

**DER EINFLUSS DES
ARYLHYDROCARBON-
REZEPTORS AUF DEN
CIRCADIANEN RHYTHMUS**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Roland Pfeiffer

aus Riesa

Düsseldorf, Juni 2011

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

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

Referent: Prof. Dr. Ellen Fritsche

Koreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

A INHALTSVERZEICHNIS

<i>1</i>	<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1	Die PAS-Protein-Familie	1
1.2	Der Arylhydrocarbon Rezeptor	2
1.3	Der circadiane Rhythmus	6
1.4	Die Haut	11
1.5	UV-Strahlung	12
1.6	Die DNS-Reparatur von UV-Schäden	13
<i>2</i>	<i>Fragestellung</i>	<i>16</i>
<i>3</i>	<i>Methoden</i>	<i>17</i>
3.1	Material	17
3.2	Methoden	17
<i>4</i>	<i>Ergebnisse</i>	<i>34</i>
4.1	Synchronisation der HaCaT-Keratinocyten mittels Serumschock	34
4.2	Circadiane Genexpression von Bmal1 und Per1 in synchronisierten HaCaT-Keratinocyten	36
4.3	Einfluss des AhR auf den circadianen Rhythmus	40
4.4	Expressionsverhalten nach aktivierung des AhR mit 3-Methylcholanthren	47
4.5	Analyse des Einflusses verschiedener Signalkaskaden auf den circadianen Rhythmus mittels Inhibitoren	50
4.6	Charakterisierung von Bmal1-defizienten HaCaT-Keratinocyten	53
4.7	Analyse des circadianen Rhythmus mittels Real-Time-Luciferase-Assay	61
4.8	Untersuchung der circadianen Expression von DNS-Reparatur genen in HaCaT-Keratinocyten	66
4.9	Bestimmung der Zellviabilität von Bmal1-defizienten HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung	70
4.10	Untersuchung der circadianen Abhängigkeit der Reparatur von DNS-Strangbrüchen nach UVB-Bestrahlung	72
4.11	Auswirkung der UVB-Bestrahlung auf die Expression von Bmal1, Per1, Cyp1A1 und Cox2	77
<i>5</i>	<i>Diskussion</i>	<i>80</i>

5.1	Expression und Synchronisation circadianer Gene in HaCaT-Keratinocyten	81
5.2	Interaktion des AhR mit der circadianen Uhr in HaCaT-Zellen	83
5.3	Einfluss des circadianen Rhythmus auf die Reparatursysteme der Haut	87
6	<i>Zusammenfassung</i>	93
7	<i>Summary</i>	94
8	<i>Anhang</i>	95
8.1	Material	95
8.2	Literaturverzeichnis	103

B ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-APB	2-Aminoethyl-Diphenylborinat
AHR	<i>Arylhydrocarbon-Rezeptor</i>
AHRR	<i>Arylhydrocarbon receptor repressor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	<i>Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BisIX, Bis9	Bisindolylmaleimid IX
Bmal1	<i>Brain and muscle arnt like 1</i>
BPIQII	8-[(3-Bromophenyl)amino]-1H-imidazo[4,5-g]-quinazolin
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNS	Komplementäre DNS
Clock	<i>Circadian locomotor output cycles protein kaput</i>
Col3A1	Collagen α -1(III)-Kette
Cox2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
Cry	<i>Cryptochrome</i>
Cyp	<i>Cytochrome P450 Monooxygenase</i>
DBP	<i>Albumin D-element-binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	<i>Dulbecco's modified Earl's Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E4BP4	<i>E4 promotor binding protein 4</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
IDV	<i>Integrated density value</i>
IL-12	Interleukin-12
IP3	Inositoltriphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
mRNS	Boten-RNS („messenger“ RNS)
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Per	<i>Period</i>
PSI	Proteasome Inhibitor 1
Rev-Erb- α	<i>v-erba-related protein Ear-1</i>
RIPA	Radio-Immunopräzipitations Assay
RNS	Ribonukleinsäure
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RPA	<i>Replication factor A</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNS	<i>small hairpin RNS</i>
siRNS	<i>Small interfering RNS</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	<i>General Transkriptionfaktor II H</i>
TIMP	Metalloproteinase Inhibitor
tRNS	Transfer-RNS
UVB	Ultraviolette Strahlung B
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group A</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group C</i>
XRE	<i>Xenobiotic responsive element</i>

1 EINLEITUNG

Jeder Organismus steht in der direkten Interaktion mit seiner Umwelt. Er muss sich dabei den ständig wechselnden Bedingungen anpassen, um seine Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Effizienz der Anpassung an die Umwelt wird dabei der evolutionären Selektion unterworfen und ständig perfektioniert. Auch die molekularen Signalwege der einzelnen Zellen haben sich im Laufe von Millionen von Jahren den Veränderungen ihrer Umgebung angepasst. Einer der bedeutendsten und konstantesten Umwelteinfluss auf unseren Planeten ist der durch die Erdrotation hervorgerufene, tägliche Wechsel der Sonneneinstrahlung; der circadiane Rhythmus. Dieser Rhythmus und die molekulare Interaktion der Zellen mit ihm, ist die Basis der in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen

1.1 DIE PAS-PROTEIN-FAMILIE

Die Mitglieder der PAS-Proteinfamilie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer sogenannten PAS-Domäne aus. Diese ist nach den Proteinen *Period* (Per), *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (Arnt) und *Single-minded* (Sim) benannt, in welchen die charakteristischen zwei 70 Aminosäuren langen Sequenzen innerhalb eines 250 bis 300 Aminosäure großen Bereichs erstmalig entdeckt wurden [Reddy et al., 1984; Crews et al., 1988; Hoffman et al., 1991]. Abbildung 1 zeigt beispielhaft den strukturellen Aufbau eines Fragments solch einer murinen PAS-Domäne.

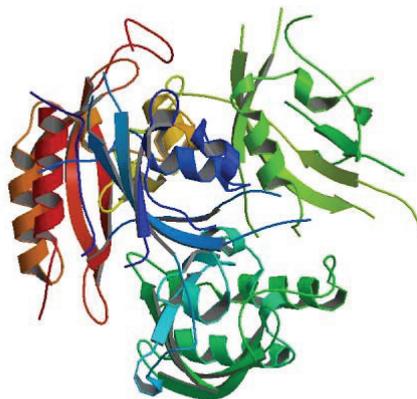


Abbildung 1 Kristallstruktur des PAS-Domänen Fragments der Maus: aus [Hennig et al., 2009], <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3GDI>.

PAS Domänen wurden in Proteinen aller Spezies gefunden. Diese Proteine haben die unterschiedlichsten Funktionen. So werden durch PAS-Proteine zum Beispiel der in dieser Arbeit untersuchte molekulare circadiane Rhythmus reguliert, sowie die Anpassung der Metabolisierung xenobiotischer Substanzen geregelt. Die PAS-Proteine bilden dabei über die PAS-Domäne untereinander verschiedene Homo- und Heterodimere. Über diese Proteininteraktionen können unterschiedliche Signalwege miteinander verknüpft werden. Damit bildet die Familie der PAS-Proteine ein essentielles Netzwerk der Zelle, um auf verschiedenste Umwelteinflüsse reagieren zu können. Dies erklärt auch die hohe Konservierung der Proteinfamilie innerhalb des Tierreichs. Die einzelnen Interaktionen der PAS-Proteine sind bis heute noch nicht gänzlich bekannt und somit noch immer Bestandteil aktueller Forschung. Einen detaillierten Einblick in die Funktion der PAS-Proteine ist den Rezensionen [McIntosh et al., 2010; Zhulin et al., 1997; Gu et al., 2000] zu entnehmen.

1.2 DER ARYLHYDROCARBON REZEPTOR

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) gehört ebenfalls zur Gruppe der PAS-Proteine [Burbach et al., 1992; Nguyen and Bradfield C. A., 2008]. Er ist jedoch, im Gegensatz zu den anderen PAS-Proteinen, ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor. Eine ausführliche Übersicht über den AhR lieferte Beischlag *et al.* [Beischlag et al., 2008]. Der Rezeptor wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Wirkungsweise des persistenten Umweltschadstoffs 2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-p-dioxin (Dioxin, TCDD) entdeckt [Fernandez-

Salguero et al., 1996]. Dioxin ist eine vom Menschen generierte Chlorverbindung, die als Verunreinigung des Entlaubungsmittels Agent Orange im Vietnamkrieg und bei der Sevesokatastrophe 1976 bekannt geworden ist. Erst kürzlich trat es wieder als Kontamination von Tierfutter in Deutschland erneut in den Blickpunkt der Medien.

Als erst durch den Menschen verbreiteter Umweltschadstoff ist die Kontamination mit Dioxin, naturgeschichtlich betrachtet ein zu junges Ereignis, um die hohe evolutionäre Konservierung des AhR zu begründen. Die eigentliche endogene Funktion des AhR lässt sich daher allein mit der Dioxinbindung nicht erklären. Während der Suche nach dem endogenen Liganden des AhR wurden eine Vielzahl endogener und exogener Substanzen mit einer großen strukturellen Breite als AhR Liganden entdeckt [Nguyen and Bradfield C. A., 2008]. Die Strukturformeln der in dieser Arbeit erwähnten AhR-Liganden sind in Abbildung 2 dargestellt.

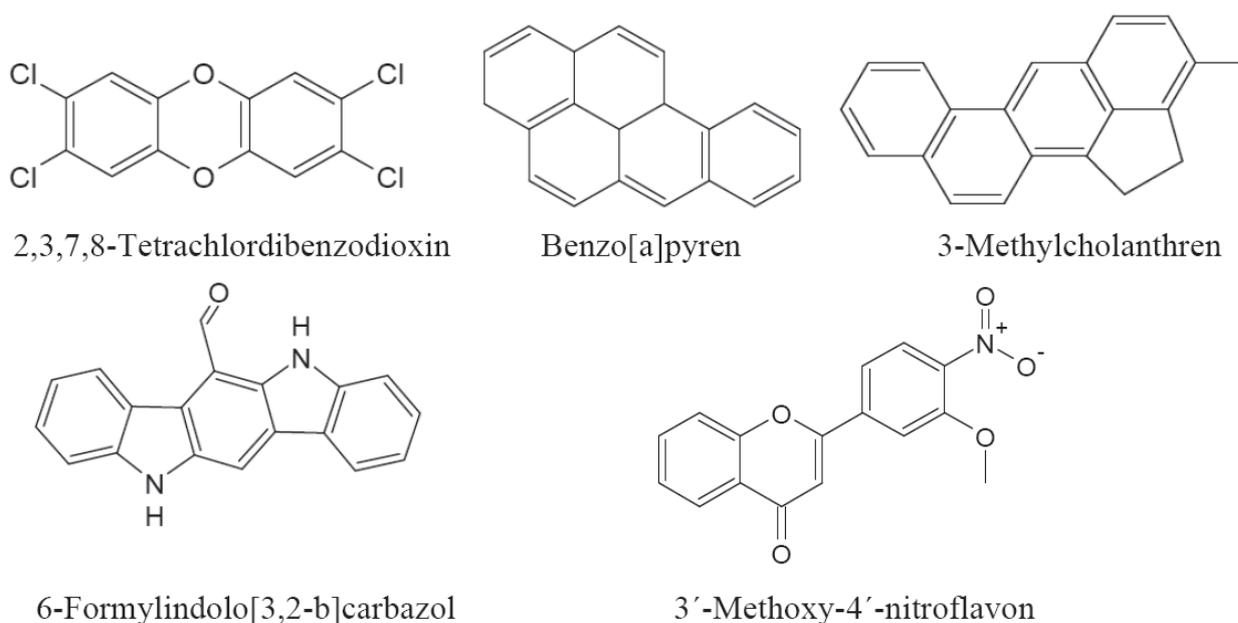


Abbildung 2 Strukturformel der in dieser Arbeit verwendeten AhR Liganden

1.2.1 Der AhR als Transkriptionsfaktor

Der inaktive AhR liegt im Cytoplasma in einem Proteinkomplex vor. In diesem Komplex sind die Hitzeschockproteine Hsp90 als Dimer mit p23, Ara9 und der Proteinkinase pp60-c-src an den AhR assoziiert [Wilhelmsson et al., 1990; Denis et al., 1988; Kazlauskas et al., 2000; Kazlauskas et al., 1999; Enan and Matsumura F., 1996]. Bindet ein Ligand an den AhR wird das nukleäre Lokalisations-Signal (NLS) des AhR durch Phosphorylierung aktiviert und der

Proteinkomplex wandert in den Zellkern. Dort trennt sich der Proteinkomplex auf und das bHLH-PAS-Protein ARNT (*Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*) dimerisiert mit dem AhR. Dieses Heterodimer agiert mit Hilfe einer Reihe von Co-Aktivatoren als Transkriptionsfaktor, bindet an das XRE (*Xenobiotic response element*)-Motiv der DNS und aktiviert die Expression verschiedener Gene. In Abbildung 3 ist schematisch der Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung durch den AhR dargestellt. Gut untersucht ist die Aktivierung von Genen des Fremdstoffmetabolismus, darunter zum Beispiel *Cytochrom P450 (CYP)1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *GST YA*, *UGT 1A1* und *UGT 1A6* [Gielen and Nebert D. W., 1971; Gielen et al., 1972; Quattrochi and Tukey R. H., 1989; Quattrochi et al., 1994; Zhang et al., 1998; Yueh et al., 2003; Lindros et al., 1998].

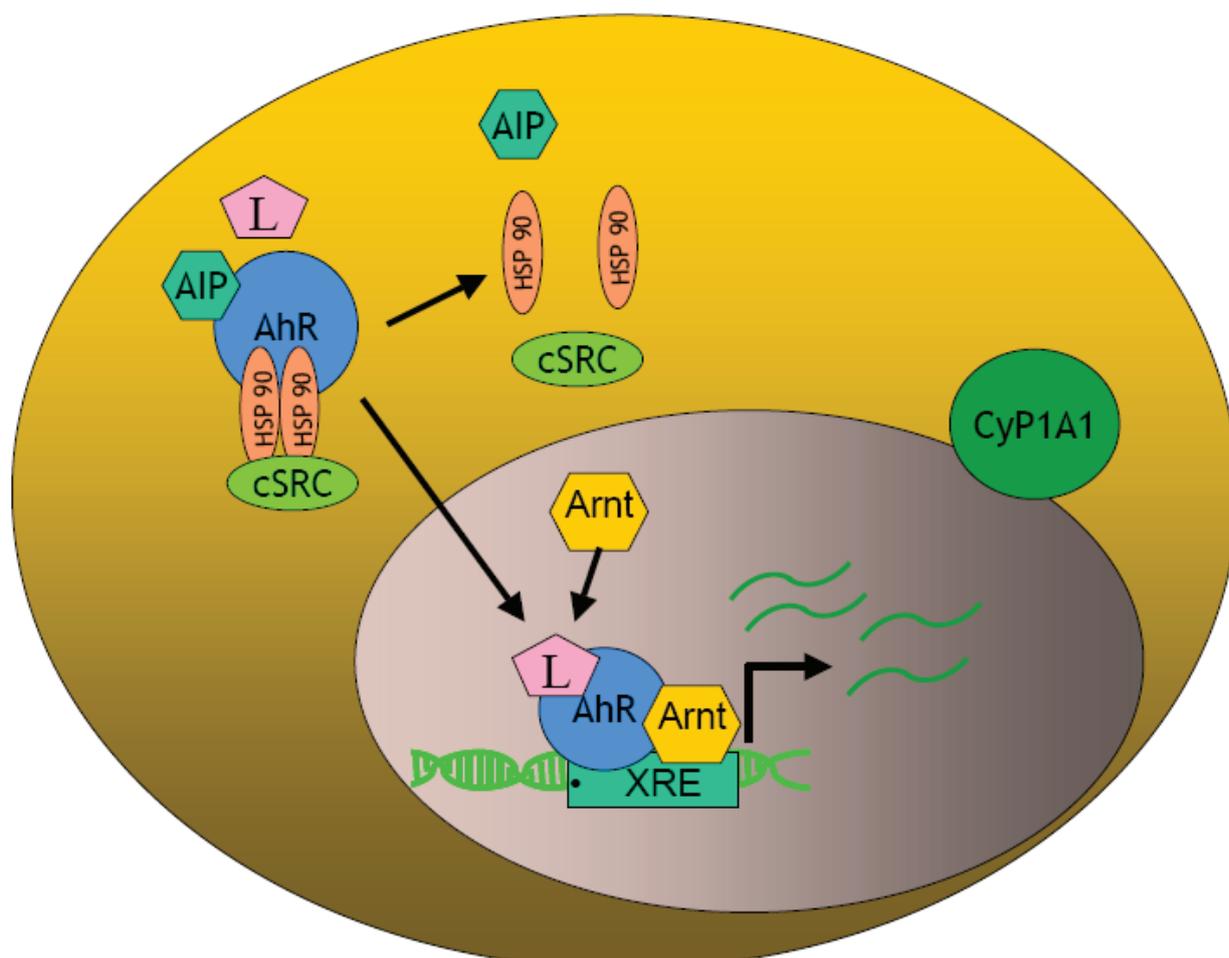


Abbildung 3 Schema des AhR-Signalwegs: Der AhR liegt im Cytoplasma in einem Multiproteinkomplex mit den Heatshock-Proteinen HSP90 und AIP und der c-src-Kinase vor. (L = Ligand; XRE = *Xenobiotic response element*)

1.2.2 Nicht-transkriptionelle Effekte der AhR-Aktivierung

Neben der klassischen Funktion als Transkriptionsfaktor ist der AhR auch in nicht direkt transkriptionelle Signalwege, nämlich in Phosphorylierungskaskaden, involviert. So wird durch Ligandenbindung an den AhR die mit dem AhR assoziierte, cytoplasmatische pp60-c-src-Kinase durch Freisetzung aktiviert [Enan and Matsumura F., 1996]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung des AhR durch UV-B Strahlung eine Phosphorylierungskaskade initiiert wird, die über die c-src-Kinase zu einer Aktivierung des EGFR mit nachfolgender Stimulierung der Phosphorylierung von ERK führt. Dieses zieht schließlich die transkriptionelle Induktion einer Reihe von Genen, unter anderem der *Cyclooxygenase (COX)2*, nach sich [Fritsche et al., 2007].

Der Bindungspartner ARNT dimerisiert nicht nur mit dem AhR sondern auch mit weiteren PAS-Proteinen. So ist er als Bindungspartner für den *Hypoxie-inducible factor 1 α* essentiell. Spekuliert wird, ob der AhR kompetitiv mit den Hif 1 α um die Bindungsstellen konkurriert. [Wang et al., 1995; Jiang et al., 1996]

Sehr intensiv ist auch die Wechselwirkung des AhR mit den Estrogenrezeptoren untersucht worden [Swedenborg and Pongratz I., 2010]. Der aktivierte AhR kann dabei gewebsspezifisch sowohl östrogene als auch antiöstrogene Wirkungen entfalten [Swedenborg and Pongratz I., 2010]. Die Aktivierung sorgt für eine Assoziation mit den Estrogenrezeptoren [Beischlag and Perdew G. H., 2005; Matthews et al., 2005; Ohtake et al., 2003; Ohtake et al., 2007]. Dies geschieht wie Ohtake *et al.* herausfanden über den CUL4B/DDB1/Rbx1-Komplex [Ohtake et al., 2007; Ohtake et al., 2008]. In dieser Funktion veranlasst die Aktivierung des AhR den proteasomalen Abbau des Estrogenrezeptors [Ohtake et al., 2007], des Androgenrezeptors [Ohtake et al., 2008; Ohtake et al., 2009], von β -Catenin [Kawajiri et al., 2009] und des AhR selbst [Ohtake et al., 2007].

Neben den direkten molekularen Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren kommt es nach Dioxin-Vergiftung auch zu vielfältigen Störungen des Hormonsystems. Diese können Symptome in anderen Organen und Zelltypen bewirken, ohne dass der AhR-Signalweg dort direkt aktiviert wird. Diese Problematik ist insbesondere zu beachten, wenn Ergebnisse aus Tierversuchen oder epidemiologische Studien auf Laborexperimente übertragen werden sollen. Nach Dioxin-Belastung kommt es zu veränderten Konzentrationen von Thyroxin [Viluksela et al., 2004], Estrogen, FSH, LH, Melatonin [Pohjanvirta et al., 1989], Cortisol [Abbott et al., 1994] und Prolactin [Jones et al., 1987].

1.2.3 Der AhR und UV-Strahlung

1983 beobachtete Goerz *et. al.* [Goerz et al., 1983], dass die Bestrahlung mit UV-Licht die Arylhydrocarbon Hydroxylaseaktivität in der Leber von Mäusen. Auf der Suche nach dem verantwortlichen Photoprodukt konnte die Arbeitsgruppe Rannug [Rannug et al., 1987] nachweisen, dass durch UV-generierte Photoprodukte für die AhR-Aktivierung verantwortlich sind. Als ein sehr effizienter Induktor konnte später in der selben Arbeitsgruppe [Wei et al., 1998] das Tryptophan-Dimer 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) ausgemacht werden. Sie konnten auch zeigen, dass dieses Dimer für die UV-abhängige CYP1A1-Induktion [Wei et al., 1999] und für die Induktion durch das Zellkulturmediums [Oberg et al., 2005] verantwortlich ist. Unsere Arbeitsgruppe [Fritsche et al., 2007] konnte mit AhR defizienten HaCaT-Keratinocyten zeigen, dass der AhR-Signalweg wesentlich zur UVB-vermittelten Stressantwort beiträgt. Erstmals konnte die Bildung von FICZ in HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung nachgewiesen werden. Nicht nur die CYP1A1 Expression in der Haut wird so durch UVB AhR-abhängig moduliert, sondern auch die COX-2 Expression wird über die Aktivierung der scr-Kinase in den HaCaT wildtyp Zellen stärker aktiviert als in den AhR defizienten Zellen.

1.3 DER CIRCADIANE RHYTHMUS

Der tägliche Wechsel von Tag und Nacht ist einer der bedeutendsten Umwelteinflüsse in der Natur. Nahezu jedes Lebewesen ist diesem Rhythmus ausgesetzt und hat sich daran angepasst. Der Zeitgeber dabei ist das Sonnenlicht.

Säugetiere nehmen die Lichtinformationen des Tag-Nachtrhythmus hauptsächlich über die Netzhaut der Augen wahr. Erst vor kurzen konnte im Zusammenhang mit der Steuerung des endogenen circadianen Rhythmus bei Säugetieren ein neuer Typus von Melanopsin-Rezeptoren im Auge entdeckt werden [Provencio et al., 2000]. Diese detektieren auch noch schwache Lichtinformationen und steuern den circadianen Rhythmus. Über den *nervus opticus* werden diese Informationen zu einem speziellen Areal des Gehirns, dem suprachiasmatischen Nucleus (SCN), weitergeleitet. Eine umfangreiche Übersicht zur circadianen Regulation im suprachiasmatischen Nucleus findet sich bei Welsh *et al.* [Welsh et al., 2010]. Der suprachiasmatische Nucleus sitzt direkt über der Kreuzung der beiden Sehnerven. Wird dieser Bereich beschädigt, verliert das Tier seine circadiane Aktivität [Ralph

et al., 1990]. Der suprachiasmatische Nukleus synchronisiert über neurale und humorale Signalwege den circadianen Rhythmus der peripheren Organe. Erst vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass der circadiane Rhythmus in Säugetieren auch unabhängig vom Lichteinfall funktioniert. Werden Ratten nur zu einer bestimmten Uhrzeit gefüttert, so passt sich ein Teil der circadianen Rhythmen unabhängig von der Lichteinstrahlung diesem Rhythmus an [Damiola et al., 2000]. Auch Temperaturschwankungen können die circadianen Rhythmen synchronisieren [Buhr et al., 2010]

1.3.1 Die Molekulare Uhr

Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr ist im Tierreich hoch konserviert. Homologe Proteine der sogenannten Clock-Gen-Familie wurden bei so verschiedenen Vertretern wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Zebrafisch *Danio rerio*, der Hausmaus *Mus musculus* und dem Menschen *Homo sapiens* entdeckt. Ein guter Vergleich zwischen der molekularen Organisation des circadianen Rhythmus in den unterschiedlichen Organismen ist in der Übersichtsarbeit von Bell-Pedersen et al. [Bell-Pedersen et al., 2005] zu finden. Das Prinzip der Uhr beruht dabei auf positiven und negativen Rückkopplungsschleifen. Ein Schema der Interaktionen der wichtigsten Vertreter der Clock-Gen-Familie ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die positive Schleife der molekularen Uhr besteht aus den Bmal1- und Bmal2-Proteinen und ihren Bindungspartnern Clock [Gekakis et al., 1998] beziehungsweise NPAS2 [Reick et al., 2001]. Die Bmal-Proteine bilden mit Clock und NPAS2 Heterodimere, die in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren agieren. Sie binden an die E-Box-Elemente und aktivieren eine Vielzahl unterschiedlicher Gene [Hardin, 2004]. Unter diesen Genen befinden sich auch die Gruppe der PAS-Proteine *Period1/2/3* und die *Cryptochrome 1* und *2*. Die Period- und Cryptochrome-Proteine bilden wiederum Heterodimere [Vitaterna et al., 1999; Griffin, Jr. et al., 1999]. Diese Proteinkomplexe wandern wiederum in den Zellkern, binden an die DNS-gebundenen Bmal1-Clock/NPAS2-Komplexe und inhibieren deren Funktion. Die aktiven Proteine Period und Cryptochrome blockieren somit ihre eigene Transkription.

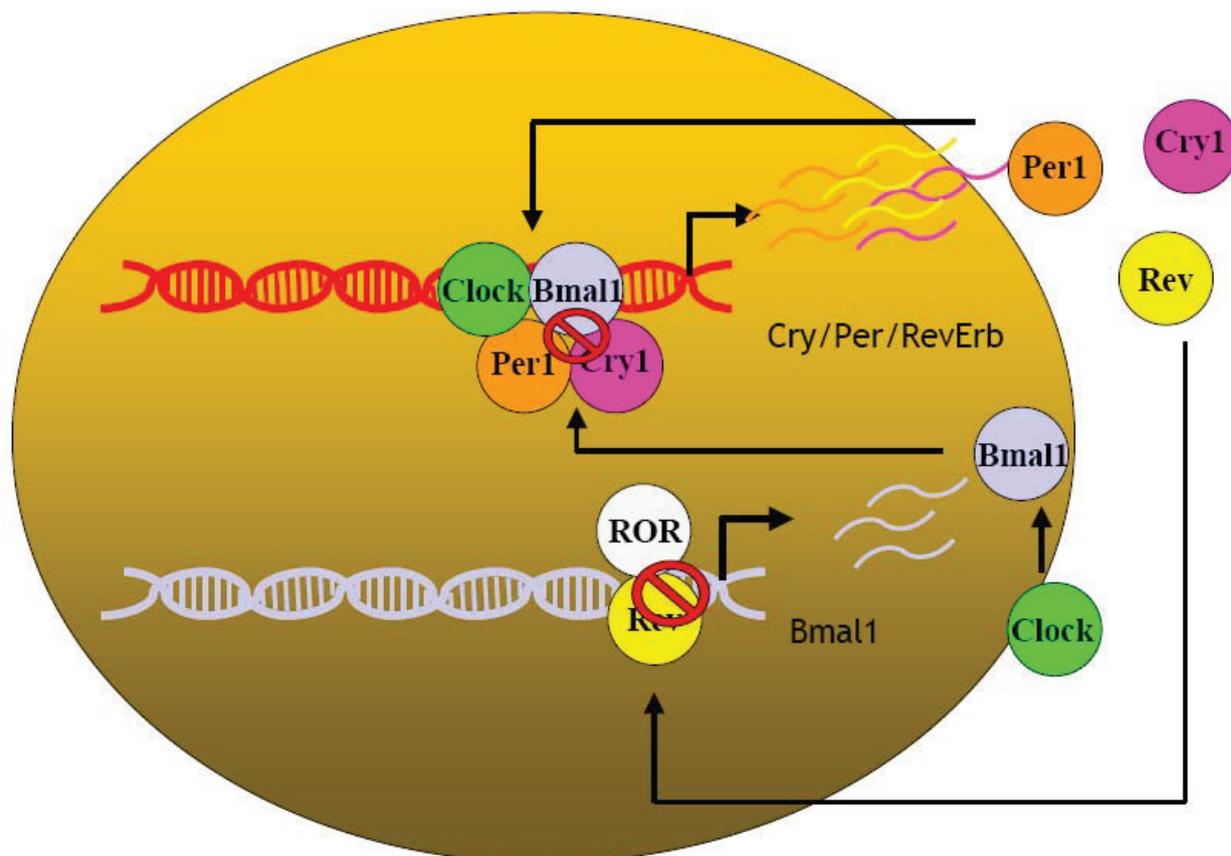


Abbildung 4 Schema der molekularen Uhr: Das Heterodimer aus Bmal1 und Clock bindet als Transkriptionsfaktor an E-Box-Elemente. Unter den induzierten Genen befinden sich auch die Gene der molekularen Uhr *Cryptochrome* (*Cry1*), *Period* (*Per1*) und *Rev-Erba* (*Rev*). *Cry1* und *Per1* bilden ein Heterodimer und inhibieren durch ihre Bindung an Bmal1 und Clock deren Aktivität und damit ihre eigene Expression. *Rev-Erba* konkurriert mit *ROR α* um die ROR-E-Bindungstelle. *Rev-Erba* wirkt dabei inhibierend auf die Expression von Bmal1.

Unter den von Bmal-Clock/NPAS2 aktivierten Genen befindet sich auch *Rev-Erba* [Preitner et al., 2002]. Dieses Protein konkurriert mit *ROR α* um die Bindung an das *ROR-binding element* (RORE) [Forman et al., 1994]. *ROR α* wirkt aktivierend auf die Transkription und *Rev-Erba* durch die Verdrängung von *ROR α* inhibierend [Guillaumond et al., 2005]. Da sich ein *ROR α* -Element auch im Promotorbereich von *Bmal1* befindet, inhibiert Bmal1 durch die Induktion der Transkription von *Rev-Erba* indirekt auch seine eigene Produktion [Preitner et al., 2002].

Die ständige Produktion von Proteinen und die eigene Inhibition der Transkription bewirken eine Oszillation auf mRNA- und Protein-Ebene dieser Regelkreisläufe. Diese Oszillation ist das molekulare Grundgerüst des circadianen Rhythmus. Um diese Oszillation auf eine Periodenlänge von 24 Stunden auszudehnen, sie gegenüber kurzzeitigen Schwankungen der Zell-Homöostase robust zu machen und gleichzeitig die erneute tägliche Synchronisation mit

dem Tagesrhythmus zu ermöglichen, sind umfangreiche posttranskriptionelle Modifikationen des circadianen Rhythmus notwendig.

1.3.2 Posttranskriptionelle Modifikationen

Eine exakte Regulierung des circadianen Rhythmus kann nicht alleinig durch Transkription gewährleistet werden. Auch die zelluläre Lokalisation der beteiligten Proteine, deren Aktivierung und Abbau partizipieren an diesem Prozess durch posttranskriptionelle Modifikationen. In den letzten 10 Jahren hat sich der Kenntnisstand über diese Mechanismen der Regulierung des circadianen Rhythmen erheblich verbessert.

Bei der Aktivierung, der Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern und für den Abbau der Proteine spielen Phosphorylierungen eine wesentliche Rolle. Dabei konnte die Interaktion einer Vielzahl von Proteinkinasen mit der circadianen Uhr belegt werden. Am gründlichsten sind die Interaktionen der Casein-Kinasen 1 und 2 dokumentiert. Die Casein-Kinasen phosphorylieren Bmal1 [Eide et al., 2002; Tamaru et al., 2009], Per1 [Takano et al., 2004; Vielhaber et al., 2000], Per2 [Eide et al., 2005; Maier et al., 2009; Tsuchiya et al., 2009], Per3 [Akashi et al., 2002] und Cry1 [Akashi et al., 2002; Eide et al., 2002]. Hauptsächlich wird durch die Phosphorylierung mit Casein-Kinasen die Wanderung in den Zellkern und der Abbau der Proteine induziert.

Eine weitere Kinase mit einem breiten Phosphorylierungsvermögen ist die GSK-3 β . Von GSK-3 β sind Interaktionen mit Clock [Spengler et al., 2009], Bmal1 [Sahar et al., 2010], Per2 [Iitaka et al., 2005] und Cry2 [Harada et al., 2005] belegt. Die Phosphorylierung bewirkt ähnlich wie bei den Casein-Kinasen die Degradation von Clock, Bmal1 und Cry2 und die nukleäre Lokalisation von Per2. Rev-Erb α hingegen wird durch GSK-3 β [Yin et al., 2006] stabilisiert.

Sanada [Sanada et al., 2004] konnte zeigen, dass Cry1 und Cry2 durch die Phosphorylierung durch MAPK/ERK in ihrer inhibitorischen Wirkung gehemmt werden. Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch eine inhibitorische Wirkung auf Bmal1 [Sanada et al., 2002].

Auch die Proteinkinasen PKA [Huang et al., 2007; Motzkus et al., 2007], PKC [Shim et al., 2007] und PKG [Tischkau et al., 2004] modulieren den circadianen Rhythmus.

Die Phosphorylierung der circadianen Proteine ist oftmals auch das Signal für den proteasomalen Abbau. 2007 konnte in mehreren unabhängigen Arbeiten [Godinho et al., 2007; Busino et al., 2007; Siepka et al., 2007] gezeigt werden, dass Fbxl3 Cry1 und Cry2 erkennt und sie für den proteasomalen Abbau markiert. Auch Bmal1 wird nach

Ubiquitinierung abgebaut, nachdem es durch GSK-3 β phosphoryliert wurde. Der proteasomale Abbau der Period-Proteine wird durch die Phosphorylierung durch Casein Kinasen eingeleitet.

Cardone et al. [Cardone et al., 2005] konnten zeigen, dass Bmal1 durch Sumoylierung modifiziert wird. Diese Modifizierung dient neben der Ubiquitinierung als Signal für den proteasomalen Abbau [Lee et al., 2008].

Neben der Phosphorylierung und dem proteasomalen Abbau wird der circadiane Rhythmus auch von einer Reihe von Signalmolekülen reguliert, deren Konzentration im Organismus oftmals selbst circadiane Schwankungen unterliegt.

Ein bedeutendes Signalmolekül ist NAD⁺. Es zeigt den metabolischen Status der Zellen an. Die Konzentration von NAD⁺ weist dabei im Organismus einen circadianen Rhythmus auf. [Nakahata et al., 2008; Nakahata et al., 2009]. NAD⁺ dient als Co-Substrat der Histondeacetylase [Bordone and Guarente L., 2005].

Dieses Enzym ist ein Gegenspieler der Histonacetyltransferase-Aktivität von Clock [Nakahata et al., 2008]. Clock selbst ist eine Histonacetyltransferase [Doi et al., 2006] und acetyliert unter anderem auch den Bindungspartner Bmal1 [Hirayama et al., 2007]. Der Kreis dieser Wechselwirkung wird durch die transkriptionelle Regulation der Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase, dem NAD⁺, generierenden Enzym, durch Bmal1/Clock geschlossen [Nakahata et al., 2009].

Ebenfalls großen Einfluss auf den circadianen Rhythmus hat der Botenstoff cAMP. Der circadiane Rhythmus der cAMP-Konzentration in verschiedenen Organen ist seit den 1970ern bekannt. Die molekulare Wechselwirkung mit Per1 konnte erst vor knapp 11 Jahren beschrieben werden [Motzkus et al., 2000; Yagita and Okamura H., 2000]. Über den cAMP-CREB-Protein-Signalweg wird auch die Lichtinformation in den suprachiasmatischen Nukleus übertragen [Tischkau et al., 2003].

Einige Proteine des circadianen Rhythmus können zudem Häm binden. Dioum et al. [Dioum et al., 2002] spekulierten, über die Funktion der Häm-Bindung von NPAS2 als Gas-abhängiger Transkriptionsfaktor. Auch bei Rev-Erba wurde eine Häm-Bindung [Ramakrishnan and Muscat G. E., 2006; Raghuram et al., 2007] gezeigt. In einer 2010 erschienen Arbeit von Ariola et al. [Ariola et al., 2010] wird die Spezifität der für Per2 in *in vitro*-Experimenten beschriebenen Häm-Bindung [Kitanishi et al., 2008] bestritten.

1.4 DIE HAUT

Die Haut stellt als Organ die Grenzschicht zwischen dem Organismus und seiner Umwelt dar. An dieser Grenze muss die Haut sehr unterschiedliche Funktionen erfüllen. Eine wichtige Funktion liegt in der Abschirmung des Organismus gegenüber Umwelteinflüssen, wie mechanischen Belastungen, ultravioletter (UV) Strahlung, Krankheitserregern und Toxinen. Diese Funktion lässt sich auch im Aufbau der Haut wiedererkennen. Für einen detaillierteren Einblick in Struktur und Aufbau der Haut siehe [Fritsch, 2004] oder ein anderes dermatologisches Lehrbuch.

Die oberste Schicht, die Epidermis, besteht aus mehreren Schichten Keratinozyten, welche in der untersten Zellschicht der Epidermis, der Basalschicht, generiert werden und sodann während ihrer Differenzierung an die Oberfläche wandern. Tote Keratinozyten, sogenannte Korneozyten, bilden dabei als Hornschicht die äußerste Barriere der Haut. Die ständige Generierung neuer Zellen schützt dabei die Haut vor persistierenden Schäden durch toxische Stoffe oder Strahlung. Zur Protektion gegenüber UV-Strahlung sind in der Basalschicht Melanin produzierende Melanozyten eingelagert [Tolleson, 2005]. Dieses Melanin ist ein dunkler Pigmentstoff, der von den Keratinozyten aufgenommen wird und die für die Zellen schädliche UV-Strahlung absorbiert. Auch Zellen des Immunsystems sind in der Epidermis vertreten. Spezielle dendritische Zellen, die Langerhans-Zellen, befähigen die Haut schon sehr rasch auf eindringende Krankheitserreger zu reagieren [Kaplan, 2010b; Kaplan, 2010a].

Unter der Epidermis liegt die Dermis. Deren Hauptbestandteil, die extrazelluläre Matrix, wird von den darin eingebetteten Fibroblasten gebildet. Dieses Bindegewebe besteht vor allem aus Kollagen. Diese Bindegewebsfasern sind sehr reißfest, dabei elastisch und sorgen für die mechanische Festigkeit der Haut. In der Dermis verlaufen auch die Blutkapillaren zur Versorgung der oberen Hautschichten.

Neben der Abgrenzung gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen muss die Haut noch weitere Aufgaben übernehmen. Als Grenzschicht ist sie auch als Sinnesorgan sehr wichtig. In der Haut sind Schmerz-, Druck-, Thermo- und Tastrezeptoren eingebettet [Birder and Perl E. R., 1994].

Die Haut dient als Oberflächenorgan auch der Wärmeregulation. Bei den Säugetieren haben sich dazu Haare als Hautanhangsgebilde entwickelt. Diese funktionieren zusätzlich zu der Fettschicht der Unterhaut als Wärmeisolation. Durch die Produktion von Schweiß in speziellen Schweißdrüsen kann die Körpertemperatur durch Verdunstung bei Überhitzung herunterreguliert werden.

Als weitere Drüsen lassen sich in der Haut Talgdrüsen finden. Sie halten Haare und Haut geschmeidig, indem sie den lipophilen Talg produzieren.

Neben all diesen genannten Funktionen ist die Haut und die Haare als deren Anhangsgebilde ein wichtiges Repräsentationsorgan in der Kommunikation zwischen Individuen derselben Spezies.

Der riesige Markt an Haut- und Haarpflegeprodukten zeigt, dass das Aussehen der Haut auch für den Menschen von wesentlicher Bedeutung ist.

1.5 UV-STRAHLUNG

Eine der wichtigsten Funktionen der Haut ist der Schutz vor UV Strahlung. Unter UV Strahlung versteht man elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen zwischen 1 nm und 380 nm. Sie liegt damit außerhalb des für das menschliche Auge sichtbaren Lichts. Der Wellenlängenbereich der UV-Strahlung wird nochmals unterteilt in UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) und UVC (100-280 nm) Strahlung. Diese drei Klassen von Strahlungswellenlängen penetrieren die Haut in unterschiedlichen Tiefen. Während UVA-Strahlung tief bis in die Dermis eindringt, wird UVB-Strahlung schon überwiegend in der Epidermis absorbiert. Im Gegensatz zu UVA- und UVB-Strahlung wird die UVC-Strahlung der Sonne schon in der Erdatmosphäre absorbiert und ist deshalb für den Menschen nur bei Exposition durch künstlich erzeugte Strahlenquellen von Bedeutung [Gasparro et al., 1998].

Die Energie von UV-A-Strahlung führt in der Haut vor allem zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen. Daher bewirkt eine chronische Exposition mit UV-A-Strahlung die Degradierung der extrazellulären Matrix durch die entstehenden reaktiven Moleküle. Solch eine Matrixdestruktion führt zu den klinischen Zeichen der Hautalterung, welche auch als extrinsische Hautalterung bezeichnet wird [Quan et al., 2009].

Bei der zellulären Wirkung von UVB-Strahlung ist neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und freien Radikalen vor allem die Wechselwirkung mit der DNS von Bedeutung. DNS absorbiert UVB-Strahlung, was zur Bildung von DNS-Photoprodukten, nämlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukten führt. Vor allem die CPD, weniger die 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte, werden für das Entstehen von UV-bedingtem Hautkrebs verantwortlich gemacht, da letztere in geringerem Maße erzeugt werden und wesentlich schneller abgebaut werden [Mitchell, 1988; Mitchell et al., 1985]. Zusätzlich können aber auch die durch UV-

Strahlung generierten reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikale zu Modifikationen der DNS und anderen Makromolekülen der Zelle führen.

Als erste Maßnahme gegen die Gefahren von UV-Strahlen besitzt die Haut mit den Melanozyten einen spezifischen Mechanismus zur Protektion gegenüber übermäßiger Strahlung (s.o.). Melanin ist dabei der wesentliche Faktor für die Hautfarbe des Menschen. An der Melaninexpression sind sowohl genetische als auch adaptive Prozesse beteiligt. So gibt es eine evolutionär entstandene Korrelation der Pigmentierung der Haut und der geografisch bedingten Intensität der UV-Strahlung. Aber auch die als Bräunungseffekt bekannte Induzierung der Melaninproduktion ist eine Anpassung an UV-Strahlung [Fischer et al., 2008; Slominski et al., 2005].

