

**Die Rolle des
Arylhydrokarbon Rezeptors bei der
UVB-induzierten Apoptose**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katrin Frauenstein

aus Berlin

Düsseldorf, Oktober 2012

aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF) gGmbH

(Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

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

Referent: Prof. Dr. Jean Krutmann

Korreferent: Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
Zusammenfassung	x
Abstract.....	xii
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau der Haut	2
1.2 UV-Strahlung und deren molekulare Wirkung auf die Haut	4
1.3 Mechanismus der UVB-induzierten Apoptose	5
1.4 Der Arylhydrokarbon Rezeptor	8
1.5 Zielsetzung	14
2 Material & Methoden	15
2.1 Allgemeines.....	15
2.2 Kultivierung humaner Zelllinien	15
2.3 Belastung der Zellen	17
2.3.1 UVB-Bestrahlung.....	17
2.3.2 Behandlung mit Substanzen	17
2.4 Transfektion von Plasmid-DNA.....	18
2.4.1 Verwendete Plasmide	18
2.4.2 Transformation	19
2.4.3 Transfektion humaner Zellen.....	19
2.5 Bestimmung der Zellproliferation	20
2.6 Reporter-Gen-Analysen	20
2.7 RNA-Analytik.....	21

2.7.1	Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA.....	21
2.7.2	cDNA-Synthese.....	21
2.7.3	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	22
2.7.4	Taqman basierte cDNA-Arrays.....	24
2.8	<i>Western Blot Analyse</i>	26
2.8.1	Proteinextraktion	26
2.8.2	Proteinquantifizierung	26
2.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.8.4	Gelelektrophorese mit Tris-Acetat Gradientengelen	28
2.8.5	Western Blot	28
2.8.6	Immundetektion von Proteinen	29
2.8.7	Densitometrische Auswertung	30
2.9	<i>Durchflusszytometrie mit der Nicoletti-Färbung</i>	31
2.10	<i>In-vivo Untersuchungen</i>	31
2.10.1	Mausmodell.....	31
2.10.2	Genotypisierung.....	32
2.10.3	UVB-Bestrahlung und Probenahme	34
2.10.4	Proteinextraktion	34
2.10.5	TUNEL-Färbung von Gefrierschnitten	34
2.11	<i>Statistik</i>	35
3	Ergebnisse	36
3.1	<i>Expression des AHR in den verwendeten NCTC Keratinozyten</i>	36
3.2	<i>Induktion von AHR-abhängigen Zielgenen nach UVB-Behandlung von NCTC Zellen</i>	37
3.2.1	CYP1A1 und COX2	37
3.2.2	PAI-2.....	38
3.2.3	Die Zytokine IL-6 und IL-8	39
3.3	<i>Einfluss des AHR auf die UVB-induzierte Apoptose</i>	41
3.3.1	Ergebnisse aus <i>in-vitro</i> Studien.....	41
3.3.2	Überprüfung der physiologischen Relevanz in einer <i>in-vivo</i> Studie	45

3.4	<i>Identifizierung der Checkpoint Kinase 1 als Mediator der AHR-abhängigen Apoptose</i>	47
3.5	<i>Identifizierung des Transkriptionsfaktors E2F1 als Regulator der AHR-abhängigen CHK1-Expression</i>	52
3.6	<i>Untersuchungen zur AHR-abhängigen Regulation von E2F1</i>	55
3.7	<i>Untersuchungen zu weiteren E2F1-abhängigen Zielgenen</i>	60
3.8	<i>Einfluss des AHR auf die Sensibilität von A431 Zellen gegenüber genotoxischem Stress</i>	63
4	Diskussion	66
4.1	<i>Charakterisierung der AHR-abhängigen UVB-Antwort in NCTC Keratinozyten</i>	67
4.1.1	<i>CYP1A1- und COX2-Induktion</i>	67
4.1.2	<i>AHR-abhängige mRNA-Expression von PAI-2 nach UVB-Behandlung</i>	69
4.1.3	<i>Der Einfluss des AHR auf die UVB-induzierte mRNA-Expression von IL-6 und IL-8</i>	71
4.2	<i>Identifizierung einer neuen E2F1-CHK1-vermittelten, anti-apoptotischen Funktion des AHR in NCTC Keratinozyten</i>	75
4.3	<i>AHR-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1</i>	78
4.4	<i>Ausblick: Der AHR als ein neuer Angriffspunkt für Chemoprävention und Chemosensibilisierung?</i>	81
	Literatur	85
	Danksagung	100
	Eidesstattliche Erklärung	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Haut.....	3
Abbildung 2: Die drei Wege der UVB-induzierten Apoptose. UVB, Ultraviolett B; ROS, reaktive Sauerstoffspezies.....	8
Abbildung 3: Aufbau der humanen bHLH/PAS-Proteine AHR, ARNT und AHRR.	9
Abbildung 4: Der AHR-Signalweg.	12
Abbildung 5: Konstitutive AHR mRNA-Expression.	36
Abbildung 6: Induzierbare mRNA-Expression von CYP1A1 und COX2 nach UVB-Behandlung.	37
Abbildung 7: Induzierbare mRNA-Expression von PAI-2 nach UVB-Behandlung.	39
Abbildung 8: Induzierbare mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 nach UVB-Behandlung.	40
Abbildung 9: subG1-Anteil der Zellpopulation nach UVB-Bestrahlung von NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.....	42
Abbildung 10: PARP-1 nach UVB-Bestrahlung in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten..	43
Abbildung 11: subG1-Anteil der Zellpopulation nach MNF-Behandlung und UVB-Bestrahlung in NCTC-EV.....	44
Abbildung 12: UVB-induzierte Apoptose in AHR-profizienten und AHR-defizienten SKH-1 Mäusen.....	46
Abbildung 13: Konstitutive JNK1 und CHK1 mRNA-Expression in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.	48
Abbildung 14: Konstitutive CHK1-Proteinexpression.....	49
Abbildung 15: PARP-1 nach transients Transfektion mit pCHK1 und UVB-Bestrahlung.....	50
Abbildung 16: mRNA-Expression von CYP1A1 und CHK1 nach BaP-Behandlung in NCTC-EV Keratinozyten.	51
Abbildung 17: Konstitutive E2F1-Proteinexpression.	52
Abbildung 18: PARP-1 nach transients Transfektion mit pE2F1 und UVB-Bestrahlung.	53
Abbildung 19: CHK1-Proteinmenge nach E2F1-Überexpression in NCTC-shAHR.....	54
Abbildung 20: Basale E2F1-Promotoraktivität in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.	55
Abbildung 21: Beeinflussung der E2F1-Promotoraktivität durch verschiedene Substanzen..	56
Abbildung 22: Konstitutive p21 ^{CIP1} und p27 ^{KIP1} mRNA-Expression in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.....	58

Abbildung 23: Konstitutive p27 ^{KIP1} -Proteinexpression.	59
Abbildung 24: Proliferation von NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.....	60
Abbildung 25: Transkription von p73 in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB- Bestrahlung.	61
Abbildung 26: Transkription von Bax in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB- Bestrahlung.	62
Abbildung 27: Transkription von PCNA in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.	63
Abbildung 28: PARP-1 nach 5-FU-Behandlung in A431 Zellen.....	64
Abbildung 29: PARP-1 nach 72-stündiger MNF- und 5-FU-Behandlung der A431 Zellen.....	64
Abbildung 30: mRNA-Expression von CYP1A1 nach MNF-Behandlung in A431 Zellen.	65
Abbildung 31: Die anti-apoptotische Funktion des AHR in NCTC Keratinozyten wird über die basale Expression von E2F1 und CHK1 vermittelt.....	75
Abbildung 32: AHR-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 in NCTC Keratinozyten.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzklassen und Beispiele von AHR-bindenden Verbindungen.....	10
Tabelle 2: Für die Untersuchungen verwendete Zelllinien.	15
Tabelle 3: Übersicht über die Zelleinsaat für die verschiedenen Versuche.....	16
Tabelle 4: Substanzen und deren Endkonzentration für die Behandlung der Zellen.	17
Tabelle 5: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Plasmide.....	18
Tabelle 6: Verwendete Primer für die qRT-PCR.	23
Tabelle 7: Plattenlayout der <i>Human DNA Repair Express Plate</i>	25
Tabelle 8: Zusammensetzung des RIPA-Puffers für die Proteinextraktion.....	26
Tabelle 9: Reagenzien für SDS-PAGE.....	27
Tabelle 10: Reagenzien für die Gelelektrophorese mit Tris-Acetat Gradientengelen.....	28
Tabelle 11: Zusammensetzung des Transferpuffers für die Western Blot Analyse.	29
Tabelle 12: Reagenzien für die Proteindetektion.	29
Tabelle 13: Verwendete Antikörper und deren eingesetzte Endkonzentration bei Western Blot Analysen.....	30
Tabelle 14: Verwendete <i>Primer</i> für die Genotypisierung.	32
Tabelle 15: Konstitutive Expression von Genen des <i>Human DNA Repair Mechanism TaqMan</i> <i>cDNA Array</i> in NCTC-shAHR Zellen.	47

Abkürzungsverzeichnis

A/A	Antibiotikum / Antimykotikum
AHR	Arylhydrokarbon Rezeptor
AHRR	AhR Repressor
AIP	<i>Immunophilin-like AHR Interacting Protein</i>
AP-1	<i>Aktivator Protein-1</i>
ARNT	<i>AHR Nuclear Translocator</i>
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARA9	AHR-assoziertes Protein
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BaP	Benzo(a)pyren
Bax	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase
cDNA	<i>copy DNA</i>
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
COX2	Cyclooxygenase-2
CYP	Cytochrom P450
DEPC	Diethyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>

Erk	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated Protein with Death Domain</i>
FANCG	<i>Fanconi Anemia</i> Gruppe G Protein
FCS	Fetales Kälberserum
FICZ	6-Formylindol(3,2,-b)carbazol
5-FU	5-Fluoruracil
HAK	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HRP	<i>Horseradish</i> -Peroxidase
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IL	Interleukin
JAK	Janus-aktivierte Kinase
LIG1	Ligase 1
LPS	Lipopolysaccharid
MAP Kinasen	<i>Mitogen-Activated-Protein</i> Kinasen
3-MC	3-Methylcholanthren
MED	minimalen Erythemdosis
Mek	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MNF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
MMLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
mRNA	<i>messenger</i> RNA
N-terminal	Amino-terminal
NES	<i>Nuclear Export</i> Signal
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation</i> Signal
NMSC	<i>Non-Melanoma Skin Cancer</i>
p.a.	<i>per analysis</i>
PAI-2	<i>Plasminogen Activator Inhibitor Type 2</i>
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PER	<i>Period</i>

PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POLR2A	Polymerase 2A
PSMB9	<i>Proteasome Subunit beta 9 Protein</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	<i>Single-minded</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TdT	<i>Terminal Desoxynucleotidyl Transferase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethylmethan)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling</i>
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Aktivator</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
XAP2	Hepatitis Virus X-assoziiertes Protein 2
XRE	<i>Xenobiotic Responsive Elements</i>

Die Abkürzung von chemischen Elementen und Verbindungen erfolgte nach der IUPAC-Nomenklatur.

Zusammenfassung

Ultraviolette (UV) Strahlung, insbesondere der UVB-Anteil, gehört zu den wichtigsten Umweltfaktoren, die zur Entwicklung von Nicht-Melanom-Hautkrebs (NMSC) führen kann. Zum Schutz vor der Entstehung von UVB-induzierten Mutationen leiten Keratinozyten mit irreparablen DNA-Schäden die Apoptose ein. Eine Erhöhung der Apoptoserate ist in den meisten Fällen mit einer verstärkten Beseitigung geschädigter Zellen und somit einer Hemmung von Initiation und Progression von Tumorerkrankungen der Haut verbunden. Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AHR) ist ein wichtiger Regulator des Fremdstoffwechsels und vermittelt die meisten der toxischen Wirkungen von Dioxinen und ähnlichen Umweltchemikalien. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der AHR eine bedeutende Rolle in der UVB-Stressantwort von Keratinozyten spielt. Nach UVB-Einwirkung kommt es zur Bildung des Tryptophan Fotoprodukts 6-Formylindol(3,2,-b)carbazol (FICZ), eines hochaffinen AHR-Liganden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Funktionen des AHR in der UVB-Stressantwort von humanen Keratinozyten zu identifizieren. In den verwendeten stabil transfizierten AHR-*knockdown* Keratinozyten (NCTC-shAHR) war im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollzellen (NCTC-EV) der AHR-Signalweg eindeutig gehemmt. So konnte neben einer verminderten UVB-medierten Induktion der bekannten AHR-Zielgene CYP1A1 und COX2 erstmals auch eine Beteiligung des AHR an der UVB-vermittelten Modulierung von IL-6 und PAI-2, zwei wichtigen Mediatoren der epidermalen Stressantwort, aufgezeigt werden. Die Hemmung des AHR mittels shRNA-Technik oder chemischen Inhibitors führte zu einer erhöhten Apoptoserate in UVB-exponierten humanen NCTC Keratinozyten. Diese anti-apoptotische Funktion des AHR konnte auch in einem entsprechenden SKH-1 Mausmodell beobachtet werden.

Mechanistische Untersuchungen ergaben eine verminderte basale Expression von E2F1 und seinem Zielgen *Checkpoint Kinase 1* (CHK1) in NCTC-shAHR Zellen. Durch eine Überexpression von E2F1 oder CHK1 in NCTC-shAHR Zellen konnte eine Reduktion der UVB-induzierten Apoptoserate auf Kontrollniveau erreicht und somit die Bedeutung von E2F1 und CHK1 für die anti-apoptotische Wirkung des AHR belegt werden. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *Cyclin-dependent Kinase 2* (CDK2)-

abhängige Regulation von E2F1 durch eine verstärkte Expression des endogenen CDK2-Inhibitors p27^{KIP1} in NCTC-shAHR Zellen unterbunden wird. Der identifizierte anti-apoptotische AHR-E2F1-CHK1-Signalweg könnte einen neuen Angriffspunkt hinsichtlich der NMSC-Prävention darstellen.

Die Beobachtung, dass eine Hemmung des AHR ebenso die Apoptoserate von epithelialen Tumorzellen in der Gegenwart eines genotoxischen Chemotherapeutikums erhöhte, könnte darüber hinaus zur Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien bei NMSC beitragen.

Abstract

Ultraviolet (UV) radiation, especially its UVB part, is the most important factor contributing to the development of non-melanoma skin cancer (NMSC). Exposure of keratinocytes to UV radiation results in initiation of apoptosis, a protective mechanism that eliminates cells harbouring DNA damage. A modulation of this process may influence the initiation and progression of UV-induced skin cancer. A few years ago, it was shown that the aryl hydrocarbon receptor (AHR), a ligand-activated transcription factor well known for its role as mediator of dioxin toxicity, is a critical regulator of UVB stress response in skin.

The aim of this work was to identify new functions of the AHR in human NCTC 2544 keratinocytes, an established non-tumorigenic *in vitro* model for keratinocyte biology. In stable transfected AHR-knockdown keratinocytes (NCTC-shAHR) AHR signaling was significantly repressed compared to the respective empty vector control cells (NCTC-EV). Between UVB-irradiated NCTC-EV cells and keratinocytes with impaired AHR signaling, there were significant alterations in the expression of PAI-2 as well as IL-6, two critical factors in the UVB response of keratinocytes and skin cancer biology. Both shRNA-mediated and chemical disturbance of AHR signaling resulted in a significantly higher apoptosis rate after UVB exposure, indicating that the AHR serves an anti-apoptotic function in human keratinocytes. Accordingly, epidermal cell death was more pronounced in UVB-exposed AHR-deficient than AHR-proficient SKH-1 hairless mice. The underlying molecular mechanism involves a loss of expression of E2F1 and its target gene checkpoint kinase-1 (CHK1), two critical components of the DNA damage response. Ectopic overexpression of both E2F1 and CHK1 in AHR-knockdown keratinocytes diminished the observed sensitization to UVB-induced apoptosis. Further mechanistic studies indicated that the AHR represses basal p27^{KIP1} expression to maintain E2F1 and CHK1 expression. The identified AHR-E2F1-CHK1 axis as a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes could represent a putative target for chemoprevention of NMSC. The apoptosis-sensitizing effect of AHR inhibition was not restricted to non-tumorigenic keratinocytes but enhanced the susceptibility of keratinocyte-derived carcinoma cells to undergo apoptosis in response to a genotoxic agent, too. These findings indicate that inhibition of the AHR may also be a suitable approach to enhance the effectiveness of genotoxic chemotherapeutics in the treatment of NMSC.

1 Einleitung

Ultraviolette (UV) Strahlung, insbesondere der UVB-Anteil, gehört zu den ubiquitär vorkommenden und wichtigsten Umweltfaktoren, die zur Entwicklung von diversen Hautstörungen, wie Sonnenbrand, Immunsuppression, Hautkrebs und vorzeitige Hautalterung, führen können. In der Haut werden UVB-Strahlen hauptsächlich von der DNA absorbiert, wodurch es zur Bildung von hoch mutagenen DNA-Fotoprodukten kommt (Kulms und Schwarz, 2000). Zellen mit diesen UVB-induzierten DNA-Veränderungen gehen in den Zellzyklusarrest, um den Schaden durch ein spezialisiertes Reparatursystem zu beseitigen. Ist die Zelle nicht in der Lage, den Schaden zu reparieren, leitet sie den programmierten Zelltod ein. UVB-Strahlung aktiviert darüber hinaus auch zellmembranständige Rezeptoren und nachfolgende Signalwege, wie MAP (*Mitogen-Activated-Protein*) Kinasen und NF (*Nuclear Factor*)- κ B (Herrlich et al., 2008; Krutmann et al., 2012). Die Aktivierung dieser molekularen Wege kann mitogene Signale und das Überleben der Zelle stimulieren, was zu den tumorpromovierenden Eigenschaften der UVB-Strahlung beitragen kann. Zusammenfassend wird demnach zwischen zwei Schenkeln der UVB-Stressantwort in der Zelle unterschieden: Einerseits erfolgt eine Antwort ausgehend von einem DNA-Schaden, andererseits werden weitere Signalwege unabhängig von DNA-Veränderungen aktiviert. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der Arylhydrokarbon Rezeptor (AHR) eine wichtige Rolle bei der zweiten Art der UVB-Stressantwort spielt (Fritsche et al., 2007). Eine UVB-Bestrahlung von Keratinozyten führt zur Bildung des Tryptophan Fotoprodukts 6-Formylindol(3,2,-b)carbazol (FICZ), eines hochaffinen AHR-Liganden. Nach Bindung von FICZ, zerfällt der cytoplasmatische AHR-Multiproteinkomplex und der Rezeptor transloziert in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit seinem Partnermolekül ARNT (*AHR Nuclear Translocator*) und bindet an sogenannte *Xenobiotic Responsive Elements* (XRE) in der Promotorregion von Zielgenen (z.B. Cytochrom P450 1A1, CYP1A1), um die Transkription zu induzieren. Des Weiteren führt eine Ligandenbindung an den AHR auch zur Freisetzung der Tyrosinkinase c-src, welche den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) phosphoryliert. Im Folgenden kommt es zur Aktivierung von MAP Kinasen und schließlich zur Induktion von weiteren Genen (z.B. Cyclooxygenase-2, COX2). Da eine erhöhte CYP-Aktivität zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen kann (Puntarulo und Cederbaum, 1998) und darüber hinaus COX2 in UV-induzierten Entzündungsprozessen und Kanzerogenese involviert ist (Pentland et al.,

1999), spielt der AHR eine entscheidende Rolle in der UVB-Antwort der Zelle. Es wurde berichtet, dass eine transiente Hemmung des AHR unerwünschte, UVB-induzierte Effekte auf die Haut reduzieren kann (Agostinis et al., 2007; Haarmann-Stemann et al., 2012; Krutmann et al., 2012). Die molekularen physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen des AHR in der Haut bleiben aber größtenteils ungeklärt.

1.1 Funktion und Aufbau der Haut

Mit bis zu 2 m² Gesamtfläche bildet die Haut die Abgrenzung des Organismus gegenüber der Außenwelt. Sie ermöglicht die Regulation des Wärme- und Wasserhaushaltes, weiterhin finden hier Sinneswahrnehmungen von Reizen und die Vitamin D Synthese statt. Ihre wichtigste Funktion aber ist der Aufbau einer ersten Barriere zum Schutz vor potentiell gefährlichen äußeren Einflüssen, wie Chemikalien und Strahlung. Bewältigt wir diese Aufgabe u.a. durch die Fähigkeiten der Haut zum enzymabhängigen Fremdstoffmetabolismus, zur Expression von bestimmten Transporterproteinen und zur spezifischen Immunantwort (Merk et al., 2004).

Die Haut wird in drei Schichten unterteilt: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut). Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel und gliedert sich weiter in die folgenden Schichten: Die an die Dermis angrenzende Stratum basale (Basalzellschicht), dem darauf folgenden Stratum spinosum (Stachelzellschicht) sowie dem Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und dem abschließenden Stratum corneum (Hornschicht) (vgl. Abbildung 1).

