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

Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann

**Induktion der Cyclooxygenase 2-Expression
durch UV-Strahlung über p38-MAP-Kinase-vermittelte
mRNA-Stabilisierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Dominik Fugmann
(2010)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. rer. nat. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: PD Dr. Wätjen

„Ihrer wahren Wesensbestimmung nach ist die Wissenschaft
das Studium der Schönheit der Welt.“

– Simone Weil

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 UV-Strahlung und Haut	1
1.2 Die p38-MAP-Kinasen.....	3
1.2.1 Regulation	3
1.2.1.1 MAPK-Aktivierung durch UV-Strahlung.....	6
1.2.2 p38-MAPK und COX-2	6
1.2.3 SB202190 – Hemmung der p38-MAPK	7
1.3 Cyclooxygenasen	8
1.3.1 Die COX-Isoformen: Vorkommen und Funktionen	9
1.3.2 Karzinogenese und Tumorpromotion durch COX-2.....	12
1.4 mRNA-Stabilisierung.....	14
1.5 Ziele der Arbeit	17
2. Material und Methoden	20
2.1 Reagenzien	20
2.2 Zellkultur	21
2.3 Behandlung der Zellen	21
2.3.1 UV-Bestrahlung	21
2.3.2 Hemmung der p38-MAPK mit SB202190.....	22
2.4 Probenanalyse.....	22
2.4.1 Isolierung von RNA	22
2.4.2 RT-PCR und Agarosegel-Elektrophorese	23
2.4.2.1 Reverse Transkription (RT) und PCR.....	23
2.4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.4.3 Bestimmung der Stabilität von RNA	24
2.4.4 Herstellung von Proteinlysaten	25
2.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) und „Western-Blot“	25
2.4.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	26
2.4.5.2 Immunanfärbung nach Western-Blot.....	27
2.4.6 Entfernen von Antikörpern („Strippen“).....	28

3. Ergebnisse	29
3.1 Induktion der COX-2 durch UV-Licht.....	29
3.1.1 COX-2-Induktion auf RNA-Ebene	29
3.1.2 COX-2-Induktion auf Proteinebene	30
3.2 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch UV-Licht	32
3.3 Rolle der p38 MAPK in der Induktion der COX-2 durch UVB	33
3.4 COX-2-mRNA-Stabilisierung durch UV-Bestrahlung	35
3.5 p38-MAPK vermittelt die UVB-induzierte COX-2-mRNA-Stabilisierung.....	37
4. Diskussion	40
4.1 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch UV-Licht	40
4.2 Induktion der COX-2 durch UVB	42
4.2.1 Stabilisierung der COX-2-mRNA	43
4.2.2 Zur Bedeutung der p38-MAPK bei der COX-2-Induktion und Stabilisierung der COX-2mRNA.....	44
4.3 p38-MAPK und COX-2 in der Krebs-Prävention und -Therapie	45
4.4 Fazit und Ausblick	47
5. Zusammenfassung.....	49
6. Literatur	50
7. Abkürzungsverzeichnis.....	62
8. Danksagung.....	65

1. Einleitung

1.1 UV-Strahlung und Haut

Eine der häufigsten Krebsarten des Menschen ist der Hautkrebs. Ein entscheidender ätiologischer Faktor ist ultraviolette (UV) Strahlung: Sie ist an der Entstehung der drei häufigsten Hautkrebsvarianten beteiligt – dem Basalzellkarzinom, dem spinocellulären Karzinom und dem kutanen malignen Melanom (Armstrong und Krickler 2001; de Gruijl et al. 2001).

UV-Strahlung wird nach abgedeckten Wellenlängenbereichen eingeteilt in UVA- (UVA I 340-400 nm; UVA II 320-340 nm), UVB- (280-320 nm) und UVC-Strahlung (200-280 nm). UVC-Strahlung wird durch die Ozonschicht absorbiert, ebenso ein Teil der UVB-Strahlung. Die biologische Wirkung der UV-Strahlung hängt von der jeweiligen Wellenlänge ab: UVB- und UVC-Strahlung werden von Basen der DNA absorbiert und schädigen so die DNA direkt, was nicht nur Strangbrüche, sondern auch kovalente Bindungen zwischen Pyrimidinbasen, also Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und Pyrimidin-(4-6)-Pyrimidon, zur Folge hat. UVA-Strahlung hingegen führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Cadet et al. 1992), die wiederum die DNA schädigen können, beispielsweise durch Bildung von 8-Hydroxyguanin, Induktion von Basenverlust oder Strangbrüchen (de Gruijl et al. 2001; Ravanat et al. 2001). Werden diese Schäden nicht oder fehlerhaft repariert, kann es zu Mutationen und infolge dieser zu Karzinogenese kommen.

Neben der DNA-Schädigung führt UV-Bestrahlung zu einer veränderten Signaltransduktion und somit auch zu einer veränderten Genexpression (Bender et al. 1997; Grether-Beck et al. 1997; Krutmann 1998; Tyrrell 1996). Die DNA-Schädigung gilt als Hauptursache der Karzinogenese; die tumorpromovierende Wirkung hingegen ist noch nicht geklärt – eben in der veränderten Signaltransduktion könnte aber ein Schlüssel liegen:

So ist bekannt, dass eine entscheidende Schnittstelle in der UV-Licht-induzierten Signaltransduktion die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind (Brenneisen et al. 2002; Klotz et al. 2001), die eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren stimulieren (vgl. Abb.1.1.) .

Es gibt Hinweise darauf, dass durch MAP-Kinasen sowohl eine Induktion von Cyclooxygenase (COX)-2 (Buckman et al. 1998) als auch eine Stabilisierung von COX-2-mRNA vermittelt wird (Lasa et al. 2000; Ridley et al. 1998). Da mehrere Studien eine tumorpromovierende oder karzinogene Wirkung von COX-2 zeigen konnten, ist die Hypothese aufgestellt worden, dass der Signalweg von UV-Strahlung über die MAP-Kinasen bis hin zur COX-2-Induktion an der Entwicklung von Hautkrebs beteiligt ist.

Auf Bedeutung und Funktion der MAP-Kinasen und der Cyclooxygenasen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

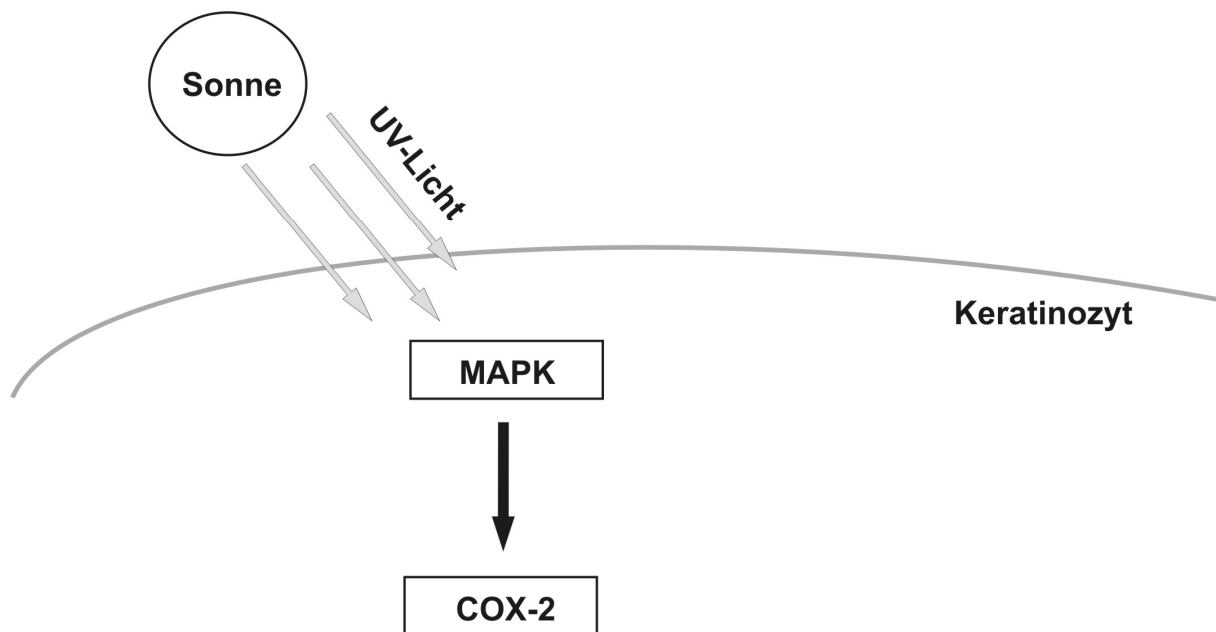


Abb. 1.1 UV-Strahlung und COX-2

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwiefern UV-Strahlung zur Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) führt, und inwiefern diese Aktivierung zur Induktion der COX-2 beiträgt.

1.2 Die p38-MAP-Kinasen

Die p38-mitogen-aktivierten Proteinkinasen (p38-MAPK) sind Stress-aktivierte Serin/Threonin-Protein-Kinasen und gehören, zusammen mit der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) und einigen durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERKs), zur Familie der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) (Schaeffer und Weber 1999; Widmann et al. 1999). Mittlerweile sind vier p38-MAPK Isoformen bekannt, die p38-MAPK α , p38-MAPK β , p38-MAPK γ , p38-MAPK δ (Freshney et al. 1994; Jiang et al. 1996; Li et al. 1996; Mertens et al. 1996; Raingeaud et al. 1995; Wang et al. 1997).

Ihre Aktivierung führt zu Veränderungen der Genexpression und beeinflusst die Zellproliferation, Zellbewegung, Differenzierung und Apoptose (Cobb 1999; Dhanasekaran et al. 1998; Schaeffer und Weber 1999).

1.2.1 Regulation

MAP-Kinasen werden durch doppelte Phosphorylierung an einer exponierten Schleife aktiviert (Hanks und Hunter 1995): Im Falle der p38-MAPK werden sowohl Threonin als auch Tyrosin eines Threonin-Glycin-Tyrosin-Motivs phosphoryliert. Auf ähnliche Weise erfolgt Aktivierung von JNKs und ERKs über Phosphorylierung von Thr-Pro-Tyr bzw. Thr-Glu-Tyr; dieser Unterschied erklärt die Spezifität der jeweiligen übergeordneten Kinasen, die die MAP-Kinasen durch diese doppeltspezifische Phosphorylierung aktivieren (Cobb und Goldsmith 1995; Freshney et al. 1994; Raingeaud et al. 1995; Rouse et al. 1994):

Diese übergeordneten Kinasen werden MAP-Kinase-Kinasen (MKK) genannt. Die p38-MAPK ihrerseits wird vornehmlich durch MKK3 und MKK6 aktiviert (Derijard et al. 1995; Raingeaud et al. 1996); MKK4 führt *in vitro* ebenfalls zu einer Aktivierung (Ganiatsas et al. 1998).

Die MKK wiederum werden durch übergeordnete Kinasen reguliert, die als MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MKKK) bezeichnet werden. Von diesen ist mittlerweile eine Vielzahl bekannt (Blank et al. 1996; Deacon und Blank 1999; Guan et al. 1998; Hirai et al. 1996; Hutchison et al. 1998; Ichijo et al. 1997; Lin et al. 1995; Rana et al. 1996; Salmeron et al. 1996; Takekawa et al. 1997; Yamaguchi et al. 1995); auch bei ihnen scheint es eine gewisse Spezifität dafür zu geben, welchen MAPK-Signalweg sie aktivieren: So wurden insbesondere

TAK-1 (*TGF- β -activated kinase-1*), MKKK-4, TAO (*thousand and one amino acid protein kinase*) und ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase*) als potente Aktivatoren des p38-MAPK-Signalweges identifiziert (siehe Abb. 1.2); MKKK-1 hingegen führt zu starker Aktivierung des JNK-Weges und eher geringfügiger Aktivierung des p38-MAPK-Weges. Auch Querverbindungen zwischen den verschiedenen Signalwegen wurden beobachtet.

Die den MKKK vorgeschaltete Signaltransduktion ist komplex: Es gibt Hinweise, dass niedermolekulare GTP-bindende Proteine stromaufwärts der JNK- und p38-MAPK-Kaskade liegen; hierzu zählt beispielsweise die Rho-Familie inklusive der Proteine Rac und Cdc42. So führt konstitutive Expression aktiver Formen von Rac oder Cdc42 zu p38-MAPK- und JNK-Aktivierung, und es werden in Zellen, die dominant-negative Formen von Rac oder Cdc42 exprimieren, der p38-MAPK- und JNK-Signalweg gehemmt (Bagrodia et al. 1995; Minden et al. 1995; Zhang et al. 1995).

Zumindest teilweise scheinen hieran die p21-aktivierten Kinasen (PAKs), eine Familie von Serin-Threonin-Kinasen, beteiligt zu sein. Durch Bindung an Cdc42 oder Rac werden sie aktiviert und stimulieren dann ihrerseits verschiedene Stress-regulierte Protein-Kinase-Signalwege (Lim et al. 1996; Zhang et al. 1995).

Das Interleukin IL-1 führt zu Aktivierung der p38-MAPK via TAK-1, einer MKKK für p38 und JNK: Nach Stimulation durch IL-1 bildet die IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) mit MyD88 einen Komplex, aus dem IRAK entlassen wird und wiederum einen Komplex mit TNF-Rezeptor-assoziiertem Faktor 6 bildet; letzterer bindet und aktiviert schließlich TAK-1 (Burns et al. 1998; Muzio et al. 1998; Wesche et al. 1997).

Auch der Zelltod induzierende Rezeptor Fas kann eine MKKK für p38-MAPK und JNK aktivieren, nämlich ASK-1, die einen Komplex mit Daxx bildet, einem Fas-Rezeptor-assoziierten Protein (Chang et al. 1998; Yang et al. 1997).

Neben Fas und proinflammatorischen Zytokinen gibt es eine Vielzahl weiterer Stimuli, die eine p38-Aktivierung herbeiführen können, wie zum Beispiel Hitzeschock, osmotischer Stress, und UV-Licht (Widmann et al. 1999).

Inaktivierung von MAPK erfolgt durch MAPK-Phosphatasen (MKP), die sowohl den Threonin-, als auch Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife dephosphorylieren und die MAP-Kinasen somit in einen inaktiven Zustand überführen. Mittlerweile sind mehrere MKP bekannt: MKP-1 bis MKP-5, PAC1 (*procaspase activating compound 1*), hVH2 (*homologue*

of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone 2) und hVH5 (Obata et al. 2000). Die MKP scheinen eine gewisse Spezifität für MAPK-Subgruppen zu haben: MKP-1 und MKP-5 beispielsweise hemmen insbesondere die p38-MAPK und JNK, MKP-3 hingegen eher die ERK (Franklin et al. 1998; Muda et al. 1996b; Muda et al. 1996a; Tanoue et al. 1999).

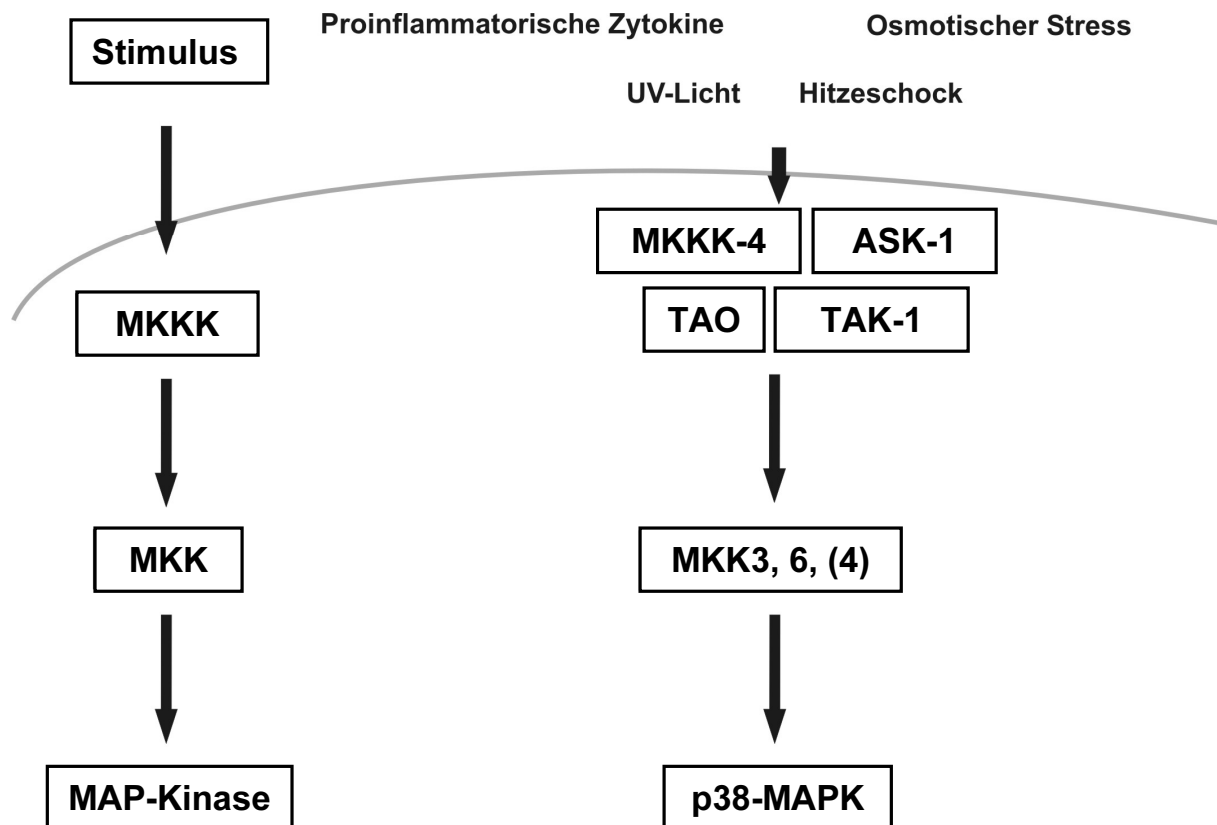


Abb. 1.2 Regulation der p38-MAPK

Verschiedene Stimuli wie z.B. UV-Strahlung führen zur Aktivierung der MKKK. Diese aktivieren die MKK, die den MAP-Kinasen direkt übergeordnet sind und diese phosphorylieren und so aktivieren. Abkürzungen werden im Text erläutert.