1.6 DIE DNS-REPARATUR VON UV-SCHÄDEN

Die durch die UV-Strahlung entstandenen DNS-Schäden der Haut müssen permanent repariert werden, da sie eine große Gefahrenquelle für den Organismus darstellen. Werden die Schäden nicht repariert, kann es zu Veränderungen des Genoms mit weitreichenden Folgen für die Zelle bis hin zur Entstehung von Tumoren kommen [Ichihashi et al., 2003].

Im Laufe der Evolution haben sich daher eine Reihe unterschiedlicher DNS-Reparatursysteme entwickelt. Man unterscheidet die direkte Reparatur, die Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur, die Doppelstrangreparatur und die Quer-Vernetzungsreparatur [Sancar et al., 2004].

Die direkte Reparatur ist in der Lage strahlungsinduzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Photoprodukte zu reparieren. Sie wird durch Photolyasen durchgeführt, eine im Tierreich weitverbreitete Enzymgruppe [Sancar, 2003]. Höhere Säugetiere, wie der Mensch, besitzen jedoch keine funktionellen Photolyasen [Sancar, 2003]. Interessanterweise existieren im Menschen jedoch homologe Proteine, die über eine sehr ähnlicher Struktur verfügen wie die Photolyasen, die am circadianen Rhythmus beteiligten Chryptochrome. [Sancar et al., 2000; Sancar, 2003; Sancar, 2004].

Die Basenexzisionsreparatur erkennt modifizierte Basen, schneidet diese heraus und hinterlässt abasische Stellen in der DNS. Diese Stellen werden von der AP-Endonuklease erkannt und entfernt. Die entstandene Lücke wird dann durch Polymerasen wieder aufgefüllt. Schäden der DNS, die nach UV-Strahlung durch ROS und freie Radikale hervorgerufen wurden, werden durch die Basenexzisionsreparatur repariert.

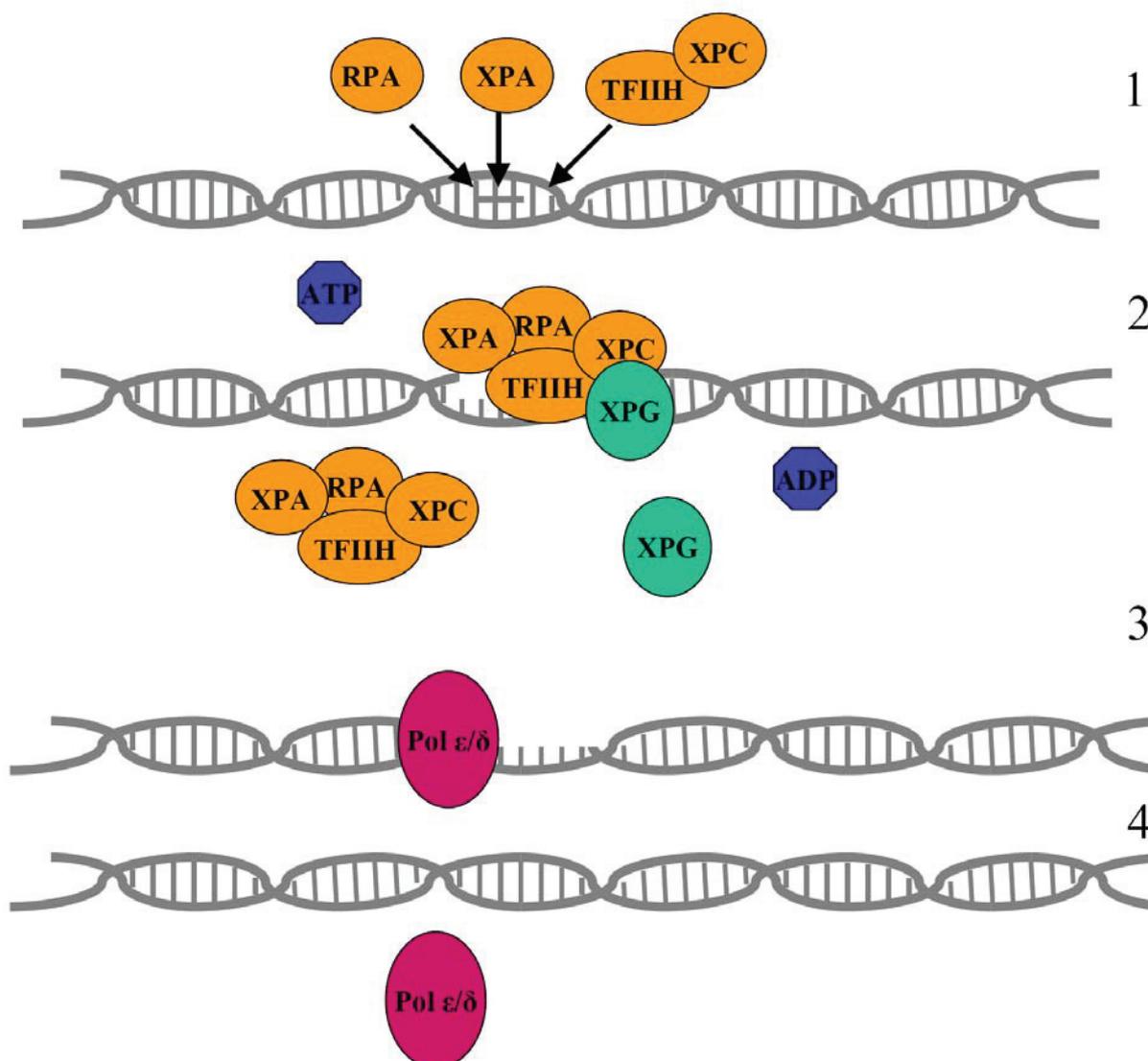


Abbildung 5 Nukleotidexzisionsreparatur: (1) Die Proteine RPA, XPA und der Komplex XPC-TFIIH erkennen DNS-Modifikationen und lagern sich daran an und entwenden die Doppelhelix an dieser Stelle. (2) Der Multienzymkomplex rekrutiert XPC und ein 24-32 Basen langes Oligomer wird um die DNS-Modifikation herum herausgeschnitten. (3 + 4) Die Polymerasen ϵ/δ erkennen diese Lücke und füllen den Strang wieder auf. Stark vereinfacht nach [Sancar et al., 2004].

Das für den Menschen wichtigste UV-Reparatursystem ist die Nukleotidexzisionsreparatur. Ihre Bedeutung zeigt sich unter anderem in der genetisch bedingten Krankheit *Xeroderma pigmentosum* [Cleaver, 1968]. Durch Chromosomenveränderungen kommt es bei dieser Krankheit zum Verlust essentieller Proteine der Nukleotidexzisionsreparatur. Sie äußert sich in schweren durch UV-Strahlung bedingten Hautschäden bis hin zum Hautkrebs. Unbehandelte Patienten werden selten älter als 10 Jahre. Die Nukleotidexzisionsreparatur erkennt und repariert CPD und (6-4)-Photoprodukte. In Abbildung 5 ist ein vereinfachter Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur dargestellt. Werden DNS-Modifikationen

durch die Reparaturfaktoren RPA, XPA oder XPC-TFIIH erkannt, lagert sich ein Multiproteinkomplex unter Verwendung von ATP an die DNS an. Als Folge wird bei Eukaryoten ein 24-32 Basen langes Oligomer um die veränderte DNS herausgeschnitten. Diese Lücke wird durch die in einem weiteren Proteinkomplex integrierte Polymerase ϵ/δ wieder geschlossen. Eine ausführliche Darstellung der Nukleotidexzisionsreparatur und der DNS Reparatur ist in einer Übersichtsarbeit von Sancar et al. [Sancar et al., 2004] zu finden. Die DNS-Doppelstrangbruchreparatur repariert UV-induzierte, ROS-abhängige Strangbrüche. Da UV-Strahlen keine Quervernetzungen von DNS-Strängen hervorrufen, spielt die Quervernetzungsreparatur bei UV-induzierten Schäden in der Haut eine eher untergeordnete Rolle.

2 FRAGESTELLUNG

Mit der Entdeckung der Aktivierbarkeit des AhR durch das Photoprodukt FICZ, wurde ein neuer licht-induzierter Signalweg entdeckt. Dieser Signalweg ist in der Lage selbst in lichtfernen Organen, wie der Leber Enzyminduktionen hervorzurufen.

Eine wichtige Aufgabe des Lichts ist es, den Tagesrhythmus der Lebewesen zu synchronisieren. Der circadiane Rhythmus wird dabei in fast jeder Zelle durch ein Netzwerk molekularer Wechselwirkungen von PAS-Proteinen wie Bmal1, Clock, Per und anderen Proteinen reguliert.

Der durch FICZ aktivierbare AhR und sein Bindungspartner Arnt gehören ebenfalls zur Gruppe der PAS-Proteine. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese besagt, dass durch eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den PAS-Domänen des AhR und der Proteine des circadianen Rhythmus, ein neuer lichtinduzierter Signalweg über die Aktivierung des AhR möglich ist.

In dieser Arbeit sollten dazu folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Ist der AhR an der Regulation des circadianen Rhythmus beteiligt?
- Welche Auswirkung hat die Aktivierung des AhR durch Liganden auf den circadianen Rhythmus?
- Ist dies Teil der UVB induzierten Signalantwort?
- Wie wirkt sich diese Wechselwirkung auf die UVB-induzierten Signalwege der DNS-Reparatur oder die extrinsische Hautalterung aus?

3 METHODEN

3.1 MATERIAL

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet.

3.2 METHODEN

3.2.1 Synchronisation von HaCaT-Keratinocyten mittels Serumschock

Die in der Promotionsarbeit angewandte Methode des Serumschocks erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Balsalobre *et al.* [Balsalobre et al., 1998]. Eine Behandlung mit 50%-Serum (FCS) enthaltendem Medium führt zu einer Synchronisation der mRNS-Expression von circadianen Genen in der Zellkultur.

Für diese Arbeit musste das Protokoll an die Bedingungen einer Keratinozytenzellkultur angepasst werden. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in normalen Wachstumsmedium (DMEM, 10% FCS, Antibiotikum/Antimykotikum) kultiviert. Nachdem die Zellen die Konfluenz erreichten, wurden sie für 24 Stunden mit serumfreien Medium ausgehungert. Dem folgte eine zweistündige Behandlung mit Medium, welches 50 % fötales Kälberserum enthielt. Für die anschließenden Versuche wurden die Zellen wieder auf Wachstumsmedium gesetzt.

3.2.2 mRNS-Expressionsanalyse

3.2.2.1 RNS-Extraktion

Für Experimente zur Bestimmung der mRNS-Expression wurden $3 \cdot 10^5$ Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte eingesät. Die Lyse der Zellen und die Isolation der RNS wurde mit dem PEQGOLD *Total RNA-Kit* nach Anleitung des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

Nach dem ersten Waschschrift erfolgte eine zusätzliche Inkubation mit DNase I (5 μ l DNase I Lösung in 35 μ l Puffer) für 20 Minuten, um eventuelle Rückstände genomischer DNS zu entfernen.

Nach der RNS-Extraktion wurde der RNS-Gehalt photometrisch durch Messung der Adsorption bei 260 nm ermittelt.

$$C[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

3.2.2.2 cDNS-Synthese

Pro Probe wurden 0,5 μ g RNS für die cDNS-Synthese eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde die mRNS mit 1,25 μ l poly-dT-Primer (100 μ M) und 1 μ l dNTP-Mix (10 mM) bei 65 $^{\circ}$ C für 5 Minuten verbunden, um in einem zweiten Schritt von der mit 1 μ l M-MLVRT (100 U/ μ l) für eine Stunde bei 37 $^{\circ}$ C in cDNS umgeschrieben zu werden. Das Pipettierschema ist in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Pipettierschema Reverse Transkription

RNS-Probe (0,5 μ g)	7,5 μ l
P(dT) ₁₅ -Primer (100 mM)	2,5 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	2 μ l
5 min 65 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C ∞	
H ₂ O	5 μ l
5x RT-Puffer	4 μ l
M-MLVRT	1 μ l

3.2.2.3 Real-Time-PCR

Die cDNS-Proben wurden vor der Real-Time-PCR mit H₂O (DEPC grade) 1:3 verdünnt. Für einen Reaktionsansatz wurden 7,5 μ l SensiMix SyBRKit, je 1 μ l 4 μ M *forward* -und *reverse* Primer, 2,5 μ l H₂O (DEPC grade) und 3 μ l cDNS pipettiert. Die PCR wurde im Rotorgene 2000 (Qiagen) mit dem in der Tabelle 2 aufgelisteten Temperaturprofil durchgeführt wurden.

Tabelle 2 Temperaturprofil der Real Time PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
Taq-Aktivierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	20 sec
Anealing	56 °C	20 sec
Elongation	72 °C	20 sec
Denaturierung - Elongation	50 Zyklen	
Wartezeit	50 °C	30 sec
Schmelzkurvenbestimmung	50-99°C	In 1 °C Schritten

3.2.2.4 Analyse circadianer Gene in einer 72 Stunden Zeitreihe

Um zu überprüfen, ob in HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten ein circadianer Rhythmus über mehrere Tage reproduzierbar zu synchronisieren ist, wurde in zwei unabhängigen Experimenten alle vier Stunden die mRNA über einen Zeitraum von 72 Stunden geerntet. Das Schema des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 6 dargestellt. Dazu wurden in 6-well-Platten pro well $3 \cdot 10^5$ Zellen eingesät. Die Zellen wurden nach der Serumschockmethode behandelt, die RNA extrahiert, in cDNA transkribiert und Real-Time-PCR-Analysen zu den Genen *Bmal1*, *Per1*, *Cyp11A1*, *ARNT*, *Cox2*, *Col3A1*, *TIMP1* und *MMP1* durchgeführt.

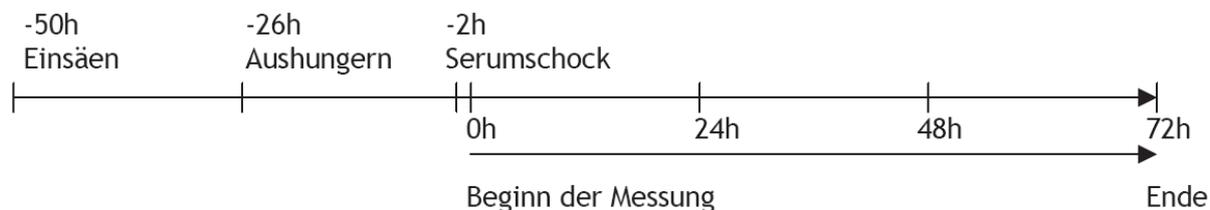


Abbildung 6: Schema der 72 Stunden Zeitreihe: Die Zellen wurden zwei Tage vor dem Serumschock eingesät. Einen Tag nach dem Einsäen wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium ausgehungert. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden mit Medium, welches 50 % Serum enthielt, geschockt. Für die Messung wurden die Zellen wieder in ihr Wachstumsmedium mit 10 % FCS überführt.

3.2.2.5 Untersuchung des Einflusses des AhR auf den circadianen Rhythmus

Die Analyse der 72 Stunden Zeitreihen ergab, dass der Zeitraum 24-48 Stunden nach dem Serumschock am besten geeignet ist, um den Einfluss der AhR-Aktivierung auf den circadianen Rhythmus zu untersuchen. Dazu wurden HaCaT-Wildtyp-, HaCaT-AhR-defiziente, HaCaT-Kontrollvektor1- und HaCaT-Kontrollvektor2-Zellen in 6-well-Platten zu je $3 \cdot 10^5$ Zellen pro well eingesät und synchronisiert. Da phasenabhängige Effekte das Experiment beeinflussen könnten, wurde eine Hälfte des Versuchs 24 Stunden nach dem

Serumschock mit 100 nM FICZ bzw. 0,01 % DMSO behandelt, die andere Hälfte erst 36 Stunden nach dem Serumschock. Dazu wurde das konditionierte Medium gesammelt und jeweils mit den Substanzen versetzt und wieder auf die Zellen pipettiert. Dies diente zur Vermeidung einer unerwünschten Aktivierung von Genen durch höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren und Hormonen in frischen Medium. Die RNS-Extraktion erfolgte alle vier Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dieser Versuch wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Nach der cDNS-Synthese wurde die Expression verschiedener Gene des circadianen Rhythmus, des AhR-Signalweges und der extrazellulären Matrix untersucht.

3.2.2.6 Effekt von AhR-Agonisten auf die Expression von circadian regulierten Genen

Im Gegensatz zu FICZ, welches sehr schnell von den HaCaT-Keratinocyten metabolisiert wird, kann 3-Methylcholanthren den AhR über einen längeren Zeitraum aktivieren. Dieser Versuch diente dazu, zu überprüfen wie sich die Aktivierung des AhR auch auf weitere Zyklen des circadianen Rhythmus auswirkt. Außerdem ist die Verwendung eines zweiten Aktivators eine zusätzliche Bestätigung der erzielten Ergebnisse.

HaCaT-Keratinocyten wurden wie beschrieben eingesät, mit der Serumschockmethode synchronisiert und 24 Stunden nach dem Serumschock mit 100 nM FICZ, 10 µM 3-Mc oder 0,01% DMSO behandelt.

Die RNS-Extraktion erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden alle vier Stunden. Nach der Translation in cDNS wurde die Expression der Gene *Bmal1*, *Per1*, *Cyp1A1*, *Cox2*, *Col3A1*, *TIMP1* und *MMPI* mittels Real-Time-PCR gemessen. Dieser Versuch wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

Die cDNS eines Experimentes wurde auch zur Analyse der Expression von Genen der UVB-Stressantwort (*XPA*, *XPC*, *Polymerase κ* , *Il 12 Untereinheit 35* und *Il 12 Untereinheit 40*) verwendet.

3.2.2.7 Einfluss von Inhibitoren der Signaltransduktion, des proteasomalen Abbaus, des Calcium-Signalwegs und des AhR auf die Expression von Bmal1, Per1, Cyp1A1 und Cox2

Ziel dieses Versuches ist es, zu eruieren, welche Signalwege für die AhR-abhängige Induktion der Bmal1-Expression verantwortlich sind.

Der Inhibitor Assay basiert auf den Experimenten zum Einfluss des AhR auf den circadianen Rhythmus. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 abgebildet. HaCaT Keratinocyten wurden

wie vorher beschrieben in 6-*well*-Platten ausgesät, mit einem Serumschock synchronisiert und 36 Stunden später für vier Stunden mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,01% DMSO behandelt. Die Zellen in diesem Versuch wurden eine Stunde vor der FICZ/DMSO Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Die Wirkungsweise der Inhibitoren ist in Tabelle 3 aufgelistet.

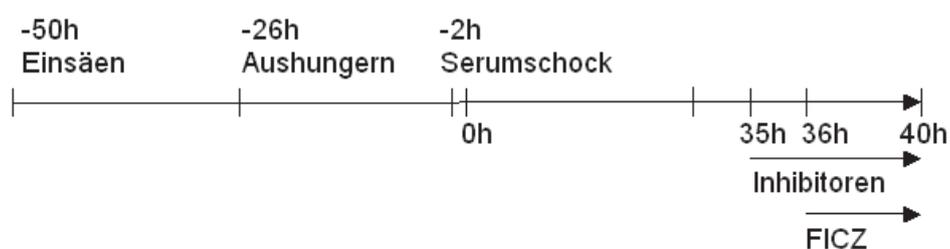


Abbildung 7 Schema des Inhibitor-Assay: Die Zellen wurden zwei Tage vor dem Serumschock eingesät. Einen Tag später wurden die Zellen für 24 Stunden mit serumfreiem Medium ausgehungert. Nach dem Aushungern wurden die Zellen mit Medium, welches 50 % Serum enthielt, für zwei Stunden geschockt und danach wieder in Wachstumsmedium mit 10 % FCS überführt. Das eigentliche Experiment begann 35 Stunden nach dem Serumschock mit der Zugabe der Inhibitoren zu den Zellen. Eine Stunde später erfolgte die Ko-Belastung mit FICZ oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Vier Stunden nach der Inkubation mit FICZ wurde die RNS gerntet und mittels Real-Time-PCR analysiert.

Vier Stunden nach der Behandlung wurde die mRNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und die Expression von Bmal1, Per1, Cyp1A1 und Cox2 untersucht.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Wirkungsort
MG-132	10 μ M	Proteasom-Inhibitor
PSI	10 μ M	Proteasom-Inhibitor
Cycloheximid	25 μ M	Translations-Inhibitor
PP2	10 μ M	Src-Kinase-Inhibitor
MNF	10 μ M	AhR Inhibitor
Nifedipine	25 μ M	Ca ²⁺ -Kanal-Inhibitor
2-APB	50 μ M	Inhibitor des IP3-induzierten Ca ²⁺ -Einstroms
BPDIQ II	3 μ M	EGFR-Inhibitor
PD98059	37,4 μ M	MEK-Inhibitor
Bis IX	1 μ M	PKC-Inhibitor
KT 5720	1,8 μ M	PKA-Inhibitor

3.2.3 Protein Analyse

3.2.3.1 Überexpression von Bmal1-Flag- und Myc-Per1-Konstrukten in HepG2-Zellen für die Western-Blot-Kontrolle

Für die Transfektion der Plasmide wurden je 3 *wells* einer 6-*well*-Platte mit $3 \cdot 10^5$ -HepG2-Zellen eingesät. Einen Tag später wurden die Zellen mittels jetPEITM-Reagenz nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Dazu wurden je 3 µg des Plasmids mit 100 µl 150 mM NaCl-Lösung und je 6 µl jetPEITM-Lösung mit 100 µl gemischt. Die jetPEITM-Lösung wurde dann der Plasmidlösung hinzugegeben und durch vortexen gemischt. Diese Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Je 200 µl dieser Lösung wurden dann nach der Inkubation tropfenweise unter Schwenken der Platten auf die Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für 48 Stunden im Inkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert und danach die Proteine, wie folgt extrahiert.

3.2.3.2 Proteinextraktion

$3 \cdot 10^5$ Zellen wurden pro *well* einer 6-*well* Platte eingesät, synchronisiert und 36 Stunden nach dem Serumschock mit 10 µM 3-Methylcholanthren beziehungsweise 0,1% DMSO behandelt. Die Proteine wurden 4, 8 und 12 Stunden nach der Aktivierung des AhR geerntet. Je drei *wells* einer 6-*well*-Platte wurden für eine Probe zusammengefasst. Das Medium wurde abgesaugt die Proben zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und in 150 µl 1xRIPA Puffer aufgenommen. Das Proteinlysate wurde anschließend bei einer Temperatur von 4°C 10 Minuten lang bei 14000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem DC-Kit von Biorad. Dieses Kit verwendet eine modifizierte Variante der Proteinbestimmung nach Lowry [LOWRY et al., 1951]. Der Nachweis erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt ist eine Komplexbildung der Peptidbindungen der Proteine mit Cu(II)-Ionen in einer Biuretreaktion. Im zweiten Schritt werden die Cu(II)- zu Cu(I)-Ionen reduziert welche in der Folin-Reagenz enthaltene Molybdänionen zu Molybdänblau reduzieren.

Je 5 µl einer 1:10 Verdünnung der Proteinproben wurde in eine 96-*well*-Platte pipettiert. Dazu wurden je 25 µl Lösung A' (20 µl Lösung S auf 980 µl Lösung A) pipettiert. 200 µl Lösung B wurden dazu pipettiert. Der Ansatz wurde kurz durch Schütteln gemischt und für 15 Minuten

im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Adsorption wurde dann bei 640 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe in einem Konzentrationsbereich von 0-3 mg/ml.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vor den *Western-Blots* wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese nach der molekularen Masse getrennt. Dafür wurden jeweils ein 10%iges Trenngel und anschließend darauf ein 5%iges Sammelgel aus Polyacrylamid gegossen. Pro Probe wurden 20 µg Protein aufgetragen. Als Größen-Marker diente der *Precision Plus Protein Standards* von Biorad. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 130 Volt im Laufpuffer getrennt.

Trenngel:

H₂O: 4,2 ml

40% Acrylamid/Bisacrylamidlg.: 2,5 ml

Tris 1,5 M pH 8,8: 2,6 ml

20% SDS: 0,05 ml

20% APS: 0,05 ml

TEMED: 0,004 ml

Sammelgel:

H₂O: 1,4 ml

40% Acrylamid/Bisacrylamidlg.: 0,3 ml

Tris 1,0 M pH 6,8: 0,3 ml

20 % SDS: 0,01 ml

20 % APS: 0,01 ml

TEMED: 0,002 ml

3.2.3.5 *Western-Blot*

Der *Western-Blot* wurde im *Wet-Blot*-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde das *Mini Protean Tetra System* von Bio Rad verwendet. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei 100 V für eine Stunde in eisgekühltem Transferpuffer. Eine Anfärbung der Membran mit Ponceau S diente zur Kontrolle des Blots und der Fixierung der Proteine auf der Membran. Nach der Entfärbung mit dest. H₂O wurden die unspezifischen Bindungen der Membran durch eine einstündige Inkubation mit Blockpuffer bei

Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde anschließend mit dem entsprechenden spezifischen Erst-Antikörper in Blockpuffer verdünnt und übernacht bei 4°C inkubiert. Es wurden Antikörper spezifisch gegen die Proteine Rev-Erb α , ROR α , β , γ , ROR α , Bmal1 und Per1 untersucht. Die überschüssige Antikörperlösung wurde abgenommen und die Membran dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Peroxidase gekoppelten Zweit-Antikörper (Anti-Maus- beziehungsweise Anti-Kaninchen-IgG, 1:10000 in Blockpuffer verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurde die Membran erneut dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Peroxidase-reaktion erfolgte mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection System*. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wurde mit Röntgenfilm aufgenommen.

Der Abgleich der einzelnen Proben wurde durch spezifische Detektion mit einem GAPDH spezifischen Maus-Antikörper vorgenommen. Dazu wurden die Blots nach der Detektion der Chemolumineszenz dreimal 10 Minuten in TBS-T gewaschen und übernacht bei 4°C mit dem GAPDH-Antikörper (1/5000 5% Magermilch in TBS-T) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blots wieder dreimal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (1/10000 in TBS-T-5% BSA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde wieder dreimal 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und das Chemolumineszenzsignal wie oben beschrieben detektiert.

Die Quantifizierung des Blot-Signals erfolgte mit der FluorChem 8900 Software.

3.2.4 Durchführung des Real-Time-Luciferase-Assays

Der Real-Time-Luciferase Assay erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reinke, Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Universität Düsseldorf. Er diente dazu die Ergebnisse der Real-Time-PCR Experimente in einer unabhängigen Methode zu bestätigen. Dazu wurde das Gen der Luziferase unter die Kontrolle eines Bmal1-Promotors gestellt. Die Aktivität der Luziferase folgt dadurch einem Tageszeit-abhängigen Rhythmus und man kann mit diesem Konstrukt Auswirkungen auf den circadianen Rhythmus untersuchen.

Dieses Konstrukt wurde stabil lentiviral in HaCaT-Wildtyp-, HaCaT-AhR-defiziente- und HaCaT-Kontrollvektor2-Keratinozyten transduziert. Die stabil transfizierten Zellen wurden mit Puromycin (1 μ g/ml) selektioniert.

Je $7 \cdot 10^5$ Zellen wurde in eine 3,5 cm Petrischale eingesät. Und das Medium (DMEM 4,5 g/l Glucose, Phenolrot frei, 10 %FCS, Antibiotikum/Antimykotikum) 24 Stunden später erneuert. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen wurden sie mit 0,1% DMSO, 100 nM FICZ und 10 μ M 3-Methylcholanthren belastet inkubiert. Je zwei Schalen dienten als Kontrolle der Synchronisierbarkeit der Zellen und wurden mit 100 nM Dexamethason in PBS inkubiert. Danach wurde das Zellkultur-Medium, welches in der Zwischenzeit bei 37 °C im Inkubator gelagert wurde, zurückgegeben. Zusätzlich wurde dem Medium noch 0,1 mM Luciferin zugesetzt. Um Verdunstung zu vermeiden wurden die Schalen mit Parafilm verschlossen und in den Lumicycler (Actimetrix, Wilmette, IL,USA) gestellt. Die Lumineszenz wurde automatisch alle 10 Minuten gemessen. Das Experiment wurde nach vier Tagen beendet. Die Auswertung erfolgte mit der Lumicycle Analysis Software (Actimetrix, Wilmette, IL,USA).

3.2.5 Konstruktion stabil lentiviral transduzierter *Bmal1*-defiziente HaCaT-Keratinocyten

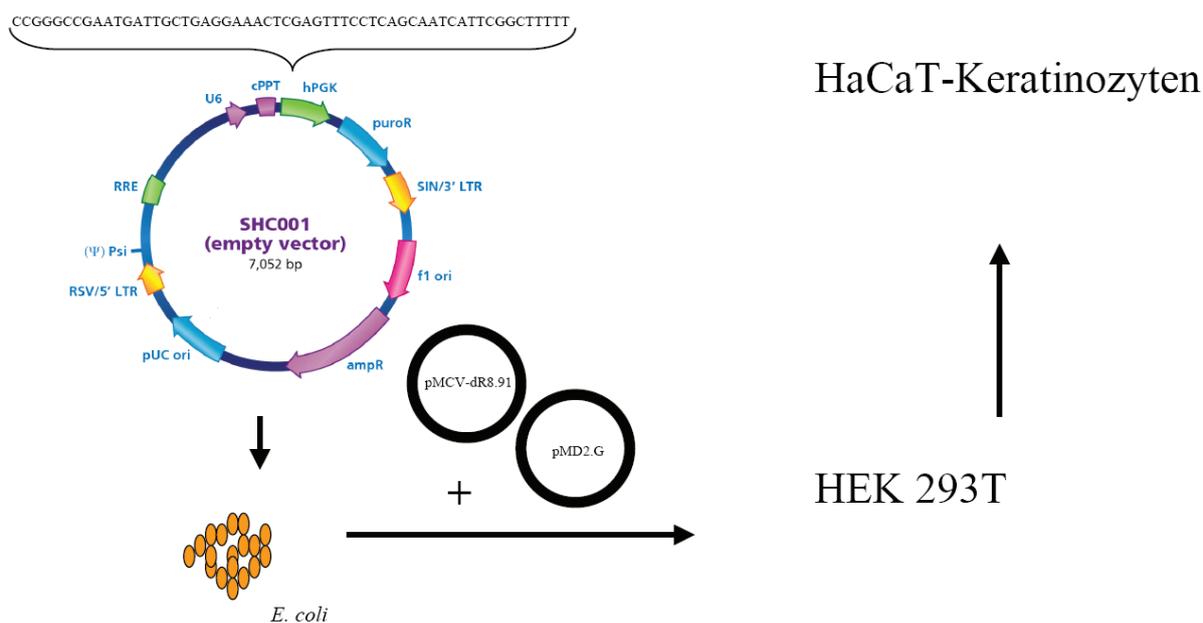


Abbildung 8 Schema der Herstellung stabil transduzierter *Bmal1*-defiziente HaCaT-Zellen: Vektoren mit shRNS-Konstrukten sind für die meisten Gene käuflich zu erwerben. Sie werden zur Vermehrung in *E.coli* transfiziert. Durch eine Plasmidpräparation einer geeigneten Menge dieser Bakterien lassen sich dann genug Plasmide produzieren. Der shRNA enthaltende Vektor wird gemeinsam mit den zwei Vektoren für die viralen Verpackungsplasmide in Hek 293T-Zellen transfiziert. Die Hek-Zellen produzieren die Viruspartikel und geben sie in das Medium ab. Aus diesem lassen sich die Viren dann extrahieren und auf die zu transduzierenden Zellen geben, in diesem Falle HaCaT-Keratinocyten. Da der shRNS-Vektor auch einen Selektionsmarker, hier ein

Puromycinresistenzgen besitzt, lassen sich durch Zugabe von Puromycin spezifisch die stabil transfizierten Zellen erhalten. Nicht transfizierte Zellen sterben durch die Puromycinbehandlung

3.2.5.1 Transformation in *e.coli* Bakterien

Die Methode der hitzekompetenten Transfektion von Bakterien ist bei Sambrook *et al.* [Sambrook J et al., 1989] beschrieben.

Der NM-001178.3-1867s1c1-Vektor (Bmal1-defizient), der Mission®pLKO.1puro *control vector* (Kontrollvektor3), der Mission® *Non Targeted shRNA Vector* (Kontrollvektor4) und die Verpackungsvektoren PMCVR.891 und PMD2.G wurden in hitzekompetente XL1Blue *E. coli*-Bakterien transfiziert, um die Plasmid-DNS zu vermehren.

Dazu wurden 50 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden zur Verbesserung der Transfektionseffizienz mit 0,8 µl β-Mercaptoethanol 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dazu wurden 1 µg Plasmid-DNS pipettiert und der Mix 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen zur besseren Regeneration noch 2 Minuten auf Eis belassen und eine Stunde mit 1 ml LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 µl dieser Bakterienkultur wurden auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatte wurde dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Pro Plasmid wurden vier der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien gepickt und in 3 ml LB-Ampicillin-Medium transferiert und eine weitere Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. 2 ml dieser Bakterienkulturen wurde zur Plasmidpräparation mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen eingesetzt. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bei 260/280 nm bestimmt und das Plasmid durch den Verdau mit Restriktionsenzymen PvuII und NcoI und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel kontrolliert.

50 µl der verifizierten Minipräp-Kultur wurde zum Animpfen von 100 ml einer Maxipräp-Kultur in LB-Ampicillin verwendet. Diese Kultur wurde 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidpräparation dieser Kultur wurde nach Protokoll des Herstellers mit dem HiSpeed® Plasmid Maxi Kit von Qiagen durchgeführt. Die Konzentration der extrahierten Plasmide wurde wie oben beschrieben photometrisch bestimmt und durch Restriktionsverdau und anschließender elektrophoretischen Auftrennung verifiziert.

3.2.5.2 Produktion der Lentiviren in Hek 293T-Zellen

Zur Produktion der Lentiviren wurden einen Tag vor der Transfektion je 10 cm Petrischale $5 \cdot 10^6$ Hek 293T-Zellen eingesät. Zur Transfektion wurde das Hekfectin-Kit von Biorad

eingesetzt. Pro Ansatz wurden hierfür 2,63 µg PMD2.G, 4,88 µg PMCVR.891 und 7,5 µg des jeweiligen *mission* shRNA Plasmids eingesetzt. Die Plasmide wurden zusammen mit 48 µl Hekfectinreagenz in 1 ml serumfreies DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose) Medium für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde das Medium der Hek 293T-Zellen in den Petrischalen durch 10 ml frisches Medium (DMEM 4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, Antibiotikum/Antimykotikum) ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde nach der Inkubation tropfenweise unter Schwenken hinzupipettiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium in den Schalen gewechselt, um die Viabilität der Zellen zu erhöhen. Das virushaltige Medium wurde dann eine Woche alle drei Tage gesammelt und durch frisches Medium ersetzt.

3.2.5.3 Stabile Transduktion der HaCaT-Keratinocyten

Für die Transduktion wurden ein Tag vorher je $5 \cdot 10^5$ HaCaT Wildtyp-Zellen in eine 7,5 cm² große Zellkulturflasche eingesät. Das virenhaltige Medium wurde für fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, um die Zellüberreste zu entfernen. Pro Ansatz wurden 5 ml des Überstands auf die HaCaT-Zellen pipettiert. Das Medium wurde nach 24 Stunden wieder abgenommen und durch frisches Medium ersetzt (DMEM 10% FCS, Antibiotikum/Antimykotikum). Nach weiteren 24 Stunden wurde die Selektion positiv transduzierter Zellen begonnen. Dazu wurde das alte Medium verworfen und durch Selektionsmedium (DMEM, 10 % FCS, Antibiotikum/Antimykotikum, 10 µg/ml Puromycin) ersetzt. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach zirka zwei bis drei Wochen erreichten die stabil transduzierten Zellen Konfluenz und wurden in größere Zellkulturflaschen überführt.

3.2.5.4 Expressionsanalyse in Bmal1-defizienten Zellen

Dieser Versuch diente zur Kontrolle der Reduktion der Expressionshöhe von Bmal1 nach stabiler Transduktion mit dem shRNS-Konstrukt. Dazu wurden pro Probe $3 \cdot 10^5$ HaCaT Wildtyp- HaCaT Bmal1 defizienten-, HaCaT Kontrollvektor3- und HaCaT-Kontrollvektor4-Zellen eingesät. Diese Zellen wurden synchronisiert. 24 Stunden nach der Synchronisation des circadianen Rhythmus wurden die Zellen mit 10 µM 3-Methylcholanthren beziehungsweise mit 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle belastet. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde alle vier Stunden die RNS extrahiert. Die RNS wurde in cDNS umgeschrieben und die Expression von Bmal1, Per1, Cyp1A1, Cox2, Per2 und Cry2 mittels Real-Time-PCR analysiert.

3.2.6 Einzelzellelektrophorese (Comet-Assay)

Der *Comet*-Assay wird verwendet, um DNS-Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche in eukaryotischen Zellen zu untersuchen. Dabei werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension in einem Agarosegel fixiert. Nach einer alkalischen Lyse wird an dieses Gel ein elektrisches Feld angelegt. Ist die DNS durch Strangbrüche geschädigt, kann sie sich besser entwinden und entlang des elektrischen Feldes aus dem Zellkern in Richtung Anode bewegen [Singh et al., 1988]. Durch interkalierende Farbstoffe wie zum Beispiel Ethidiumbromid sichtbar gemacht, ergibt sich ein Bild, welches an einen Kometen erinnert. Der Zellkern bildet dabei den Kopf des Kometen und die auswandernde DNS den Schweif. Aus der Intensität und der Reichweite des Schweifes lässt sich somit quantitativ auf die Menge der Strangbrüche beziehungsweise auf die Aktivität der Reparaturenzyme schließen [Singh et al., 1990].

Ziel des Experimentes ist es, zu untersuchen, ob die Reparatur durch UVB-Strahlung induzierter DNS-Schäden in HaCaT-Keratinocyten einem circadianem Rhythmus unterliegt. Der Schutz vor UV-Strahlung und die Reparatur der entstandenen DNS-Schäden ist essentiell für die Funktionalität der Haut. Die Einwirkung der UV-Strahlung ist dabei stark dem tageszeitlichen Wechsel der Sonneneinstrahlung unterworfen dem sich die Haut angepasst hat, um die Reparatur der DNS vor der nächsten Verdopplung zu gewährleisten. Der Zellzyklus der Haut unterläuft dabei ebenfalls einen circadianen Rhythmus [Bjarnason et al., 2001]

Das hier in dieser Arbeit verwendete Experimentierdesign basiert auf den Versuchen der Masterarbeit von Tamara Kirichevska [Kirichevska, 2009].

Während des Versuchs wurde darauf geachtet, dass die Zellen und das Medium vor Lichteinstrahlung geschützt sind und alle Arbeiten im Dunkeln durchgeführt wurden.

Pro Ansatz wurden in je zwei *wells* einer 6-*well*-Platte $3 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden über einem Zeitraum von 24 Stunden alle sechs Stunden je zwei *wells* nach der Serumschockmethode synchronisiert. Dadurch ist der circadiane Rhythmus jeweils um sechs Stunden phasenverschoben zueinander.

Vor der Bestrahlung wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml PBS pipettiert. Die Bestrahlung erfolgt bei 100 J/m^2 mit vier parallel geschalteten TL20W/12RS Leuchtstoffröhren (Philips, Eindhoven, Niederlande).

Nach der Bestrahlung wurden der PBS-Puffer durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für vier Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Währenddessen wurden die Objektträger mit einem 0,5 %igem Agarosegel beschichtet.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA pro *well* abgelöst und in 900 µl Medium aufgenommen. Die zwei *wells* eines Ansatzes wurden dabei zusammengelegt, um genügend Zellen zu bekommen. Pro Ansatz wurden drei Objektträger angefertigt. Zu 200 µl 1 %ige LMP-Agarose wurden 20 µl der Zellsuspension pipettiert, durch vortexen kurz gemischt und auf einen Objektträger übertragen. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu bekommen, wurde ein Deckgläschen aufgelegt und die LMP-Agarose mit den Zellen vier Minuten auf Eis ausgehärtet. Danach wurde das Deckgläschen vorsichtig seitlich abgezogen und der Objektträger übernacht in kaltem Lysepuffer bei 4°C gestellt, um die Zellen und den Zellkern aufzulösen. Nach der Lyse wurden die Objektträger kurz in Wasser gespült und in die Elektrophoresekammer überführt. Dort wurden sie noch für 20 Minuten in *Comet*-Elektrophoresepuffer inkubiert, um die DNS zu denaturieren. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V, 300 mA und 100 W für 10 Minuten. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger kurz in Wasser gespült und in Neutralisationspuffer für 20 Minuten überführt. Nach der Neutralisation wurden die Objektträger für fünf Minuten in 80% (v/v) Ethanol entwässert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie mit 35 µl einer Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) angefärbt und mit einem Deckgläschen versehen.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BV60, Kamera Olympus, Anregung 515-560 nm, Barrierefilter 590 nm) unter Verwendung der *Cometassay II* Software. Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgezählt und die Schweif-Intensität und die Schweif-Länge bestimmt.

3.2.7 *South-Western-Blot*

Der *South-Western-Blot* ist eine Kombination des *Southern-Blots* mit DNS spezifischer Antikörperdetektion. Beim *Southern-Blot* wird die DNS an eine Nylonmembran immobilisiert und durch Hybridisation mit markierten DNS-Sonden können spezifische DNS-Sequenzen nachgewiesen werden. Ihren Namen verdankt die Methode ihrem Entwickler Edwin Southern [Southern, 1975]. Angelehnt an die Nomenklatur der Himmelsrichtungen wurden dann weitere Immobilisierungsmethoden benannt. *Northern-* für die RNS-Immobilisierung und *Western-Blot* für die Proteinimmobilisierung. Bei dem *South-Western-Blot* wird die genomische DNS immobilisiert, die Detektion wird aber nicht mit DNS-Sonden sondern mit

Antikörpern durchgeführt. Damit lassen sich Cyclobutanpyrimidindimere nachweisen, die für die UVB-Strahlung charakteristisch sind.

Mit diesem Versuch sollte mit einer weiteren Methode die Auswirkung des circadianen Rhythmus auf die DNS-Reparatur untersucht werden.

Wie beim Comet Assay erfolgten alle Schritte auch hier im Dunkeln.

