Anzumerken ist hier eine Viabilität 8 Stunden nach Bestrahlung von ca. 90 % bei einer Dosis von 100 J/m^2 .

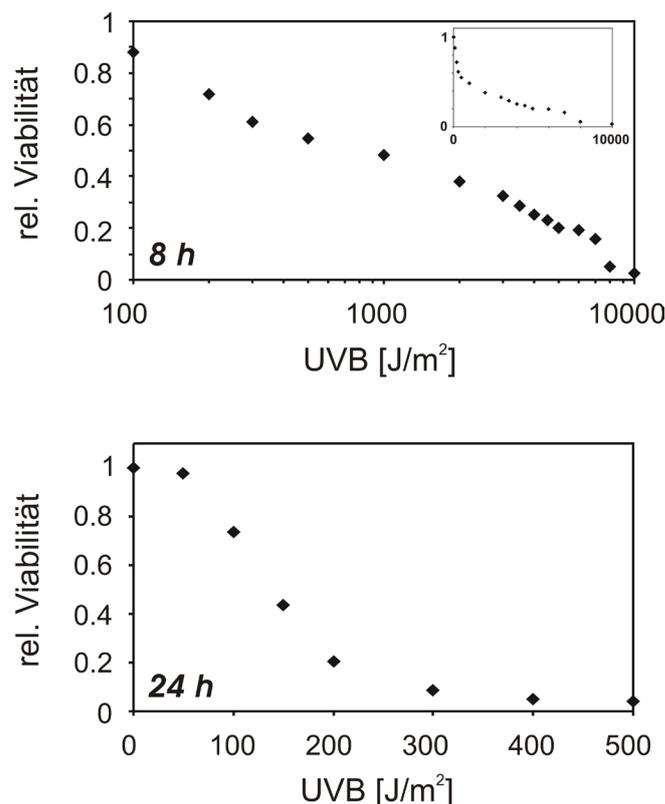


Abb. 3.1: Toxizität von UVB-Strahlung bei HaCaT-Zellen. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit den angegebenen UVB-Dosen durch PBS bestrahlt. Es wurde nach 8 Std. und maximal 10.000 J/m^2 bzw. 24 Std. und maximal 1000 J/m^2 die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die gezeigten Werte sind jeweils Mittelwerte aus 2-4 (8 Std.) bzw. 2 (24 Std.) voneinander unabhängigen Experimenten. Sie sind auf die Viabilität von unbestrahlten Zellen normiert. Die 8 Std.-Werte sind halblogarithmisch dargestellt, im selben Diagramm zudem verkleinert in linearer Darstellung zu sehen.

Weiterhin wurde die Viabilität im betrachteten Dosisbereich zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung, nämlich nach 24 Stunden, bestimmt. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Viabilität bis zu einer Dosis von ca. 300 J/m^2 steil bis zu unter 10 % abfällt. Es kann also vergleichend gesagt werden, dass sowohl 8 als auch 24 Stunden nach UVB-Exposition im Bereich bis 300 J/m^2 eine Erhöhung der Strahlungsdosis um einen bestimmten Betrag den größten negativen Einfluss auf die Integrität der HaCaT-Zellen hat. Zu betonen ist an dieser Stelle wiederum eine Viabilität von immerhin noch ca. 75 % bei einer Dosis von 100 J/m^2 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Bestrahlung. Bereits bei einer Dosis von 500 J/m^2 ist die verbliebene Viabilität mit ca. 5 % hingegen vernachlässigbar.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass 8 bzw. 24 Stunden nach Belastung von HaCaT-Zellen mit UVB einer Dosis von 100 J/m^2 noch ca. 90 % bzw. 75 % der Zellpopulation metabolisch aktiv sind. Diese Dosis wurde für alle nachfolgenden Experimente, sofern nicht anders erwähnt, benutzt.

3.1.2 Charakterisierung der COX-2-Induktion durch UVB in HaCaT-Zellen

Die Charakterisierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Induktion durch UVB in HaCaT-Zellen geschah sowohl auf Ebene der COX-2-mRNA als auch des COX-2-Proteins. Dazu wurde jeweils zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Gesamt-RNA bzw. -Protein isoliert und über RT-PCR bzw. Western-Blotting untersucht. Zu diesem Zwecke wurden die Zellen mit PBS bedeckt und mit einer Dosis von 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen für ca. 24 Stunden serumdepletiert, um nicht durch die im fötalen Kälberserum (FCS) enthaltenen Wachstumsfaktoren eine basal gesteigerte COX-2-Expression hervorzurufen. Aus diesem Grunde wurden die Zellen auch nach der Bestrahlung in serumfreiem Medium gehalten. Soweit nicht anders erwähnt, wurden diese Bestrahlungsbedingungen in allen Experimenten beibehalten. Wie **Abb. 3.2 A** bzw. **B** zu entnehmen ist, führte UVB-Exposition zu einer gegenüber Kontrollbedingungen deutlichen Steigerung nachweisbarer Spiegel von COX-2-mRNA und -Protein. Hingegen erfährt sowohl der GAPDH- als auch der α -Tubulin-Spiegel durch UVB-Bestrahlung keine Änderung.

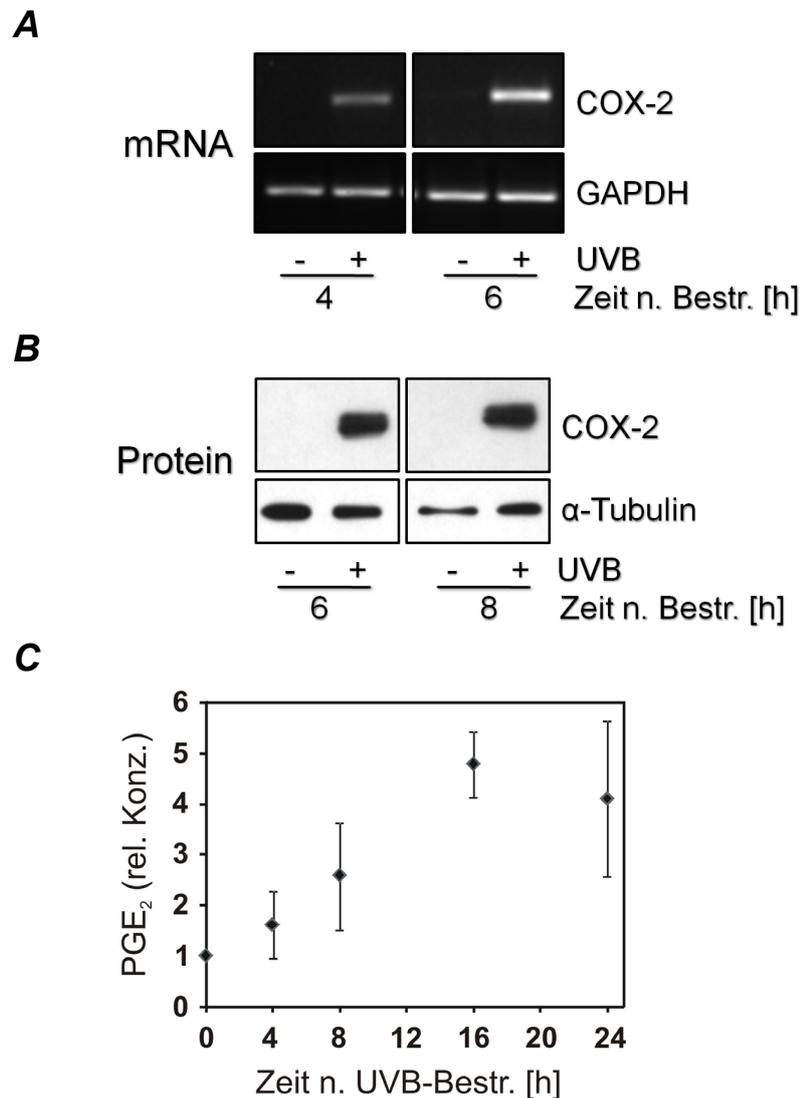


Abb 3.2: Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression in HaCaT-Zellen durch UVB. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Es wurde nach 4 und 6 Std. die Gesamt-RNA isoliert. Gezeigt ist das Ergebnis der reversen Transkription mit anschließender PCR auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle). Das abgebildete Gel ist repräsentativ für 2 (4 Std.) bzw. 5 (6 Std.) voneinander unabhängige Experimente. (B) HaCaT-Zellen wurden wie unter (A) behandelt, 6 bzw. 8 Std. nach Bestrahlung lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für mindestens 5 voneinander unabhängige Versuche. (C) HaCaT-Zellen wurden wie unter (A) behandelt. Zellkulturüberstände wurden nach den angegebenen Zeiten abgenommen und Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Spiegel mittels ELISA analysiert. Zugleich wurde Gesamtprotein zwecks Normalisierung bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Sie sind auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen und auf die PGE₂-Konzentration zum Zeitpunkt 0 nach Bestrahlung normiert.

Um zu zeigen, dass die Änderung der Menge an COX-2-mRNA und -Protein mit einer gesteigerten enzymatischen Aktivität von COX-2 einhergeht, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung die Zellkulturüberstände für eine ELISA-Analyse der PGE₂-Spiegel abgenommen. UVB-Bestrahlung induzierte eine zeitabhängige, bis zu

fünffache Zunahme der PGE₂-Konzentration in den Zellkulturüberständen (**Abb.3.2 C**). Dieses Maximum wurde innerhalb der untersuchten Zeitpunkte bei 16 Stunden nach Bestrahlung erhalten. Die in Zellkulturüberständen gemessenen PGE₂-Konzentrationen lagen dabei im Bereich von 200 bis 1500 pg/ml. Da unmittelbar nach Bestrahlung COX-2 per Western-Blot nicht nachweisbar ist (vgl. **Abb. 3.3 B**), ist die Tatsache, dass auch zum Zeitpunkt Null eine nennenswerte PGE₂-Konzentration gemessen werden konnte mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Aktivität der konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 (COX-1) zurückzuführen.

Zur Festlegung der für weitere Experimente zum molekularen Mechanismus der UVB-induzierten COX-2-Expression geeigneten Bedingungen sollte die Dosisabhängigkeit der COX-2-Induktion durch UVB zu einem festen Zeitpunkt von 8 Stunden nach der Bestrahlung ermittelt werden. HaCaT-Zellen wurden UVB-Dosen zwischen 50 und 3000 J/m² ausgesetzt. Die anschließende Western-Blot-Analyse ergab das in **Abb. 3.3 A** gezeigte Bild.

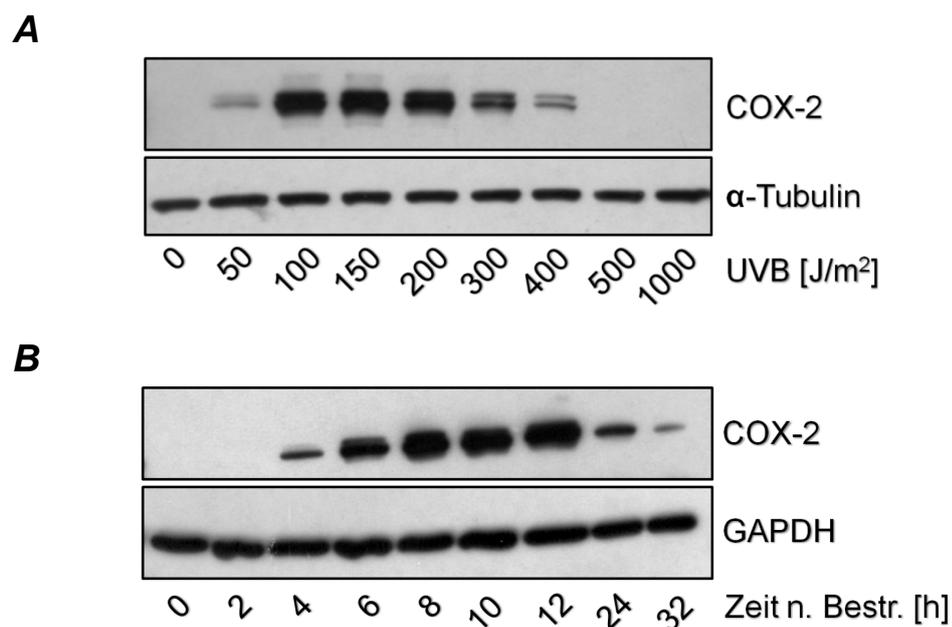


Abb. 3.3: Dosis- und Zeitabhängigkeit der UVB-induzierten COX-2-Expression. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit den angegebenen UVB-Dosen durch PBS bestrahlt, nach 8 Std. lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche. (B) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt, nach den angegebenen Zeiten lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Experimente.

Die COX-2-Proteinspiegel durchlaufen ein Maximum bei ca. 150 J/m². Schon bei einer Dosis von 50 J/m² kommt es zur, wenn auch vergleichsweise geringen, gesteigerten Bildung von COX-2-Protein. Bei Dosen ab 500 J/m² ist hingegen kein COX-2-Protein mehr festzustellen. Es wurde für weitere Experimente die bereits verwendete UVB-Dosis von 100 J/m² beibehalten, da sie in etwa dem beobachteten Maximum der induzierten COX-2-Expression entspricht.

Analysen des Zeitverlaufs der COX-2-Induktion nach Bestrahlung mit 100 J/m² 0 und 32 Stunden nach Exposition ergaben ein Maximum an COX-2-Protein etwa zwischen 8 und 12 Stunden nach Bestrahlung (**Abb. 3.3 B**). Schon nach 4 Stunden ist COX-2-Protein nachweisbar. 24 und 32 Stunden nach Bestrahlung ist wieder deutlich weniger COX-2 detektierbar. Extrapoliert man auf die Zeitpunkte zwischen 8 und 24 Stunden nach Bestrahlung, so kann davon ausgegangen werden, dass etwa bei 12 Stunden das Maximum der Menge an detektierbarem COX-2-Protein vorliegt. Vergleicht man die Zeitabhängigkeit von COX-2-Proteinspiegel und PGE₂-Freisetzung (**Abb. 3.2 C**), so findet man erwartungsgemäß einen ähnlichen Verlauf. Nach 4 Stunden kommt es jeweils zu einer ersten Zunahme an COX-2-Protein bzw. PGE₂-Konzentration, die nach 12 bzw. 16 Stunden ihr Maximum erreicht und nach 24 Stunden rückläufig ist.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die UVB-induzierte COX-2-Expression in HaCaT-Zellen eine deutlich ausgeprägte Dosis- und Zeitabhängigkeit mit Maxima bei ca. 150 J/m² bzw. 12 Stunden nach Bestrahlung aufweist, und die beobachteten Zeitverläufe von COX-2-Protein-Spiegel und PGE₂-Konzentration im Zellkulturüberstand im Großen und Ganzen übereinstimmen.

3.1.3 Vergleich der COX-2-Induktion durch UVB in HFFF2- und HaCaT-Zellen

Es sollte die COX-2-Induktion durch UVB in zwei Hautzelltypen unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen verglichen werden. Dazu wurden HFFF2-Zellen, humane Hautfibroblasten, und HaCaT-Keratinocyten 24 Stunden vor Exposition serumdepletiert oder nicht serumdepletiert und dann mit unterschiedlichen UVB-Dosen bestrahlt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 analysiert. Das Resultat ist in **Abb. 3.4** zu sehen. Auffällig ist der im Gegensatz zu HaCaT-Zellen (**Abb. 3.4 B**) basal hohe COX-2-Spiegel der HFFF2-Zellen (**Abb. 3.4 A**). Im Falle der nicht vor Bestrahlung serumdepletierten HFFF2-Zellen sieht man zu allen

untersuchten Zeitpunkten eine durch UVB hervorgerufene dosisabhängige Abnahme dieser basalen Menge an COX-2 bis unter die Detektionsgrenze. Im Falle serumdepletierter HFFF2-Zellen kommt es hingegen nach UVB-Bestrahlung mit den hier verwendeten Dosen zu keiner deutlichen Veränderung des COX-2-Spiegels.

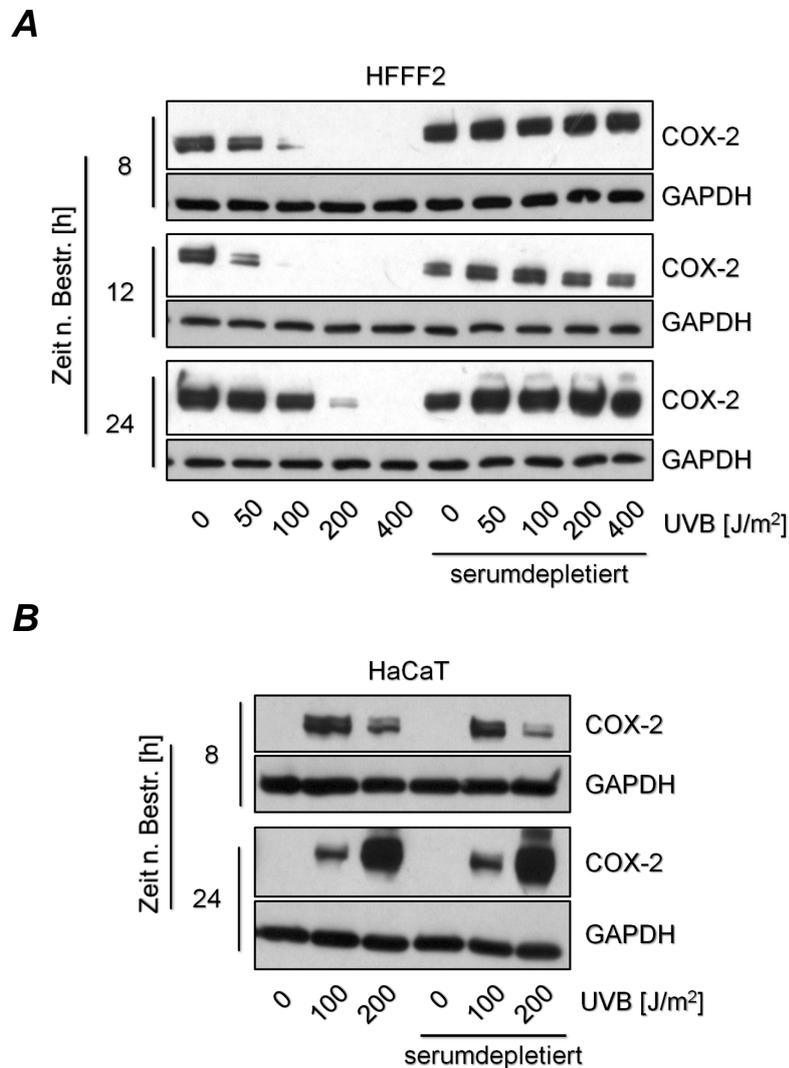


Abb. 3.4: UVB-Bestrahlung wirkt sich unterschiedlich auf den COX-2-Spiegel in HFFF2- und HaCaT-Zellen aus. HFFF2- bzw. HaCaT-Zellen wurden für 24 Std. serumdepletiert oder nicht serumdepletiert, mit den angegebenen UVB-Dosen bestrahlt und nach den angegebenen Zeiten lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils 2 voneinander unabhängige Experimente.

Bei HaCaT-Zellen ist kein Unterschied bei der COX-2-Induktion zwischen serumdepletierten und nicht serumdepletierten Zellen erkennbar. Auffällig ist, dass nach 8 Stunden bei 100 J/m² eine etwas und nach 24 Stunden bei 200 J/m² eine deutlich stärkere COX-2-Induktion vorliegt. Es kommt somit zu einer Verschiebung des Maximums der COX-2-Induktion zu

höheren Dosen hin. Zusammenfassen lässt sich, dass es im Gegensatz zu HaCaT-Zellen in HFFF2-Zellen nicht zu einer Induktion, oder bei nicht serumdepletierten Zellen sogar zu einer deutlichen Abnahme, der COX-2-Expression nach UVB-Bestrahlung kommt.

3.2 Die MAP-Kinase p38 und das mRNA-Bindeprotein HuR bei der UVB-induzierten COX-2-Expression

3.2.1 p38^{MAPK} und UVB-induzierte COX-2-Expression

Von der stressregulierten MAP-Kinase p38 war bereits bekannt, dass sie durch UV-Bestrahlung aktiviert werden kann und eine Rolle in der UV-induzierten COX-2-Expression spielt (Mahns et al., 2004). Es sollte nun die Rolle dieser Kinase bei der UVB-induzierten COX-2-Expression im untersuchten System näher beleuchtet werden.

Dazu wurden die mit 100 J/m² UVB-bestrahlten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition lysiert und einer Western-Blot-Analyse zugeführt. Dabei konnte an Thr-180 und Tyr-182 phosphorylierte und damit enzymatisch aktive p38^{MAPK} nachgewiesen werden. **Abb. 3.5. A** kann man eine deutliche UVB-induzierte Phosphorylierung 2 und 4 Stunden nach Bestrahlung entnehmen. Auch nach 8 Stunden ist diese noch immer, wenn auch wesentlich schwächer ausgeprägt, detektierbar. UVB-induzierte Phosphorylierung der p38^{MAPK} war bereits innerhalb von 30 Minuten nachweisbar (n = 2, ohne Abbildung). UVB führt in der verwendeten Dosis somit zu einer schnellen, deutlichen und lang anhaltenden Aktivierung der MAP-Kinase p38.

Wie aus **Abb. 3.5 B** ersichtlich führt eine Hemmung der p38^{MAPK}-Aktivität durch den für die α - und β -Isoform spezifischen Inhibitor SB202190 (Davies et al., 2000) zu einer klaren, nahezu vollständigen Unterdrückung der UVB-induzierten COX-2-Expression zu den untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung. Dies verdeutlicht die entscheidende Bedeutung der Aktivierung von p38^{MAPK} in der zur COX-2-Expression führenden durch UVB induzierten Signalkaskade.

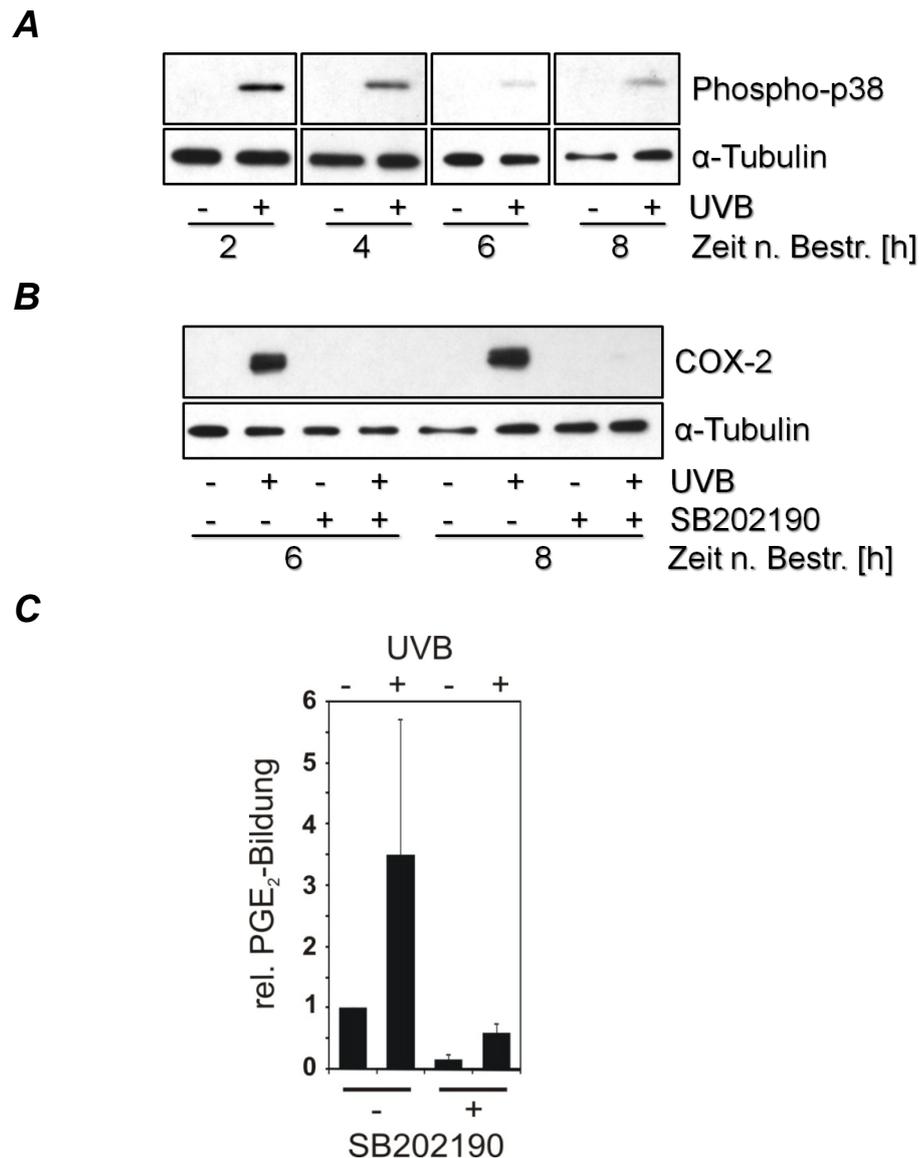


Abb. 3.5: Beteiligung von p38^{MAPK} an der UVB-induzierten COX-2-Expression. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung lysiert und mittels Western-Blotting auf Phospho-p38 und α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche. (B) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit dem p38-Inhibitor SB202190 (5 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Anschließend wurde mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und mit dem Inhibitor für 6 oder 8 Std. postinkubiert. Zelllysate wurden mittels Western-Blotting auf COX-2 und α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Experimente. (C) HaCaT-Zellen wurden wie unter (B) behandelt. Es wurden 16 Std. nach Bestrahlung die Zellüberstände abgenommen und mittels ELISA auf PGE₂ analysiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung und resultieren aus 4 voneinander unabhängigen Versuchen. Sie sind auf die jeweiligen Gesamtprotein-Konzentrationen und auf die PGE₂-Konzentration zum Zeitpunkt 0 nach Bestrahlung normiert.

Die Unterdrückung der COX-2-Induktion durch Hemmung von $p38^{\text{MAPK}}$ konnte nicht nur auf Proteinebene gezeigt werden, sondern wurde auch auf Ebene von PGE_2 , also eines Produktes der enzymatischen Aktivität der COX-2, mittels ELISA verifiziert. **Abb. 3.5 C** zeigt, dass in Gegenwart des Inhibitors SB202190 die ansonsten 16 Stunden nach UVB-Exposition deutlich erhöhte PGE_2 -Konzentration in den Zellkulturüberständen nicht mehr festzustellen ist. Die gemessene PGE_2 -Konzentration ist im Gegenteil sogar noch niedriger als basale PGE_2 -Spiegel, was dafür spricht, dass die Aktivität der gemeinhin mit Zellstress in Verbindung gebrachten $p38^{\text{MAPK}}$ etwas überraschend auch für die basale PGE_2 -Produktion/Sezernierung in HaCaT-Zellen eine Rolle spielt.

Es kann also zusammenfassend festgehalten werden, dass UVB in einer Dosierung von 100 J/m^2 im untersuchten System zu einer deutlichen und langanhaltenden Aktivierung der MAP-Kinase p38 führt, und dass die Aktivität der p38 α - und/oder β -Isoform für die UVB-induzierte Expression der COX-2 entscheidend ist, was sowohl auf Ebene des COX-2-Proteins als auch der PGE_2 -Konzentration im Zellkulturüberstand gezeigt werden konnte. Es stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus der Beteiligung von $p38^{\text{MAPK}}$, welche für stressinduzierte Erhöhung der Transkriptionsrate aber auch der mRNA-Stabilität bekannt ist.