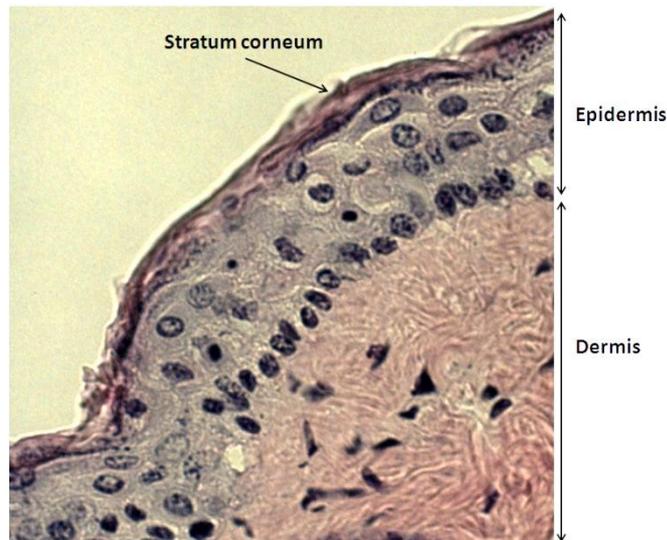


Abbildung 1: Aufbau der Haut.

Querschnitt der Haut; SKH-1 Maus. H&E Färbung. 400-fache Vergrößerung.

Die Keratinozyten sind in der Epidermis die Hauptzellpopulation. Sie werden in der Stratum basale gebildet, gelangen im Laufe ihrer Differenzierung durch die anderen Schichten an die Hautoberfläche und werden dort als Hornzellen abgeschilfert. Weitere in der Epidermis vorkommende Zelltypen sind Melanozyten, Merkelzellen und Langerhanszellen. Das mehrschichtige Epithelgewebe liegt auf einer Basalmembran, die die Zellen vom darunterliegenden Bindegewebe trennt. Durch die Basalmembran führen keine Gefäße. Die Epidermis ist deshalb auf die Ernährung durch Diffusion aus den darunterliegenden Gefäßen angewiesen. Die Dermis besteht hauptsächlich aus gut durchblutetem Bindegewebe und gewährleistet die Versorgung der Epidermis. Weiterhin sind hier Haarfollikel, Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Lymphgefäße sowie Nervenendigungen lokalisiert. Die Subkutis enthält hauptsächlich Fibroblasten und Adipozyten. Sie stellt die Verbindung zwischen Haut und Muskeln bzw. Knochen dar. In ihr verlaufen die größeren Blutgefäße und Nerven für die Versorgung der oberen Schichten (Jain, 2012).

1.2 UV-Strahlung und deren molekulare Wirkung auf die Haut

Die elektromagnetische Strahlung der Sonne wird in ultraviolettes, sichtbares und infrarotes Licht untergliedert. Ultraviolette (UV) Strahlung umfasst die Wellenlängen von etwa 200 bis 400 nm. Sie wird in drei weitere Bereiche eingeteilt: UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) und UVC (200-280 nm). Während UVC-Strahlung von der Ozonschicht der Stratosphäre komplett absorbiert wird, erreichen UVA- und UVB-Strahlen die Erdoberfläche und haben wichtige biologische Konsequenzen für die menschliche Haut (Everett et al., 1966). Dabei wird UVB-Strahlung bereits von Komponenten der oberen Epidermis (z. B. durch DNA, Proteine) absorbiert. UVA-Strahlung penetriert dagegen in tiefere Hautschichten, sie erreicht die Basalmembran der Epidermis und sogar dermale Fibroblasten (Marrot und Meunier, 2008).

Für den Menschen ist die auf die Erdoberfläche treffende Sonnenstrahlung notwendig für das Sehvermögen, den circadianen Rhythmus, die Vitamin D Synthese und die Kontrolle der Körpertemperatur. Die Haut ist derjenige Körperbestandteil, der am meisten dem Sonnenlicht ausgesetzt ist, und spielt daher eine wichtige Rolle in der UV-abhängigen Physiologie und Pathophysiologie. Eine Überdosierung der UV-Strahlung führt zu schädlichen Wirkungen in der Haut, einschließlich Sonnenbrand, Hautalterung sowie Nicht-Melanom-Hautkrebs (*Non-Melanoma Skin Cancer*, NMSC) (Matsumura und Ananthaswamy, 2004). Obwohl UVA-Strahlung den weitaus größeren Anteil am Gesamtspektrum des auf die Erde treffenden Lichts ausmacht und darüber hinaus in tiefere Hautschichten eindringen kann, hat UVB-Strahlung eine wichtigere Bedeutung bei der Kanzerogenese der Haut. Die genotoxischen Effekte von UVB-Strahlung werden hauptsächlich durch die direkte Absorption durch die DNA vermittelt. Bei höheren Wellenlängen (> 320 nm) finden nur indirekt DNA-Schäden, z.B. über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), statt (Marrot und Meunier, 2008).

UVB-Strahlung wird zum größten Teil durch die DNA der epidermalen Keratinozyten absorbiert. Dadurch kommt es zur Ausbildung von DNA-Veränderungen, hauptsächlich in Form von Cyclobutanpyrimidin-Dimeren (Merk et al., 2004). Die Dimerbildung spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung von Hautkrebs. So werden diese Schäden mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen bei UVB-induzierten Hauttumoren assoziiert (Brash und Ponten, 1998). Weiterhin werden die Dimere mit der Unterdrückung des Immunsystems der Haut in

Verbindung gebracht, sodass bereits initiierte Zellen mit Mutationen ungehindert wachsen können und somit die Krebsentstehung begünstigt wird (Berneburg und Krutmann, 2000). UVB-Strahlung kann darüber hinaus auch durch die Entstehung von ROS zu oxidativen DNA-Schäden führen (Ananthaswamy und Pierceall, 1990; Stewart et al., 1996; Black, 2004; Ma, 2010). Die Zelle antwortet bei DNA-Schäden mit einem Stopp des Zellzyklus und der Initiation der DNA-Reparatur. Ist der Grad der Schädigung zu hoch, leitet die Zelle den programmierten Zelltod ein, um eine mitotische Manifestation des DNA-Schadens zu verhindern.

Unabhängig von DNA-Schäden aktiviert UVB-Strahlung auch membranständige Rezeptoren. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung von MAP (*Mitogen-Activated-Protein*) Kinasen Kaskaden und nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren (Bender et al., 1997; Merk et al., 2004; Herrlich et al., 2008; Krutmann et al., 2012). Der genaue molekulare Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch können UVB-Strahlen auch durch andere Moleküle, die beispielsweise im Cytoplasma der Zelle lokalisiert sind, absorbiert werden. Diese Chromophore könnten für die UVB-induzierten Effekte auf die Membran verantwortlich sein. Neuere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang identifizierten das Tryptophan Fotoprodukt 6-Formylindol(3,2,-b)carbazol, das in der Lage ist, über die Aktivierung des Arylhydrokarbon Rezeptors die Genexpression von Zielgenen zu induzieren (Fritsche et al., 2007).

1.3 Mechanismus der UVB-induzierten Apoptose

Zum Schutz vor der Manifestation von irreparablen DNA-Schäden kann die Zelle die Apoptose einleiten. Bei der Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, handelt es sich um einen kontrolliert ablaufenden Prozess, der sich in drei Phasen unterteilen lässt: Initiation, Exekution und Termination (Thompson, 1995). Ausgelöst wird der programmierte Zelltod durch eine Reihe von Stimuli, inklusive UV-Strahlung. Die Exekutionsphase ist charakterisiert durch Schrumpfen der Zelle, Inversion der Membransymmetrie durch die Exposition von Phosphatidylserinen auf der Zelloberfläche, Ausstülpungen der Membran (*blebbing*), Chromatinkondensation sowie DNA-Fragmentierung. In der Terminationsphase werden membranumschlossene Vesikel, die sogenannten *apoptotic bodies*, von benachbarten Zellen phagozytiert. Bei diesem Prozess werden keine pro-inflammatorischen

Moleküle freigesetzt, wodurch im Gegensatz zur Nekrose eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes verhindert wird. *In-vivo* äußert sich die UVB-induzierte Apoptose von Keratinozyten in die Ausbildung sogenannter *sunburn cells*, die typische morphologische Besonderheiten zeigen und sich leicht von normalen Keratinozyten unterscheiden lassen (Sheehan und Young, 2002).

UVB-induzierte Apoptose kann durch die DNA-Schäden und anschließender p53 Aktivierung initiiert werden (Kulms und Schwarz, 2000; Kulms und Schwarz, 2002). Keratinozyten mit DNA-Fotoprodukten arretieren p53-abhängig in der G1-Phase, um ihren Schaden zu reparieren (Campbell et al., 1993). Sind die Zellen nicht in der Lage, die DNA-Schäden zu beseitigen, leiten sie den programmierten Zelltod ein. p53 findet sich in etwa 50% aller epidermalen Tumoren in mutierter Form vor (Marrot und Meunier, 2008). Keratinozyten mit mutiertem p53 überleben zum größten Teil auch mit irreparablen DNA-Schäden nach einer UV-Einwirkung (Brash et al., 1996). p53 knockout Mäuse, die einer UVB-Bestrahlung ausgesetzt wurden, bilden weniger *sunburn cells* aus und haben eine signifikant höhere Empfindlichkeit einen Hauttumor auszubilden als UV-bestrahlte Kontrolltiere (Jiang et al., 1999; Ziegler et al., 1994). Bei bis zu 4% aller Keratinozyten, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, liegt das p53 Gen in mutierter Form vor. Da sich jedoch weitaus weniger Zellen krebsartig verändern und auch eine künstliche Steigerung der DNA-Reparatur nicht zu einer kompletten Hemmung der UVB-induzierten Apoptose führt, muss es noch weitere Prozesse in der Zelle geben, die eine Apoptose unabhängig von DNA-Schäden und p53 einleiten können (Jonason et al., 1996; Kraemer, 1997; Kulms et al., 1999).

Es wurde gezeigt, dass UVB-Strahlung direkt membranständige Todesrezeptoren aktivieren und auf diese Weise den Apoptoseprozess einleiten kann (Kulms und Schwarz, 2000; Kulms und Schwarz, 2002). Todesrezeptoren, wie beispielsweise CD95 (Fas/APO-1), besitzen eine sogenannte *Death Domain* im cytoplasmatischen Teil, welche essentiell für die Induktion des Apoptosesignals ist (Ashkenazi und Dixit, 1998). Die Bindung eines Liganden (CD95L) an CD95 löst eine Trimerisierung des Rezeptors aus. Durch die Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-Associated Protein with Death Domain*) wird das Signal anschließend ins Zellinnere geleitet und eine Signalkaskade der Caspasen, beginnend mit der Caspase-8, eingeleitet. Diese Kaskade führt schließlich zur Spaltung von Substraten (z.B. PARP), DNA-Fragmentierung und Apoptose. In Keratinozyten wurde eine Aktivierung der Caspase-8

sowie nachfolgender Caspase-3 nach einer UVB-Bestrahlung beobachtet. Ebenso reduzierte eine Inhibierung der CD95-Trimerisierung die Apoptose nach UV-Bestrahlung (Aragane et al., 1998). Die Beteiligung des CD95/CD95L-Systems an der UVB-induzierten Apoptose wurde auch *in-vivo* gezeigt (Hill et al., 1999). Eine Blockierung der beiden Mechanismen der UVB-induzierten Apoptose, initiiert durch DNA-Schäden und durch die Aktivierung von Todesrezeptoren, führt zu einer additiven Reduktion des programmierten Zelltodes. Eine komplette Hemmung der UVB-induzierten Apoptose konnte jedoch nicht erreicht werden (Kulms et al., 1999). Es muss also noch mindestens ein weiterer unabhängiger Mechanismus beteiligt sein.

Eine intrazelluläre UVB-induzierte ROS-Bildung spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der UVB-induzierten Apoptose (Kulms und Schwarz, 2002). ROS induziert die Lipidperoxidation, welche zu Strukturveränderung von Membranen führt. Dabei kann die mitochondriale Membran so geschädigt werden, dass es zu einem Verlust des Membranpotentials mit anschließender Cytochrom c Freisetzung ins Cytoplasma kommt (Farber, 1994). Cytochrom c im Cytoplasma führt zu einer ATP-unabhängigen Aktivierung der Procaspase-9. Die nachfolgende Aktivierung von weiteren Caspasen führt schließlich zum programmierten Zelltod (Hu et al., 1999).

Abbildung 2 gibt einen vereinfachten Überblick über die drei unabhängigen Wege der UVB-induzierten Apoptose.

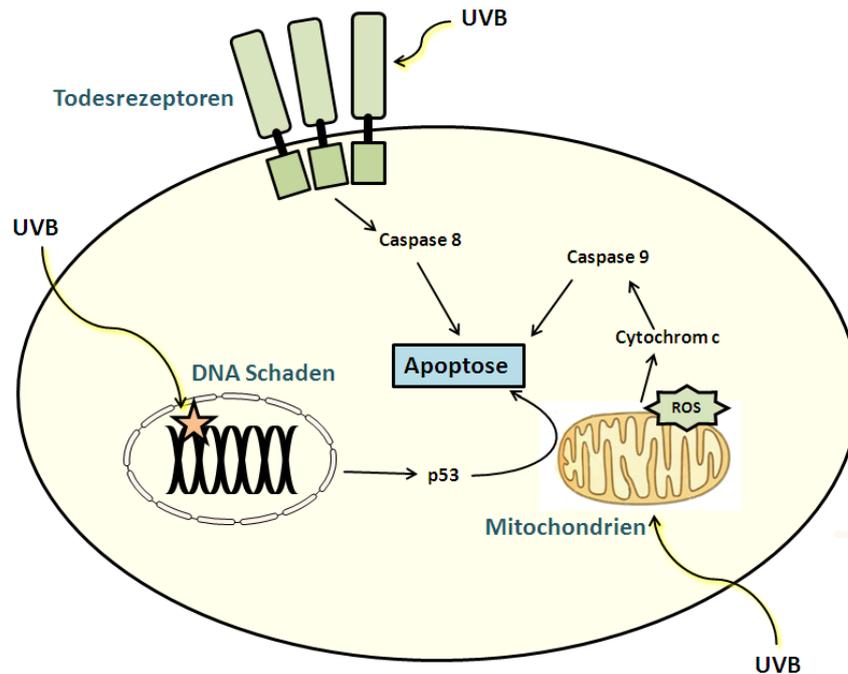


Abbildung 2: Die drei Wege der UVB-induzierten Apoptose. UVB, Ultraviolett B; ROS, reaktive Sauerstoffspezies.

1.4 Der Arylhydrokarbon Rezeptor

Der Arylhydrokarbon Rezeptor (AHR) ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der toxische Effekte von einer Vielzahl von Umweltchemikalien vermittelt. Diese persistenten und anthropogenen Stoffe sind ubiquitär verbreitet und beeinflussen die Gesundheit des Menschen. Besonders das 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) geriet in der Vergangenheit immer wieder in die Schlagzeilen der Medien (z.B. Chemieunfall in Seveso 1976, Anschlag auf Viktor Juschtschenko 2004). Die anthropogene Chemikalie TCDD gehört zu der Gruppe der Dioxine und kann beim Menschen zu Teratogenität, Tumorpromotion, endokrinen Störungen, Schädigung des Immunsystems und der Leber sowie verschiedenen Hautstörungen (Chlorakne) führen. Die meisten dieser toxischen Wirkungen werden über die Aktivierung des AHR vermittelt (Fernandez-Salguero et al., 1996; Mimura et al., 1997).

Das humane AHR-Gen kodiert für ein Protein mit 848 Aminosäuren und einer Masse von 96 kDa (Dolwick et al., 1993). Der AHR, zusammen mit seinen verwandten Proteinen AHR Nuclear Translocator (ARNT) und AHR Repressor (AHRR), gehören zu einer Superfamilie von Transkriptionsfaktoren mit einer charakteristischen *Basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) und PER-ARNT-SIM (PAS)-Struktur (bHLH/PAS-Familie). Die N-terminale bHLH-Domäne ist für die

DNA-Bindung und Protein-Dimerisierung nötig. Die PAS-Domäne beeinflusst Protein-Interaktionen, zum Beispiel mit dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), die DNA-Erkennung sowie die Ligandenbindung (Gu et al., 2000). Der AHR besitzt ein N-terminales *Nuclear Localisation* Signal (NLS) und ein *Nuclear Export* Signal (NES) in der PAS-Domäne. In Abwesenheit eines Liganden ist durch die Bindung eines Hsp90-Dimers an den AHR das NLS-Motiv maskiert (Ikuta et al., 1998). Die C-terminale Region des AHR enthält eine glutaminreiche Transaktivierungsdomäne (TAD), welche für die Aktivierung der Zielgene erforderlich ist (Rowlands et al., 1996). Der schematische Aufbau des AHR im Vergleich zu seinen strukturverwandten Proteinen ARNT und AHRR ist in Abbildung 3 dargestellt.

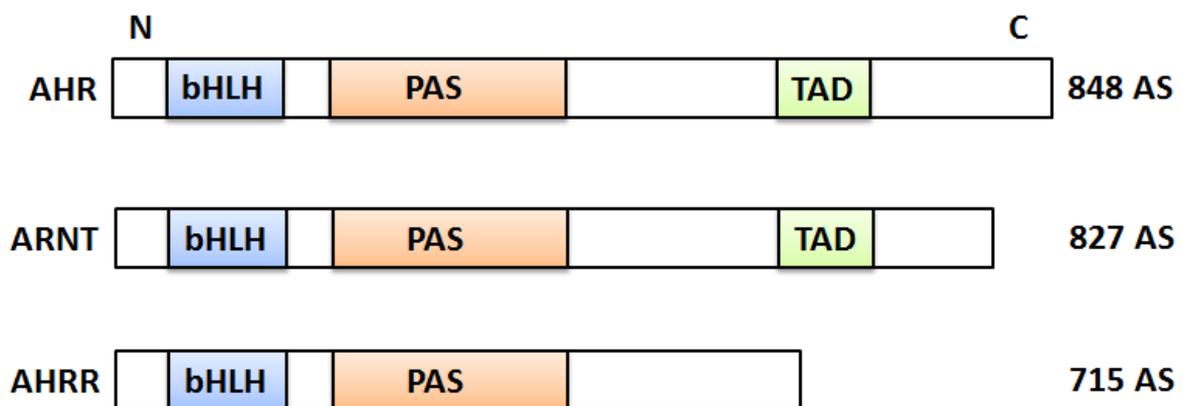


Abbildung 3: Aufbau der humanen bHLH/PAS-Proteine AHR, ARNT und AHRR.

AS, Aminosäuren; bHLH, *Basic-Helix-Loop-Helix*-Domäne; PAS, *PER-ARNT-SIM*-Domäne; TAD, Transaktivierungsdomäne; N, Amino-terminal; C, Carboxy-terminal.

Liganden des AHR können in zwei Gruppen unterteilt werden: 1) anthropogene Chemikalien einschließlich Umweltkontaminanten sowie Arzneimittel, und 2) natürliche Verbindungen aus Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren oder dem Menschen selbst (endogen synthetisiert). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von relevanten Liganden des AHR.

Tabelle 1: Substanzklassen und Beispiele von AHR-bindenden Verbindungen.
(Abel und Haarmann-Stemmann, 2010).

Stoffgruppe	Repräsentative Beispiele
Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK)	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	Benzo(a)pyren (BaP) 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen 3-Methylcholanthren (3-MC)
Indolderivate	6-Formylindol(3,2,-b)carbazol (FICZ) 2-(1'H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäure-methylester
Alkaloide	Annomontin Berberin Rutacarpin
Polyphenole	Curcumin Quercetin Resveratrol
Arzneimittel	Diclofenac Omeprazol Sulindac

AHR-Liganden können sowohl einen aktivierenden (Agonist) als auch einen hemmenden Einfluss (Antagonist) auf den Transkriptionsfaktor haben. Der Großteil der hoch affinen Agonisten sind synthetische Chemikalien, einschließlich halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (Denison und Nagy, 2003). Darüber hinaus gibt es weitere synthetische Verbindungen, die mit einer niedrigen bis mittleren Affinität an den AHR binden. Dazu zählen beispielsweise der Arzneistoff Omeprazol (Quattrochi und Tukey, 1993) sowie die Pestizide Carbaryl und Thiapendazol (Delescluse et al., 2001). Die Tryptophanderivate 6-Formylindol(3,2-b)carbazol (Fritsche et al., 2007) und 2-(1'H-Indol-3'-carbonyl)-thiazol-4-carboxylsäure-methylester (Song et al., 2002) sind endogene Liganden des AHR mit hoher Affinität. Natürlich

vorkommende Liganden umfassen hauptsächlich Bestandteile aus pflanzlichen Lebensmitteln, wie Flavonoide und Polyphenole sowie Alkaloide und Indolderivate. Viele dieser Substanzen hemmen die Aktivität des AHR. Besonders gut dokumentierte AHR-Antagonisten sind Quercetin, Kaempferol (Ciolino et al., 1999), Luteolin (Bothe et al., 2010), Resveratrol (Ciolino und Yeh, 1999), Curcumin (Ciolino et al., 1998) und das synthetische Flavonoid 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (Lu et al., 1995). Auch Grüntee catechine, wie das Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), hemmen die Aktivität des AHR. Sie binden jedoch nicht direkt an den AHR, sondern hemmen das AHR-assoziierte Hsp90 (Palermo et al., 2005).