Pro Ansatz wurden je zwei *wells* einer 6-well-Platte mit $3 \cdot 10^5$ HaCaT-Wildtyp-, AhR-defizienten, Kontrollvektor1-, Bmal1-defizienten-, Kontrollvektor3- und Kontrollvektor4-Zellen eingesät. Nachdem die Zellen die Konfluenz erreicht haben wurden sie nach der Serumschockmethode behandelt. Je 24 beziehungsweise 36 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml PBS dazu pipettiert. Hierin erfolgte die Bestrahlung mit vier parallel geschalteten TL20W/12RS-Leuchstoffröhren (Philips, Eindhoven, Niederlande). Nach der Bestrahlung wurde die Hälfte der Proben sofort geerntet, das heißt bei -80°C eingefroren, bei der anderen Hälfte wurde der PBS-Puffer abgenommen, durch frisches Medium ersetzt und für weitere 12 Stunden in den Inkubator gestellt.

Die Präparation der genomischen DNS erfolgte mit dem *Qiaamp Blood Mini* Kit nach dem Herstellerprotokoll.

Der DNS-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Für den *Southwestern Blot* wurden $3 \mu\text{g}$ DNS in $50 \mu\text{l}$ TE-Puffer (pH 8) verdünnt. Die DNS wurde für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und dann sofort auf Eis gestellt. Währenddessen wurde die Nylonmembran für zirka zehn Minuten in Millipore- H_2O aktiviert und in die Vakuumkammer eingespannt. Die Proben wurden aufgetragen und bei einem Unterdruck von 30-40 kPa auf die Membran gesaugt. Die Membran wurde dann für mindestens 30 Minuten auf in 0,4 N NaOH getränktes Whatman-Papier getrocknet. Anschließend wurde die Membran mit der Blockierungslösung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Membran mit dem CPD-Antikörper (1:2500 in Blockierungslösung) übernacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimal 10 Minuten Waschen in *South-Western-TBS-T* erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-Mouse-IgG-Antikörper (1:10000 in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit *South-Western-TBS-T* erfolgte die Detektion mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection System*. Die entstandene Chemolumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm aufgenommen.

Zum Abgleich mit der Gesamt-DNS der Proben wurde die Membran nach der Detektion mit dem *RestoreTM PLUS Western Blot Stripping Puffer* von den Antikörpern getrennt.

Dazu wurde die Membran zunächst dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, und danach für 15 Minuten mit dem *Stripping* Puffer inkubiert. Nach einem erneuten Waschen wurde die Membran wieder, wie oben beschrieben eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem Einzelstrang-DNS-Maus-IgM-Antikörper (1:5000 in Blockierungslösung). Nach dreimal 10 Minuten waschen mit *South-Western*-TBS-T wurde der Peroxidase-konjugierte Anti-IgM-Maus-Antikörper (1:5000 in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran pipettiert. Die Detektion mit dem *ECL Plus Western Blotting Detection System* erfolgte wie bereits beschrieben nach dreimaligen Waschen.

3.2.8 48-Stunden-Zeitverlaufskurve der UVB-Wirkung auf die Expression circadianer Gene

Pro Ansatz wurden $3 \cdot 10^5$ HaCaT-Keratinocyten in ein *well* einer 6-*well*-Platte eingesät. Der circadiane Rhythmus wurde mit der Serumschockmethode synchronisiert und 24 Stunden nach dem Serumschock wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml PBS auf die Zellen pipettiert. Die Hälfte der Zellen wurde mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Die andere Hälfte diente als unbestrahlte Kontrolle. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden die Zellen wieder in Wachstumsmedium überführt (DMEM, 10 % FCS, Antibiotikum/Antimykotikum). Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde alle vier Stunden die RNS einer bestrahlten und einer unbestrahlten Probe extrahiert und analysiert. Es wurde der Expressionsverlauf der Gene *Bmal1*, *Per1*, *Cyp1A1* und *Cox2* mittels Real-Time-PCR untersucht.

3.2.9 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Mit dem *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* kann man die Viabilität von Zellen bestimmen. Er beruht auf dem Umsatz von Resazurin zum Fluoreszenzmarker Resorufin.

Der Umsatz ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und somit ist die Fluoreszenzzunahme bei 590 nm ein guter Marker für die Zellviabilität. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie mit einer Lebendzellkultur durchgeführt werden kann und deshalb geeignet ist, mit anderen Experimenten kombiniert werden zu können.

Pro *well* einer 48-*well*-Platte wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen von Wildtyp-, Bmal1-defiziente, Kontrollvektor3- und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinocyten eingesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Jeder Ansatz wurde in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

Vor der UVB-Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 500 μ l PBS auf die Zellen pipettiert.

Dieser Ansatz wurde mit vier parallel geschalteten TL20W/12RS Leuchtstoffröhren in unterschiedlichen Dosen bestrahlt (50, 100, 150, 200, 300 und 400 J/m^2 plus unbestrahlte Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in 500 μ l frischem Medium inkubiert. Nach den 24 Stunden wurde jeweils 100 μ l des Mediums für den LDH-Assay (siehe Unterkapitel 3.2.10) bei -80°C eingefroren und das restliche Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen für zwei Stunden mit dem *CellTiter-Blue*[®]-*Blue Assay* (40 μ l *CellTiter-Blue*[®] Reagenz in 200 μ l Medium gelöst) inkubiert. Die Fluoreszenz des entstandenen Resorufins wurde im Fluorimeter (Emissionswellenlänge 544 nm, Excissionswellenlänge 590 nm) bestimmt.

3.2.10 LDH-Assay

Der LDH-Assay ist eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellviabilität. Er beruht darauf, dass gestresste Zellen ihre Membranintegrität verlieren. Dies führt dazu, dass Enzyme aus dem Zellinneren in das Medium gelangen. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist dabei durch ihre Stabilität ein besonders geeignetes Enzym. In dem hier verwendeten *CytoTox-ONE*TM *Homogeneous Membrane Integrity Assay* wird die durch die Lactatdehydrogenase katalysierte Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die Umsetzung des Kofaktors NAD^+ zu NADH an die Aktivität der Diaphorase gekoppelt. Die Diaphorase setzt Resazurin in den Fluoreszenzmarker Resorufin um. Der LDH-Assay ist, da er das Medium und nicht die Zellen selbst nutzt, dabei mit anderen Experimenten koppelbar, so zum Beispiel mit dem unter 3.2.9 beschriebenen *CellTiter-Blue*[®]-*Blue Assay*.

Für die Auswertung des LDH Assay ist eine Lysiskontrolle notwendig. Diese wurde durch die Zugabe von 1% Triton-X zum Medium erreicht. Ebenfalls wurde eine Leermediumkontrolle mitgeführt.

Die Vorbereitung der Zellen und die Bestrahlung mit UVB sind unter 3.2.9 beschrieben. Zu 100 μ l des Medium-Überstandes werden 100 μ l *CytoTox-ONE*TM Reagenz hinzupipettiert und 10 Minuten bei 22°C inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 50 μ l der Stop Solution beendet und die Fluoreszenz im Fluorimeter (Emissionswellenlänge 544 nm, Excissionswellenlänge 590 nm) gemessen. Die Zytotoxizität wird wie folgt berechnet:

$$\text{Prozent Zytotoxizität} = 100 * (\text{Experiment-Daten} - \text{Kulturmedium Hintergrund}) / (\text{Lysekontrolle} - \text{Kulturmedium Hintergrund})$$

3.2.11 Statistik

Die gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus den Ergebnissen von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte nach der *Two Way RM ANOVA* –Methode des Graph-Path-Prism Programm. Als statistisch signifikant wurden Werte unterhalb einer Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ (x $P < 0,05$; xx $P < 0,01$; xxx $P < 0,001$) angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 SYNCHRONISATION DER HACAT-KERATINOZYTEN MITTELS SERUMSCHOCK

Um den Einfluss des AhR auf den circadianen Rhythmus untersuchen zu können, ist es notwendig den circadianen Rhythmus so beeinflussen zu können, dass die erhaltenen Ergebnisse reproduzierbar sind. Aus Vorarbeiten war ersichtlich, dass dies ohne eine Synchronisation der Zellen nicht möglich ist.

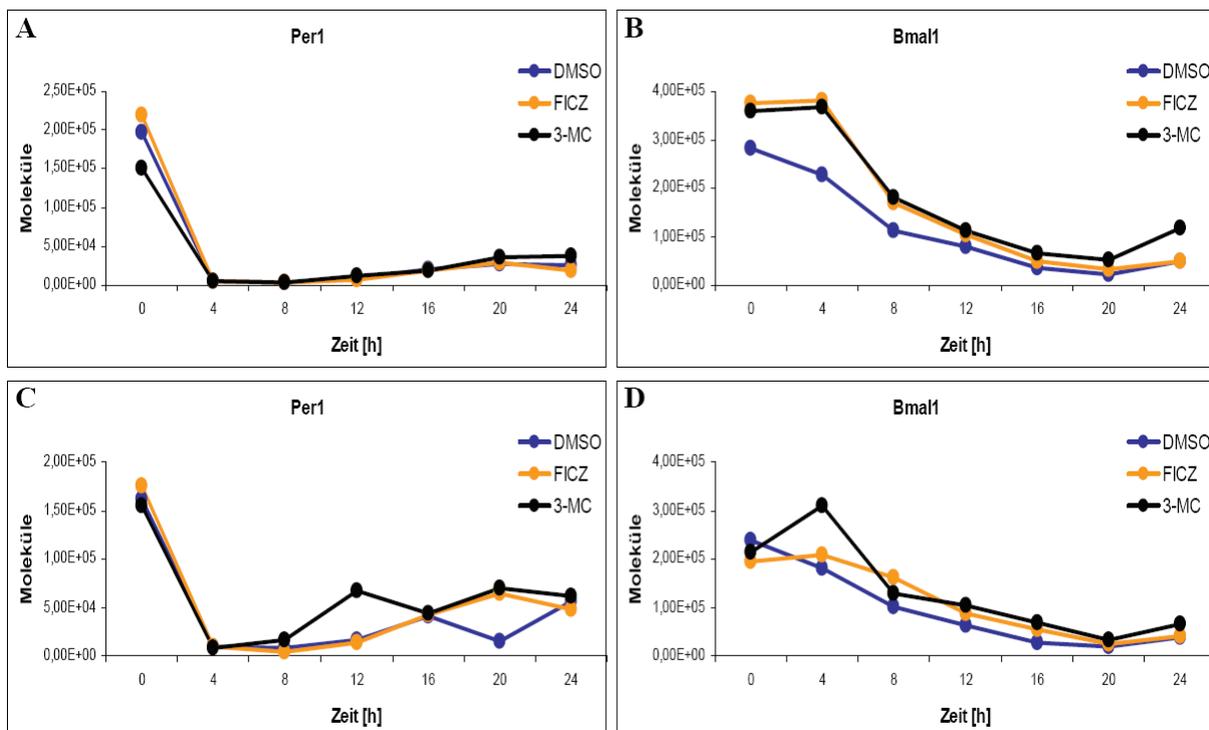


Abbildung 9 Expression der circadianen Gene *Bmal1* und *Per1* nach Serumschock und AhR Aktivierung:

HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt und unmittelbar danach mit 100 nM FICZ, 10 μ M 3-Methylcholanthren (3-MC) beziehungsweise 0,1% DMSO behandelt. Die RNS wurde extrahiert und die Genexpression von *Bmal1* und *Per1* mit der Real-Time-PCR ermittelt. Zeitpunkt 0 ist unmittelbar nach dem Serumschock. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten (A + B; C + D).

Wie in Abbildung 9 gezeigt, führte der Serumschock zu einer unmittelbaren Induktion der *Per1*-Expression (A + C). Nachdem Wechsel des 50% FCS-enthaltenden- zum 10%-FCS-enthaltenden Mediums sank die Expression auf ein Minimum. Infolge der nächsten 20

Stunden stieg die mRNA-Expression wieder. Die Belastung mit den AhR-Agonisten 3-Methylcholantren und FICZ führte in diesem Versuch zu keiner Veränderung der Per1-Expression.

Die Bmal1-Expression wurde ebenfalls durch den Serumschock induziert (B + D). Im Vergleich zur Per1-Expression blieb die Expression jedoch in den ersten vier Stunden hoch, um dann im Verlauf der Zeitreihe langsam zu sinken. Erst in den letzten vier Stunden der Zeitreihe stieg die Expression wieder. Die Aktivierung des AhR durch FICZ und 3-Methylcholanthren führte in diesem Versuch, wie bei Per1 zu keiner Veränderung der Expression.

Wie der Vergleich der beiden Versuche zeigt, sind die Real-Time-PCR-Ergebnisse gut reproduzierbar. Auf einen Abgleich auf Standardgene wurde hierbei verzichtet, da es sich gezeigt hat, dass die Normierung auf die in der Reversen Transkription eingesetzten RNS-Menge schon eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Molekülzahl bewirkt und die Expression aller untersuchten Standardgene entweder vom circadianen Rhythmus oder durch den AhR-Signalweg beeinflusst wurde. Als ein mögliches Kandidaten-Gen zur Normierung der Genexpression wurde in Vorversuchen die Expression von ARNT untersucht.

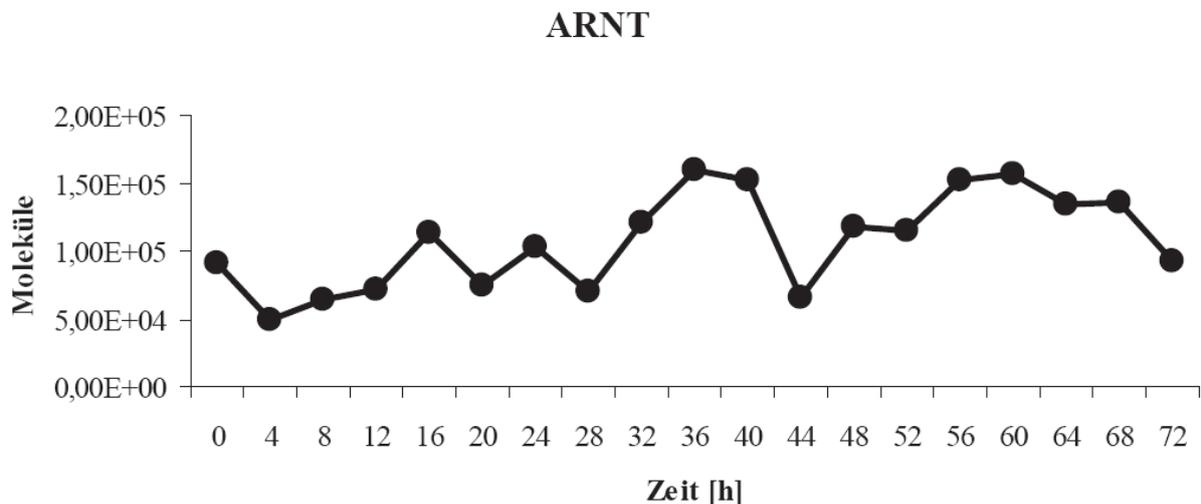


Abbildung 10 ARNT Expression nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden durch einen Serumschock synchronisiert und die mRNA-Expression von ARNT mit der Real-Time-PCR über einen Zeitraum von 72 h alle vier Stunden gemessen. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment.

Der mRNA Gehalt von ARNT in den 72 Stunden nach dem Serumschock ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Expression schwankte um den Faktor vier. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen davon abgesehen, die Expressionsdaten auf den ARNT-Gehalt

abzugleichen und dafür die für die Reverse Transkription verwendete Menge an Gesamt-RNS hinzugezogen.

In Abbildung 11 ist die Cyp1A1-Expression dargestellt. Die Expression dieses Gens diente in dieser Arbeit als Kontrolle der AhR-Aktivierung. Beide Agonisten, sowohl 3-Methylcholanthren als auch FICZ, induzierten die Cyp1A1-Expression. Das Maximum der Cyp1A1-Induktion war nach Zugabe von FICZ schon nach vier Stunden erreicht, während 3-Methylcholanthren über das ganze Experiment hinweg die Expression steigern konnte. DMSO hatte keinen Effekt auf die Cyp1A1-Expression.

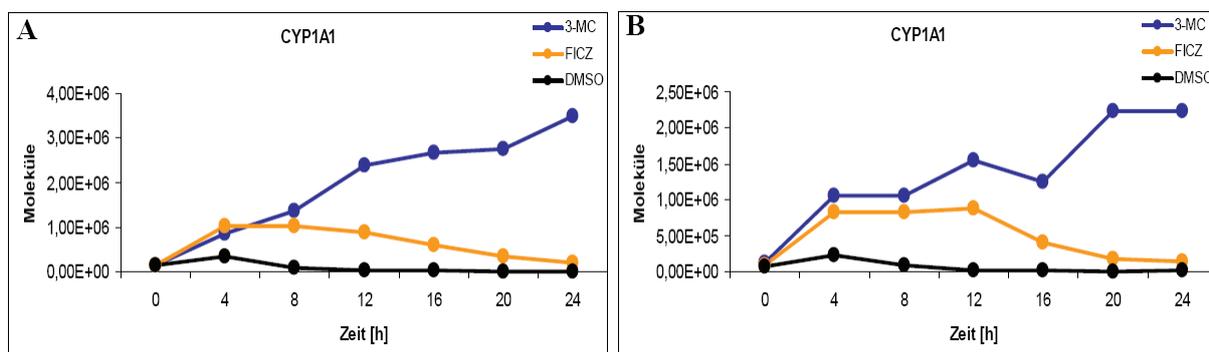


Abbildung 11 Cyp1A1-Expression nach Serumschock und AhR-Aktivierung: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt und unmittelbar danach mit 100 nM FICZ, 10 μ M 3-Methylcholantren (3-MC) beziehungsweise 0,1% DMSO behandelt. Die Cyp1A1 mRNA-Expression als Kontrolle der AhR-Aktivierung wurde mit der Real-Time-PCR ermittelt. Zeitpunkt 0 ist unmittelbar nach dem Serumschock. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Dieses Experiment hat also gezeigt, dass der Serumschock die Expression von Per1 und nachfolgend von Bmal1 induziert. Dies führte zu einer reproduzierbaren Synchronisation des circadianen Rhythmus der HaCaT-Keratinocyten. Die Synchronisation war dabei in den ersten 24 Stunden nach dem Serumschock unabhängig von der Aktivierung des AhR. Somit wurde mit dem Serumschock eine geeignete Methode für die zu bearbeiteten Fragestellungen etabliert.

4.2 CIRCADIANE GENEXPRESSION VON BMAL1 UND PER1 IN SYNCHRONISIERTEN HACAT-KERATINOZYTEN

Um ein optimales Zeitfenster für die nachkommenden Experimente zu finden, wurde das Experiment auf eine Zeitspanne von 72 Stunden ausgedehnt. In dieser Zeit sollte der

circadiane Rhythmus der Genexpression durch die wiederkehrenden Perioden deutlich sichtbar sein.

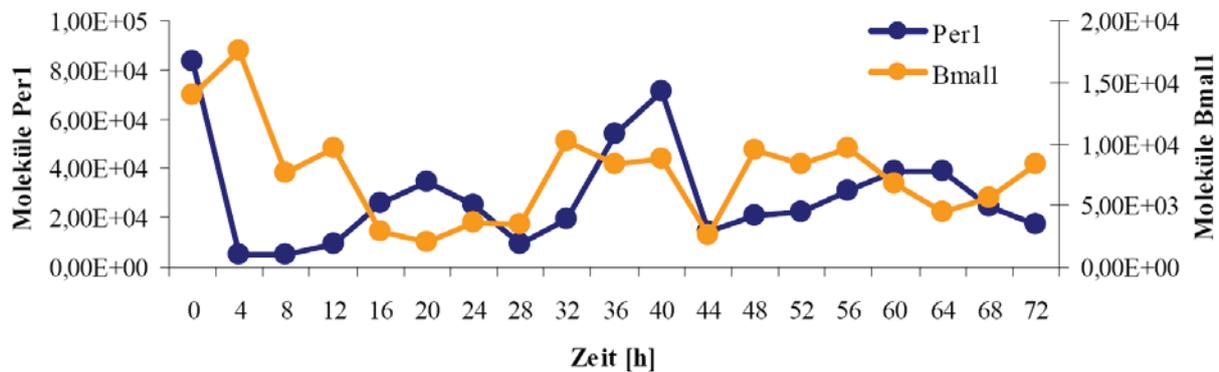


Abbildung 12 Genexpression von Bmal1 und Per1 nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt. Über einen Zeitraum von 72 Stunden wurde alle vier Stunden die RNS extrahiert und die Genexpression von Bmal1 und Per1 mit der Real-Time-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experimentes.

Abbildung 12 zeigte die Genexpression von Bmal1 und Per1 über 72 Stunden nach dem Serumschock. Deutlich zu erkennen war auch hier, wie in Abbildung 9 gezeigt, die Induktion der Per1-Expression durch den Serumschock. Auch hier nimmt die Expression in den ersten vier Stunden wieder ab. Gut sichtbar in diesem Versuch ist die circadiane Oszillation der Per1-Expression. Die Minima der Expression liegen bei 4, 28, 44 und 72 Stunden, die Maxima sind bei 20, 40 und 60-64 Stunden zu finden.

Die Bmal1-Expression verlief in diesem Versuch zeitlich versetzt zur Per1-Expression. Wie schon in Abbildung 9 wurde Bmal1 durch den Serumschock induziert. Im Gegensatz zur Per1-Expression sank die Expression von Bmal1 erst nach acht Stunden wieder. Ebenso wie die Per1-Expression konnte über den Zeitraum von 72 Stunden eine circadiane Oszillation beobachtet werden. Die Minima dieser Oszillation lagen dabei bei 20, 44 und 64 Stunden, die Maxima bei 4, 32 und 48-56 Stunden.

Zusätzlich wurde in diesem Experiment die Auswirkung des Serumschocks auf die Expression von Genen des AhR-Signalweges und der Extrazellulärmembran untersucht. Dies diente dazu, die Auswirkung des Serumschocks selbst auf die Kontrollgene zu charakterisieren.

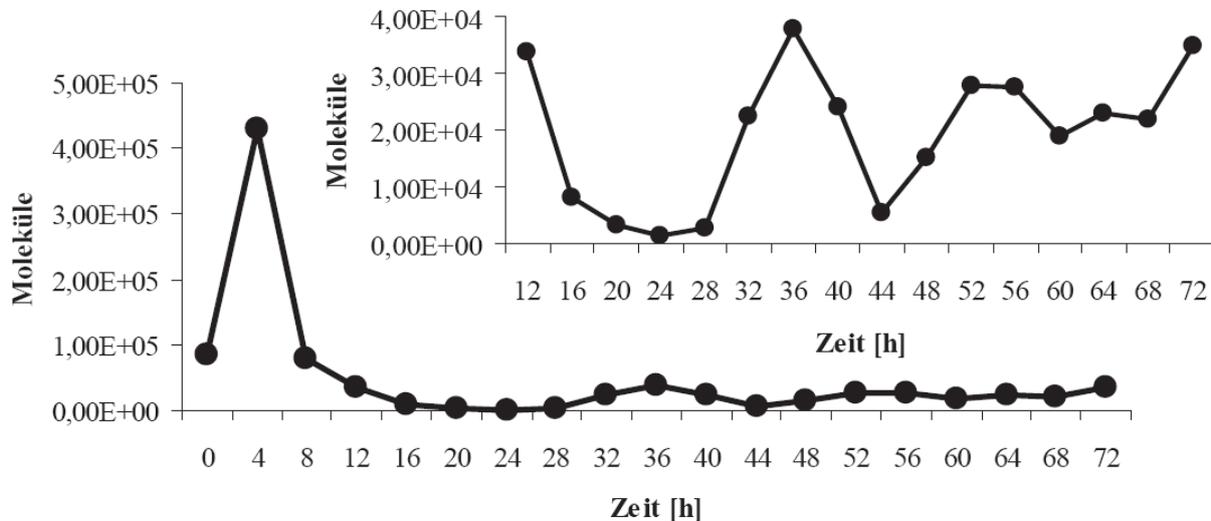


Abbildung 13 Genexpression von Cyp1A1 nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt. Über einen Zeitraum von 72 Stunden wurde alle vier Stunden die RNS extrahiert. Die Genexpression von Cyp1A1 wurde mittels Real-Time-PCR ermittelt. Der Zeitraum von 12-72 Stunden nach Serumschock ist in der oberen rechten Ecke nochmals vergrößert aufgezeigt. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Experimentes.

In Abbildung 13 und Abbildung 14 sind die Genexpressionen zweier Kontrollgene der AhR-Aktivierung nach Serumschock gezeigt. Die Cyp1A1-Expression (Abbildung 13) wird auf transkriptionellen Weg durch den AhR aktiviert. Die Cox2-Expression (Abbildung 14) wird auf einem nicht transkriptionellen Weg über die Aktivierung der c-src-Kinase beeinflusst [Fritsche et al., 2007]. Beide Gene zeigten eine deutliche Aktivierung durch den Serumschock, die nach 24 Stunden auf ihren Ausgangswert zurückfiel. Das Maximum der Cyp1A1-Expression war dabei erst nach vier Stunden zu beobachten, das Maximum der Cox2-Expression unmittelbar nach dem Serumschock. Dies spricht dafür, dass beide Gene auf unterschiedliche Weise durch den Serumschock aktiviert wurden. Nachdem die Expression wieder auf den Ausgangswert gesunken war, waren bei beiden Genen zwei weitere Spitzen im Expressionsniveau zu erkennen, die bei 36 beziehungsweise 60 Stunden nach dem Serumschock liegen. Dies ist ein Indiz dafür, dass die basale Expression beider Gene auch unabhängig von der initialen Induktion des Serumschocks durch die molekulare Uhr reguliert werden.

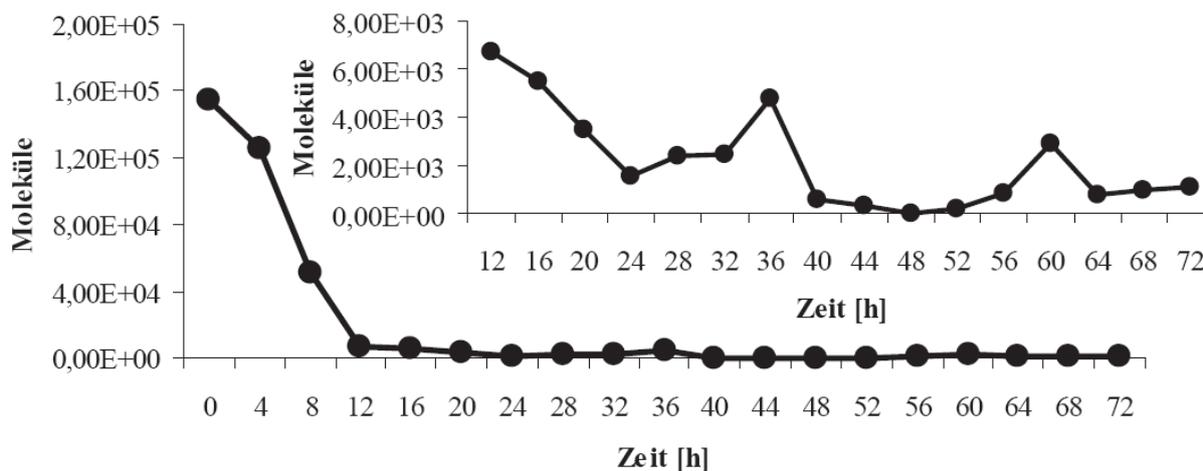


Abbildung 14 Genexpression von Cox2 nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt. Über einen Zeitraum von 72 Stunden wurde alle vier Stunden die RNS extrahiert. Die Genexpression von Cox2 wurde mittels Real-Time-PCR ermittelt. Der Zeitraum von 12-72 Stunden nach Serumschock ist in der oberen rechten Ecke nochmals vergrößert aufgezeigt. Dargestellt ist die Expression eines Experimentes.

Col3A1

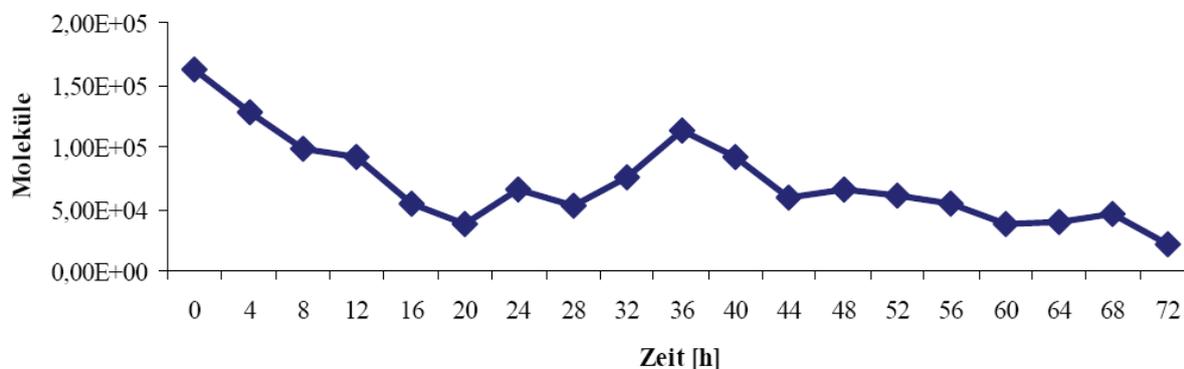


Abbildung 15 Genexpression von Col3A1 nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden nach der Serumschockmethode behandelt und über einen Zeitraum von 72 Stunden wurde alle vier Stunden RNS extrahiert. Die Genexpression von Col3A1 wurde mittels Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Daten aus einem Experiment

Als möglicher physiologischer Endpunkt der Interaktion zwischen AhR und des circadianen Rhythmus wurden die Genexpression der extrazellulärmembran-modulierenden Proteine Col3A1, MMP1 und Timp1 untersucht. Die Expression von Col3A1, dargestellt in Abbildung 15 wurde zunächst durch den Serumschock induziert, fiel dann innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Serumschock wieder ab, um wieder auf ein zweites Maximum bei 36

Stunden zu steigen. Ein drittes Maximum wie bei Bmal1 und Per1 nach ungefähr 60 Stunden, der auf eine circadiane Abhängigkeit hindeutet, ist nicht erkennbar.

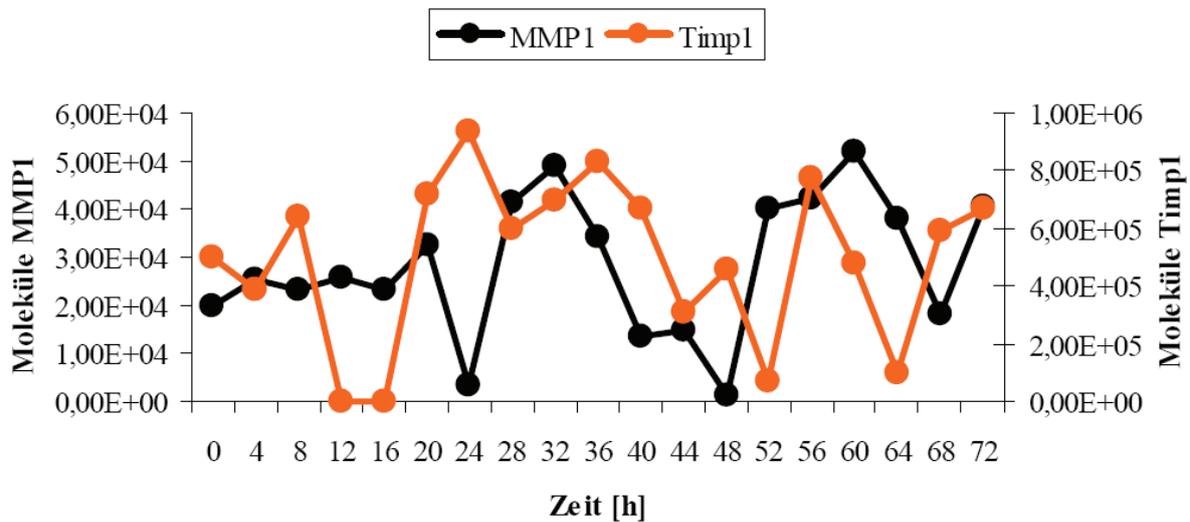


Abbildung 16 Genexpression von MMP1 und Timp1 nach Serumschock: HaCaT-Wildtyp-Keratinozyten wurden mit der Serumschockmethode synchronisiert und die mRNA Expression von MMP1 und Timp1 über einen Zeitraum von 72 Stunden gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Experiment.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, wurden die Gene MMP1 und Timp1 circadian exprimiert. Diese unabhängig von der Aktivierung des AhR durch den Serumschock ausgelöste Schwankung ist bei den nachfolgenden Experimenten zu den Untersuchungen der beiden Gene zu berücksichtigen.

Dieses Experiment lieferte die Bestätigung dass die Serumschockmethode geeignet ist, die Expression von Bmal1 und Per1 reproduzierbar in einem circadianem Rhythmus oszillieren zu lassen. Gleichzeitig wurde auch deutlich dass der Serumschock selber großen Einfluss auf die Expression der zu untersuchenden Gene hat. Die ersten 24 Stunden nach dem Serumschock sind deshalb weniger gut geeignet, um einen freien circadianen Rhythmus zu beobachten. Die Synchronisation der HaCaT-Keratinozyten ließ mit der Zeit deutlich nach, sodass die Amplitudenhöhe von Bmal1 und Per1 immer niedriger wurde. Das beste Zeitfenster um die Auswirkung der AhR-Aktivierung zu studieren liegt demnach zwischen 24 und 72 Stunden nach Serumschock.

4.3 EINFLUSS DES AHR AUF DEN CIRCADIENEN RHYTHMUS

Mit den Erkenntnissen der 72 Stunden Zeitreihen wurde ein geeignetes Zeitfenster ausgewählt, um den Einfluss der Aktivierung des AhR auf den circadianen Rhythmus zu

analysieren. Die ersten 24 Stunden direkt nach dem Serumschock wurden dabei nicht berücksichtigt, weil der AhR schon durch den Serumschock selbst aktiviert wird und dies den Versuch beeinflusst. Nach 72 Stunden sind die Amplituden von Bmal1 und Per1 durch die Desynchronisation der Zellen zu stark abgeschwächt, um effektiv den circadianen Rhythmus nach 72 Stunden beurteilen zu können. Das geeignete Zeitfenster für diese Versuche liegt demnach zwischen 24 und 72 Stunden nach dem Serumschock.

Zusätzlich musste eine mögliche Phasenabhängigkeit der Interaktion des AhR mit dem circadianen Rhythmus in Betracht gezogen werden. Dies bedeutet, dass eine Wechselwirkung auch vom Zeitpunkt des circadianen Rhythmus abhängig sein kann. Der Versuch wurde deswegen in zwei verschiedene Ansätze geteilt. Zum Einen wurde der AhR 24 Stunden nach dem Serumschock, zum Anderen in einer separaten Zeitreihe 36 Stunden nach dem Serumschock durch eine Belastung mit 100 nM FICZ aktiviert. Bei beiden Experimenten wurde dann über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 4 Stunden die RNS extrahiert und mit Hilfe von Real-Time-PCR-Analysen analysiert.

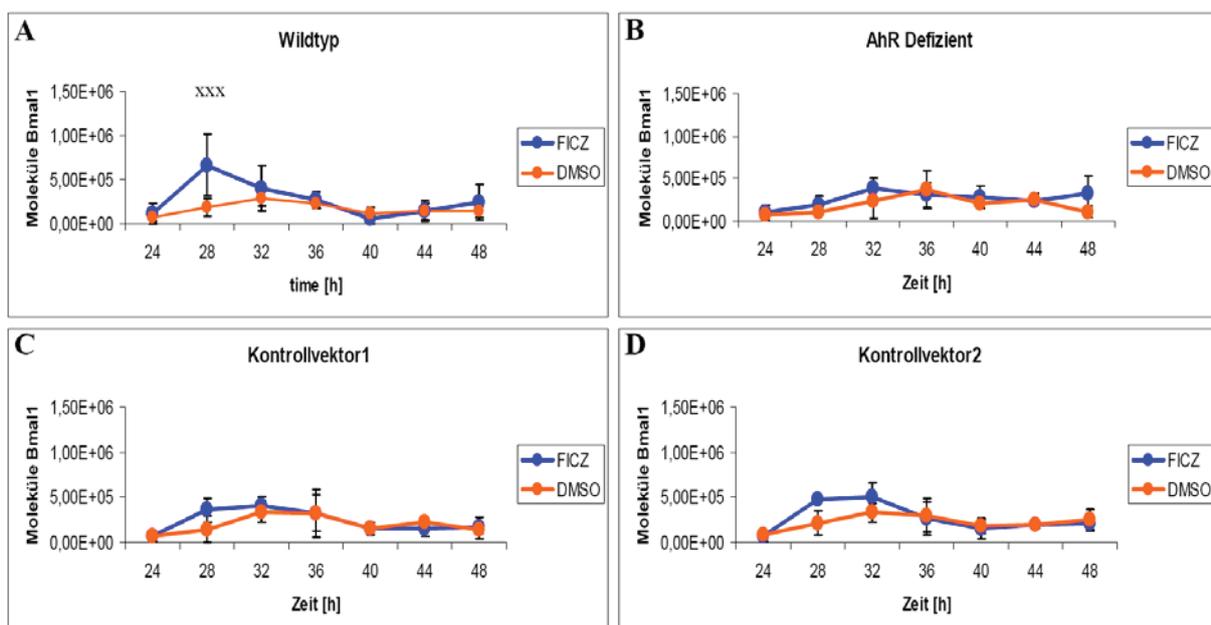


Abbildung 17 Bmal1-Expression nach AhR-Aktivierung 24 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), und Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 24 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ, beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Bmal1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mit der Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$, *TWO WAY ANOVA RM*)

Um die Abhängigkeit der Genexpression vom AhR zu verifizieren, wurden diese Ergebnisse auch in stabil transfizierten AhR-defizienten-HaCaT-Keratinocyten beziehungsweise, den entsprechenden Kontrollen durchgeführt.

Die Bmal1 Expression nach der AhR Aktivierung durch FICZ 24 Stunden nach dem Serumschock ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Expression der DMSO-Kontrolle stieg zunächst auf ihr Maximum bei 32-36 Stunden nach Serumschock an und fiel dann wieder ab. Die Zugabe von FICZ erhöhte vier Stunden nach Belastung bei den Wildtyp-Keratinocyten (A) signifikant die Bmal1-Expression ($P < 0,001$, *TWO WAY ANOVA RM*). Bei den Kontrollvektoren (C + D) und den AhR-defizienten Zellen (B) konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

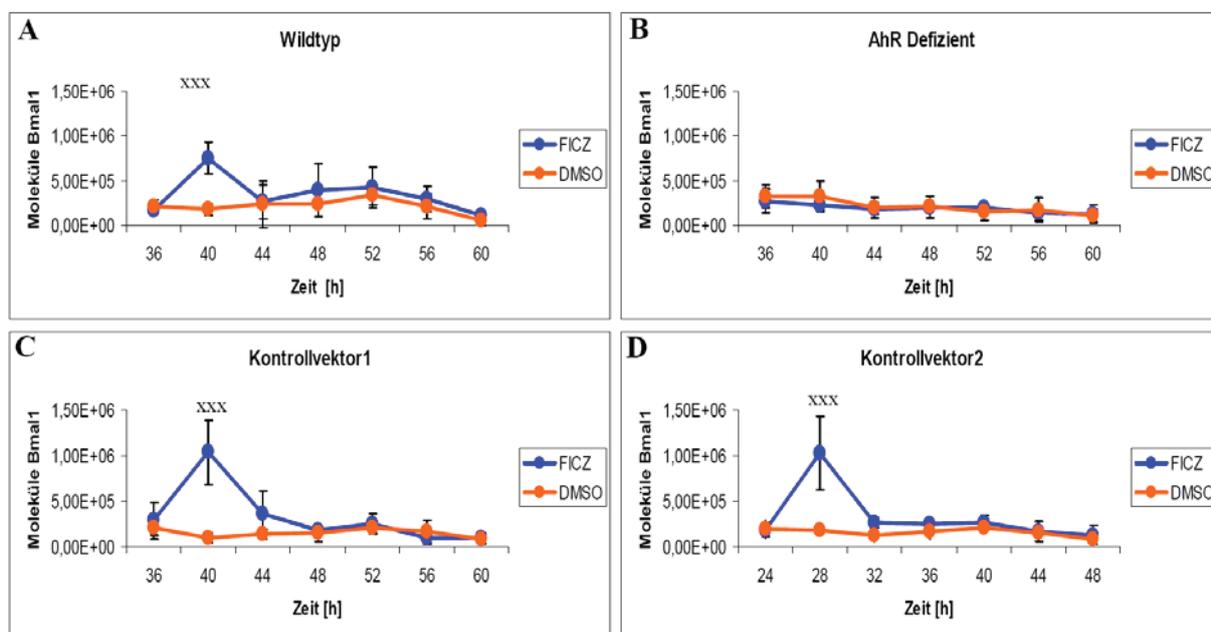


Abbildung 18 Bmal1-Expression nach AhR-Aktivierung 36 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR defiziente-(B), und Kontrollvektor 1- (C) und 2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 36 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Bmal1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mittels Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$ *TWO WAY ANOVA RM*)

Im zweiten Ansatz wurde FICZ 12 Stunden später als im ersten Ansatz zugegeben, also 36 Stunden nach dem Serumschock. Die Bmal1 Expression erreichte zunächst bei 40-44 Stunden ein Minimum, um dann wieder bei 52 Stunden nach Serumschock auf ein Maximum zu steigen. Vier Stunden nach der AhR-Aktivierung durch FICZ kam es zu einer signifikanten Zunahme der Bmal1-Expression bei den Wildtyp-(A), und den beiden Kontrollvektorkeratinocyten (C+ D). Die AhR-defizienten-Zellen (B) zeigten diesen Effekt nicht. Der Unterschied in der Bmal1-Expression war vier Stunden später wieder abklungen.

Als zweites Gen des circadianen Rhythmus wurde Per1 untersucht. Die Per1 Expression verläuft gegenläufig zur Bmal1 Expression.