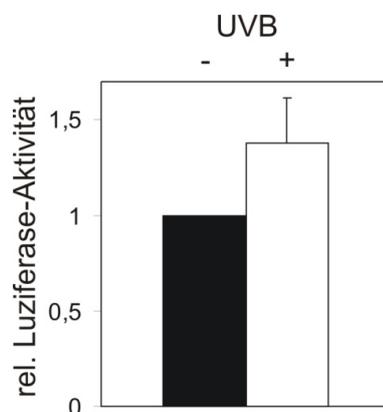


Abb. 3.6: Leichte Zunahme der COX-2-Promotoraktivität nach UVB-Bestrahlung. HaCaT-Zellen wurden mit $0,75 \mu\text{g/Schale}$ pGL3-COX-2P (COX-2-Promotor-Luziferase-Konstrukt) und zusätzlich mit $0,1 \mu\text{g/Schale}$ pRL-SV40 (Transfektionskontrolle) in serumfreiem Medium transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Weitere 16 Stunden später wurde lysiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden unter Berücksichtigung der Kontrollen korrigiert und auf unbestrahlte Zellen normiert. Die gezeigte Zunahme der Luziferase-Aktivität ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus 4 voneinander unabhängigen Versuchen.

Im Folgenden wurden HaCaT-Zellen daher mit einem Luziferasegen-Reporterkonstrukt transfiziert, welches den COX-2-Promotor mit einem upstream-Bereich bis Nukleotid # -3920 enthielt (Meade et al., 1999). In diesem Bereich befinden sich alle Bindestellen für die wichtigsten, die COX-2-Expression regulierenden Transkriptionsfaktoren, also vor allem für AP-1 (Aktivatorprotein 1), NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) und CREB (cAMP -responsives Element bindendes Protein). Wie in **Abb. 3.6** dargestellt, konnte nach UVB-Bestrahlung eine moderate Zunahme der Luziferase-Aktivität und somit der COX-2-Promotor-Aktivität um durchschnittlich einen Faktor von etwa 1,4 verzeichnet werden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass eine solche leichte Erhöhung der Promotoraktivität das Ausmaß der beobachteten UVB-induzierten Expression der COX-2 (**Abb. 3.2 A und B**) erklären kann.

Unveröffentlichte Daten aus der AG Klotz legen eine posttranskriptionelle Modulation der COX-2-Expression unter Beteiligung von p38^{MAPK} nahe. Zwei Stunden nach UVB-Bestrahlung mit einer Dosis von 100 J/m² wurden HaCaT-Zellen mit dem Transkriptioneninhibitor Actinomycin D (2 μ M) inkubiert und danach zu verschiedenen Zeitpunkten COX-2-mRNA-Spiegel per RT-PCR analysiert. Auf diese Weise konnte der Zerfall der COX-2-mRNA über die Zeit verfolgt werden. Tatsächlich wurde so eine sehr starke Zunahme der Halbwertszeit der COX-2-mRNA auf $t_{1/2} \gg 8$ Stunden bei bestrahlten im Vergleich zu nicht bestrahlten Zellen mit $t_{1/2} = 4-7$ Stunden beobachtet. Weiterhin wurde diese UVB-induzierte Halbwertszeiterhöhung bei Verwendung des p38^{MAPK}-Inhibitors SB202190 (5 μ M) vollständig unterbunden (D. Fugmann, pers. comm.).

Da p38^{MAPK} eine Proteinkinase ist, die nicht direkt mit COX-2-mRNA interagiert, stellt sich die Frage nach den mRNA-bindenden Proteinen, welche UVB-induziert zu einer posttranskriptionellen Modulation der COX-2-Expression führen.

Das mRNA-bindende und stabilisierende Protein hnRNP A0 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A0) ist eine bekannte Zielstruktur für die Phosphorylierung durch MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MK-2), die wiederum eine Zielstruktur für die Phosphorylierung durch die MAP-Kinase p38 ist. Eine Stabilisierung von COX-2-mRNA auf diesem Wege wurde bereits für die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte COX-2-Expression von Rosseau et al. (2002) gefunden. Um zu testen, ob hnRNP A0 auch die UVB-induzierte COX-2-Expression beeinflusst, wurde hnRNP A0 in HaCaT-Zellen mittels gegen hnRNP A0 gerichteter siRNA depletiert. Dabei wurde eine Mischung vierer verschiedener hnRNP A0-siRNAs verwendet. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollansätze nur mit Transfektionsagenz (ohne siRNA) und mit nicht-depletierender

siRNA mitgeführt. Das Resultat ist aus **Abb. 3.7** ersichtlich. Die hnRNP A0-Menge konnte mit Hilfe des siRNA-Pools deutlich herabgesetzt werden. Dies hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der UVB-induzierten Erhöhung des COX-2-Spiegels.

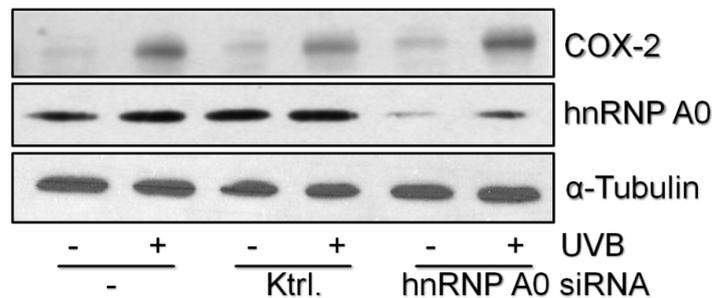


Abb. 3.7: Das RNA-bindende Protein hnRNP A0 ist nicht an der Induktion der COX-2-Expression durch UVB beteiligt. HaCaT-Zellen wurden mit insgesamt 40 nM einer Mischung aus vier gegen hnRNP A0 gerichteten siRNAs oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. Zudem wurde mit Transfektionsagens alleine (-) behandelt. 40 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und 8 Std. nach Bestrahlung lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blotting auf COX-2, hnRNP A0 und α-Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente.

Daraus lässt sich schließen, dass hnRNP A0 nicht an der beobachteten p38^{MAPK}-vermittelten COX-2-mRNA-Stabilisierung beteiligt ist. Folglich wurde untersucht, welches Protein stattdessen für die Stabilisierung verantwortlich gemacht werden kann. Die Rolle des in der Literatur bereits aus anderen Systemen für die Bindung im ARE des 3'-untranslatierten Bereichs der COX-2-mRNA bekannten Proteins HuR sollte nun auch für die UVB-induzierte COX-2-Expression in HaCaT-Zellen untersucht werden.

3.2.2 HuR und UVB-induzierte COX-2-Expression

Die Bedeutung von HuR für die Induktion der COX-2-Expression durch UVB sollte über Depletion von HuR untersucht werden. Es wurden hierzu zwei verschiedene HuR-spezifische siRNAs verwendet (im Folgenden stets als HuR#1 und HuR#2 bezeichnet). HuR#1 ist zu einem Bereich in der kodierenden Sequenz der HuR-mRNA komplementär, während HuR#2 zu einer Region aus der 3'-untranslatierten Region der HuR-mRNA komplementär ist. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher gegen HuR gerichteter siRNAs wird die Wahrscheinlichkeit, einen unspezifischen Effekt zu beobachten, drastisch reduziert.

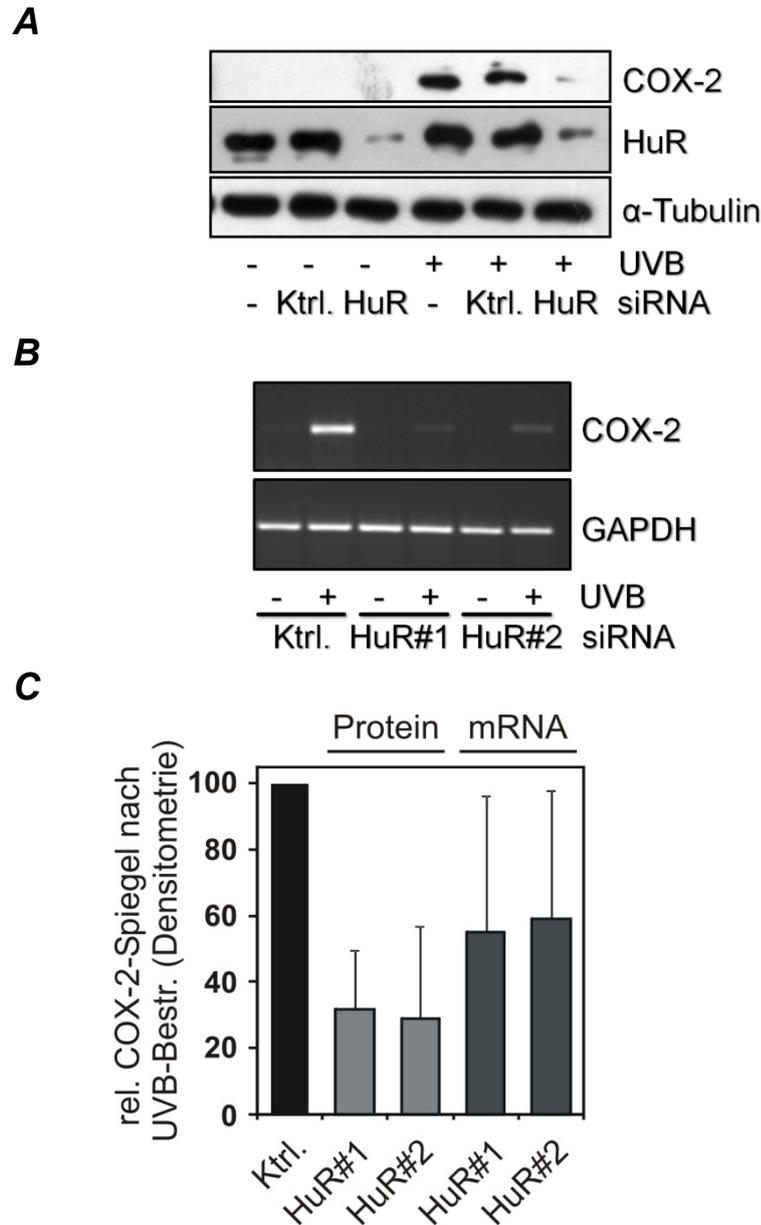


Abb. 3.8: Beteiligung von HuR an der Induktion der COX-2-Expression durch UVB. (A) HaCaT-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert, oder mit Transfektionsagens alleine (-) versetzt. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt, 8 Std. nach Bestrahlung (und damit 72 Std. nach Transfektion) lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2, HuR und α -Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. (B) HaCaT-Zellen wurden mit 150 nM zweier unterschiedlicher gegen HuR gerichteter siRNAs (HuR#1 und HuR#2) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Es wurde 6 Std. nach Bestrahlung (und damit 72 Std. nach Transfektion) die Gesamt-RNA isoliert. Gezeigt ist das Ergebnis der reversen Transkription mit anschließender PCR auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle). (C) Densitometrische Auswertung der unter (A) und (B) erläuterten Experimente. Es sind die auf den Wert von mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Ktrl.) normierten COX-2-Spiegel nach UVB-Bestrahlung gezeigt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 3-4).

Abb. 3.8 A ist zu entnehmen, dass sich die Depletion von HuR mittels siRNA deutlich auf das Ausmaß der UVB-induzierten COX-2-Expression auf Proteinebene ausgewirkt hat. Die Verwendung von Kontroll-siRNA, also keinem menschlichen Genabschnitt komplementärer siRNA, macht deutlich, dass es sich dabei nicht um einen unspezifischen Effekt handelt, der allein durch die Anwesenheit von siRNA überhaupt hervorgerufen wird. Mit der siRNA HuR#2 wurde ein vergleichbares Resultat erzielt (ohne Abbildung, vgl. **Abb. 3.8 C**). Zudem konnte die so festgestellte Beteiligung von HuR an der UVB-induzierten COX-2-Expression auf Ebene der COX-2-mRNA unter Verwendung beider siRNAs (HuR#1 und #2) wie in **Abb. 3.8 B** gezeigt zum Zeitpunkt 6 Stunden nach UVB-Exposition verifiziert werden.

Es sollte jedoch erwähnt werden, dass eine Depletionseffizienz von mindestens 85 %, d.h. also eine Restmenge von höchstens 15 % HuR-Protein, Voraussetzung war, um eine signifikante Abschwächung der COX-2-Induktion auf Protein- oder mRNA-Ebene durch HuR-Depletion beobachten zu können. Diese Effizienz wurde sowohl für die Western-Blot-Analysen auf COX-2-Protein als auch für die RT-PCRs auf COX-2-mRNA mittels Western-Blotting und immunologischem Nachweis von HuR-Protein mit anschließender densitometrischer Auswertung vorgenommen. Dabei wurden für die RT-PCRs aus ein und denselben Proben Gesamt-RNA und -protein isoliert. Experimente mit einer Effizienz von unter 85 % wurden für die Zusammenstellung in **Abb. 3.8 C** nicht berücksichtigt. In **Abb. 3.8 C** ist die densitometrische Auswertung der COX-2-Spiegel nach UVB-Bestrahlung der Experimente aus **Abb. 3.8 A** und **B** dargestellt. Dabei sind die COX-2-Spiegel auf diejenigen der lediglich mit Kontroll-siRNA transfizierten HaCaT-Zellen normiert. Man erkennt so auf Proteinebene im Durchschnitt eine Abnahme des Ausmaßes der Induktion der COX-2-Expression durch UVB auf etwa 30 %. Auf mRNA-Ebene wurden entsprechende Werte von 55 % für HuR#1 bzw. 59 % für HuR#2 erhalten. Dass die Durchschnittswerte auf mRNA-Ebene höher liegen als auf Proteinebene und zudem höhere Standardabweichungen aufweisen, kann zum Großteil auf das Vorhandensein jeweils eines „Ausreißers“ zu höherem COX-2-Spiegel hin zurückgeführt werden.

Vergleicht man die hier beobachteten Effekte mit dem Effekt der p38^{MAPK}-Hemmung auf die COX-2-Induktion aus **Abb. 3.5 B** und **C**, lässt sich feststellen, dass HuR zwar eine maßgebliche Rolle im untersuchten Prozess spielt, im Gegensatz zu p38^{MAPK} allerdings nicht essenziell für eine erfolgreiche COX-2-Expression nach UVB-Exposition zu sein scheint. Es lässt sich somit vermuten, dass UVB-aktivierte p38^{MAPK} nicht nur für einen einzigen zur COX-2-Expression führenden Weg, wie etwa die mRNA-Stabilisierung durch HuR-

notwendig ist, sondern darüber hinaus neben einer transkriptionellen Steigerung (vgl. Einleitung) auch noch für die Modulation anderer posttranskriptionell wirkender Komponenten wie von mRNA-Bindeproteinen und einer damit einhergehenden COX-2-Induktion verantwortlich sein könnte. So sind in der Literatur noch weitere Kandidaten für von p38^{MAPK} regulierte mRNA-Bindeproteine bekannt (vgl. Diskussionsteil dieser Arbeit).

Wie im Falle der p38^{MAPK} wurde auch bei HuR der Einfluss auf die gesteigerte PGE₂-Konzentration nach UVB-Bestrahlung untersucht. **Abb. 3.9** ist zu entnehmen, dass nach Depletion von HuR mittels der siRNA HuR#1 keine Steigerung der PGE₂-Konzentration 16 Stunden nach UVB-Exposition mehr festzustellen ist. Es konnte also auch auf Produktebene eine maßgebliche Rolle von HuR in dem untersuchten Prozess bestätigt werden.

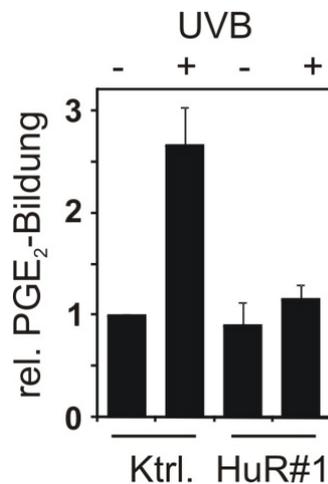


Abb. 3.9: HaCaT-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter (HuR#1) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert und nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Es wurden nach 16 Std. die Zellüberstände abgenommen und mittels ELISA auf PGE₂ analysiert. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3). Sie sind auf die jeweiligen Gesamtprotein-Konzentrationen und auf die PGE₂-Konzentration zum Zeitpunkt 0 nach Bestrahlung normiert.

Abb. 3.8 A ist zu entnehmen, dass UVB-Bestrahlung einer Dosis von 100 J/m² keine Änderung der Gesamtmenge an HuR-Protein induziert. Selbst bei den im Zuge der Experimente aus **Abb. 3.3 A** verwendeten UVB-Dosen bis zu 3000 J/m² war 8 Stunden nach Bestrahlung lediglich eine geringfügige Verringerung der Proteinmenge an HuR feststellbar (n = 3, ohne Abbildung). Es kann also festgehalten werden, dass der beobachtete Einfluss von HuR auf die UVB-induzierte COX-2-Expression nicht mit einer veränderten Gesamtmenge an HuR-Protein zusammenhängt, also folglich auf eine veränderte Aktivität von HuR

zurückgeführt werden muss. Wie weiter unten gezeigt, kommt es allerdings nach UVB-Bestrahlung zu einer subzellulären Translokation von HuR und folglich einer Erhöhung der HuR-Menge im Zytoplasma, dem Ort für mRNA-bindende Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich das Gesagte somit wie folgt: Es konnte sowohl auf Ebene des COX-2-Proteins als auch auf Ebene der COX-2-mRNA und darüber hinaus noch auf Ebene der PGE₂-Konzentration eine maßgebliche Rolle des mRNA-Bindeproteins HuR in der UVB-induzierten COX-2-Expression demonstriert werden. Im Folgenden wurden Untersuchungen durchgeführt, um diese Rolle von HuR näher zu beleuchten.

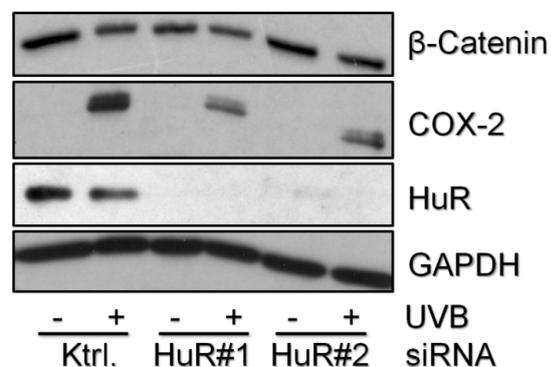


Abb. 3.10: HuR hat keinen Einfluss auf die Menge an β -Catenin. HaCaT-Zellen wurden mit 150 nM zweier unterschiedlicher gegen HuR gerichteter siRNAs (HuR#1 und HuR#2) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt, 8 Std. nach Bestrahlung (und damit 72 Std. nach Transfektion) lysiert und mittels Western-Blotting auf β -Catenin, COX-2, HuR und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

In der Literatur findet man, dass stressregulierte mRNA-Bindeproteine auch an die mRNAs anderer stressregulierter mRNA-Bindeproteine binden und auf diese Weise ihre Expression modulieren können. Im Falle von HuR ist bekannt, dass es β -Catenin-mRNA zu stabilisieren vermag (López de Silanes et al., 2003). β -Catenin wiederum kann COX-2-mRNA im Komplex mit HuR stabilisieren (Lee & Jeong, 2006). Im Falle der UVB-induzierten COX-2-Expression in HaCaT-Zellen wäre somit eine positive UVB-induzierte Wirkung von HuR auf die COX-2-mRNA-Stabilität über eine solche Steigerung der β -Catenin-Menge denkbar. Wie dem Resultat der in **Abb. 3.10** gezeigten Western-Blot-Analyse eines siRNA-Depletionsexperiments zu entnehmen, beeinflusst HuR jedoch nicht die vorhandene Menge an β -Catenin. Zudem kommt es sogar zu einer leichten Abnahme des β -Catenin-Spiegels nach UVB-Bestrahlung. Der soeben als denkbar aufgeführte Mechanismus kann also

ausgeschlossen werden. Desweiteren kann ausgeschlossen werden, dass die in **Abb. 3.8** gezeigte Verminderung der UVB-induzierten COX-2-Expression in Wirklichkeit auf einen erniedrigten β -Catenin-Spiegel zurückzuführen ist, der wiederum aus einer HuR-Depletion resultiert. HuR spielt für die β -Catenin-Expression im Gegensatz zu anderen Zelltypen in HaCaT-Zellen keine Rolle und wirkt nicht über die Modulation der β -Catenin-Expression auf die COX-2-Induktion nach UVB-Exposition ein.

3.2.3 UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma

HuR ist normalerweise ganz überwiegend im Zellkern lokalisiert (Fan & Steitz, 1998). Zur Stabilisierung von mRNA ist es hingegen erforderlich, dass HuR ins Zytoplasma transloziert. Es wurde nun überprüft, ob im untersuchten System tatsächlich eine Translokation von HuR aus dem Nukleo- ins Zytoplasma beobachtet und inwiefern diese mit der COX-2-Induktion im Zusammenhang gebracht werden kann.

Hierzu wurden HaCaT-Zellen 2, 4, 6 und 8 Stunden nach UVB-Bestrahlung (100 J/m^2) mit Formaldehydlösung fixiert und immunocytochemisch analysiert. Es konnte auf diese Weise tatsächlich eine UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma beobachtet werden, welche etwa 2-4 Stunden nach UVB-Exposition ihr maximales Ausmaß erreicht, nach 6 Stunden schon stark abgeschwächt und nach 8 Stunden wieder verschwunden ist ($n = 4$, **Abb. 3.11**). Aus den 4 Stunden nach Bestrahlung erfolgten Analysen wird die insgesamt deutliche Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma ersichtlich (**Abb. 3.11**). Zu Erkennen ist dabei das von Zelle zu Zelle differierende Ausmaß dieser Translokation: So gibt es Zellen, bei denen HuR in etwa gleichmäßig über Nukleo- und Zytoplasma verteilt ist, und Zellen, bei denen nach wie vor HuR zum Großteil im Nukleoplasma lokalisiert bleibt. Zu einem kleinen Anteil werden zudem auch Zellen vorgefunden, bei denen es nach UVB-Bestrahlung deutlich zu einer überwiegenden Lokalisation von HuR in zytoplasmatischen Foci kommt (vgl. Ausschnittvergrößerung in **Abb. 3.11**), die sogenannte Stressgranula, also Orte der stressinduzierten mRNA-Speicherung (Abdelmohsen et al., 2008) darstellen können, was für eine direkte UVB-induzierte Wechselwirkung von HuR mit mRNA spricht.

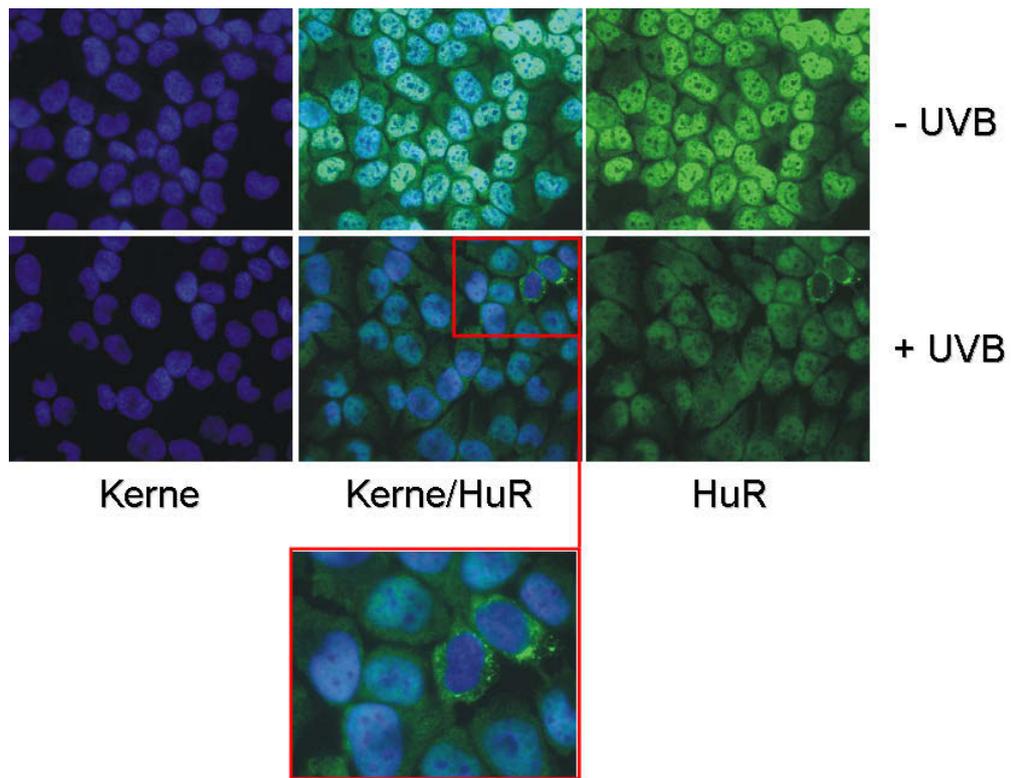


Abb. 3.11: UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma (I). HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt. Nach 4 Std. wurden die Zellen mit Formaldehydlösung fixiert und HuR (grün) immunocytochemisch angefärbt. Die Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 voneinander unabhängige Experimente.

Die sich in der HuR-Lokalisation nach UVB-Exposition unterscheidenden Zelltypen wurden für die Zeitpunkte 4, 6 und 8 Stunden nach UVB-Bestrahlung erfasst und sind in **Abb. 3.12 A** wiedergegeben. Vergleicht man die Prozentsätze der scheinbestrahlten Kontrolle, also 92 % für Zellen mit vornehmlich nukleärem HuR, 8 % für solche mit in der gesamten Zelle verteiltem HuR und 0 % für Zellen mit vornehmlich zytoplasmatischem HuR, mit denen bei 4 Stunden nach UVB-Bestrahlung, also 64 % bzw. 30 % bzw. 6 %, erkennt man auch hier eine deutliche Verschiebung zugunsten der Zellen mit gleichmäßig verteiltem oder vornehmlich zytoplasmatischem HuR und also eine Translokation von HuR ins Zytoplasma.