In Abwesenheit eines Liganden ist der AHR im Cytoplasma an einen Multiproteinkomplex gebunden. Der Proteinkomplex stabilisiert den AHR in einer ligandenaffinen Konformation und verhindert eine unkontrollierte Translokation in den Nukleus. Er besteht aus zwei Hsp90-Molekülen (Denis et al., 1988), dem Ko-Chaperon p23 (Kazlauskas et al., 1999) und dem *Immunophilin-like AHR Interacting Protein* (AIP, auch bekannt als XAP2 oder ARA9) (Ma und Whitlock, Jr., 1997). Zusätzlich wurde die Assoziation der Tyrosinkinase c-src mit dem Multiproteinkomplex beschrieben (Enan und Matsumura, 1996). Bindet nun ein Ligand an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung und der Multiproteinkomplex löst sich vom AHR (vgl. Abbildung 4). Das freigewordene NLS-Motiv führt zu einer schnellen Translokation in den Nukleus. Im Zellkern dimerisiert der AHR mit seinem Partnermolekül ARNT durch die Interaktion der bHLH- und PAS-Domänen der beiden Proteine (Probst et al., 1993). Das Heterodimer AHR/ARNT ist in der Lage, an spezifische DNA-Motive, die sogenannten *Xenobiotic-Responsive Elements* (XRE), zu binden. XREs mit der Basenabfolge 5'-GCGTG-3' befinden sich in der Promotorregion von Zielgenen des AHR. Für die Aktivierung von AHR-abhängigen Genen ist darüber hinaus auch die Interaktion der TAD-Domäne mit benachbarten TATA und CCAATT Boxen erforderlich (Ko et al., 1997). Das wohl am besten untersuchte Zielgen des AHR ist das CYP1A1-Gen, welches für das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) kodiert (Vanden Heuvel et al., 1993). Nach einem nuklearen Export folgt eine Degradierung des AHR, um eine länger anhaltende Aktivierung des AHR-Signalweges zu vermeiden. Neben der proteasomalen Degradierung kann die Aktivität des AHR auch durch den AHR *Repressor* (AHR) reguliert werden (Haarmann-Stemmann et al., 2007). Die nach Ligandenbindung auftretende Dissoziation des Multiproteinkomplexes führt zudem zur Freisetzung der c-src Kinase, was zur Aktivierung weiterer Signalwege führen kann. Mit der c-src-abhängigen Aktivierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) wird der zweite,

nicht-genomische Teil des AHR-Signalweges eingeleitet (Enan und Matsumura, 1996; Köhle et al., 1999; Agostinis et al., 2007; Haarmann-Stemmann et al., 2009). Der EGFR initiiert MAP Kinasen Signalwege mit nachgeschalteter transkriptioneller Induktion von zum Beispiel pro-inflammatorischer Cyclooxygenase-2 (COX2).

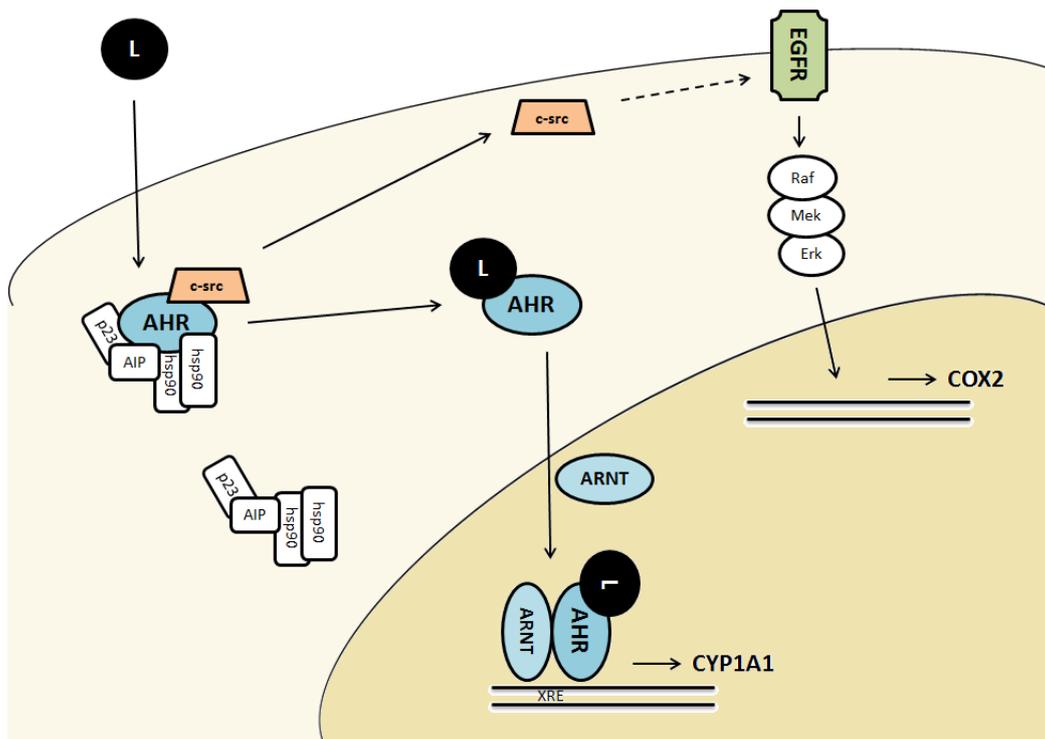


Abbildung 4: Der AHR-Signalweg.

L, Ligand; AHR, Arylhydrocarbon Rezeptor; AIP, *Immunophilin-like-AHR-Interacting Protein*; Hsp90, Hitzeschockprotein 90; ARNT, *AHR Nuclear Translocator*; EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*; Raf, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; Mek, *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*; Erk, *Extracellular-Signal Regulated Kinase*; XRE, *Xenobiotic-Responsive Elements*; CYP1A1, *Cytochrom P450 1A1*; COX2, *Cyclooxygenase-2*.

Neben den klassischen AHR-Zielgenen, die für fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I (CYP1A1, CYP1B1, COX2) und Phase II (NQO1, Glutathion-S-Transferase) kodieren, werden auch einige Gene reguliert, die bei Proliferation, Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung eine Rolle spielen. Beispielsweise wurde ein AHR-abhängiger Expressionsanstieg des pro-apoptotischen Bax (*Bcl-2-associated X Protein*) und eine verstärkte Apoptose nach PAK-Behandlung in Oozyten beschrieben (Matikainen et al., 2001).

Weiterhin ist eine Interaktion des AHR mit NF (*Nuclear Factor*)- κ B-Untereinheiten beschrieben. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in praktisch allen Zelltypen und Geweben vorkommt. Er ist von großer Bedeutung für die Regulation der Immunantwort, und eine Aktivierung von NF- κ B gilt als kritisch für die Entstehung von Entzündungen (Tian, 2009). Eine Bindung des AHR an die NF- κ B-Untereinheit RelB führt ARNT-unabhängig zur transkriptionellen Regulation von beispielsweise Interleukin-8 (IL-8) (Vogel et al., 2007; Vogel et al., 2011). Auch eine Interaktion des AHR mit der Untereinheit RelA ist beschrieben und führt zur Modulation der Interleukin-6 Transkription (IL-6) (Chen et al., 2011). Der AHR kann zudem noch in weitere Signalwege modulierend eingreifen, indem er mit Proteinen wie dem Retinoblastom Protein-1 (Rb) oder dem Estrogen Rezeptor- α interagiert (Bock und Köhle, 2009).

Fritsche et al. konnten zeigen, dass der AHR eine wichtige Rolle in der UVB-Stressantwort in Keratinozyten spielt (Fritsche et al., 2007). UVB-Strahlung führt neben der Bildung von DNA-Schäden auch zur Aktivierung von zellmembranständigen Rezeptoren. Der Mechanismus für die UVB-induzierte Aktivierung dieser Rezeptoren ist größtenteils unbekannt. Weiterhin wurde beschrieben, dass UVB-Bestrahlung in eine erhöhte Expression von CYP1A1 und CYP1B1 in menschlicher Haut resultiert, was auf eine UVB-induzierte, endogene Bildung von AHR-bindenden Substanzen hindeutet (Katiyar et al., 2000). In der Tat wurde Tryptophan, dessen Fotoprodukt FICZ hohe Bindungsaffinität für den AHR aufweist, als ein intrazelluläres Chromophor für UVB-Strahlen identifiziert (Rannug et al., 1987; Wei et al., 1998; Fritsche et al., 2007). Fritsche et al. zeigten eine Induktion der CYP1A1- und COX2-Transkription nach UVB-Bestrahlung von humanen Keratinozyten. Diese Induktion wurde sowohl durch eine shRNA-vermittelte oder chemische Hemmung des AHR als auch durch eine Hemmung von c-src reduziert. Dies legt nahe, dass beide AHR-Signalwege aktiviert wurden: Der klassische, genomische Weg und der nicht-genomische Signalweg (Fritsche et al., 2007). Eine erhöhte CYP-Aktivität kann die Bildung von ROS begünstigen (Puntarulo und Cederbaum, 1998), zusätzlich ist COX2 an UV-induzierten Entzündungsprozessen und Kanzerogenese beteiligt (Pentland et al., 1999). Der AHR spielt somit eine entscheidende Rolle bei der UVB-Stressantwort der Zelle. Eine Modulation der AHR-Aktivität könnte daher einen interessanten Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von UV-induzierten Hauterkrankungen, einschließlich NMSC, haben und zur Prävention bzw. Behandlung dieser Hautstörungen beitragen.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die physiologische bzw. pathophysiologische Rolle des AHR in der UVB-Stressantwort von Hautzellen zu charakterisieren. Untersuchungen an humanen immortalisierten und tumorösen Keratinozyten sowie an SKH-1 Mäusen sollen Erkenntnisse über die Funktion des AHR in der UVB-induzierten Expression von bedeutenden Faktoren in der Stressantwort sowie in der UVB-induzierten Apoptose liefern.

Folgende Fragestellungen werden untersucht:

1. Führt eine UVB-Bestrahlung der NCTC Keratinozyten zu einer Aktivierung des AHR-Signalweges? Ist diese Aktivierung in den zur Verfügung stehenden AHR-defizienten NCTC Zellen gehemmt? Eignen sich diese Zellen für die Untersuchung des AHR-Signalweges nach UVB-Bestrahlung?
2. Welche Rolle spielt der AHR bei der UVB-induzierten Expression der Zytokine IL-6 und IL-8 sowie PAI-2?
3. Beeinflusst der AHR die UVB-induzierte Apoptose? Besitzt er eine pro- oder anti-apoptotische Funktion in Keratinozyten? Können die Ergebnisse auch durch *in-vivo* Studien bestätigt werden? Über welchen molekularen Mechanismus greift der AHR modulierend in den programmierten Zelltod ein?
4. Können die gewonnenen Befunde hilfreich für neue Ansatzpunkte in der Chemoprävention und Chemosensibilisierung beim UV-induzierten Hautkrebs sein?

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen das Verständnis über die Funktion des AHR verbessern, als Grundlage für weiterführende Studien dienen und schließlich zur Entwicklung neuer Ansatzpunkte in der Prävention und Behandlung von UV-abhängigen Hauterkrankungen beitragen.

2 Material & Methoden

2.1 Allgemeines

Zur Herstellung der verwendeten Lösungen wurde Reinstwasser verwendet. Alle Geräte entsprachen den Laborstandards. Die verwendeten Chemikalien entsprachen p.a. Qualität und wurden, soweit nicht anders vermerkt wurde, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Bei RNA-Analysen wurde mit Diethylcarbonat behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) gearbeitet.

2.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, adhärent wachsende Zelllinien verwendet. Diese sind in Tabelle 2 aufgeführt. MEM-Medium, PBS (*Phosphate-buffered Saline*), Trypsin, Antibiotika/Antimykotika (A/A, 10.000U/ml) und Fetales Kälberserum (FCS) wurden von der Firma PAA (Cölbe) bezogen.

Tabelle 2: Für die Untersuchungen verwendete Zelllinien.

Name der Zelllinie	Beschreibung	Nährmedium
NCTC 2544	immortalisierte, humane epitheliale Keratinozyten	MEM inkl. 10% (v/v) FCS, 50.000U A/A
NCTC-EV	stabil mit pCL1P.THPC (Leervektor) transfizierte NCTC-Zellen, geneticinresistent	MEM, 10% (v/v) FCS, 50.000U A/A, 150 mg/l G418 (Geneticin, AppliChem, Darmstadt)
NCTC-shAHR	stabil mit pCL1P.THPC transfizierte NCTC-Zellen mit AHR-gerichteter shRNA-Sequenz, geneticinresistent	MEM, 10% (v/v) FCS, 50.000U A/A, 150 mg/l G418
A431	epitheliale Karzinomzellen	MEM inkl. 10% (v/v) FCS, 50.000U A/A, 1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Das Medium wurde mindestens jeden dritten Tag gewechselt. Hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80%

erreicht, wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden mit Medium vom Flaschenboden abgespült, auf neue Kulturflaschen verteilt oder für geplante Untersuchungen in Multiwell-Platten eingesät. Die für die verschiedenen Versuche eingesetzten Plattenformate und Zellzahlen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die Zelleinsaat für die verschiedenen Versuche.

Versuch	Plattenformat	Zellzahl
Proliferations-Assay	24-well	$2,5 \times 10^4$ /well
Transfektion	6-well	$1,5 \times 10^5$ / well
qRT-PCR	6-well	3×10^5 /well
Western Blot	6-well	3×10^5 /well
Durchflusszytometrie	6-well	1×10^5 /well

Für eine Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend für 5 Minuten bei 560 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des überstehenden Mediums wurde das Zellpellet in Einfriermedium (FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in sterile Einfrierröhrchen überführt. Für ein langsames Abkühlen wurden die Zellen zunächst bei -80°C über Nacht vorgefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Zellen im frischen Medium in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden wie beschrieben weiter kultiviert.

2.3 Belastung der Zellen

2.3.1 UVB-Bestrahlung

Für die UVB-Bestrahlung wurde das Medium abgenommen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde pro 6-well 1 ml PBS bzw. pro 24-well 0,5 ml PBS auf die Zellen gegeben. Die Bestrahlung erfolgte mit einer Lampe aus vier TL20W/12RS-UV-Röhren (Philips, Eindhoven, Niederlande), welche den größten Teil ihrer Energie im UVB-Bereich ($\lambda = 280\text{-}320\text{ nm}$) emittieren und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 310\text{ nm}$ aufweisen. Beispielsweise erfolgte eine Bestrahlung mit einer Dosis von 200 J/m^2 in 24 Sekunden. Die Einwirkung der UV-Strahlung fand direkt, ohne Deckel, auf die Zellen statt. Nach der UVB-Behandlung wurde wieder Medium auf die Zellen gegeben. Mit nicht-bestrahlten Kontrollzellen wurde, außer der Bestrahlung an sich, genauso verfahren.

2.3.2 Behandlung mit Substanzen

Tabelle 4 zeigt die Endkonzentration von Substanzen, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Tabelle 4. Substanzen und deren Endkonzentration für die Behandlung der Zellen.

Substanz	Endkonzentration	Lösungsmittel
3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (Symrise, Holzminden)	20, 60 μM	DMSO
Benzo(a)pyren (Sigma-Aldrich)	5 μM	DMSO
WP631 (Sigma-Aldrich)	150 nM	DMSO
KT5720 (Enzo Life Science, Lörrach)	1,8 μM	DMSO
R-Roscovitin (Enzo Life Science)	1 - 10 μM	DMSO
BAY 11-7085 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)	10 μM	DMSO
LPS (Sigma Aldrich)	5 $\mu\text{g/ml}$	Wasser
PP2 (Sigma-Aldrich)	10 μM	DMSO
PD98059 (Sigma-Aldrich)	10 μM	DMSO
5-Fluoruracil (Sigma-Aldrich)	10 μM	DMSO

Die Substanzen wurden dabei zunächst in dem entsprechenden Medium verdünnt, gemischt und dann auf die Zellen gegeben. Mit Ausnahme des LPS (Lipopolysaccharid) sind alle verwendeten Substanzen in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, wobei die Konzentration des DMSO im Medium konstant bei 0,1% des Gesamtvolumens gehalten wird, um zytotoxische Wirkungen und Effekte durch DMSO auszuschließen. Jeder Versuchsansatz beinhaltet eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO- bzw. Medium-Kontrolle).

2.4 Transfektion von Plasmid-DNA

2.4.1 Verwendete Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pCI-neo	Kontrollvektor	Promega (Mannheim)
pCI-neo FLAG-CHK1 (kurz: pCHK1)	kodiert CHK1, human	Jiri Lukas (Danish Cancer Society, Kopenhagen, Dänemark); (Sorensen et al., 2003)
pCMV	Kontrollvektor	Promega
pCMVHA E2F1 (kurz:pE2F1)	kodiert E2F1, human	Kristian Helin (University of Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark); (Christensen et al., 2005)
pGL2basic	kodiert <i>firefly</i> (<i>Photinus pyralis</i>) Luziferase, Kontrollvektor	Promega
pGL2AN	kodiert <i>firefly</i> Luziferase, durch E2F1 Promotor reguliert	William Kaelin (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA); (Neuman et al., 1994)

2.4.2 Transformation

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Hitzeschockverfahrens in kompetente Bakterien transformiert. Für einen Transformationsansatz wurden 50 µl E.coli (XL1-Blue, Stratagene, La Jolla, USA) Suspension eingesetzt, welche auf Eis aufgetaut und anschließend für 10 Minuten mit β -Mercaptoethanol (24 mM Endkonzentration) inkubiert wurden. Die Plasmid-DNA wurde hinzugegeben und der Ansatz 30 Minuten auf Eis gestellt, dann für 30 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend sofort für zwei Minuten in einem Eisbad abgekühlt. Nach der Zugabe von 900 µl LB-Kulturmedium (Roth) wurden die Zellen bei 37°C und ca. 225 rpm im Schüttel-Inkubator angezogen. Nach einer einstündigen Inkubation wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden invertiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Gewachsene Kolonien wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher abgenommen und in ca. 5 ml LB-Kulturmedium inklusive Antibiotikum bei 37°C über Nacht angezogen. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterienkolonien erfolgte mit Hilfe des QIAprep Plasmid *Purification* Kit (midi; Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch mit Hilfe des GeneQuant II Gerätes (Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt.

2.4.3 Transfektion humaner Zellen

Die humanen NCTC Zellen wurden nach einem Mediumwechsel mit jeweils 0,75 µg pCHK1 und pE2F1 (sowie deren Kontrollvektoren) bzw. mit 1 µg des E2F1-Reportergenkonstrukts pGL2AN (sowie Kontrollvektor) unter Verwendung des Transfektionsreagenz JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, Frankreich) nach Herstellerangaben transfiziert (Verhältnis: 1000 ng Plasmid-DNA zu 4 µl JetPEI). 24 bzw. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben weiter behandelt.

2.5 Bestimmung der Zellproliferation

Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) *Labeling and Detection* Kit III (Roche, Mannheim) erfasst. Nach der Behandlung der Zellen wurde dem Medium für 24 Stunden ein BrdU-haltiges Reagenz zugegeben. Da BrdU ein chemisch analoger Stoff zum Nukleosid Thymidin ist, wird es bei der DNA-Synthese anstelle von Thymidin eingebaut. Die Zellen wurden anschließend mit Ethanol/HCl fixiert und die DNA degradiert. Die frei gewordenen BrdU-Nukleoside wurden mit einem Peroxidasegekoppelten Antikörper markiert. Die Peroxidase setzt ein Substrat, 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS), zu einem Radikalkation um, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden konnte.

2.6 Reporter-Gen-Analysen

Die Transfektion der Zellen mit dem E2F1-Reportergenkonstrukt pGL2AN bzw. dem Kontrollvektor pGL2basic erfolgte wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit der angegebenen Substanz für weitere 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 150 µl *Passive-Lysis-Buffer* (Promega) lysiert und für eine Minute bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Luziferase-Aktivität wurde mit Hilfe des Luziferase-Assay-Reagenz (LAR II, Promega) gemessen. Das in diesem Reagenz enthaltene Luziferin wird durch die Luziferase unter einer messbaren Lichtemission oxidiert. 20 µl der Probe wurden eingesetzt und die Messung erfolgte in einem Multi-Bioluminat LB 9505C Gerät (Berthold Detection Systems, Oak Ridge, USA). Die Zeit der Lumineszenz-Messung betrug jeweils 30 Sekunden. Für die Normierung der ermittelten Luziferase-Aktivität auf den Proteingehalt, erfolgte eine Proteinbestimmung der Proben mit dem BC-Assay Kit (Uptima, Montluçon, Frankreich) gemäß den Herstellerangaben.

2.7 RNA-Analytik

2.7.1 Isolation und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA

Für die qRT-PCR wurde aus den Zellen zunächst die Gesamt-RNA mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem GeneQuant II Spektralphotometer bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Zudem wurde die Reinheit der isolierten RNA durch gleichzeitige Messung der Absorption bei 280 nm und Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm bestimmt. Werte von unter 1,7 ließen auf Verunreinigungen mit Protein schließen.