1.2.1.1 MAPK-Aktivierung durch UV-Strahlung

Eine Vielzahl von Studien hat eine Aktivierung von MAPK-Signalwegen infolge von UV-Strahlung beschrieben; allerdings variieren die aktivierten Subtypen der MAPK-Familie in Abhängigkeit von der Wellenlänge und des untersuchten Zelltyps:

UVA (450 bis 2000 J/m²) hat keine MAPK-Aktivierung in menschlichen Linsen-Epithelzellen bewirkt (Bomser 2002), während alle drei MAPK-Signalwege in menschlichen Keratinozyten nach UVA-Bestrahlung (3000 bis 6000 J/m²) aktiviert wurden (Englaro et al. 1998). Nur JNK- und p38-MAPK-Aktivierung konnte nach UVA-Bestrahlung in menschlichen Haut-Fibroblasten gesehen werden (30 bis 300 kJ/m²) (Klotz et al. 1997; Klotz et al. 1999); eben diese Kinasen wurden aber nicht nach UVA-Bestrahlung (1 bis 100kJ/m²) von Melanozyten aktiviert, sondern nur die ERK-Phosphorylierung nahm zu (Yanase et al. 2001).

Ähnlich kontrovers erscheint die Studienlage für UVB-Licht: So konnte in einer menschlichen Keratinozytenlinie, HaCat-Zellen, gezeigt werden, dass UVB (100 bis 800 J/m²) zu starker JNK-, aber nur schwacher ERK-Aktivierung führt (Assefa et al. 1997). In proliferierenden Keratinozyten hingegen führte UVB-Bestrahlung zu JNK- und p38-Phosphorylierung, aber zu einer ERK-Herunterregulierung (Iordanov et al. 2002). Eine andere Arbeitsgruppe hat dagegen in verschiedenen menschlichen Keratinozytenlinien eine p38- und ERK-Aktivierung nach UVB-Bestrahlung festgestellt (Chen und Bowden 1999; Chen et al. 1999).

Am besten untersucht sind die Auswirkungen von UVC-Licht auf die MAP-Kinasen: Die meisten Studien konnten eine Aktivierung aller drei MAPK-Signalwege zeigen (Bode und Dong 2003) – mit wenigen Ausnahmen: So konnte in einer humanen T-Zell-Linie nach UVC-Bestrahlung (280 nm, 100 J/m²) nur eine Aktivierung der p38-MAPK gezeigt werden, nicht aber der JNK oder ERK (Kabuyama et al. 2002).

1.2.2 p38-MAPK und COX-2

Die p38-MAPK hat verschiedene Substrate: Zum einen aktiviert sie die MAPK-aktivierten Proteinkinasen 2 und 3 (MAPKAP 2/3), zum anderen phosphoryliert und verstärkt sie – teils

auch über MAPKAP 2/3 oder andere Kinasen – die Aktivität von vielen Transkriptionsfaktoren wie

- ATF-1/2 (*activating transcription factor-1/2*),
- GADD153 (*growth arrest and DNA damage 153*),
- CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*),
- Ets-1 (*V-ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1*),
- Elk-1 (*Ets-like gene-1*),
- Max (*V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog-associated factor X*),
- MEF-2A (*myocyte enhancer factor 2A*),
- MEF-2C,
- NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*),
- HSF-1 (*heat shock transcription factor-1*) und
- SAP-1 („*Switch*“-*independent-1-associated protein*) (Obata et al. 2000).

Bindestellen für ATF-2, CREB, Ets-1 und NF- κ B finden sich unter anderem auch in der COX-2-Promotorregion (Appleby et al. 1994). Die p38-MAPK scheint also an der Regulation der Transkription des COX-2-Gens beteiligt zu sein (Dean et al. 1999). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zur COX-2-Induktion beiträgt, ist eine mRNA-Stabilisierung der COX-2 (vgl. Abschnitt 1.4; Ridley et al. 1998).

1.2.3 SB202190 – Hemmung der p38-MAPK

Pyridinyl-Imidazol-Verbindungen sind spezifische Hemmstoffe der p38-MAPK α und β (Jiang et al. 1996; Lee et al. 1994), jedoch nicht der γ und δ -Isoformen (Goedert et al. 1997; Wang et al. 1997); sie konkurrieren mit ATP um die Nukleotidbindestelle der p38-MAPK – jedoch nicht der anderen MAP-Kinasen (Wilson et al. 1997; Young et al. 1997): Im Falle eines der ersten käuflich erwerbbareren Inhibitoren, SB203580, sowie des in dieser Arbeit verwendeten SB202190 (Abb. 1.3) wird beispielsweise ein para-Fluorophenylring über Van-der-Waals-Kräfte in dieser Bindestelle gehalten. Diese spezifischen Hemmstoffe sind weit verbreitet in der Erforschung der Funktion der p38-MAPK.

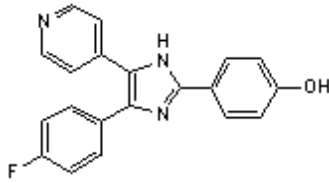


Abb. 1.3 – Chemische Struktur von SB202190

1.3 Cyclooxygenasen

Im Jahre 1982 erhielt Sir John Vane den Nobelpreis für Medizin. Er hatte den Wirkmechanismus von Acetylsalicylsäure aufgedeckt: Die Hemmung der Prostaglandin-Synthese (Vane 1971).

Die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure wird von Cyclooxygenasen katalysiert; die Cyclooxygenasen sind Glykoproteine, die luminal am glatten endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und der Zellkernmembran lokalisiert sind. Zwei enzymatische Funktionen sind ihnen zueigen: Die eine ist eine Cyclooxygenaseaktivität, die Arachidonsäure in Prostaglandin (PG) G_2 konvertiert, die andere ist eine Peroxidaseaktivität, die PGG_2 zu PGH_2 reduziert (Rouzer und Marnett 2003; van der Donk et al. 2002). PGH_2 wird durch gewebsspezifische Isomerasen in die biologisch aktiven Prostaglandine umgewandelt: PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 , Prostazyklin (PGI_2) und Thromboxan A_2 (TXA_2). Prostaglandine sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt.

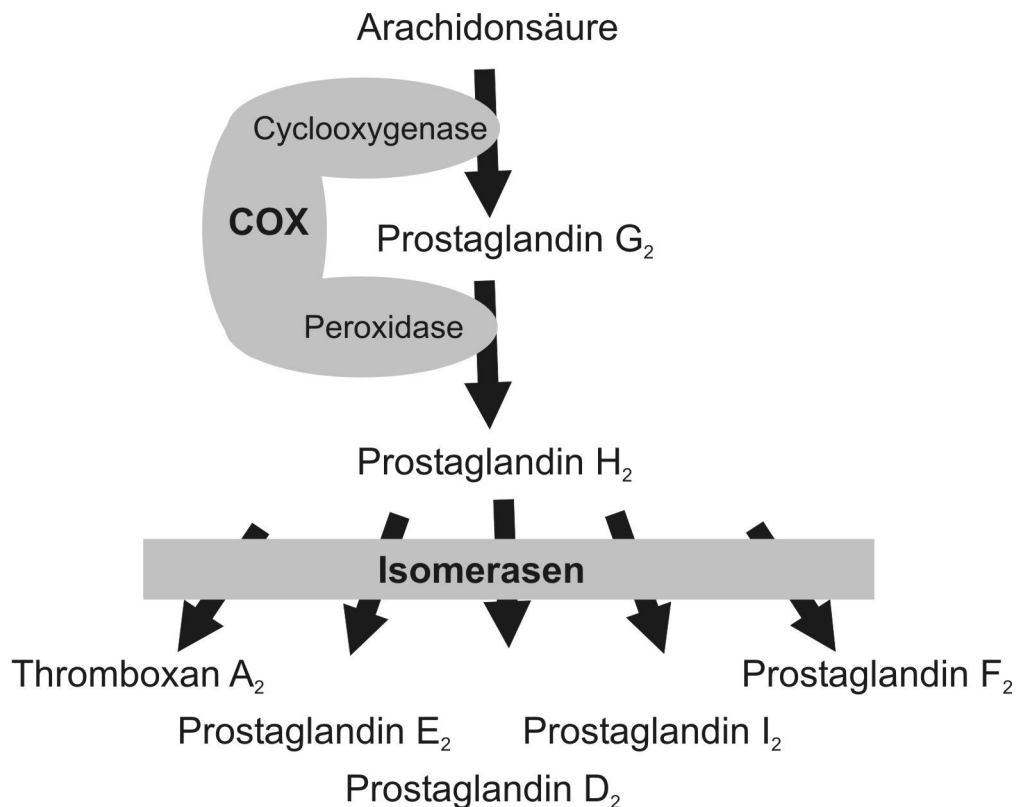


Abb. 1.4 Katalyse der Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure durch Cyclooxygenasen.

1.3.1 Die COX-Isoformen: Vorkommen und Funktionen

Cyclooxygenase aus Rind wurde zum ersten Mal im Jahre 1976 aufgereinigt (Miyamoto et al. 1976); dreizehn Jahre später wurde die humane Form (Yokoyama und Tanabe 1989) und im Jahre 1991 von verschiedenen Laboratorien eine weitere Isoform der COX kloniert (Hla und Neilson 1992; O'Banion et al. 1992). Es gibt also zwei verschiedene Gene, die für COX-Isoformen kodieren:

Eines der beiden für Cyclooxygenasen kodierenden Gene ist 22 kb lang; es beinhaltet elf Exons und zehn Introns: Es kodiert die COX-1 und die Varianten COX-1_a und COX-1_b; letztere ist auch bekannt als COX-3 (Chandrasekharan et al. 2002). Die Varianten werden durch eine Form von alternativem Spleißen gebildet, nämlich der mehr oder weniger vollständigen Retention von Intron-1; die Funktion der COX-3 wird noch kontrovers diskutiert (Davies et al. 2004; Kis et al. 2005; Snipes et al. 2005).

Im Allgemeinen wird COX-1 als konstitutiv bezeichnet, weil sie in fast allen Geweben gefunden werden kann (Crofford 1997); sie gilt also als Produkt eines *house-keeping*-Gens. Indes ist mittlerweile bekannt, dass sich COX-1-Spiegel während der Entwicklung ändern (Brannon et al. 1994), dass COX-1 in Endothelzellen durch HBGF-1 (*Heparin-binding (Acidic Fibroblast) Growth Factor*) (Hla und Maciag 1991) und in fetalem Pulmonalarterienendothel durch Dexamethason herunterreguliert werden kann (Jun et al. 1999). Eine Steigerung der Bildung von COX-1 erfolgt in Mastzellen durch eine Kombination von Dexamethason und SCF (*Stem Cell Factor*) (Samet et al. 1995) und in Endothelzellen durch Östrogen (Gibson et al. 2005).

Ein zweites COX-Gen kodiert die COX-2: Es ist mit einer Länge von nur 8 kb kompakter als das COX-1-Gen und umfasst zehn Exons und neun Introns: Das Intron-1, das für die unterschiedlich gespleisssten Formen der COX-1 verantwortlich ist, fehlt. Es handelt sich beim COX-2-Gen um ein sogenanntes *immediate-early* Gen, also eines, dessen Expression innerhalb kürzester Zeit nach Stimulation der Zelle gesteigert werden kann. Dementsprechend hat das COX-2-Gen – im Gegensatz zum COX-1-Gen – eine TATA-Box und verfügt über einige Verstärkersequenzen für Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-2 (*activator protein-2*), SP1, Ets-1 oder CRE (*cyclic AMP response element*) (Appleby et al. 1994). Dies erklärt teilweise die rasche Induzierbarkeit der COX-2.

Neben dieser Regulation auf Transkriptionsebene gibt es eine posttranskriptionelle Regulation, die für die COX-2-Expression von entscheidender Bedeutung ist: Die Stabilisierung der COX-2-mRNA (Ristimäki et al. 1994; Ristimäki et al. 1996) wird in Abschnitt 1.4 näher erläutert.

Neben Hormonen und Wachstumsfaktoren wird die Expression von COX-2 von einem breiten Spektrum von Entzündungsmediatoren reguliert: Lipopolysaccharide, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β (Interleukin-1 β), TNF- α und Wachstumsfaktoren induzieren COX-2, wohingegen IL-4, IL-13 und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 die Expression des Enzyms hemmen (Colville-Nash und Gilroy 2001; Onoe et al. 1996).

Entgegen der Annahme, COX-2 sei nur nach Induktion nachweisbar, wird sie in mehreren Geweben auch konstitutiv exprimiert, und zwar unter anderem in Hirn, Trachealepithel, den Zellen der Macula densa der Niere und den β -Zellen des Pankreas (Harris et al. 1994; Luo et al. 2002; Walenga et al. 1996; Yamagata et al. 1993).

Die Cyclooxygenasen regulieren eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, über die in Abb. 1.5 eine Übersicht gegeben werden soll (Harris und Breyer 2006; Hawkey 2002; Park und Christman 2006; Simmons et al. 2004).

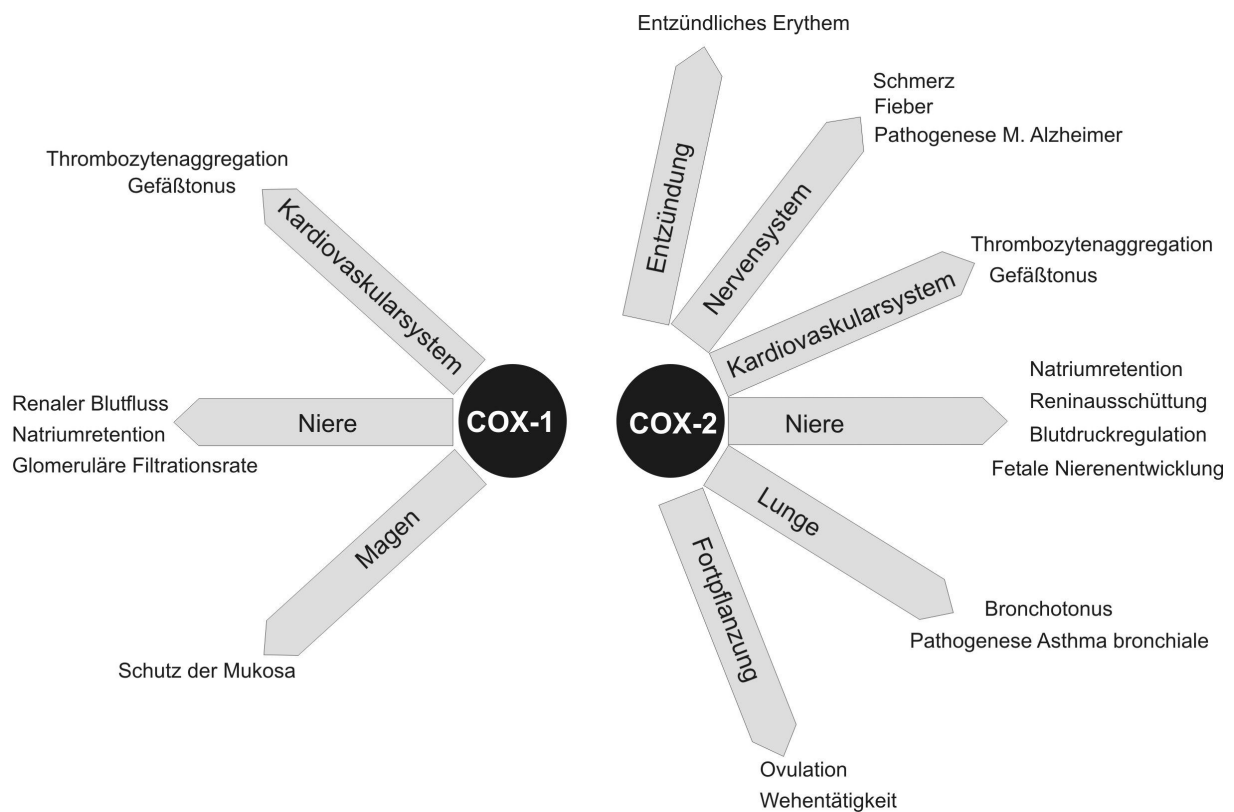


Abb. 1.5 Cyclooxygenase-Funktionen im menschlichen Körper

Die Abbildung gibt einen Überblick über die durch COX-1 und COX-2 regulierten physiologischen Prozesse.

1.3.2 Karzinogenese und Tumorpromotion durch COX-2

Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass in einigen Tumoren die COX-Aktivität höher ist als in vergleichbarem Normalgewebe (Levine 1981). Später konnte gezeigt werden, dass dem meist eine COX-2-Überexpression zugrunde liegt, nämlich für über 80 % der kolorektalen Karzinome (Kargman et al. 1995; Sano et al. 1995) und auch diverse andere Tumoren (Thun et al. 2002) wie beispielsweise dem Plattenepithel- (spinozellulären) Karzinom (SCC) der Haut (Buckman et al. 1998; Müller-Decker et al. 1995; Thun et al. 2002). Dixon *et al.* (2001) konnten für Kolonkarzinome zeigen, dass eine Überexpression des mRNA-bindenden Proteins HuR über eine mRNA-Stabilisierung zu COX-2-Überexpression führt; dies wiederum war mit einem höheren Tumorstadium assoziiert (Denkert et al. 2006). Auch in Ovarial- und Mammakarzinomen wurde eine Assoziation zwischen HuR- und COX-2-Spiegeln beobachtet, wobei hohe Spiegel mit schlechterer Prognose einhergingen (Denkert et al. 2003; Denkert et al. 2004b; Denkert et al. 2004a).

Der Verdacht, Cyclooxygenasen seien an der Tumorentstehung beteiligt, wurde zunächst durch Tierversuche untermauert, bei denen nicht-selektive COX-Hemmung die Entstehung von Kolontumoren deutlich verminderte (Narisawa et al. 1981; Reddy et al. 1987). Schließlich ergab sich in epidemiologischen Studien an Menschen, die regelmäßig Aspirin oder andere unselektive COX-Hemmer einnahmen, eine um vierzig bis fünfzig Prozent reduzierte Inzidenz verschiedener Karzinome – unter anderem des Kolons, des Magens, der Brust und der Harnblase (Thun et al. 2002). Auch für selektive COX-2-Hemmer konnte zunächst tierexperimentell eine Reduktion der Tumorneubildung infolge einer Belastung mit Karzinogenen gezeigt werden (Harris et al. 2000; Kawamori et al. 1998). Bei haarlosen Mäusen senkten sowohl selektive COX-2-Hemmung durch Celecoxib, als auch unselektive COX-Hemmung durch Indomethacin die Rate an UV-Licht-induzierten Hauttumoren (Fischer et al. 1999; Pentland et al. 1999) – einen ähnlichen Effekt hat später die Deletion der COX-Gene gezeigt (Fischer et al. 2007; Tiano et al. 2002).