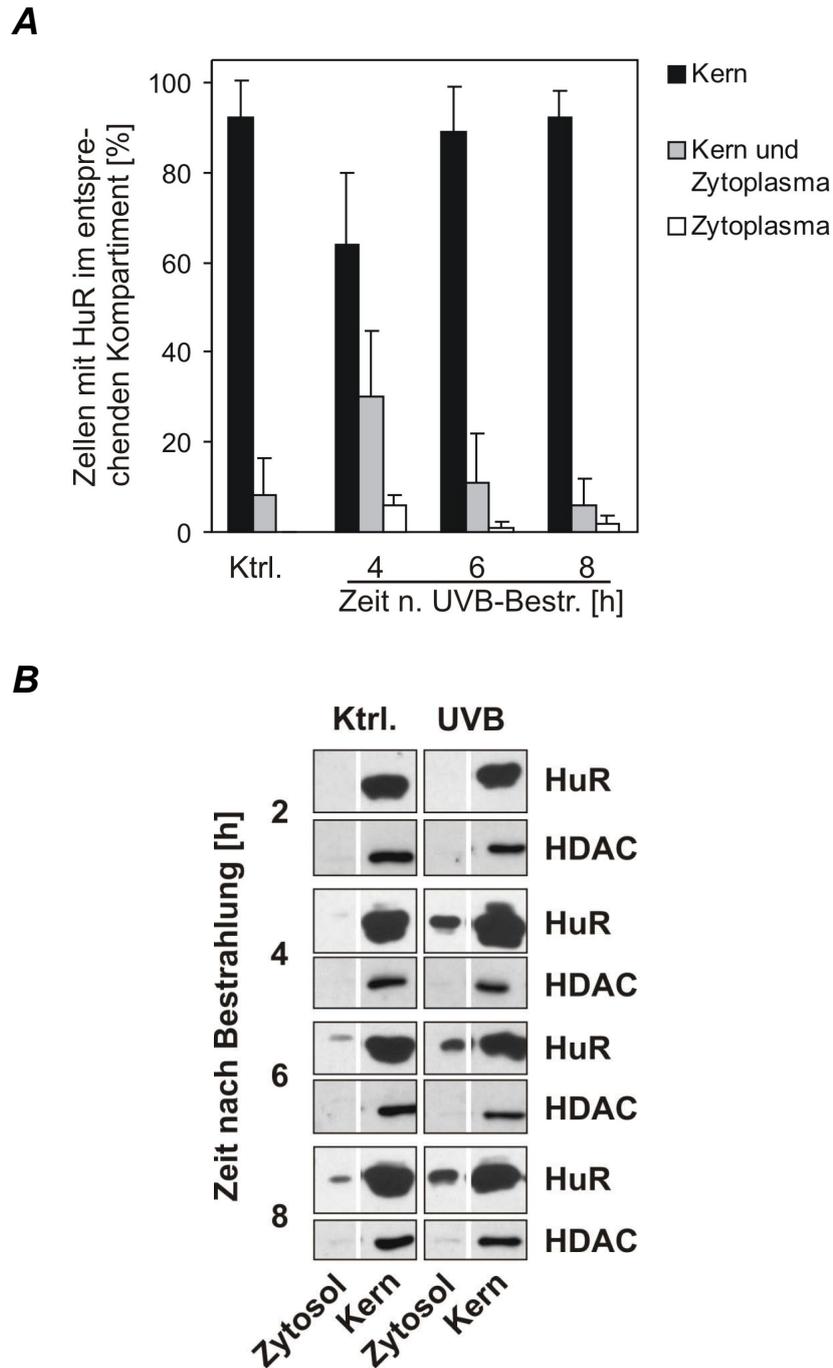


Abb. 3.12: UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma (II). (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und zu den angegebenen Zeiten fixiert, immunocytochemisch analysiert und gemäß ihrer vornehmlichen HuR-Lokalisation in Zellen mit vornehmlich nukleärem, vornehmlich zytoplasmischem und in der gesamten Zelle verteiltem HuR eingeteilt. Für jeden Zeitpunkt wurden je Versuch ca. 130 Zellen kategorisiert. Die angegebenen Mittelwerte \pm Standardabweichung resultieren aus 4 (für den 6 Std.-Wert: $n = 3$) voneinander unabhängigen Experimenten. (B) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m^2 UVB in PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt (Ktrl.). Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen fraktioniert und mittels Western-Blotting auf HuR und Histondeacetylase (HDAC) untersucht. Die nukleäre HDAC diente als Kontrolle für die Reinheit der zytoplasmischen Fraktion. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche.

Vergleicht man den Befund aus **Abb. 3.12 A** mit dem aus **Abb. 3.3 B**, so stellt man fest, dass der zeitliche Verlauf der HuR-Translokation mit dem des COX-2-Proteinspiegels gut übereinstimmt. Innerhalb der untersuchten Zeitpunkte ist bei 2-4 Stunden nach UVB-Bestrahlung ein Maximum der HuR-Translokation ins Zytoplasma vorzufinden, die dann nach 4 Stunden zu einer erstmalig detektierbaren Induktion der COX-2-Expression führt. 8 Stunden nach UVB-Exposition kommt es schließlich nur noch zu einem vergleichsweise geringfügigen Anstieg der Menge an COX-2-Protein, was mit einer 8 Stunden nach UVB-Bestrahlung nicht mehr erhöhten Zahl von Zellen mit vornehmlich zytoplasmatischem HuR korreliert.

Die auf immuncytochemischer Ebene festgestellte Translokation von HuR ins Zytoplasma konnte, wie in **Abb. 3.12 B** zu sehen, an Fraktionen subzellulärer Kompartimente verifiziert werden. Betrachtet man die zytosolische Fraktion, so erkennt man eine deutliche Zunahme an HuR nach UVB-Bestrahlung, also eine Translokation ins Zytosol. Das Maximum der Translokation ist bei 4 Stunden nach Exposition festzustellen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass UVB (100 J/m^2) eine deutliche Translokation des ansonsten zu ca. 90 % im Kern befindlichen HuRs ins Zytoplasma bewirkt, welche bei ungefähr 4 Stunden nach Bestrahlung ihr maximales Ausmaß erreicht.

HuR kann stressinduziert mit den am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligten Proteinen pp32 und APRIL assoziieren und auf diesem Wege über den Transportkomplex CRM1 (*chromosomal region maintenance protein 1*) aus dem Kern exportiert werden (Gallouzi et al., 2001). Weiterhin ist bekannt, dass HuR labile mRNAs nach Binden im ARE-Bereich der 3'-UTR aus dem Kern ins Zytoplasma vor Abbau geschützt mitführen kann (Fan & Steitz, 1998).

Wie das Ergebnis des Western-Blottings in **Abb. 3.13** zeigt, wird die UVB-induzierte COX-2-Expression auf Proteinebene bei Einsatz des CRM1-Inhibitors Leptomycin B (LMB) abgeschwächt. Dies lässt also eine Beteiligung des Transportkomplexes CRM1 bei der COX-2-Induktion erkennen. Ausgeschlossen werden kann, dass der beobachtete Effekt durch LMB auf einer Veränderung der insgesamt vorhandenen HuR-Menge beruht (**Abb. 3.13**). Die beobachtete Verminderung der COX-2-Induktion durch LMB wird dahingehend interpretiert, dass HuR am UVB-induzierten nukleozytoplasmatischen Transport über CRM1 gehindert wird und auf diese Weise nicht mehr zur Stabilisierung der COX-2-mRNA beitragen kann. Möglich wäre auch ein nicht mehr stattfindender Transport der COX-2-mRNA durch die

Bindung an HuR zum Ort der Translation, also ins Zytoplasma, was durch eine Hemmung des für die HuR-Translokation unter Stressbedingungen notwendigen CRM1-Transportkomplexes hervorgerufen würde.

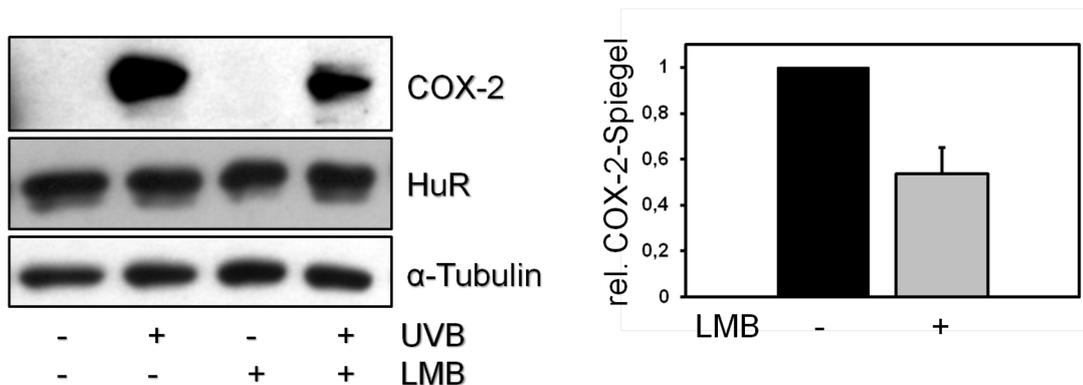


Abb. 3.13: CRM1-Abhängigkeit der UVB-induzierten COX-2-Expression. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion für 2,5 Std. mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) (20 ng/ml) oder 70 % Methanol (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Anschließend wurde mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und mit dem Inhibitor für 8 Std. postinkubiert. Zellysate wurden mittels Western-Blotting auf COX-2, HuR und α-Tubulin (Ladekontrolle) untersucht. Der densitometrischen Auswertung liegen 3 voneinander unabhängige Experimente zu Grunde. Angegeben ist der auf den Wert der nicht mit LMB behandelten Zellen normierte COX-2-Spiegel nach UVB-Bestrahlung als Mittelwert ± Standardabweichung.

Dies Ergebnis stellt die beobachtete UVB-induzierte Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma mit der UVB-Induktion der COX-2-Expression in Zusammenhang. Es stellt sich natürlich auch die Frage des Zusammenhangs von p38^{MAPK} und HuR.

Der Einfluss von p38^{MAPK} auf die UVB-induzierte HuR-Translokation wurde mittels Hemmung von p38^{MAPK} durch SB202190 zunächst immunocytochemisch analysiert. Zu keinem der betrachteten Zeitpunkte (2, 4, 6 und 8 Stunden nach UVB-Exposition) wurde eine Veränderung der UVB-induzierten HuR-Translokation durch Hemmung von p38^{MAPK} verzeichnet (n = 4). Bilder für den Zeitpunkt 4 Stunden nach Bestrahlung, also für das Maximum der HuR-Translokation ins Zytoplasma, werden dabei in **Abb. 3.14 A** gezeigt. Man sieht hier deutlich die Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma nach UVB-Bestrahlung unabhängig von einer Hemmung der p38^{MAPK}, genauer von deren Isoformen α und β. Diese immunocytochemischen Daten werden durch subzelluläre Fraktionen bestätigt (**Abb. 3.14 B**)

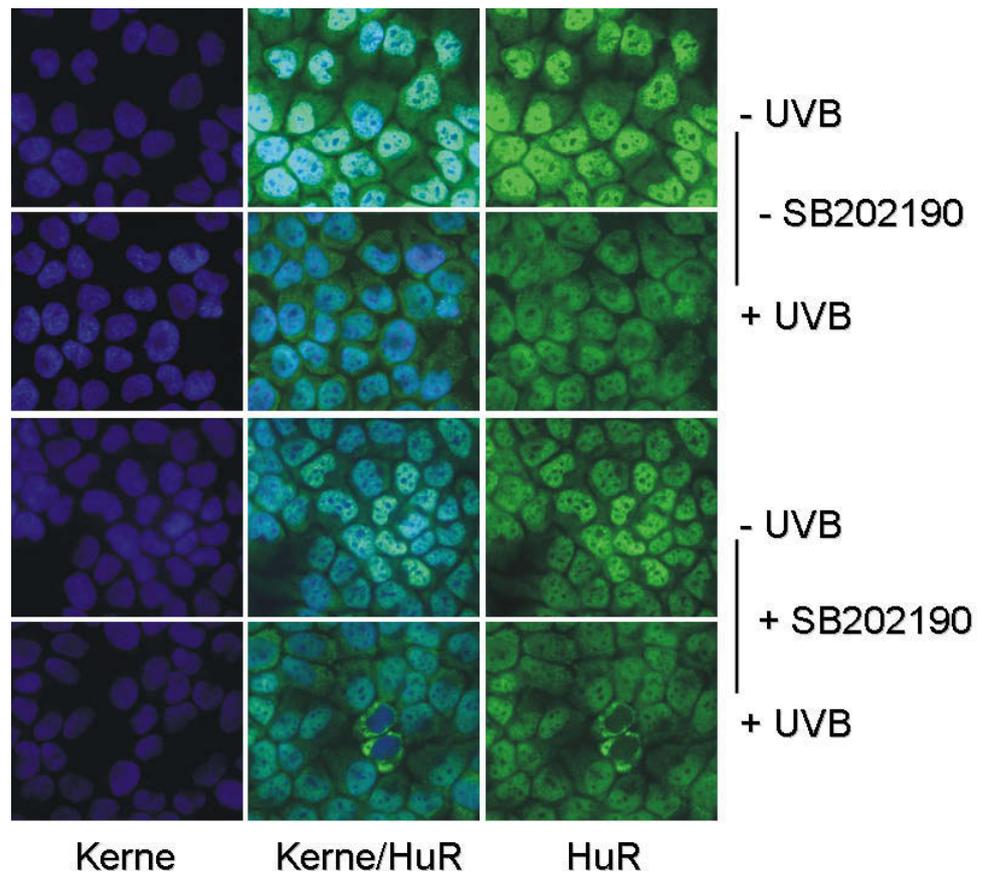
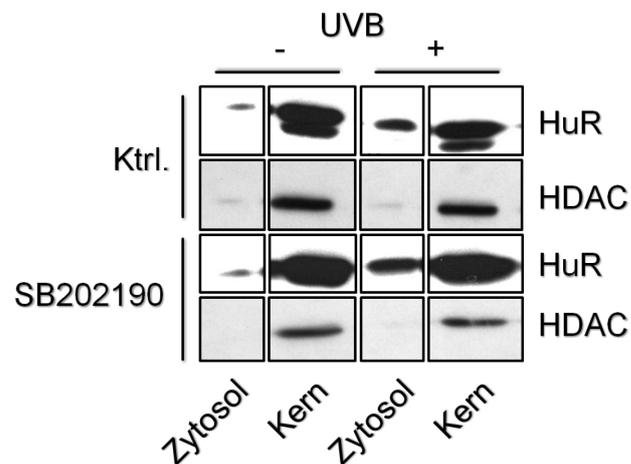
A**B**

Abb. 3.14: Unabhängigkeit der HuR-Translokation von p38^{MAPK}. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit dem p38-Inhibitor SB202190 (5 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Anschließend wurde mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt, in Gegenwart des Inhibitor für 4 Std. postinkubiert und mit Formaldehydlösung fixiert. HuR (grün) wurde immunocytochemisch angefärbt. Die Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. (B) HaCaT-Zellen wurden wie unter (A) behandelt. 4 Std. nach Bestrahlung wurden die Zellen fraktioniert und mittels Western-Blotting auf HuR und Histondeacetylase (HDAC) untersucht. Die nukleäre HDAC diente als Kontrolle für die Reinheit der zytosolischen Fraktion. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass bei der UVB-induzierten COX-2-Expression in HaCaT-Zellen 1. die Aktivität der MAP-Kinase p38 entscheidend ist, 2. das RNA-Bindeprotein HuR eine maßgebliche Rolle spielt und 3. die beobachtete UVB-induzierte Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma nicht von der Aktivität der p38^{MAPK} abhängig ist.

3.3 EGF- und Ah-Rezeptor in der Induktion der COX-2-Expression durch UVB

Es wurde der Frage nach der Initialisierung der durch UVB ausgelösten und zur COX-2-Expression führenden Signaltransduktion nachgegangen. Im Zusammenhang mit UVB-Strahlung wird in der Literatur beispielsweise der EGF-Rezeptor als allgemeiner Mediator UVB-induzierter Signaltransduktion aufgeführt (Xu et al., 2006). Es sollte nun die Rolle des EGFR bei der untersuchten UVB-induzierten COX-2-Expression analysiert werden.

3.3.1 Die Rolle des EGF-Rezeptors bei der COX-2-Induktion nach UVB

Um einen ersten Hinweis auf die Beteiligung des EGF-Rezeptors im untersuchten System zu erhalten, wurden HaCaT-Zellen vergleichsweise mit UVB-Strahlung (100 J/m²) oder EGF (100 ng/ml), dem Liganden des Rezeptors, stimuliert. Die Zellen wurden 6 bzw. 8 Stunden später lysiert und der Western-Blot-Analyse zugeführt. Wie in **Abb. 3.15 A** zu erkennen, kommt es nach Stimulierung mit der eingesetzten EGF-Konzentration zu einer deutlichen, in ihrem Ausmaß derjenigen nach UVB-Bestrahlung in etwa vergleichbaren Induktion der COX-2 zu beiden Zeitpunkten. COX-2-Induktion in HaCaT-Zellen durch Stimulation des EGF-Rezeptors nach Ligandenbindung ist also möglich.

Spielt die Aktivierung des EGF-Rezeptors, einer Rezeptor-Tyrosinkinase, tatsächlich auch eine Rolle in der UVB-induzierten COX-2-Expression, so sollte sich diese Induktion durch Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität abschwächen lassen. Verwendung des allgemeinen Tyrosinkinase-Hemmstoffs Genistein führte zu einer klaren Abschwächung der COX-2-Induktion durch UVB (100 J/m²; **Abb. 3.15 B**).

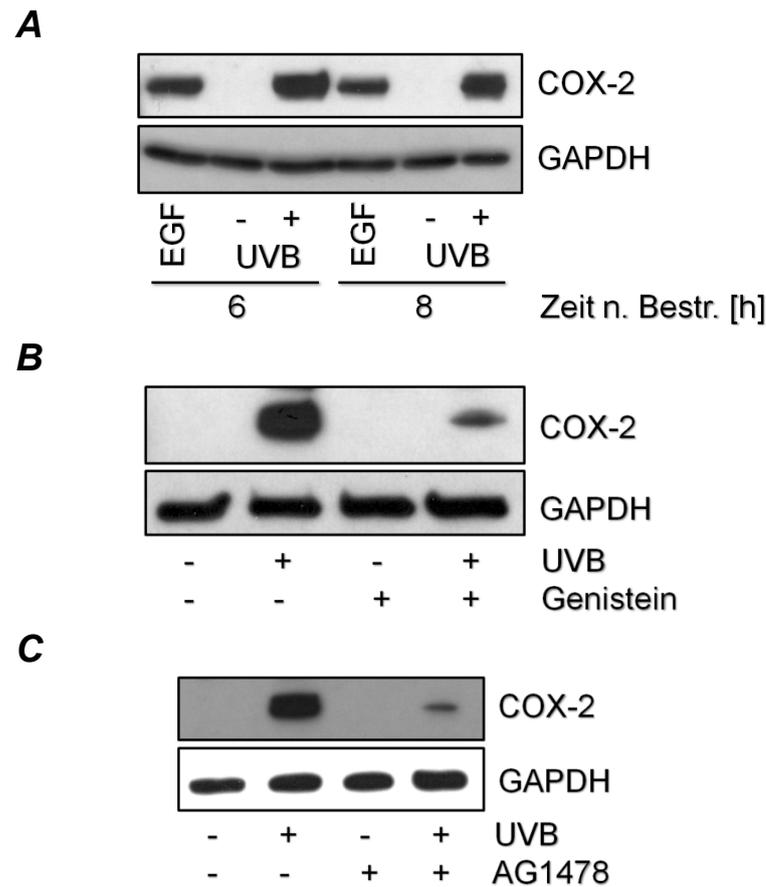


Abb. 3.15: Bedeutung des EGF-Rezeptors für die Induktion der COX-2 durch UVB. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt bzw. mit 100 ng/ml EGF behandelt, nach 6 oder 8 Std. lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der gezeigte Film ist repräsentativ für mindestens 2 voneinander unabhängige Versuche. (B, C) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion für 30 min mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein ($50 \mu\text{M}$), mit dem EGF-Rezeptor-Inhibitor AG1478 ($10 \mu\text{M}$) oder mit DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Anschließend wurde mit 100 J/m^2 UVB in PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und mit dem entsprechenden Inhibitor postinkubiert. Nach 8 Std. wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 (B) bzw. 3 (C) voneinander unabhängige Experimente.

Um einen spezifischeren Nachweis für die Rolle der EGF-Rezeptor-Aktivierung bei der UVB-induzierten COX-2-Expression zu erbringen, wurde der selektiv auf den EGF-Rezeptor wirkende Hemmstoff AG1478 verwendet. Das Resultat der Western-Blot-Analyse ist in **Abb. 3.15 C** gezeigt. In Gegenwart des Inhibitors AG1478 war die COX-2-Induktion deutlich abgeschwächt. Die Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors scheint demnach für die COX-2-Induktion nach 100 J/m^2 UVB-Exposition von Bedeutung zu sein.

Im Folgenden wurden HaCaT-Zellen mit UVB (100 J/m^2) bestrahlt oder mit EGF (100 ng/ml) stimuliert, nach 30 Minuten lysiert und eine Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors

vorgenommen. Um unspezifische Präzipitation durch den zur Fällung verwendeten EGF-Rezeptor-Antikörper oder die Agarosematrix auszuschließen, wurde zur Kontrolle auch ein gegen das nicht in humanen Zellen vorkommende Enzym Luziferase gerichteter Antikörper (IgG) eingesetzt. Die EGF-Rezeptor-Immünpräzipitate wurden sodann der Western-Blot-Analyse zugeführt und mit einem allgemein Phosphotyrosinreste erkennenden Antikörper auf Tyrosinphosphorylierung getestet.

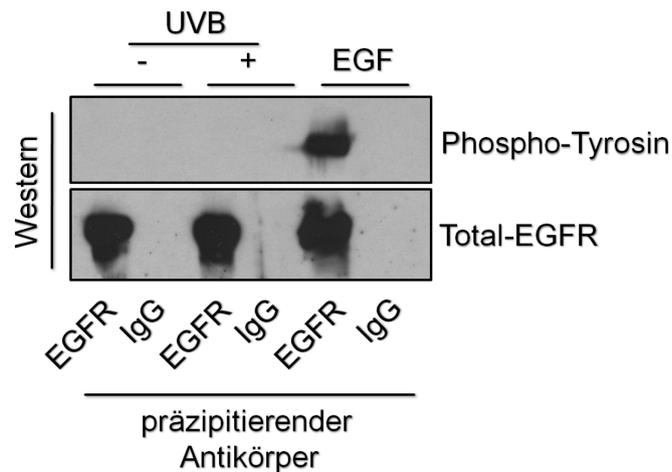
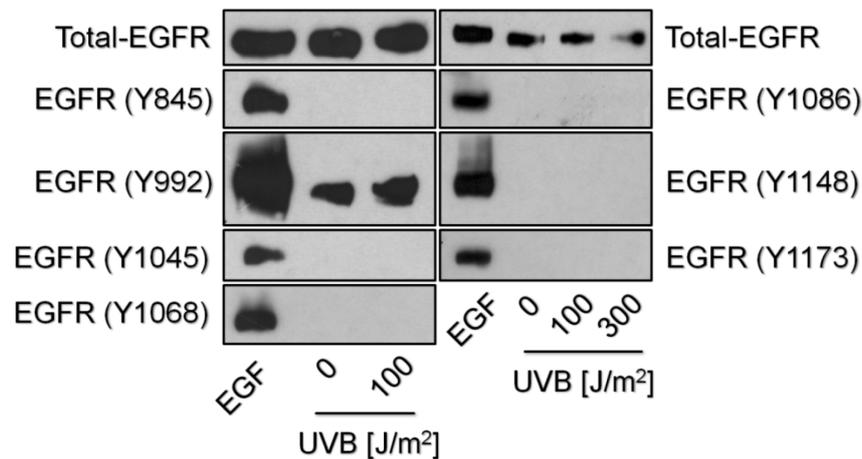
A**B**

Abb. 3.16: UVB induziert keine Tyrosinphosphorylierung des EGFR (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt bzw. mit 100 ng/ml EGF behandelt und nach 30 min lysiert. Die Lysate wurden einer Immunpräzipitation mit EGFR- oder Luciferase-Antikörper (IgG) (Kontrolle für unspezifische Wechselwirkungen) unterzogen. Die Präzipitate wurden mittels Western-Blotting auf Phosphotyrosin und Total-EGFR (Präzipitationskontrolle) untersucht. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche. **(B)** HaCaT-Zellen wurden entsprechend (A) behandelt, 30 min nach Bestrahlung lysiert und mittels Western-Blotting auf Total-EGFR (Ladekontrolle) und verschiedene Phosphotyrosinreste (Y) des EGFR untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 (für Y992: n = 3) voneinander unabhängige Experimente.

Abb. 3.16 A zeigt eine erwartungsgemäß sehr deutliche Phosphorylierung des Rezeptors nach EGF-Stimulierung. Nach Bestrahlung mit UVB konnte hingegen keine Tyrosinphosphorylierung detektiert werden, obgleich gemäß **Abb. 3.15 A** eine derjenigen nach EGF-Behandlung in ihrer Stärke vergleichbare Tyrosinphosphorylierung zu erwarten gewesen wäre, da EGF und UVB zu einer COX-2-Induktion ähnlichen Ausmaßes führen.

In der Folge wurde auch durch Verwendung von für Phosphorylierungen einzelner Tyrosinreste des EGF-Rezeptors spezifischen Antikörpern nachgewiesen, dass an 7 hier untersuchten Tyrosinresten, Y845, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148, Y1173, keine Zunahme der Phosphorylierung nach UVB-Bestrahlung einer Dosis von 100 J/m^2 stattfindet. Hingegen kommt es nach 100 ng/ml EGF-Behandlung an allen untersuchten Tyrosinresten zu einer starken Zunahme der Phosphorylierung. Aus **Abb. 3.16 B** geht hervor, dass am Tyrosin-992 des EGF-Rezeptors eine basale Phosphorylierung vorzufinden ist, welche im Vergleich zur EGF-stimulierten Probe jedoch recht gering ausfällt und nach UVB-Bestrahlung einer Dosis von 100 J/m^2 allenfalls leicht zunimmt.

Die untersuchten Tyrosinphosphorylierungsstellen sind jeweils Startpunkte bestimmter Signaltransduktionskaskaden. Tyrosin-845 wird durch die Tyrosinkinase c-Src phosphoryliert und zieht eine Aktivierung von STAT5b (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5b*) und in der Folge eine Stimulation der DNA-Replikation nach sich. Bindestelle für die Phospholipase $C\gamma$ (PLC γ) ist Phospho-Tyrosin-992. PLC γ führt über die Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und diese wiederum zur Stimulation mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) der MAPK-Kaskade. Phosphorylierung von Tyrosin-1045 verursacht über Bindung von c-Cbl Ubiquitinierung und Abbau des EGF-Rezeptors. Tyr-1068 und -1086 sind nach Phosphorylierung Bindestellen von Grb2 und Gab1. Grb2 führt zur Aktivierung der MAPK-Kaskade, während Gab1 über p85 eine Aktivierung der Phosphoinositid-3'-kinase (PI3K)/Akt-Kaskade verursacht. Tyrosin-1148 und -1173 ziehen nach Phosphorylierung schließlich über SHC, oder im Falle von Tyr-1173 auch über PLC γ und PKC, ebenfalls die Aktivierung der MAPK-Kaskade nach sich. UVB (100 J/m^2) induziert keine nennenswerte Zunahme der Phosphorylierung eines der genannten Tyrosinreste. Demnach sollte die hier untersuchte p38^{MAPK}-abhängige UVB-induzierte COX-2-Expression ihren Ursprung nicht maßgeblich am EGF-Rezeptor nehmen.

Um das unterschiedliche Verhalten des EGF-Rezeptors nach EGF-Behandlung und UVB-Bestrahlung näher zu beleuchten, wurden EGF-behandelte oder UVB-bestrahlte HaCaT-

Zellen 15, 30 und 60 Minuten später mit Formaldehydlösung fixiert, anschließend mit Methanol permeabilisiert und immunocytochemisch analysiert. Sowohl die Lokalisierung des EGF-Rezeptors als auch der allgemeinen Tyrosinphosphorylierung wurden dabei mittels der entsprechenden Antikörper in 200-facher Vergrößerung sichtbar gemacht.