2.7.2 cDNA-Synthese

Für die PCR ist die Umschreibung von RNA in die sogenannte cDNA (*copyDNA*) erforderlich. Die Synthese erfolgt mit Hilfe der *Moloney-Murine-Leukemia-Virus* (MMLV) Transkriptase. Durch die RNA-abhängige Polymerase-Aktivität wird dabei zunächst ein RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert, für den Abbau der RNA ist die RNase-Aktivität verantwortlich. Im Verlauf der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR, vgl. 2.7.3) wird der DNA-Doppelstrang durch eine DNA-abhängige Polymerase vervollständigt.

Für die cDNA-Synthese wurde 0,5 μg der RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 7,75 μl verdünnt. Nach einer Zugabe von 1,25 μl oligo(dT₁₅)-Primern (Roche) sowie 1 μl dNTPs (Peqlab) erfolgte ein fünfminütiges *Annealing* bei 65°C. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt und die RNA durch Zusatz von 200 Units MMLV Reverser Transkriptase (Promega) und 4 μl 5x RT-Puffer (Promega) für 52 Minuten bei 37°C in cDNA umgeschrieben. Zum Schluss wurde die reverse Transkriptase durch zehnminütiges Erhitzen bei 70°C inaktiviert.

2.7.3 Quantitative *Real-Time* PCR

Bei der PCR werden gezielte DNA Bereiche exponentiell amplifiziert und analysiert. Dabei wird der gewünschte Bereich der DNA von zwei komplementären Oligonukleotiden (*Primern*) eingegrenzt. Die PCR läuft in drei temperaturabhängigen Schritten ab. Zunächst findet eine Hitzedenaturierung der DNA bei 94°C statt. Hierbei trennen sich die doppelsträngigen DNA-Moleküle zu Einzelsträngen auf. Es folgt die Abkühlung auf eine spezifische Temperatur, bei der die *Primer* an die komplementären Regionen des DNA-Stranges hybridisieren (*Annealing*). Ausgehend vom 3'OH-Ende der *Primer* repliziert nun in einem dritten Schritt eine hitzestabile DNA-Polymerase den einzelsträngigen DNA-Strang (*Elongation*). Die entstandenen DNA-Moleküle dienen im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die DNA-Polymerase. Mit jeder Zyklenzahl steigt die Konzentration des gewünschten DNA-Abschnitts exponentiell an. Die sogenannte quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR) ermöglicht es, die Konzentration des DNA-Abschnitts in „Echtzeit“ zu verfolgen, indem ein fluoreszierender Farbstoff (*SYBRGreen*) in die bei der PCR entstehenden DNA-Moleküle interkaliert. Das PCR-Gerät misst die bei jedem PCR-Zyklus zunehmende Fluoreszenz der Probe und berechnet den Eintritt der Reaktion in die exponentielle Phase. Das Software-System kann anhand von Standards mit bekannter Anzahl enthaltener DNA-Moleküle die Kopienzahl in jeder Probe berechnen.

Für die qRT-PCR wurde die cDNA im Verhältnis 1:3 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Reaktionen erfolgten mit Hilfe des *FAST SYBRGreen* Kits (Qiagen), bei dem das Hybridisieren der *Primer* standardmäßig bei 60°C stattfand. Eine Liste der verwendeten Primer ist in Tabelle 6 aufgeführt. Es wurden 3 µl der verdünnten cDNA pro PCR Ansatz verwendet.

Tabelle 6. Verwendete Primer für die qRT-PCR.

	Produkt- länge	Sequenz
β-Aktin (Ihm et al., 2002)	263 bp	<i>forward</i> : 5'-CCCCAGGCACCAGGGCGTGAT-3' <i>reverse</i> : 5'-GGTCATCTTCTCGCGGTTGGCCTTGGGGT-3'
AHR (Fritsche et al., 2005)	132 bp	<i>forward</i> : 5'-TGGTCTCCCCAGACAGTAG-3' <i>reverse</i> : 5'-TTCATTGCCAGAAAACCAGA-3'
CYP1A1 (Omiecinski et al., 1990)	150 bp	<i>forward</i> : 5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3' <i>reverse</i> : 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'
COX2 (Fritsche et al., 2007)	143 bp	<i>forward</i> : 5'-CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA-3' <i>reverse</i> : 5'-AACTGATGCGTGAAGTGCTG-3'
IL-6 (Obara et al., 2005)	295 bp	<i>forward</i> : 5'-AAATTCGGTACATCCTCGAC-3' <i>reverse</i> : 5'-CAGGAACTGGATCAGGACTT-3'
IL-8 (Kina et al., 2009)	167 bp	<i>forward</i> : 5'-ACTCCAAACCTTTCCACCC-3' <i>reverse</i> : 5'-CCCTCT TCAAAA ACT TCTCCAC-3'
PAI-2 (Fernandez-Soria et al., 2006)	251 bp	<i>forward</i> : 5'-TGTTCTTGTTGCTTCCAGATGAAATTGCCG-3' <i>reverse</i> : 5'-CATTCTCTCCGACATCCCTGAGAAATTGG-3'
JNK1 (Catalano et al., 2003)	75 bp	<i>forward</i> : 5'-TCAATGGCTCTCAGCATCCA-3' <i>reverse</i> : 5'-GCCAAAGTCGGATCTGTTGAC-3'
CHK1 (Nomura et al., 2005)	220 bp	<i>forward</i> : 5'-CTTTGGCTTGGCAACAGT-3' <i>reverse</i> : 5'-CCAGTCAGAATACTCCTG-3'

	Produkt- länge	Sequenz
p21 ^{CIP1} (Zhang et al., 2009)	128 bp	<i>forward</i> : 5'-CCATGTGGACCTGTCACTGT-3' <i>reverse</i> : 5'-TGGTAGAAATCTGTCATGCTGGTC-3'
p27 ^{KIP1} (Huang et al., 2009)	171 bp	<i>forward</i> : 5'-AGATGTCAAACGTGCGAGTG-3' <i>reverse</i> : 5'-TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA-3'
p73 (Kawahara et al., 2008)	167 bp	<i>forward</i> : 5'-GCACCACGTTTGAGCACCTCT-3' <i>reverse</i> : 5'-GCAGATTGAACTGGCCATGA-3'
Bax (Ou et al., 2005)	355 bp	<i>forward</i> : 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3' <i>reverse</i> : 5'-TCCAATGTCCAGCCCATGAT -3'
PCNA (Gosselin et al., 2009)	186 bp	<i>forward</i> : 5'-TCTCAGCCATATTGGAGATG-3' <i>reverse</i> : 5'-CAGGTACCTCAGTGCAAAAG-3'

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde die *Rotor-Gene Q Series Software 1.7* (Qiagen) verwendet.

2.7.4 Taqman basierte cDNA-Arrays

Für eine umfangreiche RNA-Analyse in humanen NCTC Zellen wurden zusätzlich sogenannte *Human DNA Repair Mechanism TaqMan Express Plates* (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Auf einer 96-well Platte sind dabei spezifische Primer in dem in Tabelle 7 angegebenen Plattenlayout vorgebunden.

Tabelle 7: Plattenlayout der *Human DNA Repair Express Plate*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	APEX1	ATM	ATR	BARD1	BRCA1	BRCA2	CCNO	CHEK1
B	CHEK2	DCLRE1A	ERCC1	ERCC2	ERCC3	ERCC4	ERCC5	ERCC6	ERCC8	FANCA	FANCC	FANCD2
C	FANCE	FANCF	FANCG	FEN1	GADD45A	GADD45B	GADD45G	GTF2H1	GTF2H3	HUS1	IGF1	LIG1
D	LIG3	LIG4	MAPK10	MAPK11	MAPK12	MAPK14	MAPK8	MAPK9	MBD4	MDM2	MGMT	MRE11A
E	MSH2	MSH3	MSH6	NBN	NTHL1	OGG1	PARP1	PCNA	PNKP	POLA1	POLB	POLD1
F	POLG	POLH	POLK	POLQ	POLR1B	POLR1C	POLR2A	POLR2B	POLR2C	PRKDC	PSMA3	PSMB10
G	PSMB5	PSMB8	PSMB9	PSMC4	RAD1	RAD17	RAD23B	RAD50	RAD51	RAD52	RAD9A	RPA2
H	RPA3	SMUG1	TP53	TREX1	TREX2	XAB2	XPA	XPC	XRCC1	XRCC4	XRCC5	XRCC6

Beim *TaqMan* wird eine Sonde verwendet, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter (6-FAM) trägt, dessen Emission durch einen Quencher (MGB/NFQ) am 3'-Ende verhindert. Die Sonde bindet an einer Sequenz der cDNA zwischen dem *forward* und *reverse Primer*. Wenn die *AmpliTaq Gold* DNA-Polymerase das PCR-Produkt synthetisiert, spaltet sie die Sonde aufgrund ihrer 5'-Exo-Nuklease-Aktivität, und die Fluoreszenz des Reporters kann detektiert werden.

Die Durchführung des *TaqMan Arrays* erfolgte mit Hilfe des *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben. Um die Expression der Gene zwischen AHR-profizienten und AHR-defizienten NCTC Keratinozyten zu vergleichen, wurde eine semiquantitative Bestimmung der Menge der Ausgangs-cDNA mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durchgeführt. Dabei wurde die Differenz (ΔC_t) aus dem Schwellenwert (C_t) des zu untersuchenden Gens und des Referenzgens (18S, GAPDH oder HPRT1) gebildet. Dann wurden die beiden ΔC_t -Werte der NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_t$). Um den Expressionsunterschied zwischen den beiden Zelllinien zu ermitteln, wurde dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt.

2.8 Western Blot Analyse

2.8.1 Proteinextraktion

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot Analysen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer (vgl. Tabelle 8) mit Zusatz von 2 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail (PIC; Calbiochem, La Jolla, USA) sowie 5 µl/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) auf Eis lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorfgefäße überführt und durch Zentrifugation (15 Minuten, 14.000 rpm, 4°C) von Zelltrümmern bereinigt. Für die weiteren Analysen wurde nur der Überstand verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des RIPA-Puffers für die Proteinextraktion.

RIPA-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,1 mM	EDTA (Ethylendiamintetraacetat; pH 8,0)
	1 % (w/v)	Nonidet p-40
	1 % (w/v)	Desoxycholsäure
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,025 % (w/v)	NaN ₃
	2 µl/ml	Protease Inhibitor Cocktail, frisch zugesetzt
	5 µl/ml	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), frisch zugesetzt

2.8.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte nach dem Prinzip von Lowry mit den DC-Protein-Assay (Bio-Rad, Richmond, USA) nach Herstellerangaben. Der Assay basiert auf der Reaktion der Proteine mit einer basischen Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte über die Erstellung einer BSA-Standardgerade.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld anhand ihrer Molekülgröße. Um eine möglichst scharfe Auftrennung zu erreichen, wurde ein diskontinuierliches System bestehend aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proteine und einem Trenngel für die eigentliche Auftrennung verwendet.

Eine einheitliche Menge an Protein wurde mit Wasser eingestellt, anschließend mit 4x Laemmli-Puffer versetzt, für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht und zusammen mit 10 µl *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad) Protein-Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde vertikal mit einer Apparatur der Firma Roth in SDS-PAGE-Laufpuffer für ca. 3 Stunden bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Die Zusammensetzung der benötigten Reagenzien ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Reagenzien für SDS-PAGE.

4x Laemmli-Probenpuffer:	250 nM	Tris-HCl, pH 8
	20% (w/v)	Glycerol
	5% (w/v)	SDS
	0,001% (w/v)	Bromphenolblau
	100 mM	DTT (Dithiothreitol)
	16 %	β-Mercaptoethanol, frisch zugesetzt
SDS-PAGE-Laufpuffer:	50 mM	Tris
	383 mM	Glycin
	0,1%	SDS
Sammelgel (5%):	2,9 ml	H ₂ O
	0,5 ml	Acrylamid (40% v/v)
	0,5 ml	1 M Tris , pH 6,8
	20 µl	SDS
	20 µl	APS (Ammoniumperoxodisulfat, 20% v/v)
	4 µl	TEMED (Tetramethylethyldiamin)

Trenngel (12%):	4,2 ml	H ₂ O
	3,0 ml	Acrylamid (40% v/v)
	2,6 ml	1,5 M Tris, pH 8,8
	50 µl	SDS
	50 µl	APS (20% v/v)
	4 µl	TEMED

2.8.4 Gelelektrophorese mit Tris-Acetat Gradientengelen

Für eine scharfe Auftrennung von großen Proteinen (> 80 kDa) wurden 3-8% Tris-Acetat Gradientengele verwendet. Durchgeführt wurde die Gelelektrophorese nach den Angaben des Herstellers Invitrogen und mit Hilfe der in Tabelle 10 aufgelisteten Materialien.

Tabelle 10: Reagenzien für die Gelelektrophorese mit Tris-Acetat Gradientengelen.

4x Probepuffer:	NuPAGE <i>Sample Buffer</i> (4x; Invitrogen)
Tris-Acetat-SDS-Laufpuffer:	NuPAGE <i>Tris-Acetate-SDS Running Buffer</i> (20x; Invitrogen)
Gradientengel:	NuPAGE Novex 3-8% <i>Tris-Acetate Gel</i> (Invitrogen)

2.8.5 Western Blot

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran im elektrischen Feld wurde die Tank-Blot-Methode mit Hilfe einer Apparatur der Firma Roth nach Herstellerangaben verwendet. Die PVDF-Membran wurde für 30 Sekunden in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Gel und den Blotting-Papieren sowie Schwämmen für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer (vgl. Tabelle 11) äquiliert. Beim Aufbau der Tank-Blot-Kassette wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Gel und PVDF-Membran keine Luftblasen befinden. Der Elektrotransfer der Proteine wurde für 1 Stunde bei 100 V durchgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Transferpuffers für die Western Blot Analyse.

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

2.8.6 Immundetektion von Proteinen

Die PVDF-Membranen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Magermilch(MM)/TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörperreaktion zu blockieren. Wurden für die Proteindetektion Antikörper verwendet, die in BSA/TBS-T verdünnt werden mussten, erfolgte ein zweiter Blockierungsschritt mit BSA/TBS-T für 30 Minuten. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem verdünnten Erstantikörper inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde am nächsten Tag dreimal für 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde mit Hilfe des ECL-Systems (GE-Healthcare, Freiburg) das nachzuweisende Protein über die Aktivität der an den Zweitantikörper gebundenen *Horseradish*-Peroxidase (HRP) mit Hilfe von Röntgenfilmen nach Herstellerangaben detektiert. Alle benötigten Reagenzien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Reagenzien für die Proteindetektion.

TBS-Puffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
TBS-T-Puffer:	0,1% (v/v)	Tween-20 in TBS-Puffer
MM/TBS-T:	5% (w/v)	MM (Magermilch) in TBS-T-Puffer
BSA/TBS-T:	5% (w/v)	BSA (<i>Bovine</i> Serum Albumin) in TBS-T-Puffer

Tabelle 13 stellt eine Liste der verwendeten Antikörper dar.

Tabelle 13: Verwendete Antikörper und deren eingesetzte Endkonzentration bei Western Blot Analysen.

Antikörper	Hersteller	Endkonzentration
CHK1	Cell Signaling (#2345)	1:1000 in BSA/TBS-T
PARP-1	Epitomics (#1078-1)	1:1000 in MM/TBS-T
Caspase-3	Cell Signaling (#9665)	1:500 in MM/TBS-T
E2F1	Cell Signaling (#3742)	1:1000 in BSA/TBS-T
p27^{KIP1}	Cell Signaling (#3686)	1:1000 in BSA/TBS-T
GAPDH	Cell Signaling (#2118)	1:5000 in BSA/TBS-T
β-Aktin	Cell Signaling (#3700)	1:5000 in MM/TBS-T
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling (#7074)	1:5000 in MM/TBS-T
Anti-mouse IgG, HRP-linked	GE-Healthcare (#RPN4201)	1:5000 in MM/TBS-T

Um verschiedene Proteine auf einer Membran nachweisen zu können, wurde sie von gebundenen Antikörpern mit Hilfe des *Restore Western Blot Stripping-Buffer* (Thermo Scientific, Bremen) gereinigt. Nach Waschen mit TBS-T und erneutem Blockieren konnte die Membran wieder mit einem primären Antikörper inkubiert werden.

2.8.7 Densitometrische Auswertung

Zur densitometrischen Auswertung fand die Analyse-Funktion „Spot Denso“ des Programms FluorChem 8900 (Alpha Innotech Corporation) Anwendung.

2.9 Durchflusszytometrie mit der Nicoletti-Färbung

Bei der sogenannten Nicoletti-Färbung kann der Anteil an apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer ermittelt werden. Mit Hilfe des Nicoletti-Puffers (0,1 % w/v Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100 und 50 µg/ml Propidiumiodid) wird die Membran der zu untersuchenden Zellen zunächst permeabilisiert, um dann ein Eindringen des Propidiumiodids in den Zellkern zu ermöglichen. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkalieren kann. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt der Zellen anhand des fluoreszierenden Propidiumiodids analysiert und die Phasen des Zellzyklus unterschieden werden. Zellen in der G2-Phase weisen im Vergleich zu den in der G1-Phase befindlichen Zellen einen doppelten DNA-Gehalt auf und zeigen entsprechend doppelt so starke Fluoreszenz. Im Bereich dazwischen befinden sich Zellen in der S-Phase. Ist der DNA-Gehalt geringer als in Zellen der G1-Phase, spricht man von hypodiploiden Zellen (subG1). Hierbei handelt es sich um apoptotische Zellen, bei denen eine Degradierung der DNA mit nachfolgendem Verlust der degradierten DNA geschah.

Die Färbung der Zellen erfolgte wie in (Riccardi und Nicoletti, 2006) beschrieben. Trypsinierte Zellen inklusive dem Medium wurden bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde wieder der Überstand verworfen und die Zellen wurden in 150 µl Nicoletti-Puffer unter Vortexen resuspendiert. Die Messung erfolgte am BD FACS Calibur mithilfe der *Software CellQuest 3.3* (BD Bioscience, Heidelberg). Ausgewertet wurde mit der *Software FlowJo* (Treestar, San Carlos, USA). Dabei wurde nach Ausschluss von Zelltrümmern (*Debris*) der prozentuale Anteil an Zellen in der subG1-Phase bestimmt.

2.10 *In-vivo* Untersuchungen

2.10.1 Mausmodell

Für *in-vivo* Untersuchungen wurden SKH-1 *hairless* Mäuse der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charlotte Esser (IUF) verwendet. Für die Generierung von AHR-defizienten Tieren wurde die AHR Exon-2 Deletion der B6.AhR^{tmlbra} Maus (Schmidt et al., 1996) über mehr als neun Generationen in den SKH-1 Hintergrund gekreuzt (Esser, unveröffentlicht). Die Mäuse wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen (12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus,

Raumtemperatur: 20-24°C, 70% Luftfeuchtigkeit) gezüchtet. Futterpellets und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Für die Untersuchungen wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Alle Experimente wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.10.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden die Schwanzspitzen (ca. 0,5 cm) mit 237,5 µl *Direct PCR Lysis Reagent* (Peqlab) und 12,5 µl Proteinase K (Roche) versetzt und anschließend für mindestens 6 Stunden bei 55°C erhitzt. Nach anschließender Inaktivierung der Proteinase K (45 Minuten bei 85°C) und dreiminütiger Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde 1 µl des Lysats pro PCR Reaktion eingesetzt.

Für die Vervielfältigung der isolierten DNA wurden sequenzspezifische *Primer* (vgl. Tabelle 14) benutzt, die je nach Genotyp unterschiedlich große Fragmente amplifizieren. So sind die *Primer* AHR-1 und AHR-2 an der Synthese an einem Produkt mit 669 bp (Wildtyp) beteiligt, während das von den *Primern* AHR-3 und AHR-4 amplifizierte Fragment eine Größe von 172 bp (*knockout*) hat.

Tabelle 14: Verwendete *Primer* für die Genotypisierung.

	Primersequenz
AHR-1	5'-GGATTTGACTTAATTCCTTCAGCGG-3'
AHR-2	5'-TCTTGGGCTCGATCTTGTGTCAGGAACAGG-3'
AHR-3	5'-CTGAATGAACTGCAGGACGA-3'
AHR-4	5'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-3'

In einem Gesamtvolumen von 16 μl wurde für die PCR folgender Ansatz verwendet:

10x Taq PCR-Puffer	1,6 μl
dNTP-Mix (10 mM)	0,32 μl
AHR-1 <i>Primer</i> (20 μM)	0,94 μl
AHR-2 <i>Primer</i> (20 μM)	0,94 μl
AHR-3 <i>Primer</i> (20 μM)	0,53 μl
AHR-4 <i>Primer</i> (20 μM)	0,53 μl
Taq Polymerase 5 U/ μl	0,16 μl
DNA	1 μl

Die Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt:

	5 Minuten	94°C	} 35 Zyklen
Denaturierung	45 Sekunden	94°C	
<i>Annealing</i>	1 Minute	62°C	
<i>Elongation</i>	60 Sekunden	72°C	
	7 Minuten	72°C	

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel mit 4 μl /100 ml Ethidiumbromid und bei einer Spannung von 140 V. Anschließend konnten die DNA-Banden mittels UV-Licht detektiert und anhand ihrer Größe dem Genotyp zugeordnet werden.