Andere Studien hingegen lassen Zweifel an der Bedeutung der COX-Aktivität für die Karzinogenese aufkommen: So hemmten auch nicht-steroidale Antiphlogistika wie Sulindac-Sulfon die Tumorneubildung, obwohl durch sie die COX-Aktivität nicht beeinträchtigt wurde (Piazza et al. 1997; Thompson et al. 1995). Zudem wurde in verschiedenen Zellmodellen der Transformation gezeigt, dass weder COX-1 noch COX-2 als klassische Onkogene fungieren –

vielmehr führte Überexpression der COX-Isoformen zum Wachstumsstillstand (Narko et al. 1997; Trifan et al. 1999).

Ein entscheidender Beleg für die Rolle von COX-2 in der Karzinogenese wurde von Oshima *et al.* (1996) erbracht, und zwar am Maus-Modell mit einer Mutation im Adenomatöse-Polyposis-Coli-Gen ($APC^{\Delta 716}$), die zur Entwicklung hunderter intestinaler Polypen führt. Hier reduzierte eine Deletion des COX-2-Gens die Darmpolypenbildung dosisabhängig; auch eine selektive COX-2-Hemmung verminderte die Polypenbildung. Ähnliche Ergebnisse wurden später für COX-1 vorgelegt (Chulada et al. 2000; Langenbach et al. 1999).

Verschiedene Mechanismen, die via COX zur Karzinogenese und zur Tumorpromotion beitragen können, wurden bereits aufgezeigt; so haben Cyclooxygenasen Einfluss auf das Zellwachstum: In Kolonkarzinom-Zellen führte eine Überexpression von COX-1 und COX-2 zu erhöhten Wachstumsraten und zur Induktion des *Epidermal Growth Factor*-Rezeptors (EGFR) (Kinoshita et al. 1999). PGE_2 stimuliert die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen (Trifan und Hla 2003) – unter anderem von menschlichen Keratinozyten (Pentland und Needleman 1986).

Zusätzlich scheint eine COX-2-Überexpression erhöhte Apoptose-Resistenz zu verleihen (DuBois et al. 1996b; Sun et al. 2002; Tsujii und DuBois 1995). Speziell an der Haut konnte gezeigt werden, dass COX-2 via PGE_2 die durch UVB-Bestrahlung induzierte Apoptoserate senkt (Chun et al. 2007).

Immunmodulatorische Effekte der Prostaglandine könnten ebenfalls eine Tumorentstehung fördern: So hemmt PGE_2 die Blastogenese von T-Zellen und die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killer-Zellen (Marnett 1992).

Es gibt einen weiteren wichtigen Mechanismus, über den Cyclooxygenasen tumorpromovierend wirken könnten: Sie haben Einfluss auf die Angiogenese (Tsujii et al. 1998) und können so zum Wachstum eines Tumors beitragen (Williams et al. 2000).

1.4 mRNA-Stabilisierung

Zelluläre mRNA-Spiegel werden sowohl über mRNA-Bildung im Zuge der Transkription, als auch posttranskriptionell über Regulation der Stabilität und des Abbaus der mRNA kontrolliert (Day und Tuite 1998). Die Stabilität einer RNA wird durch mehrere Strukturen beeinflusst, darunter die sogenannte 5'-Kappe, die 5'-untranslatierte Region (UTR), die 3'-UTR sowie der 3'-Poly-Adenosin (A)-Schwanz. Der Poly-(A)-Schwanz der eukaryotischen mRNA wird durch das Poly-(A)-bindende Protein (PABP) gebunden, das wiederum vor Deadenylasen und 3'-5'-Exonukleasen schützt (Bernstein und Ross 1989; Sachs 1990) und so die Stabilität der mRNA erhöht. Der Abbau der mRNA kann durch eine Verkürzung des Poly-(A)-Schwanzes durch mindestens eine Poly-(A)-Ribonuklease (Körner und Wahle 1997) initiiert werden, die mit der 5'-Kappe interagiert (Dehlin et al. 2000; Gao et al. 2000). Durch die folgende Deadenylierung wird die PABP-Bindestelle abgebaut und so die weitere Degradation erleichtert.

Der Poly-(A)-Schwanz-Verkürzung folgt ein Abbau der 5'-Kappe (Beelman und Parker 1995; Couttet et al. 1997; Gao et al. 2001). Für die weitere Degradation der RNA ist ein Komplex aus zahlreichen 3'-5'-Exonukleasen und mRNA bindenden Proteinen zuständig, der als Exosom bezeichnet wird (Mitchell et al. 1997; van Hoof und Parker 1999).

Die individuelle biologische Halbwertszeit (HWZ) einer mRNA wird von internen Sequenzelementen bestimmt. Beispiele für stabilitätsbestimmende cis-Elemente sind die *iron-response elements* in der 3'UTR der mRNA des Transferrinrezeptors (Casey et al. 1989) und die Adenosin-/Uridin-reichen Elemente (ARE), Sequenzen wie zum Beispiel AUUUA oder UUAUUUAUU. Am besten erforscht sind die ARE, die sich gelegentlich in der protein-kodierenden Region, meistens jedoch in der 3'-UTR finden lassen (Chen und Shyu 1995). Sie begünstigen nicht nur eine schnelle Deadenylierung und einen 5'-Kappenabbau, sondern scheinen auch in die Rekrutierung der Exosomen involviert zu sein (Gao et al. 2001; Mukherjee et al. 2002; Xu et al. 1997). Eben hierbei spielen trans-regulierende Proteine eine Rolle: ARE-bindende Proteine (AUBP) können die Erkennung der ARE durch das Exosom vermitteln. Beispiele hierfür sind Tristetraprolin (TTP) und KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*), die im zellfreien System den Abbau von ARE-beinhaltender mRNA beschleunigen, so dass für sie eine Rolle als „Adapter-Proteine“ zwischen ARE und Exosom

vorgeschlagen wurde (Chen et al. 2001a). So konnte gezeigt werden, dass TTP die mRNA von TNF- α durch direkte ARE-Bindung destabilisiert (Carballo et al. 1998; Lai et al. 1999); die gleichen Effekte konnten an der mRNA von Il-3 und anderen Zytokinen gezeigt werden (Stoecklin et al. 2000).

Das AUBP AUF1 (*ARE/poly(U)-binding/degradation Factor 1*) hingegen scheint sowohl stabilisierend als auch destabilisierend wirken zu können: AUF1 beschleunigt den Abbau von c-myc-mRNA in vitro und destabilisiert ARE-haltige mRNA in vivo (Brewer 1991; Loflin et al. 1999). Andererseits konnten Chen *et al.* (2001) zeigen, dass Exosomen, die durch AUF1 rekrutiert worden waren, nicht in der Lage waren, ARE-beinhaltenende RNA abzubauen. Auch Laroia *et al.* (1999) haben eine Beteiligung von AUF1 bei der Stabilisierung ARE-haltiger mRNA gefunden – in diesem Falle induziert durch Hitzeschock.

Seit 1996 ist ein weiteres AUBP bekannt, das den mRNA-Abbau beeinflusst, HuR (*Hu Antigen R*), ein Homolog der ELAV (*Embryonic lethal abnormal vision*)-Proteine aus *Drosophila melanogaster*, von denen schon länger bekannt war, dass sie mRNA stabilisieren (Ma et al. 1996). So konnte auch in Säugerzellen eine Stabilisierung verschiedener mRNAs durch HuR gezeigt werden, und zwar unter anderem für die mRNAs von c-fos (*V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), p21 und COX-2 (Dixon et al. 2001; Figueroa et al. 2003; Levy et al. 1998; Peng et al. 1998; Sengupta et al. 2003; Wang et al. 2000). Im Falle der zuletzt genannten COX-2 wird eine Stabilisierung durch HuR noch diskutiert, denn Sully *et al.* (2004) konnten an der CR-1 (*conserved region 1*), einer regulatorischen ARE der COX-2-mRNA, keinen Einfluss von HuR auf die mRNA-Stabilität feststellen.

TNF- α und auch COX-2 (Brook et al. 2000; Ming et al. 2001; Miyazawa et al. 1998; Ridley et al. 1998; Winzen et al. 1999).

UV-Licht kann eine mRNA-Stabilisierung induzieren, beispielsweise von p21, c-fos und anderen mRNAs mit kurzer HWZ (Blattner et al. 2000; Gorospe et al. 1998). In HaCat-Zellen wurde für UVA-Licht auch eine Stabilisierung der COX-2-mRNA gezeigt (Bachelor et al. 2002) und zwar via p38-MAPK. An einem Epidermis-Modell haben Mahns *et al.* (2004) eine COX-2-Induktion nach UVA-Bestrahlung sowohl mit JNK, als auch p38-MAPK in Verbindung gebracht. Bollig *et al.* (2002) haben in Hela-Zellen eine p38-MAPK-unabhängige mRNA-Stabilisierung nachweisen können; allerdings wurde eine p38-MAPK-vermittelte mRNA-Stabilisierung von ARE-haltiger mRNA gezeigt.

1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte an einer menschlichen Keratinozyten-Zell-Linie, HaCat-Zellen, die COX-2-Expression infolge von UVA- oder UVB-Bestrahlung untersucht werden. Folgende Fragestellungen sollten hierdurch geklärt werden (siehe auch Abb. 1.6):

- (i) Gibt es Unterschiede im Einfluß von UVA- oder UVB-Bestrahlung auf die COX-2-Expression auf RNA- oder Proteinebene?
- (ii) Welche Rolle spielt die p38-MAPK in einer Modulation der COX-2-Expression durch UV-Strahlung ?
- (iii) Kommt es durch UVA- oder UVB-Bestrahlung zu einer Stabilisierung der COX-2-mRNA, und welchen Anteil hat hierbei der p38-MAPK-Signalweg?

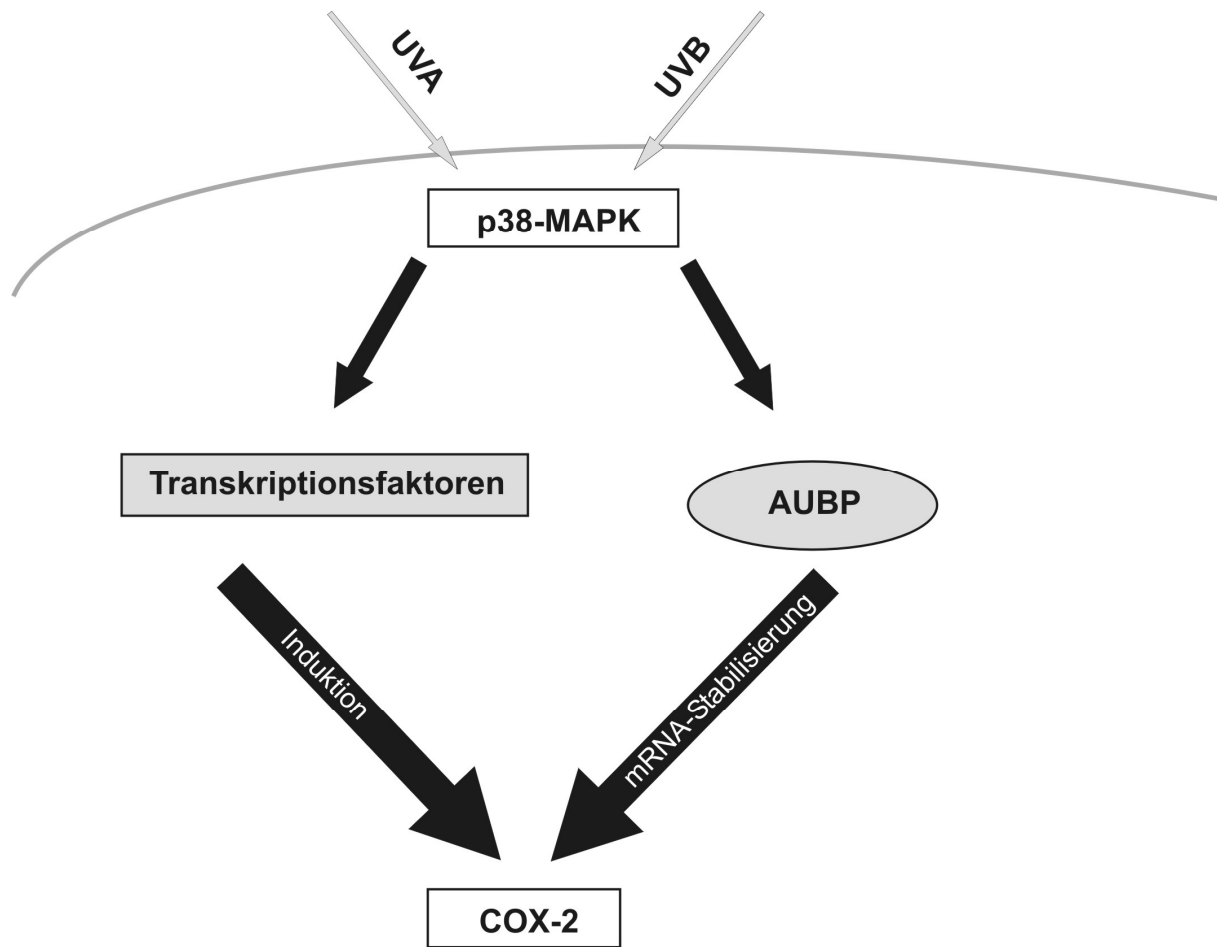


Abb. 1.6 Hypothese: COX-2-Induktion durch UVA- und UVB-Strahlung erfolgt über Modulation der Transkription und mRNA-Stabilisierung.

UV-Strahlung führt zur p38-MAPK-Aktivierung; diese wiederum aktiviert zum einen verschiedene Transkriptionsfaktoren, die zur vermehrten COX-2-Transkription und so zur Induktion führen könnten, zum anderen aktiviert die p38-MAPK verschiedene mRNA-bindende Proteine (AU-reiche Elemente bindende Proteine, AUBP), die den Abbau der COX-2-mRNA und die Stabilität der COX-2-mRNA regulieren.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Reagenzien (siehe Tab. 2.1) von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma (München). Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, welches aus einer Milli-Q-Anlage (Fa Millipore, Eschborn) aufbereitet wurde.

Tabelle 2.1 Verwendete Reagenzien

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
PBS	2,6 mM KCl 1,4 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,2-7,4
SDS-Lysepuffer, 2x konzentriert	125 mM Tris (ICN Biomedicals; Aurora, Ohio, USA) 10 % (v/v) Glycerin 2,5 % (w/v) SDS 50 µg/ml Bromphenolblau pH 8,0 mit HCl einstellen direkt vor Gebrauch Zugabe von 100 mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe)
2,5 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris (8 mM EDTA); pH 8,9 0,4 % (w/v) SDS
5 x Sammelgelpuffer	0,3 M Tris 0,5 % SDS pH 6,7 mit HCl einstellen
5 x Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 0,5 % SDS pH 8,3
10 x Transfer-Puffer	250 mM Tris (ICN) 2 M Glycin Mit HCl auf pH 8,5 einstellen
10 x TBS	20 mM Tris 137 mM NaCl pH 7,4 mit NaOH einstellen
10 x TBST	990 ml 10 x TBS (siehe oben) 10 ml Tween-20 (Roth)

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Tris-Acetate-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH-Wert von 8,3 mit Eisessig einstellen
DNA-Blaumarker, 5 x konzentriert	30 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.2 Zellkultur

HaCat-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Peter Brenneisen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. HaCat-Zellen sind Keratinozyten, die aus spontan transformierten Keratinozyten hervorgegangen sind: Sie sind immortal, aber nicht tumorigen (Boukamp et al. 1997; Fusenig und Boukamp 1998).

Sie wurden in RPMI-1640 Medium (Sigma), das mit 10 % (v/v) FBS (Greiner, Frickenhausen), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und Penicillin/Streptomycin (100 mg/ml und 10 U/l, PAA, Cölbe) supplementiert war, bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid kultiviert. Zu 80 bis 100 % konfluente Zellen wurden passagiert und auf neue Kulturflaschen (Cellstar, Greiner) verteilt.

2.3 Behandlung der Zellen

2.3.1 UV-Bestrahlung

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-100 % herangezogen, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 24 Stunden in FCS-freiem RPMI-Medium kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Für die folgende Bestrahlung wurde jede Schale mit 2,5 ml PBS versehen; der Deckel der Zellschale wurde während der Bestrahlung abgenommen. Zellschalen, die als Kontrolle dienten und nicht bestrahlt wurden, wurden während der Bestrahlung mit geöffneten Deckeln in einem dunklen Raum belassen. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in FCS-freiem RPMI-Medium inkubiert.

Für die UVA-Bestrahlung wurde eine „UVA-700“-Lampe (Waldmann) verwendet. Die Bestrahlungsdosis betrug 300 kJ/m^2 bei einer Intensität von 49 mW/cm^2 . Um eine möglichst homogene Verteilung der Dosis zu erreichen, wurden die Zellschalen auf einem Drehteller platziert.

Die UVB-Bestrahlung wurde mit vier „ULTRAVIOLET-B TL 20W/12 RS“-Röhren (Philips) mit einer Dosis von 100 J/m^2 durchgeführt; das Wellenlängenspektrum lag bei 290 – 340 nm bei einem Emissionsmaximum von 313 nm.

2.3.2 Hemmung der p38-MAPK mit SB202190

In einigen Versuchen wurde die p38-MAPK mittels in DMSO gelöstem SB202190 gehemmt: Hierzu wurden die HaCat-Zellen eine Stunde vor und nach der Bestrahlung bis zur Ernte in FCS-freiem RPMI-Medium mit $2 \text{ } \mu\text{M}$ SB202190 inkubiert; Zellproben, die als Kontrolle dienten, wurden in FCS-freiem RPMI-Medium mit demselben Volumen an DMSO inkubiert.