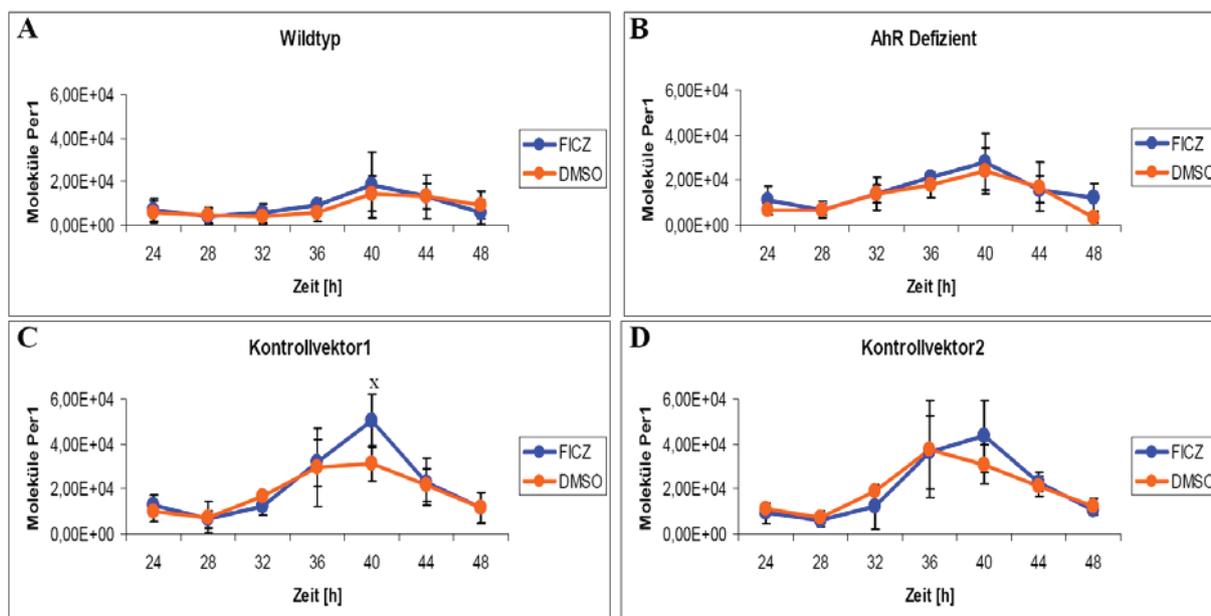


Abbildung 19 Per1-Expression nach AhR-Aktivierung 24 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), und Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 24 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Per1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mittels Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (x $P < 0,05$ *TWO WAY ANOVA RM*)

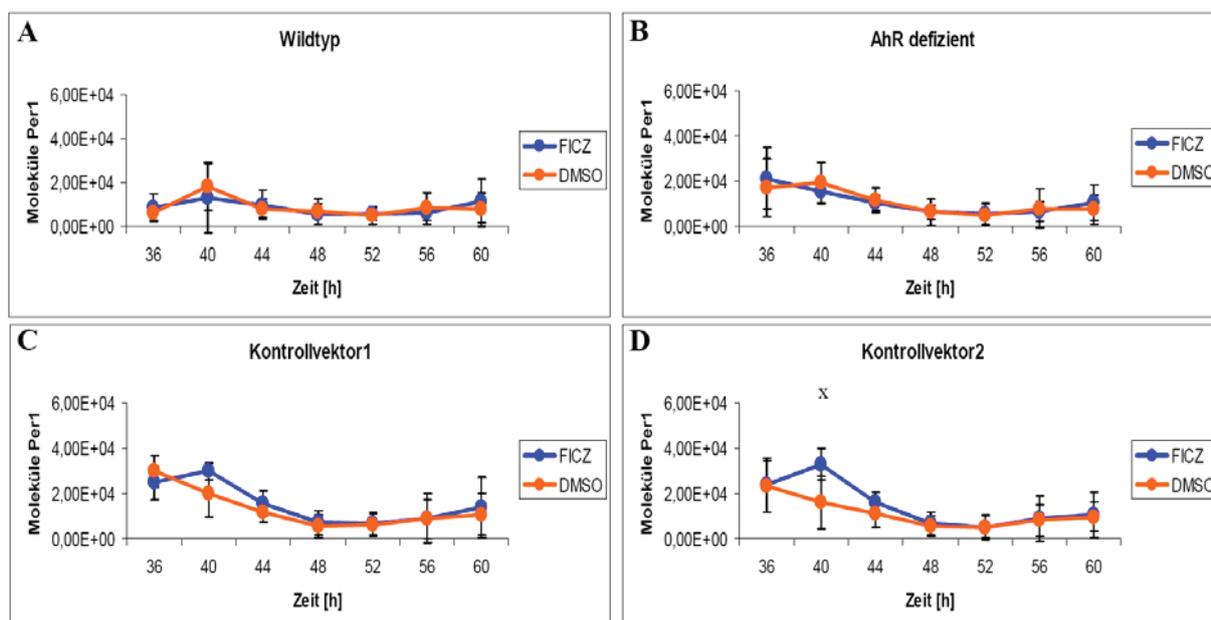


Abbildung 20 Per1 Expression nach AhR-Aktivierung 36 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), und Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 36 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Per1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mittels Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (x $P < 0,05$ *TWO WAY ANOVA RM*)

Die Per1-Expression erreichte nach 36 – 40 Stunden ihr Maximum. Wie in Abbildung 19 ersichtlich, bewirkte die Belastung mit 100 nM FICZ 24 Stunden nach Serumschock nur bei

den Kontrollvektor2-Zellen (C) eine signifikante Erhöhung der Genexpression während der maximalen Expression. In den anderen Zelltypen konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

Im zweiten Experiment, dargestellt in Abbildung 20, in dem die Zellen 36 Stunden nach dem Serumschock mit FICZ belastet wurden, zeigte sich nur bei den HaCaT-Kontrollvektor2 (D) eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle, 40 Stunden nach dem Serumschock. Dass jeweils nur die maximale Amplitude der Expression erhöht war, ist ein Indiz dafür dass der Einfluss der AhR-Aktivierung stark phasenabhängig ist.

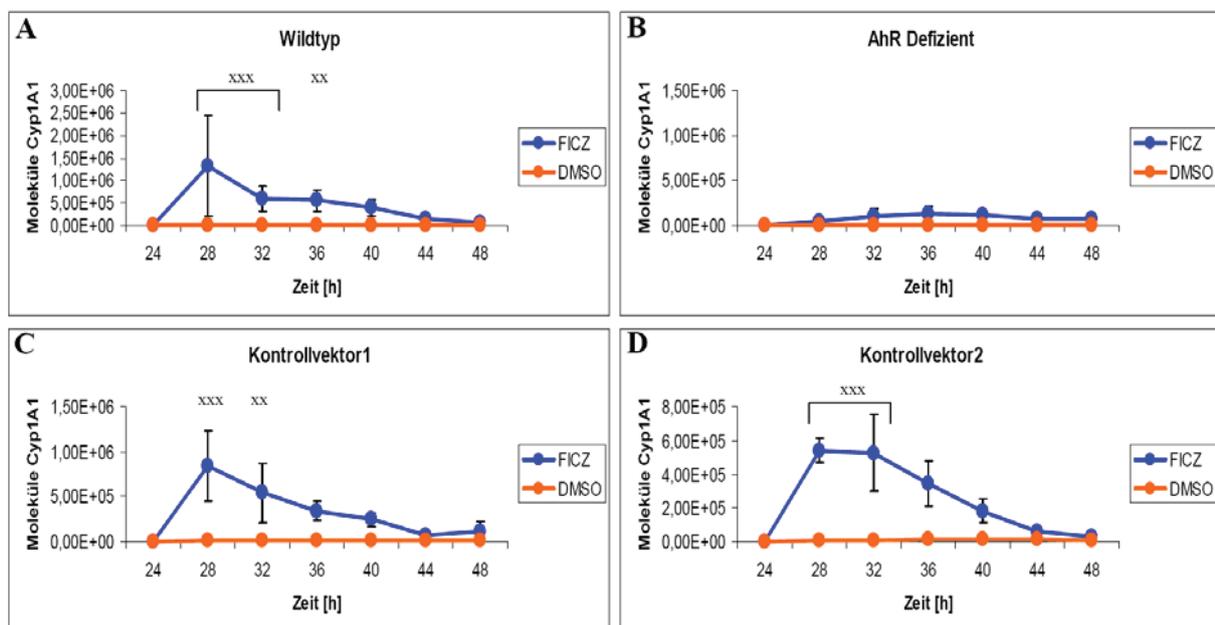


Abbildung 21 Cyp1A1-Expression nach AhR-Aktivierung 24 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 24 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Cyp1A1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mit der Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$, xx $P < 0,01$ *TWO WAY ANOVA RM*)

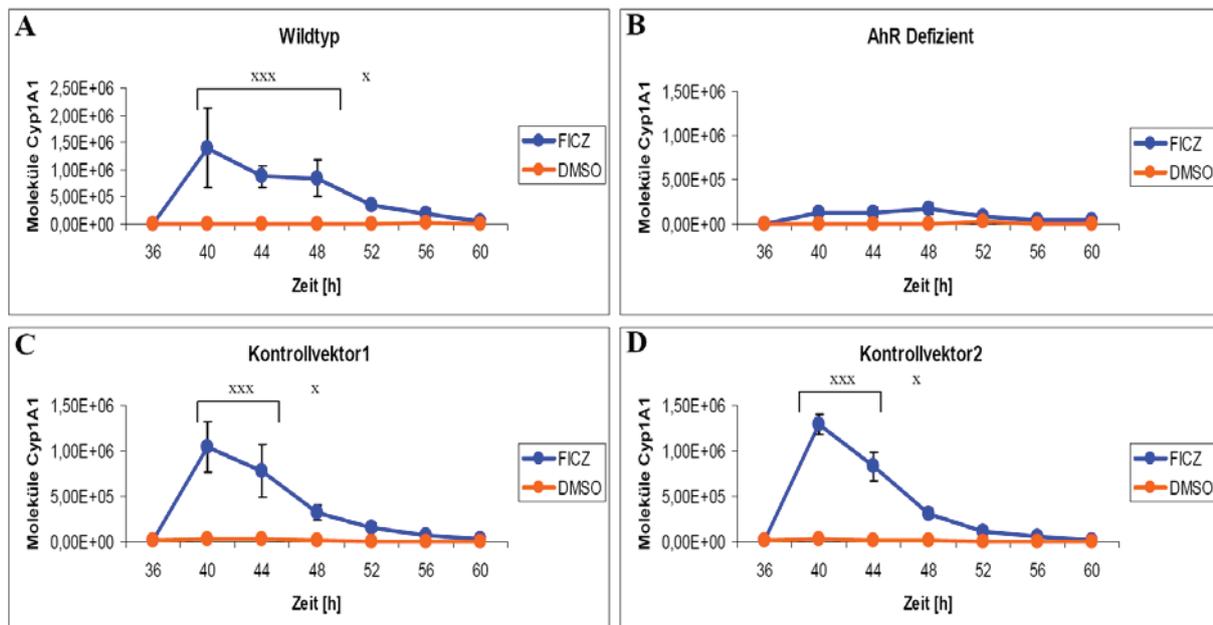


Abbildung 22 Cyp1A1-Expression nach AhR-Aktivierung 36 Stunden nach Serumschock: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-HaCaT-Keratinocyten (D) wurden 36 Stunden nach Serumschock mit 100 nM FICZ beziehungsweise 0,1% DMSO belastet und die Cyp1A1 Expression über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden mit der Real-Time-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$, x $P < 0,05$ *TWO WAY ANOVA RM*)

Die in Abbildung 21 und Abbildung 22 aufgeführte Cyp1A1-Expression diente der Kontrolle der AhR-Aktivierung. Bei den HaCaT Wildtyp-(A), den Kontrollvektor1-(C) und Kontrollvektor2-Zellen (D) induzierte die Zugabe von 100 nM FICZ die Cyp1A1-Expression signifikant nach 4 Stunden um das 70fache. Der Unterschied zwischen belasteten und unbelasteten Zellen blieb 8-12 Stunden bestehen, erst dann sank die Expression wieder soweit ab, dass es kein signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle gab. Die Expression der AhR defizienten Zellen (B), erreichte nur zehn Prozent des Wertes der Kontrollen. Die Induktion durch die Zugabe von FICZ war nicht signifikant verschieden von der DMSO-Kontrolle. Die Cyp1A1-Induktion war in den jeweiligen Zelltypen zwischen beiden Experimenten vergleichbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass in diesem Versuchsaufbau die Induktion phasenunabhängig vom circadianen Rhythmus war.

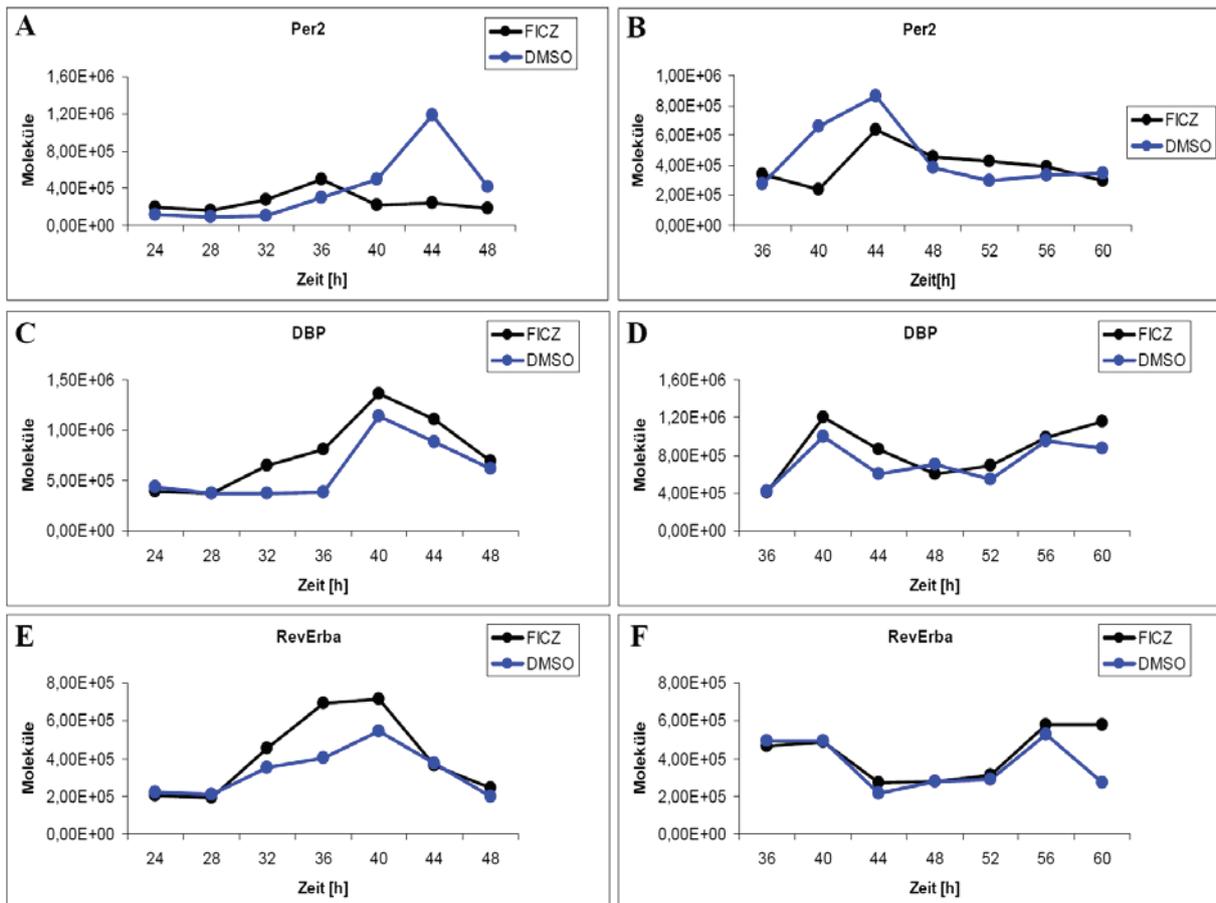


Abbildung 23 Abhängigkeit weiterer circadianer Gene von der AhR-Aktivierung: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden jeweils 24 Stunden (links) beziehungsweise 36 Stunden (rechts) nach Serumschock mit 100 nM FICZ behandelt. Die Lösungsmittelkontrolle war eine Zugabe von 0,1% DMSO zum Medium. Die mRNA-Expression der Gene der molekularen Uhr Per2 (A + B), DBP (C + D) und Rev-Erb α (E + F) wurden analysiert. Dargestellt sind die Daten eines Experiments.

Zusätzlich zu den Genen Bmal1 und Per1 wurden in einem Experiment mit HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten auch die Expression der circadianen Gene Per2, DBP und Rev-Erb ausgewertet. Die Expression von Per2 der DMSO-Kontrolle erreichte das Maximum der Expression 44 Stunden nach Serumschock (A + B). Die Aktivierung des AhR durch FICZ reduzierte die Per2-Expression zu diesem Zeitpunkt. Die Expression von DBP (C + D) wurde in diesem Experiment nicht durch die Aktivierung des AhR beeinflusst. Sie erreichte in den Versuchen 40 Stunden nach Serumschock das Maximum. Bei Rev-Erb α war im ersten Teil des Experiments (E) die Expression 36 bis 40 Stunden nach Serumschock nach Zugabe von FICZ leicht erhöht. In diesem Zeitraum lag auch bei der DMSO-Kontrolle das Maximum. Im zweiten Teil, des Experiments, bei dem erst 36 Stunden nach Serumschock FICZ hinzugegeben wurde (F), waren die Kurvenverläufe nach AhR-Aktivierung und DMSO-Kontrolle gleich. Zwischen 44 und 52 Stunden war hier die Expression auf ein Minimum gesunken, um 56 Stunden nach dem Serumschock wieder zu steigen.

Die Zugabe von FICZ in den ersten vier Stunden erhöhte signifikant die Bmal1-Expression in den Wildtyp-, und Kontrollvektorzellen. Dass dieser Effekt nicht bei den AhR-defizienten Zellen beobachtet werden konnte, ist ein Indiz für die AhR-Abhängigkeit. Die Auswirkung auf die Per1-Expression war deutlich schwächer. Hier konnte nur bei den Kontrollvektorzellen während der maximalen Ausprägung der Amplitude ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dies spricht dafür, dass der Effekt von FICZ auf den circadianen Rhythmus phasenabhängig ist und dass die AhR-Expression eher mit der Bmal1-Expression wechselwirkt als mit der Per1-Expression.

4.4 EXPRESSIONSVERHALTEN NACH AKTIVIERUNG DES AHR MIT 3-METHYLCHOLANTHREN

Die mRNA-Induktion von Cyp1A1 in Abbildung 11 war bei Belastung der HaCaT-Wildtyp-Zellen durch 100 nM FICZ nach 12 Stunden beendet. In diesem Experiment soll nun geklärt werden, wie sich der Einfluss des AhR auf den circadianen Rhythmus bei dauerhafter Aktivierung durch Zugabe eines anderen AhR-Agonisten verhält. Das für dieses Experiment gewählte 3-Methylcholanthren wurde in der eingesetzten Dosis wesentlich langsamer metabolisiert und sollte im Zeitraum dieses Experimentes für eine andauernde Aktivierung des AhR sorgen.

In diesem Experiment wurden HaCaT-Wildtyp-Keratinozyten mit einem Serumschock synchronisiert. 24 Stunden später erfolgte dann die Belastung mit dem AhR Agonisten 3-Methylcholanthren (10 μ M) beziehungsweise der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 % v/v). Die mRNA Expression wurde dann über einen Zeitraum von 48 Stunden kontinuierlich alle vier Stunden gemessen. Die Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente sind in Abbildung 24 zusammengefasst.

Die anhaltende Aktivierung wurde bei dem Kontrollgen Cyp1A1 (Abbildung 24C) deutlich. Im Gegensatz zur Induktion durch FICZ, welche ihr Maximum nach vier Stunden erreichte (Abbildung 11), konnte die Zugabe von 10 μ M 3-Methylcholanthren die Cyp1A1-Expression über einen wesentlich längeren Zeitpunkt erhöhen. In dem Zeitraum von 12 bis 40 Stunden nach der Belastung war sie signifikant gegenüber der Expression der DMSO-Kontrolle erhöht.

Die Bmal1-Expression (Abbildung 24A) zeigte in diesem Versuch eine deutliche circadiane Rhythmik mit zwei Wiederholungen. Die Aktivierung mit den AhR-Agonisten 3-Methylcholanthren führte zu einer signifikant ($P < 0,001$, *TWO Way RM ANOVA*) erhöhten Expression vier und 72 Stunden nach der Belastung. Bei der zweiten Amplitudenspitze bei 56 Stunden nach Serumschock konnte aufgrund der hohen Standardabweichung kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

Trotz der gesteigerten Aktivierung des AhR durch 3-Methylcholanthren und die dadurch bedingte erhöhte Expression von Bmal1 konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Per1-Expression beobachtet werden (B).

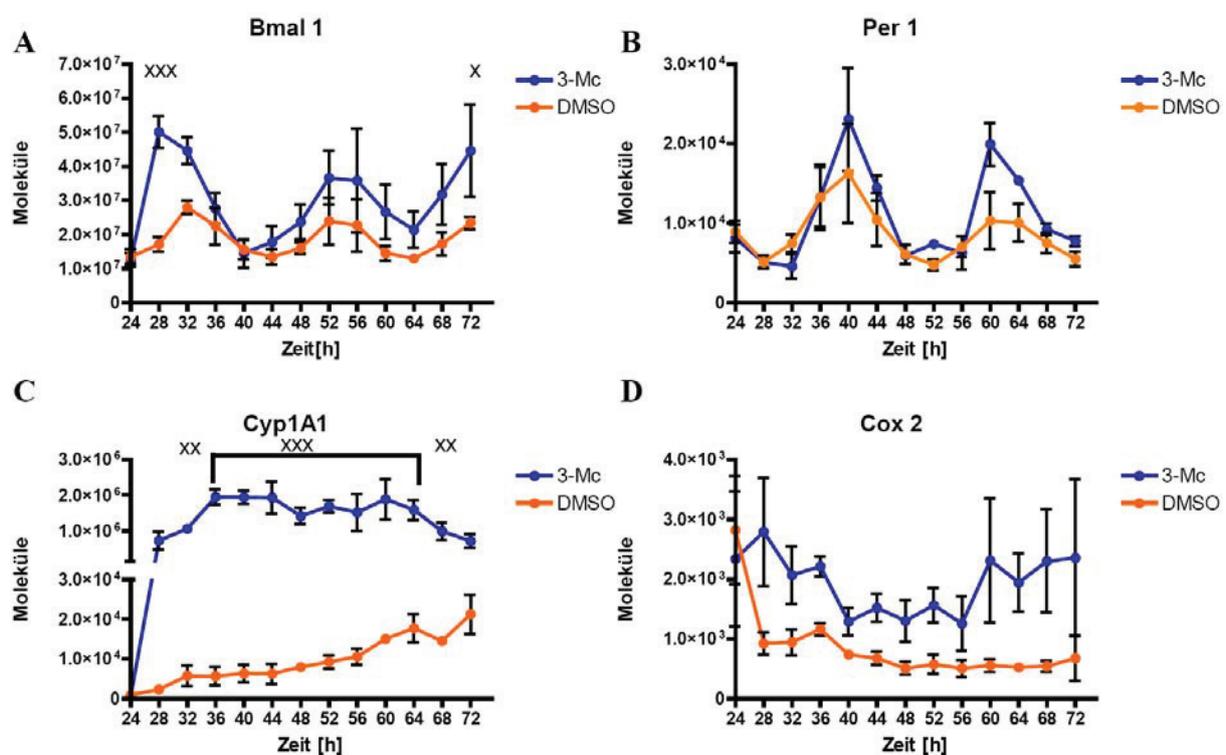


Abbildung 24 Genexpression 48 Stunden nach Serumschock und Aktivierung des AhR: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 24 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen jeweils mit 10 μM 3-Methylcholanthren (3-Mc) beziehungsweise 0,1 % (v/v) DMSO belastet. Die RNS der Proben ist über einen Zeitraum von 48 Stunden alle vier Stunden geerntet wurden. Die Genexpression von Bmal1 (A), Per1 (B), Cyp1A1 (C) und Cox2 (D) ist mit der Real-Time-PCR analysiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$, xx $P < 0,01$, x $P < 0,05$ *TWO WAY ANOVA RM*)

Als weiteres Kontrollgen diente die Expression der Cyclooxygenase2 (Cox2, Abbildung 24D). Die Expression von Cox2 wird ebenfalls durch die Aktivierung des AhR induziert [Fritsche et al., 2007]. In diesem Experiment wurde die Expression von Cox2 durch die

Belastung der Zellen mit 3-Methylcholanthren statistisch nicht signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle verändert.

Dieses Experiment diente auch dazu zu überprüfen, ob die Expression von Genen mit für die extrinsische Hautalterung relevanten Endpunkten durch den AhR beziehungsweise den circadianen Rhythmus beeinflusst wird. Für das in dieser Arbeit untersuchte Szenario der UVB-vermittelten Stressantwort sind vor allem die Expression von die extrazelluläre Matrix regulierenden Gene von Bedeutung. Sie sind ein wichtiger Faktor in der UV-induzierten Hautalterung. Exemplarisch wurde in diesem Versuch die Expression der Gene Col3A1 (A), MMP1 (B) und TIMP1 (C) untersucht. Die Expressionsverläufe nach Serumschock und AhR-Aktivierung sind in Abbildung 25 dargestellt.

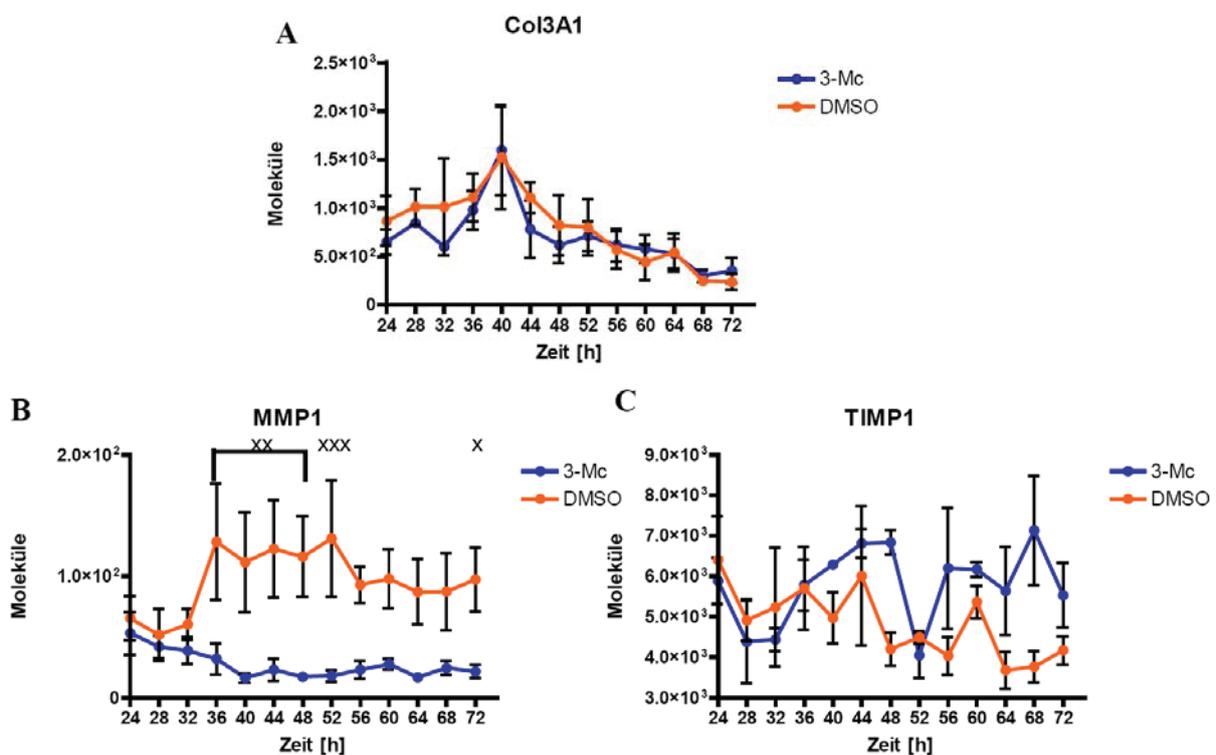


Abbildung 25 Genexpression von Genen der extrazellulären Matrix: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 24 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen jeweils mit 10 μ M 3-Methylchplanthren (3-Mc) beziehungsweise 0,1 % (v/v) DMSO belastet. Die RNS der Proben ist über einen Zeitraum von 48 Stunden alle vier Stunden geerntet wurden. Die Genexpression von Col3A1 (A), MMP1 (B) und TIMP1(C) ist mit der Real-Time-PCR analysiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (xxx $P < 0,001$, xx $P < 0,01$, x $P < 0,05$ *TWO WAY ANOVA RM*)

Bei der Col3A1-Expression (A) war kein Einfluss der AhR-Aktivierung zu erkennen. Der Expressionsverlauf nach 3-Methylcholanthren und DMSO-Belastung war nahezu gleich. Bei beiden Kurven war eine Spitze bei 36-40 Stunden nach Serumschock erkennbar, der schon

während der 72 Stunden Zeitreihen, zum Vergleich Abbildung 15, zu beobachten war und auf die Serumschockmethode zurückzuführen ist.

Die MMP1-Expression (B) wurde durch die AhR Aktivierung mit 3-Methylcholanthren in diesem Versuchsaufbau signifikant (Zeitraum 36-48 Stunden $P < 0,01$, 52 Stunden $P < 0,001$, 72 Stunden $P < 0,05$ *TWO WAY RM ANOVA*) reduziert.

TIMP1, der Inhibitor der MMP1, wiederum wurde nicht durch die Aktivierung des AhR reguliert. Die Schwankungen in der Genexpression lassen sich aufgrund der hohen Standardabweichung auch nicht direkt auf einen circadianen Rhythmus zurückzuführen.

Die Ergebnisse dieses Versuches untermauern die Hypothese, dass der AhR in HaCaT-Keratinocyten die Amplitude der Bmal1-Expression erhöht (Abbildung 24A). 3-Methylcholanthren als weiterer Agonist konnte ebenfalls die Bmal1-Expression vier Stunden nach Belastung induzieren. Trotz der dauerhaften Aktivierung des AhR blieb die circadiane Oszillation der Bmal1-Expression jedoch bestehen. Der letzte Wert der Bmal1-Expression war wieder statistisch signifikant erhöht. Die AhR-Aktivierung führte zu keiner signifikanten Veränderung der Per1-Expression (Abbildung 24B). Von den untersuchten Genen, welche die extrazelluläre Matrix regulieren, wurde in diesem Versuch nur die MMP1-Expression signifikant reduziert (Abbildung 25B). Diese Reduktion war dabei unabhängig vom circadianen Rhythmus.

4.5 ANALYSE DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER SIGNALKASKADEN AUF DEN CIRCADIANEN RHYTHMUS MITTELS INHIBITOREN

Um einen genaueren Einblick in die Wechselwirkung des AhR mit dem circadianen Rhythmus zu bekommen, wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Bmal1-, Per1-, Cyp1A1- und Cox2-Expression gemessen. Von Priorität waren vor Allem jene Inhibitoren deren Modulation des AhR-Signalwegs schon wissenschaftlich beschrieben worden sind.

Untersucht wurden hierbei die Expression der circadianen Gene Bmal1 und Per1 sowie die Kontrollgene der AhR Aktivierung Cyp1A1 und Cox2.

2-APB und Nifedipin sind Inhibitoren des Calcium-Signalweges. 2-APB inhibiert dabei einen Ca^{2+} -Kanal und Nifedipin den IP3 induzierten Calcium-Einstrom. Beide Inhibitoren wurden

von Dong und Matsumura [Dong and Matsumura F., 2008] eingesetzt, um die TCDD induzierte Ausschüttung von Arachidonsäure zu blockieren.

In diesem Versuch führte die Zugabe von 2-APB und Nifedipin im Zusammenhang mit der FICZ-Inkubation zu keiner signifikanten Veränderung der Expression von Bmal1 (A), Per1 (B), Cyp1A1 (C) oder Cox2 (D).

Bisindolamid IX (Bis IX) ist ein Inhibitor der Proteinkinasen C. Diese sind an einer Vielzahl von Proteinphosphorylierungen beteiligt, so auch an der AhR-abhängigen Aktivierung von Cyp1A1 [Lee and Yang J. H., 2010; Machemer and Tukey R. H., 2005; Long et al., 1998; Chen and Tukey R. H., 1996]. Die Inhibierung der Proteinkinase C führte zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der untersuchten Gene.

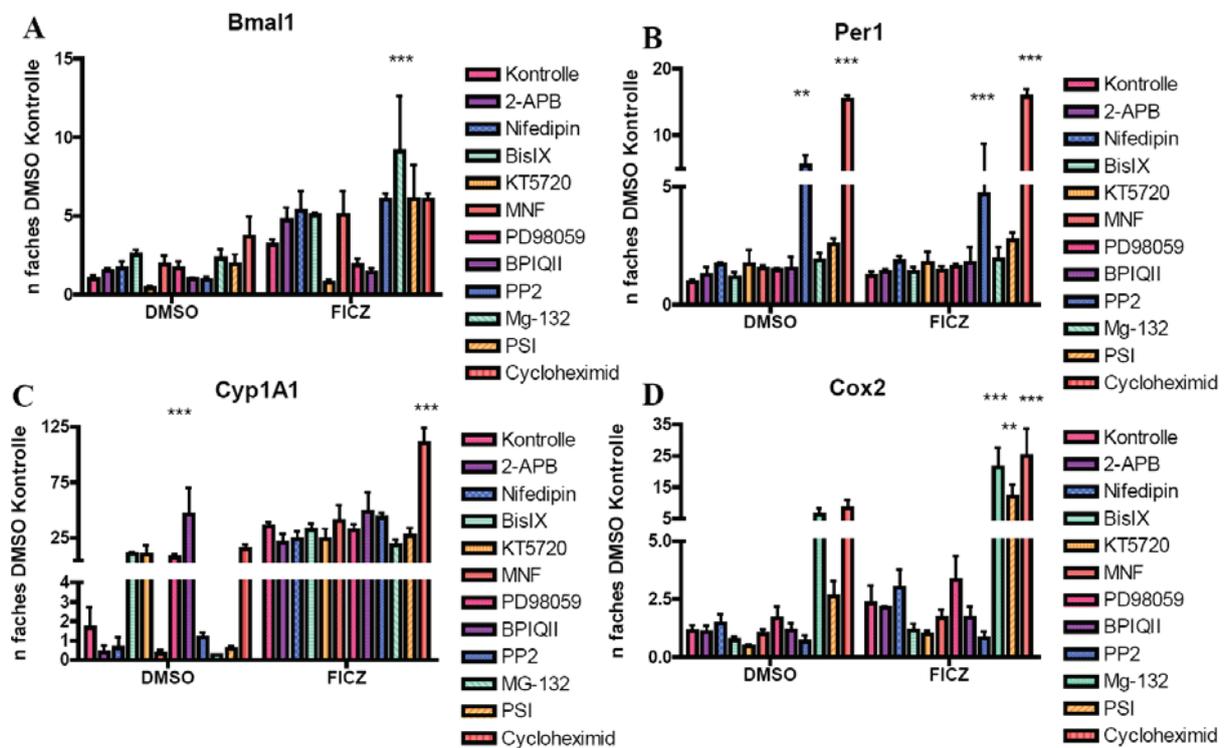


Abbildung 26 Inhibitor-Studien: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert, 36 Stunden danach mit 100 nM FICZ belastet, die RNS 4 Stunden nach Belastung extrahiert und mittels Real-Time-PCR analysiert. Eine Stunde vor der Belastung wurden die Zellen jeweils mit verschiedenen Inhibitoren vorinkubiert: 50 μ M 2-APB, 25 μ M Nifedipin, 1 μ M Bis IX; 1,8 μ M KT 5720, 10 μ M MNF, 37,4 μ M PD98059, 3 μ M BPIQ II, 10 μ M PP2, 10 μ M MG132, 10 μ M PSI und 25 μ M Cycloheximid (*TWO WAY ANOVA* ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$)

KT5720 ist ein Inhibitor der Proteinkinase A, einer cAMP-abhängige Serin/Threoninkinase. Mehrere Arbeitsgruppen berichten über eine Störung des cAMP-Signalwegs durch Dioxin. Oesch-Bartlomowicz und Oesch [Oesch-Bartlomowicz and Oesch F., 2009] veröffentlichten

eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Expressionen der untersuchten Gene wurden durch KT5720 nicht signifikant beeinflusst.

MNF ist ein Antagonist des AhR-Signalweges [Lu et al., 1995]. In diesem Versuch konnte kein Effekt von MNF auf die Expression der untersuchten Gene gefunden werden.

PD98059 ist ein MEK-Inhibitor. Unsere Arbeitsgruppe [Fritsche et al., 2007] konnte zeigen, dass die AhR-abhängige Antwort auf die UVB-Strahlung teilweise über Phosphorylierungskaskaden über die Aktivierung der c-src-Kinase, dem EGF-Rezeptor, RAS-Kinase, MEK und ERK läuft. Dieser Signalweg sollte in diesem Versuch durch verschiedene Inhibitoren an mehreren Stellen blockiert werden (PD98059 ein MEK-Inhibitor, BPIQII blockiert den EGFR und PP2 die src-Kinase).

Die Zugabe von PD98059 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression.

BPIQII konnte die Expression von Cyp1A1 (C) der DMSO-Kontrolle signifikant um das 50fache steigern, hatte aber keinen additiven Effekt auf die FICZ-Induktion.

Der MEK-Inhibitor PP2 war in der Lage die Expression von Per1 (B) sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch nach FICZ-Zugabe signifikant zu steigern.

Eine weitere Form des nichttranskriptionellen Signalweges ist die Funktion des AhR als Liganden-abhängige-E3-Ubiquitin-Ligase bei dem proteasomalen Abbau des Östrogen-Rezeptors [Ohtake et al., 2007]. Die Inhibitoren MG-132 und PSI blockieren den proteasomalen Abbau. Die Inhibierung führte bei MG-132 zu einer signifikanten ($P < 0,001$ *TWO WAY ANOVA RM*) Erhöhung der Bmal1-Expression (A) nach AhR-Aktivierung. Die Per1-(B) und Cyp1A1-(C) waren nicht betroffen. Die Cox2-Expression wurde durch Zugabe von MG-132 stark erhöht (signifikant bei AhR-Aktivierung $P < 0,001$). PSI zeigte ein ähnliches Ergebnis wie MG-132. Die Steigerung der Bmal1-Expression war geringer als bei Mg-132. Die Cox2-Expression war konstitutiv erhöht und ließ sich durch Zugabe FICZ noch signifikant steigern ($P < 0,01$).

Der letzte in diesem Assay eingesetzte Inhibitor ist Cycloheximid. Er blockiert die Bindung und das Ablösen der tRNS an Ribosomen und verhindert somit die Translation neuer Proteine. Die Inhibierung der Translation führte zu einer starken Veränderung des Expressionsprofils in diesem Experiment. Bei gleichzeitiger Zugabe von FICZ erhöhte sich die Expression von Per1- ($P < 0,001$)(B), CyP1A1- ($P < 0,001$)(C) und Cox2-Expression ($P < 0,001$)(D) statistisch signifikant. Zudem konnte Cycloheximid auch die Expression von Per1(B) der DMSO-Kontrolle signifikant erhöhen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Auswirkung der Inhibitoren bis auf MG-132 auf die Bmal1-Expression zu gering waren, um statistisch belegbare Unterschiede messen zu können. MG-132 führte additiv zu einer gesteigerten Induktion der Bmal1-Expression nach der FICZ-Zugabe. Der Trend, dass die Hemmung des c-src-Kinase-EGFR-MEK-ERK-Signalwegs auch zu einem Verlust der FICZ-induzierten Steigerung der Bmal1-Expression führte, konnte nicht statistisch belegt werden, da die Unterschiede im Verhältnis zu den Standardabweichungen zu gering waren. Ebenfalls interessant war die signifikante Induktion der Per1-Expression durch PP2.

4.6 CHARAKTERISIERUNG VON BMAL1-DEFIZIENTEN HACAT-KERATINOZYTEN

Um die Effizienz der stabil transfizierten Bmal1-defizienten Zellen zu kontrollieren, wurde der Expressionsverlauf der Zellen nach einem Serumschock und einer AhR-Aktivierung durch 3-Methylcholanthren mit denen der Wildtyp-Zellen verglichen.

Wie in Abbildung 27 zu sehen, führte das Bmal1-shRNS-Konstrukt zu einer Senkung der mRNA auf 20 – 50% des Normalwertes. Am deutlichsten war der Unterschied in den Maxima der Bmal1 Expressionen. Nach vier Stunden kam es durch die Aktivierung des AhR zu einem Anstieg der Expression bei den Kontrollen. Auch bei den Bmal1-defizienten Zellen verdoppelte sich die Molekülanzahl der 3-Methylcholanthren behandelten Zellen gegenüber der DMSO-Kontrolle. Jedoch war der Ausgangswert nach der Reduktion deutlich reduziert. Nach 16 Stunden erreichte der mRNA-Gehalt ein zweites Maximum. Auch hier wurde die Expression durch die 3-Methylcholanthren-Inkubation erhöht. Die stabil transfizierte shRNS konnte somit insgesamt die Bmal1-Expression reduzieren. Die Induktion der Bmal1-Expression nach AhR-Aktivierung ist aber auch bei diesen Zellen, wenn auch verringert, zu beobachten.

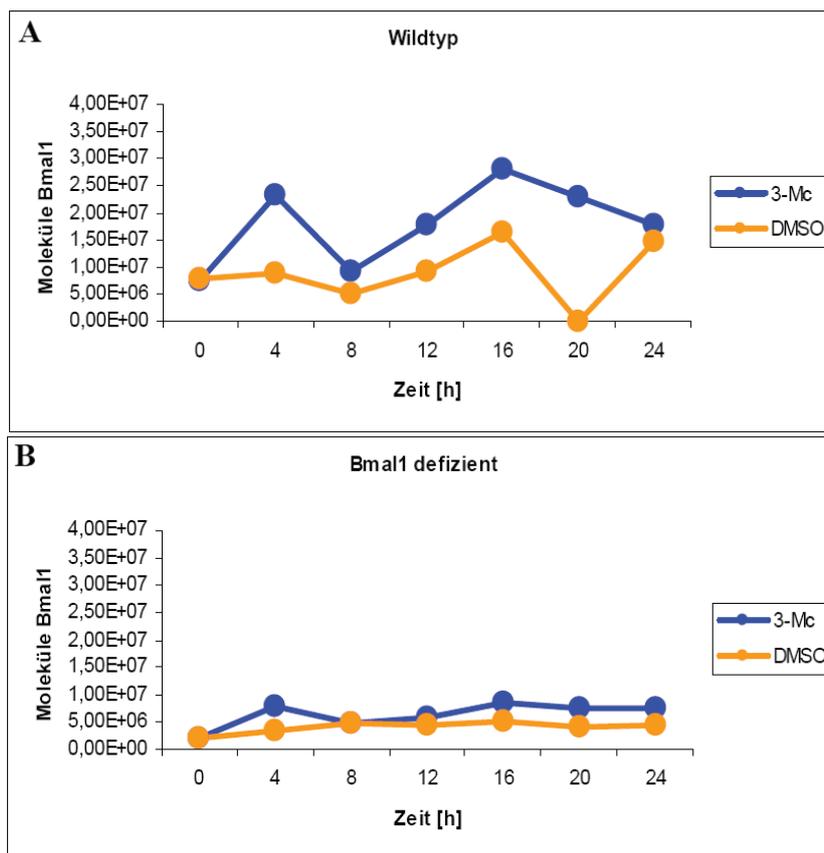


Abbildung 27 Bmal1-Expression nach Bmal1-Reduktion: Wildtyp-(A) und Bmal1-defiziente HaCaT-Keratinocyten (B) wurden mittels Serumschock synchronisiert. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren beziehungsweise 0,1 % DMSO belastet. Die Bmal1-Expression wurde mit der Real-Time-PCR über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden gemessen. Dargestellt sind die Daten eines Experiments.