2.10.3 UVB-Bestrahlung und Probenahme

Die Bestrahlung der Mäuse erfolgte mit Hilfe einer Lampe aus vier TL20W/12RS-UV-Röhren (Philips, Eindhoven) in einer gesonderten Box. Dabei wurde eine Bestrahlungsdosis von 185 mJ/cm² bzw. 200 mJ/cm² UVB verwendet.

Die Probenahme der Rückenhaut erfolgte direkt vor bzw. 24 oder 48 Stunden nach der UVB-Bestrahlung unter Verwendung von Ø 4 mm Biopsienadeln.

2.10.4 Proteinextraktion

Die Hautproben wurden mit RIPA-Puffer (vgl. Tabelle 8) im TissueLyser (Qiagen) bei einer Frequenz von 30/Sekunde für 10 Minuten homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 15 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm abzentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden quantifiziert (vgl. 2.8.2) und für Western Blot Analysen (vgl. 2.8.3 bis 2.8.6) verwendet.

2.10.5 TUNEL-Färbung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Hautproben in *Tissue-Tek Cryomedium* (Sakura, Torrance, CA, USA) in ein *Cryomold* eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bei -80°C gelagert. Die Gewebeschnitte wurden am Kryostat (Leica, Wetzlar) bei einer Schnittdicke von 6 µm angefertigt und auf Superfrost Ultra Plus Objektträger (Thermo Fischer Scientific, Schwerte) aufgezogen. Anschließend wurden sie 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, mit Aceton fixiert und bei -20°C gelagert.

Die Detektion der apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der TUNEL-Methode und unter Verwendung des *In-situ Cell Death Detection Kit* (Roche) nach Herstellerangaben. Im Verlauf der Apoptose wird die DNA unter Bildung von freien Hydroxylgruppen fragmentiert. Bei der TUNEL (*TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*)-Methode werden diese Hydroxylgruppen mit Fluorescein-markierten Nukleotiden polymerisiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym TdT (*Terminal Desoxynucleotidyl Transferase*) katalysiert.

Die Schnitte wurden mit Fluoreszenz-Einbettmedium (inkl. DAPI 1:2000) eingedeckt. Die Detektion der TUNEL-positiven Zellen fand schließlich an einem Fluoreszenzmikroskop und unter Verwendung der Software AxioVision (Zeiss, Jena) statt.

2.11 Statistik

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Diese wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung in den Diagrammen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Student t-test* (Excel, Microsoft) ermittelt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p < 0,05$) als signifikant gewertet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des AHR in den verwendeten NCTC Keratinozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen NCTC Zellen stellen ein etabliertes nicht-tumoröses *in-vitro* Model für biologische und toxikologische Untersuchungen an humanen Keratinozyten dar (Gelardi et al., 2001; Grandjean-Laquerriere et al., 2007). Es wurden die stabil transfizierten Keratinozyten NCTC-EV (Leervektor-Kontrollzellen) und NCTC-shAHR (AHR-*knockdown* Zellen) verwendet. Zunächst wurde zur Überprüfung eines erfolgreichen AHR-*knockdown* die konstitutive Expression des AHR ermittelt. Die AHR-Transkriptmengen wurden mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt.

In Abbildung 5 ist die konstitutive AHR-Expression in NCTC 2544 (Wildtyp), NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten dargestellt.

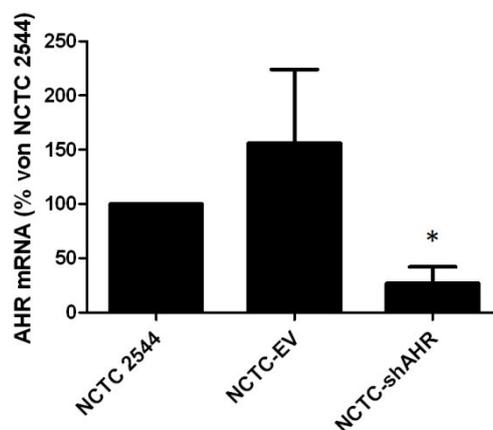


Abbildung 5: Konstitutive AHR mRNA-Expression.

Die Transkriptmengen von AHR wurden mittels qRT-PCR in unbehandelten NCTC 2544, NCTC-EV und NCTC-shAHR bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. Dargestellt ist die relative Transkriptmenge bezogen auf NCTC 2544 Zellen. *signifikant niedriger als NCTC 2544.

Die AHR-Transkriptmenge in den NCTC-EV Keratinozyten unterschied sich im Vergleich zu den NCTC 2544 Zellen nicht signifikant. In den NCTC-shAHR Zellen wurde der AHR dagegen signifikant schwächer exprimiert. Bezogen auf NCTC 2544 Zellen betrug die relative Transkriptmenge hier nur noch ca. 25%. Mit dieser Untersuchung konnte bestätigt werden,

dass die stabile Transfektion der NCTC Keratinozyten mit einem lentiviralen Vektor, der für eine AHR-gerichtete shRNA kodiert, zu einer deutlichen Reduktion der AHR-Transkriptmenge führt.

3.2 Induktion von AHR-abhängigen Zielgenen nach UVB-Behandlung von NCTC Zellen

3.2.1 CYP1A1 und COX2

Die Induzierbarkeit der AHR-abhängigen Zielgene CYP1A1 und COX2 in NCTC 2544, NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten wurde 6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m^2 mittels qRT-PCR untersucht. Eine Bestrahlung mit 200 J/m^2 UVB entspricht der minimalen Erythemdosis (MED), d.h. der Bestrahlungsdosis, die bei einem hellhäutigen Menschen zur Hautrötung (Erythem) führt (Autier et al., 2000). CYP1A1 stellt das Markergen für die Aktivierung des klassischen AHR-Signalweges da, während eine COX2-Induktion auf die Aktivierung des nicht-genomischen Signalweges zurückzuführen ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

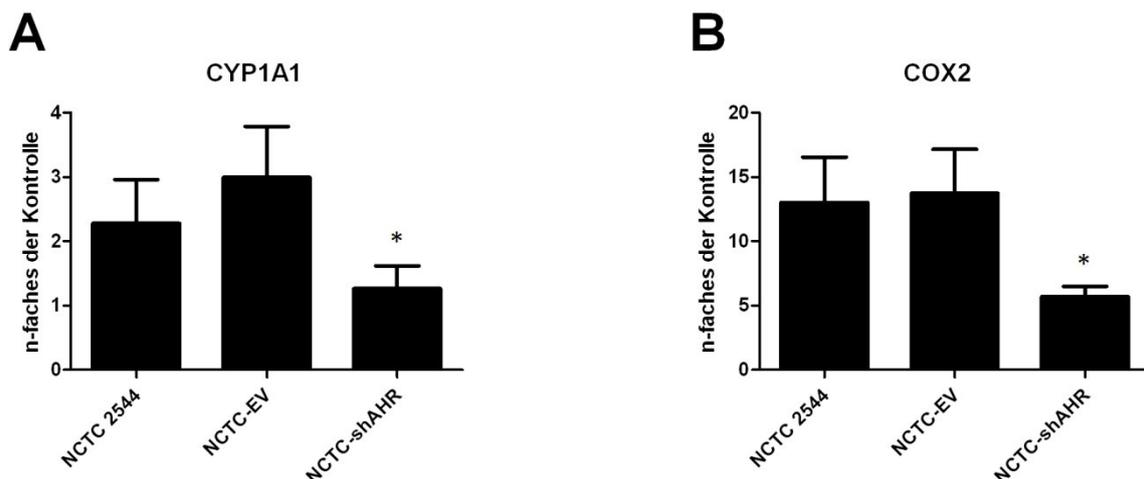


Abbildung 6: Induzierbare mRNA-Expression von CYP1A1 und COX2 nach UVB-Behandlung.

Die NCTC 2544, NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 J/m^2 UVB bestrahlt. 6 Stunden später wurden die Transkriptmengen von CYP1A1 (A) und COX2 (B) unter Verwendung der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. Die mRNA-Expression ist relativ zu den jeweiligen unbestrahlten Kontrollen dargestellt. *signifikant niedriger als NCTC-EV.

Sechs Stunden nach der Bestrahlung wurde in den NCTC 2544 Keratinozyten CYP1A1 etwa 2,2-fach höher exprimiert als in den Kontrollzellen (vgl. Abbildung 6A). Diese UVB-vermittelte CYP1A1-Induktion wurde auch in den NCTC-EV Zellen beobachtet. In NCTC-shAHR Keratinozyten war die CYP1A1-Induktion nach UVB-Bestrahlung signifikant schwächer. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte hier nur noch ein ca. 1,3-fach erhöhter Anstieg der CYP1A1-Transkription gemessen werden. Eine UVB-Behandlung der NCTC 2544 und NCTC-EV Keratinozyten führte ebenfalls zu einer Induktion der COX2-Expression. Wie in Abbildung 6B ersichtlich ist, wurde in den beiden Zelllinien 6 Stunden nach der Bestrahlung ein etwa 13-facher Anstieg der COX2-Kopienzahl beobachtet. Die COX2-Induktion war in den NCTC-shAHR Keratinozyten signifikant reduziert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde hier COX2 nur ca. 6-fach erhöht exprimiert.

Zusammenfassend konnte mit diesen Versuchen bestätigt werden, dass der *AHR-knockdown* durch stabile Transfektion in NCTC Keratinozyten zu einer schwächeren Induzierbarkeit der AHR-abhängigen Gene CYP1A1 und COX2 führt und daher die gewünschte Hemmung des AHR-Signalweges verursacht. Weiterhin unterschied sich weder die Induzierbarkeit von CYP1A1 und COX2 noch die konstitutive AHR-Expression (vgl. Abbildung 5) signifikant in den NCTC 2544 und NCTC-EV Zellen. Diese beiden Zelllinien können daher als gleich responsiv angesehen werden. Für die weiteren Untersuchungen werden nun die NCTC-EV als AHR-profiziente Zellen und die NCTC-shAHR als AHR-defiziente Keratinozyten verwendet.

3.2.2 PAI-2

Der AHR ist nicht nur an der Regulation von diversen Enzymen, die im Fremdstoffmetabolismus involviert sind (z.B. CYP1A1, COX2), beteiligt, sondern beeinflusst auch die Expression von Proteinen, die eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Zellproliferation spielen. So wurde beispielsweise eine AHR-abhängige Expression von PAI-2 (*Plasminogen Activator Inhibitor Type 2*) beschrieben (Bock, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob sich PAI-2 auch nach UVB-Bestrahlung AHR-abhängig regulieren lässt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der PAI-2-Transkriptmengen 6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² in den NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.

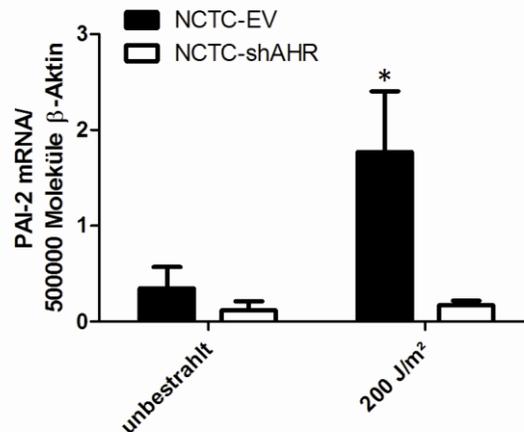


Abbildung 7: Induzierbare mRNA-Expression von PAI-2 nach UVB-Behandlung.

Die NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 J/m² UVB bestrahlt. 6 Stunden später wurden die Transkriptmengen von PAI-2 unter Verwendung der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β-Aktin normiert. *signifikant erhöht im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

In den NCTC-EV Keratinozyten wurde 6 Stunden nach UVB-Bestrahlung eine signifikante PAI-2-Induktion beobachtet. Im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen wurde ein etwa 5-facher Anstieg der Transkriptmenge ermittelt. In den AHR-*knockdown* Zellen veränderte sich die PAI-2-Kopienzahl nach der UVB-Einwirkung nicht. Diese Daten zeigen eine eindeutige AHR-abhängige Regulation der PAI-2-Expression nach UVB-Bestrahlung in Keratinozyten. Da PAI-2 als Inhibitor an einer Vielzahl von physiologischen aber auch pathophysiologischen Prozessen, einschließlich Differenzierung von Keratinozyten, Inflammation und Apoptose, beteiligt ist (Kruithof et al., 1995), nimmt der PAI-2-regulierende AHR eine wichtige Rolle bei der UVB-Stressantwort der Keratinozyten ein.

3.2.3 Die Zytokine IL-6 und IL-8

Neben dem klassischen AHR-Signalweg und dem nicht-genomischen Weg kann der AHR auch mit NF-κB-Untereinheiten interagieren und so die Transkription weiterer Gene regulieren. So wurde auf diese Weise eine AHR-abhängige Expression des Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) beschrieben (Chen et al., 2011; Vogel et al., 2007; Vogel et al., 2011). Um zu untersuchen, ob sich IL-6 und IL-8 auch nach UVB-Einwirkung AHR-abhängig regulieren

lassen, wurden NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten mit 200 J/m² UVB bestrahlt. Sechs Stunden später erfolgte die Ermittlung der IL-6- und IL-8-Transkriptmengen unter Verwendung der qRT-PCR. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

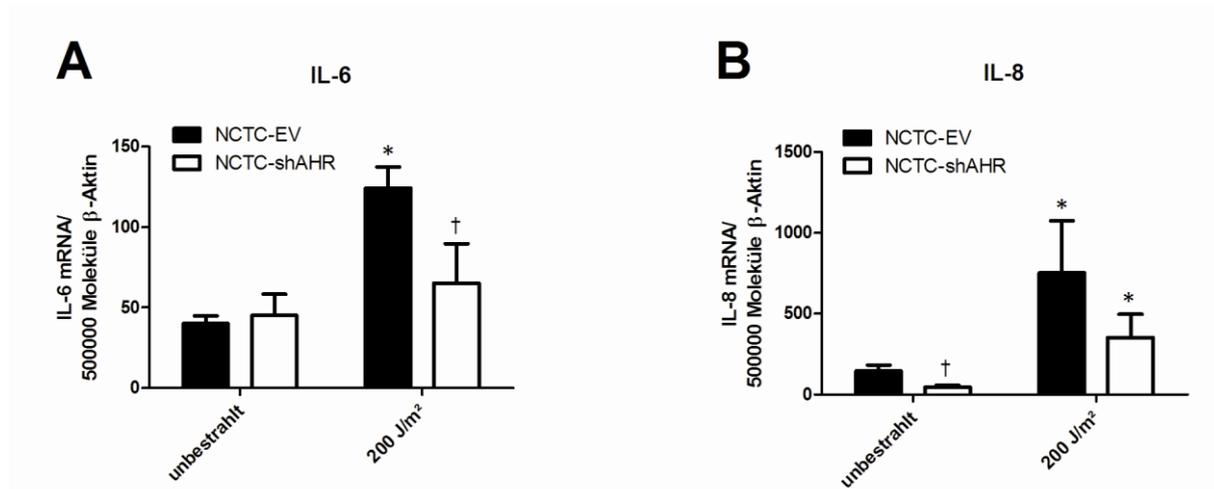


Abbildung 8: Induzierbare mRNA-Expression von IL-6 und IL-8 nach UVB-Behandlung.

Die NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 J/m² UVB bestrahlt. 6 Stunden später wurden die Transkriptmengen von IL-6 (A) und IL-8 (B) unter Verwendung der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β-Aktin normiert. *signifikant erhöht im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; †signifikant reduziert im Vergleich zu NCTC-EV.

In den NCTC-EV Zellen wurde 6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² ein signifikanter, ca. 3-facher Anstieg der IL-6-Transkriptmenge beobachtet (vgl. Abbildung 8A). In den AHR-*knockdown* Keratinozyten wurde eine schwächere, nicht signifikante IL-6-Induktion nach UVB-Einwirkung gezeigt. Zudem war die IL-6-Kopienzahl nach der Bestrahlung im Vergleich zu den AHR-profizienten Zellen signifikant reduziert. Die IL-6 Transkription scheint demnach nach einer UVB-Einwirkung AHR-abhängig reguliert zu sein. Beim IL-8 wurden bereits in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen signifikante Unterschiede in der Transkriptmenge festgestellt. Während in den AHR-profizienten Keratinozyten etwa 150 Transkripte pro 500000 Moleküle β-Aktin detektiert wurden, waren es in den AHR-defizienten Zellen nur ca. 40 (vgl. Abbildung 8B). Nach UVB-Bestrahlung wurde in beiden Zelllinien eine signifikante IL-8-Induktion beobachtet, wobei in den NCTC-EV Zellen die IL-8-Transkriptmenge im Vergleich zu den NCTC-shAHR Keratinozyten etwa doppelt so hoch war. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Der AHR scheint

demnach einen Einfluss auf die basale IL-8-Transkription zu haben. Nach einer UVB-Bestrahlung gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den AHR-profizienten und AHR-defizienten Keratinozyten.

Die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 wird bei UVB-Einwirkung auf die menschliche Haut induziert und spielt dort wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf UVB-Bestrahlung und bei der Reparatur von UV-verursachten Hautschäden (Nishimura et al., 1999). Es induziert unkontrolliertes Zellwachstum und das Überleben von Tumorzellen durch eine Aktivierung von Genen, die die Zellproliferation stimulieren, und Hemmung von Genen, die die Apoptose induzieren (Hoejberg et al., 2012; Johnson et al., 2012). Auch das pro-inflammatorische Zytokin IL-8 hat einen hemmenden Einfluss auf den programmierten Zelltod, indem es zu einer erhöhten Expression von anti-apoptotischen Proteinen führt (Wang et al., 2011). Da eine Hemmung des gewollten Zelltodes ein entscheidender Faktor bei der Kanzerogenese von z.B. NMSC sein kann, wird im Laufe der Arbeit die Untersuchung der Apoptose nach UVB-Einwirkung im Vordergrund stehen. Dabei soll der Einfluss des AHR auf die UVB-induzierte Apoptose charakterisiert werden.

3.3 Einfluss des AHR auf die UVB-induzierte Apoptose

3.3.1 Ergebnisse aus *in-vitro* Studien

UVB-Strahlung verursacht primär DNA-Schäden und initiiert so eine DNA-Schadens-Antwort, welche Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur sowie, insbesondere bei schweren Schäden, Apoptose beinhaltet. Darüber hinaus kann UVB-Strahlung auch über die Aktivierung von Todesrezeptoren und über den ROS-induzierten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zur Apoptose führen. In der Literatur wird der Einfluss des AHR auf die Apoptose kontrovers diskutiert. Es scheint zelltyp- und gewebespezifische Unterschiede zu geben (Chopra et al., 2009; Matikainen et al., 2001; Wu et al., 2007). Diese Arbeit hat zum Ziel, die Rolle des AHR in der UVB-induzierten Apoptose in humanen NCTC Keratinozyten zu charakterisieren.

NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 und 400 J/m² UVB bestrahlt und 24 Stunden später erfolgte für die Bestimmung der Apoptose sowohl eine Analyse des subG1-

Anteils der Zellpopulation (Durchflusszytometrie) als auch eine Ermittlung der Menge an gespaltenem PARP-1 (Western Blot). In Abbildung 9 ist zunächst die Bestimmung des subG1-Anteil nach UVB-Bestrahlung dargestellt.

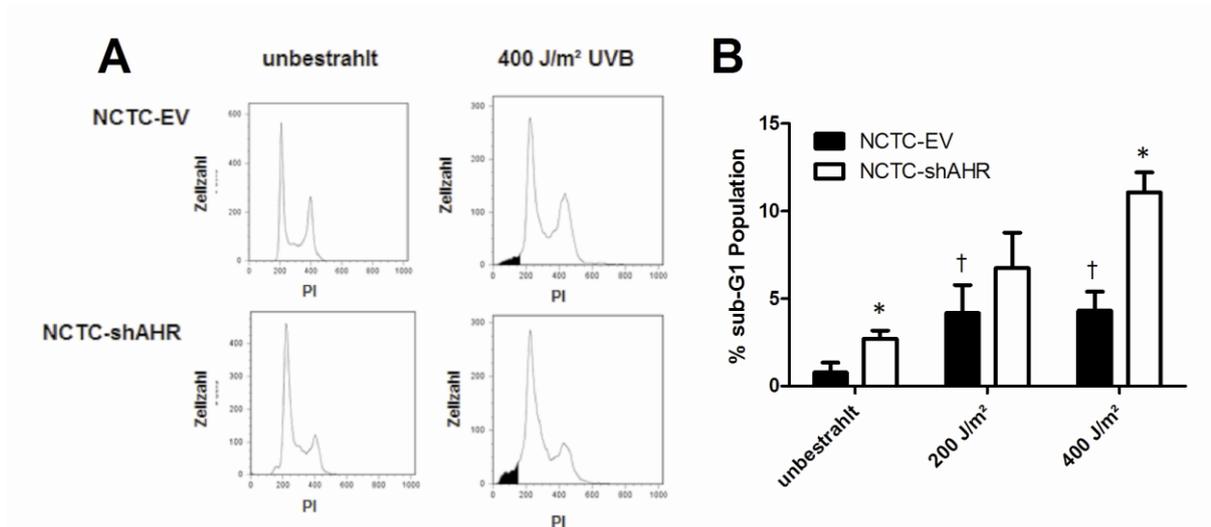


Abbildung 9: subG1-Anteil der Zellpopulation nach UVB-Bestrahlung von NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.

NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 oder 400 J/m² UVB bestrahlt, 24 Stunden später mit Propidiumiodid gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. **A:** Exemplarische Darstellung von Zellzyklusprofilen von unbestrahlten sowie UVB-behandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen. **B:** Quantitative Darstellung des subG1-Anteils der Zellpopulation von drei unabhängigen Versuchen, *signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV; †signifikant erhöht im Vergleich zur unbestrahlten NCTC-EV Kontrolle.

Eine Bestrahlung von NCTC-EV Keratinozyten mit 200 und 400 J/m² UVB führte zu einem signifikant erhöhten subG1-Anteil (etwa 5%) im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen (Abbildung 9B). Bei einer Bestrahlungsdosis von 400 J/m² UVB zeigten sich deutliche Unterschiede im prozentualen subG1-Anteil zwischen den AHR-profizienten und AHR-defizienten Keratinozyten. Bei den NCTC-shAHR Zellen stieg der subG1-Anteil auf über 10% an und war somit signifikant erhöht im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen. Eine Hemmung des AHR-Signalweges führte demnach zu einer verstärkten Apoptose nach UVB-Behandlung in humanen NCTC Keratinozyten. Im Vergleich zu den unbestrahlten NCTC-EV Zellen wurde bereits in den unbestrahlten NCTC-shAHR Zellen eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung der Apoptoserate beobachtet.

Western Blot Analysen zur Detektion von gespaltenem PARP-1, einem etablierten Apoptosemarker, unterstützten die beobachtete anti-apoptotische Rolle des AHR in UVB-bestrahlten NCTC Keratinozyten (vgl. Abbildung 10).

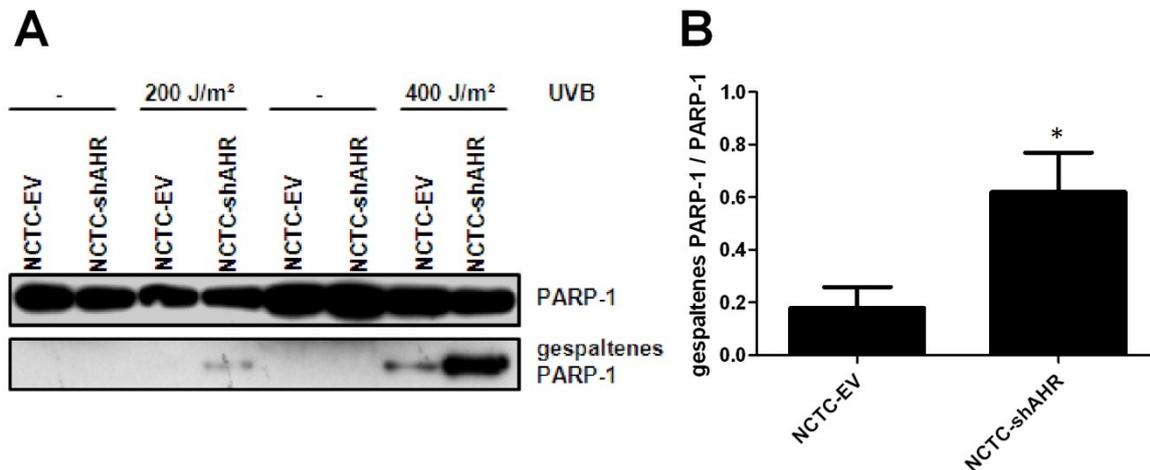


Abbildung 10: PARP-1 nach UVB-Bestrahlung in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.

NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurden mit 200 oder 400 J/m² UVB bestrahlt und 24 Stunden später geerntet. Zur Detektion von PARP-1 und dessen Spaltprodukt wurden Western Blot Analysen durchgeführt. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung von PARP-1 und gespaltenem PARP-1, 24 Stunden nach 400 J/m² UVB. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität vom gespaltenen PARP-1 pro ungespaltenem PARP-1. *signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV.

Nach einer UVB-Bestrahlung mit 400 J/m² konnte in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten gespaltenes PARP-1 detektiert werden, wobei die AHR-*knockdown* Zellen eine etwa 3,5-fach erhöhte Menge des Spaltprodukts aufwiesen. Im Vergleich zu 200 J/m² UVB, konnten nach einer Bestrahlung mit 400 J/m² UVB deutlichere Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Versuche, die den zellulären Endpunkt Apoptose zum Gegenstand der Untersuchung haben, die Zellen nur noch mit 400 J/m² UVB bestrahlt.

Um zu bestätigen, dass der AHR einen Einfluss auf die UVB-induzierte Apoptose in NCTC Keratinozyten ausübt, wurden NCTC-EV Zellen 1 Stunde vor der UVB-Bestrahlung mit dem

AHR-Antagonisten 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (MNF, 20 μM) behandelt. 24 Stunden nach Bestrahlung mit 400 J/m^2 UVB wurde der subG1-Anteil der Zellpopulationen untersucht.

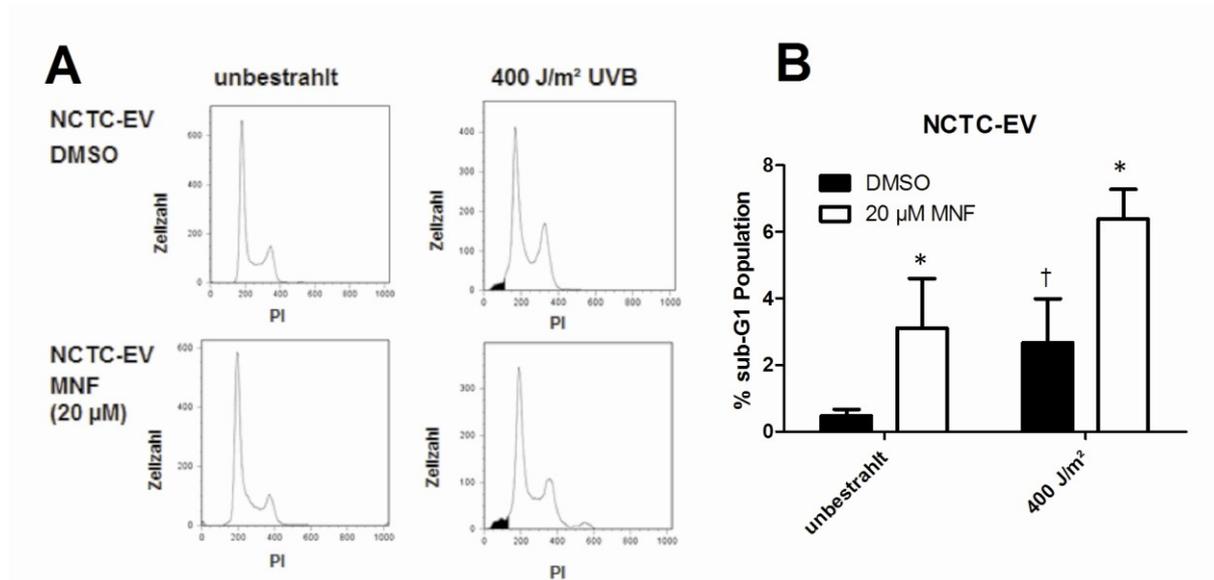


Abbildung 11: subG1-Anteil der Zellpopulation nach MNF-Behandlung und UVB-Bestrahlung in NCTC-EV.

NCTC-EV Zellen wurden 1 Stunde vor einer Bestrahlung mit 400 J/m^2 UVB mit 20 μM MNF bzw. 0,1% DMSO behandelt, 24 Stunden später mit Propidiumiodid gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. **A:** Exemplarische Darstellung von Zellzyklusprofilen von MNF-behandelten und UVB-bestrahlten NCTC-EV Zellen. **B:** Quantitative Darstellung des subG1-Anteils der Zellpopulation von drei unabhängigen Versuchen, *signifikant erhöht im Vergleich zu DMSO-behandelten NCTC-EV; †signifikant erhöht im Vergleich zur unbestrahlten NCTC-EV Kontrolle.

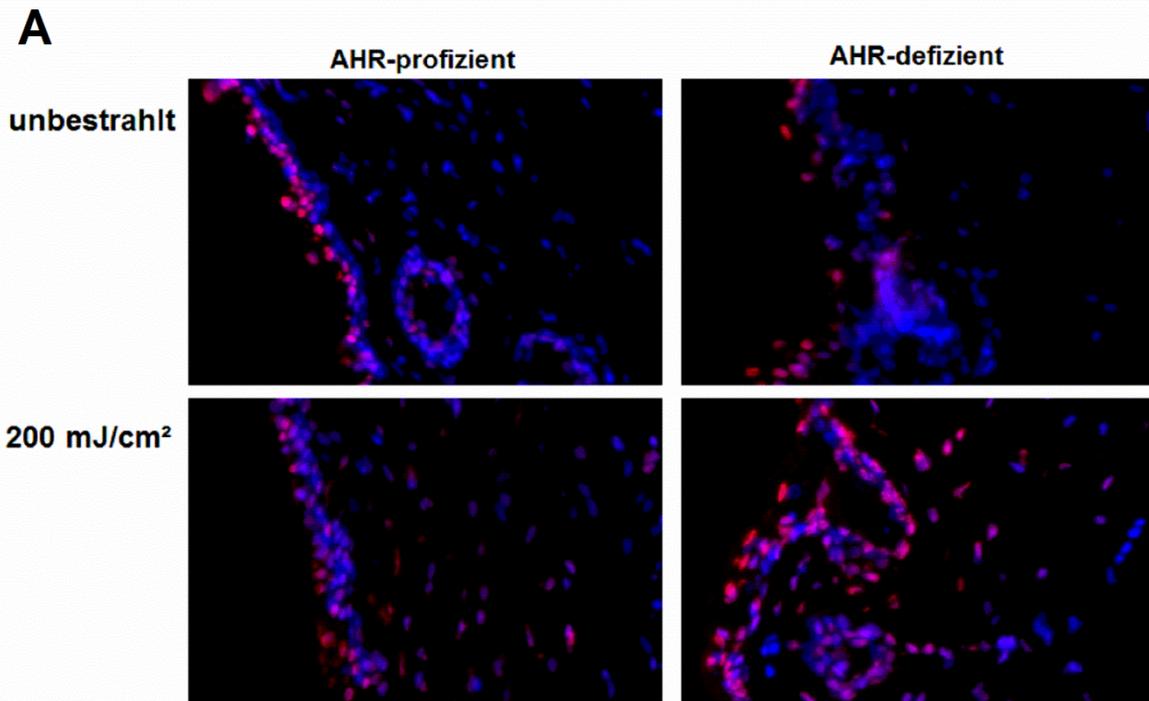
Abbildung 11 zeigt, dass auch eine chemische Hemmung des AHR durch MNF zu einer Erhöhung des subG1-Anteils nach UVB-Behandlung in NCTC Zellen führt. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollzellen stieg der subG1-Anteil der Zellpopulation signifikant von ca. 3% auf über 6% nach Bestrahlung an. Zudem konnte auch in unbestrahlten NCTC-EV Keratinozyten eine Erhöhung der Apoptoserate um ca. 3% nach MNF-Behandlung beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des AHR durch shRNA oder durch einen chemischen Antagonisten in eine erhöhte Apoptoserate nach UVB-Bestrahlung in NCTC Keratinozyten resultiert.

3.3.2 Überprüfung der physiologischen Relevanz in einer *in-vivo* Studie

Um die physiologische Bedeutung der anti-apoptotischen Funktion des AHR zu charakterisieren, wurde eine *in-vivo* Studie mit einem SKH-1 *hairless* Mausmodell, bei dem sowohl AHR-profiziente als auch AHR-defiziente Tiere zur Verfügung standen, durchgeführt. Die Tiere wurden mit 200 mJ/cm² bzw. 185 mJ/cm² UVB bestrahlt und nach 24 bzw. 48 Stunden für die Untersuchungszwecke schmerzfrei getötet. Abbildung 12A zeigt TUNEL-positive Zellen in der Haut der Mäuse und in Abbildung 12B ist die Menge an gespaltener Caspase-3 (Effektor-Caspase) von Hautproteinen zu erkennen.

Im Vergleich zu den AHR-profizienten Tieren führte eine UVB-Bestrahlung der AHR-defizienten SKH-1 Mäuse zu scheinbar mehr TUNEL-positiven Zellen in der Haut und somit zu einem erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen (vgl. Abbildung 12A). Diese Beobachtung wird durch Western Blot Analysen unterstützt. So konnte 48 Stunden nach UVB-Bestrahlung in der Haut von AHR-defizienten Tieren eine erhöhte Menge gespaltener Caspase-3 detektiert werden (Abbildung 12B).



B

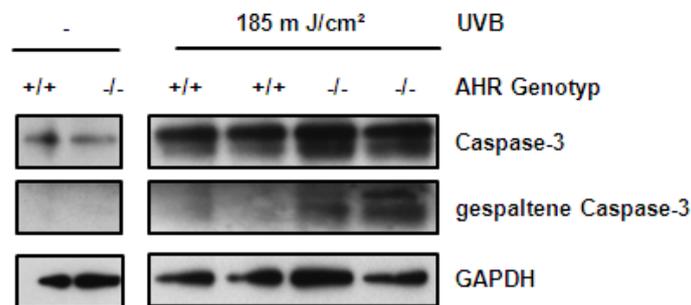


Abbildung 12: UVB-induzierte Apoptose in AHR-profizienten und AHR-defizienten SKH-1 Mäusen.

A: Jeweils 2 AHR-profiziente und AHR-defiziente SKH-1 Mäuse wurden mit 200 mJ/cm² UVB bestrahlt. Vor der Bestrahlung und 24 Stunden nach UVB-Behandlung wurden Hautproben entnommen, Schnitte angefertigt und apoptotische Zellen mit der TUNEL-Methode gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt der Schnitte. Blau: Zellkern, Rot: TUNEL-positiver Zellkern, 200-fache Vergrößerung. **B:** 2 SKH-1 Mäuse pro Genotyp wurden mit 185 mJ/cm² UVB bestrahlt bzw. jeweils eine SKH-1 Maus pro Genotyp blieb unbestrahlt. Nach 48 Stunden wurden die Proteine aus der Haut extrahiert und zur Detektion von Caspase-3 und deren Spaltprodukte sowie GAPDH wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Diese Studie unterstützt die physiologische Relevanz der anti-apoptotischen Funktion des AHR in Hautzellen.

3.4 Identifizierung der *Checkpoint* Kinase 1 als Mediator der AHR-abhängigen Apoptose

Im Vergleich zu den AHR-profizienten Zellen führte eine UVB-Bestrahlung in NCTC-shAHR Keratinozyten zu einer verstärkten Apoptose. Um den molekularen Mechanismus aufzuklären, wurde zunächst ein umfassender cDNA *TaqMan Array* durchgeführt. Die konstitutive Expression von insgesamt 93 verschiedenen Genen wurde zwischen unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen verglichen. Diese Gene kodieren für Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur sowie der Apoptose beteiligt sind.

Tabelle 15: Konstitutive Expression von Genen des *Human DNA Repair Mechanism TaqMan cDNA Array* in NCTC-shAHR Zellen.

												im Vergleich zu NCTC-EV ist die Expression:		
												 erhöht	 reduziert	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	APEX1	ATM	ATR	BARD1	BRCA1	BRCA2	CCNO	CHEK1		
B	CHEK2	DCLRE1A	ERCC1	ERCC2	ERCC3	ERCC4	ERCC5	ERCC6	ERCC8	FANCA	FANCC	FANCD2		
C	FANCE	FANCF	FANCG	FEN1	GADD45A	GADD45B	GADD45G	GTF2H1	GTF2H3	HUS1	IGF1	LIG1		
D	LIG3	LIG4	MAPK10	MAPK11	MAPK12	MAPK14	MAPK8	MAPK9	MBD4	MDM2	MGMT	MRE11A		
E	MSH2	MSH3	MSH6	NBN	NTHL1	OGG1	PARP1	PCNA	PNKP	POLA1	POLB	POLD1		
F	POLG	POLH	POLK	POLQ	POLR1B	POLR1C	POLR2A	POLR2B	POLR2C	PRKDC	PSMA3	PSMB10		
G	PSMB5	PSMB8	PSMB9	PSMC4	RAD1	RAD17	RAD23B	RAD50	RAD51	RAD52	RAD9A	RPA2		
H	RPA3	SMUG1	TP53	TREX1	TREX2	XAB2	XPA	XPC	XRCC1	XRCC4	XRCC5	XRCC6		

Tabelle 15 zeigt eine erhöhte Expression der Ligase 1 (LIG1) in NCTC-shAHR Zellen verglichen mit den NCTC-EV Keratinozyten. Dagegen war die Expression der *Checkpoint* Kinase 1 (CHEK1), des *Fanconi Anemia* Gruppe G Proteins (FANCG), der *Mitogen-activated* Protein Kinase 10 (MAPK10) und 8 (MAPK8), der Polymerase 2A (POLR2A) sowie des *Proteasome Subunit beta 9* Proteins (PSMB9) in den AHR-*knockdown* Zellen reduziert.

Eine anschließende ausgiebige Literaturrecherche ergab, dass sich die reduzierte Expression der MAPK8 (oder JNK1) und der *Checkpoint* Kinase 1 (CHEK1 oder CHK1) als besonders vielversprechend für den gesuchten molekularen Mechanismus herausstellte. So wurde durch eine Hemmung des JNK1-Signalweges ein Anstieg der Apoptoserate nach UVB-

Bestrahlung beobachtet (Cao et al., 2012), und eine reduzierte Expression bzw. Aktivität von CHK1 wurde mit einer erhöhten UVB-induzierten Apoptoserate in Keratinozyten in Verbindung gebracht (Heffernan et al., 2009). Daher war im Folgenden die Expression von JNK1 und CHK1 Gegenstand der Untersuchungen. Da der *TaqMan cDNA Array* nur einmal durchgeführt wurde, erfolgte zunächst eine Überprüfung der Ergebnisse in drei unabhängigen Versuchen unter Verwendung der qRT-PCR.

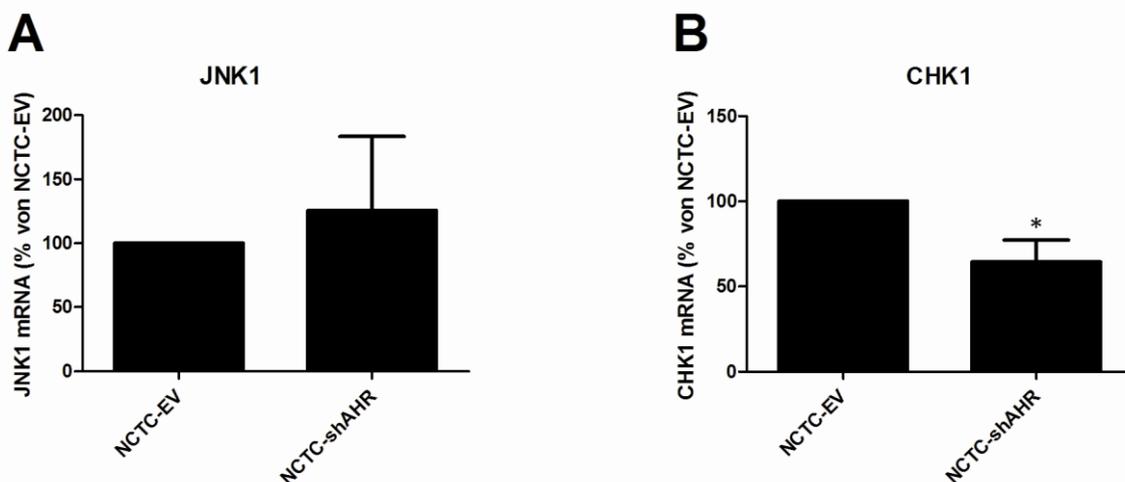


Abbildung 13: Konstitutive JNK1 und CHK1 mRNA-Expression in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.

Die Transkriptmengen von JNK1 und CHK1 wurden mittels qRT-PCR in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. Dargestellt ist die relative Transkriptmenge bezogen auf NCTC-EV. * signifikant niedriger als NCTC-EV.