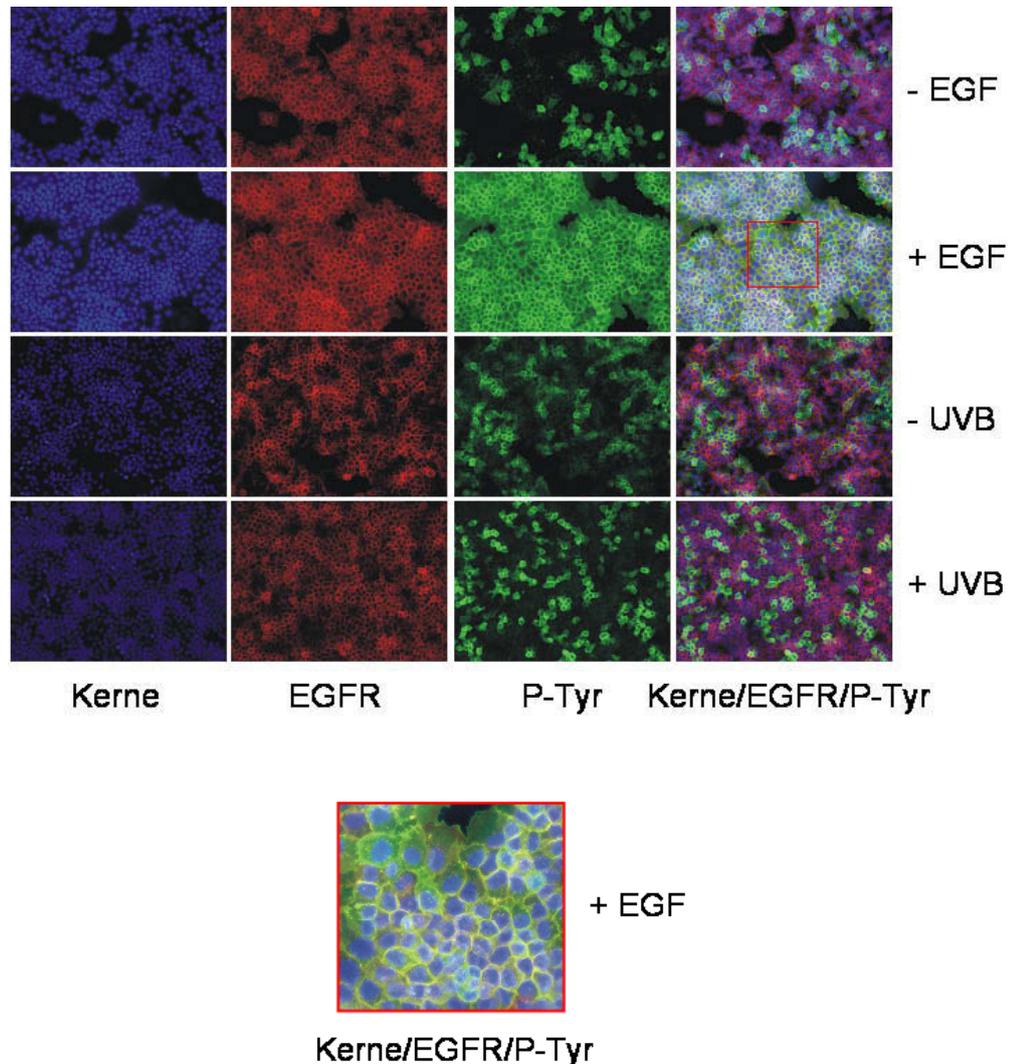


Abb. 3.17: Zelluläre Lokalisation von EGF-Rezeptor und Tyrosinphosphorylierung nach EGF-Behandlung und UVB-Bestrahlung (I). HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 ng/ml EGF behandelt oder mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt. Nach 15 min wurden die Zellen mit Formaldehydlösung fixiert und anschließend mit Methanol permeabilisiert. Die zelluläre Lokalisation von EGFR (rot) und Phospho-Tyrosin (grün) wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI angefärbt. Die abgebildeten Aufnahmen sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

Wie **Abb. 3.17** zu entnehmen, lässt sich im Falle der 100 ng/ml EGF-Behandlung nach 15 Minuten erwartungsgemäß eine sehr deutliche Steigerung der Tyrosinphosphorylierung (grün)

erkennen, welche zum allergrößten Teil in der Zytoplasmamembran vorzufinden ist und dort zudem eindeutig mit dem EGF-Rezeptor (rot) kolokalisiert (Mischfarbe: gelblich). Hingegen ist 15 Minuten nach 100 J/m^2 UVB-Bestrahlung diese eindeutige Zunahme der Tyrosinphosphorylierung nicht zu erkennen. Die mit dieser Dosis bestrahlten Zellen bieten bezüglich EGF-Rezeptor und Tyrosinphosphorylierung ein ähnliches Bild wie die scheinbestrahlten Kontrollzellen. Es ist allenfalls eine leichte Zunahme der Tyrosinphosphorylierung feststellbar. Interessanterweise findet sich eine basal erhöhte Tyrosinphosphorylierung in Gruppierungen von HaCaT-Zellen, welche ca. 25 % der Gesamtzellpopulation ausmachen. Diese Phosphorylierung ist teilweise im Zellinneren und teilweise in der Zytoplasmamembran mit dem EGF-Rezeptor kolokalisiert. Letzteres entspricht den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen von **Abb. 3.16 B**, nach denen am Tyrosin-992 eine basale Phosphorylierung zu erkennen ist.

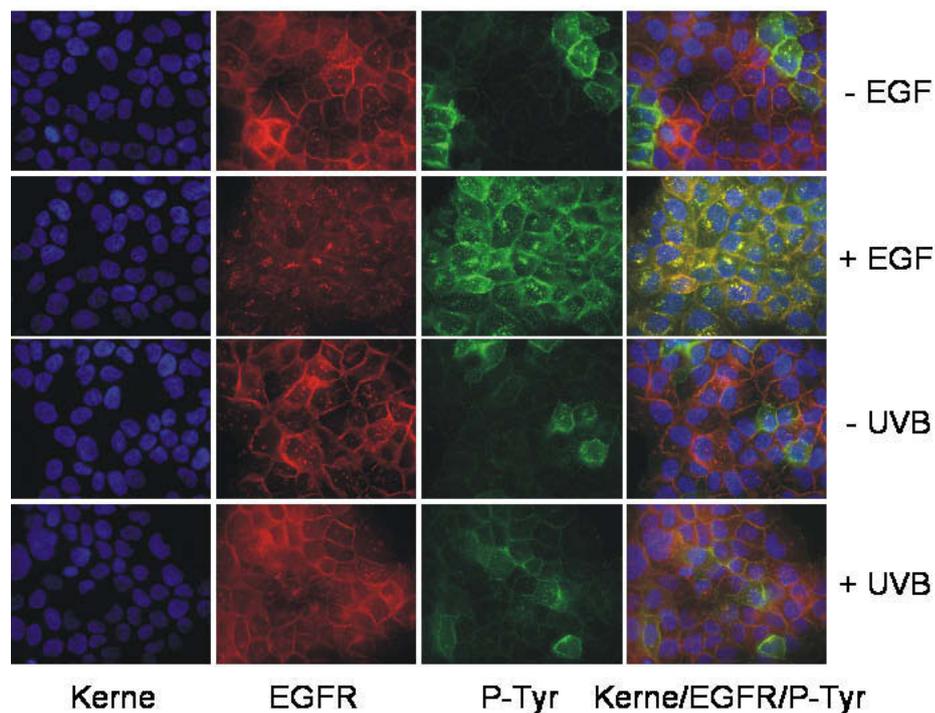


Abb. 3.18: Zelluläre Lokalisation von EGF-Rezeptor und Tyrosinphosphorylierung nach EGF-Behandlung und UVB-Bestrahlung (II). HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 ng/ml EGF behandelt oder mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt. Nach 30 min wurden die Zellen mit Formaldehydlösung fixiert und anschließend mit Methanol permeabilisiert. Die zelluläre Lokalisation von EGFR (rot) und Phospho-Tyrosin (grün) wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung sichtbar gemacht. Zellkerne (blau) wurden mittels DAPI angefärbt. Die abgebildeten Aufnahmen sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

Auch 30 Minuten nach Behandlung und bei 1000-facher Vergrößerung (**Abb. 3.18**) ist im Falle der UVB-Bestrahlung kein deutlicher Unterschied hinsichtlich EGF-Rezeptor-Lokalisation und Tyrosinphosphorylierung zu sehen. Lediglich eine geringfügige und über die gesamte Zelle verteilte Zunahme der Tyrosinphosphorylierung ist feststellbar. Im Falle der EGF-Behandlung ist wiederum eine starke Zunahme der Tyrosinphosphorylierung (grün) und eine deutliche Kolokalisation dieser mit dem EGF-Rezeptor (rot) zu erkennen (Mischfarbe: gelb). EGF-Rezeptor und Tyrosinphosphorylierung sind zum Teil noch in der Zytoplasmamembran anzutreffen, zum Großteil aber auch erwartungsgemäß internalisiert und fokussiert im Zytoplasma. Ergebnisse 60 Minuten nach Behandlung mit EGF bzw. Bestrahlung mit UVB sind mit jenen nach 30 Minuten vergleichbar ($n = 2$, ohne Abbildung).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach der EGF-Behandlung von HaCaT-Zellen eine starke Zunahme der Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors mit anschließender Internalisierung des Rezeptors zu erkennen ist, nach UVB-Bestrahlung hingegen keine Auswirkungen vergleichbaren Ausmaßes auf den EGF-Rezeptor festzustellen sind.

Aus **Abb. 3.15 A** geht hervor, dass EGF in der eingesetzten Konzentration von 100 ng/ml und UVB bei der angewandten Dosis von 100 J/m² zu einer Induktion der COX-2-Expression vergleichbaren Ausmaßes führen. Zusammen mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen in **Abb. 3.16** muss davon ausgegangen werden, dass die Rolle des EGF-Rezeptors bei diesen beiden Arten der COX-2-Induktion unterschiedlich ist. Aufgrund der in **Abb. 3.15 C** gezeigten Hemmbarkeit der UVB-induzierten COX-2-Expression durch den EGFR-Inhibitor AG1478 kann eine Beteiligung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität an dem hier untersuchten UVB-induzierten Prozess allerdings nicht ausgeschlossen werden. So ist beispielsweise eine basale und/oder geringfügig induzierte Aktivität des EGF-Rezeptors als notwendige Bedingung für das Stattfinden einer zur Induktion der COX-2-Expression führenden durch UVB anderenorts initiierten Signalkaskade denkbar.

Eine maßgebliche Beteiligung des EGF-Rezeptors an der UVB-induzierten COX-2-Expression in Form einer eindeutigen Stimulation seiner Tyrosinphosphorylierung mit anschließender Internalisierung des Rezeptors ist in HaCaT-Zellen bei einer Dosis von 100 J/m² unwahrscheinlich. Der Einsatz des Hemmstoffs U0126 für die ERK 1 und 2 phosphorylierenden Kinasen MEK 1/2 hatte keine Verminderung der COX-2-Induktion nach UVB-Bestrahlung zur Folge (**Abb. 3.19**). Für die COX-2-Induktion durch UVB sollte danach die Aktivierung der typischen durch EGF ausgelösten Signalkaskade EGFR → Ras → Raf → MEK 1/2 → ERK 1/2 nicht notwendig sein.

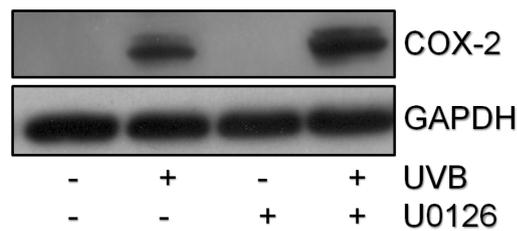


Abb. 3.19: Induktion der COX-2-Expression durch UVB ist unabhängig von MEK 1/2. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit dem MEK 1/2-Inhibitor U0126 (10 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Anschließend wurde mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und mit dem Inhibitor postinkubiert. Die Zellen wurden nach 8 Stunden lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche.

Obgleich keine eindeutige Stimulation und Internalisierung des EGF-Rezeptors in HaCaT-Zellen bei einer UVB-Dosis von 100 J/m^2 festzustellen ist, führt UVB-Bestrahlung eben genannter Dosis nach 30 Minuten zu einer mit 100 ng/ml EGF-Behandlung vergleichbaren Phosphorylierung von ERK 1/2 (**Abb. 3.20**).

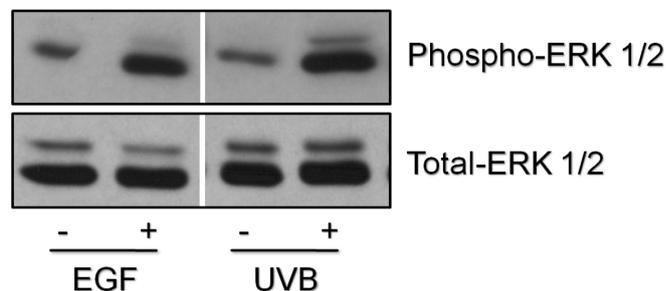


Abb. 3.20: Aktivierung von ERK1/2 nach EGF-Behandlung und UVB-Bestrahlung. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 ng/ml EGF behandelt oder mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt und nach 30 Minuten lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blotting auf Phospho-ERK 1/2 und Total-ERK 1/2 (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

Die Stimulation des EGF-Rezeptors mit 100 ng/ml EGF führt zu einer Induktion der COX-2-Expression, welche in ihrem Ausmaß der nach UVB-Bestrahlung ähnlich ist (**Abb. 3.15 A**). Um zu testen, ob die für die UVB-induzierte COX-2-Expression essenziellen Proteine p38^{MAPK} und HuR hier beteiligt sind, wurden HaCaT-Zellen in Gegenwart des p38^{MAPK} -Hemmstoffs SB202190 bzw. nach Depletion von HuR mit EGF behandelt (**Abb. 3.21**). Im Gegensatz zur UVB-induzierten COX-2-Expression hat weder p38^{MAPK} -Hemmung durch

SB202190 noch Depletion von HuR mittels siRNA einen Einfluss auf die EGF-induzierte Expression von COX-2-Protein. Es ist dies ein wichtiger Anhaltspunkt für eine nicht auf die Aktivierung des EGF-Rezeptors angewiesene UVB-induzierte COX-2-Expression über p38^{MAPK} und HuR.

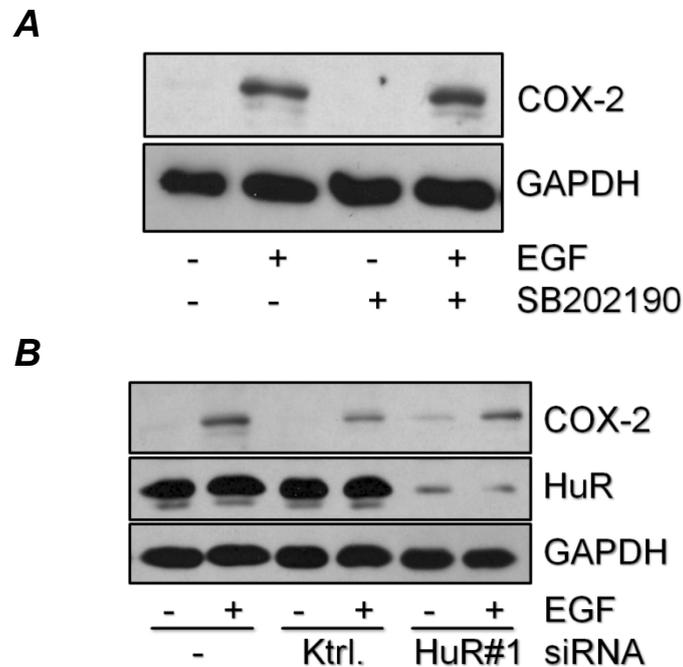


Abb. 3.21: p38^{MAPK} und HuR sind nicht an der EGF-induzierten COX-2-Expression beteiligt. (A) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit dem p38-Inhibitor SB202190 (5 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml EGF behandelt, mit dem Inhibitor für 8 Std. postinkubiert, lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 voneinander unabhängige Experimente. (B) HaCaT-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter (HuR#1) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. Zudem wurde mit Transfektionsagens alleine (-) versetzt. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 ng/ml EGF behandelt, nach 8 Std. (und damit 72 Std. nach Transfektion) lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2, HuR und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 voneinander unabhängige Experimente.

Hinsichtlich der zur COX-2-Induktion führenden Signalkaskade nach EGF-Stimulation sollte auf eine Beteiligung von MEK 1/2 getestet werden. Hierzu wurde der MEK 1/2-Hemmstoff U0126 eingesetzt, gefolgt von Stimulation der Zellen mit EGF. Wie **Abb. 3.22** zu entnehmen, wurde die EGF-stimulierte COX-2-Expression in Gegenwart von U0126 nicht vermindert. Ähnlich wie für die durch UVB induzierte lässt sich demnach für die mit EGF stimulierte COX-2-Expression annehmen, dass diese nicht über die EGF-Rezeptor-MEK-ERK-Achse verläuft.

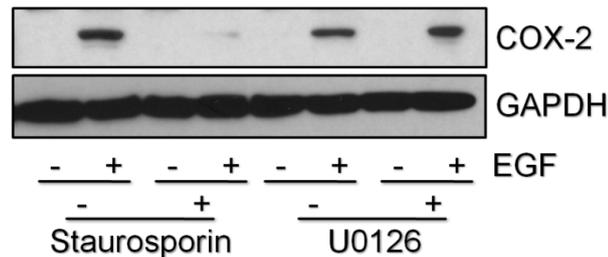


Abb. 3.22: Hemmung der EGF-induzierten COX-2-Expression durch Staurosporin. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit Staurosporin (100 nM), U0126 (10 μ M) oder DMSO (Lösemittelkontrolle) präinkubiert. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml EGF behandelt, mit dem entsprechenden Inhibitor für 8 Std. postinkubiert, lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente.

Eine weitere vom EGF-Rezeptor ausgehende Signalkaskade verläuft über Phospholipase C (PLC γ), die Freisetzung von DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) sowie die daraus resultierende intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺ und Aktivierung von Isoformen der Proteinkinase C (PKC). So bietet **Abb. 3.22**, in der deutlich die Hemmbarkeit der EGF-induzierten COX-2-Expression durch 100 nM Staurosporin, einen Inhibitor der PKC, sichtbar ist, einen starken Hinweis auf eine Beteiligung von PKC.

Zum Test auf eine Beteiligung der PKC auch bei der UVB-induzierten COX-2-Expression wurde zunächst ebenfalls Staurosporin (100 nM) verwendet. Wie **Abb. 3.23 A** zeigt, kommt es auch hier zu einer starken Hemmung der induzierten COX-2-Expression.

Die daraus angestellte Vermutung einer Notwendigkeit von PKC-Aktivität wurde mittels des für die PKC-Isoformen α (IC₅₀ = 0,008 μ M) und β 1 (0,018 μ M) („konventionelle PKC“), δ (0,21 μ M) und ϵ (0,132 μ M) („neuartige PKC“) und ζ (5,8 μ M) („atypische PKC“) der PKC spezifischen Inhibitors Bisindolylmaleimid I (BIM I) überprüft. Wie **Abb. 3.23 B** zu entnehmen, konnte eine von der Konzentration des Hemmstoffs abhängige Verminderung der UVB-induzierten COX-2-Expression festgestellt werden. Eine detektierbare Verminderung der COX-2-Induktion tritt dabei ab 1 μ M BIM I auf. Bei 3 μ M ist diese Abschwächung des COX-2-Signals deutlich zu erkennen und bei 10 μ M nahezu vollständig. Aufgrund der für die einzelnen PKC-Isoformen anzunehmenden IC₅₀-Werte (Martiny-Baron et al., 1993) ist eine Beteiligung der atypischen DAG- und Ca²⁺-unabhängigen Isoform ζ unwahrscheinlich. Zudem ist auch eine unspezifische Hemmung der PKA (K_i = 2 μ M; Toullec et al., 1991) unwahrscheinlich.

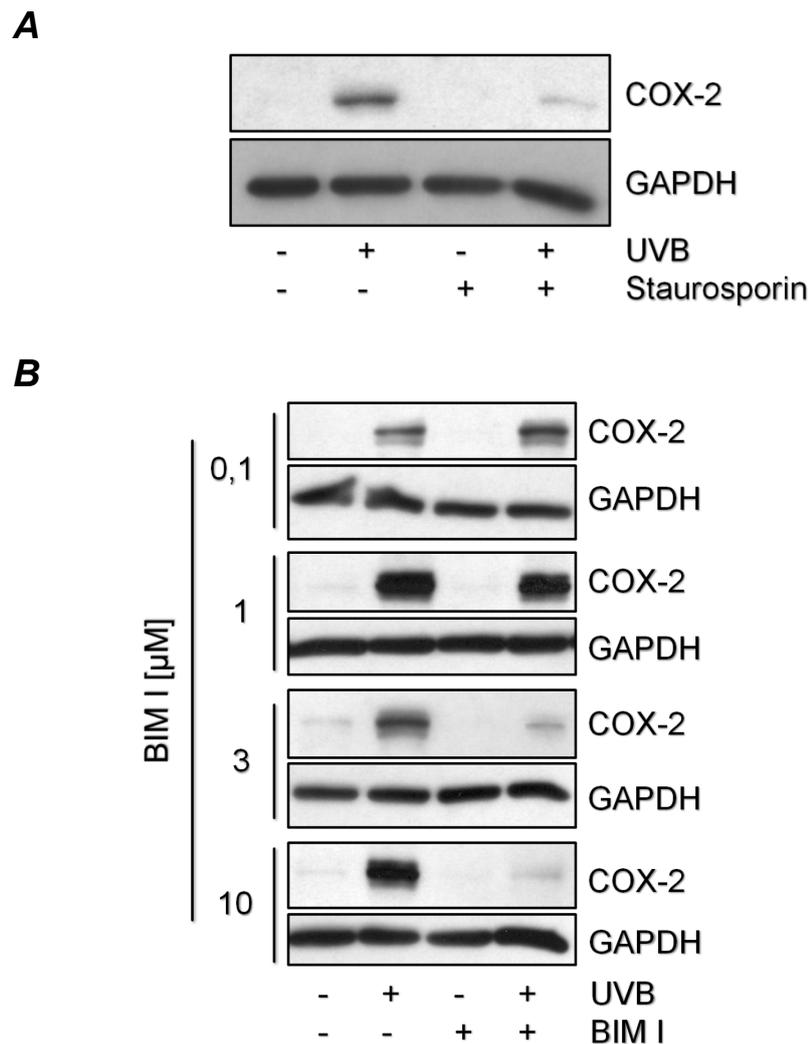


Abb. 3.23: Beteiligung von PKC an der UVB-induzierten COX-2-Expression. HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion 30 min mit Staurosporin (100 nM), dem PKC-Inhibitor BIM I in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) präinkubiert. Die Zellen wurden mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt, mit dem entsprechenden Inhibitor für 8 Std. postinkubiert, lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 (B) bzw. 2 (C) voneinander unabhängige Experimente.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die UVB-Induktion der COX-2 über p38^{MAPK} und HuR zumindest in den hier verwendeten physiologisch relevanten Dosen nicht ihren Ursprung in der Zunahme der Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors hat. Die Hemmbarkeit der COX-2-Induktion nach UVB durch AG1478 lässt allerdings vermuten, dass eine basale Aktivität des Rezeptors, etwa zur Aufrechterhaltung einer gewissen PKC-Aktivität, zur Ermöglichung einer anderenorts UVB-initiierten zur COX-2-Induktion führenden Signaltransduktion notwendig ist.

3.3.2 Die Rolle des Ah-Rezeptors bei der COX-2-Induktion nach UVB

Fritsche et al. (2007) wiesen die Bildung von 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) aus Tryptophan in UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen nach. FICZ bindet mit hoher Affinität an den Ah-Rezeptor (Arylhydrocarbon-Rezeptor) (Rannug et al., 1987; Rannug et al., 1995) und kann diesen so aktivieren. Es sollte daher die Bedeutung des Ah-Rezeptors im untersuchten System der UVB-induzierten COX-2-Expression ermittelt werden.

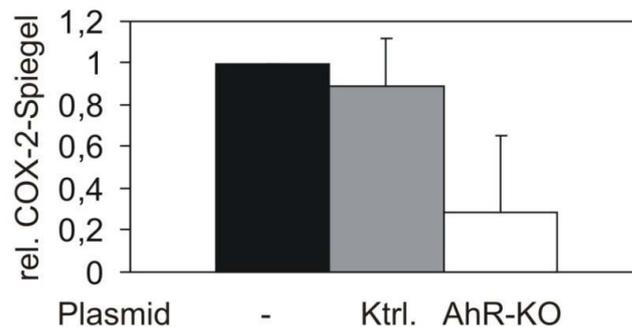


Abb. 3.24: Beteiligung des Ah-Rezeptors an der UVB-induzierten COX-2-Expression. HaCaT VSV-G- (-) (Leervektor), HaCaT EM140 N3- (Ktrl.) (Vektor mit Kontrollinsert) und HaCaT VSV-G N1-Zellen (AhR-KO) (Vektor mit AhR-KO-Insert) wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt oder scheinbestrahlt, nach 6 Std. lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der densitometrischen Auswertung liegen 3 voneinander unabhängige Experimente zu Grunde. Angegeben sind die auf den Wert der HaCaT VSV-G-Zellen (-) normierten COX-2-Spiegel nach UVB-Bestrahlung als Mittelwerte ± Standardabweichung.

Es wurden zu diesem Zwecke Ah-Rezeptor-defiziente HaCaT-Zellen (AhR-KO) und die entsprechenden Kontrollzellen, d.h. nur mit Vektor (-) bzw. mit Vektor und Kontrollinsert stabil transfizierte (Ktrl.) HaCaT-Zellen mit UVB bestrahlt (100 J/m²). Dabei wurde 6 und 8 Stunden nach Exposition lysiert und eine Western-Blot-Analyse auf COX-2 durchgeführt. **Abb. 3.24** zeigt, dass bei den AhR-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (-) ein im Mittel um ca. 70 % geringerer COX-2-Spiegel 6 Stunden nach UVB-Bestrahlung vorzufinden ist. Der Ah-Rezeptor ist demnach für einen Teil der COX-2-Induktion notwendig.

Umgekehrt sollte demnach nach Stimulation des Ah-Rezeptors eine entsprechende Steigerung der COX-2-Expression induzierbar sein. Hierzu wurden HaCaT-Zellen zum einen mit 100 nM FICZ und zum anderen mit 1 oder 10 µM 3-Methylcholanthren (3-MC) inkubiert.

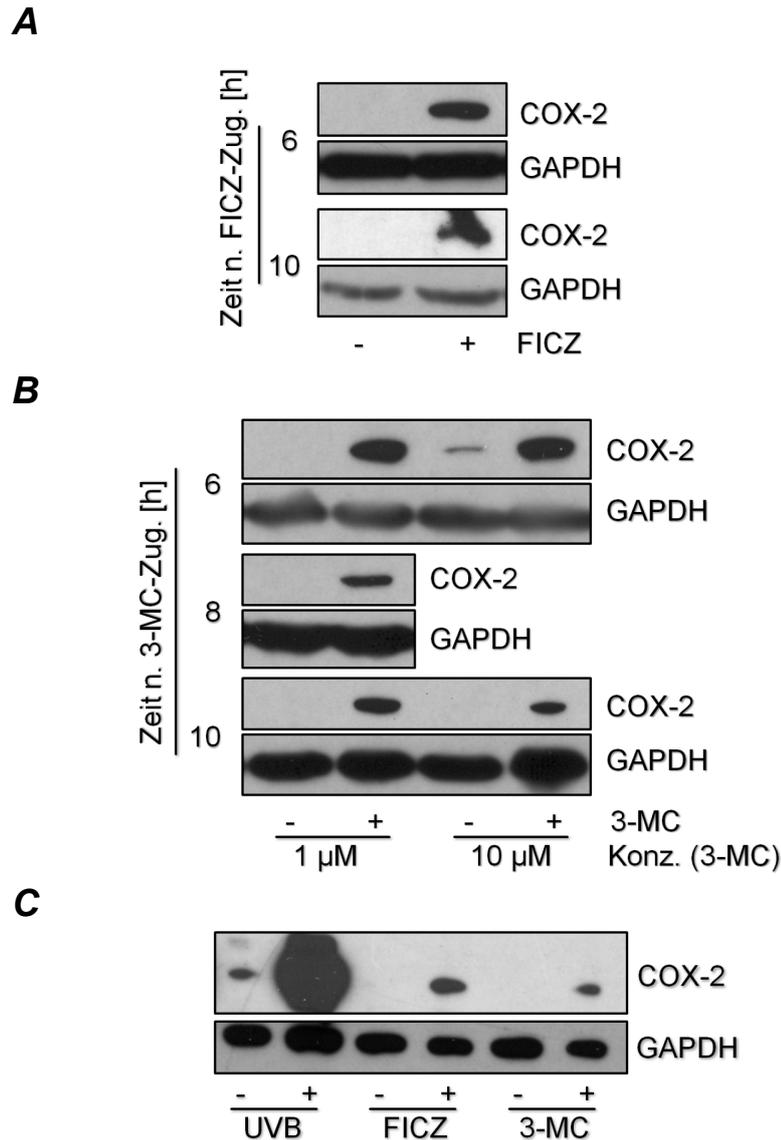


Abb. 3.25: Induzierbarkeit der COX-2-Expression durch Liganden des Ah-Rezeptors. (A, B) HaCaT-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 pM 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), 1 μ M oder 10 μ M 3-Methylcholanthren (3-MC) versetzt, nach den angegebenen Zeiten lysiert und mittels Western-Blotting auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils 4 voneinander unabhängige Versuche. **(C)** Gezeigt ist die vergleichende Western-Blot-Analyse der COX-2-Induktion durch 100 J/m² UVB und durch 100 pM FICZ sowie 10 μ M 3-MC. Die Zellen wurden jeweils nach 6 Stunden lysiert.