Daher sollte in diesem Versuch auch überprüft werden, ob die Bmal1-Reduktion Auswirkungen auf die durch Bmal1 regulierten Gene hat. Der Expressionsverlauf von Per1, Per2 und Cry2, nicht dargestellt, wurde ebenfalls mittels Genexpressionsanalysen untersucht. Es konnten keine Veränderungen in der Expression bei diesen Genen festgestellt werden. Die Induktion von Cyp1A1 durch den AhR wurde, wie in Abbildung 28 gezeigt, von der Bmal1-shRNS-Expression nicht beeinflusst. Auch die basale Expression änderte sich nicht. Neben der Genexpression sollte die Auswirkung der Bmal1-Reduktion zusätzlich auch auf Proteinebene untersucht werden.

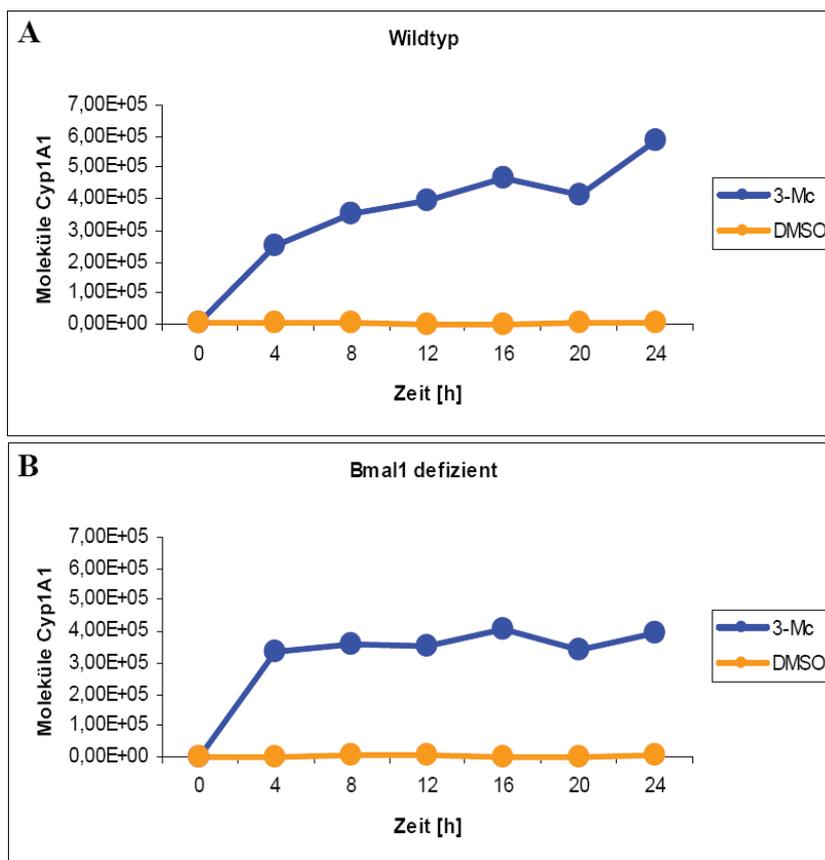


Abbildung 28 Cyp1A1-Expression nach Bmal1-Reduktion: Wildtyp-(A) und Bmal1-defiziente-HaCaT-Keratinocyten (B) wurden mittels Serumschock synchronisiert. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren beziehungsweise 0,1 % DMSO belastet. Die Cyp1A1-Expression wurde mit der Real-Time-PCR über einen Zeitraum von 24 Stunden alle vier Stunden gemessen. Dargestellt sind die Daten eines Experiments.

Die mRNA wird von den Ribosomen in Proteine umgeschrieben. Zwischen dem Gehalt an mRNA und funktionellem Protein kann durch posttranskriptionelle Modifikationen eine erhebliche Differenz bestehen. Deswegen wurde in diesem Experiment versucht die Ergebnisse aus den vorausgegangenen mRNA-Experimenten auch auf Proteinebene zu bestätigen. Für die Proteine des circadianen Rhythmus standen nur wenige verifizierte spezifische, kommerziell erhältlich Antikörper zur Verfügung. Eine Auswahl davon wurde hier verwendet, um zu überprüfen ob sie für die in dieser Arbeit vorhandene Fragestellung nutzbar sind. Insbesondere waren jene Proteine von Interesse, von denen eine Mitwirkung bei der Bmal1-Regulation bekannt ist. Dies sind Rev-Erba und die Proteine der ROR-Familie. Diese Proteine konkurrieren um die gleiche Bindestelle im Bmal1-Promotorbereich und das Verhältnis zwischen Rev-Erba und den ROR-Proteinen entscheidet über die Bmal1-Expression [Guillaumond et al., 2005]. Desweiteren wurde jeweils noch ein Antikörper für Bmal1 und Per1 auf ihre Verwendbarkeit im HaCaT-Keratinocyten-System getestet. Im Western-Blot wurden die ersten 12 Stunden nach Belastung untersucht.

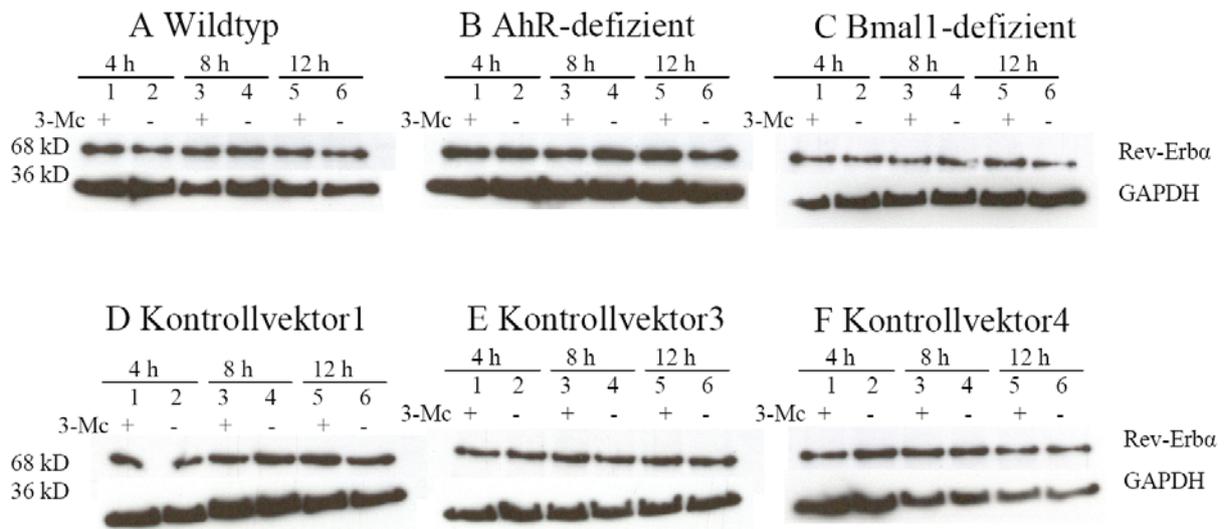


Abbildung 29 Western-Blot von Rev-Erba: Wildtyp-(A), AhR-defiziente-(B), Bmal1-defiziente-(C), Kontrollvektor1-(D), Kontrollvektor3-(E) und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinocyten (F) wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren (1, 3, und 5) beziehungsweise mit 0,1 % DMSO (2, 4, und 6) belastet und nach vier Stunden (1 + 2), 8 Stunden (3 + 4) und 12 Stunden (5 + 6) geerntet. Die Proben wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen Rev-Erba inkubiert. GAPDH diente zum Proteinabgleich.

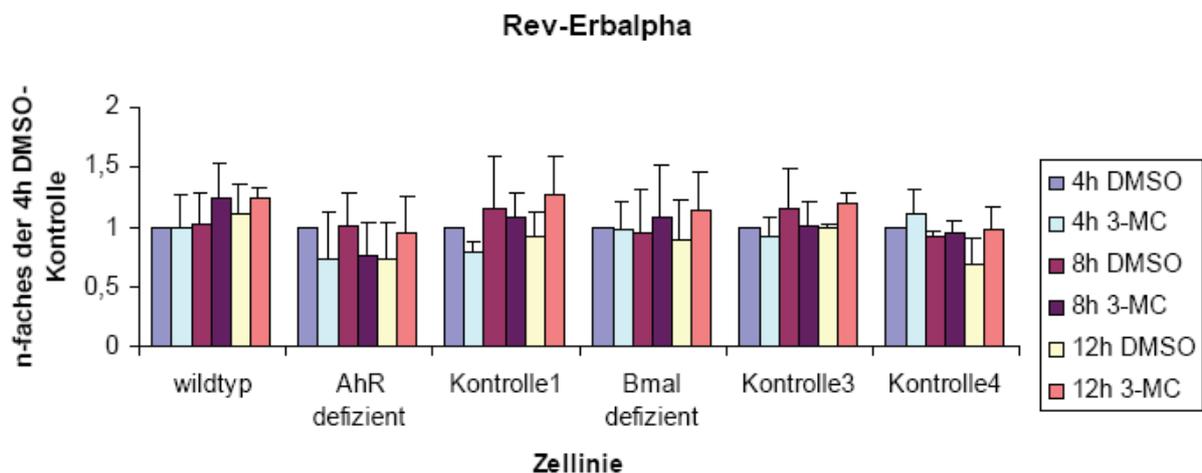


Abbildung 30 Quantitative Auswertung des Rev-Erba Western-Blots: Wildtyp-, AhR-defiziente-, , Kontrollvektor1-, Bmal1-defiziente, Kontrollvektor3- und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden danach wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren bzw. 0,01% (v/v) DMSO belastet. Das Gesamtprotein wurde 4-, 8- und 12 Stunden nach der Belastung geerntet und Rev-Erba und das Kontrollprotein GAPDH mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Blot-Intensität ist quantitativ erfasst worden und das Verhältnis von Rev-Erba zu GAPDH auf die DMSO Kontrolle 4 Stunden nach Belastung normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche.

Rev-Erb α ist ein 66,8 kD großes Protein. Es bindet an RORE/RevRE-Sequenzen im Bmal1-Promotorbereich und inhibiert die Transkription von Bmal1. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper lieferte eine spezifische Bande im richtigen Größenbereich von ungefähr 70 kD. Repräsentative *Western-Blots* eines Experiments sind in Abbildung 29 abgebildet. Es konnte keine Auswirkung der AhR-Aktivierung auf die Menge an Rev-Erb α in den Proben gefunden werden.

Die Gegenspieler von Rev-Erb α bei der transkriptionellen Kontrolle der Bmal1-Expression sind die Rezeptoren ROR α , β und γ . Diese konkurrieren mit Rev-Erb α um die Bindestelle am Promotorbereich und erhöhen die Bmal1-Transkription.

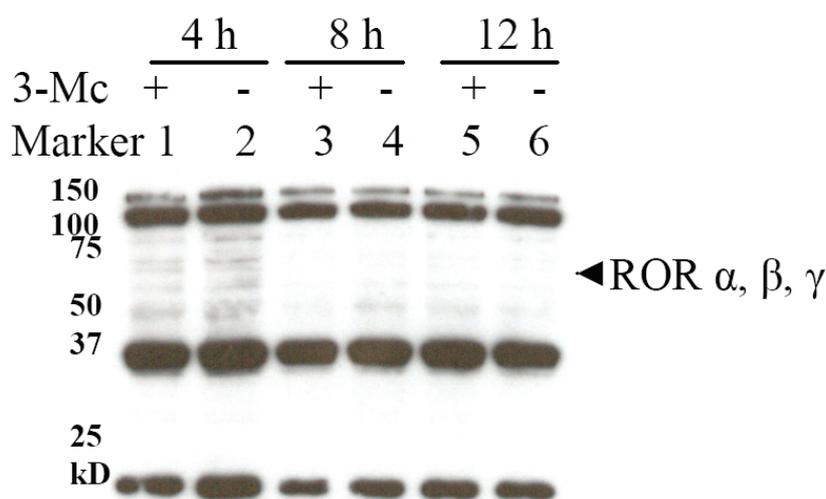


Abbildung 31 Western-Blot von HaCaT Keratinozyten mit ROR- α , β , δ spezifischen Antikörper: HaCaT-Wildtyp-Keratinozyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren (1, 3, und 5) beziehungsweise mit 0,1 % DMSO (2, 4, und 6) belastet und nach 4- (1 + 2), 8- (3 + 4) und 12 Stunden (5 + 6) geerntet. Die Proben wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen ROR α , β und γ inkubiert.

Es wurden zwei verschiedene ROR-Antikörper getestet. Der erste erkennt alle drei Rezeptor-Isoformen. Mit diesem Antikörper wurde ein unspezifisches Bandenmuster erhalten mit vier intensiven Banden im Bereich von 120-, 100-, 35- und 10-kD. Alle bekannten Isoformen der drei Rezeptoren befinden sich im Größenbereich von 50-65 kD. In diesem Größenbereich konnte jedoch in diesem Experiment kein starkes Signal detektiert werden. Dieser Antikörper ist daher für die in der Arbeit aufgeworfenen Fragestellungen ungeeignet.

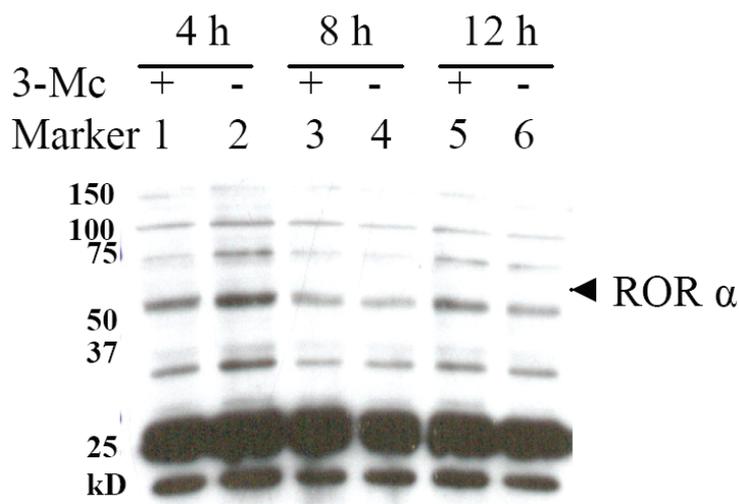


Abbildung 32 Western-Blot von ROR α : HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden nach dem Serumschock wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren (1, 3, und 5) beziehungsweise mit 0,1 % DMSO (2, 4, und 6) belastet und nach 4-(1 + 2), 8- (3 + 4) und 12 Stunden (5 + 6) geerntet. Die Proben wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen ROR α inkubiert.

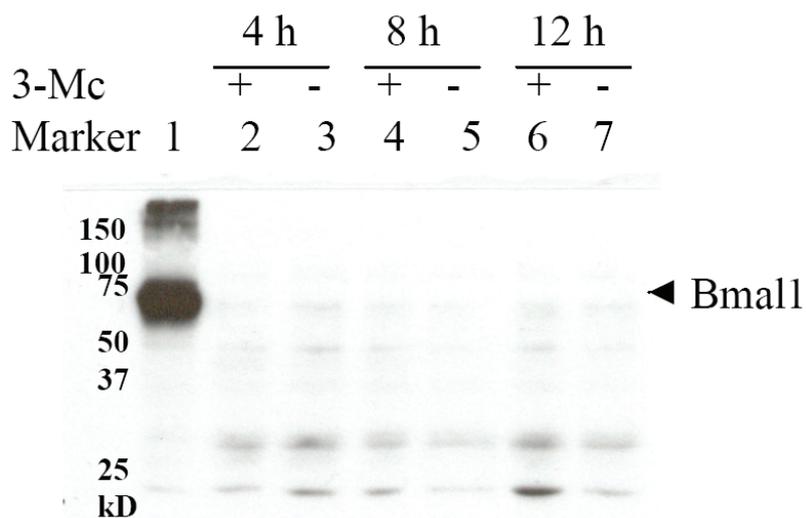


Abbildung 33 Bmal1-Western-Blot: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden nach Serumschock wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren (2, 4 und 6) beziehungsweise mit 0,1 % DMSO (3, 5 und 7) belastet und nach 4 Stunden (2 + 3), 8 Stunden (4 + 5) und 12 Stunden (6 + 7) geerntet. Als Kontrolle dienten mit einem Bmal1-Überexpressionskonstrukt transient transfizierte HepG2-Zellen (1). Die Proben wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen Bmal1 inkubiert.

Der zweite Antikörper ist spezifisch gegen ROR α gerichtet. Aber auch dieser lieferte in HaCaT Keratinocyten, wie in Abbildung 32 dargestellt, vor allem unspezifische Banden. Die Banden mit der stärksten Intensität liegen bei 25- beziehungsweise 10 kD und damit viel zu niedrig für ein funktionelles ROR α Protein. Somit konnte in dieser Arbeit kein ROR spezifischer Antikörper für eine HaCaT-Keratinocyten-Kultur etabliert werden.

Das dritte Protein, welches mittels Antikörper-Nachweis analysiert werden sollte, war Bmal1. Hierfür wurde ein von der Arbeitsgruppe Schibler in Kaninchen generierter Antikörper durch Prof. Hans Reinke zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrolle diente das Gesamtprotein von HePG2-Zellen, die transient mit einem Bmal1-Flag-Überexpressionskonstrukt transfiziert wurden.

Bei dem Überexpressionskonstrukt generierte dieser Antikörper eine sehr intensive Bande auf der richtigen Höhe bei 68 kD. In den nicht transfizierten HaCaT-Keratinocyten war das Bandenmuster wesentlich unspezifischer. Es traten mehrere unterschiedliche Banden auf, die meist kleiner als 68 kD waren. Jedoch ist auf der Höhe des Überexpressionskonstrukts auch eine sehr schwache Bande in den Proteinproben der HaCaT-Keratinocyten sichtbar. Ein repräsentativer Blot ist in Abbildung 33 abgebildet. Im Vergleich zum Überexpressionskonstrukt war demnach deutlich weniger Bmal1-Protein in den HaCaT-Keratinocyten vorhanden. Die Analyse auf Proteinebene mittels *Western-Blot*-Experimenten war dadurch deutlich erschwert. Die generelle Eignung konnte jedoch mit dem Überexpressionskonstrukt bestätigt werden.

Der letzte Antikörper, der in den *Western-Blot*-Experimenten getestet wurde, erkannte spezifisch Per1. Da die mRNS-Expression schon in der Real-Time-PCR umfangreich analysiert wurde, bot es sich an auch auf Proteinebene das Verhalten von Per1 auf die AhR-Aktivierung zu vergleichen.

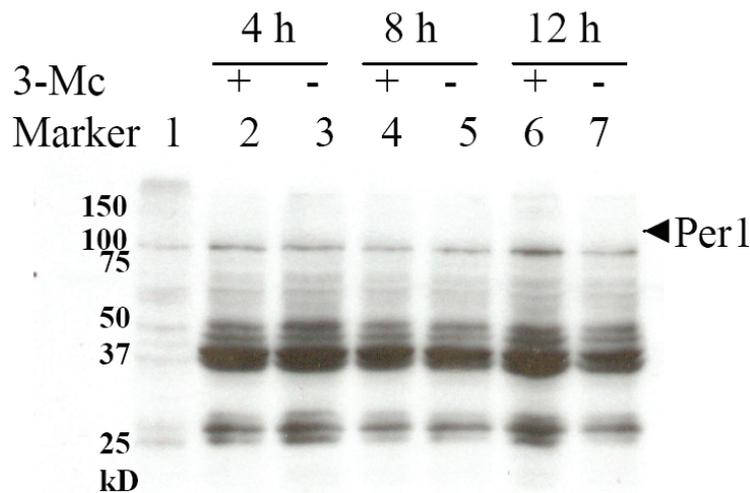


Abbildung 34 Per1 Western-Blot: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert. 36 Stunden nach Serumschock wurden die Zellen mit 10 μ M 3-Methylcholanthren (2, 4 und 6) beziehungsweise mit 0,1 % DMSO (3, 5 und 7) belastet und nach 4- (2 + 3), 8-(4 + 5) und 12 Stunden (6 + 7) geerntet. Als Kontrolle dienten mit einem Per1-Überexpressionskonstrukt transient transfizierte HepG2-Zellen (1). Die Proben wurden mit einem Antikörper spezifisch gegen Per1 inkubiert.

Wie bei Bmal1 wurden auch hier zur Kontrolle HepG2-Zellen transient mit einem Überexpressionskonstrukt transfiziert. In Spalte 1 in Abbildung 34 ist ein repräsentativer Western-Blot mit diesem Konstrukt zu sehen. Per1 hat eine molekulare Masse 136 kD. Die stärkste Bande ist leicht oberhalb von 100 kD zu erkennen. Die Überexpression war verglichen mit dem Bmal1-Überexpressionskonstrukt schwächer. Auf gleicher Höhe war auch bei den HaCaT Proben eine Bande zu erkennen. Zusätzlich traten hier vier starke Banden zwischen 37 und 50 kD auf. Und weitere zwischen 35 und 37 kD. Die höchste Bande bei 100 kD ist ebenfalls zu klein für Per1.

Das Fazit dieser Untersuchungen ist, dass das in dieser Arbeit verwendete Bmal1-shRNS-Konstrukt die Expression von Bmal1 um bis zu 50% reduzieren konnte. Diese Reduktion hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression anderer circadianer Gene wie Per1, Per2 und Cry2. Die Reduktion der Bmal1-Expression konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden, da der Bmal1-Antikörper kein spezifisches Signal in HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten lieferte. In mit einem Überexpressionskonstrukt transfizierte HepG2-Zelle funktionierte dieser Antikörper jedoch sehr gut. Der einzige Antikörper, der ein spezifisches Signal erzeugte, war der gegen Rev-Erb α gerichtete Antikörper. In diesem Versuch konnte jedoch mit diesem Antikörper keine Veränderung bei den Bmal1-defizienten oder den ebenfalls getesteten Ahr-defizienten Zellen gegenüber den Wildtyp-Zellen gemessen werden.

4.7 ANALYSE DES CIRCADIANEN RHYTHMUS MITTELS REAL-TIME-LUCIFERASE-ASSAY

Eine weitere Methode, die Ergebnisse aus den Real-Time-PCR-Experimenten zu verifizieren, ist der Real-Time-Luciferase-Assay. Mit Hilfe eines Bmal1-Promotorkonstruktes, welches das Reportergen Luciferase steuert, kann in diesem Assay der circadiane Rhythmus in lebenden Zellen beobachtet werden. Kontrolliert durch den Promotor, wird die Luciferase in einem circadianen Rhythmus analog zu Bmal1 produziert und die als Lumineszenz gemessene Aktivität besitzt ähnlich wie die mRNA-Expression einen 24 Stunden-Rhythmus. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit ihr kontinuierlich über mehrere Tage hinweg gemessen werden kann, ohne die Proben in diesem Zeitraum durch die Messung zu stören. Die zeitliche Auflösung ist mit zehn Minuten deutlich höher als es bei der manuellen Probennahme der mRNA-Analyse möglich ist. Dieses System wird deshalb bevorzugt genutzt, um die Auswirkung von Substanzapplikationen auf den circadianen Rhythmus in der Zellkultur zu untersuchen [Hirota et al., 2010].

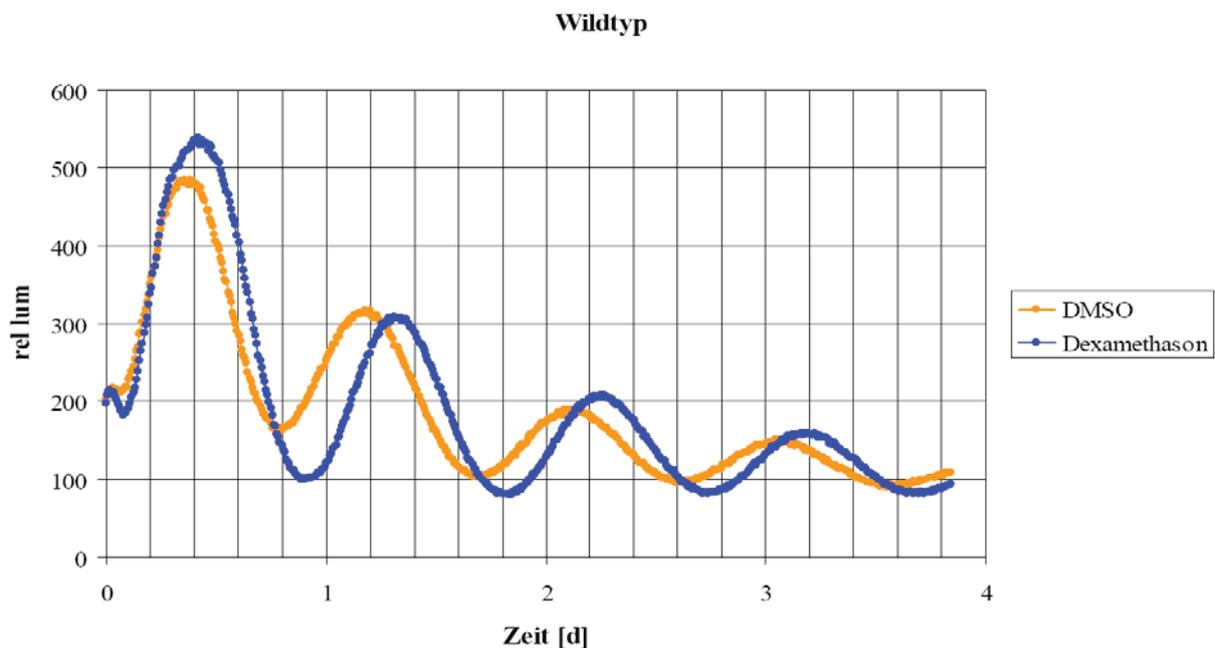


Abbildung 35 Analyse der Bmal1-Promotor-Luciferase-Aktivität von Wildtyp-HaCT-Keratinocyten nach DMSO beziehungsweise Dexamethason-Behandlung: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden konfluent in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gegen das Luciferase-Medium ausgetauscht und die Zellen für 24 Stunden im Inkubator akklimatisiert. Zur Etablierung des Versuchs wurde ein Teil des Versuchs mit Dexamethason synchronisiert, da diese Methode standardmäßig im Labor Reinke verwendet wurde. Die Lumineszenz der Zellen wurde über einen Zeitraum von vier Tagen im Lumicycler gemessen.

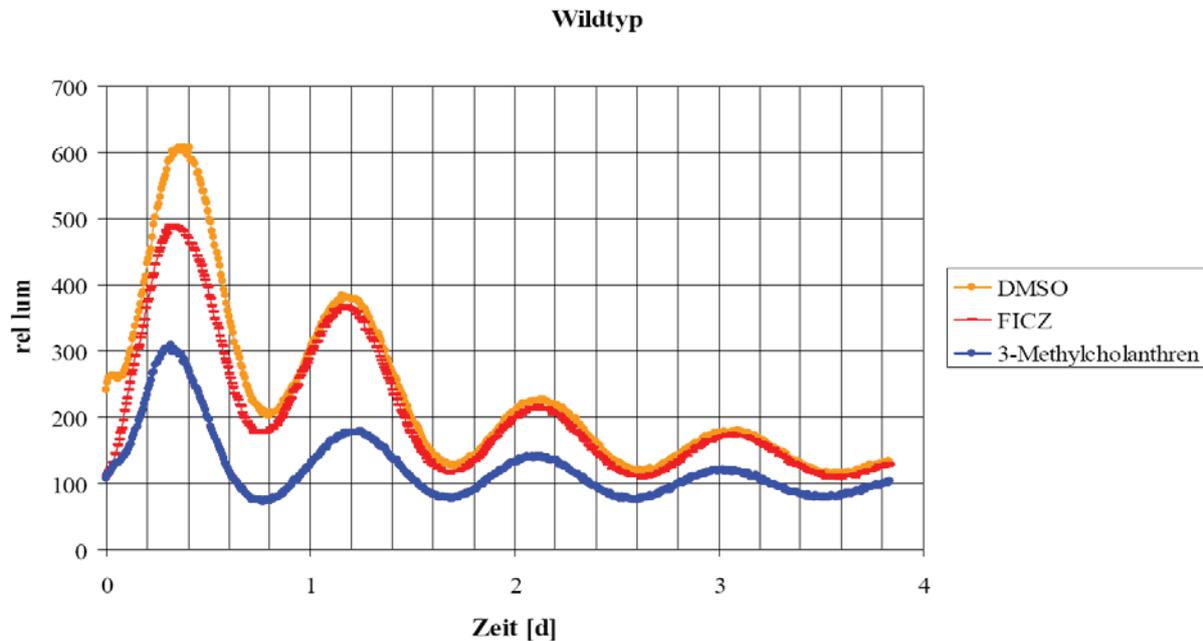


Abbildung 36 Analyse der **Bmal1-Promotor-Luciferase-Aktivität von HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten nach Aktivierung des AhR**: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden konfluent in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gegen das Luciferase-Medium ausgetauscht und die Zellen für 24 Stunden im Inkubator akklimatisiert. In diesem Medium wurden die Zellen jeweils mit 100 nM FICZ, 10 μ M 3-Methylcholanthren oder 0,1 % (v/v) DMSO behandelt. Die Lumineszenz der Zellen wurde über einen Zeitraum von vier Tagen im Lumicycler gemessen.

In diesem Versuch sollte untersucht werden, wie die Inkubation mit den AhR-Agonisten den circadianen Rhythmus beeinflusst. Um die Abhängigkeit vom AhR zu bestätigen wurden diese Versuche neben HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten auch mit AhR-defizienten-Zellen durchgeführt.

Zur Etablierung dieser Versuche wurde als Kontrolle zusätzlich noch ein Teil der Zellen mit Dexamethason synchronisiert (Abbildung 35). Dies ist neben dem Serumschock eine weitere Standardmethode für die Synchronisation von Zellen und wird von der Arbeitsgruppe Reinke routinemäßig für ihre Versuche eingesetzt [Balsalobre et al., 2000]. In Abbildung 35 ist der Kurvenverlauf der DMSO-Kontrolle gegenüber den Dexamethason synchronisierten Zellen dargestellt. Wie zu sehen führten beide Behandlungen zu einer guten Synchronisation der Wildtyp-HaCaT-Keratinocyten. Im Verlauf von vier Tagen waren vier Wiederholungen der Oszillation erkennbar. Die Synchronisation mit Dexamethason führte zu einer Rechtsverschiebung der Kurve gegenüber der DMSO-Kontrolle. Dies resultierte aus einer Verlängerung der Periodendauer von 22,5 Stunden auf 22,8 Stunden.

Für die weiteren Versuche zur Analyse des Einflusses der AhR-Aktivierung auf den circadianen Rhythmus wurde auf die Synchronisation mit Dexamethason verzichtet, um mögliche Interaktionen des Glucocorticoid-Signalwegs mit dem AhR auszuschließen. In

Abbildung 36 sind die Kurvenverläufe nach Zugabe von FICZ beziehungsweise 3-Methylcholanthren in Wildtyp-HaCaT gegenüber der DMSO-Kontrolle aufgetragen. Bei allen drei Behandlungen konnten vier Amplituden gemessen werden. Anders als bei der Analyse der mRNA-Expression konnte hier keine Erhöhung der ersten Amplitude durch AhR-Aktivierung beobachtet werden. Der Kurvenverlauf nach FICZ-Zugabe war bis auf eine reduzierte erste Amplitude identisch mit dem Kurvenverlauf nach DMSO-Behandlung. Die Belastung mit 3-Methylcholanthren führte zu einer deutlichen Abschwächung der Amplitudenhöhe. Die Periodendauer blieb dabei aber gegenüber der DMSO-Kontrolle unverändert.

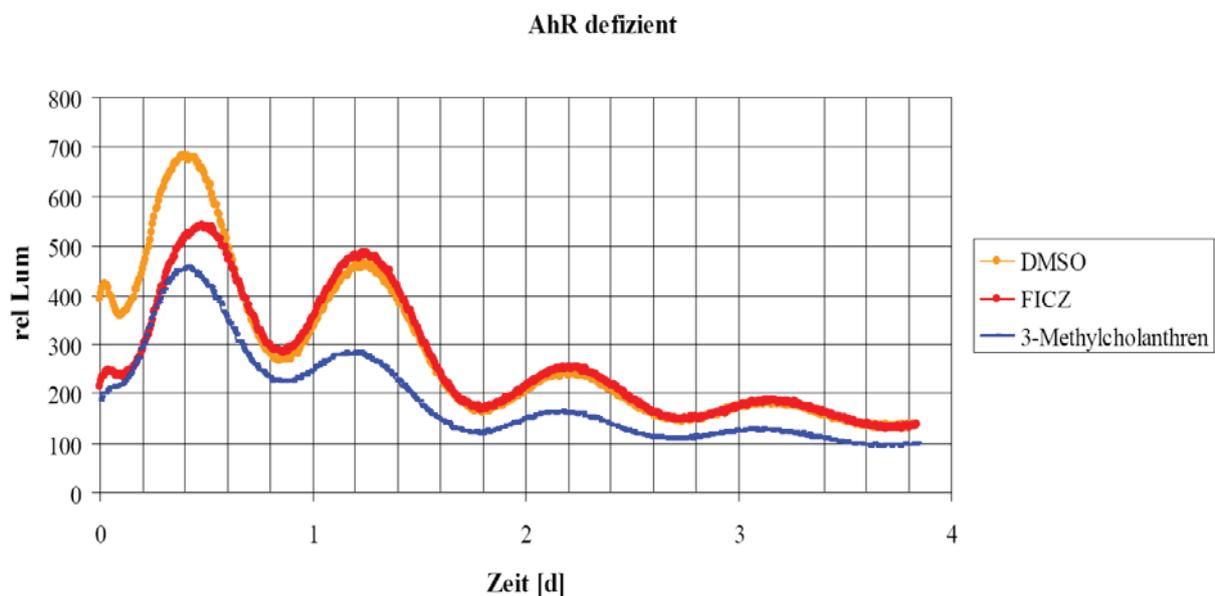


Abbildung 37 Real-Time-Luciferase-Analyse mit HaCaT-AhR-defizienten Keratinozyten: AhR-defiziente-Keratinozyten wurden konfluent in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gegen das Luciferase-Medium ausgetauscht und die Zellen für 24 Stunden im Inkubator akklimatisiert. In diesem Medium wurden die Zellen jeweils mit 100 nM FICZ, 10 μ M 3-Methylcholanthren oder 0,1 % (v/v) DMSO behandelt. Die Lumineszenz der Zellen wurde über einen Zeitraum von vier Tagen im Lumicycler gemessen.

Auch die AhR-defizienten Zellen zeigen wie schon die HaCaT-Keratinozyten einen deutlichen circadianen Rhythmus. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse dargestellt. Grundsätzlich ist also der circadiane Rhythmus nicht von der Expression des AhR abhängig. Wie auch bei den Wildtyp-HaCaT-Keratinozyten kam es nach 3-Methylcholanthren-Behandlung zu einer stärkeren Abflachung der Oszillation. Die Belastung mit FICZ führte zu keiner Veränderung des Kurvenverlaufs, jedoch war genauso wie bei den Wildtyp-Keratinozyten die erste Amplitude verringert. Im Vergleich zu den HaCaT-Wildtyp-Keratinozyten (Abbildung 36) ist die Lumineszenz bei den AhR-defizienten Zellen in den ersten zwei Tagen erhöht, siehe Abbildung 38, Abbildung 39 und Abbildung 40. Dies ist

vermutlich auf ein experimentelles Artefakt zurückzuführen. Haben die Zellen nach der Einsaat noch nicht die volle Konfluenz erreicht und das Zellwachstum ist noch nicht ausreichend gehemmt, kann durch den verstärkten Metabolismus solche Artefakte auftreten. Nach zwei Tagen ist diese erhöhte Luciferase-Aktivität wieder auf das Niveau der anderen Zellen abgefallen.

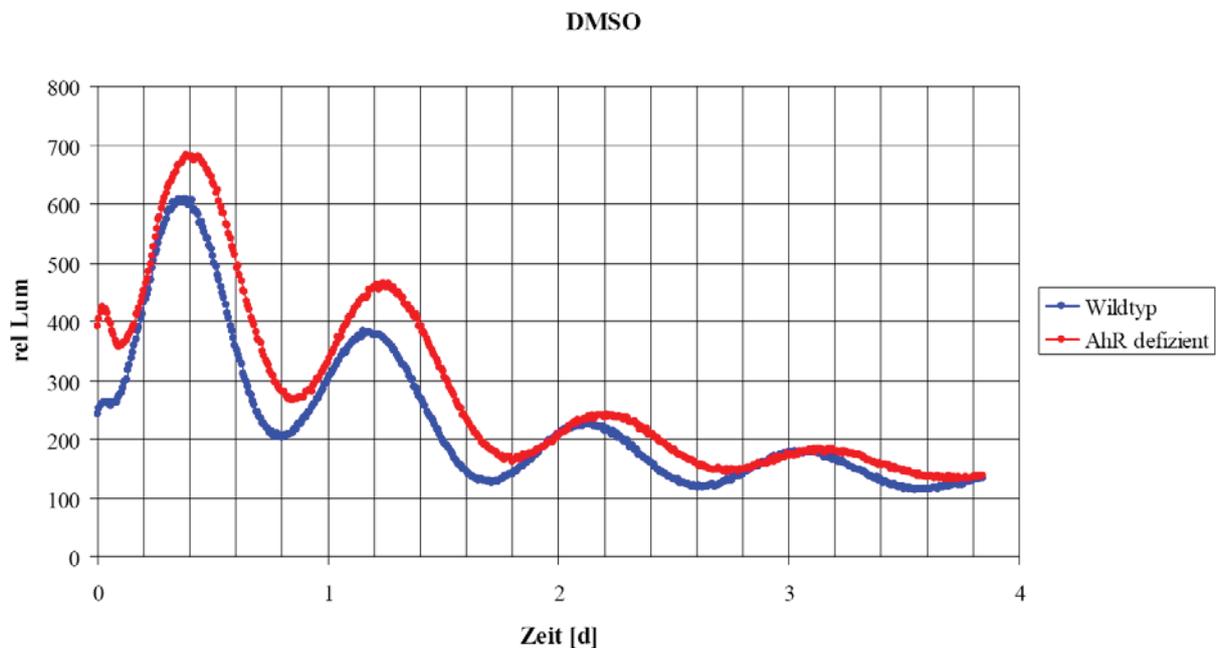


Abbildung 38 Vergleich des circadianen Rhythmus von Wildtyp- und AhR-defizienten-Zellen der DMSO-Kontrolle: Die Kurvenverläufe der Wildtyp- (Abbildung 36) und der AhR-defizienten-Zellen (Abbildung 37) nach DMSO-Belastung sind zum besseren Vergleich in dieser Abbildung gegeneinander aufgetragen.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen war bei den AhR-defizienten-Zellen der Kurvenverlauf in der DMSO-Behandlung in Abbildung 38 leicht nach rechts verschoben. Da diese Verschiebung während der Wiederholungen gleich bleibt, ist anzunehmen dass dieser Effekt durch eine Phasenverschiebung um ungefähr eine Stunde hervorgerufen wurde. Ob, diese Phasenverschiebung ein AhR spezifischer Effekt oder eine experimentelles Artefakt darstellte war in diesem Experiment nicht zu ermitteln.

Im Vergleich der beiden Zelllinien nach FICZ-Belastung in Abbildung 39 fällt auf, dass die Lumineszenz zwischen den ersten beiden Amplituden der AhR-defizienten Zellen nicht so stark zurückging wie bei den Wildtyp-Zellen. So ein Kurvenverlauf ist charakteristisch für zellteilungsbedingte Effekte. Obwohl die Zellen vor Beginn des Experiments möglichst bis zur Konfluenz wachsen gelassen wurden, war es nicht immer ausgeschlossen, dass der Zellzyklus vollständig inhibiert war. Zellteilungen können die Lumineszenz des circadianen Rhythmus beeinflussen. Nach zwei Tagen war dieser Effekt auf das Niveau der Wildtyp-

Zellen zurückgegangen. Anderes als bei den mRNS-Expressionsanalysen konnte hier keine erhöhte Bmal1-Expression der Wildtyp-Zellen gegenüber den AhR-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Der größte Unterschied lag in einem stärkeren Anstieg der ersten Amplitude der Wildtyp-Zellen gegenüber den AhR-defizienten-Zellen.

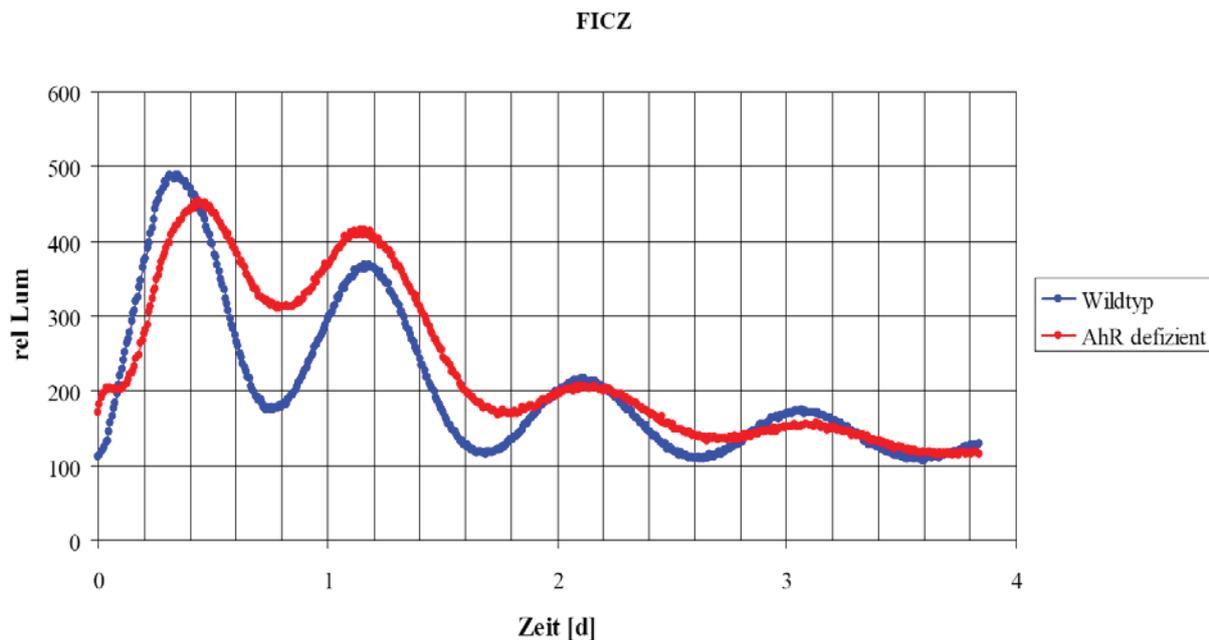


Abbildung 39 Vergleich des circadianen Rhythmus von Wildtyp- und AhR-defizienten-Zellen nach FICZ-Behandlung: Die Kurvenverläufe der Wildtyp-(Abbildung 36) und der AhR-defizienten-Zellen (Abbildung 37) nach FICZ-Belastung sind zum besseren Vergleich in dieser Abbildung gegeneinander aufgetragen.