Abbildung 13 zeigt, dass sich die basale JNK1 mRNA-Expression zwischen den NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nicht signifikant unterschied. Damit konnte das Ergebnis aus dem *TaqMan cDNA Array* nicht bestätigt werden, woraufhin die Expression von JNK1 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde. Dagegen war im Vergleich zu den AHR-profizienten Keratinozyten die basale CHK1-Transkription in NCTC-shAHR Zellen signifikant, um etwa 35%, reduziert. Dieser Befund untermauert die Beobachtung aus dem *TaqMan cDNA Array* und deutet auf eine mögliche Beteiligung von CHK1, in Bezug auf die AHR-abhängige unterschiedliche Sensitivität gegenüber der UVB-induzierten Apoptose, hin. Im Einklang mit den Genexpressionsanalysen, konnte auch auf Proteinebene eine deutlich verringerte CHK1-Expression in den unbehandelten AHR-*knockdown* Zellen detektiert werden (vgl. Abbildung

14). Hier wurde eine Reduktion um etwa 50% im Vergleich zu den NCTC-EV Keratinozyten beobachtet.

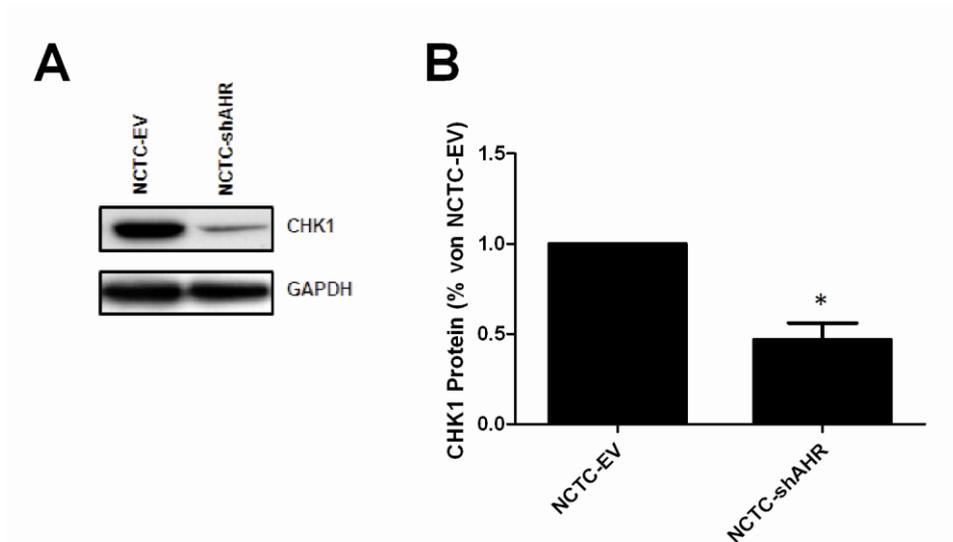


Abbildung 14: Konstitutive CHK1-Proteinexpression.

Die Expression des CHK1-Proteins wurde mittels Western Blot in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten bestimmt und auf GAPDH normiert. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität von CHK1 bezogen auf NCTC-EV Zellen. *signifikant reduziert im Vergleich zu NCTC-EV.

Um zu überprüfen, ob die reduzierte CHK1-Expression für die erhöhte Apoptoserate nach UVB-Einwirkung in den NCTC-shAHR Zellen verantwortlich ist, wurden die Zellen mit dem Expressionsplasmid pCHK1 transient transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Keratinozyten mit 400 J/m² UVB bestrahlt und nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Detektion der Apoptose über die Quantifizierung des gespaltenen Caspasesubstrats PARP-1 (vgl. Abbildung 15)

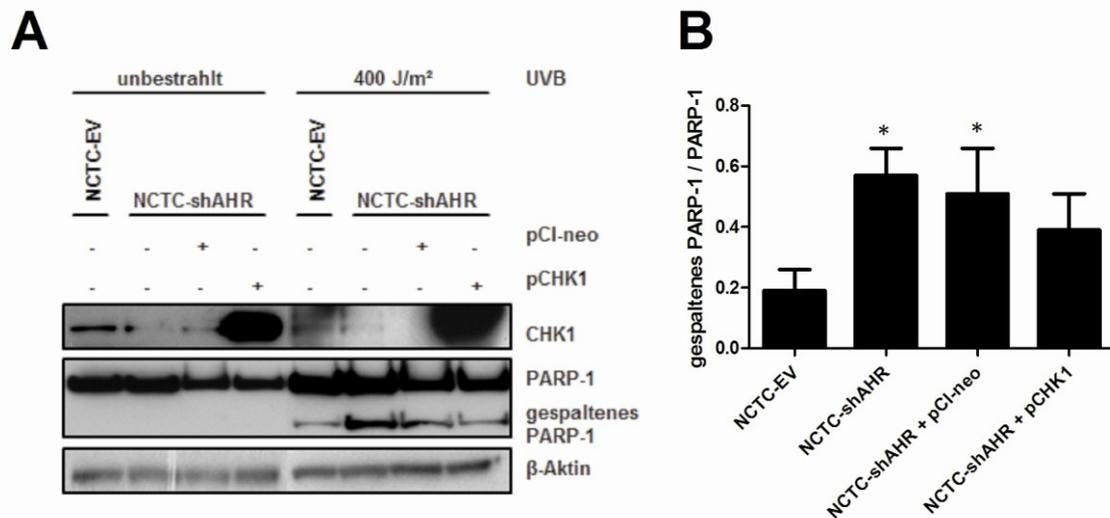


Abbildung 15: PARP-1 nach transients Transfektion mit pCHK1 und UVB-Bestrahlung.

NCTC-shAHR Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCHK1 (bzw. dem Leervektor pCI-neo) transfiziert und 24 Stunden später mit 400 J/m² UVB bestrahlt. NCTC-EV Keratinozyten wurde mit 400 J/m² UVB bestrahlt. 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgte die Detektion von CHK1, PARP-1 und dessen Spaltprodukt sowie β-Aktin mittels Western Blot Analysen. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung von PARP-1 und gespaltenem PARP-1, 24h nach 400 J/m² UVB. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität vom gespaltenen PARP-1 pro ungespaltenem PARP-1. *signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV.

Eine transiente Transfektion mit dem Expressionsplasmid pCHK1 führte wie erwartet zu einer Überexpression von CHK1 in den NCTC-shAHR Keratinozyten. 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 400 J/m² UVB war übereinstimmend mit den vorangegangenen Beobachtungen im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen eine signifikant erhöhte Menge an gespaltenem PARP-1 in den AHR-*knockdown* Keratinozyten detektierbar. Wurde jedoch CHK1 in den NCTC-shAHR überexprimiert, reduzierte sich die Menge an gespaltenem PARP-1 und war im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen nicht mehr signifikant erhöht. Eine Transfektion mit dem Kontrollvektor pCI-neo hatte weder auf die CHK1-Expression noch auf die Spaltung des PARP-1 einen signifikanten Einfluss. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die reduzierte CHK1-Expression für die erhöhte Apoptoseneigung der AHR-defizienten NCTC Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung verantwortlich ist und dass eine Überexpression von CHK1 diese erhöhte Sensibilität wieder aufhebt.

In der Promotorregion des CHK1-Gens wurden keine putativen XRE-Motive gefunden, was gegen eine direkte transkriptionelle Regulation durch den klassischen AHR-Signalweg spricht.

Dazu passend zeigt Abbildung 16, dass eine Aktivierung des AHR-Signalweges durch eine sechsstündige Behandlung mit den Liganden BaP (5 μ M) zwar CYP1A1 induziert, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die CHK1-Transkription in NCTC-EV Zellen hat.

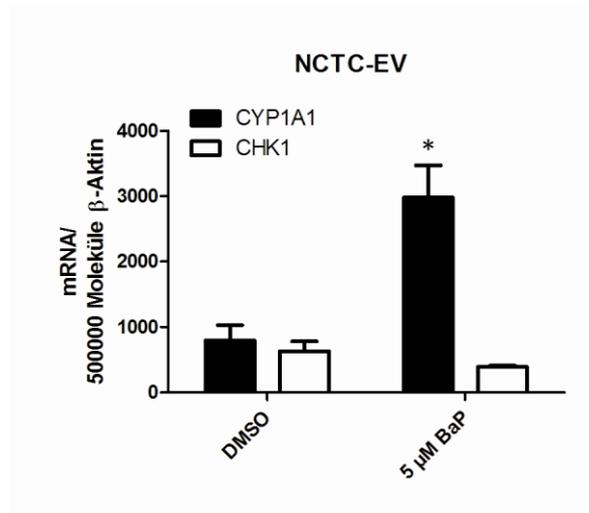


Abbildung 16: mRNA-Expression von CYP1A1 und CHK1 nach BaP-Behandlung in NCTC-EV Keratinozyten.

Die NCTC-EV Zellen wurden mit 5 μ M BaP bzw. 0,1% DMSO behandelt. 6 Stunden später wurden die Transkriptmengen von CYP1A1 und CHK1 mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. *signifikant erhöht im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Versuchen ableiten, dass eine reduzierte CHK1-Expression für die erhöhte Apoptoserate in den NCTC-shAHR Zellen verantwortlich ist. Wie der AHR Einfluss auf die CHK1-Expression nimmt, ist zunächst unklar und soll in den weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

3.5 Identifizierung des Transkriptionsfaktors E2F1 als Regulator der AHR-abhängigen CHK1-Expression

Im CHK1-Promotor befinden sich mehrere funktionale Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F1 (Carrassa et al., 2003). Die reduzierte CHK1-Expression in den NCTC-shAHR Zellen könnte demnach über E2F1 reguliert sein. Im Folgenden wurde daher die basale Proteinmenge von E2F1 in den NCTC-EV und NCTC-shAHR untersucht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17. Im Vergleich zu den NCTC-EV Keratinozyten ist die E2F1-Proteinexpression in den NCTC-shAHR Zellen um etwa 70% reduziert.

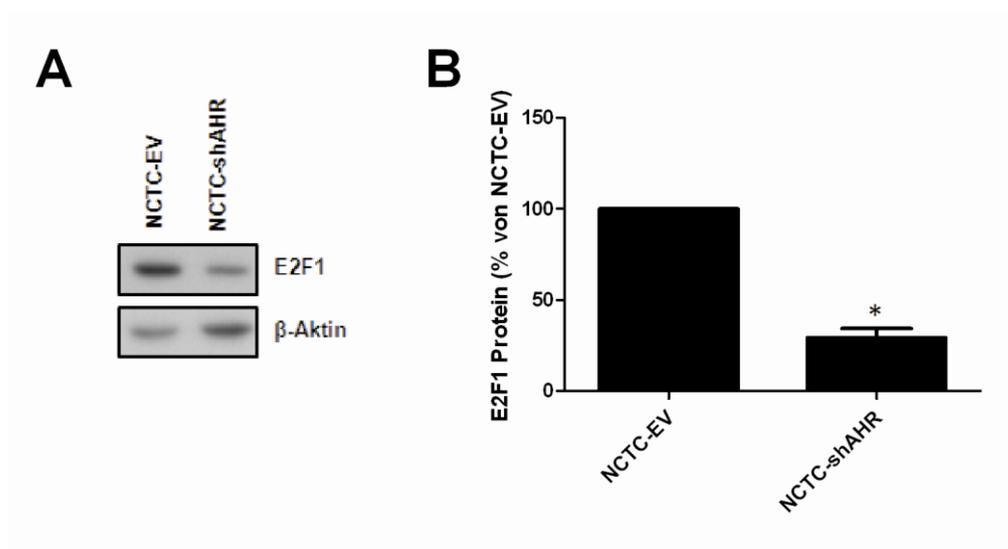


Abbildung 17: Konstitutive E2F1-Proteinexpression.

Die Expression des E2F1-Proteins wurden mittels Western Blot in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten bestimmt und auf β -Aktin normiert. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität von E2F1 bezogen auf NCTC-EV. *signifikant reduziert im Vergleich zu NCTC-EV.

Um zu testen, ob die reduzierte E2F1-Expression für die erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate in den NCTC-shAHR Zellen verantwortlich ist, wurde E2F1 mittels transientser Transfektion (pE2F1) überexprimiert. 24 Stunden nach der transienten Transfektion erfolgte eine UVB-Bestrahlung mit 400 J/m^2 . Und weitere 24 Stunden später wurden die Apoptose über die PARP-1-Detektion im Western Blot analysiert.

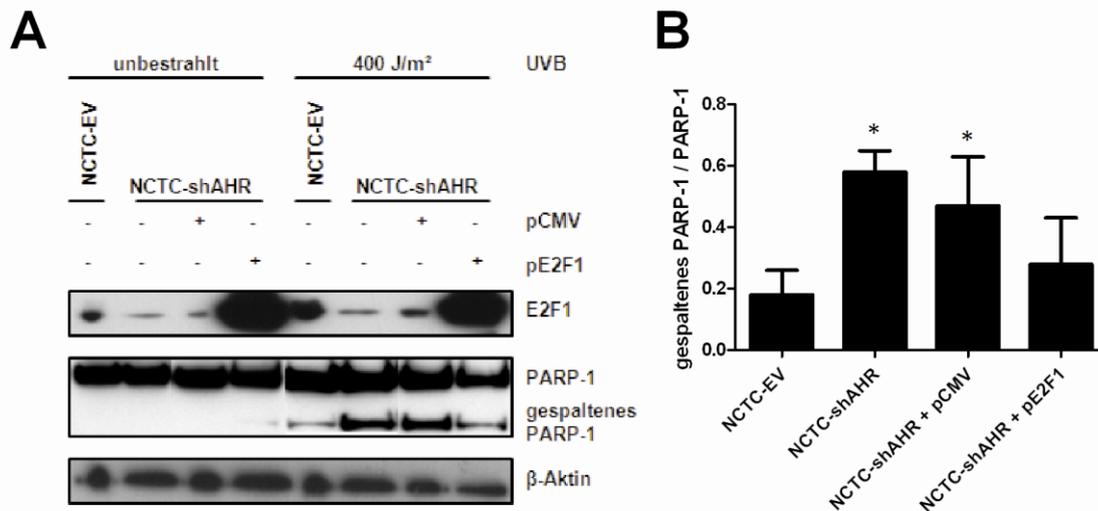


Abbildung 18: PARP-1 nach transientser Transfektion mit pE2F1 und UVB-Bestrahlung.

NCTC-shAHR Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pE2F1 (bzw. dem Leervektor pCMV) transfiziert und 24 Stunden später mit 400 J/m² UVB bestrahlt. NCTC-EV Keratinozyten wurden mit 400 J/m² UVB bestrahlt. 24 Stunden nach Bestrahlung erfolgte die Detektion von E2F1, PARP-1 und dessen Spaltprodukt sowie β -Aktin mittels Western Blot Analysen. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung von PARP-1 und gespaltenem PARP-1, 24h nach 400 J/m² UVB. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität vom gespaltenen PARP-1 pro ungespaltenem PARP-1. *signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, führte eine transiente Transfektion mit pE2F1 zu der erwarteten Überexpression des E2F1-Proteins. Zudem lässt sich wieder erkennen, dass 24 Stunden nach einer Bestrahlung mehr gespaltenes PARP-1 in den NCTC-shAHR Zellen detektiert werden konnte, als in den AHR-profizienten Keratinozyten. Nach Überexpression von E2F1 reduzierte sich die Menge an gespaltenem PARP-1 und war gegenüber den NCTC-EV Zellen nicht mehr signifikant erhöht. Die Transfektion mit dem Kontrollplasmid pCMV hatte weder auf die E2F1-Proteinmenge noch auf die Spaltung von PARP-1 einen signifikanten Einfluss. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass die reduzierte Expression von E2F1 und seinem Zielgen CHK1 (vgl. Abbildung 15) für die erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate in den NCTC-shAHR Keratinozyten verantwortlich ist.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die reduzierte E2F1-Proteinmenge in den NCTC-shAHR Zellen zu der beobachteten Hemmung der CHK1-Expression führt. Dafür wurden 0,25, 0,75 und 1,5 μ g des Expressionsplasmids pE2F1 in die AHR-defizienten

Keratinocyten transfiziert und die CHK1-Expression 48 Stunden nach der Transfektion im Western Blot detektiert.

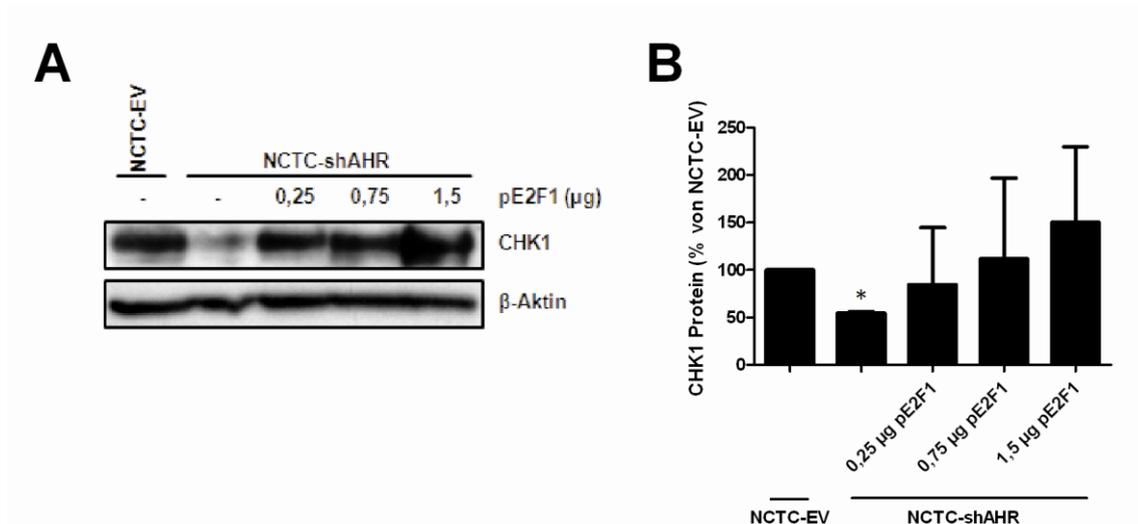


Abbildung 19: CHK1-Proteinmenge nach E2F1-Überexpression in NCTC-shAHR.

NCTC-shAHR Zellen wurden mit 0,25, 0,75, und 1,5 µg pE2F1 transfiziert. NCTC-EV Zellen wurden nicht behandelt. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Detektion von E2F1 (zur Überprüfung der Transfektion; nicht dargestellt), CHK1 und β-Aktin. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität von CHK1 bezogen auf NCTC-EV. *signifikant unterschiedlich im Vergleich zu NCTC-EV.

Abbildung 19 zeigt, dass eine erhöhte E2F1-Expression dosisabhängig in eine Induktion der CHK1-Proteinmenge in den NCTC-shAHR Zellen resultierte. Zudem ist übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen zu sehen, dass in den AHR-defizienten Keratinocyten die CHK1-Expression im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen signifikant reduziert war.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass eine Hemmung des AHR zur Verringerung der E2F1-Expression führte. Dies hatte eine reduzierte CHK1-Expression und eine erhöhte UVB-induzierte Apoptosesensibilität zur Folge. Im Folgenden sollte untersucht werden, wie der AHR Einfluss auf die E2F1-Expression ausübt.

3.6 Untersuchungen zur AHR-abhängigen Regulation von E2F1

Um den molekularen Mechanismus der AHR-abhängigen Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 zu identifizieren, erfolgten Promotoranalysen mit dem E2F1-Reporterergenkonstrukt pGL2AN. Bei diesem Konstrukt wird die Expression des Reporterproteins *firefly (Photinus pyralis)* Luziferase durch den humanen E2F1-Promotor reguliert. 48 Stunden nach der Transfektion mit pGL2AN bzw. dem Kontrollvektor pGL2basic wurde die Aktivität der Luziferase über eine Lumineszenzreaktion ermittelt und Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen. Abbildung 20 zeigt die basale E2F1-Promotoraktivität in den NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.

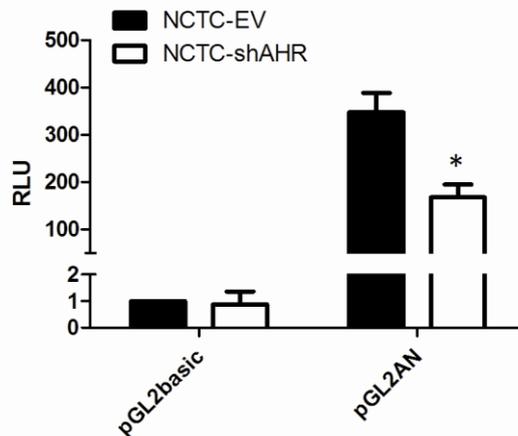


Abbildung 20: Basale E2F1-Promotoraktivität in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.

NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten wurden mit dem E2F1-Reporterergenkonstrukt pGL2AN (bzw. dem Leervektor pGL2basic) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität. *signifikant reduziert im Vergleich zu NCTC-EV.

Im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen konnte in den unbehandelten *AHR-knockdown* Keratinozyten eine um ca. 50% verringerte Luziferaseaktivität gemessen werden. Eine Unterdrückung des AHR-Signalweges resultierte demnach in eine Reduktion der E2F1-Promotoraktivität, wodurch die beobachtete verringerte Proteinexpression zu erklären ist (vgl. Abbildung 17).