Wie **Abb. 3.25 A** bzw. **B** zu entnehmen, kam es sowohl durch FICZ als auch durch 3-MC bei den verwendeten Konzentrationen tatsächlich zu einer Induktion der COX-2-Expression. Vergleicht man diese in **Abb. 3.25 C** mit der UVB-induzierten, so findet man eine weitaus stärkere Induktion nach UVB-Bestrahlung mit 100 J/m² als nach Behandlung mit den beiden AhR-Liganden FICZ und 3-MC vor. Zusammen mit der nur teilweisen Unterdrückung der

COX-2-Induktion in AhR-defizienten HaCaT-Zellen legt dies nahe, dass die Signaltransduktionsprozesse, die in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung zur Induktion der COX-2-Expression führen, nicht ausschließlich in der Bindung von Photoprodukten wie FICZ am AhR ihren Ursprung nehmen.

3.4 Stimulation des EGF-Rezeptors durch UVA

Im Falle von UVA war ungeklärt, ob Bestrahlung eine Aktivierung des EGF-Rezeptors (Zhang et al., 2001; Gulati et al., 2004) oder eine Verminderung des Rezeptorspiegels ohne Tyrosin-Phosphorylierung (He et al., 2003) zur Folge hat. Entsprechend wurde für ERK 1/2 teilweise eine Zunahme aber teilweise auch keine Zunahme der Phosphorylierung (Klotz et al., 2000) durch UVA-Bestrahlung berichtet. In Untersuchungen an mit UVA bestrahlten HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass für die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an dem typischen zur Aktivierung der MAPK-Kaskade führenden Tyrosin-1068 bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein müssen (von Montfort et al., 2006a).

Einfache Bestrahlung von HeLa-Zellen mit UVA einer physiologisch relevanten Dosis von 30 J/cm² in (Dulbecco's) PBS (D/P) hat keine entsprechende Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyr-1068 zur Folge, im Unterschied zur Situation nach Stimulation mit 100 ng/ml EGF (**Abb. 3.26 A**). Erst Präinkubation mit 100 µM des allgemeinen Tyrosinphosphatase-Inhibitors Orthovanadat für 1 Stunde mit anschließender Bestrahlung in sowohl Riboflavin als auch Tryptophan und/oder HEPES-haltigem, farblosem Zellkulturmedium (M), hat eine der EGF-Behandlung vergleichbare EGF-Rezeptor-Phosphorylierung zur Folge. Wie von Montfort et al. (2006a) zeigen konnten, gilt das soeben über die EGF-Rezeptor-Phosphorylierung nach UVA-Bestrahlung Gesagte auch für HaCaT-Zellen.

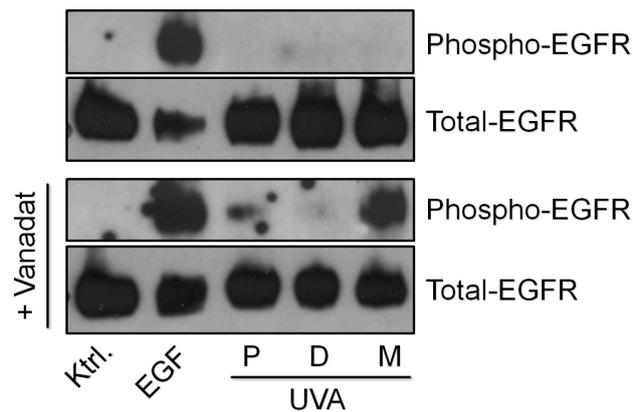
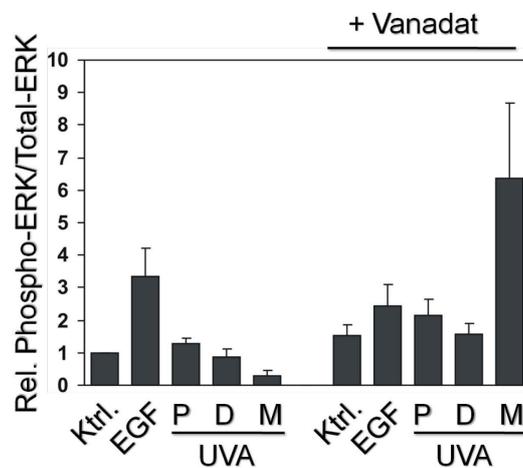
A**B**

Abb. 3.26: Stimulation von EGF-Rezeptor- und ERK 1/2 nach UVA-Bestrahlung in HeLa-Zellen (I). (A) HeLa-Zellen wurden über Nacht serumdepletiert und gegebenenfalls mit 100 μ M Vanadat für 1 Stunde präinkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde durch PBS (P), Dulbecco's PBS (D) oder farbloses Zellkulturmedium (M) mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlt bzw. mit 100 ng/ml EGF behandelt. Die Zellen wurden umgehend lysiert und durch Western-Blot-Analyse auf Total- und Phospho (Tyr-1068)-EGFR untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche. (B) Die wie unter (A) behandelten Zellen wurden lysiert und mittels eines ELISAs auf Total- und auf Phospho-ERK 1/2 analysiert. Es wurden die Quotienten aus Phospho- und Total-ERK 1/2 gebildet und auf denjenigen Quotienten unbehandelter Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Vanadatbehandlung vor der UVA-Bestrahlung ist notwendig, um durch Hemmung entsprechender Tyrosin-Phosphatasen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors zu unterdrücken, ihn also damit der Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung zugänglicher zu machen (von Montfort et al., 2006a). Die notwendige Anwesenheit von Zellkulturmedium bei der Bestrahlung ist dadurch zu erklären, dass es mit Riboflavin und Tryptophan ein unter UVA-Bestrahlung ROS-erzeugendes Photosensibilisatorsystem enthält (Mahns et al., 2003).

Wie der Vergleich von Ca^{2+} -haltigem Dulbecco's PBS (D) und Ca^{2+} -freiem PBS (P) in **Abb. 3.26 A** zeigt, ist die Anwesenheit von Ca^{2+} im Zellkulturmedium (M) keine Voraussetzung für die beobachtete EGFR-Phosphorylierung. Auch nach Bestrahlung von mit Vanadat vorbehandelten Zellen durch Ca^{2+} -haltiges Dulbecco's PBS war keine Phosphorylierung des EGFR an Tyrosin-1068 feststellbar. Die Stimulation von p38^{MAPK} durch UVA ist hingegen auch ohne vorherige Inkubation mit Vanadat und in PBS, also unabhängig von einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors, nachweisbar (von Montfort et al., 2006a).

Analog einer EGF-induzierten Phosphorylierung vergleichbaren Phosphorylierung des EGFR nach UVA sollte auch Aktivierung von ERK 1/2 die Vorstimulation mit Vanadat und Bestrahlung in entsprechendem Zellkulturmedium erfordern. Dies wurde mittels ELISA auf Phospho- und Total-ERK 1/2 quantitativ überprüft. Wie in **Abb. 3.26 B** dargestellt, wurde dieser Zusammenhang bestätigt. Gezeigt sind die Quotienten aus Phospho- und Total-ERK 1/2-Spiegeln. Dabei wurde auf den Quotienten unbehandelter Zellen normiert. Erkennbar ist hier, außer im Falle der EGF-Behandlung, die Zunahme der ERK 1/2-Phosphorylierung nach Vanadatbehandlung bei allen Proben um ca. einen Faktor von 1,5 im Vergleich zu den jeweiligen nicht mit Vanadat behandelten Proben, was auf eine schon basal erhöhte Aktivität des EGF-Rezeptors durch Tyrosin-Phosphatase-Hemmung zurückzuführen ist. Erkennbar ist weiterhin eine leichte Zunahme der ERK 1/2-Phosphorylierung bei in PBS bestrahlten HeLa-Zellen, welche in ihrem Ausmaß allerdings vanadatunabhängig ist. Im Falle der in Zellkulturmedium bestrahlten mit Vanadat vorstimulierten Zellen, kommt es zu einem starken Anstieg der ERK 1/2-Phosphorylierung um einen Faktor von ca. 6,5 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Weder 100 μM Vanadat (Spur #3) noch 30 J/cm^2 UVA in Zellkulturmedium (#4) sind alleine ausreichend, um eine der EGF-Behandlung (#2) vergleichbare Phosphorylierung von EGFR und ERK 1/2 in Hela-Zellen zu erzielen (**Abb. 3.27**). UVA-Bestrahlung in Zellkulturmedium führt lediglich in Verbindung mit vorhergehender Vanadat-Behandlung zu einer entsprechenden Phosphorylierung von EGFR und ERK 1/2 (#5). Diese Phosphorylierung des durch Vanadat-Behandlung voraktivierten EGFR wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das im Zellkulturmedium photochemisch durch UVA-Strahlung gebildete H_2O_2 verursacht (von Montfort et al., 2006a).

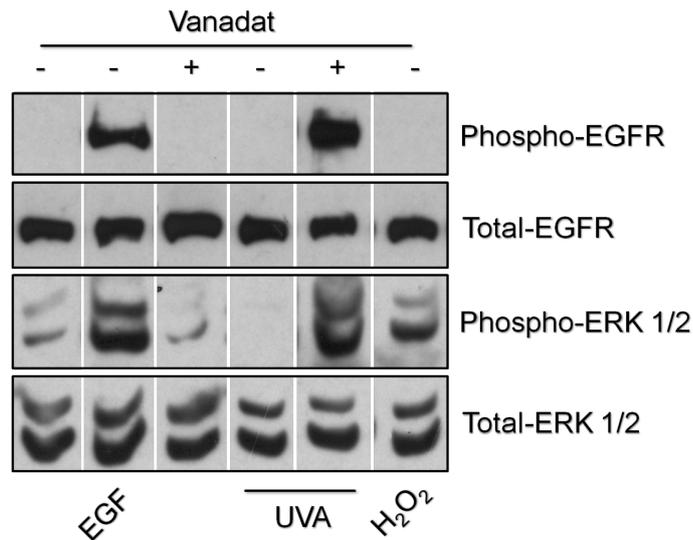


Abb. 3.27: Stimulation von EGF-Rezeptor- und ERK 1/2 nach UVA-Bestrahlung in HeLa-Zellen (II). HeLa-Zellen wurden über Nacht serumdepletiert und gegebenenfalls mit 100 μM Vanadat für 1 Stunde präinkubiert. Es wurde mit 100 ng/ml EGF behandelt, durch farbloses Zellkulturmedium mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlt oder mit 125 μM H_2O_2 versetzt. Nach umgehender Lyse wurden durch Western-Blotting Total- und Phospho (Tyr-1068)-EGFR sowie Total- und Phospho-ERK 1/2 nachgewiesen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche.

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ist ein wichtiger Mediator der Wirkung von UVA-Strahlung auf Signaltransduktionsprozesse (Klotz et al., 1997; Klotz et al., 1999). Laut **Abb. 3.28** führt Belastung von Zellen mit $^1\text{O}_2$ allerdings zur Unterdrückung der EGF-induzierten EGFR-Phosphorylierung an Tyrosin-1068 durch Weißlicht-Bestrahlung in Anwesenheit von 300 nM des Photosensibilisators Bengalrosa (BR), also bei Bedingungen, die zur Bildung von $^1\text{O}_2$ führen (Klotz et al., 1999). Diese Abnahme ist zum Teil auf den Verlust des Rezeptors zurückzuführen (Abnahme des Total-EGFR-Signals). Auch nach Vorbehandlung mit 100 μM Vanadat kommt es zu der beobachteten Unterdrückung der EGFR-Phosphorylierung. Parallel zu dieser Hemmung der EGFR-abhängigen Signaltransduktion führt die Erzeugung von $^1\text{O}_2$ jedoch zu einer deutlichen Phosphorylierung der $\text{p}38^{\text{MAPK}}$ in HeLa-Zellen (von Montfort et al., 2006a). Dies verdeutlicht die Möglichkeit einer von einer Phosphorylierung des EGF-Rezeptors völlig unabhängigen Aktivierung der $\text{p}38^{\text{MAPK}}$ durch ROS, welche auch durch UV-Strahlung erzeugt werden können.

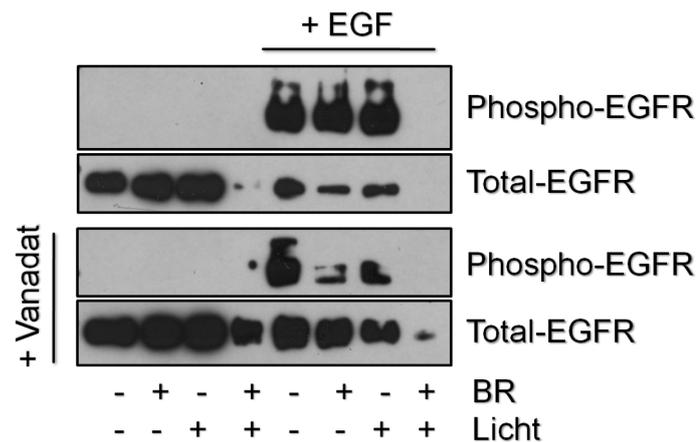


Abb. 3.28: Singulett-Sauerstoff hemmt die Phosphorylierung des EGFR in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden über Nacht serumdepletiert und gegebenenfalls mit 100 μ M Vanadat für 1 Stunde präinkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde in Anwesenheit von 300 nM Bengalrosa (BR) durch PBS für 10 min mit Weißlicht bestrahlt und anschließend gegebenenfalls für 15 min mit EGF (100 ng/ml) behandelt. Es wurde dann lysiert und eine Western-Blot-Analyse auf Total- und Phospho (Tyr-1068)-EGFR vorgenommen. Die abgebildeten Daten sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche.

Im Gegensatz zu $^1\text{O}_2$ führt nach Vorbehandlung mit 100 μ M Vanadat schon die Zugabe von 125 μ M H_2O_2 zu einer erkennbaren Phosphorylierung des EGF-Rezeptors am Tyrosin-1068. Ohne Vorbehandlung mit Vanadat ist letztere hingegen erst bei 10 mM H_2O_2 festzustellen (ohne Abbildung, vgl. von Montfort et al., 2006a). Nun zeigt **Abb. 3.27**, dass H_2O_2 in einer Konzentration von 125 μ M ohne vorherige Vanadat-Behandlung (Spur #6) eine deutliche Phosphorylierung von ERK 1/2 zu verursachen vermag, ohne dass es zu einer entsprechenden Phosphorylierung des EGFR kommt.

Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da es verdeutlicht, dass sogar ERK 1/2, typische Glieder der EGFR-Signalkaskade, durch ROS aktiviert werden können, ohne dass dafür eine entsprechend detektierbare Phosphorylierung des EGFR stattfinden muss. Eine solche Induktion der ERK 1/2-Phosphorylierung ohne deutliche Aktivierung des EGFR (vgl. **Abb. 3.16**) ist auch in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit UVB zu beobachten (vgl. **Abb. 3.20**).

4 Diskussion

4.1 Die Frage nach dem Zusammenhang von p38^{MAPK} und HuR

Es war in dieser Arbeit festzustellen, dass die UVB-induzierte Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma von p38^{MAPK} unabhängig ist (s. **Abb. 3.14**). Die für seine Funktion als mRNA-Bindeprotein im Zytoplasma notwendige Translokation von HuR kann prinzipiell von der Aktivität verschiedener Kinasen abhängig sein. Im Falle der ATP γ S- oder Angiotensin II-induzierten COX-2-Expression wurde eine Phosphorylierung von HuR durch PKC α bzw. δ im Kern mit nachfolgender Translokation ins Zytoplasma und Stabilisierung der COX-2-mRNA berichtet (Doller et al., 2007 & 2008). Bei der durch die oxidativen Taxane (Subbaramaiah et al., 2003) oder das Zytokin IL-1 β (Jin et al., 2007) bewirkten COX-2-Induktion und der durch das peroxidierend wirkende Sulindac verursachten γ -GCSH-Induktion (Song et al., 2005) wurde hingegen eine Notwendigkeit von p38^{MAPK}-Aktivität für die Translokation von HuR ins Zytoplasma festgestellt. Darüberhinaus konnte in Zellen mit konstitutiv aktiver MAPK-aktivierter Kinase-2 (MK-2), einem direkten Ziel von p38^{MAPK}, welches auch nach H₂O₂-Behandlung phosphoryliert wird, eine verstärkte Translokation von HuR und eine damit einhergehende Stabilisierung der mRNAs des Urokinase-Plasminogen-Aktivators und seines Rezeptors beobachtet werden (Tran et al., 2003). Es wurde allerdings bislang keine direkte Phosphorylierung von HuR durch p38^{MAPK} oder MK-2 nachgewiesen.

Desweiteren wurde kürzlich gefunden, dass UVB-Strahlung in HaCaT-Zellen zu einer Inaktivierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) führt, welche HuR durch Phosphorylierung im Kern zurückhält, und auf diese Weise zur Translokation von HuR ins Zytoplasma beiträgt (Zhang & Bowden, 2008). UVC-Strahlung verursacht eine Inaktivierung der zyklinabhängigen Kinase 1 (Cdk1), welche ebenfalls durch Phosphorylierung HuR im Kern hält, und dadurch eine entsprechende Translokation von HuR (Abdelmohsen et al., 2008). Obgleich eine solche Hemmung einer inaktivierenden Kinase durch UV-Bestrahlung bereits gefunden wurde, stellt sich im Falle UVB-bestrahlter HaCaT-Zellen weiterhin die Frage nach der Beteiligung einer HuR bezüglich seiner Translokation ins Zytoplasma aktivierenden Kinase. Eine solche Beteiligung von p38^{MAPK} ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit unwahrscheinlich. Denkbar ist hier etwa eine Beteiligung der PKC, wie im Falle der ATP γ S-induzierten COX-2-Expression (Doller et al., 2007). Denn die AMPK sollte auch in diesem Falle durch ATP γ S, ein stabiles ATP-Analogon, gehemmt werden. Tatsächlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Notwendigkeit von PKC-Aktivität bei der UVB-induzierten

COX-2-Expression in HaCaT-Zellen als wahrscheinlich herausgestellt (s. **Abb. 3.23**). Welche Rolle dabei PKC für die Translokation von HuR ins Zytoplasma spielt, gälte es noch zu untersuchen.

Im Falle von p38^{MAPK} kann angenommen werden, dass diese zwar keine Rolle bei der UVB-induzierten Translokation von HuR spielt, aber dennoch zur Aktivierung der RNA-Bindfähigkeit von HuR im Zytoplasma beiträgt. So wurde in den bereits erwähnten Fällen der COX-2- bzw. γ -GCSH-Induktion durch Taxane bzw. Sulindac (Subbaramaiah et al., 2003; Song et al., 2005) eine Notwendigkeit von p38^{MAPK}-Aktivität auch für die mRNA-Bindung von HuR im Zytoplasma gefunden. Diese Ergebnisse sprechen für HuR als Mediator p38^{MAPK}-verursachter mRNA-Stabilisierung, und zwar über eine p38^{MAPK}-vermittelte Translokation ins Zytoplasma hinaus.

Es gibt jedoch auch Hinweise, welche gegen eine solche Rolle von HuR als Zielstruktur von p38^{MAPK} und vielmehr für zwei separate Wege der mRNA-Stabilisierung durch p38^{MAPK} und HuR sprechen. So gelang es Winzen et al. (2004), einen ARE-Bereich in der 3'-UTR von IL-8 und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) auszumachen, der als kleinste die mRNA-Stabilität bestimmende Einheit fungiert. Dieser Bereich unterteilt sich in zwei strukturell sowie funktionell unterschiedliche Domänen. Die näher am 3'-Ende gelegene sogenannte Kerndomäne (CD) ist dabei reich an AUUUA-Motiven, über eine Förderung der Deadenylierung an sich moderat destabilisierend und Ziel der mRNA-stabilisierenden Wirkung von p38^{MAPK} und MK-2. Im Falle der COX-2 wurde entsprechend bereits eine p38^{MAPK}-vermittelte mRNA-Stabilisierung über eine Hemmung der Deadenylierung nachgewiesen (Dean et al., 2003). Die weiter vom 3'-Ende entfernte sogenannte Hilfsdomäne (AD) wirkt hingegen über eine Förderung des endonukleären Abbaus stark destabilisierend und ist für die durch HuR-Bindung hervorgerufene mRNA-Stabilisierung ausschlaggebend. Zudem wurden in Untersuchungen von Sully et al. (2004) zur Stabilisierung eines konservierten p38^{MAPK}-responsiven AREs der 3'-UTR von COX-2 (CR1, *conserved region 1*) Hinweise gegen die Beteiligung verschiedener RNA-bindender Proteine an der p38^{MAPK}-vermittelten mRNA-Stabilisierung der COX-2 gewonnen, unter diesen auch HuR. Außerdem zeigte eine Bewertung verschiedener RNA-Bindeproteine als Zielstrukturen von p38^{MAPK} gegen HuR sprechende Gründe auf (Dean et al., 2004; vgl. **Kap. 4.2**).

Zusammenfassen lässt sich demnach, dass Anhaltspunkte sowohl für als auch gegen eine Beteiligung von HuR an der p38^{MAPK}-vermittelten mRNA-Stabilisierung der COX-2 nach UVB-Exposition in HaCaT vorliegen (vgl. **Kap. 3.2.1**). Es bliebe daher noch zu untersuchen,

ob eine Abhängigkeit der HuR-Bindung an die COX-2-mRNA von der p38^{MAPK}-Aktivität im untersuchten System besteht. Ungeachtet der Frage nach einem Zusammenhang mit p38^{MAPK} ist der Nachweis einer direkten Wechselwirkung von HuR mit COX-2-mRNA etwa durch mRNP-IP (mRNA-Protein-Immunpräzipitation) oder EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) sinnvoll. Ein solcher Nachweis wurde in UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen kürzlich von Zhang & Bowden (2008) in Form einer entsprechenden mRNP-IP erbracht.

4.2 Substrate von p38^{MAPK} und UVB-induzierte COX-2-Expression

Über welche weiteren RNA-bindenden Proteine könnte p38^{MAPK} die UVB-induzierte COX-2-mRNA-Stabilisierung in HaCaT vermitteln? Rousseau et al. (2005) fanden, dass das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A0 (hnRNP A0) LPS-induziert und abhängig von p38^{MAPK} und MK-2 an COX-2-mRNA bindet. hnRNP A0 wird dabei von MK-2 und MK-2 wiederum von p38^{MAPK} phosphoryliert und dadurch aktiviert. In dieser Arbeit wurde allerdings nach siRNA-Depletion von hnRNP A0 keine Veränderung der COX-2-Induktion durch UVB beobachtet (s. **Abb. 3.7**).

Nach den bereits genannten Untersuchungen von Sully et al. (2004) (vgl. **Kap. 4.1**) stellten sich AUF-1, AUF-2 und FBP-1 (*far upstream sequence element binding protein 1*) als zwar an die CR1 der 3'UTR von COX-2 bindend jedoch in dieser Bindung nicht von p38^{MAPK} abhängig heraus. Diese und andere RNA-Bindeproteine wie HuR, hnRNP A0, KSRP, TIA-1, TIAR oder PABP (Poly-(A)-Bindeprotein) sind nach Dean et al. (2004) als Mediatoren der p38^{MAPK}-vermittelten mRNA-Stabilisierung auch im Allgemeinen unwahrscheinlich. Allerdings wurde in der Folge festgestellt, dass das destabilisierend wirkende ARE-Bindeprotein KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) von p38^{MAPK} phosphoryliert und so inaktiviert werden kann (Briata et al., 2005; Winzen et al., 2007). Gleiches gilt für das ebenfalls destabilisierend wirkende Tristetraprolin (TTP) und die Kinase MK-2 (Stoecklin et al., 2004, Winzen et al., 2007). Sowohl TTP als auch KSRP können an die COX-2-mRNA binden (Sawoaka et al., 2003; Winzen et al., 2007) und sind somit „Kandidaten“ für mRNA-Bindeproteine stromabwärts von p38^{MAPK} bei der hier untersuchten UVB-induzierten COX-2-Expression. Im Falle von TTP wurden im Zuge dieser Arbeit bereits erste Versuche zur siRNA-Depletion zwecks Ermittlung einer TTP-Beteiligung durchgeführt. Es konnte jedoch kein funktionsfähiger TTP-Antikörper erschlossen werden, um die Depletionseffizienz mittels Western-Blotting zu überprüfen.

Außer mit der MAPK-Kaskade ist ein Zusammenhang der im untersuchten System gefundenen Beteiligung der p38^{MAPK} mit anderen Signalkaskaden denkbar. Auf Ebene der transkriptionellen Regulation von COX-2 wurde in HaCaT-Zellen durch die Hemmung von p38^{MAPK} (Tang et al., 2001b) und auch durch die der Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3K; Tang et al., 2001a) die Erhöhung der Promotoraktivität nach UVB-Bestrahlung deutlich vermindert. Die beobachtete Erhöhung der COX-2-Promotoraktivität wurde dabei auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF-1 (Aktivierender Transkriptionsfaktor 1) und CREB (CRE-bindendes Protein) an das cAMP-responsive Element (CRE) des COX-2-Promotors zurückgeführt (Tang et al., 2001b). In SKH-1-Mäusen wurde ebenfalls sowohl eine Beteiligung von p38^{MAPK} als auch von PI3K an der UVB-induzierten COX-2-Expression gefunden (Bachelor et al., 2005). Außerdem wurde eine UVB-induzierte Phosphorylierung von Akt und Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β) nach UVB-Bestrahlung von HaCaT festgestellt und der Zusammenhang davon mit der UVB-induzierten COX-2-Transkription aufgezeigt. So führt die UVB-induzierte Aktivierung/Phosphorylierung von Akt durch PI3K zu einer Inaktivierung/Phosphorylierung eines negativen Regulators, ihrer Zielstruktur GSK-3 β , und dadurch zu einer Steigerung der COX-2-Transkriptionsrate (Tang et al., 2001a).

Von β -Catenin ist seit Kurzem bekannt ist, dass es im Komplex mit CREB die Transkription der COX-2 zu steigern vermag (Wang et al., 2008). GSK-3 β ist ein negativer Regulator von β -Catenin, womit eine Beteiligung von β -Catenin an der UVB-Induktion der COX-2-Transkription vorstellbar ist. Weiterhin ist von β -Catenin bekannt, dass es im Komplex mit HuR COX-2-mRNA stabilisieren kann (Lee & Jeong, 2006). Es bliebe also schließlich zu untersuchen, ob auch dies im untersuchten System der Fall ist. Zudem wurde für β -Catenin-Aktivierung und ROS-Bildung, wie sie auch in Zellen bei UV-Bestrahlung vorzufinden ist, ein Zusammenhang aufgezeigt (Korswagen, 2006). Im Falle einer Beteiligung von β -Catenin im untersuchten System, sei es auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene, sollte dieses nicht über eine Veränderung seiner Menge, sondern seiner Aktivität in die COX-2-Induktion eingreifen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bleibt nämlich die Menge an β -Catenin nach UVB zumindest bis 8 Stunden nach Exposition weitgehend unverändert (s. **Abb. 3.10**). Über die Rolle von β -Catenin in der UV-induzierten Expression von Proteinen ist bislang nichts bekannt.