Auch bei den mit 3-Methylcholanthren behandelten Zellen in Abbildung 40 konnte das schon bei den FICZ-behandelten Zellen beschriebene erhöhte Plateau zwischen den zwei ersten Amplituden beobachtet werden. Die AhR-abhängige Induktion der Bmal1-Expression konnte nicht nachgewiesen werden. Auch blieb der Effekt des AhR-Agonisten auf einen stärkeren Anstieg der ersten Amplitude begrenzt. Gemeinsam bei beiden Zelllinien war, dass die Amplitudenhöhe im Vergleich zu den anderen Behandlungen vermindert war.

3-Methylcholanthren

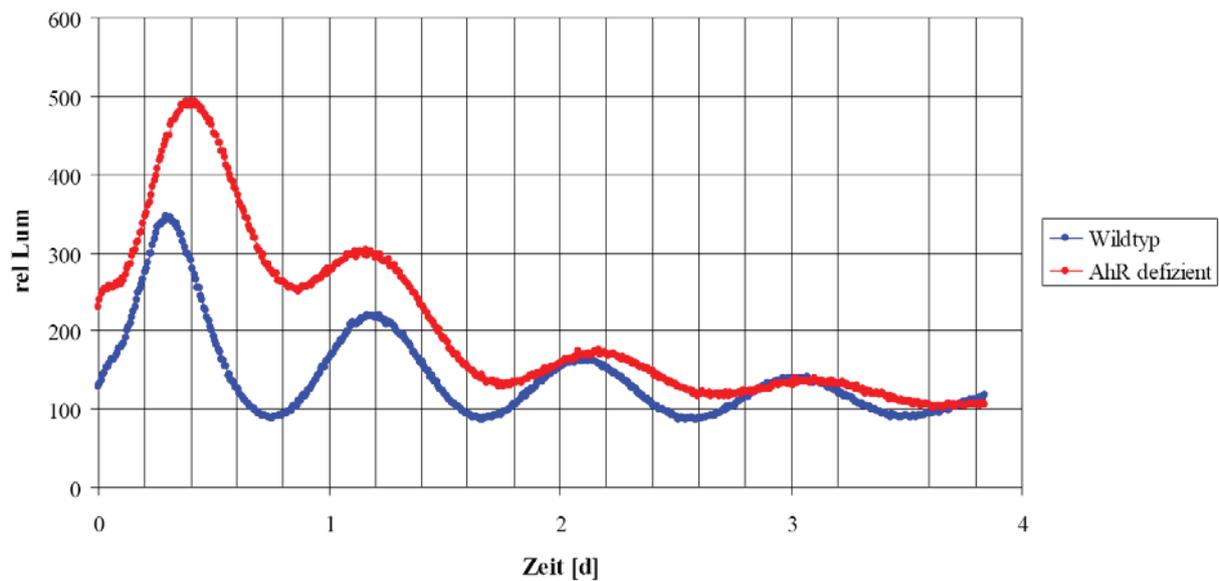


Abbildung 40 Vergleich des circadianen Rhythmus von Wildtyp- und AhR-defizienten-Zellen nach 3-Methylcholanthren-Belastung: Die Kurvenverläufe der Wildtyp- (Abbildung 36) und der AhR-defizienten-Zellen (Abbildung 37) nach 3-Methylcholanthren sind zum besseren Vergleich in dieser Abbildung gegeneinander aufgetragen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es in diesem Experiment gelungen ist, stabil transfizierte Bmal1-Promotor-Luciferase-Konstrukte in HaCaT-Keratinocyten zu generieren. Zusätzlich konnte dieses Reporterkonstrukt auch in AhR-defizienten Zellen stabil transfiziert werden. Mit diesen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass HaCaT-Keratinocyten auch mit Dexamethason synchronisiert werden können.

Die Experimente mit den Bmal1-Promotor-Luciferas-Konstrukte bestätigen nicht die Ergebnisse der mRNA-Analysen. Es konnte keine erhöhte Bmal1-Expression nach der Aktivierung des AhR gemessen werden.

4.8 UNTERSUCHUNG DER CIRCADIENEN EXPRESSION VON DNS-REPARATUR GENEN IN HACAT-KERATINOZYTEN

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Reparatur von DNS-Läsionen in den HaCaT-Keratinocyten circadian reguliert wird. Da die UVB-Strahlung als natürlicher Bestandteil des Sonnenlichts eine streng circadiane Rhythmik aufweist, ist eine evolutionäre Anpassung der molekularen Uhr an den circadianen Wechsel der UV-induzierten DNS-Schäden und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durchaus denkbar. Vom besonderen

Interesse für diese Arbeit dabei war, ob diese Stressantwort dabei auch durch die Aktivierung des AhR moduliert wird.

Um einen ersten Überblick über die circadiane Rhythmik von Reparaturgenen in den HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten zu bekommen, wurde auf die etablierten Experimente der RNS-Expressions-Analyse mittels Real-Time-PCR zurückgegriffen. Dafür wurde die RNS aus den 48-Stunden-Zeitreihen zur 3-Methylcholanthren-Induktion (3.2.2.6) auf das Expressionsverhalten ausgewählter Gene der UVB-Stressantwort ausgewertet.

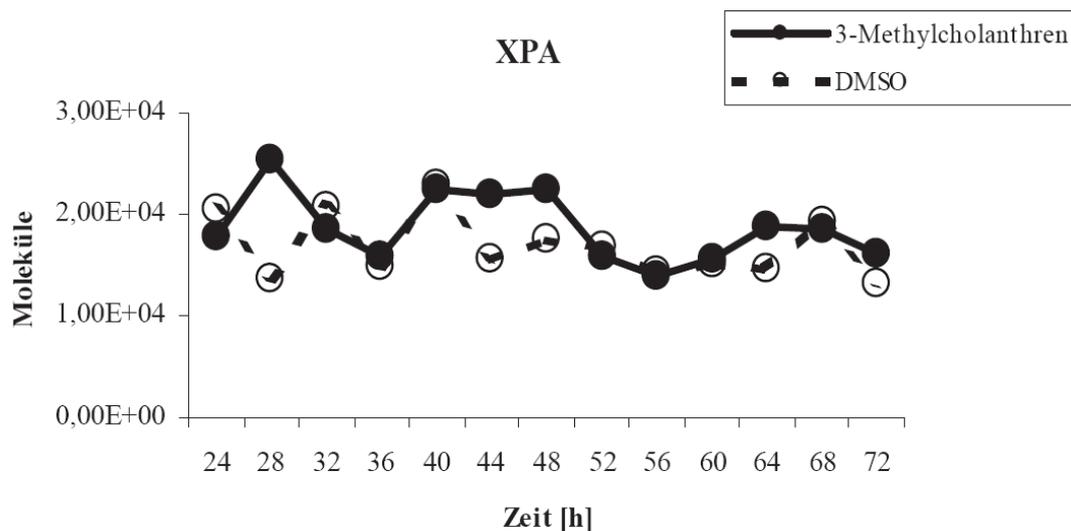


Abbildung 41 mRNA-Expression von XPA: Eine 48-Stunden-Zeitreihe aus den unter 3.2.2.6 beschriebenen Experimenten wurde auf die mRNA-Expression von XPA untersucht.

XPA und XPC sind Proteine der Basenexzisionsreparatur. Die Basenexzision ist die Hauptreparaturmethode für UV-induzierte DNS-Schäden. Kang et al. [Kang et al., 2009] konnte zeigen, dass die XPA-Aktivität durch die molekulare Uhr reguliert wird. Die Expression von XPA, dargestellt in Abbildung 41, zeigte in den HaCaT-Keratinocyten nur eine schwache Oszillation. Ob es sich dabei um einen circadianen Rhythmus handelt ließ sich aufgrund der niedrigen Amplitudenhöhe nicht mit Sicherheit bestimmen. Eine Veränderung der Expression nach AhR Aktivierung durch 3-MC konnte nicht beobachtet werden.

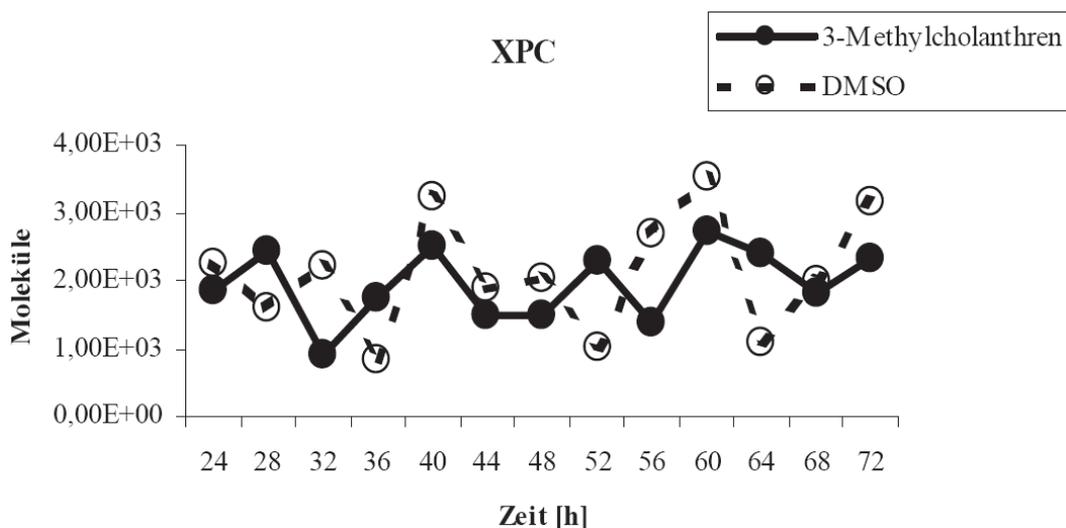


Abbildung 42 mRNA-Expression von XPC: Eine 48-Stunden-Zeitreihe aus den unter 3.2.2.6 beschriebenen Experimenten wurde auf die mRNA-Expression von XPC untersucht.

XPC ist ein weiteres Protein der Basenexzisionsreparatur. Über die circadiane Regulierung dieses Proteins war bis zur Ausfertigung der Arbeit jedoch nichts bekannt. In Abbildung 42 ist die Expression in einem Zeitraum von 48 Stunden nach 3-Methylcholanthren-Belastung dargestellt. In den Wildtyp-Keratinocyten konnte nach Synchronisation des circadianen Rhythmus mit der Serumschockmethode kein Einfluss des AhR auf die Expression beobachtet werden. Die zu beobachtende Schwankung in der Expression kann keiner circadianen Rhythmik zugeordnet werden.

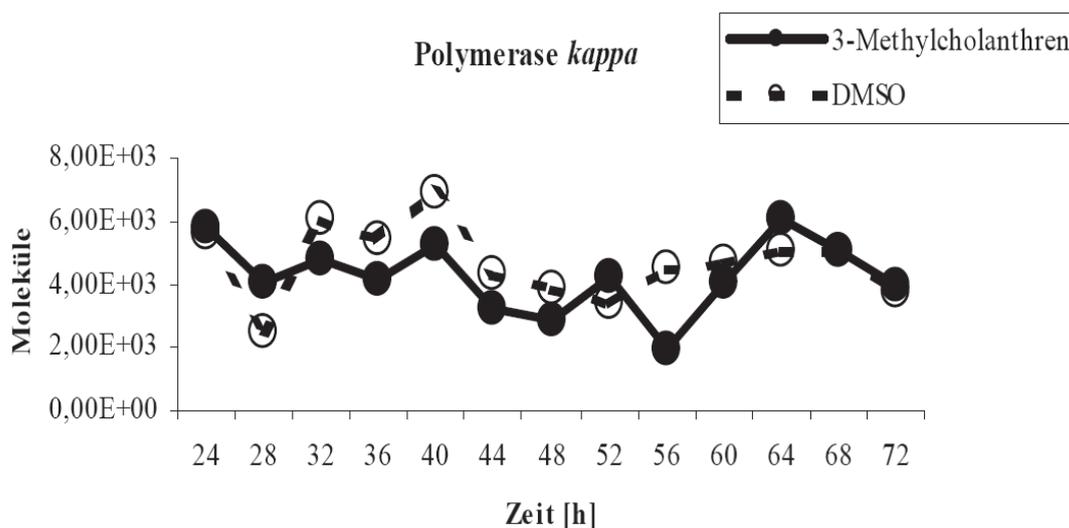


Abbildung 43 mRNA-Expression von Polymerase kappa: Eine 48-Stunden-Zeitreihe aus den unter 3.2.2.6 beschriebenen Experimenten wurde auf die mRNA-Expression von Polymerase kappa untersucht.

Polymerase kappa ist ebenfalls ein Enzym der Basenexzisionsreparatur, welches nach Aktivierung des AhR durch Benzo[a]pyren aktiviert werden kann. [Ogi et al., 2001]. In

diesem Versuch war, wie in Abbildung 43 zu sehen, die Expression unabhängig vom circadianen Rhythmus und der AhR-Aktivierung.

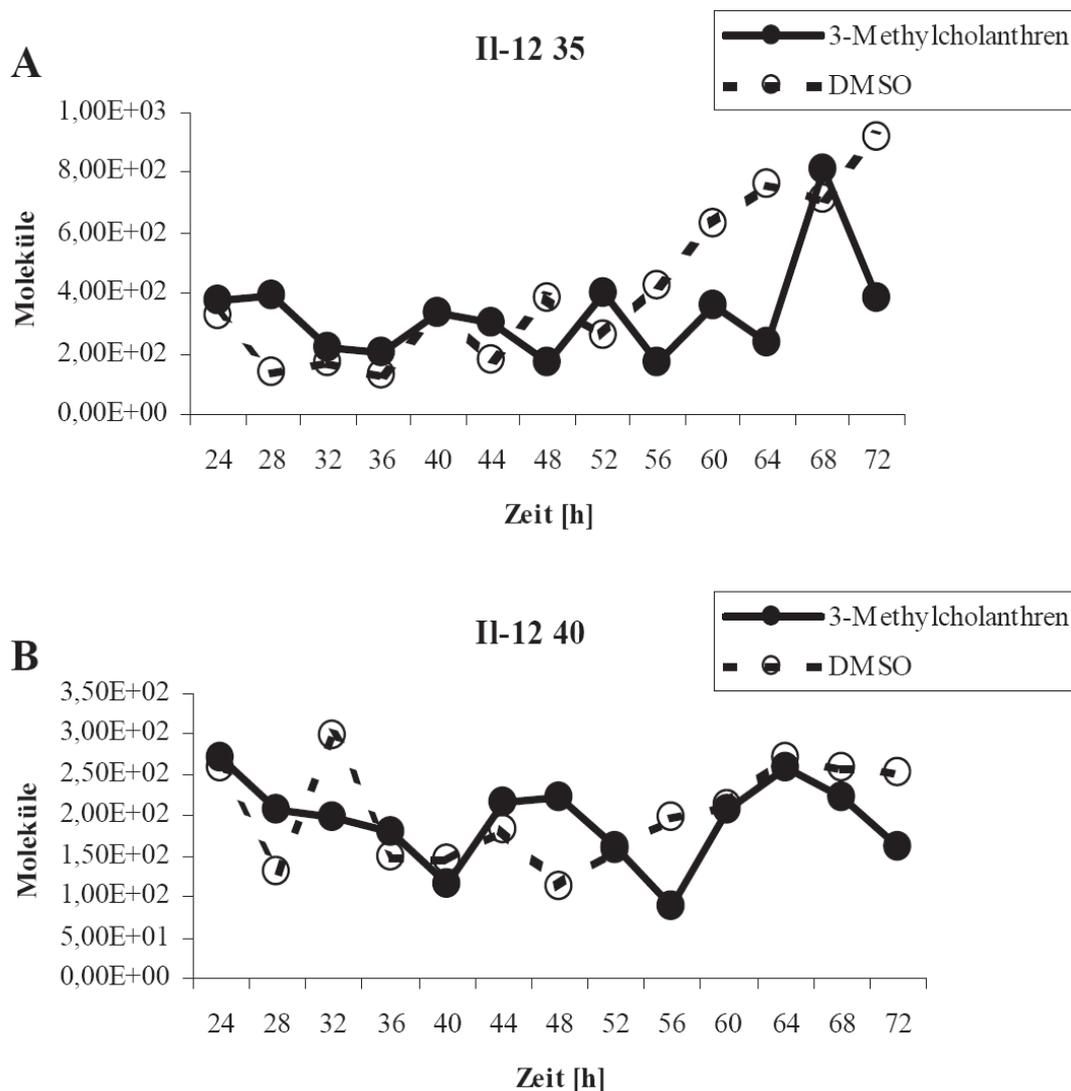


Abbildung 44 mRNS-Expression der II 12 35 (A) und II-12 40 (B) Untereinheit: Eine 48 h Zeitreihe aus den unter 3.2.2.6 beschriebenen Experimenten wurde auf die mRNS-Expression der 35 kD und 40 kD-Untereinheit von II 12 untersucht.

Die letzten beiden Gene, die in diesem Versuch untersucht wurden, bilden jeweils eine Untereinheit des Botenstoffs II-12. Es wurde gezeigt, dass II-12 in Keratinozyten die UV-vermittelte Stressantwort reduzieren kann [Schwarz et al., 2002]. Dabei wird es durch den AhR moduliert. In dieser Studie unterschied sich die Expression der beiden Untereinheiten, dargestellt in Abbildung 44 nach der AhR-Aktivierung nicht wesentlich von der DMSO Kontrolle. Die gemessene Molekülnzahl von 100-300 pro Ansatz ist sehr niedrig, sodass nicht davon auszugehen ist, dass II-12 in diesem Versuch von biologischer Relevanz war.

Die Untersuchung der Genexpression der ausgewählten DNS-Reparaturgene hat somit keinen Einfluss des circadianen Rhythmus oder der AhR-Aktivierung in HaCaT-Keratinocyten ergeben.

4.9 BESTIMMUNG DER ZELLVIABILITÄT VON Bmal1-DEFIZIENTEN HACAT-ZELLEN NACH UVB-BESTRAHLUNG

Um den Einfluss der Bmal1-Expression auf die zelluläre Stressantwort in den HaCaT-Keratinocyten zu untersuchen, wurde zunächst die Viabilität der Bmal1-defizienten Keratinocyten im Vergleich zu den Kontrollzellen bei zunehmender UVB-Bestrahlung getestet. Dazu wurde die Viabilität in zwei unabhängigen Assays analysiert: Der *CellTiter-Blue*[®] *Cell Viability Assay* und der LDH-Assay.

Beim *CellTiter-Blue*[®] *Assay* wird die Substanz Resazurin von den Zellen in das Fluorophor Resorufin umgesetzt. Die Fluoreszenz ist somit proportional zur metabolischen Aktivität und ein Marker für die Viabilität der Zellen.

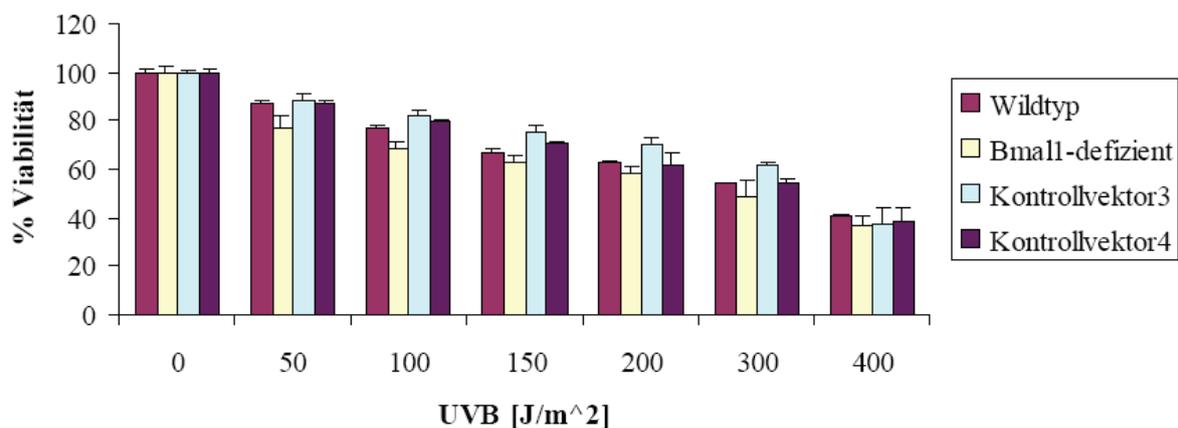


Abbildung 45 *CellTiter-Blue*[®] *Cell Viability Assay*: Wildtyp-, Bmal1-defiziente-, Kontrollvektor3- und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinocyten wurden mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Viabilität als Prozent der unbestrahlten Kontrolle mit dem *CellTiter-Blue*[®] *Cell Viability Assay* bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

In diesem Versuch wurde der Einfluss einer Bmal1-Reduktion auf die Viabilität von HaCaT-Keratinocyten nach UVB-Stress untersucht. Wie in Abbildung 45 zu sehen führte in diesem Versuch die Bmal1-Reduktion zu keiner Veränderung der Viabilität nach der Bestrahlung mit UVB. Betrachtet man die metabolische Kapazität in Abbildung 46, ohne sie mit der

unbestrahlten Kontrolle abzugleichen, fällt auf, dass die Bmal1-defizienten-Zellen ein generell niedrigeres Signal besaßen. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde also unabhängig von der UVB-Strahlung durch den *Knockdown* reduziert.

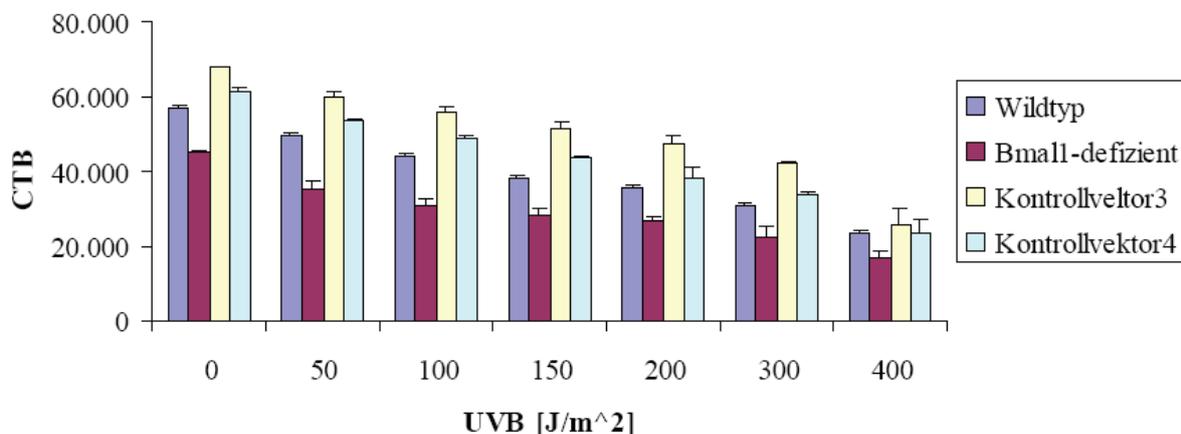


Abbildung 46 CellTiter-Blue® Assay: Wildtyp-, Bmal1-defiziente-, Kontrollvektor3 und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinozyten wurden mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Viabilität der Zellen mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

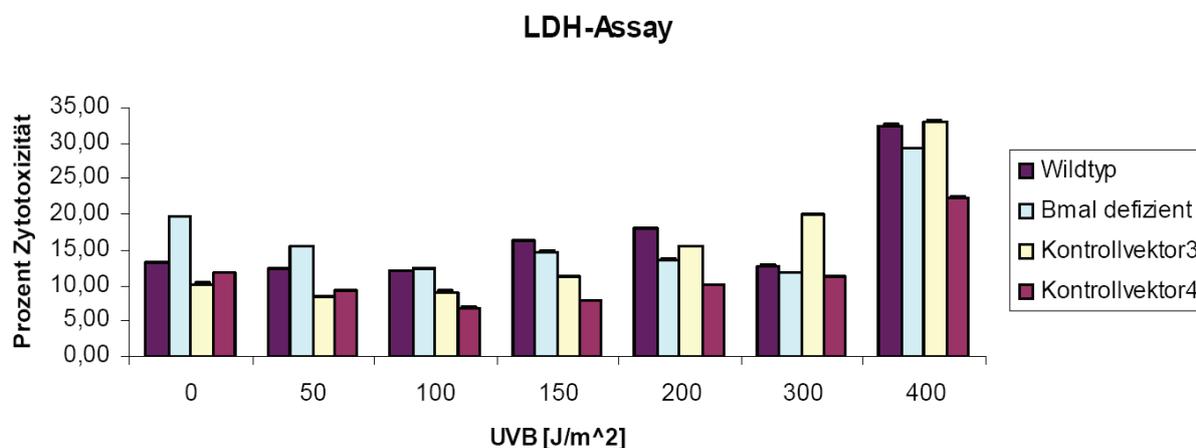


Abbildung 47 LDH Assay: Wildtyp-, Bmal1-defiziente-, Kontrollvektor3- und Kontrollvektor4-HaCaT-Keratinozyten wurden mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Zelltoxizität als Prozent der LDH-Aktivität im Zellkultur-Überstand im Verhältnis zur Lyse-Kontrolle gemessen. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments

Der LDH-Assay ist eine zusätzliche Methode zur Bestimmung der Viabilität. Hierbei wird die Aktivität der Lactatdehydrogenase im Medium gemessen. Dieses Enzym wird aus den Zellen ausgeschleust, sobald die Integrität der Zellmembran aufgrund toxischer Bedingungen gestört

ist. Die Methode kann dabei mit verschiedenen anderen Experimenten kombiniert werden unter anderem auch mit dem *CellTiter-Blue*[®]-Assay.

Die Ergebnisse der LDH-Messung in Abbildung 47 bestätigen die Daten des *CellTiter-Blue*[®] Assays. Der Bmal1-Knockdown hatte keinen Einfluss auf die UVB-abhängige Viabilität. Eine deutliche Zunahme der LDH-Aktivität konnte nur bei der höchsten Strahlendosis gemessen werden. In Bmal1-defizienten Zellen war aber die Gesamtaktivität im *CellTiter-Blue*[®] Assay gegenüber den anderen Zelllinien reduziert.

4.10 UNTERSUCHUNG DER CIRCADIENEN ABHÄNGIGKEIT DER REPARATUR VON DNS-STRANGBRÜCHEN NACH UVB-BESTRAHLUNG

Die Einzelzellgelelektrophorese oder der *Comet*-Assay wird angewandt, um DNS-Schäden in eukaryotischen Zellen zu quantifizieren. Durch den Bruch eines DNS-Stranges kann dieser sich besser aus der Superspiralisierung entwinden [Collins et al., 2008]. Wird nun an eine Zelle ein elektrisches Feld angelegt, bewegt sich dieser stärker entwundene Strang im elektrischen Feld weiter. Sichtbar gemacht ähnelt diese DNS-Wanderung aus dem Zellkern, einem Kometen, mit dem Zellkern als Kopf und der ausgewanderten DNS als Schweif. Die Intensität und die Länge des Schweifes sind dabei proportional zur Höhe der DNS-Schädigung.

Die UVB-Strahlung führt im Gegensatz zur UVA nicht primär zu Strangbrüchen, sondern zu Dimerisierungen wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte [Mitchell, 1988]. Diese Fehlpaarungen werden von den Reparaturenzymen erkannt, ausgeschnitten und ersetzt. Während dieser Reparatur entstehen die DNS-Einzelstrangbrüche, die im *Comet*-Assay analysiert werden können [Tzung and Runger T. M., 1998; Alapetite et al., 1996].

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob der circadiane Rhythmus einen Einfluss auf die Aktivität der DNS-Reparatur-Enzyme nach einer UVB-Bestrahlung hat.

Dazu wurden HaCaT-Wildtyp-Keratinozyten zu verschiedenen Zeiten synchronisiert und dann mit UVB-bestrahlt. Nach vier Stunden wurden die Zellen dann im *Comet*-Assay untersucht.

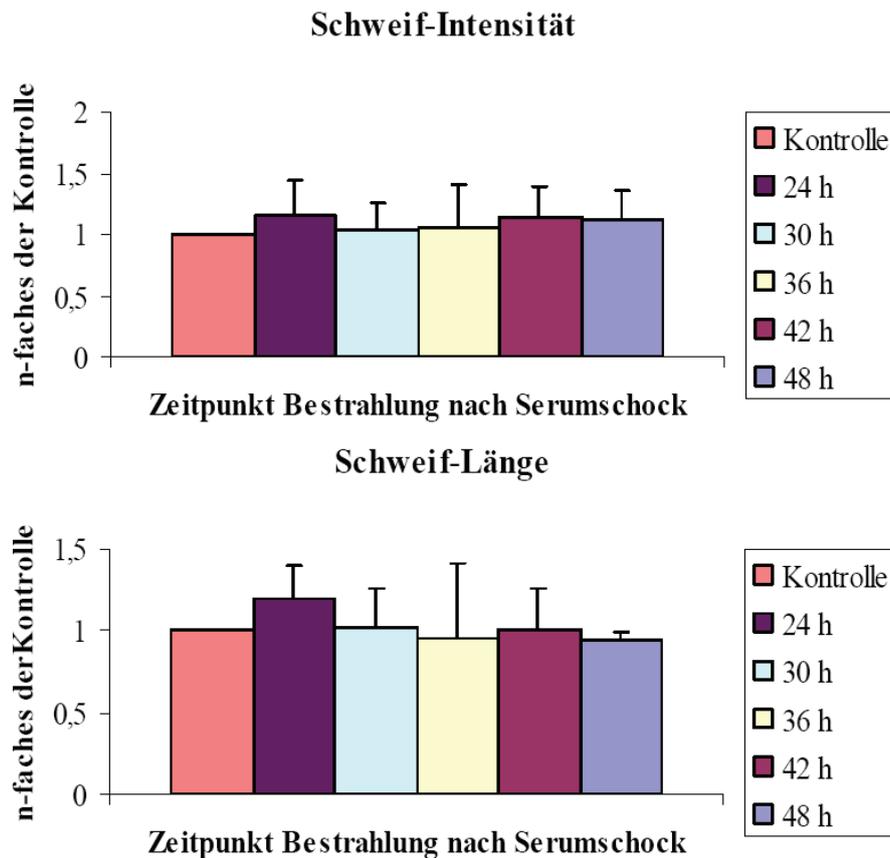


Abbildung 48 Einzelzellgelelektrophorese: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit dem Serumschock synchronisiert und zu verschiedenen Zeiten nach dem Serumschock mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Vier Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen in der Einzelzellgelelektrophorese analysiert. Dargestellt ist die Schweif-Intensität und das Schweif-Moment aus drei unabhängigen Versuchen.

Zur Quantifizierung des *Comet*-Assays wurden die Schweif-Intensität und die Schweif-Länge gemessen. In Abbildung 48 ist das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Es konnte kein Unterschied weder in der Schweif-Intensität als auch des Schweif-Momentes zwischen den einzelnen Zeiten des Serumschocks festgestellt werden. Die *Comet*-Ausbildung war demnach in diesem Versuchsaufbau nicht circadian reguliert. Problematisch dabei war, dass auch unbehandelte Wildtyp-Keratinocyten eine deutliche unspezifische Schweifausprägung zeigten und der Unterschied der Kontrolle zur Bestrahlung damit eingeschränkt war. Der *Comet*-Assay war für die in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen nicht besonders geeignet.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der DNS-Reparatur nach UVB-Bestrahlung ist der *South-Western-Blot*. Hier werden die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere direkt mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Assay sollte deshalb UV-B-spezifischere Resultate erzeugen als der *Comet*-Assay.

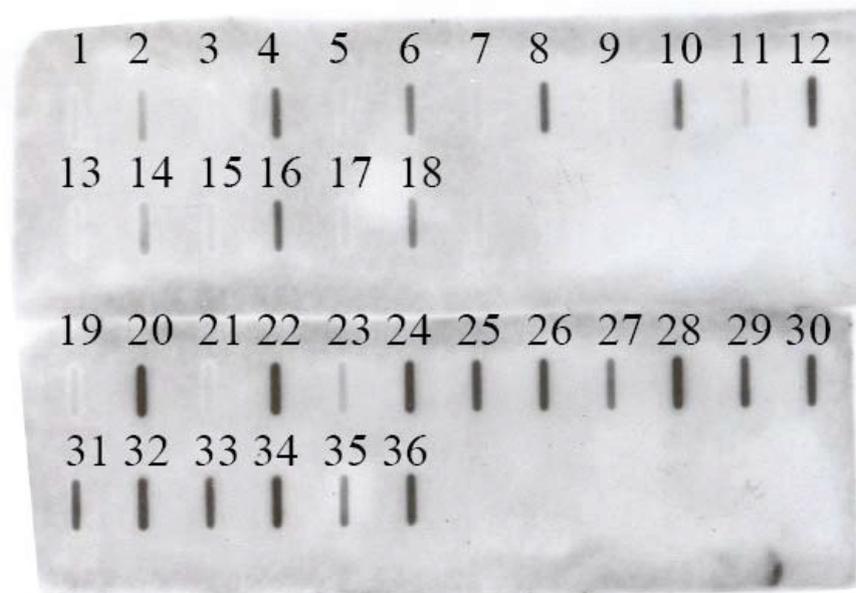


Abbildung 49 Southwestern-Blot: Wildtyp-, AhR-defiziente-, Bmal1-defiziente-, Kontrollvektor1-, Kontrollvektor2-, Kontrollvektor3-, Kontrollvektor4-Keratinocyten wurden synchronisiert und 24 Stunden beziehungsweise 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt. Jeweils unmittelbar nach der Bestrahlung und 12 Stunden später wurde die genomische DNS geerntet und im *South-Western Blot* mit einem CPD-Antikörper inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot eines Experiments. (1 Wildtyp unbestrahlt; 2 Wildtyp, 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 3 AhR-defizient unbestrahlt; 4 AhR-defizient 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet, 5 Kontrollvektor1 unbestrahlt, 6 Kontrollvektor1 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 7 Bmal1-defizient unbestrahlt; 8 Bmal1-defizient 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 9 Kontrollvektor3 unbestrahlt; 10 Kontrollvektor3 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 11 Kontrollvektor4 unbestrahlt; 12 Kontrollvektor4 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 13 Wildtyp unbestrahlt; 14 Wildtyp 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt direkt geerntet; 15 AhR-defizient, unbestrahlt; 16 AhR-defizient, 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 17 Kontrollvektor1 unbestrahlt; 18 Kontrollvektor1 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet, 19 Bmal1-defizient unbestrahlt; 20 Bmal1-defizient 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet, 21 Kontrollvektor3 unbestrahlt, 22 Kontrollvektor3 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 23 Kontrollvektor4 unbestrahlt; 25 Kontrollvektor4 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, direkt geerntet; 25 Wildtyp 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 26 AhR-defizient 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 27 Kontrollvektor1 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 28 Bmal1-defizient 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet, 29 Kontrollvektor3 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 30 Kontrollvektor4 36 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 31 Wildtyp 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 32 AhR-defizient 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 33 Kontrollvektor1 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 34 Bmal1-defizient 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet, 35 Kontrollvektor3 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet; 36 Kontrollvektor4 24 Stunden nach Serumschock bestrahlt, 12 Stunden nach Bestrahlung geerntet

Im Gegensatz zum *Comet-Assay* war der Unterschied zwischen bestrahlten Proben und unbestrahlten Kontrollen, in Abbildung 49 dargestellt, eindeutig. Nur in den bestrahlten Proben war nach der Inkubation mit einem CPD-Antikörper ein Signal erkennbar. Methodisch war dieser Assay daher für diese Arbeit besser geeignet als der *Comet-Assay*.

Die Auswertung der Blots ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelltypen oder der Zeit nach dem Serumschock.

Das größte Problem bei diesem Versuch war die Schwankung der Signalstärke des CPD-Antikörpers. Dies erschwerte die Reproduzierbarkeit des Versuchs. Die Reparatur der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere war in den ersten 12 Stunden nach UVB-Bestrahlung nicht ausreichend, um eine deutliche Veränderung der Signalstärke messen zu können. Ein Vergleich mit der Gesamt-DNS-Kontrolle in Abbildung 50 zeigt, dass sich die unterschiedliche Signalintensität des CPD-Antikörpers nicht nur durch Schwankungen der Gesamt-DNS erklären lässt. Auch ist davon auszugehen, dass bei gleicher Bestrahlung die Anzahl der DNS-Schäden annähernd gleich sein muss.



Abbildung 50 South-Western-Blot: Abgleich des *Southwestern Blots* aus Abbildung 49 gegen den Gesamt-DNS-Gehalt mit dem Einzelstrang-DNS-Antikörper. Pipettierschema siehe **Abbildung 49**.

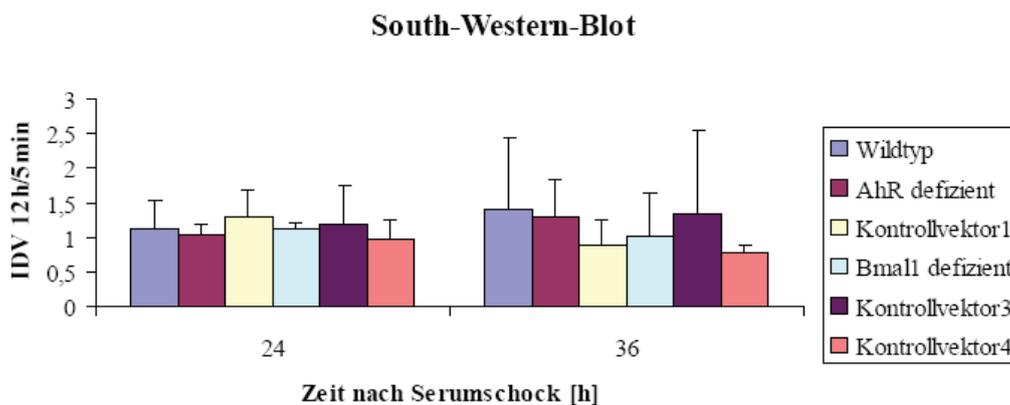


Abbildung 51 Auswertung des *South-Western-Blots*: Die Signalintensitäten des CPD-Antikörpers (Abbildung 49 und der DNS-Kontrolle Abbildung 50) wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalstärke des CPD-Antikörpers auf die Gesamt-DNS-Kontrolle bezogen. Dargestellt ist das Verhältnis der Signalintensität 12 h nach Bestrahlung zur Intensität unmittelbar nach Bestrahlung als repariert CPD/DNS-Kontrolle.

Somit haben weder der *Comet-Assay* noch der *South-Western-Blot* einen Hinweis auf die Abhängigkeit der DNS-Reparatur vom circadianen Rhythmus in HaCaT-Keratinocyten ergeben.

4.11 AUSWIRKUNG DER UVB-BESTRAHLUNG AUF DIE EXPRESSION VON Bmal1, PER1, CYP1A1 UND COX2

Aufgrund der Probleme in der Einzelzellgelelektrophorese und im *South-Western-Blot* wurde die mRNA-Expression in synchronisierten Wildtyp-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung analysiert.

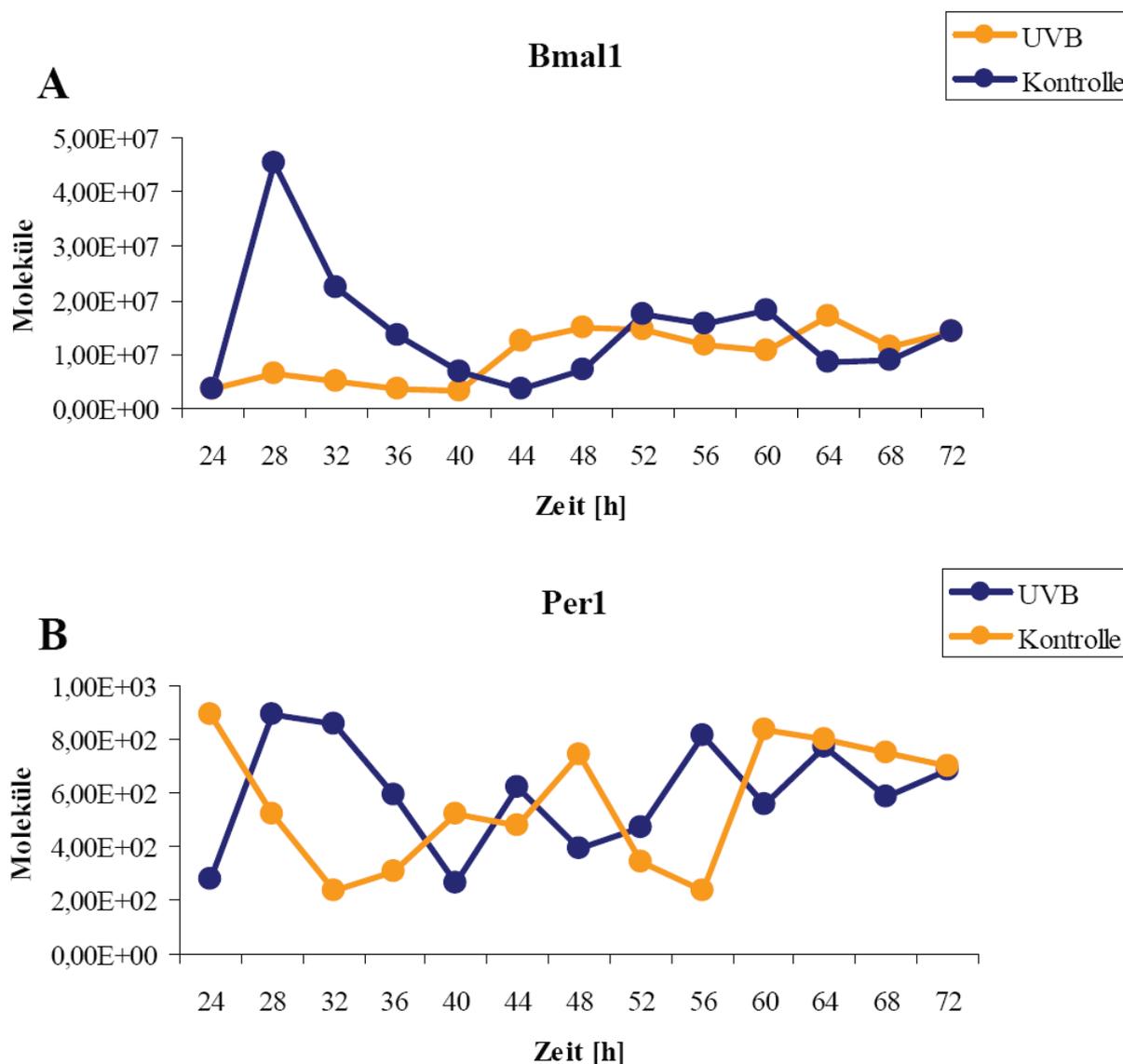


Abbildung 52 Bmal1- und Per1-Expression nach UVB-Bestrahlung: HaCaT Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert und 24 Stunden danach mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Die RNS wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden alle vier Stunden extrahiert und die mRNA-Expression von Bmal1 (A) und Per1 (B) mittels Real-Time-PCR gemessen.