2.4 Probenanalyse

2.4.1 Isolierung von RNA

Zum Aufreinigen von RNA aus kultivierten Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und alle Flüssigkeit auf Filterpapier ausgeklopft. In Schalen mit 6 cm Durchmesser zur Konfluenz gewachsenen Zellen wurden mit $400 \text{ } \mu\text{l}$ Trizol (Invitrogen) lysiert, gründlich mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die entstandenen Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurden $120 \text{ } \mu\text{l}$ Chloroform (Roth) hinzugegeben, 15 sec stark geschüttelt und mit $20800 \times g$ bei 4°C für 40 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in mit $280 \text{ } \mu\text{l}$ Isopropanol gefüllte Eppendorf-Gefäße überführt. Der Ansatz wurde intensiv gemischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert.

Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und $20800 \times g$ wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das entstandene RNA-Präzipitat mit 1 ml eiskaltem 75%-igem Ethanol gewaschen, für 10 min bei 4°C mit $20800 \times g$ zentrifugiert und der Überstand

anschließend verworfen. Die RNA wurde für etwa 5-15 min im Abzug luftgetrocknet. Es wurden 20 µl ddH₂O hinzupipettiert und zum Lösen für ca. 15 min unter Schütteln bei 65°C inkubiert und resuspendiert. Die RNA-Lösung wurde im Anschluss zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -80°C eingefroren. Eine Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

2.4.2 RT-PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Zum Nachweis und zur halbquantitativen Bestimmung spezifischer mRNA wurde zelluläre RNA revers transkribiert. Mit der dadurch entstandenen cDNA wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, wobei ein durch Primer bestimmter Abschnitt der cDNA vervielfältigt wurde. Nach anschließender Agarosegelelektrophorese wurden einzelne DNA-Banden mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht und in ihrer Intensität (AIDA, Raytest Isotopen Messgeräte) vermessen.

2.4.2.1 Reverse Transkription (RT) und PCR

Zelluläre mRNA wurde mit Hilfe des „Omniskript“-Kits von Qiagen (Hilden) in cDNA umgeschrieben. Den Ansätzen zur reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA (vgl. Abschnitt 2.4) wurden neben reverser Transkriptase (1U), dNTPs (500 µM Endkonzentration) und entsprechendem RT-Puffer aus dem Kit auch 10 U RNase-Inhibitor („RNaseOUT“, Invitrogen) sowie Oligodesoxythymidin (dT₁₅, Invitrogen; 10 µM Endkonzentration) zugegeben (Gesamtvolumen des Ansatzes: 20 µl). Das Reaktionsgemisch wurde sodann für 60 min bei 37°C inkubiert. Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Amplifikation von Zielsequenzen aus der entstandenen cDNA über PCR erfolgte in einem „T-Personal“- oder „T-Gradient“-Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen). Dazu wurden in 20 µl Gesamtvolumen 2 µl des Produkts aus oben genannten RT-Ansätzen mit 2 µl 10 x PCR Puffer (Qiagen), 1-2 U Taq-Polymerase (Qiagen), jeweils 200-500 µM (Endkonzentration) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTP-Mix, Sigma, Deisenhofen) sowie je 0,5 (Primerpaar 3), 0,65 (Primerpaar 1) oder 1,5 (Primerpaar 2) µM (Endkonzentration) der beiden Primer versetzt. Eine Liste der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer findet sich in Tabelle 2.2. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 2 min ein Zyklus aus Temperaturen für Denaturierung (95°C, 30

2. Material und Methoden

s), Primeranlagerung (55-60°C, 30 s) und Elongation [72°C, 45 s (Primerpaar 3)-1 min (Primerpaare 1 und 2)] mehrfach wiederholt. Anlagerungstemperatur und Zyklenzahl variierten dabei mit den eingesetzten Primerpaaren (vgl. Tab. 2.2). Die PCR wurde mit einer Inkubation bei 72°C für 10 min zur Verlängerung noch unvollständiger PCR-Produkte abgeschlossen.

Tabelle 2.2 Sequenzen in dieser Arbeit eingesetzter Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Größe (bp)	Zykluszahl	Anlagerungstemperatur
1a	5' COX-2 Nr.1	GCAGTTGTTCCAGACAAGCA	539	34	55°C
1b	3' COX-2 Nr.1	CAGGATACAGCTCCACAGCA			
2a	5' COX-2 Nr.2	CGAGGTGTATGTATGAGTGTG	594	28	60°C
2b	3' COX-2 Nr.2	TCTAGCCAGAGTTTCACCGTA			
3a	5' GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	524	22	60°C
3b	3' GAPDH	AGGGGTCTACATGGCAACTG			

2.4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung und Aufreinigung amplifizierter DNA erfolgte über Elektrophorese im Agarosegel. Hierzu wurde geeignete Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht und abgekühlt. Vor dem Gießen der noch heißen Agaroselösung in eine Gelkammerform wurde der Lösung 5 µg/ml (Endkonzentration) Ethidiumbromid zugesetzt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Blaumarker versetzt und über Elektrophorese im ausgehärteten Agarosegel mit TAE als Laufpuffer analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8 %-ige (w/v) Agarosegele eingesetzt.

Die so aufgetrennten DNA-Banden wurden mit einem UV-Illuminator dargestellt und ihre Intensität gemessen (AIDA, Raytest Isotopen Messgeräte).

2.4.3 Bestimmung der Stabilität von RNA

Zur Untersuchung der Stabilität einer spezifischen mRNA wurden Zellen mit Actinomycin D behandelt, das durch Einlagerung in die DNA dazu führt, dass die Transkription eingestellt

wird. Unter diesen Bedingungen wird die jeweils messbare zelluläre RNA-Menge nur noch durch ihren Abbau beeinflusst.

Für die Behandlung mit Actinomycin D (Sigma; Stammlösung: 2 mg/ml) wurden die Zellen nach der Bestrahlung für 2 Stunden im Inkubator belassen. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in FCS-freiem RPMI-Medium mit Actinomycin D (1 µg/ml) inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen in Trizol-Reagenz (Invitrogen) lysiert. Nach Aufreinigung der RNA (siehe 2.4) wurde die Menge an COX-2-mRNA durch RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (siehe 2.4.1 und 2.4.2). Als Primer für die Amplifikation der COX-2-cDNA wurden Primer Nr. 1a und 1b oder Nr. 2a und 2b eingesetzt (siehe Tab. 2.2).

Als unter den beschriebenen Bedingungen stabile mRNA stellte sich diejenige der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) heraus, weswegen ihre Amplifikation per RT-PCR als Kontrolle diente (siehe Tab. 2.2)

2.4.4 Herstellung von Proteinlysaten

In Schalen mit 3 cm Durchmesser zur Konfluenz gewachsene Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und gründlich ausgeklopft. Es wurden 300 µl zweifach konzentrierter SDS-Lysepuffer auf die Zellen gegeben und die Schalen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sorgfältig mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde bei -20°C gelagert.

2.4.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) und „Western-Blot“

Die gewonnenen Proteinlysate wurden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels „Western-Blot“ auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran übertragen. Die jeweils untersuchte Proteinbande wurde durch eine Immunanfärbung sichtbar gemacht und durch Chemilumineszenz auf einen Film übertragen.

2.4.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen bei maximal 40 mA pro Minigel (Towbin et al. 1979) – für die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele vgl. Tab. 2.3.

Tabelle 2.3 Verwendete Gele und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Trenngel (12 % Acrylamid)	40 % (v/v) Lösung 1*; 25 % (v/v) Lösung 2*; 35 % (v/v) H ₂ O. Zur Polymerisation Zugabe von 0,07 % (v/v) APS und 0,007 % (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED).
Sammelgel (4 % Acrylamid)	13,4 % (v/v) Lösung 1*; 30 % (v/v) Lösung 3*; 56,6 % (v/v) H ₂ O. Zur Polymerisation Zugabe von 0,075 % (v/v) APS; 0,007 % (v/v) TEMED.
Elektrodenpuffer	0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8; APS: 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
* <u>Lösung 1</u> : 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; <u>Lösung 2</u> : 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8,8; <u>Lösung 3</u> : 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6,8;	

Der Transfer („Blotting“) der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham, Braunschweig) geschah über 90 min bei 100 mA pro Gel. Hierzu wurde nach der Elektrophorese das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer [25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,5] äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie mit in Methanol aktivierter und anschließend in Transferpuffer äquilibrierter PVDF-Membran (Amersham) zum Blottingaufbau zusammengestellt. Zwei in Transferpuffer gesättigte Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren, die in einer „Trans-Blot™ Semi-Dry Transfer Cell“-Apparatur von BioRad zum Elektrotransfer eingesetzt wurden.

2.4.5.2 Immunanfärbung nach Western-Blot

Der Nachweis einzelner Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Blockierpuffer, bestehend aus TBST [TBS (20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween20] und 5% (w/v) Magermilchpulver (BioRad) oder 5% (w/v) bovinem Serumalbumin (Roth), für 60 min. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tab. 2.4) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer halben Stunde Waschen mit TBST, wobei dieses dreimal gewechselt wurde, erfolgte dann die Inkubation mit an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem sekundärem Antikörper in jeweiliger Verdünnung (siehe Tab. 2.5) für 90 min bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift mit TBST von mindestens einer halben Stunde – auch hier wurde der Puffer dreimal ausgetauscht – erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper über Chemilumineszenz [„SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, USA)] durch Auflegen eines Filmes (Amersham, Freiburg).

Tabelle 2.4 Verwendete primäre Antikörper

Name	Firma und Katalognummer	Verdünnung
COX-2	Santa Cruz # Sc-1745	1:1000 in TBS
Phospho-p38-MAPK	Cell Signaling # 9211S	1:1000 in TBST mit 1% (w/v) BSA
p38-MAPK Total	NEB # 9212	1:1000 in TBST mit 5% (w/v) Milchpulver
β-Actin	Abcam # Ab6276	1:5000 in TBST mit 5% (w/v) Milchpulver

Tabelle 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper

Name	Firma	Verdünnung
Anti-Rabbit-HRP	Dianova # 111-034-144	1:3000 in TBST
Anti-Goat-HRP	Sigma # A-5420	1:2000 in TBST mit 5% (w/v) Milchpulver
Anti-Mouse-HRP	Amersham Biosciences # NA931	1:5000 in TBST mit 5% (w/v) Milchpulver

2.4.6 Entfernen von Antikörpern („Strippen“)

Sollten mehrere verschiedene Immunodetektionen nacheinander durchgeführt werden, so wurde die PVDF-Membran nach der Belichtung des Films kurz mit TBST gewaschen und dann für 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C in „Stripping“-Puffer [100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8] geschwenkt, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran zwei bis drei Mal in großen Volumina von TBST bei RT gewaschen. Für die neue Immunodetektion wurde nun wieder mit dem Blockierungsschritt, wie unter 2.4.5.2 beschrieben, begonnen.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion der COX-2 durch UV-Licht

HaCat-Zellen wurden mit UVA-Licht (300 kJ/m²) oder UVB-Licht (100 J/m²) bestrahlt und anschließend nach unterschiedlichen Zeitpunkten Lysate aus den Zellen erstellt.

Die Lysate wurden per RT-PCR auf die COX-2-mRNA-Spiegel und per Western-Blot auf die COX-2-Proteinmenge hin untersucht.

3.1.1 COX-2-Induktion auf RNA-Ebene

Nach der Bestrahlung wurden Zellen nach zwei, vier und sechs Stunden in Trizol-Reagenz lysiert, die RNA isoliert und quantifiziert. Daraufhin wurde eine RT-PCR für COX-2 durchgeführt und zur Sicherung, dass die RNA-Menge in allen Proben gleichmäßig verteilt war, zusätzlich eine RT-PCR für die mRNA der GAPDH durchgeführt, die nicht durch UV-Licht induziert wird.

Während die COX-2-mRNA-Spiegel bei den UVA-bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben unverändert blieben, nach UVB-Bestrahlung eine mit der Zeit zunehmende COX-2-mRNA-Menge zu erkennen (siehe Abb. 3.1).

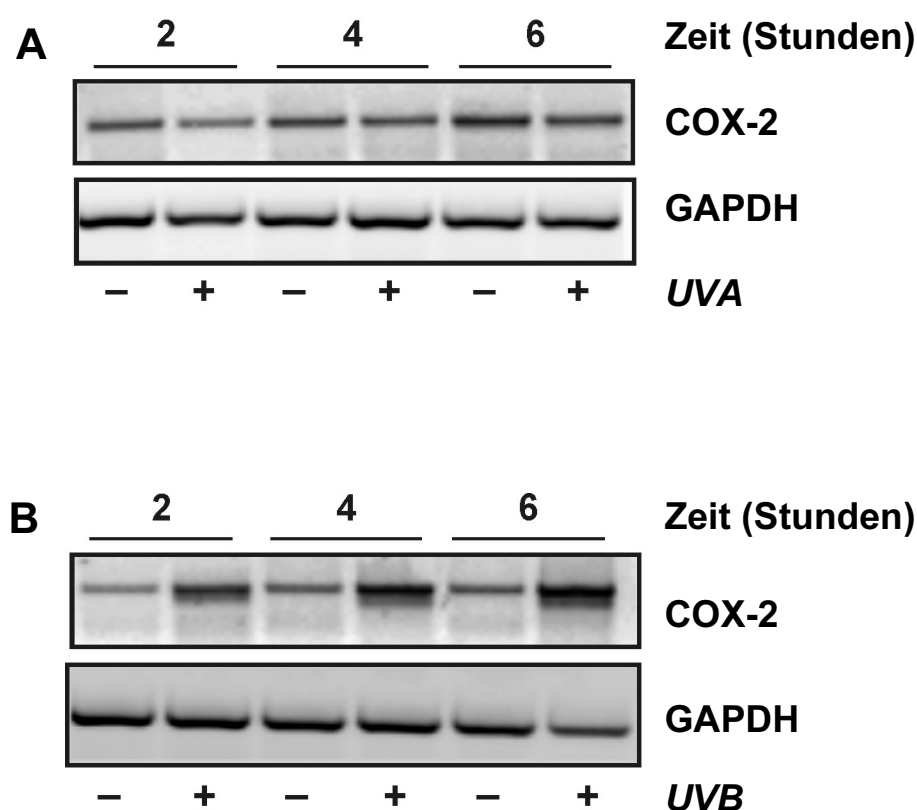


Abb. 3.1 Effekt von UV-Bestrahlung auf die COX-2 -Expression

(A) HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Es folgte eine UVA-Bestrahlung (300 kJ/m^2); nach 2, 4 und 6 Stunden wurden die Zellen in Trizol-Reagenz lysiert; die RNA wurde aufgereinigt und eine RT-PCR auf COX-2 und GAPDH durchgeführt. (B) COX-2-mRNA-Expression nach UVB-Bestrahlung (100 J/m^2) bei sonst gleichem Procedere wie in (A). Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.1.2 COX-2-Induktion auf Proteinebene

Die Zellen wurden vier, sechs und acht Stunden nach der UV-Bestrahlung in doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die COX-2-Proteinspiegel wurden über Western-Blot-Analyse und Immundetektion mit anti-COX-2-Antikörpern untersucht; als Positivkontrolle diente hierbei ein Lysat aus Lipopolysaccharid (LPS)-induzierten RAW-Zellen. LPS ist ein starker Induktor der COX-2

(Fu et al. 1990; Hempel et al. 1994; Lee et al. 1992). Um zu kontrollieren, ob der Proteingehalt der Proben gleichmäßig war, wurde an denselben Membranen eine weitere Immundetektion mit anti- β -Actin-Antikörpern durchgeführt.

Hierbei ergab sich in Analogie zu den Untersuchungen der mRNA-Spiegel bei den UVA-bestrahlten Zellen, dass zu keinem der untersuchten Zeitpunkte der COX-2-Proteinspiegel höher war als in den unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu war nach UVB-Bestrahlung zu allen Zeitpunkten eine deutliche Induktion der COX-2 auf Proteinebene sichtbar (siehe Abb. 3.2).

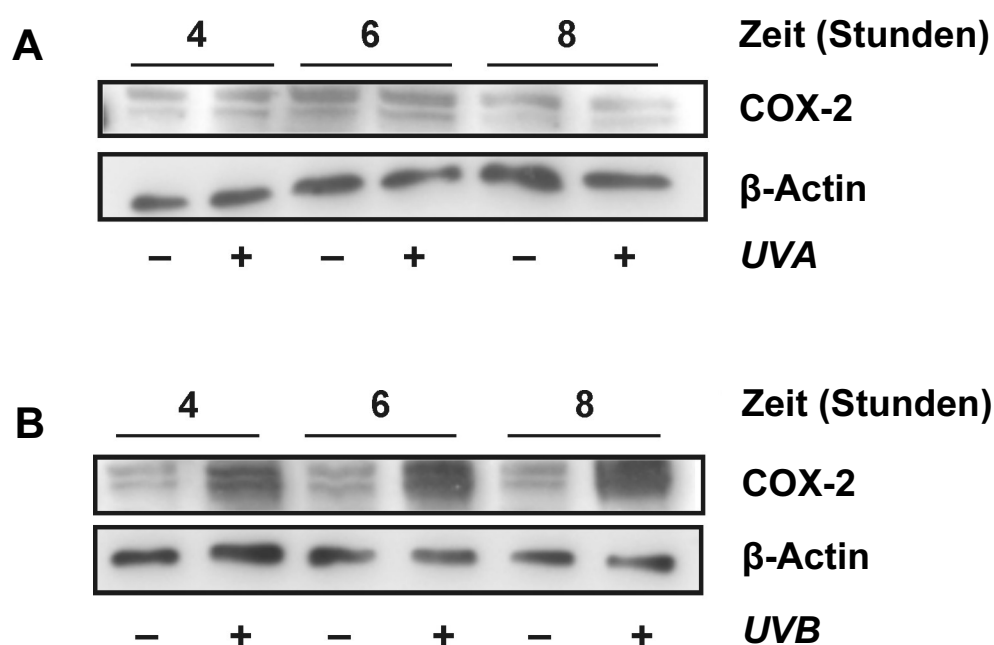


Abb. 3.2 Effekt von UV-Bestrahlung auf die COX-2-Proteinexpression

(A) HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Es folgte eine UVA-Bestrahlung (300 kJ/m^2); die Zellen wurden nach 4, 6 und 8 Stunden lysiert. In den Lysaten wurde die COX-2-Proteinexpression per Westernblot-Analyse und Immundetektion mit COX-2-spezifischen Antikörpern untersucht; als Kontrolle diente eine Immundetektion mit β -Actin-Antikörpern auf denselben Membranen. (B) Proteinexpression nach UVB-Bestrahlung (100 J/m^2) bei sonst gleichem Procedere wie in (A). Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.2 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch UV-Licht

Um zu untersuchen, ob UV-Bestrahlung wie in der Literatur beschrieben (vgl. Einleitung) eine Aktivierung von p38-MAPK induziert, wurden unter gleichen Bestrahlungsmodalitäten wie bei der COX-2-Induktions-Untersuchung (UVA 300 kJ/m²; UVB 100 J/m²) behandelte Zellen 15, 30, 60 und 120 Minuten nach UV-Bestrahlung in doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer lysiert; eine Analyse der Veränderung von Phosphorylierung und Aktivierung der p38-MAPK wurde mithilfe einer auf Westernblotting folgenden Immundetektion durch anti-phospho-p38-MAPK-Antikörper durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Proteinmenge in allen Proben etwa gleich groß war, wurden die anti-Phospho-p38-MAPK-Antikörper wie unter Abschnitt 2.4.6 beschrieben entfernt und eine weitere Immundetektion mit anti-p38-MAPK-Antikörpern durchgeführt, die p38 unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus erkennen.