Interessanterweise besteht prinzipiell die Möglichkeit einer von p38^{MAPK} abhängigen Akt-Aktivierung. So wird z.B. im Falle der Zn²⁺-induzierten COX-2-Expression in Bronchialzellen die Akt-Phosphorylierung durch den p38^{MAPK}-Hemmstoff SB203580

unterdrückt (Wu et al., 2005). Zudem wurde gefunden, dass die durch hohe UVB-Dosen induzierte Akt-Phosphorylierung in epidermalen Mäusezellen effektiv durch niedrigdosiertes SB202190 abgeschwächt wird (Nomura et al., 2001). Desweiteren wurde kürzlich für GSK-3 β eine Inaktivierung durch p38^{MAPK} berichtet (Bikkavilli et al., 2008). Es wäre demnach möglich, dass p38^{MAPK} in die von Tang et al. (2001a) verdeutlichte Signalkaskade UVB \rightarrow PI3K \rightarrow Akt \rightarrow GSK-3 β eingreift und auf diese Weise etwa über β -Catenin im Komplex mit HuR zu einer mRNA-Stabilisierung der COX-2 führt. Dies wäre auch insofern bemerkenswert, als dass es sich bei den RNA-Bindeproteinen KSRP und TTP um destabilisierende Faktoren handelt, welche aufgrund von Phosphorylierung durch p38^{MAPK} bzw. MK-2 inaktiviert werden, während es sich bei β -Catenin und HuR um stabilisierende Faktoren handelt. Ein von p38^{MAPK} ausgehender dualer Effekt bei der COX-2-mRNA-Stabilisierung in Form einer Inaktivierung der Destabilisierung und Aktivierung der Stabilisierung ist also prinzipiell vorstellbar.

Bollig et al. (2002) fanden bei der Bestrahlung von HeLa-Zellen mit hohen UVB-Dosen (1200 J/m²) eine Stabilisierung auch nicht ARE-haltiger mRNAs sowie eine Unabhängigkeit der UVB-Stabilisierung von ansonsten p38^{MAPK}-modulierten mRNAs (z.B. bei LPS- oder IL-1-Stimulation) von p38^{MAPK}-Aktivität. Es wurde daraus auf einen p38^{MAPK}-und ARE-unabhängigen allgemeineren Mechanismus der UVB-induzierten mRNA-Stabilisierung geschlossen. Allerdings führt eine Dosis im Bereich von 1000 J/m² im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit letztlich bei 100 % der bestrahlten Zellen zu metabolischer Inaktivität (s. **Abb. 3.1**). Es ist hingegen für niedrigere, nicht in solchem Maße zytotoxische Dosen plausibel, von einer anderen, spezifischeren Art der mRNA-Stabilitätsmodulation wie der durch p38^{MAPK}- oder HuR-vermittelten ARE-Stabilisierung auszugehen.

Der Hemmstoff SB202190 ist als sehr spezifisch für die α - und β -Isoform von p38^{MAPK} bekannt. Es wurde allerdings mittlerweile eine Hemmung der in der Entzündungsantwort involvierten RIP2 (Rezeptor-interagierendes Protein 2)-Kinase oder der mit Clathrin-Vesikeln in Verbindung gebrachten GAK (Zykin G-assoziierten Kinase) in vergleichbarem Ausmaß gezeigt (Bain et al., 2007). SB202190 hemmt zudem, allerdings etwa um einen Faktor von 10 schwächer, die GSK-3 β (Bain et al., 2007), welche auch eine Rolle in der UVB-induzierten COX-2-Expression in HaCaT spielt (Tang et al., 2001a). Eine Verifizierung der p38^{MAPK}-Wirkung im hier untersuchten System durch Transfektion mit entsprechenden Plasmiden wäre also sinnvoll. In Frage käme die Überexpression konstitutiv aktiver MKK 6 und die damit einhergehende Aktivierung ihres spezifischen Substrats p38^{MAPK} oder eine Überexpression

von p38^{MAPK} in einer dominant negativen, d.h. also inaktiven Form (Wildtyp-Überexpression als Kontrolle). Im ersten Fall sollten sich diejenigen Effekte, die durch p38^{MAPK} bei UVB-Bestrahlung vermittelt werden, simulieren lassen, was auch in Hinsicht auf die Frage nach HuR als Zielstruktur der p38^{MAPK} aufschlussreich wäre. Im zweiten Fall sollten sich die gleichen Ergebnisse wie bei Verwendung des Inhibitors SB202190 ergeben.

4.3 Potentielle Ziele posttranskriptioneller Modulation durch HuR nach UVB-Exposition

Bollig et al. (2002) fanden in HeLa-Zellen beim Einsatz zweier verschiedener AREs, nämlich solcher aus der 3'-UTR von IL-8 und von GM-CSF, in einer EMSA mit Zytoplasmaextrakten je zwei Komplexe, welche nach UVB verstärkt vorzufinden waren und durch HuR-Antikörper verschoben wurden. Dies spricht dafür, dass HuR nach UVB-Bestrahlung neben einer Modulation der COX-2-mRNA auch eine Reihe anderer ARE-haltiger mRNAs durch Bindung im Zytoplasma reguliert.

Die nach UV-Exposition beobachtete Translokation von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma kann so beispielsweise mit der Einleitung antiapoptotischer Prozesse in Verbindung gebracht werden. Im Zytoplasma wird die Translationsrate der mRNA des Apoptosom-Inhibitors Prothymosin α (ProT α) so durch die Bindung von HuR gesteigert (Lal et al., 2005). Desweiteren wird die mRNA-Stabilität von p21, einem universellen Inhibitor der zyklinabhängigen Kinasen, durch HuR-Bindung nach UVC erhöht (Wang et al., 2000b). Dies kann zur Auslösung des Zellzyklusarrests führen, welcher wiederum eine effektivere Reparatur der entstandenen DNA-Schäden ermöglicht und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zelle erhöht. Schließlich ist auch eine durch UVC verursachte Stabilisierung der mRNA von RhoB, einem kleinen GTP-bindenden Protein, welches sich in HaCaT-Zellen als wichtiger antiapoptotischer Mediator nach UVB-Bestrahlung herausgestellt hat (Canguilhem et al., 2005), durch HuR bekannt (Westmark et al., 2005). Es ist also denkbar, dass HuR im Falle der physiologisch relevanten UVB-Strahlung aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Translokation ins Zytoplasma (s. **Abb. 3.11** und **3.12**) ähnliche antiapoptotische Prozesse bewirken kann.

Im Zuge der hier durchgeführten Experimente war stets ein erhöhter Anteil toter Zellen 8 Stunden nach Bestrahlung mit 100 J/m² UVB bei den mittels siRNA HuR-depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen mikroskopisch sichtbar (ohne Abbildung). Auch die

Aktivität der COX-2 ist als antiapoptotisch zu sehen, worauf zum Teil ihre krebsfördernde Wirkung zurückzuführen ist (Moore & Simmons, 2000) und, wie im Rahmen dieser Arbeit verdeutlicht wurde, in ihrer UVB-induzierten Expression maßgeblich auf die Aktivität von HuR angewiesen (s. **Abb. 3.8** und **3.9**). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass bei der UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen ab einer Dosis (500 J/m^2), welche nach 24 Stunden zur metabolischen Inaktivität aller Zellen führt (s. **Abb. 3.1**), keinerlei COX-2-Induktion zum Zeitpunkt 8 Stunden nach Bestrahlung bei einer relativen Viabilität von immerhin noch 55 % mehr festzustellen ist (s. **Abb. 3.3 A** bzw. **3.1**). Es ist denkbar, dass HuR bei sehr starker Beschädigung der Zelle durch die Einwirkung letalen Stresses, wie etwa 500 J/m^2 UVB-Strahlung, nicht mehr eine antiapoptotische sondern eher eine apoptoseunterstützende Funktion ausübt. So berichteten Mazroui et al. (2008) die Assoziation von pp32 und HuR im Kern letal gestresster HeLa-Zellen mit anschließender Spaltung von HuR durch Caspase-7 und -3 nach gemeinsamer Translokation ins Zytoplasma, was wiederum eine Stimulation des Apoptosoms durch das so freigesetzte pp32 verursacht. Eine solche Spaltung von HuR würde sicherlich dazu führen, dass bestimmte ARE-haltige mRNAs nicht mehr moduliert werden könnten und also eine entsprechende Veränderung ihres Expressionslevels zu beobachten wäre. Im Falle der COX-2 mag ein solcher Effekt zu einer deutlichen Verminderung ihrer Induktion nach letalen UVB-Dosen führen.

β -Catenin ist als Vermittler zwischen Zelladhäsionsproteinen, den Cadherinen (E-, P- und N-Cadherin), und dem Zytoskelett bei bestimmten Zell-Zell-Verbindungen, den Adhärenzkontakten bekannt. Es bindet dabei an die zytoplasmatische Catenin bindende Domäne der Cadherine und bildet so eine Brücke zu α -Catenin, welches wiederum mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Adhärenzkontakte spielen eine entscheidende Rolle für den Zell-Zell-Zusammenhalt mechanisch stark beanspruchter Gewebe wie der Epidermis. β -Catenin besitzt darüberhinaus vor allem die Fähigkeit als Transkriptionsfaktor im Wnt-Signalweg zu fungieren und wird daher außerdem mit Krebs-, auch Hautkrebsbildung in Zusammenhang gebracht (Ehrhart et al., 2003).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, trägt HuR wahrscheinlich nicht zur β -Catenin-Expression in HaCaT-Zellen bei (s. **Abb. 3.10**). Dies verhält sich jedoch anders in Rattenleberepithel- (WB-F344; unveröffentlichte Ergebnisse der AG Klotz; N. Ale-Agha, pers. comm.) oder Darmkrebszellen (Lopéz de Silanes et al., 2003). Dort spielt HuR eine wesentliche Rolle für die Expression. Es könnte zur Erklärung der Unabhängigkeit der β -Catenin-Expression von HuR im Gegensatz zu anderen Zellen angenommen werden, dass in der Epidermis aufgrund

der besonderen Anforderungen, die an Stabilität und Flexibilität der Adhärenzkontakte gestellt werden, auch die β -Catenin-Expression anders reguliert ist als etwa in Darm oder Leberzellen. Zudem kann man davon ausgehen, dass HuR daher nicht über eine Erhöhung des β -Catenin-Spiegels zur Hautkrebsbildung nach UVB-Exposition beitragen sollte. Vorstellbar wäre jedoch, wie weiter oben (s. **Kap. 4.2**) schon ausgeführt, eine UVB-induzierte stabilisierende Komplexbildung von HuR und β -Catenin an der COX-2-mRNA (Lee & Jeong, 2006).

Es ist denkbar, dass HuR nach UVB-Bestrahlung zu einer erhöhten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in Keratinozyten führt. MMPs werden über den Abbau extrazellulärer Matrix allgemein mit Alterung und Krebsbildung (Förderung der Metastasierung) in Zusammenhang gebracht. Akool et al. (2008) konnten bereits für andere Zellen eine Stabilisierung der MMP-9-mRNA durch HuR nachweisen. Die immunrelevante MMP-7, auch Matrilysin genannt, wurde als mögliche Zielstruktur von HuR vorhergesagt (Lopéz de Silanes et al., 2004). Eine solche Vorhersage wurde außerdem für MTA1 (*metastasis associated protein 1*) gemacht, welches nachweislich die Invasivität von HaCaT-Zellen steigert (Mahony et al., 2002). Tatsächlich führt UVB in HaCaT-Zellen zu einer erhöhten Expression von MMP-1, -2, -7 und -9 (Zaid et al., 2007).

Eine dosisabhängige Steigerung der Gesamtmenge an HuR nach UVB-Bestrahlung in HaCaT wie von Zhang & Bowden (2008) festgestellt, wurde in dieser Arbeit sogar bei Dosen bis zu 3000 J/m^2 nicht gefunden (s. **Kap. 3.2.2**). Die einzige Erklärung für diese Divergenz wäre die Tatsache, dass bei den Untersuchungen von Zhang & Bowden 4 Stunden, im Rahmen dieser Arbeit hingegen 8 Stunden nach Exposition eine entsprechende Western-Blot-Analyse von HaCaT-Lysaten auf HuR durchgeführt wurde. Es könnte sich also bei der von Zhang & Bowden beobachteten Zunahme an HuR um eine transiente Erscheinung handeln.

4.4 Zur Rolle der PKC bei der COX-2-Induktion durch UVB

Durch Verwendung des spezifischen Inhibitors Bisindolylmaleimid I (BIM I) konnte in der vorliegenden Arbeit eine wahrscheinlich maßgebliche Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der UVB-induzierten COX-2-Expression in HaCaT herausgearbeitet werden (s. **Abb. 3.23**). Wie der Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Unterdrückung der COX-2-Induktion durch BIM I mit den IC_{50} -Werten der PKC-Isoformen zeigte (vgl. **Kap. 3.3.1**), ist eine Beteiligung der atypischen Isoform ζ dabei unwahrscheinlich. Zum einen kann man

fragen, auf welche Weise PKC im untersuchten Prozess aktiviert wird, und zum anderen, in welcher Form ihre Aktivität zur beobachteten COX-2-Induktion beiträgt.

Ginge man von einer Beteiligung klassischer Ca^{2+} -abhängiger Isoformen wie PKC α oder β aus, so wäre eine Aktivierung dieser durch einen UVB-verursachten höheren zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel vorstellbar. UVA-Bestrahlung führt, wahrscheinlich durch Beeinträchtigung der Membranintegrität durch Lipid- und Proteinoxidation, zu Kationen-Einstrom, auch von Ca^{2+} , in verschiedene Zellen (Mendez und Penner, 1998). Im Falle von UVB-Bestrahlung ist ebenfalls eine dadurch ausgelöste Lipidperoxidation bekannt sowie eine Beeinträchtigung antioxidativer Enzymaktivität (Punnonen et al., 1991). UVB könnte folglich ähnliche Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Durchlässigkeit von Membranen haben. So wäre einerseits eine Zunahme des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels durch Einstrom von Ca^{2+} aus den Mitochondrien oder dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), andererseits durch Einstrom aus dem extrazellulären Raum denkbar. Der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel kann desweiteren auch durch die Aktivität der EGFR-gekoppelten Phospholipase C γ (PLC γ) erhöht werden, was im hier untersuchten Prozess von Bedeutung sein könnte (s. **Kap. 4.5**).

Fukunaga et al. (2001) konnten in HaCaT-Zellen eine Tyrosinphosphorylierung der neuartigen PKC-Isoform δ nach 40 J/m² UVB/UVC-Exposition feststellen. Angenommen wurde dabei eine Aktivierung der Nicht-Rezeptortyrosinkinase Lck durch intrazellulär erzeugte ROS mit daraus resultierender Phosphorylierung von PKC δ .

Im Falle der COX-2-Induktion ist sowohl eine Aktivität von PKC stromaufwärts von p38^{MAPK} (Subbaramaiah et al., 2003) als auch von HuR (Doller et al., 2007 & 2008) bekannt. Im letzteren Fall bewirkt die PKC durch direkte Phosphorylierung von HuR seine Translokation ins Zytoplasma (vgl. **Kap. 4.1**). Wie noch erläutert wäre prinzipiell auch ein Zusammenlaufen der PKC- und p38^{MAPK}-vermittelten Signalkaskaden stromabwärts von p38^{MAPK} möglich (s. **Kap. 4.5**).

4.5 Initiation von Signaltransduktionsprozessen nach UVB-Bestrahlung

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Frage nach der Initiation der UVB-verursachten zur COX-2-Induktion führenden Signaltransduktion nachgegangen. Dabei wurde eine Beteiligung des EGF- sowie des Ah-Rezeptors untersucht.

4.5.1 Zur Rolle des EGF-Rezeptors bei der COX-2-Induktion durch UVB

Zwar wurde keine eindeutige Zunahme der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach UVB-Bestrahlung mit der hier für die COX-2-Induktion verwendeten Dosis von 100 J/m^2 beobachtet (s. **Abb. 3.16** bis **3.18**), jedoch war eine deutliche Abschwächung der COX-2-Induktion durch den Hemmstoff AG1478 festzustellen (s. **Abb. 3.15 C**). Bekannt für eine mögliche Hemmbarkeit durch AG1478 sind neben dem EGFR ($\text{IC}_{50} = 3 \text{ nM}$), allerdings in weitaus schwächerem Maße, noch der nahe verwandte ErbB2 ($\text{IC}_{50} > 100 \text{ }\mu\text{M}$), der PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*; $\text{IC}_{50} > 100 \text{ }\mu\text{M}$) und p21 ($\text{IC}_{50} > 50 \text{ }\mu\text{M}$). Bei der hier eingesetzten Konzentration des Inhibitors von $10 \text{ }\mu\text{M}$ ist eine solche unspezifische Hemmung jedoch unwahrscheinlich, zumal es sich bei IC_{50} -Werten um die Konzentrationen halbmaximaler Hemmung bei *in vitro*-Aktivitäts-Tests handelt.

Zudem überprüften Ashida et al. (2003), die in Gegenwart von AG1478 verminderte UVB-Induktion der COX-2 in HaCaT durch Verwendung eines neutralisierenden EGFR-Antikörpers und fanden auch hier eine Unterdrückung vor. Es ist also davon auszugehen, dass der EGFR, obwohl keine nennenswerte Zunahme der Phosphorylierung nach 100 J/m^2 UVB festgestellt wurde, eine wichtige Rolle bei der COX-2-Induktion auch bei dieser Dosis spielt. Zur Erklärung dieser Tatsache seien im Folgenden die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Hinweise zur Beteiligung des EGFR bei der COX-2-Induktion durch 100 J/m^2 UVB in HaCaT zusammenfassend aufgeführt und in diesem Zuge die daraus ableitbaren Schlüsse dargelegt.

Wie durch EGF-Behandlung festgestellt, geht vom EGFR eine Signalkaskade aus, die zur COX-2-Induktion führt, diese ist möglicherweise ERK 1/2-unabhängig und PKC abhängig (s. **Abb. 3.22**). Auch von der Bestrahlung mit UVB geht eine Signalkaskade aus, die zur COX-2-Induktion führt, diese ist ebenfalls möglicherweise ERK 1/2-unabhängig (s. **Abb. 3.19**) und wahrscheinlich PKC-abhängig (s. **Abb. 3.23**). Außerdem ist diese auf die Aktivität des EGF-Rezeptors angewiesen (s. **Abb. 3.15 C**). Soweit könnte man annehmen, dass auch die COX-2-Induktion nach UVB durch eine Aktivierung des EGFR initialisiert wird.

Die COX-2-Induktion nach EGF-Behandlung ist allerdings unabhängig von p38^{MAPK} und HuR (s. **Abb. 3.21**). Wie die Experimente mit HeLa-Zellen im Rahmen dieser Arbeit (s. **Abb. 3.26** bis **3.28**) und in den Untersuchungen bei von Montfort et al. (2006a) nahelegen, ist die Aktivierung von p38^{MAPK} zumindest nach UVA-Bestrahlung unabhängig von einer EGFR-Aktivierung. Es ist zudem in HaCaT keine nennenswerte Aktivierung des EGFR, nur eine

basale Phosphorylierung an Tyr-992 (s. **Abb. 3.16 B**), wohl aber von p38^{MAPK} nach 100 J/m² UVB festzustellen (s. **Abb. 3.5 A**). Angemerkt sei diesbezüglich außerdem, dass Peus et al. (1999) bei Verwendung eines neutralisierenden EGFR-Antikörpers keinerlei Verminderung der durch eine in etwa vergleichbare UVB-Dosis von 200 J/m² in humanen Keratinozyten induzierten Phosphorylierung von p38^{MAPK} fanden. Eine durch die Aktivität des EGFR verursachte so deutliche Zunahme der p38^{MAPK}-Phosphorylierung und damit ihrer Aktivität ist also zumindest bei 100 J/m² UVB unwahrscheinlich.

Es lässt sich vermuten, dass eine gewisse basale Phosphorylierung des EGFR zu einer basal leicht aktivierten Signalkaskade, etwa über PLC γ (Tyr -992) und PKC führt, welche in eine anderenorts UVB-initialisierte zur p38^{MAPK}-Aktivierung führende Signalkaskade stromabwärts von p38^{MAPK} einmündet. Dieses Einmünden wäre dann in Form einer „Voraktivierung“ der entsprechenden Signalkaskadenkomponente als Voraussetzung für die an anderer Stelle initialisierte p38^{MAPK}-vermittelte COX-2-Induktion nach UVB notwendig (s. **Abb. 3.15 C**). Denkbar ist hier etwa eine Beteiligung der Teilkaskade PI3K \rightarrow Akt \rightarrow GSK-3 β , welche, zumindest auf Transkriptionsebene (vgl. **Kap. 4.2**), wichtig für die UVB-induzierte COX-2-Expression in HaCaT ist (Tang et al., 2001a; Ashida et al., 2003) und sowohl ein bekanntes Ziel EGFR-vermittelter als auch ein denkbare Ziel p38^{MAPK}-vermittelter Signaltransduktion sein kann (Nomura et al., 2001; Wu et al., 2005; Bikkavilli et al., 2008). Wie beispielsweise bei Downward (1998) erwähnt, ist PI3K eine mögliche Zielstruktur von Ras. Ras ist wiederum ein bekanntes Substrat von PKC. Eine basal aktive Teilkaskade EGFR \rightarrow PLC γ \rightarrow PKC \rightarrow Ras \rightarrow PI3K sollte also prinzipiell möglich sein.

Vorstellbar ist im untersuchten System auch ein Zusammenhang von PKC und HuR (s. **Kap. 4.1**), welches durch PKC phosphoryliert und somit aktiviert werden kann (Doller et al., 2007 & 2008), und also auch die vom EGFR ausgehende Teilkaskade EGFR \rightarrow PLC γ \rightarrow PKC \rightarrow HuR. Der Frage nach HuR als Substrat von p38^{MAPK} beim untersuchten Prozess gälte es noch weiter nachzugehen (vgl. **Kap. 4.1**). Weiterhin kann spekuliert werden, dass die vom EGFR ausgehende EGF-stimulierte COX-2-Induktion ebendiesen Weg der einmündenden, aber dann deutlich aktivierten, Signalkaskade nimmt.

Zusammenfassen lassen sich die angestellten Überlegungen in folgendem Modell. Eine vom EGFR ausgehende basale (oder höchstens geringfügig induzierte) Signalkaskade stellt eine notwendige jedoch noch nicht hinreichende Bedingung der UVB-induzierten COX-2-Expression dar. Die zur p38^{MAPK}-Aktivierung führende Signalkaskade nimmt hingegen

(zumindest größtenteils) anderenorts ihren Ursprung und ist die hinreichende Bedingung der UVB-induzierten COX-2-Expression.

Wohlbekannt ist aus der Literatur die Möglichkeit einer deutlichen UVB-induzierten EGFR-Phosphorylierung etwa über eine Inaktivierung diesen Rezeptor negativ regulierender Phosphatasen. Dies stellt jedoch keinen Widerspruch zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen dar, betrachtet man die bei diesen Untersuchungen verwendeten Dosierungen. Knebel et al. (1996) konnten bei der UVB-Bestrahlung von rat-1/HER-Zellen, Fibroblasten, welche über den humanen EGFR verfügen, bei 500 J/m² zwar eine leichte, aber derjenigen nach EGF-Behandlung überhaupt nicht vergleichbare Phosphorylierung des EGFR feststellen. Auch Peus et al. (1998) fanden bei ihren Untersuchungen in humanen Keratinozyten erst bei einer UVB-Dosis von 800 J/m² eine der EGF-Behandlung in etwa entsprechende Phosphorylierung des EGFR. Bei einer Dosis von 100 J/m² wurde zwar eine leichte, in ihrem Ausmaß derjenigen nach EGF-Behandlung jedoch nicht vergleichbare Aktivierung des EGFR vorgefunden. Iordanov et al. (2002) stellten in HEK₂₉₃-E6/E7-Zellen, immortalisierten humanen Keratinozyten, bei einer Dosis von 1200 J/m² UVB eine minimale Aktivierung des EGFR im Vergleich zur 100 ng/ml EGF-Behandlung fest. Schließlich erhielten Y. Xu et al. (2006) in ihren Untersuchungen von HaCaT-Zellen zwar eine der Behandlung mit EGF in etwa entsprechende Phosphorylierung. Dazu wurde jedoch eine sich in dieser Arbeit als zytotoxisch herausgestellt habende Dosis von 400 J/m² UVB (s. **Abb. 3.1**) und eine 10-fach niedrigere EGF-Konzentration von 10 ng/ml verwendet.

Es lässt sich wiederum zusammenfassen, dass nach Wissensstand des Verfassers kein Fall aus der Literatur bekannt ist, bei dem 100 J/m² UVB im Vergleich mit einer entsprechenden EGF-Behandlung mehr als zu einer schwachen Phosphorylierung des EGFR geführt hätten. Die hier verwendete Dosis von 100 J/m² UVB ist physiologisch relevant, da sie 1/3 der minimalen Erythemdosis darstellt (Fritsche et al., 2007). Wichtiger ist allerdings noch die Tatsache, dass es sich bei dieser Dosis um eine in zytotoxischer Hinsicht vertretbare handelt. Denn es erscheint wenig sinnvoll, Vorgänge wie die UVB-Induktion der COX-2 in letal gestressten Zellen zu untersuchen, auch wenn diese nach Bestrahlung mit hohen Dosen etwa zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Bestrahlung noch relativ intakt sein mögen.

4.5.2 Zur Rolle des Ah-Rezeptors bei der COX-2-Induktion durch UVB

Wie Fritsche et al. (2007) zeigen konnten, spielt der Ah-Rezeptor eine Rolle bei der UVB-induzierten COX-2-Expression in HaCaT-Zellen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Verwendung von AhR-defizienten HaCaT-Zellen bestätigt, bei denen eine Verminderung der mit 100 J/m^2 UVB induzierten COX-2-Expression um 70 % auf Proteinebene im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt wurde (s. **Abb. 3.24**). Dieses Resultat ist in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fritsche et al., die eine Verminderung der COX-2-Induktion in diesen Zellen um 65 % auf mRNA-Ebene vorfanden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine leichte Induzierbarkeit der COX-2-Expression durch 100 nM FICZ, welches in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung im picomolaren Mengen photochemisch gebildet wird (Fritsche et al. 2007), auf Proteinebene bestätigt (s. **Abb. 3.25 A**). Fritsche et al. stellten zudem eine AhR-abhängige Zunahme der COX-2-mRNA-Menge um einen Faktor von knapp 2,5 nach FICZ-Behandlung in HaCaT fest.

Die FICZ-induzierte COX-2-Expression ist jedoch bei weitem geringer als diejenige nach 100 J/m^2 UVB. Auch die Behandlung mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ 3-Methylcholanthren (3-MC) führte bemerkenswerterweise nur zu einer ebenso relativ schwachen COX-2-Induktion (s. **Abb. 3.25 C**). Bei 3-MC, einem auch im Zigarettenrauch enthaltenen Kanzerogen, handelt es sich um einen klassischen AhR-Liganden und Induktor u.a. der CYP1A1-Expression (Gelardi et al., 2001). Diese Resultate unterstreichen die prinzipielle Möglichkeit einer COX-2-Induktion aufgrund der Aktivierung des AhR durch Ligandenbindung. Es sollte jedoch im Vergleich mit der UVB-Induktion hinterfragt werden, welchen Anteil die Bindung von Photoprodukten wie FICZ an den AhR tatsächlich bei der COX-2-Induktion nach UVB in HaCaT ausmacht.