Die UVB-Strahlung hatte, wie in Abbildung 52 zu sehen, eine deutliche Auswirkung auf die Expression der circadianen Gene Bmal1(A) und Per1 (B) in den HaCaT-Keratinocyten. Die

Bmal1-Expression wurde durch die UVB-Bestrahlung stark reduziert und begann erst nach 16 Stunden wieder auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle zu steigen. Der Rhythmus der Per1 Expression verlief gegenläufig zur unbehandelten Kontrolle

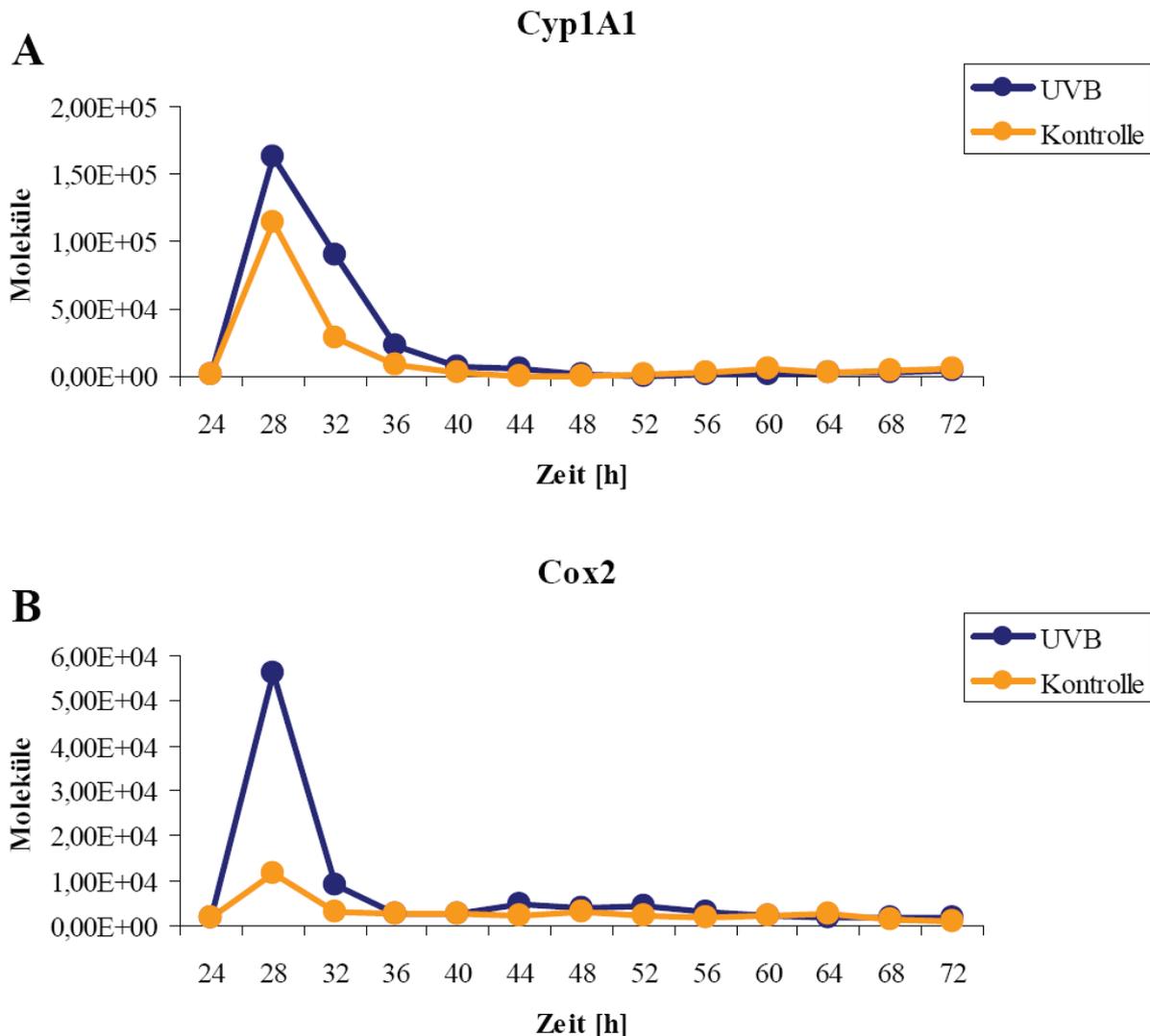


Abbildung 53 Cyp1A1- und Cox2-Expression nach UVB-Bestrahlung: HaCaT-Wildtyp-Keratinocyten wurden mit einem Serumschock synchronisiert und 24 Stunden danach mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Die RNS wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden alle vier Stunden extrahiert und die mRNS-Expression von Cyp1A1 und Cox2 mittels Real-Time-PCR gemessen

Cyp1A1 (A) und Cox2 (B) dienten als Kontrollgene der AhR-Aktivierung. Die Expression der beiden Gene in HaCaT-Keratinocyten ist in Abbildung 53 dargestellt. Die Cyp1A1-Expression wurde bei diesem Versuch sowohl bei den UVB-bestrahlten Ansätzen als auch bei den Kontrollen induziert. Dies lässt sich auf den Mediumwechsel nach der Bestrahlung zurückführen. Zur Bestrahlung wurden die Zellen in PBS überführt und bekamen danach für den Verlauf der Zeitreihe frisches Wachstumsmedium. Da die Kontrollen bis auf die

Bestrahlung die gleiche Behandlung bekamen, war dieses Maximum auch bei ihnen zu finden. Die Amplitudenhöhe war nach Bestrahlung dennoch höher, was für eine Aktivierung des AhR nach der UVB-Bestrahlung spricht. Die Induktion von Cox2 nach UVB-Bestrahlung war sechsmal höher als die Kontrolle. Die stärkere Induktion von Cox2 gegenüber Cyp1A1 ist ein Hinweis darauf, dass nicht allein der AhR-vermittelte Signalweg, für die Induktion der Cox2-Expression verantwortlich ist.

5 DISKUSSION

Die Rotation der Erde hat in lebenden Organismen zu einer Entwicklung einer inneren Uhr geführt, die es ermöglicht sich an die rhythmischen Veränderungen in der Umwelt anzupassen. Solche Uhren existieren in allen untersuchten Organismen der Reiche Bakterien, Pilze, Pflanzen, und Tiere. Viele biologische Prozesse in diesen Organismen oszillieren und weisen dabei eine Periodizität von etwa 24 Stunden auf.

Die Haut ist als Oberflächenorgan den ständig wechselnden Umweltbedingungen exponiert. Besonders die Sonneneinstrahlung, mit der die Haut schädigenden UV-Strahlung, unterliegt dabei einer täglichen Rhythmik. Weil die Haut im Vergleich zu anderen Organen experimentell leicht zugänglich ist, wurden schon eine Reihe von physiologischen Parametern beschrieben, die einen Tagesrhythmus aufzeigen. So werden die Körpertemperatur, der transepidermale Wasserverlust, die Sebumproduktion, der pH-Wert, der Blutfluss, Hormonkonzentrationen und die Zellproliferationsrate circadian reguliert [Bjarnason et al., 2001; Bjarnason and Jordan R., 2002; Yosipovitch et al., 1998; Yosipovitch et al., 2004].

Das Verständnis der Regelmechanismen der circadianen Vorgänge ist insbesondere im Zusammenhang mit der verbesserten Wirkung von Arzneimitteln von Bedeutung, weil postulierte Nebenwirkungen erheblich verringert werden können [Ohdo et al., 2011].

Die im Bezug auf den circadianen Rhythmus am gründlichsten untersuchten Zellen der Haut sind die Fibroblasten. [Balsalobre et al., 1998] beobachteten anhand von Fibroblasten, dass der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr auch außerhalb des suprachiasmatischen Nucleus synchronisiert werden kann. [Zanello et al., 2000] konnten diese Ergebnisse bestätigen und [Yagita et al., 2001] fanden heraus, dass die molekulare Uhr in diesen Zellen ähnlich der des suprachiasmatischen Nucleus abläuft. Mit der Generierung von Promotor-Luciferase-Konstrukten wurden Fibroblasten Bestandteil in den experimentellen Untersuchungen in vielen Laboren.

Für die Beantwortung der in dieser Arbeit gestellten Fragen sind Fibroblasten jedoch kein geeignetes System, weil der AhR-Signalweg durch die starke Expression des AhR-Repressors teilweise blockiert ist [Haarmann-Stemmann and Abel J., 2006; Gradin et al., 1993; Gradin et al., 1999].

Über die Expression und die Regulation und funktionelle Bedeutung der molekularen Uhr in den Keratinozyten war zu Beginn der Arbeit sehr wenig bekannt.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression und Regulation circadian regulierter Gene, deren Interaktion mit dem AhR sowie ihre Integration in Reparaturprozesse an dem HaCaT-Keratinocyten-Modell analysiert

5.1 EXPRESSION UND SYNCHRONISATION CIRCADIANER GENE IN HACAT-KERATINOZYTEN

Zunächst war es erforderlich, die Expression der circadian regulierten Gene in HaCaT-Keratinocyten zu synchronisieren. Die Synchronisation der HaCaT-Keratinocyten erfolgte wie in [Balsalobre et al., 1998] beschrieben.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, weisen die Genprodukte von *Bmal1* und *Per1* eine Periodizität im Mittel von circa 22 Stunden auf. Die drei unabhängigen Experimente in Abbildung 24 zeigen, dass die Expressionsanalysen gut reproduziert werden konnte.

Der Serumschock führte unmittelbar zu einer Induktion von *Per1* und vier Stunden verschoben von *Bmal1*. Die Oszillation der beiden Gene konnte dabei auf mRNA-Ebene über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden (Abbildung 12) gemessen werden. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Daten fanden auch [Balsalobre et al., 1998; Izumo et al., 2006] eine Induktion von *Bmal1* und *Per1* nach Serumschock, eine Periodendauer von ungefähr 23 Stunden und die gegenläufige Expression von *Bmal1* und *Per1*. Dies ist ein Indiz dafür, dass die molekulare Uhr in beiden Zelltypen auf den gleichen Mechanismen beruht.

Neben den beiden Genen *Bmal1*, und *Per1*, die im Hauptfokus dieser Arbeit standen, konnte auch für die Gene der molekularen Uhr *Per2*, *DBP* und *Rev-Erba* eine circadiane Oszillation der Expression nachgewiesen werden (Abbildung 23).

Als weitere Kontrolle der Periodizität der circadiane Uhr konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Reinke stabil in Wildtyp- und AhR-defizienten-HaCaT-Keratinocyten *Bmal1*-Promotor-Luciferase-Konstrukte transfiziert werden. Mit diesen war es möglich die Luciferase-Aktivität kontinuierlich über einen Zeitraum von vier Tagen zu messen.

Wie aus der Abbildung 35 hervorgeht, betrug die Periodizität des *Bmal1*-Gens 22,5 Stunden, was gut mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen übereinstimmt. Aus den Daten in

Abbildung 37 geht hervor, dass auch in AhR-defizienten-Zellen eine Periodizität der *Bmal1*-Expression vorliegt. Diese war in den Expressionsanalysen nicht feststellbar.

Ebenfalls konnte mit diesen Zellen die Synchronisierbarkeit von HaCaT-Keratinocyten mit Dexamethason bestätigt werden. Die zeitliche Verschiebung der Dexamethason behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen wurde schon in Fibroblasten [Balsalobre et al., 2000; Izumo et al., 2006] beschrieben. Izumo et al. postuliert, dass die verzögerte Kinetik nach Dexamethasonbehandlung mit der Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors statt des cAMP-CREB-Signalwegs zusammenhängt [Izumo et al., 2006]. Auch eine kürzlich publizierte Arbeit von Sporn et. [Sporn et al., 2011] reproduziert die Befunde.

Als weiteres Untersuchungsmodell wurden mit einem MissionTM-shRNS-Konstrukt stabile *Bmal1*-defiziente HaCaT-Keratinocyten generiert, um die circadiane Expression von *Bmal1* auszuschalten. Es gelang die Expression von *Bmal1* um 50% zu reduzieren, was jedoch keinen Einfluss auf die Expression der circadianen Gene *Per1*, *Per2* und *Cry2* hatte. Dagegen war in *Bmal1*-defizienten Mäusen die Expression von *Per1* und *Per2* stark suprimiert [Bunger et al., 2000]. In der Arbeit von [Sporn et al., 2011] wurde ebenfalls ein shRNS-Konstrukt zur Regulierung der *Bmal1*-Expression eingesetzt. Die Oszillation des *Bmal1*-Promotor-Luciferasekonstruktes wurde unterdrückt. Eine mögliche Interpretation für die Ineffektivität der Reduzierung der *Bmal1*-Expression auf den circadianen Rhythmus ist, dass das paraloge Protein *Bmal2* in den HaCaT-Keratinocyten die Funktionen übernimmt [Shi et al., 2010].

Die Daten der Genexpressionsexperimente sollten auf Proteinebene mittels *Western-Blot* verifiziert werden. Wie in Abbildung 23 dargestellt ist, wurden nur für das Protein Rev-Erb α positive Ergebnisse erzielt. Der Rev-Erb α -Antikörper generierte eine einzelne spezifische Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich. Eine Oszillation dieses Proteins war im *Western-Blot* jedoch nicht nachweisbar.

Versuche ROR α , β , γ (Abbildung 31 und Abbildung 32), *Bmal1* (Abbildung 33) und *Per1* (Abbildung 34) nachzuweisen, ergaben keine Ergebnisse. Für die negativen Befunde bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeit an:

- A) Die Expression der untersuchten Proteine ist in den HaCaT-Zellen ist zu gering.
- B) Der Untersuchungszeitraum war ungeeignet, um eine Oszillation der Proteine nachzuweisen, weil die Proteine sehr schnell abgebaut werden und daher schwer auf Proteinebene nachweisbar sind [Sahar et al., 2010].

5.2 INTERAKTION DES AHR MIT DER CIRCADIANEN UHR IN HACAT-ZELLEN

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war die Möglichkeit einer Interaktion des AhR mit dem circadianen Signalweg. Für eine solche Interaktion gibt es in der Literatur zahlreiche Indizien:

Die erste Beobachtung beruht auf den physikalischen Proteininteraktionen zwischen den PAS-Proteinen. Diese hochkonservierte Proteinfamilie, zu der neben dem AhR, ARNT und dem AhRR auch die Proteine der Clock-Familie Bmal, Per, NPAS und Clock gehören, zeichnen sich durch Proteinbindungs-Domänen aus [Huang et al., 2007]. Diese Domänen ermöglichen die Bildung verschiedener Heterodimere zwischen Mitgliedern dieser Gruppe. In *Yeast two Hybrid*-Experimenten versuchte Hogenesch *et al.* mögliche Wechselwirkungen aufzuklären [Hogenesch et al., 1997; Hogenesch et al., 1998]. So beschreiben sie in der 1997 veröffentlichten Publikation [Hogenesch et al., 1997] die Wechselwirkung des AhR mit Bmal1. Das *Yeast two Hybrid*-System ist jedoch sehr artifiziell und muss durch weitere Analysen verifiziert werden. Dies gelang ihnen in der ein Jahr später veröffentlichten Studie nicht [Hogenesch et al., 1998]. In dieser Studie interagierte Bmal1 mit Hif1 α . Dieser Befund konnte später von [Cowden and Simon M. C., 2002] nicht reproduziert werden. In einer 2010 von Xu *et al.* publizierten Arbeit wurde bei Mäusen die Interaktion des aktivierten AhR mit Bmal1 beschrieben [Xu et al., 2010]. Diese Interaktion führte zum Bruch der Clock-Bmal1-Wechselwirkung und dadurch zur verminderten Per1-Expression.

Ein weiteres Indiz für eine Interaktion des AhR mit dem circadianen Rhythmus beruht auf der Beobachtung der verschiedenen Wechselwirkungen einer Dioxinvergiftung mit dem Hormonsystem. Durch eine Kontamination mit Dioxin kommt es zu veränderten Konzentrationen von Corticosteroiden [DiBartolomeis et al., 1987], Prolactin, Thyroid-Hormon [Jones et al., 1987] und Melatonin [Linden et al., 1991; Pohjanvirta et al., 1989]. Die Konzentration dieser Hormone weisen selber einen starken circadianen Rhythmus auf und es ist nicht noch vollständig aufgeklärt, inwieweit sie für die Funktion des circadianen Rhythmus des Organismus von Bedeutung sind. Gerade Melatonin, auch als Schlafhormon bezeichnet, wird eine besondere Bedeutung zugeschrieben [Lewy, 2007]. Die beschriebenen neurologischen Störungen, wie Schlaflosigkeit und Unruhe, die durch Dioxin verursacht werden können, unterstützen die Hypothese, dass der AhR mit dem circadianen Rhythmus interagiert [Neuberger et al., 1999]

Weitere Indizien liefern die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Tischkau. Sie untersuchte die Auswirkungen der AhR-Aktivierung auf den circadianen Rhythmus in Mäusen. In ihrer 2007 [Mukai and Tischkau S. A., 2007] veröffentlichten Arbeit demonstrierte sie, dass FICZ die Glutamat-induzierte Phasenverschiebung des circadianen Rhythmus in Hirnschnitten inhibiert. Sie konnten in dieser Arbeit auch zeigen, dass FICZ oder mit Sonnenlicht bestrahltes Tryptophan die *Cyp1A1*-Expression in Mäuselebern nach intraperitonealer Injektion induziert. Diese Induktion konnten sie in SCN 2.2-Zellen, einer Zelllinie aus dem suprachiasmatischen Nucleus, wiederholen. Bei dieser Behandlung konnten sie aber keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von Genen des circadianen Rhythmus feststellen. In einer weiteren Studie untersuchten sie, ob der Verlust des funktionellen AhR zu Veränderungen des circadianen Rhythmus führt [Mukai et al., 2008]. Zunächst stellten sie fest, dass *AhR-Knockout*-Mäuse einen normalen circadianen Rhythmus besitzen. Lediglich bei ovariectomisierten Mäusen zeigten sich kleine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *AhR-Knockout*-Mäusen. Doch die Untersuchung der mRNA-Expression von *Bmal1* und *Per1* zu zwei Zeitpunkten in den *AhR-Knockout*-Mäusen, TCDD-behandelten Wildtyp-Mäusen und unbehandelten Mäusen ergab, dass die Expression besonders von *Per1* von der Aktivierung des AhR beeinflusst wurde. Nach ihren Ergebnissen wird die Hemmung der Expression von *Per1* durch die Bindung des AhR an *Bmal1* und die dadurch bewirkte teilweise Verdrängung von Clock von *Bmal1* verursacht. Diese Ergebnisse konnten sie in einer weiteren Veröffentlichung in den Ovarien von Mäusen reproduzieren [Tischkau et al., 2011].

Die Daten der Expressionsanalysen zeigen, dass die AhR-Agonisten FICZ und 3-Methylcholantren die Amplitude der *Bmal1*-mRNA-Expression in HaCaT-Keratinocyten signifikant erhöhen (Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 24). Diese Erhöhung fand nur in der zunehmenden Phase der *Bmal1*-Expression statt. Die Abnahme der Expression wurde nicht beeinflusst. In den AhR-defizienten-Zellen konnte dieser Anstieg nicht gemessen werden, was dafür spricht, dass die Erhöhung der *Bmal1*-Expression AhR spezifisch ist. Diese Induktion von *Bmal1* hatte keine signifikanten Einfluss auf andere untersuchte Gene des circadianen Rhythmus, wie *Per1*, *Per2*, *DBP* und *Rev-Erba* (Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21).

[Mukai et al., 2008] konnten zeigen, dass TCDD die Expression von *Per1* hemmt, während die Expression in den *AhR-Knockout*-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöht ist. Dieser Befund wurde in einer von [Xu et al., 2010] veröffentlichten Studie detailliert untersucht. Nach TCDD-Behandlung veränderte sich die circadiane Expression von *Per1* in

Mäuselebern. Auch in Hepa1c1c7-Zellen, die eine starke AhR-Expression aufweisen, wurde *Per1* durch den AhR-Agonisten β -Naphthoflavon gehemmt.

Im Gegensatz zu den Befunden an den Maus-Leber-Zelllinien hatte die Aktivierung des AhR durch 3-Methylcholanthren und FICZ in HaCaT-Keratinocyten keinen Einfluss auf die Expression von *Per1*.

Für diesen Befund gibt es mehrere Erklärungen:

- A) Die Expression des AhR ist in den Keratinocyten geringer als in Leber Zellen. Xu *et al.* demonstrieren dies anhand von den zwei Hepa-Zelllinien, Hepa1c1c7 und c12, die sich in der AhR-Expression unterscheiden [Xu et al., 2010]. Während es in den Hepa1c1c7-Zellen, die eine starke AhR-Expression aufweisen, zur Repression der *Per1*-Expression kam, war dies in den c12-Zellen nicht der Fall. Da die AhR-Expression in Leberzellen generell stärker ist als in Keratinocyten, wie den HaCaT, ist es möglich, dass die AhR-Expression in den HaCaT-Keratinocyten nicht ausreicht [Carver et al., 1994].
- B) Eine zweite Erklärung ist, dass die Proteine an dieser Interaktion beteiligten Proteine AhR, Arnt, Bmal1 und Clock speziesspezifische Unterschiede zwischen dem Menschen und der Maus aufweisen können und die Differenzen in den Ergebnissen dieser Arbeit und der der Arbeitsgruppe Tischkau auf interspezifische Unterschiede zurückzuführen sind.
- C) Eine dritte Möglichkeit ist, dass die verwendeten AhR-Liganden, hier FICZ und 3-Methylcholanthren, bei Xu *et al.* [Xu et al., 2010] TCDD und β -Naphthoflavon, in den verschiedenen Organen unterschiedliche Reaktionen bewirken.
- D) Die Interaktion des AhR mit dem Bmal1-Protein kann auch die Erhöhung der Bmal1 mRNA bewirken, da das Heterodimer Bmal1/Clock die eigene Expression von Bmal1 hemmt [Yu et al., 2002; Kwon et al., 2006].

Die Auswirkung der circadianen Uhr auf die Expression und Aktivität des AhR-Signalwegs war Gegenstand von Experimenten verschiedener Studien. Wie [Richardson et al., 1998] zeigen konnte, unterliegt die Proteinexpression von AhR und Arnt in verschiedenen Geweben von Ratten einer circadianen Periodizität. Eine andere Arbeitsgruppe fand erhöhte Cyp1A1- und Cyp1B1-Induktionen in Brustdrüsen von Mäusen mit einem nicht funktionellem *Per1* [Qu et al., 2007]. In weiteren Studien konnten sie diesen Effekt auch mit *Per1*-spezifischer siRNA in Hepa1-Zellen reproduzieren [Qu et al., 2009]. Es konnte gezeigt werden, dass die

Cyp1A1-Expression in den Wildtyp-Mäusen circadian reguliert wird und in Leber und Brustdrüsen nachts erhöht ist [Qu et al., 2010].

Die Analysen der Cyp1A1-Expression in den HaCaT-Zellen, in Abbildung 13 dargestellt, deuten darauf hin, dass die basale Expression auch in dieser Zelllinie nach einem Serumschock oszilliert.

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen AhR und der Clock-Gen-Familie wurde in dieser Arbeit die Integration verschiedener Signalwege, die mit der Aktivität des AhR in Beziehung gesetzt wurden, mittels pharmakologischer Inhibitoren gehemmt. Dies diente der Überprüfung, inwieweit posttranskriptionelle Modifikationen den Einfluss des AhR auf die *Bmal1*-Expression steuern.

Die Inhibitionstudien zeigten, dass einzig der Proteasom-Inhibitor MG-132, die Expression von *Bmal1* beeinflusst. In Gegenwart von FICZ war die Expression zusätzlich erhöht.

Diese Daten stützen Befunde verschiedener Arbeitsgruppen. [Roberts and Whitelaw M. L., 1999; Davarinos and Pollenz R. S., 1999] zeigten, dass der AhR nach Aktivierung schnell degradiert wird. Kürzlich konnte eine E3-abhängige Ubiquitinligase-Aktivität nachgewiesen werden [Ohtake et al., 2007].

Die zusätzliche Induktion durch FICZ unterstützt die Hypothese einer Wechselwirkung von AhR und *Bmal1*.

Es wurde postuliert, dass der AhR via Aktivierung der c-src-Kinase [Enan and Matsumura F., 1996] den EGFR und die RAS-MEK-ERK-Phosphorylierungskaskade stimuliert [Fritsche et al., 2007]. Es wird vermutet, dass auf diesen Weg ein Teil der UV-B vermittelten Signalantwort über den AhR weitergeleitet wird und dafür verantwortlich ist, Gene der zellulären Stressantwort wie *Cox2* [Fritsche et al., 2007] zu regulieren.

In dieser Arbeit wurden drei Inhibitoren getestet, die diesen Weg an unterschiedlichen Stellen blockieren. PP2 inhibiert direkt die Phosphorylierung der c-src-Kinase, BPIQII inhibiert den EGFR und PD98050 die Phosphorylierung der ERK. Alle drei Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die Expression von *Bmal1*.

Hinweise für die Beteiligung des MEK/ERK-Signalwegs am circadianen Rhythmus stammen vor allem aus Untersuchungen der Lichtinduzierung des SCN [Coogan and Piggins H. D., 2003; Dziema et al., 2003; Pizzio et al., 2003]. Im SCN wird die Phosphorylierung der ERK circadian reguliert. Sie ist mittags, bei höchster Sonnenstrahlung am intensivsten und vermutlich an der täglichen Neujustierung des endogenen Rhythmus des SCN durch das Licht

beteiligt. Sanada *et al.* konnten eine ERK-abhängige Phosphorylierung von Bmal1 und Cry1/2 in *in-vitro*-Versuchen zeigen [Sanada et al., 2002; Sanada et al., 2004].

Die beobachtete Hemmung der Aktivität von Bmal1 als Transkriptionsfaktor konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

[Akashi et al., 2008] konnten mit einem MAPK-Inhibitor den Zell-autonomen circadianen Rhythmus in SCN-Schnitten inhibieren.

Der EGFR-Signalweg ist aber auch an der Regulation der AhR-Aktivität beteiligt. [Sutter et al., 2009] beschreiben eine inhibierende Wirkung des EGFR auf die AhR-Aktivität in Keratinozyten.

Während die verwendeten Signaltransduktions-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Expression von *Bmal1* hatten, zeigte sich, dass der c-src-Kinase-Inhibitor PP2 zu einer signifikanten Steigerung der *Per1*-Expression führte. In den Kontrollen und den FICZ induzierten Zellen war die Expression ungefähr fünffach gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht. Über einen Mechanismus, der diese Induktion bewirkt, war zum Zeitpunkt dieser Arbeit nichts bekannt. Diese Befunde stützen die Hypothese der c-src-Kinase-gekoppelten Aktivierung der EGFR-MEK-ERK-Kaskade und eines potentiellen Einflusses dieser Signalkaskade auf den circadianen Rhythmus.

5.3 EINFLUSS DES CIRCADIENEN RHYTHMUS AUF DIE REPARATURSYSTEME DER HAUT

Als drittes Teilgebiet wurde in dieser Arbeit der Einfluss des circadianen Rhythmus auf die Hauthomöostase untersucht. Insbesondere die UVB-induzierten Reparaturmechanismen und die UVB-induzierte Hautalterung standen dabei im Fokus.

Die eindeutigsten Hinweise auf einen Einfluss des circadianen Rhythmus auf die Hauthomöostase stammen aus Experimenten mit ausgeschalteten circadianen Genen. Bmal1-defiziente Mäuse zeigten in verschiedenen Arbeiten. [Khapre et al., 2010; Kondratov et al., 2009; Kondratov, 2007; Kondratov et al., 2006] vorzeitige Alterungserscheinungen. In der Haut machte sich das vor allem in einem verminderten Haarwachstum und einem reduzierten subkutanen Fettgewebe in 40 Wochen alten Mäusen bemerkbar [Kondratov et al., 2006]. Gleichzeitig konnte in diesen Mäusen erhöhte ROS-Signale gemessen werden. In einer weiteren Studie [Kondratov et al., 2009] wurde überprüft, ob mit Zufütterung des Antioxidans

N-Acetylcystein die vorzeitige Alterung in Bmal1-defizienten Mäusen vermindert werden kann. Obwohl die Lebenspanne nach Zufütterung signifikant erhöht wurde, konnte kein Effekt auf das Haarwachstum festgestellt werden, sodass die Ursache für die vorzeitige Hautalterung in Bmal1-defizienten Mäusen in dieser Arbeit nicht gelöst werden konnte. Die Arbeitsgruppe von Andersen schlägt einen P21 regulierten G1-Arrest, durch die Reduzierung von Rev-Erba als Ursache für das verminderte Haarwachstum vor [Geyfman and Andersen B., 2010; Lin et al., 2009].

5.3.1 Einfluss der AhR-Aktivierung auf Gene der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix der Dermis ist ein wichtiger Angriffspunkt der extrinsischen Hautalterung. Durch die Modulation der die Matrix regulierenden Gene kommt es zur typischen Hautfaltenbildung [Quan et al., 2009]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkung des AhR mit dem circadianen Rhythmus für einen Teil der UVB-induzierten Hautalterung verantwortlich ist.

Bei der Etablierung der Synchronisation des circadianen Rhythmus durch den Serumschock, konnte festgestellt werden, dass die Expression von MMP1 und TIMP1 circadian reguliert werden (Abbildung 16). Die ebenfalls untersuchte Expression von Col3A1 zeigte keine circadiane Oszillation (Abbildung 15). Jedoch wurde die Expression durch den Serumschock induziert, sodass es neben der unmittelbaren Induktion, auch 36 Stunden später zu einem weiteren Anstieg der Expression kam. Nach Belastung der Zellen mit 10 µM 3-Methylcholanthren reduzierte sich die MMP1-Expression signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle, Abbildung 25. Diese Reduktion blieb über den gesamten Verlauf der Zeitreihe bestehen. Im Gegensatz dazu wurde TIMP1 gegenüber der DMSO-Kontrolle nicht verändert.

Die unterschiedliche Regulation von MMP1 und TIMP1 nach 3-Methylcholanthren-Belastung könnte auch von physiologischer Relevanz sein, da die Modulation der extrazellulären Matrix auch vom Verhältnis der Aktivitäten dieser beiden Gene abhängt [Gilchrist and Krutman J, 2006]. TIMP1 ist ein Inhibitor der MMP1. Eine reduzierte Expression von MMP1 bei gleichbleibender TIMP1-Expression ist ein Hinweis auf einen verminderten Abbau der extrazellulären Matrix durch MMP1 in diesem Versuchsaufbau. Die Hemmung der MMP1-Expression steht dabei im Gegensatz zur beschriebenen Induktion von MMP1 durch TCDD [Murphy et al., 2004]. Dieser Unterschied ist am ehesten mit den verschiedenen Versuchsbedingungen zu erklären. In dieser Arbeit wurden die HaCaT bis zur Konfluenz wachsen gelassen, um Einflüsse eines aktiven Zellzyklus zu minimieren. Sowohl für den AhR, [Dietrich and Kaina B., 2010; Cho et al., 2004; Ikuta et al., 2004] als auch für die

Aktivität der extrazelluläre Matrix regulierende Gene [Bachmeier et al., 2005] ist die Zelldichte ein wesentlicher Regulationsfaktor.

5.3.2 Einfluss des circadianen Rhythmus auf die DNS-Reparatur nach UVB-Bestrahlung

Vor allem die Cryptochrome als Homologe der Photolyasen werden mit der DNS-Reparatur in Verbindung gebracht [Gauger and Sancar A., 2005; Gehring and Rosbash M., 2003]. Photolyasen sind Enzyme, die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Photoprodukte mit Hilfe von Lichtenergie reparieren können [Sancar et al., 2000; Selby and Sancar A., 2006]. Die mit den Photolyasen strukturell eng verwandten Cryptochrome, gelten deshalb als mögliche Photorezeptoren des circadianen Rhythmus. Bei einigen Organismen wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [Berndt et al., 2007] und dem Zebrafisch *Danio rerio* [Kobayashi et al., 2000; Tamai et al., 2007; Hirayama et al., 2009] sind die Cryptochrome in der Lage als Photorezeptoren blaues Licht zu detektieren. In Säugetieren konnte keine Photorezeptoraktivität der Cryptochrome nachgewiesen werden. Die Arbeit von Matsuo et al. [Matsuo et al., 2003] beweist jedoch die Bedeutung der Cryptochrome für die DNS-Reparatur und den Zell-Zyklus. In Cryptochrome-defizienten Mäusen kommt es in dieser Arbeit zur deregulierten Mitose in der Leber. Dies ist nach Matsuo et al. auf Unterschiede in der Expression verschiedener am Zell-Zyklus beteiligten Proteine, wie Cyclin B1, cdc 2, Wee 1, Bu6 1, P53 cdc, Cyclin a2 und Cyclin d1 zu begründen. Gauger und Sancar konnten die erhöhten Wee1-Expressionen in Cryptochrome 1- und Cryptochrome 2-defizienten Mäusen und Mausfibroblasten zwar reproduzieren, fanden aber keinen Unterschied in den Wachstumsraten der Fibroblasten gegenüber denen von Wildtyp-Fibroblasten [Gauger and Sancar A., 2005].

Cryptochrome bilden Heterodimere mit den Period-Proteinen. Auch bei Period 2 konnte eine Regulation der DNS-Reparatur gezeigt werden. Eine erhöhte Per2-Expression führt zu verminderter Strahlungsempfindlichkeit [Chang et al., 2009; Zhang et al., 2008].

Ein weiteres Protein welches mit der DNS-Reparatur in Zusammenhang gebracht wird ist NPAS2. Polymorphismen dieses Gens gelten als Risikofaktoren für das Non-Hodgkin-Lymphom und Brustkrebs [Yi et al., 2010; Yi et al., 2009; Zhu et al., 2007; Zhu et al., 2008; Hoffman et al., 2008].

In dieser Arbeit wurde zunächst mit den etablierten mRNA-Real-Time-PCR-Analysen der 48 Stunden-Zeitreihen das Expressionsverhalten von Genen, die an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt sind, untersucht.

Die Expressionsverläufe der untersuchten Gene XPA, PXC, Polymerase κ und die Il-12-Untereinheiten 35 und 40 ließen aufgrund ihrer nur geringen Amplitudenhöhe keinen Zusammenhang mit dem circadianen Rhythmus erkennen. Zudem waren keine Veränderungen zwischen der DMSO-Kontrolle und den 3-Methylcholanthren belasteten Zellen zu erkennen, sodass auch die AhR-Abhängigkeit in diesem Versuch ausgeschlossen werden kann. Über die circadiane Expression von Genen der Nukleotidexzisionsreparatur ist bis jetzt sehr wenig bekannt. Einen ersten Nachweis für die circadiane Abhängigkeit gelang [Kang et al., 2009; Kang and Sancar A., 2009], indem sie zeigten, dass das Protein XPA im Cerebrum von Mäusen circadian reguliert wird. Da die Ergebnisse von Kang et al. in dieser Arbeit nicht reproduziert werden konnten, kann an dem angewandten Experimentierdesign liegen. Der circadiane Rhythmus scheint in den HaCaT-Keratinocyten nicht stark genug ausgeprägt zu sein, damit die circadiane Oszillation der DNS-Reparatur gemessen werden kann. Denkbar ist auch, dass in der immortalisierten HaCaT-Zelllinie Gendefekte aufgetreten sind, die diesen Signalweg unterbrechen [Boukamp et al., 1988]. Bei HaCaT-Keratinocyten wurden zwei Punktmutationen im Protein P53 nachgewiesen [Lehman et al., 1993]. Mullenders et al. [Mullenders et al., 2009] identifizierten Bmal1 als einen möglichen Kandidaten der P53-Regulation. Diese könnte in den HaCaT-Zellen gestört sein.

Die Einzelzellgelelektrophorese ist ein weiterer Ansatzpunkt, um die Auswirkung des circadianen Rhythmus auf die DNS-Reparatur zu untersuchen. Mit ihr können DNS-Strangbrüche gemessen werden [Singh et al., 1988]. Diese Strangbrüche werden nach der UVB-Strahlung durch die Nukleotidexzisionsreparatur während des Herausschneidens eines Oligomers rund um die defekten Basen zugefügt [Sancar et al., 2004]. In diesem Versuch konnte keine Abhängigkeit der Anzahl der Strangbrüche vom Bestrahlungszeitpunkt nach der Synchronisation des circadian Rhythmus festgestellt werden (Abbildung 48). Das Hauptproblem während dieses Versuchs bestand darin, dass schon in den unbestrahlten Kontrollen eine starke *Comet*-Schweifintensität zu messen und der Unterschied zu den bestrahlten Proben vergleichsweise gering war. Dies lässt sich damit begründen, dass die für die Ablösung benötigte Trypsinisierung die *Comet*-Bildung stark beeinflusst. [Singh et al., 1991].

Für die weiteren Experimente wurden zusätzlich stabil lentiviral-transduzierte HaCaT-Bmal1-defizienten Keratinocyten generiert. In mRNA-Analysen reduzierten diese Zellen die Bmal1-

Expression um bis zu 50%, Abbildung 27. In dem Viabilitätstests *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* und dem Lactatdehydrogenase-Assay zeigten die Bmal1-defizienten-Keratinocyten nach UVB-Bestrahlung keinen Unterschied zu den Kontrollen, Abbildung 45 und Abbildung 47. Jedoch war der Gesamtumsatz im *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* in den Bmal1-defizienten-Zellen niedriger als in den Kontrollen. Bmal1 ist als Transkriptionsfaktor auch an der Regulation des zellulären Metabolismus beteiligt [Asher and Schibler U., 2011; Hatanaka et al., 2010].

Mit diesen Konstrukten wurde mittels *South-Western-Blot* Analysen, der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimergehalt unmittelbar nach Bestrahlung und 12 Stunden danach bestimmt. Um den Einfluss des circadianen Rhythmus zu bestimmen, wurden die Zellen dazu in zwei, 12 Stunden auseinanderliegenden Phasen nach der Synchronisation bestrahlt. Im Gegensatz zur Einzelzellgelelektrophorese konnte in diesem Assay ein deutlicher Signalunterschied zwischen bestrahlten Proben und unbestrahlten Kontrollen gemessen werden. Der *South-Western-Blot* war für die zugrundeliegenden Versuchsbedingungen daher besser geeignet als die Einzelzellgelelektrophorese. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede nach Bestrahlung zwischen den Zelllinien oder den verschiedenen Zeitpunkten. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass die 12 Stunden zur Reparatur nicht ausreichten, um die Unterschiede in den Reparaturaktivitäten von den messbedingten Schwankungen unterscheiden zu können. Ein späterer Zeitpunkt wurde ausgeschlossen, damit sich der Einfluss des circadianen Rhythmus nicht ausgleicht.

Da sowohl die Einzelzellgelelektrophorese als auch der *South-Western-Blot* keine Hinweise auf einen Einfluss des circadianen Rhythmus lieferten, sollte in einer Zeitreihe die mRNS-Expression der circadianen Gene nach UVB-Bestrahlung überprüft werden. Nach der Bestrahlung wurde die Bmal1-Expression gehemmt, erst nach 16–20 Stunden stieg die Expression wieder. Dadurch kam es zu einer Phasenverschiebung gegenüber der Kontrolle. Die mRNS-Expression von Per1 wurde nach UVB-Bestrahlung induziert auch hier hat sich dadurch die Phase gegenüber der Kontrolle verschoben. Die Hemmung von Clock-Genen durch UVB wurde schon bei Kawara et al. [Kawara et al., 2002] publiziert. Auch hier war die Per1-Expression gegenüber der Bmal1-Expression erhöht. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem Verhalten der Bmal1- und Per1-Expression, das nach AhR-Aktivierung gemessen wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der in der HaCaT-Keratinocytenkultur beobachtete Mechanismus der Bmal1-Induktion durch AhR-Agonisten unabhängig von der Wechselwirkung der UVB-Strahlung mit der Clock-Genfamilie ist.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass UVB selbst starke modulierende Eigenschaften auf die Expression circadianer Gene in Keratinozyten hat. Dies verhindert, dass UVB als Induktor für DNS-Schäden verwendet werden kann, um in der Zellkultur den Einfluss des circadianen Rhythmus auf die DNS-Reparatur zu überprüfen. Die Bestrahlung würde nicht nur die DNS-Schäden hervorrufen, sondern auch gleichzeitig die circadiane Uhr neu synchronisieren. Es ist durchaus möglich, dass beide Mechanismen DNS-Reparatur und circadianer Rhythmus dabei sogar miteinander gekoppelt sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bedingt durch die Rotation der Erde werden circa 30% des menschlichen Genoms rhythmisch exprimiert. Auch verschiedene Funktionen der Haut weisen einen circadianen Rhythmus auf. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die UVB-vermittelte Aktivierung des AhR durch das Photoprodukt FICZ den circadianen Rhythmus in Keratinozyten beeinflussen kann. Weiterhin sollte der Mechanismus dieser Wechselwirkung aufgeklärt werden und eventuelle Auswirkungen auf die Hauthomöostase überprüft werden.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es konnten Versuchsbedingungen etabliert werden, mit der die Periodizität der Markergene *Bmal1* und *Per1* nachzuweisen war. Dazu wurden in HaCaT-Zellen die Expression der circadian regulierten Gene *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry2*, *DBP* und *Rev-Erba* mittels Serumschockmethode synchronisiert. Die Zyklusdauer betrug im Mittel 22,5 Stunden. Diese Befunde konnten mit Hilfe eines *Bmal1*-Promotor-Luciferase-Konstruktes bestätigt werden.
2. In den Wildtyp-HaCaT-, jedoch nicht in AhR-defizienten Zellen, konnte nach Zugabe von AhR-Agonisten eine Erhöhung der *Bmal1*-Expression nachgewiesen werden. Diese Erhöhung ist phasenabhängig auf die induktive Phase der *Bmal1*-Expression beschränkt. Unter Verwendung verschiedener mit der Aktivität des AhR in Verbindung gebrachter Inhibitoren erhärtete sich die Hypothese einer nicht-transkriptionellen Interaktion zwischen AhR und dem circadianen Gen *Bmal1*.
3. Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen ließen sich nicht im *Western-Blot* verifizieren, sodass ein endgültiger Nachweis der Wechselwirkung des AhR mit der *Bmal1*-Expression noch aussteht.
4. Bei den Untersuchungen der physiologischen Relevanz des circadianen Rhythmus für die Stressantwort nach UVB-Bestrahlung, zeigte sich, dass UVB den circadianen Rhythmus unabhängig von der Aktivität des AhR beeinflusst.