Sowohl durch UVA als auch UVB konnte eine Phosphorylierung und Aktivierung von p38 induziert werden, was darauf hinweist, dass die jeweils eingesetzten Bestrahlungsdosen zur Induktion biologischer Effekte ausreichen, obgleich etwa im Falle der UVA-Bestrahlung keine COX-2-Induktion erkennbar war (s.o.). Auch hier ergaben sich allerdings Unterschiede zwischen UVA- und UVB-Bestrahlung: Nach UVA-Bestrahlung war nur eine vergleichsweise schwache Phosphorylierung der p38-MAPK zu erkennen, die auch nur für kurze Zeit nach Bestrahlung, 15 und 30 min, nachweisbar war; nach 60 und 120 Minuten war das Signal bereits unter der Nachweisgrenze.

Nach UVB-Bestrahlung ist dagegen eine deutlich stärkere Aktivierung der p38-MAPK zu erkennen; diese ist zu allen untersuchten Zeitpunkten nachweisbar.

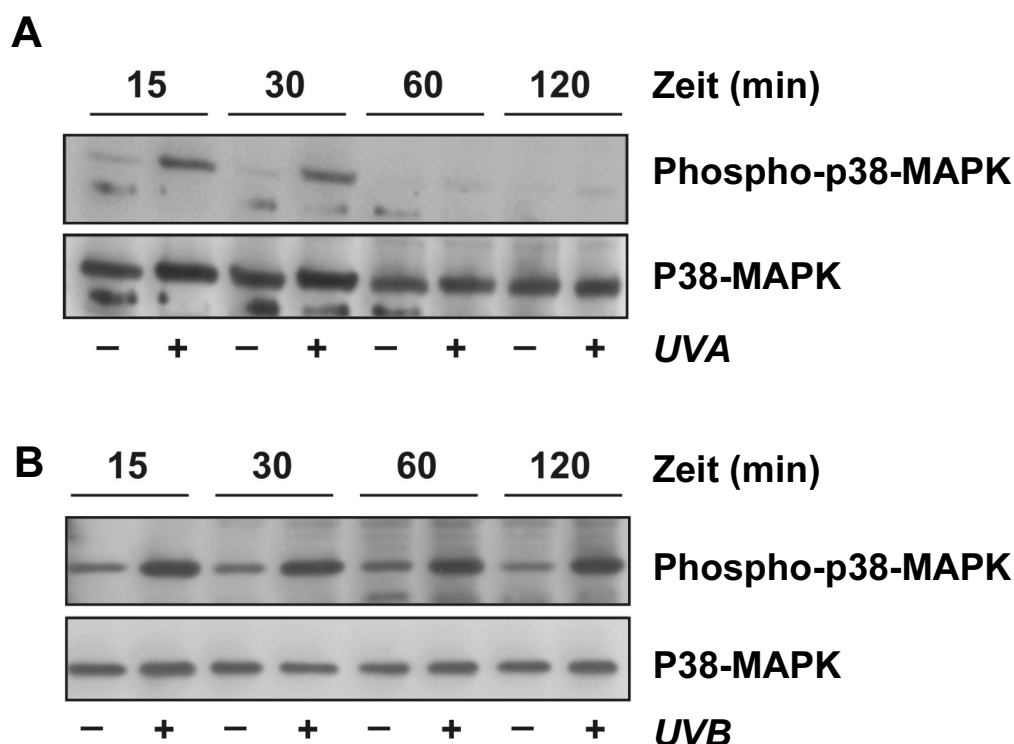


Abb. 3.3 Phosphorylierung der p38-MAPK durch UV-Bestrahlung

(A) HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Es wurde eine UVA-Bestrahlung (300 J/m^2) durchgeführt, und die Zellen wurden 15, 30, 60 und 120 min später geerntet. Mit den Lysaten wurde ein Westernblot und eine Immunodetektion mit anti-phospho-p38-MAPK-Antikörpern und – als Ladungskontrolle – p38-MAPK-Antikörpern durchgeführt. (B) Es wurde eine Bestrahlung mit UVB (100 J/m^2) bei sonst gleichem Procedere wie in (A) durchgeführt. Die Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Versuche.

3.3 Rolle der p38 MAPK in der Induktion der COX-2 durch UVB

Nachdem eine starke Aktivierung der p38-MAPK und eine Induktion der COX-2 durch UVB-Bestrahlung gezeigt werden konnte, sollte anschließend untersucht werden, inwiefern die Induktion der COX-2 durch die p38-MAPK vermittelt wird. Da UVA-Bestrahlung nicht zu COX-2-Induktion auf RNA- oder Proteinebene geführt hatte, wurde diese hier nicht weiter betrachtet.

Hierzu wurden Zellen mit 2 μ M SB202190, einem spezifischen Inhibitor der p38-MAPK behandelt und anschließend mit UVB (100 J/m²) bestrahlt. Als Kontrollbehandlung wurden Zellen mit dem gleichen Volumen Lösemittel (DMSO) inkubiert.

Nach Postinkubation für bis zu 6 Stunden wurden Proben sowohl zur Untersuchung des COX-2-Proteingehaltes als auch zur Untersuchung der COX-2-mRNA-Menge gewonnen.

Eine Induktion der COX-2 auf mRNA- und auf Proteinebene wurde nur unter Bedingungen der Kontrollbehandlung, also unter Bestrahlung in Gegenwart der Lösemittelkontrolle, erreicht. In Gegenwart von 2 μ M SB202190 jedoch war die COX-2-induzierende Wirkung der UVB-Bestrahlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene vollständig aufgehoben (Abb. 3.4).

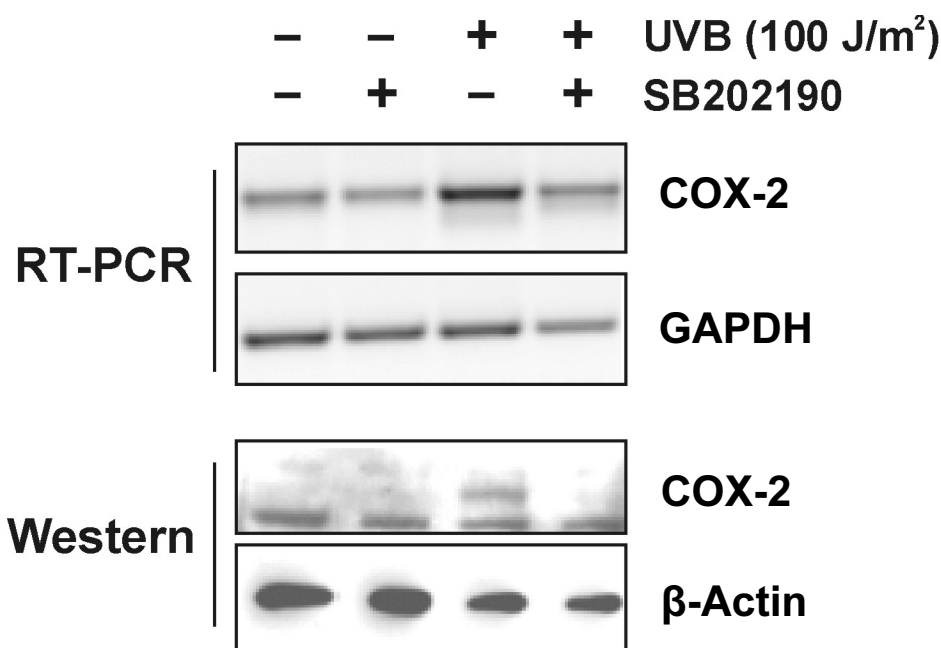


Abb. 3.4 Abhängigkeit der COX-2-Expression von der p38-MAPK

HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert, eine Stunde vor UVB-Bestrahlung (100 J/m²) in serumfreies Medium mit 2 μ M SB202190 umgesetzt und auch nach Bestrahlung bis zur Ernte unter diesen Bedingungen inkubiert. Zellen wurden nach 6 Stunden geerntet, die RNA aufgereinigt und eine RT-PCR für COX-2 und GAPDH (Kontrolle) durchgeführt. Für eine Westernblotanalyse und Immunodetektion mit einem anti-COX-2-Antikörper wurden Zellen nach 8 Stunden geerntet. Eine weitere Immunodetektion mit einem anti- β -Actin-Antikörper diente als Ladungskontrolle. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.4 COX-2-mRNA-Stabilisierung durch UV-Bestrahlung

Um zu testen, ob UV-Strahlung eine Stabilisierung der COX-2-mRNA in HaCat-Zellen induziert, und ob somit diese Stabilisierung zur Induktion der COX-2-Expression beitragen kann, wurden HaCat-Zellen in beschriebener Weise mit UVA- und UVB-Licht bestrahlt und im Anschluss für weitere zwei Stunden im Inkubator belassen. Dann wurde durch Zusatz eines Actinomycin D (1 µg/ml) enthaltenden Mediums die zelluläre Transkription gestoppt und sofort im Anschluss sowie nach mehreren weiteren Zeitpunkten Zell-Lysate zur Isolierung von RNA gewonnen. Schließlich wurde eine RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der COX-2-mRNA-Menge sowie der Menge vorliegender GAPDH-mRNA, die als durch UV nicht regulierte Kontrolle für eingesetzte Gesamt-RNA diente, durchgeführt.

Während sich bei den unbestrahlten Kontrollproben eine rasche Degradation der COX-2-mRNA nach Behandlung mit Actinomycin D feststellen ließ, ergab sich eine signifikante Stabilisierung der COX-2-mRNA durch Bestrahlung mit UVB (Abb. 3.5). Im Gegensatz hierzu und in Übereinstimmung mit den Daten zur COX-2-Induktion auf mRNA- und Proteinebene war die Halbwertszeit der COX-2-mRNA nach UVA-Bestrahlung nur geringfügig höher als in den nicht bestrahlten Zellen.

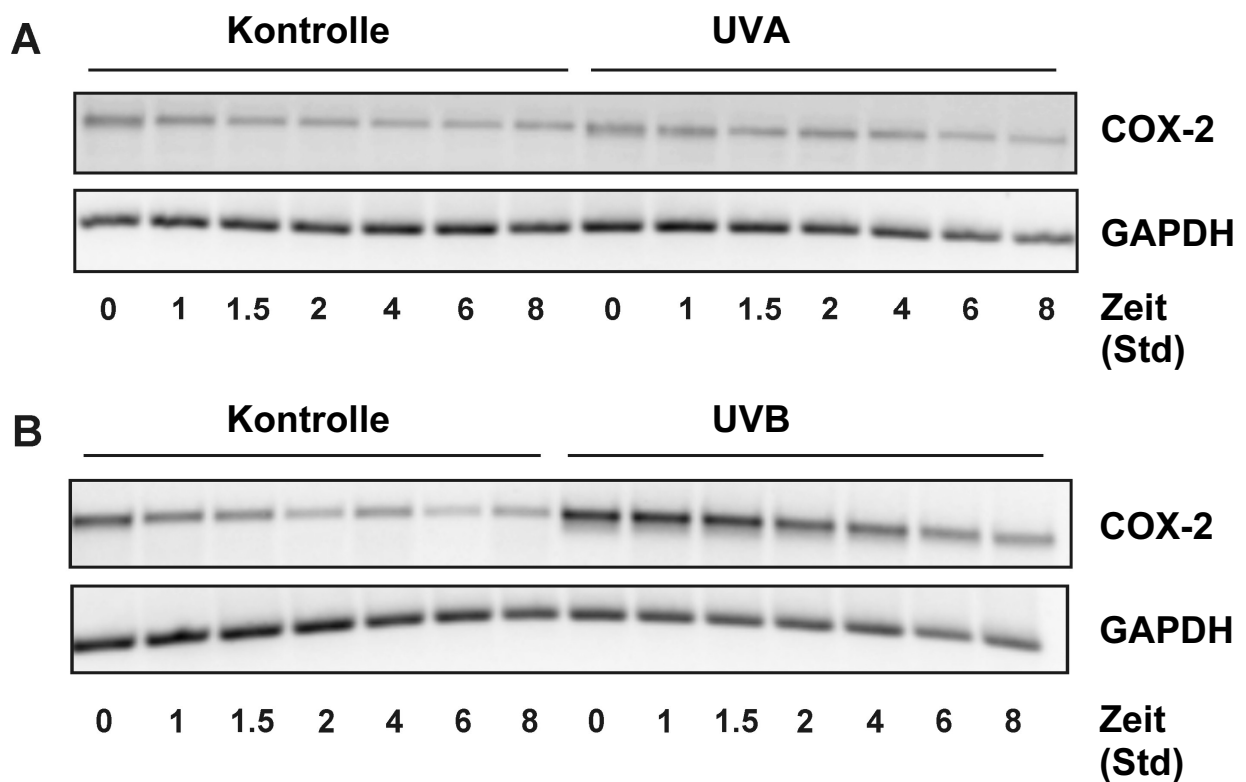


Abb. 3.5 COX-2-mRNA-Stabilisierung durch UV-Bestrahlung

(A) HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert; es folgte eine UVA-Bestrahlung (300 kJ/m^2). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D inkubiert, um die Transkription zu stoppen. Zell-Lysate wurden sowohl sofort (Zeitpunkt 0) als auch zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Actinomycin D-Inkubation gewonnen; die RNA wurde aufgereinigt und eine RT-PCR auf COX-2 und GAPDH (Kontrolle) durchgeführt. (B) Zellen wurden mit UVB (100 J/m^2) bestrahlt und anschließend wie unter (A) behandelt. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

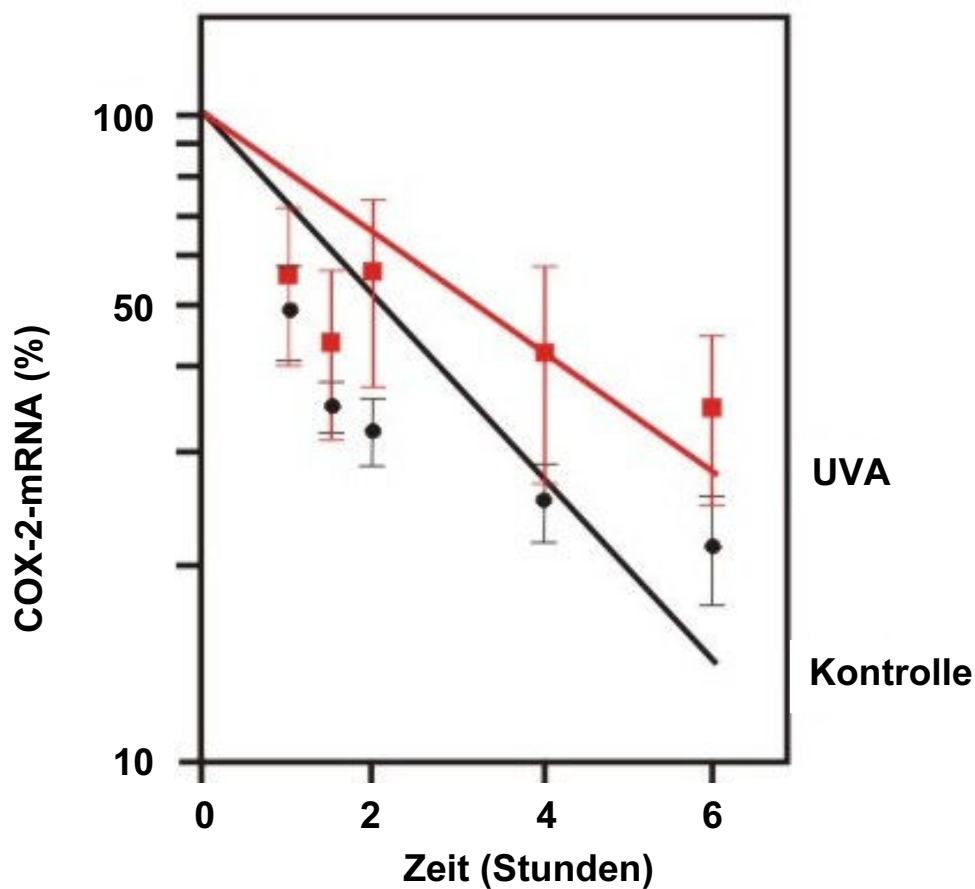


Abb. 3.6 COX-2-mRNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach UVA-Bestrahlung und Hemmung der Transkription durch Actinomycin D.

Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung dreier wie in Abb. 3.5.A durchgeführter Experimente. UVA-Bestrahlung induziert eine geringfügige Stabilisierung der COX-2-mRNA verglichen mit den nicht-bestrahlten Kontrollproben: Die HWZ steigt von ca.2 auf ungefähr 3 Stunden an.