Wie Fritsche et al. zeigen konnten, ist die Zunahme der ERK 1/2-Phosphorylierung durch UVB (vgl. **Abb. 3.20**) teilweise auf den AhR zurückzuführen und zudem eine AhR-abhängige Internalisierung des EGFR nach UVB-Bestrahlung festzustellen. Die immunocytochemischen Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch keine einer EGF-Stimulation vergleichbaren Auswirkungen von 100 J/m^2 UVB auf den EGF-Rezeptor erkennen (s. **Abb. 3.16 bis 3.18**), wobei hingegen das Ausmaß der COX-2-Induktion durch EGF und UVB vergleichbar ist (s. **Abb. 3.15 A**). Es sollte vor diesem Hintergrund der von Fritsche et al. vorgeschlagene Mechanismus der Wirkung des AhR über eine Internalisierung des EGFR und eine Phosphorylierung von ERK 1/2 auf die UVB-induzierte COX-2-Expression nicht vollkommen vorbehaltlos betrachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Anwesenheit des AhR, wie die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit HaCaT-KO-Zellen bestätigen sowie Versuche mit Mäusen zeigen (Fritsche et al., 2007), eine Rolle bei der UVB-induzierten COX-2-Expression spielt, die Frage nach dem genauen Mechanismus der AhR-Wirkung allerdings nach Meinung des Verfassers noch weiterführender Untersuchungen bedarf. So ist der AhR vor allem für seine Wirkung als Transkriptionsfaktor bekannt. Tatsächlich konnten Fritsche et al. auch eine Translokation des AhR vom Zytosol in den Kern nach UVB-Exposition von HaCaT beobachten. Auch die Untersuchungen zur Art der Aktivierung des AhR nach UVB-Bestrahlung hinsichtlich der COX-2-Induktion sollten noch nicht als abgeschlossen angesehen werden. So mag die schwache Induzierbarkeit der COX-2 durch AhR-Liganden im Vergleich zu UVB dadurch zu erklären sein, dass eine Wechselwirkung mit einem weiteren durch UVB, etwa durch ROS-Bildung, induzierten Prozess notwendig ist, um zu einer klaren COX-2-Induktion zu führen.

Vor dem Hintergrund, dass bislang keine abschließende Antwort auf die Frage nach der Initiation der zur COX-2-Induktion nach UVB-Bestrahlung in HaCaT-Zellen führenden Signaltransduktion gefunden wurde, seien zwei weitere, im Rahmen dieser Arbeit jedoch experimentell nicht behandelte Möglichkeiten für Startpunkte UVB-induzierter Signaltransduktion in Bezug auf den hier untersuchten Prozess erläutert.

4.5.3 DNA-Schädigung oder Urokaninsäure-Isomerisierung?

UV-induzierte DNA-Schädigung führt nachweislich zu einer erhöhten DNA-Affinität der Kinase ATR (*ATM- and Rad3-related*) (Unsal-Kaçmaz et al., 2002). Es wurde zudem gefunden, dass $p38^{\text{MAPK}}$ nach DNA-Schädigung durch γ - oder UVC-Strahlung über TAO (*Thousand and one amino acid*)-Kinasen, Zielstrukturen von ATM und ATR, aktiviert wird (Raman et al., 2007). $p38^{\text{MAPK}}$ -Aktivität ist so beispielsweise zur Rekrutierung der NER-Faktoren XPC (*xeroderma pigmentosum complementation group C*) und TFIIH (Transkriptionsfaktor II H) an UV-Läsionen erforderlich (Zhao et al., 2008). Weiterhin ist die Aktivierung der $p38^{\text{MAPK}}$ und ihres Substrats MK-2 durch ATM und ATR in p53-defizienten Zellen, wie etwa den hier untersuchten HaCaT, für die Einleitung des Zellzyklusarrestes nach DNA-Schädigung essenziell (Reinhardt et al., 2007). Dies zeigt, dass UVB-verursachte DNA-Schädigung prinzipiell auch zur beobachteten COX-2-induzierenden $p38^{\text{MAPK}}$ -Aktivierung in HaCaT-Zellen beitragen kann. Die typischen mit DNA-Schädigung assoziierten Kinasen

ATM und ATR sind zudem bekannt für eine Aktivierbarkeit durch ROS (Abdelmohsen et al., 2008).

HuR ist in nicht tumorösen, unstimulierten Zellen hauptsächlich im Zellkern, also in unmittelbarer Nähe zur DNA lokalisiert. Es ist somit ebenfalls denkbar, dass die zur Translokation ins Zytoplasma führende HuR-Aktivierung nach UVB-Exposition durch eine Veränderung der DNA-Struktur initialisiert wird. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Hemmung der Translokation durch Cdk1 (Kim et al., 2008) und die Regulation der mRNA-Bindung von HuR durch Chk2 (Abdelmohsen et al., 2007). Cdk1 wird wiederum nach DNA-Beschädigung ausgehend von ATM und ATR inhibiert (Badie et al., 2000), während Chk2 aktiviert wird. Da UVB-Strahlung sowohl für DNA-Schädigung durch Bildung von Pyrimidindimeren als auch für die Erzeugung von ROS, welche dann wiederum zur DNA-Schädigung führen können, wohlbekannt ist, ist sowohl für die HuR- als auch die p38^{MAPK}-vermittelte UVB-Induktion von COX-2 eine solche Initiation der Signaltransduktion in der DNA-Schädigung vorstellbar.

Die im Stratum corneum (Hornschicht) durch Filaggrinzerfall gebildete Urokaninsäure isomerisiert nach UV-Bestrahlung von ihrer trans- zur cis-Form, die mit der UVB-induzierten Immunsuppression in Verbindung gebracht wird. Wie Urokaninsäure Signaltransduktionsprozesse initialisieren kann, ist allerdings noch nicht ganz verstanden. Es wurde kürzlich eine Reihe spezifisch durch cis-Urokaninsäure aufregulierter Gene, welche mit Apoptose, Zellzyklusarrest, Zytokinen und oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, in primären Keratinozyten identifiziert (Kaneko et al., 2008). Darunter auch die Cyclooxygenase-2, welche besonders deutlich induziert wurde. Im hier untersuchten System von HaCaT-Zellen sollte dies allerdings in Ermangelung einer epidermalen Struktur keine Rolle bei der UVB-induzierten COX-2-Expression spielen. HaCaT-Keratinozyten besitzen jedoch noch die Fähigkeit zur Differenzierung und bilden daher auf Kollagengelen, welche wiederum Hautfibroblasten enthalten können, eine reguläre Epidermis mit filaggrinhaltiger Hornschicht aus (Boukamp et al., 1988).

4.6 Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse zur COX-2-Induktion durch UVB-Strahlung in HaCaT

Bei der Zelllinie HaCaT handelt es sich um in vitro spontan immortalisierte humane Keratinozyten. Diese besitzen noch die Fähigkeit zur vollständigen Differenzierung und sind

nicht tumorbildend (Boukamp et al., 1988). Der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 ist in HaCaT-Zellen jedoch durch für UV-Strahlung typische Punktmutationen inaktiviert. Dies lässt ein anderes Verhalten bezüglich Zellzyklusarrest/DNA-Reparatur oder Apoptose nach UV-Bestrahlung im Vergleich zu regulären Keratinozyten annehmen. Es stellt sich die Frage, inwiefern die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte UVB-induzierte COX-2-Expression von diesen Prozessen unabhängig ist (vgl. **Kap. 4.5.3**). HaCaT-Zellen sind zudem aneuploid, d.h. sie weisen eine teilweise erhöhte Chromosomenzahl auf, wohingegen Chromosom 4 fehlt. Auf Chromosom 4 ist beispielsweise der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) kodiert. Es sollte daher hinterfragt werden, ob die in HaCaT insgesamt gewonnen Erkenntnisse auf andere Modelle und letztlich den menschlichen Organismus vollständig übertragbar sind.

Sowohl in vivo-Studien mit Mäusen (Bachelor et al., 2005) als auch Untersuchungen an komplexeren in vitro-Modellen, wie der von Mahns et al. (2004) verwendeten artifiziellen Epidermis, zeigen eine durch UVB induzierte COX-2-Expression unter Beteiligung von MAP-Kinasen. Die Kernparameter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten UV-induzierten Prozesse in HaCaT sind somit auch in diesen Modellen gegeben, was deutlich für eine Übertragbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse in HaCaT spricht. Die Zelllinie HaCaT besitzt jedoch den wesentlichen Vorteil leicht durchzuführender Manipulation etwa in Form von Proteindepletion mittels siRNA, des Einsatzes spezifischer Hemmstoffe oder von Luziferase-Reporter-Gen-Transfektionen für Untersuchungen zum molekularen Mechanismus beispielsweise der UVB-Induktion der COX-2.

4.7 Zum Zusammenhang von Seneszenz, HuR und COX-2-Induktion

Sowohl in seneszenten kultivierten humanen diploiden Fibroblasten (HDF) als auch in Fibroblasten humaner Hautbiopsien älterer Individuen wurde eine deutlich verminderte HuR-Expression beobachtet (Wang et al., 2001 & 2003). So ist auch die verminderte Expression der durch HuR modulierten und für die Mitose wichtigen Zykline A2 und B1 zumindest zum Teil auf diesen niedrigeren Gesamt-HuR-Spiegel zurückzuführen (Wang et al., 2000a & 2001). Zudem wurde ein anteilmäßig niedrigerer HuR-Spiegel im Zytoplasma seneszenten Fibroblasten vorgefunden, was zumindest teilweise durch das höhere AMP/ATP-Verhältnis und einer damit aktiveren AMPK erklärt werden kann (Wang et al., 2003 & 2004) (vgl. **Kap. 4.1**). Es bestehen also Hinweise für eine Rolle von HuR im Zusammenhang mit

Seneszenzprozessen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine UVB-induzierte Translokation von HuR ins Zytoplasma gefunden (s. **Abb. 3.11** und **3.12**). Die Translokation von HuR ist Voraussetzung für eine Wechselwirkung mit und Modulation von ARE-haltigen mRNAs im Zytoplasma. Beispielsweise ist eine solche posttranskriptionelle Modulation von MMPs in Keratinozyten oder auch Fibroblasten nach UVB durchaus denkbar (vgl. **Kap. 4.3**). Es konnte in der vorliegenden Arbeit eine maßgebliche Beteiligung von HuR an der UVB-Induktion der COX-2 gezeigt werden (s. **Abb. 3.8** und **3.9**). COX-2-Aktivität wird nicht nur mit Entzündungs- und Tumorgenesevorgängen assoziiert, sondern seit nicht allzu langer Zeit zudem mit Seneszenzerscheinungen.

COX-2 wird bekanntermaßen in bestimmten gealterten Zellen wie murinen Makrophagen (Hayek et al., 1997), humanen Neokortezellen (Lukiw & Bazan, 1998) oder humanen dermalen Fibroblasten (HDFs) (Zdanov et al., 2007) stärker exprimiert. Da die von ihr katalysierte Reaktion mit der Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate einhergehen kann (vgl. **Abb. 1.5**), ist eine ursächliche Verbindung zu Seneszenzprozessen durch oxidativen Stress denkbar (Zdanov et al., 2007). Sowohl in der stressinduzierten (NF- κ B oder H₂O₂) als auch der normalen Seneszenz von HDFs konnte durch Verwendung des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 die mit erhöhter COX-2-Expression und PGE₂-Produktion korrelierende Zunahme biologischer Seneszenzmarker wie seneszenzassoziierte β -Galaktosidase-Aktivität (SA- β -Gal-Aktivität) oder Wachstumsstopp zumindest teilweise unterbunden werden (Zdanov et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der replikativen Seneszenz primärer Hautfibroblasten durch Verwendung eben dieses Inhibitors mitunter die beobachtete Zunahme an COX-2, PGE₂ und MMP-1 (Kollagenase) sowie die Abnahme des MMP-1-Inhibitors TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) und des Prokollagens vermindert wird. Dies deutet auf eine Beteiligung von COX-2-Aktivität bei der durch Rückgang der extrazellulären Kollagenmatrix verursachten Form der Hautalterung hin (Han et al., 2004).

Durch Bestrahlung von HDFs mit einer Serie subtoxischer UVB-Dosen wurde eine Zunahme typischer Seneszenzmarker sowie eine entsprechend veränderte Expression bestimmter Gene festgestellt (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Welche Rolle dabei die COX-2 spielt, ist jedoch noch ungeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es nach einmaliger UVB-Bestrahlung von HFFF2-Zellen (humane fötale Vorhautfibroblasten) mit unterschiedlichen Dosen nicht zu einer Induktion der COX-2, ja im Falle nicht serumdepletierter Zellen sogar zu einer Abnahme an COX-2 kommt (s. **Abb. 3.4 A**). Es kann also angenommen werden, dass es nicht über eine direkte Wirkung von UVB-Strahlung auf

die Haut zu einer mit der COX-2-Induktion in Zusammenhang stehenden Alterung von Hautfibroblasten kommt, welche die entscheidende Rolle für Aufbau und Veränderung der extrazellulären Kollagenmatrix der Dermis spielen. Es wäre jedoch möglich, dass sich die in Keratinozyten durch UVB verursachte COX-2-Induktion (s. **Abb. 3.4 B**) indirekt über die damit einhergehende gesteigerte Sezernierung von Prostaglandinen (vgl. **Abb. 3.2 C**) auf Hautfibroblasten auswirkt. Beispielsweise wurde bei durch UVB-Bestrahlung DNA-geschädigten Keratinozyten (vgl. **Kap. 4.5.3**) eine Sezernierung von Mediatoren beobachtet, welche folglich in Hautfibroblasten zu einer Steigerung der Kollagenase-Expression führten (Dong et al., 2008).

Nach neusten Daten von Kim et al. (2008) führt der in oben aufgeführte Untersuchungen (Han et al., 2004; Zdanov et al., 2007) verwendete COX-2-Inhibitor NS-398 jedoch nicht über eine Hemmung der COX-2-Enzymaktivität zu einer Modulation der Seneszenz von HDF-Zellen. Der exakte Beitrag der COX-2-Aktivität zur zellulären Seneszenz ist demnach derzeit nicht geklärt.

4.8 p38^{MAPK}, HuR und EGF-Rezeptor als Ansatzpunkte der Präventivmedizin

Der durch entartete Keratinozyten verursachte sog. weiße Hautkrebs hat seine Hauptursache in der Einwirkung von UV-Strahlung auf die Epidermis. Diese Krebsform ist zwar deutlich weniger invasiv als der durch Melanozyten verursachte schwarze Hautkrebs, er führt aber häufig zu erheblicher Schädigung des betroffenen Bereiches und tritt zudem oft im besonders UV-exponierten Gesicht auf. In Deutschland werden laut der Deutschen Krebshilfe e.V. jährlich mehr als 100.000 neue Fälle dieser Erkrankung dokumentiert (<http://www.krebshilfe.de/gesundheitsfoerderung-hautkrebs.html>). Es ist also von großem Interesse, Medikamente zur Prävention dieser UV-induzierten Krebsart zur Verfügung zu haben.

Wie Versuche mit transgenen Mäusen zeigen, spielt die Cyclooxygenase-2 eine zentrale Rolle bei der Entstehung UVB-verursachten Hautkrebses (Rundhaug et al., 2007). Es sollte also möglich sein, die schädlichen Folgen einer übermäßigen UV-Exposition durch Unterdrückung der UV-verursachten gesteigerten COX-2-Aktivität zu vermindern. Tatsächlich konnten Anderson et al. (1992) so die Sonnenbrand vorbeugende Wirkung der Einnahme verschiedener nicht-steroidaler Antirheumatika (NSARs) wie Aspirin, welche sowohl COX-1

als auch COX-2 hemmen, durch die Ermittlung quantitativer Parameter bei Probanden belegen. Zudem konnte die durch UVA/UVB-Bestrahlung hervorgerufene Hautkrebsbildung im Mausmodell durch die Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib reduziert werden (Pentland et al. 1999).

Eine andere Möglichkeit zur Unterdrückung COX-2 verursachter Schädigung auf die Haut als die Hemmung ihrer Enzymaktivität besteht in der Unterdrückung ihrer UV-induzierten Expression wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit in ihrem molekularen Mechanismus im Falle von UVB beleuchtet wurde. Ein Ansatzpunkt ist dabei die Hemmung der auch bei anderen Krebsarten allgemein wichtigen Aktivität des EGFR. Denkbar wäre der Einsatz von den EGFR sehr effektiv und selektiv hemmenden Tyrosinkinase-Inhibitoren wie dem auch hier eingesetzten AG1478 (vgl. **Abb. 3.15 C**) oder von PD168393. So konnte im Fall von AG1478 bereits tatsächlich eine Chemoprävention der Bildung von Hauttumoren bei UV-bestrahlten Mäusen verzeichnet werden (El-Abaseri et al., 2005).

Auch SB202190, ein Pyridylimidazol, das in dieser Arbeit zur Hemmung der p38^{MAPK}, welche bei entzündlichen Reaktionen eine zentrale Rolle spielt, Anwendung fand, schützt im Mausmodell vor der akuten Beeinträchtigung der Haut nach hohen UVB-Dosen. Da aber zudem Apoptoseprozesse in der Epidermis auf diese Weise deutlich unterdrückt wurden, könnte eine langfristige Anwendung eventuell auch die Tumorbildung in der Haut fördern (Hildesheim et al., 2004).

Prinzipiell müsste nach den Ergebnissen dieser Arbeit (s. **Abb. 3.23**) auch der Einsatz spezifischer PKC-Inhibitoren zur Hautkrebsprävention möglich sein, zumal eine erhöhte, fehlgesteuerte PKC-Aktivität auch allgemein mit Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht wird. So sind die Phorbolester wichtige Cokarzinogene, da sie eine starke und langanhaltende PKC-Aktivierung bewirken.

Auch die Nutzbarmachung von in Naturprodukten enthaltenden Wirkstoffen ist denkbar. Hier ist beispielsweise Genistein, eine in der Sojabohne vorkommende Verbindung, zu nennen. Genistein ist als Antioxidanz und allgemeiner Tyrosinkinase-Inhibitor bekannt. In dieser Arbeit führte die Inkubation mit Genistein zu einer effektiven Verminderung der COX-2-Induktion durch UVB (s. **Abb. 3.15 B**). Als Erklärung dafür wäre eine Hemmung des EGFR aber möglicherweise auch eine Verminderung der Aktivierung von p38^{MAPK} oder PKC etwa durch MKK 3/6, eine Threonin-/Tyrosinkinase, bzw. die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Lck (Fukunaga et al., 2001) anzuführen (vgl. **Kap. 4.4**). Zudem könnte Genistein aufgrund seiner

antioxidativen Eigenschaften über eine Verminderung der UVB-verursachten ROS-Produktion wirken. Tatsächlich führt die topische Anwendung von Genistein und seinen gastrointestinalen Metaboliten wie Equol zu einer deutlichen Abschwächung des UVB-verursachten Sonnenbrands und der durch UVB verursachten H₂O₂-Produktion in muriner Haut (Widyarini et al., 2001). Attraktiv wäre in diesem Zuge natürlich eine orale Einnahme von Genistein in Form von speziellen Sojaerzeugnissen.

Ein weiteres Beispiel ist das in grünem Tee enthaltene Epigallocatechin-3-gallat (EGCG). Dieses hemmt bekanntermaßen die Aktivierung von p38^{MAPK} nach UVB-Bestrahlung (Chen et al., 1999) und führt unter oxidativen Stressbedingungen (AAPH) zur Verminderung der COX-2-Induktion durch Hemmung von p38^{MAPK} (Cui et al., 2004). So sind auch in diesem Fall schon entsprechende Untersuchungen zur chemopräventiven Wirkung bei UV-Schädigung der Haut durchgeführt worden (Afaq et al., 2002). Es dürfte also deutlich geworden sein, dass die weitere Aufklärung der an der Hautkrebsentstehung beteiligten Mechanismen wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung von Medikamenten liefern kann.

So wurde in dieser Arbeit eine maßgebliche Beteiligung von HuR an der posttranskriptionellen Modulation und somit Expression der Cyclooxygenase-2 gefunden (s. **Abb. 3.8** und **3.9**). Es wäre eine Selektion auf Naturprodukte wie Pflanzenextrakte denkbar, die zu einer Unterdrückung der Translokation von HuR ins Zytoplasma (s. **Abb. 3.11** und **3.12**) und somit zu einer Abschwächung der HuR-Wirkung auf die mRNA von COX-2 (vgl. **Abb. 3.13**) sowie anderer noch zu identifizierender Proteine führen, welche mit Hautkrebs und auch -alterung in Zusammenhang gebracht werden. Auch im Falle von UVA bestehen Hinweise für eine entsprechende Translokation von HuR in HaCaT (Zhang & Bowden, 2008), so dass im Zuge solcher Untersuchungen auch dieser, besonders altersrelevante Spektralbereich miteinbezogen werden sollte. Zu bedenken ist jedoch auch eine mögliche antiapoptische Wirkung von HuR nach UV-Einwirkung (vgl. **Kap. 4.3**), was das Potential von HuR als präventivmedizinischem Ansatzpunkt gegebenenfalls etwas relativiert.

Zusammenfassung

Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ein induzierbares, im Entzündungsgeschehen zentrales Enzym, dessen gesteigerte Bildung nach UV-Exposition in der menschlichen Haut mit Photokarzinogenese in Verbindung gebracht wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Induktion der COX-2-Bildung durch UVB-Strahlung (280-320 nm) an kultivierten menschlichen Keratinozyten (HaCaT) untersucht.

Die COX-2-Induktion durch UVB wurde auf mRNA-, Protein- und Produktebene (Nachweis von Prostaglandin E₂) gezeigt. Parallel induziert UVB eine starke und lang anhaltende Aktivierung der Stresskinase p38^{MAPK}, deren Aktivität sich als für die COX-2-Induktion erforderlich erwies, was sowohl auf Protein- als auch auf Produktebene gezeigt wurde. Als weitere die COX-2-Induktion modulierende Faktoren wurden Proteinkinase C-Aktivität sowie der nukleozytoplasmatische Transportkomplex CRM1 identifiziert.

Die maßgebliche Rolle des RNA-Bindeproteins und posttranskriptionellen Modulators HuR bei der COX-2-Induktion durch UVB wurde anhand der Depletion mittels siRNA auf mRNA- und Protein- sowie Produktebene herausgearbeitet. UVB induziert zudem die Translokation von HuR aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Die Beteiligung eines weiteren RNA-Bindeproteins, hnRNP A0, an der Induktion der COX-2 konnte ausgeschlossen werden.

Behandlung mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und UVB-Bestrahlung (100 J/m²) führen in HaCaT-Zellen zu einer COX-2-Induktion vergleichbaren Ausmaßes. Obgleich UVB-Induktion durch Hemmung des EGF-Rezeptors sowie durch Tyrosinkinasehemmung vermindert wird, weisen mehrere Ergebnisse darauf hin, dass UVB und EGF – entgegen bisheriger Annahmen – unterschiedliche Signalkaskaden stimulieren: (i) Weder in Western-Blot-Analysen noch immuncytochemisch konnte eine der EGF-Wirkung entsprechende Tyrosinphosphorylierung oder Internalisierung des Rezeptors durch UVB gefunden werden, und (ii) weder Hemmung der p38^{MAPK} noch Depletion von HuR beeinflussten die EGF-induzierte COX-2-Expression. Am Beispiel der durch UVA-Strahlung (320-400 nm) induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR sowie der nachfolgenden Signalkaskade in HeLa-Zellen wurde bestätigt, dass eine UV-induzierte Stimulation des EGFR dennoch prinzipiell möglich ist, jedoch definierte Bestrahlungsbedingungen erfordert.

Mit dem Ah-Rezeptor wurde ein zweites zelluläres Rezeptorsystem, dessen Bedeutung für die zelluläre Wirkung von UVB bekannt ist, hinsichtlich seiner Bedeutung für die UVB-induzierte COX-2-Expression untersucht. In Ah-Rezeptor-defizienten HaCaT-Zellen wurde zwar in der Tat eine abgeschwächte UVB-Induktion der COX-2 festgestellt, jedoch wurde umgekehrt eine verglichen mit UVB nur sehr geringe Induzierbarkeit der COX-2 durch AhR-Liganden in HaCaT gefunden. Insgesamt spricht dies für eine lediglich modulierende, nicht aber entscheidende Rolle des Ah-Rezeptors im untersuchten System.

Die genaue Kenntnis der molekularen Prozesse, die eine Induktion der COX-2 durch UVB vermitteln, ist Voraussetzung für eine auf Hautkrebsprävention gerichtete pharmakologische Intervention. In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits mit der Stresskinase p38^{MAPK}, dem RNA-Bindeprotein HuR sowie Proteinkinase C potentielle Zielstrukturen einer solchen Intervention identifiziert – andererseits wurde die Bedeutung von bisher als entscheidend für diese Induktion angenommene Faktoren, EGF- und Ah-Rezeptor, relativiert.

Summary

The enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) is a crucial regulator of inflammatory processes, the expression of which is found to be enhanced in human skin exposed to ultraviolet radiation and is linked to UV-induced carcinogenesis. This work focuses on molecular mechanisms contributing to the induction of COX-2 expression by UVB radiation (280-320 nm) in cultured human keratinocytes (HaCaT).

Induction of COX-2 expression upon exposure to UVB was demonstrated to occur at the level of mRNA, protein and product (detection of prostaglandin E₂). In parallel, UVB caused a strong and persistent activation of the stress kinase p38^{MAPK}, whose activity was then demonstrated to be required for UVB-induced COX-2 expression and PGE₂ formation. Moreover, protein kinase C activity and the nucleocytoplasmic transport complex CRM1 were identified as further factors modulating COX-2 induction.

The RNA binding protein and posttranscriptional modulator, HuR, was then demonstrated by means of siRNA-based depletion experiments to be a major regulator of UVB-induced COX-2 expression, taking both mRNA or protein and PGE₂ as parameters. In line with a role of HuR in UVB-induced effects, UVB was found to stimulate translocation of HuR from nucleus to cytoplasm. In contrast, another RNA binding protein, hnRNP A0, was found not to be involved in COX-2 induction by UVB.

Induction of COX-2 expression is elicited to similar extents in HaCaT cells exposed to epidermal growth factor (EGF) or to UVB (100 J/m²). Although UVB-induced COX-2 expression is attenuated by inhibition of the EGF receptor or employing an unspecific tyrosine kinase inhibitor, arguing for a UVB effect via the EGF receptor, several data in this work support the novel view that different signaling cascades are stimulated by UVB and EGF: (i) no significant tyrosine phosphorylation or internalization of the EGF receptor that are caused by EGF was found in Western Blot analyses or immunocytochemically in cells exposed to UVB, and (ii) neither inhibition of p38^{MAPK} nor depletion of HuR affected EGF-induced COX-2 expression. UVA (320-400 nm)-induced EGF receptor tyrosine phosphorylation and stimulation of downstream events in HeLa cells was used to demonstrate that UV-induced EGF receptor stimulation is possible provided that irradiation conditions are strictly defined.

A second cellular receptor described in the literature as a major cellular target of UVB, the arylhydrocarbon receptor (AhR), was then analyzed with respect to its contributions to UVB-induced COX-2 expression. In line with previous reports, an attenuated induction of COX-2 by UVB was observed in AhR-deficient HaCaT cells. Conversely, however, induction of COX-2 in HaCaT cells by well-known efficient AhR ligands was minor compared to induction elicited by UVB, implying that the AhR may modulate, but is unlikely to be essential for induction of COX-2 expression by UVB.

Pharmacological intervention aiming at the prevention of COX-2-dependent skin carcinogenesis requires exact knowledge of the molecular processes causing induction of COX-2 by UV radiation. The present work both identifies novel potential targets for such an intervention (the stress kinase p38^{MAPK}, the RNA binding protein HuR and protein kinase C) and challenges the view that EGF and Ah receptors are major regulators of COX-2 expression following exposure to UVB.