Die Untersuchungen lassen eine Interaktion des AhR mit *Bmal1* erkennen. Die zugrunde liegenden Mechanismen bleiben jedoch ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

7 SUMMARY

Due to the earth rotation approximately 30% of the human genome is expressed rhythmically. Also different skin functions show an circadian rhythm.

The aim of this work was to analyse, if the UVB mediated activation of the AhR via the photoproduct FICZ has an impact on the circadian rhythm in keratinocytes. Furthermore the mechanism of such an interaction should be elucidated and possible effects on skin homeostasis should be proven.

Following results were obtained:

1. Test conditions could be established to prove the periodicity of the marker genes *Bmal1* and *Per1*. For that purpose the expression of the circadian regulated genes *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry2*, *DBP* and *Rev-Erba* in HaCaT keratinocytes was synchronized with a serumshock. The cycle time was 22,5 hours in the middle. These findings could be verified by using a *Bmal1*-promotor-luciferase-construct.
2. Treatment with an AhR agonist in wildtyp-HaCaT but not in AhR-deficient cells led to an increase of the *Bmal1* expression. This increase was phase dependently limited to the inductive part of the *Bmal1* expression. With the application of different inhibitors, associated with the AhR activity, the hypothesis of a non transcriptional interaction between the AhR and the circadian gene *Bmal1* could be hardened.
3. The results of the mRNA expression experiments could not be verified by Western-Blot experiments. A final proof of the interaction of the AhR with the *Bmal1* expression remains elusive.
4. The investigations of the physiological relevance of the circadian rhythm to the stress response after UVB-exposure revealed that UVB-exposure affects the circadian rhythm in an AhR independent way.

The experiments reveal an interaction of the AhR with *Bmal1*. However the underlying mechanisms have to be part of further investigations.

8 ANHANG

8.1 MATERIAL

8.1.1 Chemikalien

3-Methylcholanthren	Sigma-Aldrich, Steinheim
6-Formylindolo[3,2-b]carbazol, FICZ	Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA
Agarose	Biozym, Oldendorf
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
H ₂ O DEPC-grade	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LB-Agarose	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
Luciferin-EF TM	Promega, Mannheim
Magermilch	AppliChem, Darmstadt
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	ICN Biomedicals Inc, Aurora, Ohio, USA
Puromycin	Invitrogen, Darmstadt
SDS	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Tris HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

8.1.2 Medien

DMEM, 4,5 g/l Glucose mit Glutamin	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
Antibiotikum/Antimykotikum	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
DMEM, 1 g/l Glucose mit Glutamin	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
DMEM, Phenolrotfrei, 4,5 g/l Glucose mit Glutamin	PAA Laboratories GMBH Cölbe
FCS	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
MEM	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
PBS	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
RPMI	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GMBH, Cölbe

8.1.3 Zelllinien

HaCaT wildtyp	
HaCaT AhR-defizient	
HaCaT Leervektorkontrolle	HaCaT-Kontrollvektor1
HaCaT Zielgen unspezifische Kontrolle	HaCaT-Kontrollvektor2
HaCaT Bmal1-Luciferase	
HaCaT AhR-defizient Bmal1-Luciferase	
HaCaT Kontrollvektor1 Bmal1-Luciferase	
HaCaT Bmal1-defizient	
HaCaT Mission-Kontrollvektor	HaCaT-Kontrollvektor3
HaCaT Zielgen unspezifische shRNA	HaCaT-Kontrollvektor4
(Die Kontrollen werden zur besseren Lesbarkeit durchnummeriert weitergeführt)	
HEK 293	
HepG2	
Hela	

E. coli XL1Blue

8.1.4 Vektoren

Kontrollvektor3	Mission®pLKO.1puro control vector	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kontrollvektor4	Mission® Non Targed shRNA Vector,	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bmal1-defizient	NM-001178.3-1867s1c1,	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMCVR.891		Arbeitsgruppe Altschmied, IUF, Düsseldorf
PMD2.G891		Arbeitsgruppe Altschmied, IUF, Düsseldorf
Bmal-Flag-Überexpressionskonstrukt		Arbeitsgruppe Haarmann-Stemmann, IUF, Düsseldorf
Per1-Überexpressionskonstrukt		Arbeitsgruppe Haarmann-Stemmann, IUF, Düsseldorf
Bmal1-Promotor-Luciferase		Arbeitsgruppe Reinke, IUF, Düsseldorf

8.1.5 Puffer

8.1.5.1 2x RIPA Puffer:

50 mM Tris HCL pH 7,4

300 mM NaCl

0,2 mM EDTA pH 8,0

2% Nonidet P40

2% Desoxycholat

0,2 % SDS

8.1.5.2 1x RIPA Gebrauchslösung:

500 µl 2x RIPA Puffer

10 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, # P-8340)

10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma, # P-5726)

480 µl dest. H₂O

8.1.5.3 10xLaufpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

1% (m/v) SDS

pH 8,3

8.1.5.4 10xTBS-T

0,2 M Tris
1,37 M NaCl
1% v/ v Tween
pH 7,6

8.1.5.5 10xTransferpuffer

0,48 M Tris
0,4 M Glycin

8.1.5.6 1xTransferpuffer

1/10 10xTransferpuffer
7/10 dest. H₂O
2/10 Methanol

8.1.5.7 Blockpuffer (Western-Blot)

5 % (m/v) BSA in 1xTBS-T

8.1.5.8 Comet Lysepuffer

2,809 M NaCl
112,35 mM Na₂EDTA
11,235 mM Tris
pH 10
frisch vor der Lyse hinzufügen:
10 % (v/v) DMSO
1 % (v/v) Triton X-100

8.1.5.9 Comet Elektrophoresepuffer

300 mM NaOH
1 mM Na₂EDTA
pH > 13, bei 4°C lagern

8.1.5.10 Neutralisierungspuffer

0,4 M Tris
pH 7,5

8.1.5.11 TE-Puffer

1mM EDTA-Na₂
10 mM Tris
pH 8,0

8.1.5.12 *South Western* TBS-Tween 0,5 %

10 mM Tris
150 mM NaCl
0,5 % (v/v) Tween-20

8.1.5.13 *South Western* Blockierungslösung

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

8.1.6 *Enzyme*

DNase I	Qiagen, Hilden
M-MLVRT	Promega, Mannheim

8.1.7 *Inhibitoren*

2-Aminoethyl-diphenylborat, 2-APB	Sigma-Aldrich, Steinheim
BPIQ-II	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
KT5720	Merck, Darmstadt
MG-132	Merck, Darmstadt
MNF	Symrise, Holzminden
Nifedipine	Sigma-Aldrich, Steinheim
PD 98059	Sigma-Aldrich, Steinheim
PP2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteasome Inhibitor I PSI	Merck, Darmstadt
Ro-31-8220, Bis IX	Merck, Darmstadt

8.1.8 Kits

5xRT buffer	Invitrogen, Darmstadt
Cell Titer Blue Assay	Promega, Mannheim
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Mannheim
DC Kit	Biorad, München
ECL Plus Western Blotting Detection System	Ge Healthcare, München
Hekfectin	Biorad, München
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
P(dT) ₁₅ Primer	Roche, Mannheim
PEQGOLD total RNA kit	PEQLAB, Berlin
Qiaamp Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Schwerte
SensiMix SyBRKit	Quantace, Berlin

8.1.9 Antikörper

ROR alpha Rabbit polyclonal, Ab70061	Abcam, Cambridge, Uk
Rev-Erbα Rabbit polyclonal, #2124	Cell Signalling Technology Inc.,
Bmal1, Rabbit polyclonal	Labor Schibler, Zürich, Schweiz
Per1, Rabbit polyclonal #PAI-524	Affinity Bioreagents
ROR alpha + beta + gamma monoclonal (ab41942)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CPD Mouse	Kamiyn Biomedical Company
Anti-DNA Mouse IGM	Antibodies online, Aachen
ECL™ Anti-Rabbit IgG Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	Horseshadish GeHealthcare, München
ECL™ Anti-Mouse IgG Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	Horseshadish GeHealthcare, München
Anti-Mouse IGM, μ-Kette,	Peroxidase Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

konjugiert

8.1.10 Primer

Name	Sequenz': 3'-5
ARNT FW	TGG TCT CCC CCA GAC AGT AG
ARNT RV	TCT GGT TTT CTG GCA ATG AA
Bmal1 FW	CCC TAG TCT CAC CAA TCG TGG AT
Bmal1 RV	CAA AAA TCC ATC TGC TGC CCT G
Clock FW	AAG TTA GGG CTG AAA GAC GAC G
Clock RV	GAA CTC CGA GAA GAG GCA GAA G
Cry2 FW	ATC ATT GGT GTG GAC TAC CC
Cry2 RV	ACA GGG TGA CTG AGG TCT TC
CyP1A1 FW	TAG ACA CTG ATC TGG CTG CAG
Cyp1A1 RV	GGG AAG GCT CCA TCA GCA TC
Per1 FW	ACT CGA CAG CTC TTC CAC AG
Per1 RV	GGT GAG GGG TGT GAG ACA TA
Per2 FW	ACA CAG AAG GAG GAG CAG AC
Per2 RV	CGC TTG GAC TTC AAT TTT CT
Rev-Erb α FW	AGG AGA TCT GGG AGG ATT TC
Rev-Erb α RV	CAT CAC TGT CTG GTC CTT CA
XPA FW	GCA GCC CCA AAG ATA ATT GA
XPA RV	TGG CAA ATC AAA GTG GTT CA
XPC FW	AAG TTC ACT CGC CTC GGT TGC
XPC RV	TTC TTT CCT GAT TTT AGC CTT TTT
Polymerase κ FW	AAT GTA TCT TGG TGA CTC CA
Polymerase κ RV	AGA CTT AAG GGT AGA ACT GTT ACC
II 12 -35 FW	TGT CAC CGA GAA GCT GAT GT
II 12 - 35 RV	GAG GTT TCT GGC CAA ACT GA
II 12 - 40 FW	TCG GCA GGT GGA GGT CAG C
II 12 - 40 RV	CGC AGA ATG TCA GGG AGA AGT AGG
Cox2 FW	CCC TTG GGT GTC AAA GGT AA

Cox2 RV	AAC TGA TGC GTG AAG TGC TG
Col3A1 FW	TTG ACC CTA ACC AAG GAT GC
Col3A1 RV	GGA AGT TCA GGA TTG CCG TA
MMP1 FW	CAA TTT CAT TTC TGT TTT CTG GC
MMP1 RV	TGT AGA TGT CCT TGG GGT ATC C
TIMP1 FW	GTG GGG ACA CCA GAA GTC AA
TIMP1 RV	GTG GGA CCT GTG GAA GTA

8.2 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott BD, Perdew G H, Buckalew A R, Birnbaum L S. 1994. Interactive regulation of Ah and glucocorticoid receptors in the synergistic induction of cleft palate by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. *Toxicol Appl Pharmacol.* **128** 138-150.
2. Airola MV, Du J, Dawson J H, Crane B R. 2010. Heme binding to the Mammalian circadian clock protein period 2 is nonspecific. *Biochemistry* **49** 4327-4338.
3. Akashi M, Hayasaka N, Yamazaki S, Node K. 2008. Mitogen-activated protein kinase is a functional component of the autonomous circadian system in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* **28** 4619-4623.
4. Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. 2002. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol. Cell Biol* **22** 1693-1703.
5. Alapetite C, Wachter T, Sage E, Moustacchi E. 1996. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *Int. J Radiat. Biol* **69** 359-369.
6. Asher G, Schibler U. 2011. Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* **13** 125-137.
7. Bachmeier BE, Vene R, Iancu C M, Pfeffer U, Mayer B, Noonan D, Albin A, Jochum M, Nerlich A G. 2005. Transcriptional control of cell density dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in breast cancer cell lines. *Thromb. Haemost.* **93** 761-769.
8. Balsalobre A, Brown S A, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt H M, Schutz G, Schibler U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289** 2344-2347.
9. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93** 929-937.
10. Beischlag TV, Luis M J, Hollingshead B D, Perdew G H. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18** 207-250.
11. Beischlag TV, Perdew G H. 2005. ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* **280** 21607-21611.
12. Bell-Pedersen D, Cassone V M, Earnest D J, Golden S S, Hardin P E, Thomas T L, Zoran M J. 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* **6** 544-556.

13. Berndt A, Kottke T, Breitzkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M, Wolf E. 2007. A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *J Biol Chem* **282** 13011-13021.
14. Birder LA, Perl E R. 1994. Cutaneous sensory receptors. *J Clin. Neurophysiol.* **11** 534-552.
15. Bjarnason GA, Jordan R. 2002. Rhythms in human gastrointestinal mucosa and skin. *Chronobiol. Int.* **19** 129-140.
16. Bjarnason GA, Jordan R C, Wood P A, Li Q, Lincoln D W, Sothorn R B, Hrushesky W J, Ben-David Y. 2001. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* **158** 1793-1801.
17. Bordone L, Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **6** 298-305.
18. Boukamp P, Petrussevska R T, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N E. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* **106** 761-771.
19. Buhr ED, Yoo S H, Takahashi J S. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* **330** 379-385.
20. Bunger MK, Wilsbacher L D, Moran S M, Clendenin C, Radcliffe L A, Hogenesch J B, Simon M C, Takahashi J S, Bradfield C A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103** 1009-1017.
21. Burbach KM, Poland A, Bradfield C A. 1992. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89** 8185-8189.
22. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan P M, Godinho S I, Draetta G F, Pagano M. 2007. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* **316** 900-904.
23. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo J J, Sassone-Corsi P. 2005. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* **309** 1390-1394.
24. Carver LA, Hogenesch J B, Bradfield C A. 1994. Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res* **22** 3038-3044.
25. Chang L, Liu Y Y, Zhu B, Li Y, Hua H, Wang Y H, Zhang J, Jiang Z, Wang Z R. 2009. High expression of the circadian gene mPer2 diminishes the radiosensitivity of NIH 3T3 cells. *Braz. J Med. Biol Res* **42** 882-891.
26. Chen YH, Tukey R H. 1996. Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **271** 26261-26266.
27. Cho YC, Zheng W, Jefcoate C R. 2004. Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.* **199** 220-238.

28. Cleaver JE. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218** 652-656.
29. Collins AR, Oscoz A A, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith C C, Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* **23** 143-151.
30. Coogan AN, Piggins H D. 2003. Circadian and photic regulation of phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster. *J Neurosci.* **23** 3085-3093.
31. Cowden KD, Simon M C. 2002. The bHLH/PAS factor MOP3 does not participate in hypoxia responses. *Biochem Biophys. Res Commun.* **290** 1228-1236.
32. Crews ST, Thomas J B, Goodman C S. 1988. The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* **52** 143-151.
33. Damiola F, Le M N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14** 2950-2961.
34. Davarinis NA, Pollenz R S. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* **274** 28708-28715.
35. Denis M, Cuthill S, Wikstrom A C, Poellinger L, Gustafsson J A. 1988. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys. Res Commun.* **155** 801-807.
36. DiBartolomeis MJ, Moore R W, Peterson R E, Christian B J, Jefcoate C R. 1987. Altered regulation of adrenal steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. *Biochem Pharmacol.* **36** 59-67.
37. Dietrich C, Kaina B. 2010. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell-cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* **31** 1319-1328.
38. Dioum EM, Rutter J, Tuckerman J R, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M A, McKnight S L. 2002. NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* **298** 2385-2387.
39. Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P. 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* **125** 497-508.
40. Dong B, Matsumura F. 2008. Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells. *Mol. Pharmacol.* **74** 255-263.
41. Dziema H, Oatis B, Butcher G Q, Yates R, Hoyt K R, Obrietan K. 2003. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J Neurosci.* **17** 1617-1627.
42. Eide EJ, Kang H, Crapo S, Gallego M, Virshup D M. 2005. Casein kinase I in the mammalian circadian clock. *Methods Enzymol.* **393** 408-418.

43. Eide EJ, Vielhaber E L, Hinz W A, Virshup D M. 2002. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **277** 17248-17254.
44. Enan E, Matsumura F. 1996. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol.* **52** 1599-1612.
45. Fernandez-Salguero PM, Hilbert D M, Rudikoff S, Ward J M, Gonzalez F J. 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* **140** 173-179.
46. Fischer TW, Slominski A, Zmijewski M A, Reiter R J, Paus R. 2008. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp. Dermatol* **17** 713-730.
47. Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer S A, Henshaw R, Ong E S, Evans R M. 1994. Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* **8** 1253-1261.
48. Fritsch P. 2004. *Dermatologie und Venerologie*. Springer Verlag.
49. Fritsche E, Schafer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hubenthal U, Cline J E, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz L O, Rannug A, Furst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104** 8851-8856.
50. Gasparro FP, Mitchnick M, Nash J F. 1998. A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem. Photobiol.* **68** 243-256.
51. Gauger MA, Sancar A. 2005. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer Res* **65** 6828-6834.
52. Gehring W, Rosbash M. 2003. The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J Mol. Evol.* **57 Suppl 1** S286-S289.
53. Gekakis N, Staknis D, Nguyen H B, Davis F C, Wilsbacher L D, King D P, Takahashi J S, Weitz C J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280** 1564-1569.
54. Geyfman M, Andersen B. 2010. Clock genes, hair growth and aging. *Aging (Albany. NY)* **2** 122-128.
55. Gielen JE, Goujon F M, Nebert D W. 1972. Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple Mendelian expression in mouse tissues in vivo. *J Biol Chem* **247** 1125-1137.
56. Gielen JE, Nebert D W. 1971. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mammalian liver cell culture. I. Stimulation of enzyme activity in nonhepatic cells and in hepatic cells by phenobarbital, polycyclic hydrocarbons, and 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane. *J Biol Chem* **246** 5189-5198.

57. Gilchrist B, Krutman J. Photoaging of skin. In *Skin Aging*, Gilchrist B, Krutman J (eds). Springer: New York.
58. Godinho SI, Maywood E S, Shaw L, Tucci V, Barnard A R, Busino L, Pagano M, Kendall R, Quwillid M M, Romero M R, O'Neill J, Chesham J E, Brooker D, Lallane Z, Hastings M H, Nolan P M. 2007. The after-hours mutant reveals a role for Fbx13 in determining mammalian circadian period. *Science* **316** 897-900.
59. Goerz G, Merk H, Bolsen K, Tsambaos D, Berger H. 1983. Influence of chronic UV-light exposure on hepatic and cutaneous monooxygenases. *Experientia*.
60. Gradin K, Toftgard R, Poellinger L, Berghard A. 1999. Repression of dioxin signal transduction in fibroblasts. Identification Of a putative repressor associated with Arnt. *J Biol Chem* **274** 13511-13518.
61. Gradin K, Wilhelmsson A, Poellinger L, Berghard A. 1993. Nonresponsiveness of normal human fibroblasts to dioxin correlates with the presence of a constitutive xenobiotic response element-binding factor. *J Biol Chem* **268** 4061-4068.
62. Griffin EA, Jr., Staknis D, Weitz C J. 1999. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* **286** 768-771.
63. Gu YZ, Hogenesch J B, Bradfield C A. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **40** 519-561.
64. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* **20** 391-403.
65. Haarmann-Stemmann T, Abel J. 2006. The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function. *Biol Chem* **387** 1195-1199.
66. Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, Fukada Y. 2005. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* **280** 31714-31721.
67. Hardin PE. 2004. Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J Biol Rhythms* **19** 348-360.
68. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T. 2010. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Mol. Cell Biol* **30** 5636-5648.
69. Hennig S, Strauss H M, Vanselow K, Yildiz O, Schulze S, Arens J, Kramer A, Wolf E. 2009. Structural and functional analyses of PAS domain interactions of the clock proteins Drosophila PERIOD and mouse PERIOD2. *PLoS Biol* **7** e94.
70. Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, Todo T, Yamamoto T, Sassone-Corsi P, Nishina H. 2009. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle* **8** 2794-2801.

71. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P. 2007. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* **450** 1086-1090.
72. Hirota T, Lee J W, Lewis W G, Zhang E E, Breton G, Liu X, Garcia M, Peters E C, Etchegaray J P, Traver D, Schultz P G, Kay S A. 2010. High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKIalpha as a clock regulatory kinase. *PLoS Biol* **8** e1000559.
73. Hoffman AE, Zheng T, Ba Y, Zhu Y. 2008. The circadian gene NPAS2, a putative tumor suppressor, is involved in DNA damage response. *Mol. Cancer Res* **6** 1461-1468.
74. Hoffman EC, Reyes H, Chu F F, Sander F, Conley L H, Brooks B A, Hankinson O. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252** 954-958.
75. Hogenesch JB, Chan W K, Jackiw V H, Brown R C, Gu Y Z, Pray-Grant M, Perdew G H, Bradfield C A. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* **272** 8581-8593.
76. Hogenesch JB, Gu Y Z, Jain S, Bradfield C A. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95** 5474-5479.
77. Huang G, Chen S, Li S, Cha J, Long C, Li L, He Q, Liu Y. 2007. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev.* **21** 3283-3295.
78. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* **189** 21-39.
79. Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, Ishida N. 2005. A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem* **280** 29397-29402.
80. Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K. 2004. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **279** 19209-19216.
81. Izumo M, Sato T R, Straume M, Johnson C H. 2006. Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput Biol* **2** e136.
82. Jiang BH, Rue E, Wang G L, Roe R, Semenza G L. 1996. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271** 17771-17778.
83. Jones MK, Weisenburger W P, Sipes I G, Russell D H. 1987. Circadian alterations in prolactin, corticosterone, and thyroid hormone levels and down-regulation of prolactin receptor activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* **87** 337-350.
84. Kang TH, Reardon J T, Kemp M, Sancar A. 2009. Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106** 2864-2867.

85. Kang TH, Sancar A. 2009. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy
14. *Cell Cycle* **8** 1665-1667.
86. Kaplan DH. 2010a. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells.
Trends Immunol. **31** 446-451.
87. Kaplan DH. 2010b. Langerhans cells: not your average dendritic cell. *Trends Immunol.* **31** 437.
88. Kawajiri K, Kobayashi Y, Ohtake F, Ikuta T, Matsushima Y, Mimura J, Pettersson S, Pollenz R S, Sakaki T, Hirokawa T, Akiyama T, Kurosumi M, Poellinger L, Kato S, Fujii-Kuriyama Y. 2009. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106** 13481-13486.
89. Kawara S, Mydlarski R, Mamelak A J, Freed I, Wang B, Watanabe H, Shivji G, Tavadia S K, Suzuki H, Bjarnason G A, Jordan R C, Sauder D N. 2002. Low-dose ultraviolet B rays alter the mRNA expression of the circadian clock genes in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **119** 1220-1223.
90. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. 1999. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* **274** 13519-13524.
91. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. 2000. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* **275** 41317-41324.
92. Khapre RV, Samsa W E, Kondratov R V. 2010. Circadian regulation of cell cycle: Molecular connections between aging and the circadian clock. *Ann. Med.* **42** 404-415.
93. Kirichevska T. Die Rolle des Arylhydrokarbon Rezeptors in der UV-B-induzierten Toxizität: Reparatur und Signaltransduktion. In Heinrich Heine Universität Düsseldorf.
94. Kitanishi K, Igarashi J, Hayasaka K, Hikage N, Saiful I, Yamauchi S, Uchida T, Ishimori K, Shimizu T. 2008. Heme-binding characteristics of the isolated PAS-A domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochemistry* **47** 6157-6168.
95. Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* **5** 725-738.
96. Kondratov RV. 2007. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev.* **6** 12-27.
97. Kondratov RV, Kondratova A A, Gorbacheva V Y, Vykhovanets O V, Antoch M P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* **20** 1868-1873.

98. Kondratov RV, Vykhovanets O, Kondratova A A, Antoch M P. 2009. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Aging (Albany. NY)* **1** 979-987.
99. Kwon I, Lee J, Chang S H, Jung N C, Lee B J, Son G H, Kim K, Lee K H. 2006. BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol. Cell Biol* **26** 7318-7330.
100. Lee HG, Yang J H. 2010. PKC-delta mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner. *Chemosphere* **81** 1039-1044.
101. Lee J, Lee Y, Lee M J, Park E, Kang S H, Chung C H, Lee K H, Kim K. 2008. Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol. Cell Biol* **28** 6056-6065.
102. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett W P, Welsh J A, Metcalf R A, Stampfer M R, Fusenig N, Rogan E M, . 1993. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* **14** 833-839.
103. Lewy AJ. 2007. Melatonin and human chronobiology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **72** 623-636.
104. Lin KK, Kumar V, Geyfman M, Chudova D, Ihler A T, Smyth P, Paus R, Takahashi J S, Andersen B. 2009. Circadian clock genes contribute to the regulation of hair follicle cycling. *PLoS Genet.* **5** e1000573.
105. Linden J, Pohjanvirta R, Rahko T, Tuomisto J. 1991. TCDD decreases rapidly and persistently serum melatonin concentration without morphologically affecting the pineal gland in TCDD-resistant Han/Wistar rats. *Pharmacol. Toxicol* **69** 427-432.
106. Lindros KO, Oinonen T, Kettunen E, Sippel H, Muro-Lupori C, Koivusalo M. 1998. Aryl hydrocarbon receptor-associated genes in rat liver: regional coinduction of aldehyde dehydrogenase 3 and glutathione transferase Ya. *Biochem Pharmacol.* **55** 413-421.
107. Long WP, Pray-Grant M, Tsai J C, Perdew G H. 1998. Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **53** 691-700.
108. LOWRY OH, ROSEBROUGH N J, FARR A L, RANDALL R J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** 265-275.
109. Lu YF, Santostefano M, Cunningham B D, Threadgill M D, Safe S. 1995. Identification of 3'-methoxy-4'-nitroflavone as a pure aryl hydrocarbon (Ah) receptor antagonist and evidence for more than one form of the nuclear Ah receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys.* **316** 470-477.
110. Machemer DE, Tukey R H. 2005. The role of protein kinase C in regulation of TCDD-mediated CYP1A1 gene expression. *Toxicol Sci.* **87** 27-37.
111. Maier B, Wendt S, Vanselow J T, Wallach T, Reischl S, Oehmke S, Schlosser A, Kramer A. 2009. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* **23** 708-718.

112. Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302** 255-259.
113. Matthews J, Wihlen B, Thomsen J, Gustafsson J A. 2005. Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol. Cell Biol* **25** 5317-5328.
114. McIntosh BE, Hogenesch J B, Bradfield C A. 2010. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu. Rev. Physiol* **72** 625-645.
115. Mitchell DL. 1988. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem. Photobiol.* **48** 51-57.
116. Mitchell DL, Haipek C A, Clarkson J M. 1985. (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat. Res* **143** 109-112.
117. Motzkus D, Loumi S, Cadenas C, Vinson C, Forssmann W G, Maronde E. 2007. Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways. *Chronobiol. Int.* **24** 783-792.
118. Motzkus D, Maronde E, Grunenberg U, Lee C C, Forssmann W, Albrecht U. 2000. The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett.* **486** 315-319.
119. Mukai M, Lin T M, Peterson R E, Cooke P S, Tischkau S A. 2008. Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Rhythms* **23** 200-210.
120. Mukai M, Tischkau S A. 2007. Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci.* **95** 172-181.
121. Mullenders J, Fabius A W, Madiredjo M, Bernards R, Beijersbergen R L. 2009. A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway. *PLoS One.* **4** e4798.
122. Murphy KA, Villano C M, Dorn R, White L A. 2004. Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *J Biol Chem* **279** 25284-25293.
123. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente L P, Sassone-Corsi P. 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* **134** 329-340.
124. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. 2009. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* **324** 654-657.
125. Neuberger M, Rappe C, Bergek S, Cai H, Hansson M, Jager R, Kundi M, Lim C K, Wingfors H, Smith A G. 1999. Persistent health effects of dioxin contamination in herbicide production. *Environ. Res* **81** 206-214.

126. Nguyen LP, Bradfield C A. 2008. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* **21** 102-116.
127. Oberg M, Bergander L, Hakansson H, Rannug U, Rannug A. 2005. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci.* **85** 935-943.
128. Oesch-Bartlomowicz B, Oesch F. 2009. Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem Pharmacol.* **77** 627-641.
129. Ogi T, Mimura J, Hikida M, Fujimoto H, Fujii-Kuriyama Y, Ohmori H. 2001. Expression of human and mouse genes encoding polkappa: testis-specific developmental regulation and AhR-dependent inducible transcription. *Genes Cells* **6** 943-953.
130. Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N. 2011. Chronopharmacology. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **137** 115-119.
131. Ohtake F, Baba A, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. 2008. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochem Biophys. Res Commun.* **370** 541-546.
132. Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase
4. *Nature* **446** 562-566.
133. Ohtake F, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. 2009. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem Pharmacol.* **77** 474-484.
134. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* **423** 545-550.
135. Pizzio GA, Hainich E C, Ferreyra G A, Coso O A, Golombek D A. 2003. Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport* **14** 1417-1419.
136. Pohjanvirta R, Tuomisto J, Linden J, Laitinen J. 1989. TCDD reduces serum melatonin levels in Long-Evans rats. *Pharmacol. Toxicol* **65** 239-240.
137. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110** 251-260.
138. Provencio I, Rodriguez I R, Jiang G, Hayes W P, Moreira E F, Rollag M D. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* **20** 600-605.
139. Qu X, Metz R P, Porter W W, Cassone V M, Earnest D J. 2007. Disruption of clock gene expression alters responses of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in the mouse mammary gland. *Mol. Pharmacol.* **72** 1349-1358.

140. Qu X, Metz R P, Porter W W, Cassone V M, Earnest D J. 2009. Disruption of period gene expression alters the inductive effects of dioxin on the AhR signaling pathway in the mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol.* **234** 370-377.
141. Qu X, Metz R P, Porter W W, Neuendorff N, Earnest B J, Earnest D J. 2010. The clock genes period 1 and period 2 mediate diurnal rhythms in dioxin-induced Cyp1A1 expression in the mouse mammary gland and liver. *Toxicol Lett.* **196** 28-32.
142. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees J J, Fisher G J. 2009. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Investig. Dermatol Symp. Proc.* **14** 20-24.
143. Quattrochi LC, Tukey R H. 1989. The human cytochrome Cyp1A2 gene contains regulatory elements responsive to 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* **36** 66-71.
144. Quattrochi LC, Vu T, Tukey R H. 1994. The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. *J Biol Chem* **269** 6949-6954.
145. Raghuram S, Stayrook K R, Huang P, Rogers P M, Nosie A K, McClure D B, Burris L L, Khorasanizadeh S, Burris T P, Rastinejad F. 2007. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat. Struct. Mol. Biol* **14** 1207-1213.
146. Ralph MR, Foster R G, Davis F C, Menaker M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247** 975-978.
147. Ramakrishnan SN, Muscat G E. 2006. The orphan Rev-erb nuclear receptors: a link between metabolism, circadian rhythm and inflammation? *Nucl. Recept. Signal.* **4** e009.
148. Rannug A, Rannug U, Rosenkranz H S, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafstrom A K. 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* **262** 15422-15427.
149. Reddy P, Zehring W A, Wheeler D A, Pirrotta V, Hadfield C, Hall J C, Rosbash M. 1984. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* **38** 701-710.
150. Reick M, Garcia J A, Dudley C, McKnight S L. 2001. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* **293** 506-509.
151. Richardson VM, Santostefano M J, Birnbaum L S. 1998. Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats. *Biochem Biophys. Res Commun.* **252** 225-231.
152. Roberts BJ, Whitelaw M L. 1999. Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem* **274** 36351-36356.
153. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. 2010. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS One.* **5** e8561.

154. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory USA..
155. Sanada K, Harada Y, Sakai M, Todo T, Fukada Y. 2004. Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes Cells* **9** 697-708.
156. Sanada K, Okano T, Fukada Y. 2002. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem* **277** 267-271.
157. Sancar A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev.* **103** 2203-2237.
158. Sancar A. 2004. Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Adv. Protein Chem* **69** 73-100.
159. Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Unsal-Kacmaz K, Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem* **73** 39-85.
160. Sancar A, Thompson C, Thresher R J, Araujo F, Mo J, Ozgur S, Vagas E, Dawut L, Selby C P. 2000. Photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors use light energy to repair DNA or set the circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **65** 157-171.
161. Schwarz A, Stander S, Berneburg M, Bohm M, Kulms D, van S H, Grosse-Heitmeyer K, Krutmann J, Schwarz T. 2002. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat. Cell Biol* **4** 26-31.
162. Selby CP, Sancar A. 2006. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103** 17696-17700.
163. Shi S, Hida A, McGuinness O P, Wasserman D H, Yamazaki S, Johnson C H. 2010. Circadian clock gene *Bmal1* is not essential; functional replacement with its paralog, *Bmal2*. *Curr. Biol* **20** 316-321.
164. Shim HS, Kim H, Lee J, Son G H, Cho S, Oh T H, Kang S H, Seen D S, Lee K H, Kim K. 2007. Rapid activation of CLOCK by Ca²⁺-dependent protein kinase C mediates resetting of the mammalian circadian clock. *EMBO Rep.* **8** 366-371.
165. Siepka SM, Yoo S H, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, Lee C, Takahashi J S. 2007. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* **129** 1011-1023.
166. Singh NP, Danner D B, Tice R R, Brant L, Schneider E L. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res* **237** 123-130.
167. Singh NP, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* **175** 184-191.

168. Singh NP, Tice R R, Stephens R E, Schneider E L. 1991. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat. Res* **252** 289-296.
169. Slominski A, Fischer T W, Zmijewski M A, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski R M, Tobin D J. 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine* **27** 137-148.
170. Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol. Biol* **98** 503-517.
171. Spengler ML, Kuropatwinski K K, Schumer M, Antoch M P. 2009. A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle* **8** 4138-4146.
172. Sporn F, Schellenberg K, Blatt T, Wenck H, Wittern K P, Schrader A, Kramer A. 2011. A circadian clock in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **131** 338-348.
173. Sutter CH, Yin H, Li Y, Mammen J S, Bodreddigari S, Stevens G, Cole J A, Sutter T R. 2009. EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106** 4266-4271.
174. Swedenborg E, Pongratz I. 2010. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* **268** 132-138.
175. Takano A, Isojima Y, Nagai K. 2004. Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J Biol Chem* **279** 32578-32585.
176. Tamai TK, Young L C, Whitmore D. 2007. Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104** 14712-14717.
177. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, Sassone-Corsi P. 2009. CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat. Struct. Mol. Biol* **16** 446-448.
178. Tischkau SA, Jaeger C D, Krager S L. 2011. Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Lett.* **201** 116-122.
179. Tischkau SA, Mitchell J W, Pace L A, Barnes J W, Barnes J A, Gillette M U. 2004. Protein kinase G type II is required for night-to-day progression of the mammalian circadian clock. *Neuron* **43** 539-549.
180. Tischkau SA, Mitchell J W, Tyan S H, Buchanan G F, Gillette M U. 2003. Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem* **278** 718-723.
181. Tolleson WH. 2005. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **23** 105-161.

182. Tsuchiya Y, Akashi M, Matsuda M, Goto K, Miyata Y, Node K, Nishida E. 2009. Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Sci. Signal.* **2** ra26.
183. Tzung TY, Runger T M. 1998. Assessment of DNA damage induced by broadband and narrowband UVB in cultured lymphoblasts and keratinocytes using the comet assay. *Photochem. Photobiol.* **67** 647-650.
184. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao Z H, Virshup D M. 2000. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol. Cell Biol* **20** 4888-4899.
185. Viluksela M, Raasmaja A, Lebofsky M, Stahl B U, Rozman K K. 2004. Tissue-specific effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the activity of 5'-deiodinases I and II in rats. *Toxicol Lett.* **147** 133-142.
186. Vitaterna MH, Selby C P, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte E M, Hitomi K, Thresher R J, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi J S, Sancar A. 1999. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96** 12114-12119.
187. Wang GL, Jiang B H, Rue E A, Semenza G L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92** 5510-5514.
188. Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. 1998. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact.* **110** 39-55.
189. Wei YD, Rannug U, Rannug A. 1999. UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact.* **118** 127-140.
190. Welsh DK, Takahashi J S, Kay S A. 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol* **72** 551-577.
191. Wilhelmsson A, Cuthill S, Denis M, Wikstrom A C, Gustafsson J A, Poellinger L. 1990. The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *EMBO J* **9** 69-76.
192. Xu CX, Krager S L, Liao D F, Tischkau S A. 2010. Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene. *Toxicol Sci.* **115** 98-108.
193. Yagita K, Okamura H. 2000. Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* **465** 79-82.
194. Yagita K, Tamanini F, van der Horst G T, Okamura H. 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **292** 278-281.
195. Yi C, Mu L, de l L, I, Sochirca O, Arisio R, Yu H, Hoffman A E, Zhu Y, Katsaro D. 2010. The circadian gene NPAS2 is a novel prognostic biomarker for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **120** 663-669.

196. Yi CH, Zheng T, Leaderer D, Hoffman A, Zhu Y. 2009. Cancer-related transcriptional targets of the circadian gene NPAS2 identified by genome-wide ChIP-on-chip analysis. *Cancer Lett.* **284** 149-156.
197. Yin L, Wang J, Klein P S, Lazar M A. 2006. Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* **311** 1002-1005.
198. Yosipovitch G, Sackett-Lundeen L, Goon A, Yiong H C, Leok G C, Haus E. 2004. Circadian and ultradian (12 h) variations of skin blood flow and barrier function in non-irritated and irritated skin-effect of topical corticosteroids. *J Invest Dermatol* **122** 824-829.
199. Yosipovitch G, Xiong G L, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, Maibach H I. 1998. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J Invest Dermatol* **110** 20-23.
200. Yu W, Nomura M, Ikeda M. 2002. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys. Res Commun.* **290** 933-941.
201. Yueh MF, Huang Y H, Hiller A, Chen S, Nguyen N, Tukey R H. 2003. Involvement of the xenobiotic response element (XRE) in Ah receptor-mediated induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1. *J Biol Chem* **278** 15001-15006.
202. Zanello SB, Jackson D M, Holick M F. 2000. Expression of the circadian clock genes clock and period1 in human skin. *J Invest Dermatol* **115** 757-760.
203. Zhang J, Zhu B, Liu Y, Jiang Z, Wang Y, Li Y, Hua H, Wang Z. 2008. High expression of circadian gene mPer2 diminishes radiosensitivity of tumor cells. *Cancer Biother. Radiopharm.* **23** 561-570.
204. Zhang L, Savas U, Alexander D L, Jefcoate C R. 1998. Characterization of the mouse Cyp1B1 gene. Identification of an enhancer region that directs aryl hydrocarbon receptor-mediated constitutive and induced expression. *J Biol Chem* **273** 5174-5183.
205. Zhu Y, Leaderer D, Guss C, Brown H N, Zhang Y, Boyle P, Stevens R G, Hoffman A, Qin Q, Han X, Zheng T. 2007. Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J Cancer* **120** 432-435.
206. Zhu Y, Stevens R G, Leaderer D, Hoffman A, Holford T, Zhang Y, Brown H N, Zheng T. 2008. Non-synonymous polymorphisms in the circadian gene NPAS2 and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* **107** 421-425.
207. Zhulin IB, Taylor B L, Dixon R. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci.* **22** 331-333.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Ellen Fritsche für die Chance über dieses spannende Thema zu promovieren und einer umfassenden Betreuung und Unterstützung während dieser Zeit.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch möchte ich mich für die fachübergreifende Betreuung als Koreferent bedanken.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Josef Abel für seine Bereitschaft bei der Vollendung dieser Arbeit zu unterstützen und für die hilfreichen Ratschläge zum AhR-Signalweg.

Ich danke Dr. Thomas Haarmann-Stemmann, Tamara Kirichevska, Katrin Frauenstein und Birgit Neumann für die Hilfe bei der Analyse der DNS-Reparatur und der Plasmidpräparation.

Für die wertvollen Ratschläge zu Fragen zum circadian Rhythmus und der Unterstützung bei den Bmal1-Promotor-Luciferase-Experimenten möchte ich mich bei Prof. Hans Reinke, Dr. Britta-Linder-Stuart und Rebecca Schneider bedanken.

Herrn Dr. Joachim Altschmied, Arne Myrnek und Annika Rühl gilt mein Dank für die Hilfe bei der lentiviralen Transduktion.

Besonders bedanken möchte ich mich bei der Julia Tigges, Ulrike Hübenthal und Dr. Christine Götz für die tatkräftige Unterstützung und die motivierenden Zusprüche jede noch so lange Zeitreihe zu überstehen und den nötigen Tritt in den Arsch zu richtigen Zeit.

Ich möchte mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der molekularen Toxikologie für eine absolut freundliche Arbeitsatmosphäre und die tolle Zeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Regine Kahl, Frau Prof. Charlotte Esser und Herrn Prof. Wim Wätjen für die Möglichkeit als Kollegiat am Graduiertenkolleg 1427 teilzunehmen.

Meinen Eltern und meinen Bruder danke ich dafür, dass ich mich zu jeder Zeit auf ihre Hilfe verlassen konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

(Roland Pfeiffer)

Düsseldorf, den 21.06.2011