3.5 p38-MAPK vermittelt die UVB-induzierte COX-2-mRNA-Stabilisierung

Da die COX-2-Induktion auf Protein- und RNA-Ebene von p38-MAPK vermittelt wird, sollte im nächsten Versuch ermittelt werden, ob auch die COX-2-mRNA-Stabilisierung über den p38-MAPK-Signalweg reguliert wird. Weil UVA-Strahlung sowohl nur geringfügigen Einfluss auf die COX-2-mRNA-Stabilität hatte (Abb. 3.5A und 3.6.) als auch keine vermehrte

Expression auf RNA- oder Proteinebene induzierte, wurde diese UV-Qualität nicht weiter betrachtet.

Zunächst wurde die p38-MAPK in HaCat-Zellen durch Inkubation mit 2 μ M SB202190 gehemmt; zur Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Vehikel DMSO inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation mit dem Inhibitor wurden die Zellen mit UVB bestrahlt (100 J/m²), gefolgt von einer zweistündigen Postinkubation in Gegenwart des Inhibitors bzw. Vehikels. Im Anschluß wurde das Medium der Zellen verworfen und neues hinzugegeben, in dem der Transkriptionshemmer Actinomycin D (1 μ g/ml) gelöst war. Die Zellen wurden dann sofort, nach 30 Minuten und nach einer Stunde, nach 90 Minuten und nach 2, 4, 6 und 8 Stunden in Trizol-Reagenz lysiert. Nach Isolierung und Quantifizierung der RNA wurde zunächst eine reverse Transkription durchgeführt. Darauf folgten eine PCR auf COX-2 und – zur Kontrolle der RNA-Menge in allen Proben – eine PCR auf GAPDH.

Wie Abb. 3.7. zu entnehmen ist, induzierte UVB-Bestrahlung eine intensive Stabilisierung der COX-2-mRNA (Halbwertszeit $\gg$ 8h), während die Halbwertszeit der COX-2-mRNA in unbestrahlten Zellen im Bereich von vier bis sieben Stunden lag. Hemmung von p38-MAPK hingegen hob den UVB-Effekt fast vollständig auf: Die Halbwertszeit der COX-2-mRNA ist wieder im Bereich von vier bis sieben Stunden.

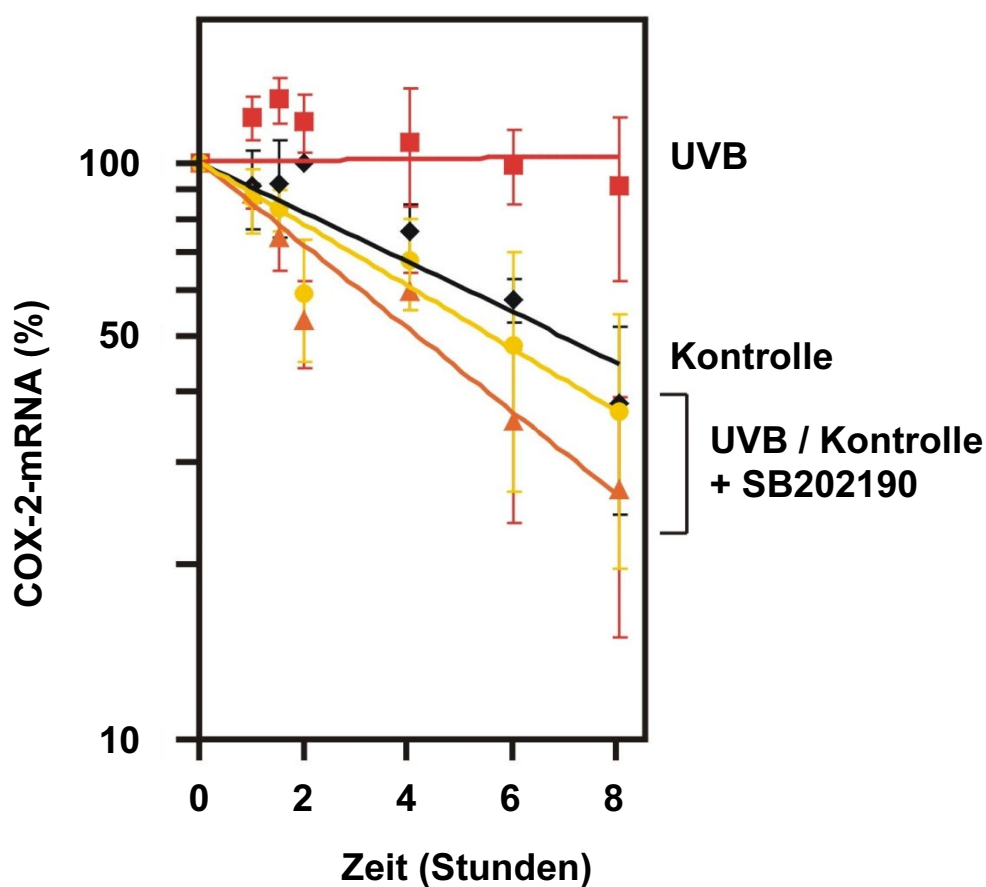


Abb. 3.7 Stabilisierung der COX-2-mRNA durch UVB-Bestrahlung; Effekt der Hemmung von p38-MAPK. HaCat-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert und eine Stunde vor Bestrahlung in serumfreies Medium mit 2 μ M SB202190 umgesetzt. Nach der UVB-Bestrahlung (100 J/m²) wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit 1 μ g/ml Actinomycin D sowie 2 μ M SB202190 inkubiert. Zell-Lysate wurden sowohl sofort (Zeitpunkt 0) als auch zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Actinomycin D-Inkubation gewonnen; die RNA wurde aufgereinigt und eine RT-PCR auf COX-2 und GAPDH (Kontrolle) durchgeführt. Die Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung mindestens dreier voneinander unabhängiger Versuche; die Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass COX-2 in HaCat-Zellen auf RNA- und Proteinebene durch UVB-Bestrahlung induziert werden kann, nicht jedoch durch UVA-Bestrahlung. Ebenso kann die p38-MAP-Kinase durch UVB-Bestrahlung aktiviert werden, und zwar deutlich stärker und längerfristiger als durch UVA-Bestrahlung. Eine Hemmung der p38-MAP-Kinase vor UVB-Bestrahlung verhinderte eine COX-2-Induktion weitestgehend.

Analog zu diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass durch UVB-Bestrahlung eine langfristige Stabilisierung der COX-2-mRNA bewirkt wird, während UVA-Bestrahlung nur zu einer geringfügigen Stabilisierung führt. Die durch UVB-Bestrahlung induzierte COX-2-mRNA-Stabilisierung konnte unterbunden werden, indem die p38-MAPK vor der Bestrahlung durch SB202190 gehemmt wurde.

Diese Daten zeigen, dass die Induktion der COX-2-Expression durch UVB über die Aktivierung der p38-MAP-Kinase erfolgt und legen nahe, dass die p38-MAPK-vermittelte Stabilisierung der COX-2-mRNA hieran beteiligt ist.

4.1 Aktivierung der p38-MAP-Kinase durch UV-Licht

Bestrahlung von HaCat-Zellen mit UVA-Licht (300 kJ/m^2) führt zu einer transienten p38-MAPK-Aktivierung mit einem Maximum nach 15 Minuten – bereits nach einer Stunde ist jedoch das Ausgangsniveau wieder erreicht. Betrachtet man hingegen die Aktivierung der p38-MAPK nach von UVB-Licht-Exposition (100 J/m^2), so stellt man fest, dass diese deutlich stärker ausfällt und zudem auch länger andauert als nach UVA-Bestrahlung: 15 Minuten nach der Bestrahlung ist eine starke Aktivierung der p38-MAPK erkennbar, die bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt – also bis zwei Stunden nach Bestrahlung – annähernd konstant bleibt.

Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Bachelor et al. (2002), die nach UVA-Bestrahlung von HaCat-Zellen nur eine kurzfristige Aktivierung der p38-MAPK nachweisen konnten. Bei einem künstlichen Epidermismodell (Mahns et al. 2004) und bei

menschlichen Fibroblasten (Klotz et al. 1999) führte UVA-Bestrahlung ebenfalls zu einer nur kurz andauernden Aktivierung der p38-MAPK.

Im Gegensatz dazu konnte nach UVB-Bestrahlung eine konstante Aktivierung der p38-MAPK in HaCat-Zellen gezeigt werden, die auch nach zehn Stunden noch anhielt; allerdings war die Bestrahlungsdosis mit 400 J/m^2 höher als in der vorliegenden Arbeit (Chen und Bowden 1999). Mit einer geringeren UVB-Bestrahlungsdosis von 200 J/m^2 konnte in humanen Keratinozyten eine Aktivierung der p38-MAPK auch nach zwei Stunden noch nachgewiesen werden (Peus et al. 1999). Eine schwächere p38-MAPK-Aktivierung durch UVA-, als durch UVB-Licht konnten auch Englaro et al. (1998) in menschlichen Keratinozyten finden.

Wahrscheinlich wird die Aktivierung der p38-MAPK nach UVA-Bestrahlung durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt (Klotz et al. 1999). Mahns et al. (2003) haben eine vermehrte Bildung von Wasserstoffperoxid nach UVA-Bestrahlung gefunden. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der UVA-induzierten Wasserstoffperoxidbildung in verschiedenen Zellkulturmedien und der Aktivierung der ERK-MAPK. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen jedoch nicht in Zellkulturmedien, sondern in geringen Mengen PBS bestrahlt, um eben diesen Effekt zu vermeiden. Die Aktivierung der p38-MAPK ist deshalb wahrscheinlich auf die Bildung intrazellulärer ROS zurückzuführen, die von Petersen et al. (2000) in HaCat-Zellen nach UVA-Bestrahlung beschrieben worden sind. Ein Bindeglied zwischen ROS-Bildung und p38-MAPK-Aktivierung ist möglicherweise eine Aktivierung des EGFR. Wasserstoffperoxid kann eine Induktion der Phosphorylierung von EGFR und damit seine Aktivierung bewirken (Meves et al. 2001; von et al. 2006). Einige Studien beschreiben eine p38-MAPK-Aktivierung die durch EGFR vermittelt wird (Xu und Shu 2007; Xu et al. 2006), allerdings erwies sich in anderen Studien die UVA-Licht-induzierte p38-MAPK-Aktivierung als von EGFR unabhängig (Englaro et al. 1998; Zhang et al. 2001).

Eine Bildung von ROS durch UVB-Bestrahlung ist ebenfalls vielfach beschrieben worden: Peus et al. (1999) finden nach UVB-Bestrahlung eine Aktivierung der p38-MAPK durch ROS – die offenbar unabhängig ist von einer ebenfalls ROS-induzierten EGFR-Aktivierung. Van Laethem et al. (2006) entdeckten in menschlichen Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung eine ROS-induzierte Aktivierung der ASK-1, eine der p38-MAPK vorgeschaltete Kinase, die

folglich eine p38-MAPK-Aktivierung bewirkt. Am Mausmodell wird eine H₂O₂-induzierte Aktivierung der p38-MAPK nach UVB-Bestrahlung mit der Hemmung der MKP-1, einer MAP-Kinase-Phosphatase, die die p38-MAPK inaktiviert in Zusammenhang gebracht (Katiyar und Meeran 2007).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass UVA- und UVB-Strahlung zu einer Aktivierung der p38-MAPK führen. UVB ist von den beiden Qualitäten der deutlich potentere Stimulus: Es bewirkt eine stärkere und über längere Zeit anhaltende Aktivierung der p38-MAPK als UVA.

4.2 Induktion der COX-2 durch UVB

Schon lange ist bekannt, dass UV-Strahlung ein wichtiger ätiologischer Faktor verschiedener Hautkrebsarten ist (siehe 1.1): Exposition begünstigt die Entstehung des Basalzellkarzinoms, des spinzellulären Karzinoms und des kutanen malignen Melanoms (Armstrong und Krickler 2001; de Gruijl et al. 2001). Die Rolle der COX-2 in der Entwicklung von Hautkrebs hingegen wird erst zunehmend deutlich und ist noch nicht völlig erschlossen: Wie bei einigen anderen Tumorarten schon vorher bekannt, konnte auch im spinzellulären Karzinom der Haut eine Überexpression der COX-2 gefunden werden (Buckman et al. 1998; Müller-Decker et al. 1995; Thun et al. 2002). In Experimenten mit haarlosen Mäusen konnte die Rate an UV-Licht-induzierten Hauttumoren durch selektive COX-2-Hemmung mit Celecoxib, durch unselektive COX-Hemmung mit Indomethacin oder auch durch Deletion der COX-Gene deutlich gesenkt werden (Fischer et al. 2007; Tiano et al. 2002). Eine weitere Erforschung der Stimuli und der folgenden Signalwege, die in Keratinozyten zur Induktion der COX-2 führen, könnte also zur Prävention und Behandlung von Hautkrebs beitragen.

Die Unterscheidung zwischen der Wirkung von UVA- und UVB-Strahlung im Rahmen dieser Arbeit sollte klären, welchen Anteil die verschiedenen Wellenlängen an der COX-2-Induktion haben. Hierbei ergeben sich einige Unterschiede: Während UVA-Bestrahlung weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene eine Induktion der COX-2 bewirkt, führt eine Bestrahlung mit UVB zu einer mit der Zeit zunehmenden Expression an COX-2-mRNA und -Protein: Die

größte mRNA-Menge ist nach sechs Stunden nachweisbar, die größte Proteinmenge nach acht Stunden – also an den jeweils letzten untersuchten Zeitpunkten.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen haben Bachelor et al. (2002) nach UVA-Bestrahlung von HaCat-Zellen eine Induktion der COX-2 finden können, und zwar schon ab einer Bestrahlungsdosis von 250 kJ/m^2 . Das Emissionsmaximum der Lichtquelle war mit 365 nm identisch mit demjenigen der in dieser Arbeit verwendeten; da jedoch eine andere Lampe verwendet wurde, ist anzunehmen, dass dennoch Unterschiede im Bestrahlungsspektrum oder der Intensität und damit der Bestrahlungsdauer vorliegen.

Auch in einer anderen Studie konnte eine Induktion der COX-2 nach UVA-Bestrahlung gezeigt werden, und zwar an einem künstlichen Epidermis-Modell (Mahns et al. 2004). Hier wurden Bestrahlungen mit UVA I (340 – 400 nm) und UVA II (320 – 340 nm) miteinander verglichen: Das Ergebnis war, dass UVA II ein starker Induktor der COX-2 war, während Wellenlängen oberhalb von 350 nm, also das UVA I-Spektrum, keinen nennenswerten Einfluss auf die COX-2-Induktion hatten, also der Großteil des UVA I-Spektrums. Nicht nur das Emissionsmaximum, sondern auch der überwiegende Anteil des Spektrums der in dieser Arbeit verwendeten Lampe liegt jedoch im UVA I-Spektrum oberhalb von 350 nm.

Eine COX-2-Induktion auf Proteinebene nach UVB-Bestrahlung wird dagegen bestätigt durch Chen et al. (2001), die – mit einer höheren Bestrahlungsdosis von 250 J/m^2 – in HaCat-Zellen eine zunehmende COX-2- Proteinmenge bis zu zwölf Stunden nach UVB-Exposition beobachten konnten. An menschlichen Keratinozyten konnte nach UVB-Bestrahlung (300 J/m^2) eine COX-2-Induktion auf RNA- und Proteinebene sechs und zwölf Stunden nach Exposition gezeigt werden (Buckman et al. 1998).

Zusammenfassend können in dieser Arbeit zwei Beobachtungen festgehalten werden: UVB-Licht ist ein potenter Induktor der COX-2, sowohl auf RNA-, wie auch auf Proteinebene; UVA-Bestrahlung hingegen führt nicht zu einer COX-2-Induktion.

4.2.1 Stabilisierung der COX-2-mRNA

In unbehandelten Kontrollzellen liegt die Halbwertszeit der COX-2-mRNA bei etwa zwei Stunden. Während UVA-Bestrahlung nur zu einer geringfügigen Stabilisierung der COX-2-mRNA zu führen scheint (die Halbwertszeit wird auf etwa drei Stunden erhöht) induziert UVB eine drastische Stabilisierung der COX-2-mRNA:

Über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Stunden bleibt die COX-2-mRNA-Menge annähernd konstant, und die Halbwertszeit der COX-2-mRNA in UVB-bestrahlten Zellen liegt demnach jenseits des letzten untersuchten Zeitpunktes von acht Stunden und somit deutlich über der der unbehandelten und UVA-bestrahlten Zellen.

4.2.2 Zur Bedeutung der p38-MAPK bei der COX-2-Induktion und Stabilisierung der COX-2mRNA

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, inwiefern die UVB-induzierte COX-2-Induktion und -mRNA-Stabilisierung abhängig sind von der Aktivierung der p38-MAP-Kinase. Hierzu werden UVB-bestrahlte Zellen mit SB202190 inkubiert, einem p38-MAPK-Hemmstoff: Es zeigt sich, dass durch den p38-MAPK-Inhibitor eine Induktion der COX-2 sowohl auf RNA-, wie auch auf Proteinebene nahezu vollständig unterdrückt wird. Betrachtet man zusätzlich die COX-2-mRNA-Halbwertszeit, zeigt sich, dass es nach Hemmung der p38-MAPK nicht mehr zu einer Stabilisierung der COX-2-mRNA kommt: Trotz UVB-Strahlung wird die COX-2-mRNA nach p38-MAPK-Hemmung etwa ebenso schnell abgebaut wie in den nicht bestrahlten Kontrollproben.

Andere Arbeiten, die sich mit dem Zusammenhang zwischen MAP-Kinasen und COX-2 beschäftigen, kommen zu ähnlichen Ergebnissen: So konnten Chen und Bowden (1999) eine Induktion der p38-MAPK und ERK in HaCat-Zellen finden, nachdem diese mit UVB-Licht bestrahlt worden waren; in einer Folgearbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der ERK keinen signifikanten Einfluss auf die COX-2-Induktion hatte, während eine Hemmung der p38-MAPK mit SB202190 zu einer Minderung der COX-2-Induktion führte (Chen et al. 2001b). Mahns et al. (2004) konnten im Epidermismodell einen Einfluss der JNK und der p38-MAPK auf die COX-2-Induktion finden: Eine Hemmung der p38-MAPK durch SB203580 oder der JNK durch SP600125 oder JNK-inhibitorische Peptide verminderten die durch Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht ausgelöste COX-2-Induktion. Auch in Versuchen mit haarlosen SKH1-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die p38-MAPK an der COX-2-Induktion beteiligt ist, und zwar via Induktion von AP-1, einem Transkriptionsfaktor, der an den COX-2-Promotor binden kann; als ein zusätzlicher Einfluss auf die COX-2-Expression wurde in dieser Studie der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg gefunden, der ebenfalls via AP-1-Induktion zu vermehrter COX-2-Expression führt (Bachelor et al. 2005).