6 Literatur

Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T (1990)

Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro
Science. **249**(4973): 1157-1161

Abdelmohsen K, Pullmann R Jr, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M (2007)

Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression
Mol Cell. **25**(4): 543-557

Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim HH, Gorospe M (2008)

Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence
Biol Chem. **389**(3): 243-255

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2002)

Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis
Front Biosci. **7**: d784-d792

Akool el-S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Förstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2003)

Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR
Mol Cell Biol. **23**(14): 4901-4916

Andersen PH, Abrams K, Maibach H (1992)

Ultraviolet B dose-dependent inflammation in humans: a reflectance spectroscopic and laser Doppler flowmetric study using topical pharmacologic antagonists on irradiated skin
Photodermatol Photoimmunol Photomed. **9**(1): 17-23

Ashida M, Bito T, Budiyo A, Ichihashi M, Ueda M (2003)

Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB
Exp Dermatol. **12**(4): 445-452

Bachelor MA, Silvers AL, Bowden GT (2002)

The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT
Oncogene. **21**(46): 7092-7099

Bachelor MA, Cooper SJ, Sikorski ET, Bowden GT (2005)

Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model
Mol Cancer Res. **3**(2): 90-99

Badie C, Itzhaki JE, Sullivan MJ, Carpenter AJ, Porter AC (2000)

Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells

Mol Cell Biol. **20**(7): 2358-2366

Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007)

The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update

Biochem J. **408**(3): 297-315

Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montorsi F, Montironi R (2008)

Overexpression of ELAV-like Protein HuR is Associated with Increased COX-2 Expression in Atrophy, High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Incidental Prostate Cancer in Cystoprostatectomies

Eur Urol., im Druck (doi: ...) PMID: 18468781

Barrett WC, DeGnore JP, König S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB (1999)

Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215

Biochemistry. **38**(20): 6699-6705

Beak SM, Lee YS, Kim JA (2004)

NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes

Biochimie. **86**(7): 425-429

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006)

Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress

Cell. **125**(6): 1111-1124

Bikkavilli RK, Feigin ME, Malbon CC (2008)

p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt- β -catenin signaling by inactivation of GSK3 β

J. Cell Sci. **121**(Pt 21): 3598-3607

Blasina A, de Weyer IV, Laus MC, Luyten WH, Parker AE, McGowan CH (1999)

A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase

Curr Biol. **9**(1): 1-10

Bollig F, Winzen R, Kracht M, Ghebremedhin B, Ritter B, Wilhelm A, Resch K, Holtmann H (2002)

Evidence for general stabilization of mRNAs in response to UV light

Eur J Biochem. **269**(23): 5830-5839

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988)

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line

J Cell Biol. **106**(3): 761-771

Boutaud O, Dixon DA, Oates JA, Sawaoka H (2003)

Tristetraprolin binds to the COX-2 mRNA 3' untranslated region in cancer cells
Adv Exp Med Biol. **525**: 157-160

Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K (2002)

Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events
Ann N Y Acad Sci. **973**: 31-43

Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Puri PL, Gherzi R (2005)

p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts
Mol Cell. **20**(6): 891-903

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP (1998)

COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer
Carcinogenesis. **19**(5): 723-729

Burke B (2005)

The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity
Immunobiology. **209**(1-2): 51-56

Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G (2005)

RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling
J Biol Chem. **280**(52): 43257-43263

Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M (1996)

The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase
EMBO J. **15**(22): 6269-6279

Chainiaux F, Magalhaes JP, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O (2002)

UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts
Int J Biochem Cell Biol. **34**(11): 1331-1339

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002)

COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression
Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(21): 13926-13931

Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD (1999)

Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage
Proc Natl Acad Sci U S A. **96**(24): 13777-13782

Chen K, Vita JA, Berk BC, Keaney JF Jr (2001)

c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation
J Biol Chem. **276**(19): 16045-16050

Chen W, Dong Z, Valic S, Timmermann BN, Bowden GT (1999)

Inhibition of ultraviolet B--induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in a human keratinocyte cell line

Mol Carcinog. **24**(2): 79-84

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001)

MAP kinases

Chem Rev. **101**(8): 2449-2476

Chu F, Ward NE, O'Brian CA (2001)

Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine
Carcinogenesis. **22**(8): 1221-1229

Cui Y, Kim DS, Park SH, Yoon JA, Kim SK, Kwon SB, Park KC (2004)

Involvement of ERK AND p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells

Chem Phys Lipids. **129**(1): 43-52

Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K (2001)

Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer

Lancet Oncol. **2**(9): 544-551

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000)

Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors

Biochem J. **351**(Pt 1): 95-105

Dean JL, Sarsfield SJ, Tsounakou E, Saklatvala J (2003)

p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation

J Biol Chem. **278**(41): 39470-39476

Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J (2004)

The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilization

Cell Signal. **16**(10): 1113-1121

Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J, Toussaint O (2005)

Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway

J Cell Sci. **118**(Pt 4): 743-758

Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, Müller BM, Noske A, Niesporek S, Kristiansen G, Guski H, Dietel M, Hauptmann S (2004)

Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma

Cli Cancer Res. **10**(16): 5580-5586

Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994)

JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain

Cell. **76**(6): 1025-1037

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000)

Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region

J Biol Chem. **275**(16): 11750-11757

Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2001)

Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells

J Clin Invest. **108**(11): 1657-1665

Doller A, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2007)

Protein kinase C α -dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2

Mol Biol Cell. **18**(6): 2137-2148

Doller A, Akool el-S, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2008)

Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA

Mol Cell Biol. **28**(8): 2608-2625

Dong KK, Damaghi N, Picart SD, Markova NG, Obayashi K, Okano Y, Masaki H, Grether-Beck S, Krutmann J, Smiles KA, Yarosh DB (2008)

UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin

Exp Dermatol., im Druck (doi: ...) PMID: 18459971

Downward J (1998)

Ras signalling and apoptosis

Curr Opin Genet Dev. **8**(1): 49-54

Dwivedi S, Sharma A, Patrick B, Sharma R, Awasthi YC (2007)

Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling

Redox Rep. **12**(1): 4-10

Dworaczek H, Xiao W (2007)

Xeroderma pigmentosum: a glimpse into nucleotide excision repair, genetic instability, and cancer

Crit Rev Oncog. **13**(2): 159-177

Ehrhart JC, Gosselet FP, Culerrier RM, Sarasin A (2003)

UVB-induced mutations in human key gatekeeper genes governing signalling pathways and consequences for skin tumourigenesis

Photochem Photobiol Sci. **2**(8): 825-834

-
- El-Abaseri TB, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW, Hansen LA (2005)**
Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor
Cancer Res. **65**(9): 3958-3965
- Erkinheimo TL, Lassus H, Sivula A, Sengupta S, Furneaux H, Hla T, Haglund C, Butzow R, Ristimäki A (2003)**
Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma
Cancer Res. **63**(22): 7591-7594
- Fan XC, Steitz JA (1998)**
HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR
Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(26): 15293-15298
- Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T (1998)**
Photodynamic therapy in dermatology
Arch Dermatol. **134**(2): 207-214
- Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J (2007)**
Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation
Proc Natl Acad Sci U S A. **104**(21): 8851-8856
- Fukunaga M, Oka M, Ichihashi M, Yamamoto T, Matsuzaki H, Kikkawa U (2001)**
UV-induced tyrosine phosphorylation of PKC δ and promotion of apoptosis in the HaCaT cell line
Biochem Biophys Res Commun. **289**(2): 573-579
- Furnari B, Blasina A, Boddy MN, McGowan CH, Russell P (1999)**
Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1
Mol Biol Cell. **10**(4): 833-845
- Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA (2001)**
Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock
RNA. **7**(9): 1348-1361
- Gelardi A, Morini F, Dusatti F, Penco S, Ferro M (2001)**
Induction by xenobiotics of phase I and phase II enzyme activities in the human keratinocyte cell line NCTC 2544
Toxicol In Vitro. **15**(6): 701-711
- Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmüller D, Moroni C, Karin M, Chen CY (2004)**
A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery
Mol Cell. **14**(5): 571-583
-

Gibbs NK, Tye J, Norval M (2008)

Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology
Photochem Photobiol Sci. 7(6): 655-667

Gómez N, Cohen P (1991)

Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases
Nature. 353(6340): 170-173

Gross S, Knebel A, Tenev T, Neininger A, Gaestel M, Herrlich P, Böhmer FD (1999)

Inactivation of protein-tyrosine phosphatases as mechanism of UV-induced signal transduction
J Biol Chem. 274(37): 26378-26386

Gulati P, Markova B, Göttlicher M, Böhmer FD, Herrlich PA (2004)

UVA inactivates protein tyrosine phosphatases by calpain-mediated degradation
EMBO Rep. 5(8):812-817

Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ (1996)

Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors
EMBO J. 15(11): 2760-2770

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Hoolbrook NJ (1996)

Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury
J Biol Chem. 271(8): 4138-4142

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994)

A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells
Science. 265(5173): 808-811

Han JH, Roh MS, Park CH, Park KC, Cho KH, Kim KH, Eun HC, Chung JH (2004)

Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts
Mech Ageing Dev. 125(5): 359-366

Hawk JL, Black AK, Jaenicke KF, Barr RM, Soter NA, Mallett AI, Gilchrest BA, Hensby CN, Parrish JA, Greaves MW (1983)

Increased concentrations of arachidonic acid, prostaglandins E₂, D₂, and 6-oxo-F₁ α, and histamine in human skin following UVA irradiation
J Invest Dermatol. 80(6): 496-499

Hayek MG, Mura C, Wu D, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, Meydani SN (1997)

Enhanced expression of inducible cyclooxygenase with age in murine macrophages
J Immunol. 159(5): 2445-2451

He YY, Huang JL, Gentry JB, Chignell CF (2003)

Epidermal growth factor receptor down-regulation induced by UVA in human keratinocytes does not require the receptor kinase activity
J Biol Chem. 278(43): 42457-42465

Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T (1997)

Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes

J Invest Dermatol. **109**(6): 722-727**Hildesheim J, Awwad RT, Fornace AJ Jr (2004)**

p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses

J Invest Dermatol. **122**(2): 497-502**Hollis BW (2005)**

Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D

J Nutr. **135**(2): 317-322**Huang C, Ma WY, Hanenberger D, Cleary MP, Bowden GT, Dong Z (1997)**

Inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 (AP-1) activity by aspirin in AP-1-luciferase transgenic mice

J Biol Chem. **272**(42): 26325-26331**Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003)**

Radical causes of cancer

Nat Rev Cancer. **3**(4): 276-285**Iordanov MS, Choi RJ, Ryabinina OP, Dinh TH, Bright RK, Magun BE (2002)**

The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor

Mol Cell Biol. **22**(15): 5380-5394**Jin SH, Kim TI, Yang KM, Kim WH (2007)**

Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR

Eur J Pharmacol. **558**(1-3): 14-20**Kaneko K, Smetana-Just U, Matsui M, Young AR, John S, Norval M, Walker SL (2008)**

cis-Urocanic acid initiates gene transcription in primary human keratinocytes

J Immunol. **181**(1): 217-224**Kedersha N, Anderson P (2002)**

Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability

Biochem Soc Trans. **30**(Pt 6): 963-969**Keyse SM, Tyrrell RM (1989)**

Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite

Proc Natl Acad Sci U S A. **86**(1): 99-103

Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Pullmann R Jr, Yang X, Galban S, Srikantan S, Martindale JL, Blethrow J, Shokat KM, Gorospe M (2008)

Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1

Genes Dev. **22**(13): 1804-1815

Kim SR, Choi EM, Park JH, Lee ME, Park JS, Han JA, Park SC (2008)

Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner

Mech Ageing Dev., im Druck (doi: ...) PMID: 18848576

Klotz LO, Briviba K, Sies H (1997)

Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts

FEBS Lett. **408**(3): 289-291

Klotz LO, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry JM, Sies H (1999)

Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA

Eur J Biochem. **260**(3): 917-922

Klotz LO, Briviba K, Sies H (2000)

Mitogen-activated protein kinase activation by singlet oxygen and ultraviolet A

Methods Enzymol. **319**: 130-143

Klotz LO (2005)

Modulation of Cellular Signaling Processes by Reactive Oxygen Species

The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 2, Part O: 203-218

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A, Herrlich P (1996)

Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents

EMBO J. **15**(19): 5314-5325

Korswagen HC (2006)

Regulation of the Wnt/ β -catenin pathway by redox signaling

Dev Cell. **10**(6): 687-688

Kullmann M, Göpfert U, Siewe B, Hengst L (2005)

ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR

Genes Dev. **16**(23): 3087-3099

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature. **227**(5259): 680-685

Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ (2003)

Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease

Mol Cell Biol. **23**(11): 3798-3812

-
- Lal A, Mazan-Mamczarz K, Kawai T, Yang X, Martindale JL, Gorospe M (2004)**
Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs
EMBO J. **23**(15): 3092-3102
- Lal A, Kawai T, Yang X, Mazan-Mamczarz K, Gorospe M (2005)**
Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin α
EMBO J. **24**(10): 1852-1862
- Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T (2006)**
Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells
Nucleic Acids Res. **34**(14): 3988-3999
- Lee HK, Jeong S (2006)**
Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR
Nucleic Acids Res. **34**(19): 5705-5714
- Levine AJ (1997)**
p53, the cellular gatekeeper for growth and division
Cell. **88**(3): 323-331
- Linker K, Pautz A, Fehlich M, Hubrich T, Greeve J, Kleinert H (2005)**
Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR
Nucleic Acids Res. **33**(15): 4813-4827
- Liu M, Yang SC, Sharma S, Luo J, Cui X, Peebles KA, Huang M, Sato M, Ramirez RD, Shay JW, Minna JD, Dubinett SM (2007)**
EGFR signaling is required for TGF-beta 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells
Am J Respir Cell Mol Biol. **37**(5): 578-588
- López de Silanes I, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, Gorospe M (2003)**
Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis
Oncogene. **22**(46): 7146-7154
- López de Silanes I, Zhan M, Lal A, Yang X, Gorospe M (2004)**
Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR
Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(9): 2987-2992
- Lugo B, Ford HR, Grishin A (2007)**
Molecular signaling in necrotizing enterocolitis: regulation of intestinal COX-2 expression
J Pediatr Surg. **42**(7): 1165-1171
- Lugović L, Situm M, Ozanić-Bulić S, Sjerobabski-Masneć I (2007)**
Phototoxic and photoallergic skin reactions
Coll Antropol. **31** Suppl 1: 63-67
-

Lukiw WJ, Bazan NG (1998)

Strong nuclear factor- κ B-DNA binding parallels cyclooxygenase-2 gene transcription in aging and in sporadic Alzheimer's disease superior temporal lobe neocortex
J Neurosci Res. **53**(5): 583-592

Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H (1996)

Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein
J Biol Chem. **271**(14): 8144-8151

Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz LO (2003)

Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide
Free Radic Res. **37**(4): 391-397

Mahns A, Wolber R, Stäb F, Klotz LO, Sies H (2004)

Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis
Photochem Photobiol Sci. **3**(3): 257-262

Mahoney MG, Simpson A, Jost M, Noé M, Kari C, Pepe D, Choi YW, Uitto J, Rodeck U (2002)

Metastasis-associated protein (MTA)1 enhances migration, invasion, and anchorage-independent survival of immortalized human keratinocytes
Oncogene. **21**(14): 2161-2170

Maldve RE, Kim Y, Muga SJ, Fischer SM (2000)

Prostaglandin E₂ regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors
J Lipid Res. **41**(6): 873-881

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008)

Cancer-related inflammation
Nature. **454**(7203): 436-444

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C (1993)

Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976
J Biol Chem. **268**(13): 9194-9197

Masaki H, Atsumi T, Sakurai H (1995)

Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation
Biochem Biophys Res Commun. **206**(2): 474-479

Mazan-Mamczarz K, Galbán S, López de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, Gorospe M (2003)

RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation
Proc Natl Acad Sci U S A. **100**(14): 8354-8359

Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, Keene JD, Saleh M, Gallouzi IE (2008)

Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis
J Cell Biol. **180**(1): 113-127

Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999)

Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells
J Biol Chem. **274**(12): 8328-8334

Mendez F, Penner R (1998)

Near-visible ultraviolet light induces a novel ubiquitous calcium-permeable cation current in mammalian cell lines
J Physiol. **507** (Pt 2): 365-377

Meredith P, Riesz J (2004)

Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin
Photochem Photobiol. **79**(2): 211-216

Moore BC, Simmons DL (2000)

COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Curr Med Chem. **7**(11): 1131-1144

Moore MJ (2005)

From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs
Science. **309**(5740): 1514-1518

Nomura M, Kaji A, He Z, Ma WY, Miyamoto K, Yang CS, Dong Z (2001)

Inhibitory mechanisms of tea polyphenols on the ultraviolet B-activated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway
J Bio Chem. **276**(49): 46624-46631

Ono K, Han J (2000)

The p38 signal transduction pathway: activation and function
Cell Signal. **12**(1): 1-13

Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM (1997)

5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges
Cancer. **79**(12): 2282-2308

Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KN, Han R (1999)

Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition
Carcinogenesis. **20**(10): 1939-1944

Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR (1998)

H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes
J Invest Dermatol. **110**(6): 966-971

Peus D, Meves A, Vasa RA, Beyerle A, O'Brien T, Pittelkow MR (1999)

H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation
Free Radic Biol Med. **27**(11-12): 1197-1202

Pham H, Chong B, Vincenti R, Slice LW (2008)

Ang II and EGF synergistically induce COX-2 expression via CREB in intestinal epithelial cells
J Cell Physiol. **214**(1): 96-109

Pieczyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, Anderson P (2000)

TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha
EMBO J. **19**(15): 4154-4163

Punnonen K, Puntala A, Jansén CT, Ahotupa M (1991)

UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme activities in human keratinocytes in vitro
Acta Derm Venereol. **71**(3): 239-242

Rakoff-Nahoum S (2006)

Why cancer and inflammation?
Yale J Biol Med. **79**(3-4): 123-130

Raman M, Earnest S, Zhang K, Zhao Y, Cobb MH (2007)

TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage
EMBO J. **26**(8): 2005-2014

Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafström AK (1987)

Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances
J Biol Chem. **262**(32): 15422-15427

Rannug U, Rannug A, Sjöberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J (1995)

Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands
Chem Biol. **2**(12): 841-845

Rauterberg A, Jung EG (1993)

UV exposure, skin cancer and decrease in the ozone layer
Ther Umsch. **50**(12): 804-807

Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB (2007)

p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage
Cancer Cell. **11**(2): 175-189

Rousseau S, Morrice N, Peggie M, Campbell DG, Gaestel M, Cohen P (2002)

Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs
EMBO J. **21**(23): 6505-6514

Rundhaug JE, Mikulec C, Pavone A, Fischer SM (2007)

A role for cyclooxygenase-2 in ultraviolet light-induced skin carcinogenesis
Mol Carcinog. **46**(8): 692-698

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998)

Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1
EMBO J. **17**(9): 2596-2606

Sawoaka H, Dixon DA, Oates JA, Boutaud O (2003)

Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site
J Biol Chem. **278**(16): 13928-13935

Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G (1991)

UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo
Arch Dermatol Res. **283**(8): 506-511

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blandschun R, Wenk J (1997)

UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging
Biol Chem. **378**(11): 1247-1257

Schenk H, Klein M, Erdbrügger W, Dröge W, Schulze-Osthoff K (1994)

Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1
Proc Natl Acad Sci U S A. **91**(5): 1672-1676

Schreck R, Rieber P, Bäumler PA (1991)

Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1
EMBO J. **10**(8): 2247-2258

Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, Hla T (2003)

The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2
J Biol Chem. **278**(27): 25227-25233

Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBuis RN (2000)

Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells
J Biol Chem. **275**(43): 33951-33956

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000)

Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology
Annu Rev Biochem. **69**: 145-82

Song IS, Tatebe S, Dai W, Kuo MT (2005)

Delayed mechanism for induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling
J Biol Chem. **280**(31): 28230-28240

Soriani M, Rice-Evans C, Tyrrell RM (1998)

Modulation of the UVA activation of haem oxygenase, collagenase and cyclooxygenase gene expression by epigallocatechin in human skin cells
FEBS Lett. **439**(3): 253-257

Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK, Anderson P (2004)

MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay
EMBO J. **23**(6): 1313-1324

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ (1999)

Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53
J Biol Chem. **274**(16): 10911-10915

Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ (2002)

Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3
J Biol Chem. **277**(21): 18649-18657

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ (2003)

Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment
Trends Pharmacol Sci. **24**(2): 96-102

Subbaramaiah K, Marmo TP, Dixon DA, Dannenberg AJ (2003)

Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR
J Biol Chem. **278**(39): 37637-37647

Sullivan SG, Chiu DT, Errasfa M, Wang JM, Qi JS, Stern A (1994)

Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells
Free Radic Biol Med. **16**(3): 399-403

Sully G, Dean JL, Wait R, Rawlinson L, Santalucia T, Saklatvala J, Clark AR (2004)

Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetraprolin, HuR (Hu antigen R) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1)
Biochem J. **377**(Pt 3): 629-639

Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006)

Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance
Plant Cell. **18**(8): 2051-2065

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS (2001)

Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation
Mutat Res. **480-481**: 243-68

Takakura K, Beckman JS, MacMillan-Crow LA, Crow JP (1999)

Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite
Arch Biochem Biophys. **369**(2): 197-207

Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden GT (2001a)

Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3 β in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes
Cancer Res. **61**(11): 4329-4332

Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Inoue H, Bowden GT (2001b)

Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes
Oncogene. **20**(37): 5164-5172

Tong X, Van Dross RT, Abu-Yousif A, Morrison AR, Pelling JC (2007)

Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition
Mol Cell Biol. **27**(1): 283-296

Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. (1991)

The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C
J. Biol Chem. **266**(24): 15771-15781

Tran H, Maurer F, Nagamine Y (2003)

Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
Mol Cell Biol. **23**(20): 7177-88

Trautinger F (2001)

Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing.
Clin Exp Dermatol. **26**(7): 573-577

Unsal-Kaçmaz K, Makhov AM, Griffith JD, Sancar A (2002)

Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA
Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(10): 6673-6678

Von Montfort C, Fernau NS, Beier JI, Sies H, Klotz LO (2006a)

Extracellular generation of hydrogen peroxide is responsible for activation of EGF receptor by ultraviolet A radiation
Free Radic Biol Med. **41**(9): 1478-1487

Von Montfort C, Sharov VS, Metzger S, Schöneich C, Sies H, Klotz LO (2006b)

Singlet oxygen inactivates protein tyrosine phosphatase-1B by oxidation of the active site cysteine
Biol Chem. **387**(10-11): 1399-1404

Wang H, Wen S, Bunnett NW, Leduc R, Hollenberg MD, MacNaughton WK (2008)

Proteinase-activated receptor-2 induces cyclooxygenase-2 expression through β -catenin and cyclic AMP-response element-binding protein
J Biol Chem. **283**(2): 809-815

Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M (2000a)

HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation
EMBO J. **19**(10): 2340-2350

Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M (2000b)

HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light
Mol Cell Biol. **20**(3): 760-769

Wang W, Yang X, Cristofalo VJ, Holbrook NJ, Gorospe M (2001)

Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence
Mol Cell Biol. **21**(17): 5889-5898

Wang W, Yang X, López de Silanes I, Carling D, Gorospe M (2003)

Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function
J Biol Chem. **278**(29): 27016-27023

Wang W, Yang X, Kawai T, López de Silanes I, Mazan-Mamczarz K, Chen P, Chook YM, Quensel C, Köhler M, Gorospe M (2004)

AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin α 1: involvement in the nuclear import of RNA-binding protein HuR
J Biol Chem. **279**(46): 48376-48388

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Hoolbrook NJ (1998)

The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival
Biochem J. **333** (Pt 2): 291-300

Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1976)

Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor
Cancer Res. **36**(7 PT 1): 2326-2329

Weiss FU, Daub H, Ullrich A (1997)

Novel mechanisms of RTK signal generation
Curr Opin Genet Dev. **7**(1): 80-86

Westmark CJ, Bartleson VB, Malter JS (2005)

RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light
Oncogene. **24**(3): 502-511

Widyarini S, Spinks N, Husband AJ, Reeve VE (2001)

Isoflavonoid compounds from red clover (*Trifolium pratense*) protect from inflammation and immune suppression induced by UV radiation

Photochem Photobiol. **74**(3): 465-470

Winzen R, Gowrishankar G, Bollig F, Redich N, Resch K, Holtmann H (2004)

Distinct domains of AU-rich elements exert different functions in mRNA destabilization and stabilization by p38 mitogen-activated protein kinase or HuR

Mol Cell Biol. **24**(11): 4835-4847

Winzen R, Thakur BK, Dittrich-Breiholz O, Shah M, Redich N, Dhamija S, Kracht M, Holtmann H (2007)

Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets

Mol Cell Biol. **27**(23): 8388-8400

Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL (2006)

Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection

Photochem Photobiol Sci. **5**(2): 215-237

Wu W, Silbajoris RA, Whang YE, Graves LM, Bromberg PA, Samet JM (2005)

p38 and EGF receptor kinase-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is required for Zn²⁺-induced cyclooxygenase-2 expression

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **289**(5): L883-L889

Xu L, Han C, Wu T (2006)

A novel positive feedback loop between peroxisome proliferator-activated receptor- δ and prostaglandin E₂ signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth

J Biol Chem. **281**(45): 33982-33996

Xu Y, Voorhees JJ, Fisher GJ (2006)

Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells

Am J Pathol. **169**(3): 823-830

Zaid MA, Afaq F, Syed DN, Dreher M, Muktar H (2007)

Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx

Photochem Photobiol. **83**(4): 882-888

Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, Martien S, Gosselin K, Vercaemer C, Chelli F, Toussaint O, Abbadie C (2007)

Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity

Exp Cell Res. **313**(14): 3046-3056

Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ (1998)

Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2

J Biol Chem. **273**(4): 2424-2428

Zhang J, Bowden GT (2008)

UVB irradiation regulates Cox-2 mRNA stability through AMPK and HuR in human keratinocytes
Mol Carcinog., im Druck (doi: ...) PMID: 18449856

Zhang Y, Dong Z, Bode AM, Ma WY, Chen N, Dong Z (2001)

Induction of EGFR-dependent and EGFR-independent signaling pathways by ultraviolet A irradiation
DNA Cell Biol. **20**(12): 769-779

Zhang Z, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, DuBois (2000)

Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells
Neoplasia. **2**(6): 523-530

Zhao Q, Barakat BM, Qin S, Ray A, El-Mahdy MA, Wani G, Arafa ES, Mir SN, Wang QE, Wani AA (2008)

The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation
J Biol Chem. **283**(47): 32553-32561

Danksagung

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz möchte ich vor allem dafür danken, dass er mir die Bearbeitung einer solch interessanten Thematik ermöglicht hat, sowie für die fachliche Inspiration.

Prof. Dr. Lutz Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klotz bedanke ich mich sowohl für die mir entgegengebrachte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft als auch für die Momente humorvoller Regeneration.

Dr. Niloofar Ale-Agha gilt mein Dank insbesondere für die Unterstützung gegen Ende der experimentellen Tätigkeiten.

Fr. Elisabeth Sauerbier danke ich für die kompetente Einführung in die benötigten Methoden.

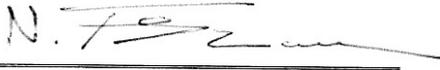
Erwähnt werden sollten zudem alle übrigen Mitarbeiter der Abteilung für Molekulare Altersforschung des Instituts für umweltmedizinische Forschung gGmbH sowie die des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I des Universitätsklinikums Düsseldorf. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre!

Außerdem sei noch Dr. Philippe L. Walter für seine Ratschläge rund um das Promotionsvorhaben gedankt.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich schließlich herzlich für ihre Nachsicht auch in schwierigeren Phasen dieser Arbeit.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst. Diese Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bislang habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 29.11.2008

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'N. Fernau', written over a horizontal line.

(Niklas S. Fernau)