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass die p38-MAP-Kinase ein entscheidendes Bindeglied ist in der Signalkette von UVB-Bestrahlung bis zur Induktion der COX-2. Zum ersten Mal konnte zudem gezeigt werden, dass UVB-Licht via p38-MAPK zu einer Stabilisierung der COX-2-mRNA führt.

4.3 p38-MAPK und COX-2 in der Krebs-Prävention und -Therapie

Da in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen UV-Bestrahlung und p38-MAPK-Aktivierung bzw. COX-2-Induktion in menschlichen Keratinozyten hergestellt werden konnte und andere Studien eine Induktion der COX-2 als tumorpromovierend oder gar kanzerogen postulieren (vgl. Abschnitt 1.3.2), stellt sich die Frage, inwiefern umgekehrt eine Hemmung der p38-MAPK oder der COX-2 wirksam gegen eine Krebserkrankung eingesetzt werden könnte:

Am besten untersucht ist der Einfluss der p38-MAP-Kinase auf das kolorektale Karzinom: Comes et al. (2007) konnten zeigen, dass eine Blockade der p38-MAPK α mit SB202190 in verschiedenen kolorektalen Karzinom-Zell-Linien zum autophagischen Zelltod führt. Kuwamura et al. (2007) konnten nach Inaktivierung des ASK-1-Gens, einer stromaufwärts der p38-MAPK gelegenen Kinase, einen Wachstumsstillstand und vermehrten Zelltod kolorektaler Karzinomzellen beobachten. Auch in Ergänzung zu einer bestehenden Therapie mit Sulindac, einem NSAID, haben sich p38-MAPK-Inhibitoren als wirksam erwiesen: So erhöhte die Kombination aus SB203580, einem p38-MAPK-Hemmstoff, und Sulindac-Sulfid die Apotoserate von Kolonkarzinomzellen (Sun und Sinicrope 2005).

Ein weiterer Ansatz zur Krebstherapie oder -prävention wird durch Gout et al. (2006) und durch Suarez-Cuervo et al. (2004) aufgezeigt: Sie konnten am Mausmodell zeigen, dass die p38-MAP-Kinasen α und β für die Zellmigration und Metastasenformation benötigt werden – nicht nur beim kolorektalen Karzinom, sondern auch beim Mammakarzinom.

Besser untersucht ist der Einfluss von COX-2-Hemmstoffen auf verschiedene Tumoren: Topische Anwendung von Diclofenac, einem unspezifischen COX-Inhibitor, hat sich als wirksam gegen die aktinische Keratose, einer Präkanzerose der Haut, erwiesen. Mittlerweile

sind klinische Phase IV-Studien abgeschlossen, so dass Diclofenac-Salbe zu den Standardtherapien gegen die aktinische Keratose zählt (Jarvis und Figgitt 2003; Nelson et al. 2004).

Es wurde darüber hinaus beschrieben, dass eine Hemmung der COX-2 zu Wachstumsunterdrückung und vermehrter Apoptose von Ösophaguskarzinomzellen führt (Souza et al. 2004). Eine klinische Studie zeigt, dass COX-2-Hemmstoffe bei Patienten mit Barrett-Ösophagus, einer Präkanzerose, präventiv gegen die Entwicklung eines Karzinoms wirken (Kaur et al. 2002). Karzinome der Bauchspeicheldrüse gehen in der Regel mit einer sehr schlechten Prognose einher. Die Tumoren treten familiär gehäuft auf, so dass die Entwicklung einer Chemoprophylaxe sinnvoll ist. Es konnte gezeigt werden, dass COX-Inhibitoren sowohl die Inzidenz, als auch das Wachstum des Pankreas-Karzinoms mindern können (Anderson et al. 2002) – andere Studien können dies allerdings nicht bestätigen (Jacobs et al. 2004). Einige klinische Phase II-Studien, die Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika untersuchen, deuten teils auf einen positiven Effekt der zusätzlichen COX-2-Hemmung hin (Ferrari et al. 2006), teils aber auch nicht (El-Rayes et al. 2005).

Breit angelegte epidemiologische Studien konnten zeigen, dass Menschen, die regelmäßig COX-Hemmstoffe eingenommen hatten, eine geringere Inzidenz für das Ausbilden von und Mortalität an kolorektalen Karzinomen aufwiesen (DuBois et al. 1996a). Mehrere Studien bestätigen, dass COX-Hemmstoffe das Wachstum von kolorektalen Adenomen hemmen (Labayle et al. 1991; Steinbach et al. 2000). Bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms jedoch gibt es mehrere klinische Phase II-Studien, die keine positive Wirkung einer Kombination von Chemotherapeutika mit COX-2-Inhibitoren finden können (Becerra et al. 2003; El-Rayes et al. 2008; Pan et al. 2005).

Bei der Behandlung von Brustkrebs könnten COX-2-Inhibitoren erfolgreich eingesetzt werden: So konnte gezeigt werden, dass Depletion von COX-2 über einen siRNA („silencer“-RNA)-Ansatz die Metastasierung und den Progress des gering differenzierten Mammakarzinoms hemmen können (Stasinopoulos et al. 2007); dementsprechend konnte in verschiedenen aggressiven Mammakarzinom-Zelllinien gefunden werden, dass COX-2 die Expression von Matrix-Metalloproteinasen induziert und vermutlich auf diesem Wege eine erhöhte Motilität und Invasivität des Mammakarzinoms fördert (Larkins et al. 2006). In

Tierversuchen mit menschlichen Brustkrebszellen führte eine selektive Hemmung der COX-2 zu einer Wachstumshemmung der Tumoren (Barnes et al. 2007). Einige klinische Studien haben eine Kombinationstherapie von selektiven COX-2-Hemmstoffen mit anderen Therapeutika untersucht – teils erfolgreich, teils aber auch ohne einen Nutzen zu finden (Canney et al. 2006; Dang et al. 2004; Fabi et al. 2008).

Neben therapeutischen Ansätzen zeigen andere Studien auf, dass COX-2-Hemmstoffe für eine Chemoprävention gegen die Entwicklung von Brust-, Prostata-, Kolon- und Lungenkarzinome eingesetzt werden können (Harris et al. 2007).

Zusammenfassend ergibt sich, dass das präventive und therapeutische Potential der p38-MAPK-Inhibitoren und insbesondere der COX-2-Hemmstoffe groß ist. Für die Behandlung von Hautkrebs sind sie dagegen noch kaum erprobt. Die vorliegende Arbeit zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Kanzerogen UV-Licht und der Induktion der COX-2 via p38-MAPK auf; da in verschiedenen Studien Hinweise auf die tumorpromovierende oder kanzerogene Wirkung der COX-2 – auch bei der Entwicklung von Hautkrebs – gefunden worden sind (vgl. 1.3.2), sollten klinische Studien folgen, um den Einfluss von p38-MAPK- und COX-2-Hemmstoffen auf Hauttumoren zu untersuchen. Einen weiteren Ansatzpunkt bietet die in der vorliegenden Arbeit beschriebene COX-2-mRNA-Stabilisierung: Eine Hemmung potentiell mRNA-stabilisierender Proteine wie beispielsweise HuR (vgl. Abschnitt 1.4) könnte sich ebenfalls als wirksam gegen Hautkrebs oder auch andere Tumoren erweisen.

4.4 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass UVA-Licht in HaCat-Zellen, einer menschlichen Keratinozytenlinie, zu einer transienten p38-MAPK-Aktivierung führt, jedoch zu keiner Induktion der COX-2 – trotz geringfügiger COX-2-mRNA-Stabilisierung. UVB-Bestrahlung hingegen führt zu einer deutlich stärkeren p38-MAPK-Aktivierung. Diese wiederum bewirkt eine ausgeprägte Induktion der COX-2 auf mRNA- und Proteinebene via mRNA-Stabilisierung.

Weitere Studien müssen zeigen, welche vorgeschalteten Rezeptoren und Kinasen zur p38-MAPK-Aktivierung führen und auf welchem Wege die p38-MAPK letztlich die COX-2-Induktion bewirkt. Neben verschiedenen Transkriptionsfaktoren kommen hier auch verschiedene mRNA-stabilisierende Proteine in Frage (siehe 1.2.2 und 1.4).

Eine klinische Anwendung der Ergebnisse dieser Arbeit würde darin bestehen, eine Hemmung der COX-2 direkt oder indirekt via p38-MAPK-Hemmung oder Hemmung mRNA-stabilisierender Proteine bei der Behandlung von Hauttumoren zu erproben.

5. Zusammenfassung

COX-2 hat zahlreiche physiologische Aufgaben im menschlichen Organismus, ist jedoch auch an einigen pathophysiologischen Prozessen beteiligt: So gibt es Hinweise auf tumorpromovierende und karzinogene Wirkung der COX-2. Da UV-Strahlung Hauttumoren verursachen kann, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen den UV-Qualitäten UVA- und UVB-Strahlung und der COX-2-Expression in HaCat-Zellen, immortalisierten menschlichen Keratinozyten, näher untersucht werden. Als ein mögliches Bindeglied zwischen UV-Bestrahlung und COX-2-Expression wird unter anderem ein Mitglied aus der Familie der MAP-Kinasen vermutet: Die p38-MAP-Kinase, so dass auch ihre Rolle bei der COX-2-Expression in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass UVB-Bestrahlung – im Gegensatz zu UVA-Bestrahlung – zu einer deutlichen Induktion der COX-2 führt, und zwar sowohl auf RNA-, als auch auf Proteinebene. Als Vermittler dieser Induktion wurde die p38-MAP-Kinase identifiziert: Eine Hemmung derselben vor Bestrahlung unterdrückte die vermehrte COX-2-Expression. Wesentlich zur vermehrten COX-2-Expression trägt bei, dass UVB-Bestrahlung zu einer langanhaltenden COX-2-mRNA-Stabilisierung führt – wohingegen eine Stabilisierung nach UVA-Bestrahlung nur sehr geringfügig nachzuweisen war. Die Stabilisierung ließ sich verhindern, indem die p38-MAPK vor Bestrahlung gehemmt wurde.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit also gezeigt werden, dass – im Gegensatz zur UVA-Strahlung – vor allem UVB-Strahlung eine vermehrte COX-2-Expression bewirkt, und zwar durch Stabilisierung der COX-2-mRNA. Diese wird vermittelt durch eine Aktivierung der p38-MAP-Kinase.

6. Literatur

- Anderson KE, Johnson TW, Lazovich D and Folsom AR. (2002). *J Natl Cancer Inst*, **94**, 1168-1171.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K and Hla T. (1994). *Biochem J*, **302 (Pt 3)**, 723-727.
- Armstrong BK and Kricker A. (2001). *J Photochem Photobiol B*, **63**, 8-18.
- Assefa Z, Garmyn M, Bouillon R, Merlevede W, Vandenheede JR and Agostinis P. (1997). *J Invest Dermatol*, **108**, 886-891.
- Bachelor MA, Cooper SJ, Sikorski ET and Bowden GT. (2005). *Mol Cancer Res*, **3**, 90-99.
- Bachelor MA, Silvers AL and Bowden GT. (2002). *Oncogene*, **21**, 7092-7099.
- Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ and Cerione RA. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 27995-27998.
- Barnes NL, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E and Bundred NJ. (2007). *Br J Cancer*, **96**, 575-582.
- Becerra CR, Frenkel EP, Ashfaq R and Gaynor RB. (2003). *Int J Cancer*, **105**, 868-872.
- Beelman CA and Parker R. (1995). *Cell*, **81**, 179-183.
- Bender K, Blattner C, Knebel A, Iordanov M, Herrlich P and Rahmsdorf HJ. (1997). *J Photochem Photobiol B*, **37**, 1-17.
- Bernstein P and Ross J. (1989). *Trends Biochem Sci*, **14**, 373-377.
- Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S and Johnson GL. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 5361-5368.
- Blattner C, Kannouche P, Litfin M, Bender K, Rahmsdorf HJ, Angulo JF and Herrlich P. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 3616-3625.
- Bode AM and Dong Z. (2003). *Sci STKE*, **2003**, RE2.
- Bollig F, Winzen R, Kracht M, Ghebremedhin B, Ritter B, Wilhelm A, Resch K and Holtmann H. (2002). *Eur J Biochem*, **269**, 5830-5839.
- Bomser JA. (2002). *J Biochem Mol Toxicol*, **16**, 33-40.
- Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hulsen A, Fasching C, Cremer T and Fusenig NE. (1997). *Genes Chromosomes Cancer*, **19**, 201-214.
- Brannon TS, North AJ, Wells LB and Shaul PW. (1994). *J Clin Invest*, **93**, 2230-2235.

- Brenneisen P, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (2002). *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 31-43.
- Brewer G. (1991). *Mol Cell Biol*, **11**, 2460-2466.
- Brook M, Sully G, Clark AR and Saklatvala J. (2000). *FEBS Lett*, **483**, 57-61.
- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J and Pentland AP. (1998). *Carcinogenesis*, **19**, 723-729.
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di MF, French L and Tschopp J. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 12203-12209.
- Cadet J, Anselmino C, Douki T and Voituriez L. (1992). *J Photochem Photobiol B*, **15**, 277-298.
- Canney PA, Machin MA and Curto J. (2006). *Eur J Cancer*, **42**, 2751-2756.
- Carballo E, Lai WS and Blackshear PJ. (1998). *Science*, **281**, 1001-1005.
- Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, Klausner RD and Harford JB. (1989). *EMBO J*, **8**, 3693-3699.
- Chandrasekharan S, Qiu TH, Alkharouf N, Brantley K, Mitchell JB and Liu ET. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 5235-5247.
- Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H and Baltimore D. (1998). *Science*, **281**, 1860-1863.
- Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M and Karin M. (2000). *Genes Dev*, **14**, 1236-1248.
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M and Karin M. (2001a). *Cell*, **107**, 451-464.
- Chen CY and Shyu AB. (1995). *Trends Biochem Sci*, **20**, 465-470.
- Chen W and Bowden GT. (1999). *Oncogene*, **18**, 7469-7476.
- Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann BN and Bowden GT. (1999). *Mol Carcinog*, **24**, 79-84.
- Chen W, Tang Q, Gonzales MS and Bowden GT. (2001b). *Oncogene*, **20**, 3921-3926.
- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O and Langenbach R. (2000). *Cancer Res*, **60**, 4705-4708.
- Chun KS, Akunda JK and Langenbach R. (2007). *Cancer Res*, **67**, 2015-2021.
- Cobb MH. (1999). *Prog Biophys Mol Biol*, **71**, 479-500.
- Cobb MH and Goldsmith EJ. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 14843-14846.

- Colville-Nash PR and Gilroy DW. (2001). *BioDrugs*, **15**, 1-9.
- Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, Ingravallo G, Modica S, Lo SG, Moschetta A, Guanti G and Simone C. (2007). *Cell Death Differ*, **14**, 693-702.
- Couttet P, Fromont-Racine M, Steel D, Pictet R and Grange T. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5628-5633.
- Crofford LJ. (1997). *J Rheumatol Suppl*, **49**, 15-19.
- Dang CT, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Dickler MN, Moasser MM, Seidman AD, D'Andrea GM, Theodoulou M, Panageas KS, Norton L and Hudis CA. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 4062-4067.
- Davies NM, Good RL, Roupe KA and Yanez JA. (2004). *J Pharm Pharm Sci*, **7**, 217-226.
- Day DA and Tuite MF. (1998). *J Endocrinol*, **157**, 361-371.
- de Gruijl FR, van Kranen HJ and Mullenders LH. (2001). *J Photochem Photobiol B*, **63**, 19-27.
- Deacon K and Blank JL. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 16604-16610.
- Dean JL, Brook M, Clark AR and Saklatvala J. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 264-269.
- Dehlin E, Wormington M, Korner CG and Wahle E. (2000). *EMBO J*, **19**, 1079-1086.
- Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, Noske A, Niesporek S, Dietel M and Weichert W. (2006). *Mod Pathol*, **19**, 1261-1269.
- Denkert C, Weichert W, Pest S, Koch I, Licht D, Köbel M, Reles A, Sehouli J, Dietel M and Hauptmann S. (2004a). *Cancer Res*, **64**, 189-195.
- Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, Müller BM, Noske A, Niesporek S, Kristiansen G, Guski H, Dietel M and Hauptmann S. (2004b). *Clin Cancer Res*, **10**, 5580-5586.
- Denkert C, Winzer KJ, Müller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H and Hauptmann S. (2003). *Cancer*, **97**, 2978-2987.
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ. (1995). *Science*, **267**, 682-685.
- Dhanasekaran N, Tsim ST, Dermott JM and Onesime D. (1998). *Oncogene*, **17**, 1383-1394.
- Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA and Prescott SM. (2001). *J Clin Invest*, **108**, 1657-1665.
- DuBois RN, Giardiello FM and Smalley WE. (1996a). *Gastroenterol Clin North Am*, **25**, 773-791.

- DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H and Beauchamp RD. (1996b). *Cancer Res*, **56**, 733-737.
- El-Rayes BF, Zalupski MM, Manza SG, Rusin B, Ferris AM, Vaishampayan U, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R, Shields AF and Philip PA. (2008). *Cancer Chemother Pharmacol*, **61**, 283-289.
- El-Rayes BF, Zalupski MM, Shields AF, Ferris AM, Vaishampayan U, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R, Adsay V and Philip PA. (2005). *Invest New Drugs*, **23**, 583-590.
- Englaro W, Derijard B, Ortonne JP and Ballotti R. (1998). *Oncogene*, **16**, 661-664.
- Fabi A, Metro G, Papaldo P, Mottolese M, Melucci E, Carlini P, Sperduti I, Russillo M, Gelibter A, Ferretti G, Tomao S, Milella M and Cognetti F. (2008). *Cancer Chemother Pharmacol*, **62**, 717-725.
- Ferrari V, Valcamonico F, Amoroso V, Simoncini E, Vassalli L, Marpicati P, Rangoni G, Grisanti S, Tiberio GA, Nodari F, Strina C and Marini G. (2006). *Cancer Chemother Pharmacol*, **57**, 185-190.
- Figueroa A, Cuadrado A, Fan J, Atasoy U, Muscat GE, Munoz-Canoves P, Gorospe M and Munoz A. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 4991-5004.
- Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA and Conti CJ. (1999). *Mol Carcinog*, **25**, 231-240.
- Fischer SM, Pavone A, Mikulec C, Langenbach R and Rundhaug JE. (2007). *Mol Carcinog*, **46**, 363-371.
- Franklin CC, Srikanth S and Kraft AS. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3014-3019.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J and Saklatvala J. (1994). *Cell*, **78**, 1039-1049.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A and Needleman P. (1990). *J Biol Chem*, **265**, 16737-16740.
- Fusenig NE and Boukamp P. (1998). *Mol Carcinog*, **23**, 144-158.
- Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA and Zon LI. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6881-6886.
- Gao M, Fritz DT, Ford LP and Wilusz J. (2000). *Mol Cell*, **5**, 479-488.
- Gao M, Wilusz CJ, Peltz SW and Wilusz J. (2001). *EMBO J*, **20**, 1134-1143.
- Gibson LL, Hahner L, Osborne-Lawrence S, German Z, Wu KK, Chambliss KL and Shaul PW. (2005). *Circ Res*, **96**, 518-525.

- Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R and Cohen P. (1997). *EMBO J*, **16**, 3563-3571.
- Gorospe M, Wang X and Holbrook NJ. (1998). *Mol Cell Biol*, **18**, 1400-1407.
- Gout S, Morin C, Houle F and Huot J. (2006). *Cancer Res*, **66**, 9117-9124.
- Grether-Beck S, Buettner R and Krutmann J. (1997). *Biol Chem*, **378**, 1231-1236.
- Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ and Morrison AR. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 12901-12908.
- Hanks SK and Hunter T. (1995). *FASEB J*, **9**, 576-596.
- Harris RC and Breyer MD. (2006). *Clin J Am Soc Nephrol*, **1**, 236-245.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN and Breyer MD. (1994). *J Clin Invest*, **94**, 2504-2510.
- Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H and Seibert K. (2000). *Cancer Res*, **60**, 2101-2103.
- Harris RE, Beebe-Donk J and Alshafie GA. (2007). *Int J Biol Sci*, **3**, 328-334.
- Hawkey CJ. (2002). *Gut*, **50 Suppl 3**, III25-III30.
- Hempel SL, Monick MM, He B, Yano T and Hunninghake GW. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 32979-32984.
- Hirai S, Izawa M, Osada S, Spyrou G and Ohno S. (1996). *Oncogene*, **12**, 641-650.
- Hla T and Maciag T. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 24059-24063.
- Hla T and Neilson K. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7384-7388.
- Hutchison M, Berman KS and Cobb MH. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 28625-28632.
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, Ten DP, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K and Gotoh Y. (1997). *Science*, **275**, 90-94.
- Iordanov MS, Choi RJ, Ryabinina OP, Dinh TH, Bright RK and Magun BE. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 5380-5394.
- Jacobs EJ, Connell CJ, Rodriguez C, Patel AV, Calle EE and Thun MJ. (2004). *J Natl Cancer Inst*, **96**, 524-528.
- Jarvis B and Figgitt DP. (2003). *Am J Clin Dermatol*, **4**, 203-213.
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S and Han J. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 17920-17926.
- Jun SS, Chen Z, Pace MC and Shaul PW. (1999). *Circ Res*, **84**, 193-200.

- Kabuyama Y, Homma MK, Kurosaki T and Homma Y. (2002). *Eur J Biochem*, **269**, 664-670.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA and Jothy S. (1995). *Cancer Res*, **55**, 2556-2559.
- Katiyar SK and Meeran SM. (2007). *Free Radic Biol Med*, **42**, 299-310.
- Kaur BS, Khamnehei N, Iravani M, Namburu SS, Lin O and Triadafilopoulos G. (2002). *Gastroenterology*, **123**, 60-67.
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K and Reddy BS. (1998). *Cancer Res*, **58**, 409-412.
- Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T and Yoshimoto T. (1999). *Biochim Biophys Acta*, **1438**, 120-130.
- Kis B, Snipes JA and Busija DW. (2005). *J Pharmacol Exp Ther*, **315**, 1-7.
- Klotz LO, Briviba K and Sies H. (1997). *FEBS Lett*, **408**, 289-291.
- Klotz LO, Holbrook NJ and Sies H. (2001). *Curr Probl Dermatol*, **29**, 95-113.
- Klotz LO, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry JM and Sies H. (1999). *Eur J Biochem*, **260**, 917-922.
- Körner CG and Wahle E. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 10448-10456.
- Krutmann J. (1998). *Eur J Dermatol*, **8**, 200-202.
- Kuwamura H, Tominaga K, Shiota M, Ashida R, Nakao T, Sasaki E, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Ichijo H, Arakawa T and Iwao H. (2007). *Oncol Rep*, **17**, 781-786.
- Labayle D, Fischer D, Vielh P, Drouhin F, Pariente A, Bories C, Duhamel O, Troussset M and Attali P. (1991). *Gastroenterology*, **101**, 635-639.
- Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS and Blackshear PJ. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 4311-4323.
- Langenbach R, Loftin C, Lee C and Tiano H. (1999). *Biochem Pharmacol*, **58**, 1237-1246.
- Larkins TL, Nowell M, Singh S and Sanford GL. (2006). *BMC Cancer*, **6**, 181.
- Laroia G, Cuesta R, Brewer G and Schneider RJ. (1999). *Science*, **284**, 499-502.
- Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J and Clark AR. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 4265-4274.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW and . (1994). *Nature*, **372**, 739-746.

- Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D and Hwang D. (1992). *J Biol Chem*, **267**, 25934-25938.
- Levine L. (1981). *Adv Cancer Res*, **35**, 49-79.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H and Levy AP. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 6417-6423.
- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ and Han J. (1996). *Biochem Biophys Res Commun*, **228**, 334-340.
- Lim L, Manser E, Leung T and Hall C. (1996). *Eur J Biochem*, **242**, 171-185.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL and Karin M. (1995). *Science*, **268**, 286-290.
- Loflin P, Chen CY and Shyu AB. (1999). *Genes Dev*, **13**, 1884-1897.
- Luo C, Kallajoki M, Gross R, Mulari M, Teros T, Ylinen L, Makinen M, Laine J and Simell O. (2002). *Cell Tissue Res*, **310**, 169-175.
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A and Furneaux H. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 8144-8151.
- Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H and Klotz LO. (2003). *Free Radic Res*, **37**, 391-397.
- Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO and Sies H. (2004). *Photochem Photobiol Sci*, **3**, 257-262.
- Marnett LJ. (1992). *Cancer Res*, **52**, 5575-5589.
- Mertens S, Craxton M and Goedert M. (1996). *FEBS Lett*, **383**, 273-276.
- Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR and Peus D. (2001). *Toxicol Lett*, **122**, 205-214.
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A and Karin M. (1995). *Cell*, **81**, 1147-1157.
- Ming XF, Kaiser M and Moroni C. (1998). *EMBO J*, **17**, 6039-6048.
- Ming XF, Stoecklin G, Lu M, Looser R and Moroni C. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 5778-5789.
- Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M and Tollervey D. (1997). *Cell*, **91**, 457-466.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S and Hayaishi O. (1976). *J Biol Chem*, **251**, 2629-2636.
- Miyazawa K, Mori A, Miyata H, Akahane M, Ajisawa Y and Okudaira H. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 24832-24838.
- Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W and Arkinstall S. (1996a). *J Biol Chem*, **271**, 4319-4326.

- Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, Davies K, Ashworth A and Arkinstall S. (1996b). *J Biol Chem*, **271**, 27205-27208.
- Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS and Wilusz J. (2002). *EMBO J*, **21**, 165-174.
- Müller-Decker K, Scholz K, Marks F and Furstenberger G. (1995). *Mol Carcinog*, **12**, 31-41.
- Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M and Mantovani A. (1998). *J Exp Med*, **187**, 2097-2101.
- Narisawa T, Sato M, Tani M, Kudo T, Takahashi T and Goto A. (1981). *Cancer Res*, **41**, 1954-1957.
- Narko K, Ristimäki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC and Hla T. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 21455-21460.
- Nelson C, Rigel D, Smith S, Swanson N and Wolf J. (2004). *J Drugs Dermatol*, **3**, 401-407.
- O'Banion MK, Winn VD and Young DA. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4888-4892.
- Obata T, Brown GE and Yaffe MB. (2000). *Crit Care Med*, **28**, N67-N77.
- Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I and Suda T. (1996). *J Immunol*, **156**, 758-764.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF and Taketo MM. (1996). *Cell*, **87**, 803-809.
- Pages G, Berra E, Milanini J, Levy AP and Pouyssegur J. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 26484-26491.
- Pan CX, Loehrer P, Seitz D, Helft P, Juliar B, Ansari R, Pletcher W, Vinson J, Cheng L and Sweeney C. (2005). *Oncology*, **69**, 63-70.
- Park GY and Christman JW. (2006). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**, L797-L805.
- Peng SS, Chen CY, Xu N and Shyu AB. (1998). *EMBO J*, **17**, 3461-3470.
- Pentland AP and Needleman P. (1986). *J Clin Invest*, **77**, 246-251.
- Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KN and Han R. (1999). *Carcinogenesis*, **20**, 1939-1944.
- Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T and Wulf HC. (2000). *J Photochem Photobiol B*, **59**, 123-131.
- Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C and Pittelkow MR. (1999). *J Invest Dermatol*, **112**, 751-756.

- Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ and Pamukcu R. (1997). *Cancer Res*, **57**, 2909-2915.
- Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 7420-7426.
- Raingaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B and Davis RJ. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 1247-1255.
- Rana A, Gallo K, Godowski P, Hirai S, Ohno S, Zon L, Kyriakis JM and Avruch J. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 19025-19028.
- Ravanat JL, Douki T and Cadet J. (2001). *J Photochem Photobiol B*, **63**, 88-102.
- Reddy BS, Maruyama H and Kelloff G. (1987). *Cancer Res*, **47**, 5340-5346.
- Ridley SH, Dean JL, Sarsfield SJ, Brook M, Clark AR and Saklatvala J. (1998). *FEBS Lett*, **439**, 75-80.
- Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T and Hla T. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 11769-11775.
- Ristimaki A, Narko K and Hla T. (1996). *Biochem J*, **318 (Pt 1)**, 325-331.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T and Nebreda AR. (1994). *Cell*, **78**, 1027-1037.
- Rouzer CA and Marnett LJ. (2003). *Chem Rev*, **103**, 2239-2304.
- Sachs A. (1990). *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 1092-1098.
- Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP and Ley SC. (1996). *EMBO J*, **15**, 817-826.
- Samet JM, Fasano MB, Fonteh AN and Chilton FH. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 8044-8049.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M and Hla T. (1995). *Cancer Res*, **55**, 3785-3789.
- Schaeffer HJ and Weber MJ. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 2435-2444.
- Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H and Hla T. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 25227-25233.
- Simmons DL, Botting RM and Hla T. (2004). *Pharmacol Rev*, **56**, 387-437.
- Snipes JA, Kis B, Shelness GS, Hewett JA and Busija DW. (2005). *J Pharmacol Exp Ther*, **313**, 668-676.

- Souza RF, Shewmake K, Pearson S, Sarosi GA, Jr., Feagins LA, Ramirez RD, Terada LS and Spechler SJ. (2004). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **287**, G743-G748.
- Stasinopoulos I, O'Brien DR, Wildes F, Glunde K and Bhujwala ZM. (2007). *Mol Cancer Res*, **5**, 435-442.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK and Levin B. (2000). *N Engl J Med*, **342**, 1946-1952.
- Stoecklin G, Ming XF, Looser R and Moroni C. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 3753-3763.
- Suarez-Cuervo C, Merrell MA, Watson L, Harris KW, Rosenthal EL, Väänänen HK and Selander KS. (2004). *Clin Exp Metastasis*, **21**, 525-533.
- Sully G, Dean JL, Wait R, Rawlinson L, Santalucia T, Saklatvala J and Clark AR. (2004). *Biochem J*, **377**, 629-639.
- Sun Y and Sinicrope FA. (2005). *Mol Cancer Ther*, **4**, 51-59.
- Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT and Sinicrope FA. (2002). *Cancer Res*, **62**, 6323-6328.
- Takekawa M, Posas F and Saito H. (1997). *EMBO J*, **16**, 4973-4982.
- Tanoue T, Moriguchi T and Nishida E. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 19949-19956.
- Thompson HJ, Briggs S, Paranka NS, Piazza GA, Brendel K, Gross PH, Sperl GJ, Pamukcu R and Ahnen DJ. (1995). *J Natl Cancer Inst*, **87**, 1259-1260.
- Thun MJ, Henley SJ and Patrono C. (2002). *J Natl Cancer Inst*, **94**, 252-266.
- Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, Lee CA, Spalding J, Sessoms A, Dunson DB, Rogan EG, Morham SG, Smart RC and Langenbach R. (2002). *Cancer Res*, **62**, 3395-3401.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1979). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trifan OC and Hla T. (2003). *J Cell Mol Med*, **7**, 207-222.
- Trifan OC, Smith RM, Thompson BD and Hla T. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 34141-34147.
- Tsujii M and DuBois RN. (1995). *Cell*, **83**, 493-501.
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M and DuBois RN. (1998). *Cell*, **93**, 705-716.
- Tyrrell RM. (1996). *Bioessays*, **18**, 139-148.
- van der Donk WA, Tsai AL and Kulmacz RJ. (2002). *Biochemistry*, **41**, 15451-15458.
- van Hoof A and Parker R. (1999). *Cell*, **99**, 347-350.

- van Laethem A, Nys K, van Kelst S, Claerhout S, Ichijo H, Vandenheede JR, Garmyn M and Agostinis P. (2006). *Free Radic Biol Med*, **41**, 1361-1371.
- Vane JR. (1971). *Nat New Biol*, **231**, 232-235.
- von Montfort C, Fernau NS, Beier JJ, Sies H and Klotz LO. (2006). *Free Radic Biol Med*, **41**, 1478-1487.
- Walenga RW, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R and Statt C. (1996). *Prostaglandins*, **52**, 341-359.
- Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N and Gorospe M. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 760-769.
- Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M and Yao Z. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 23668-23674.
- Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K and Martin MU. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 7727-7731.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB and Johnson GL. (1999). *Physiol Rev*, **79**, 143-180.
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK and DuBois RN. (2000). *J Clin Invest*, **105**, 1589-1594.
- Wilson KP, McCaffrey PG, Hsiao K, Pazhanisamy S, Galullo V, Bemis GW, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Murcko MA and Su MS. (1997). *Chem Biol*, **4**, 423-431.
- Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Müller M, Gaestel M, Resch K and Holtmann H. (1999). *EMBO J*, **18**, 4969-4980.
- Xu K and Shu HK. (2007). *Cancer Res*, **67**, 6121-6129.
- Xu N, Chen CY and Shyu AB. (1997). *Mol Cell Biol*, **17**, 4611-4621.
- Xu Y, Voorhees JJ and Fisher GJ. (2006). *Am J Pathol*, **169**, 823-830.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA and Worley PF. (1993). *Neuron*, **11**, 371-386.
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E and Matsumoto K. (1995). *Science*, **270**, 2008-2011.
- Yanase H, Ando H, Horikawa M, Watanabe M, Mori T and Matsuda N. (2001). *Pigment Cell Res*, **14**, 103-109.
- Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY and Baltimore D. (1997). *Cell*, **89**, 1067-1076.

Yang X, Wang W, Fan J, Lal A, Yang D, Cheng H and Gorospe M. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 49298-49306.

Yokoyama C and Tanabe T. (1989). *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 888-894.

Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL and Lee JC. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 12116-12121.

Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ and Bokoch GM. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 23934-23936.

Zhang Y, Dong Z, Nomura M, Zhong S, Chen N, Bode AM and Dong Z. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 20913-20923.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ak	Antikörper
AP	<i>activator protein</i>
ARE	AU-reiche Elemente
ASK	<i>apoptosis signal-regulating kinase</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
AUF	ARE/poly(U)-binding/degradation Factor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-fos	<i>V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
COX	Cyclooxygenase
CR	<i>conserved region</i>
CRE	<i>cyclic AMP response element</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element-binding protein</i>
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
Elk	<i>Ets-like gene</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinasen
Ets	<i>V-ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog</i>
FCS	Fötales Kalbserum (<i>fetal calf serum</i>)
GADD	<i>growth arrest and DNA damage</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBGF	<i>Heparin-binding (Acidic Fibroblast) Growth Factor</i>
HSF	<i>heat shock transcription factor</i>
HuR	Hu Antigen R
HWZ	Halbwertszeit
hVH	<i>homologue of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone</i>
Il	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP	MAPK-aktivierte Protein-Kinase
Max	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog-associated factor X</i>
MEF	<i>myocyte enhancer factor</i>
MKK	MAPK-Kinase
MKKK	MKK-Kinase
MKP	MAPK-Phosphatase
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PABP	Poly-(A)-bindendes Protein
PAC	<i>procaspase activating compound</i>
PAK	p21-aktivierte Kinasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

7. Abkürzungsverzeichnis

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SAP	„switch“- <i>independent-1-associated protein</i>
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SCC	spindelzelliges Plattenepithelkarzinom
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Tristetraprolin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UV	ultraviolettes Licht
UTR	untranslatierte Region
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen
w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen

8. Danksagung

Herrn Professor Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich dafür, dass er mir dieses spannende Projekt anvertraut hat, insbesondere aber auch dafür, dass er mich in die Arbeit eingewiesen hat und permanent bei fachlichen Problemen zur Verfügung stand bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies und Herrn Professor Dr. Krutmann für die Bereitstellung der Arbeitsplätze.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Stefanie Galbàn für ihr stetiges Engagement bei meiner Einarbeitung und ihre freundliche Begleitung in den ersten Forschungsjahren.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klotz sowie den anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie des Institutes für umweltmedizinische Forschung Düsseldorf möchte ich danken für das außerordentlich angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei fachlichen Fragen.

Darüber hinaus gilt mein Dank besonders meinen Laborkollegen Christiane Sobieroy und den Assistentinnen Andrea Borchard und Elisabeth Sauerbier für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinen Freunden und meiner Familie für die stete Unterstützung in allen Belangen.