Um die AHR-abhängige Regulation der E2F1-Promotoraktivität aufzuklären, wurden die NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit dem

Reportergenkonstrukt pGL2AN mit verschiedenen stimulierenden und inhibierenden Substanzen für weitere 24 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Luziferaseaktivitäten. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

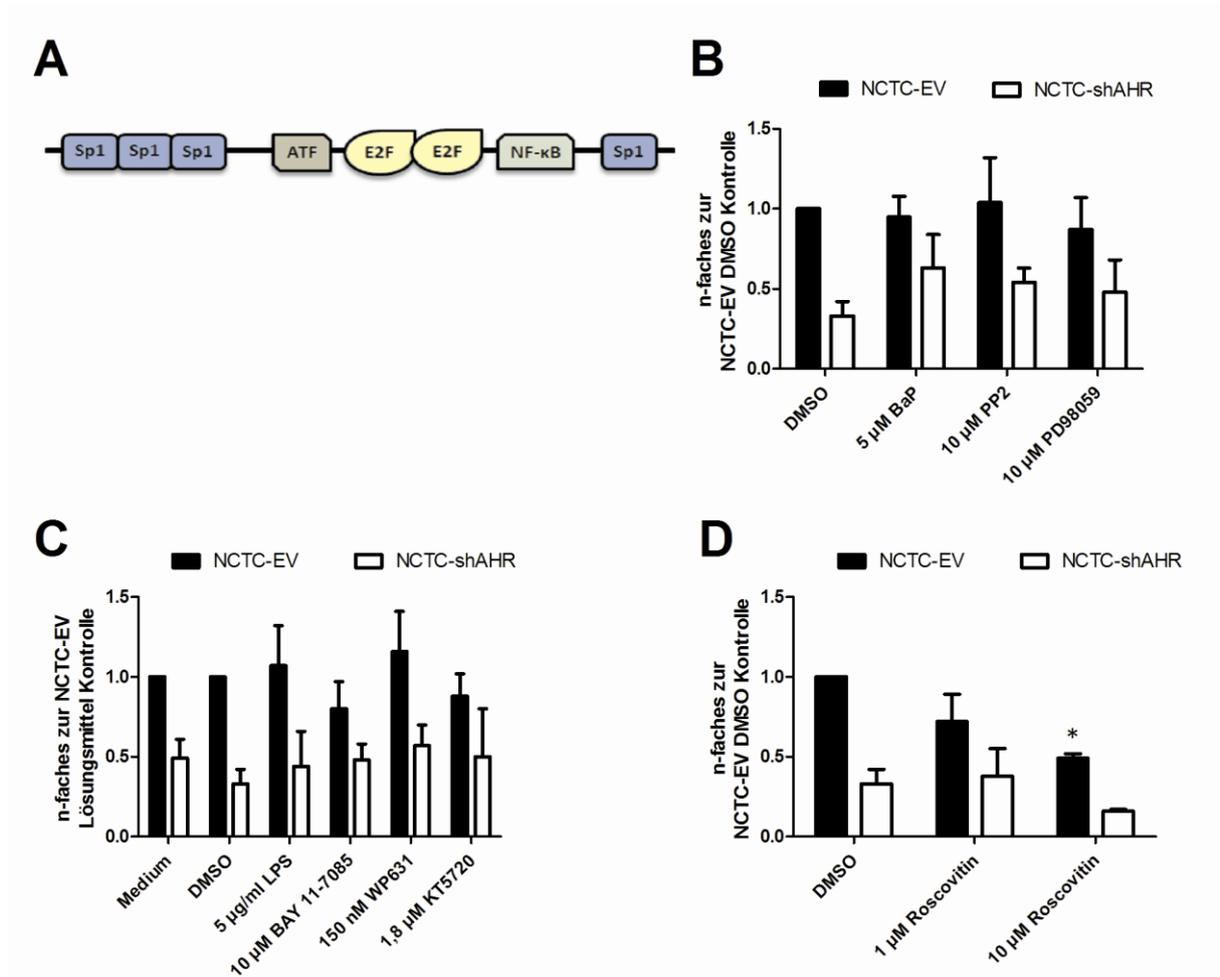


Abbildung 21: Beeinflussung der E2F1-Promotoraktivität durch verschiedene Substanzen.

A: Schematische Übersicht über relevante Bindungsstellen im E2F1-Promotor. NF-κB, *Nuclear Factor-κB*; ATF, *Activating Transcription Factor*; **B - D:** NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten wurden mit dem E2F1-Reportergenkonstrukt pGL2AN (bzw. dem Leervektor pGL2basic) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit **B:** 5 µM BaP, 10 µM PP2, 10 µM PD98059; **C:** 5 µg/ml LPS, 10 µM BAY 11-7085, 150 nM WP631, 1,8 µM KT5720; **D:** 1 und 10 µM Roscovitin sowie 0,1 % DMSO belastet bzw. blieben als Mediumkontrolle für LPS unbehandelt. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität. Die Ergebnisse sind auf die NCTC-EV Lösungsmittel Kontrolle bezogen dargestellt. *signifikant reduziert im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittel Kontrolle.

Eine Aktivierung des AHR-Signalweges durch Behandlung der NCTC-EV Zellen mit 5 μM BaP hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die E2F1-Promotoraktivität. Ebenso kann eine Beteiligung des nicht-genomischen Signalweges an der E2F1-Regulation ausgeschlossen werden, da eine c-src-Inhibierung durch 10 μM PP2 sowie eine Mek-Hemmung durch 10 μM PD98059 die Luziferaseaktivitäten nicht veränderten (vgl. Abbildung 21B).

Im E2F1-Promotor befinden sich Bindungsstellen für NF- κB , Sp1 und ATF (*Activating Transcription Factor*) (Neuman et al., 1994). NF- κB und Sp1 sind zwei Transkriptionsfaktoren, die mit dem AHR interagieren und die Genexpression regulieren können (Kim et al., 2000; Vogel et al., 2007; Wang et al., 1999). Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert den Transkriptionsfaktor ATF (Reh fuss et al., 1991) und es wurde gezeigt, dass sie zudem die AHR-Aktivität beeinflusst (Oesch-Bartlomowicz und Oesch, 2009). Eine Behandlung mit dem NF- κB -aktivierenden Lipopolysaccharid (LPS; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), dem NF- κB -Inhibitor BAY 11-7085 (10 μM), dem Sp1-Inhibitor WP631 (150 nM) oder dem spezifischen PKA-Inhibitor KT 5720 (1,8 μM) hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Luziferaseaktivitäten in den NCTC-EV und NCTC-AHR Keratinozyten (vgl. Abbildung 21C). Obwohl bei diesen drei Transkriptionsfaktoren die Verbindung zum AHR gegeben ist, sind sie, zumindest in dem gewählten Untersuchungsmodell, aufgrund dieser Beobachtungen demnach nicht an der AHR-abhängigen Regulation von E2F1 beteiligt.

Im E2F1-Promotor sind weiterhin Bindungsstellen für die E2F-Proteine lokalisiert (Neuman et al., 1994). In Abhängigkeit von der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin-dependent Kinases*, CDK), insbesondere der CDK2, findet durch die Regulation über E2F-Proteine eine Induktion oder eine Hemmung der E2F1-Expression statt (Johnson et al., 1994). In Abbildung 21D ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit dem CDK2-Inhibitor Roscovitin (1 und 10 μM) die Luziferaseaktivität in den NCTC-EV Zellen um bis zu 50% reduzierte. Da in den unbehandelten NCTC-shAHR Zellen eine vergleichbare Reduktion beobachtet wurde (vgl. Abbildung 20), deutet dies darauf hin, dass eine verringerte CDK2-Aktivität in den NCTC-*knockdown* Keratinozyten für die Reduktion der E2F1-Promotoraktivität verantwortlich ist.

Die vorangegangenen Untersuchungen weisen darauf hin, dass in den NCTC-shAHR Keratinozyten eine reduzierte CDK2-Aktivität vorliegt. In Zellen kommen die natürlichen CDK2-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} vor (Martin et al., 2005). Eine erhöhte Expression dieser endogenen Inhibitoren würde eine reduzierte CDK2-Aktivität in den AHR-defizienten Zellen

erklären. In der Tat wurde im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen eine 1,8-fach erhöhte basale Transkriptmenge von $p27^{KIP1}$ in den *AHR-knockdown* Keratinozyten gemessen. Bei der Expression von $p21^{CIP1}$ ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 22).

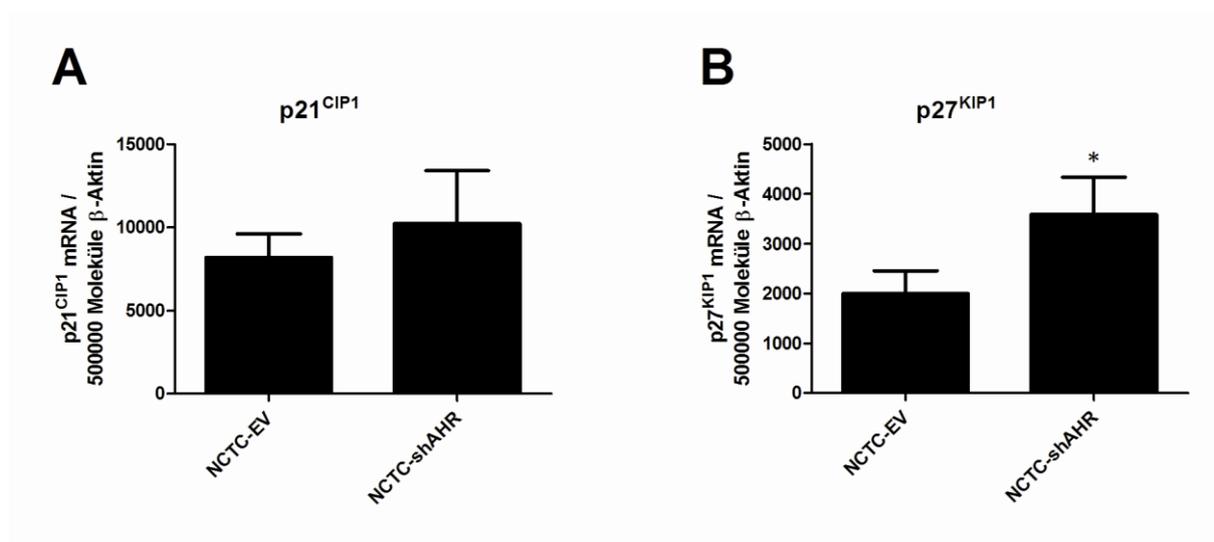


Abbildung 22: Konstitutive $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ mRNA-Expression in NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen.

Die Transkriptmengen von $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ wurden mittels qRT-PCR in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. * signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV.

Darüber hinaus konnte eine signifikant gesteigerte $p27^{KIP1}$ -Proteinexpression in den AHR-defizienten Keratinozyten detektiert werden. Im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen war sie um das 2,5-fache erhöht (vgl. Abbildung 23).

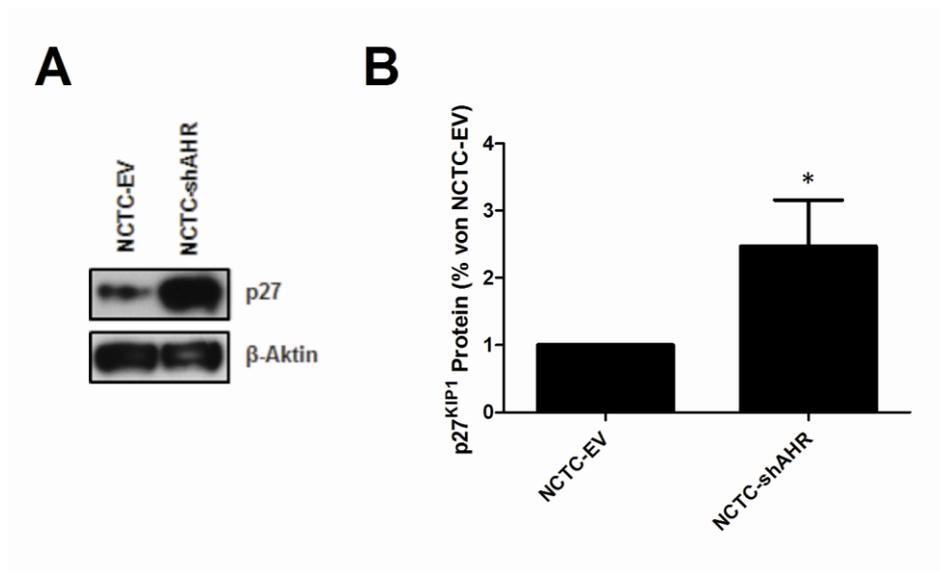


Abbildung 23: Konstitutive p27^{KIP1}-Proteinexpression.

Die Expression des p27^{KIP1}-Proteins wurden mittels Western Blot in unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten bestimmt und auf β -Aktin normiert. **A:** Exemplarischer Western Blot. **B:** Densitometrische Auswertung. Die Auswertung erfolgte von drei unabhängigen Versuchen. Dargestellt ist die Bandenintensität von p27^{KIP1} bezogen auf NCTC-EV. *signifikant erhöht im Vergleich zu NCTC-EV.

Eine erhöhte Expression des Inhibitors p27^{KIP1} könnte folglich zu der reduzierten CDK2-Aktivität in den NCTC-shAHR führen.

CDK2 spielt eine wichtige Rolle für die Zellproliferation. Deren Aktivität ist wichtig für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase (Johnson et al., 1994). Um die vorangegangenen Erkenntnisse weiter zu bekräftigen, wurde die Proliferationsrate zwischen unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen verglichen. Dabei wurde der Einbau von BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) während der DNA-Replikation durch einen spezifischen Antikörper detektiert.

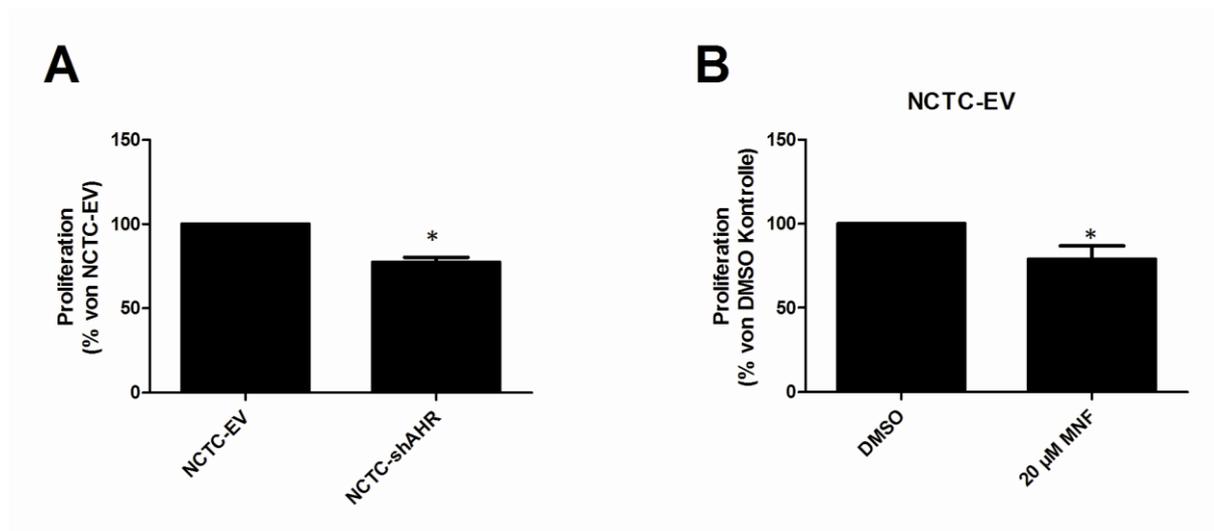


Abbildung 24: Proliferation von NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.

A: Die Proliferationsraten der NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen wurde über den BrdU-Einbau innerhalb von 24 Stunden bestimmt. **B:** 1 Stunde vor der 24-stündigen Inkubation mit BrdU wurden die NCTC-EV Keratinozyten mit 20 µM MNF bzw. 0,1% DMSO behandelt. *signifikant reduziert im Vergleich zu NCTC-EV (A) bzw. DMSO Kontrolle (B).

Abbildung 24A zeigt, dass im Vergleich zu den NCTC-EV Zellen die *AHR-knockdown* Keratinozyten eine um etwa 20% verringerte Proliferationsrate aufwiesen. Auch bei einer chemischen Hemmung des AHR durch MNF (20 µM) reduzierte sich die Proliferationsrate in den NCTC-EV Zellen im gleichen Maße (vgl. Abbildung 24B). Diese Daten weisen erneut auf eine reduzierte CDK2-Aktivität in den NCTC-shAHR Keratinozyten hin.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der AHR die $p27^{KIP1}$ -Expression hemmt, dadurch die CDK2-Aktivität erhöht und auf diese Weise an der Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 beteiligt ist.

3.7 Untersuchungen zu weiteren E2F1-abhängigen Zielgenen

In NCTC-shAHR Zellen wurde in den vorangegangenen Untersuchungen eine reduzierte E2F1-Expression festgestellt. Durch die daraus resultierende gehemmte CHK1-Expression wurde eine erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate in den AHR-defizienten Zellen verursacht. Neben CHK1 reguliert E2F1 die Transkription von einer Vielzahl an weiteren Genen, die sowohl einen induzierenden als auch einen hemmenden Einfluss auf den programmierten Zelltod ausüben. In den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob diese E2F1-

abhängigen Zielgene neben CHK1 einen Einfluss auf die erhöhte Apoptoseneigung in den NCTC-shAHR Keratinozyten haben.

In dieser Arbeit wurde sich zuerst auf das pro-apoptotische p73 konzentriert, da hier bereits eine Beeinflussung der Expression durch E2F1 zusammen mit dem AHR beschrieben wurde (Marlowe et al., 2008). Für die Untersuchung der p73-Expression in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten wurden die Zellen mit 200 J/m² UVB bestrahlt. Sechs Stunden später erfolgte die Ermittlung der Transkriptmengen unter Verwendung der qRT-PCR. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

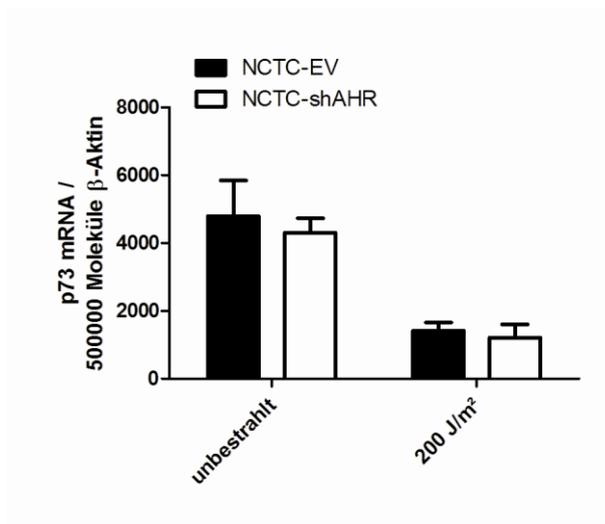


Abbildung 25: Transkription von p73 in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.

6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² wurde die Transkriptmenge von p73 mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β-Aktin normiert.

Die basalen Kopienzahlen von p73 unterschieden sich in den NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen nicht. Sechs Stunden nach UVB-Bestrahlung wurde eine etwa 3,5-fache Reduktion der p73-Transkription in beiden Zelllinien beobachtet, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den AHR-profizienten und AHR-defizienten Keratinozyten ersichtlich wurde. Demnach scheint die Transkription von p73 in den NCTC Zellen unabhängig vom AHR-Signalweg reguliert zu sein.

p73 ist an der transkriptionellen Aktivierung von einer Vielzahl an weiteren Genen beteiligt, die den programmierten Zelltod einleiten. Um zu bestätigen, dass p73 nicht für die erhöhte

Apoptoserate in UVB-bestrahlten NCTC-shAHR Keratinozyten verantwortlich ist, wurde die Expression eines Zielgens von diesem pro-apoptotischen Faktor untersucht. Ein in diesem Kontext interessantes, p73-abhängiges Gen ist Bax (*Bcl-2-associated X Protein*), dessen Regulation bereits als AHR-abhängig beschrieben wurde (Matikainen et al., 2001).

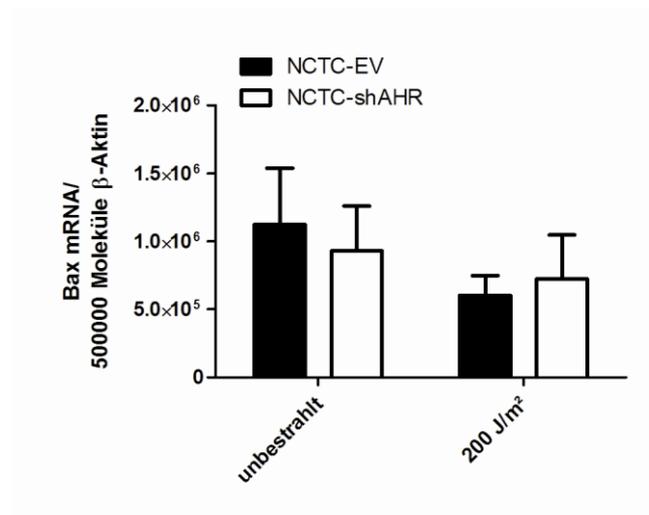


Abbildung 26: Transkription von Bax in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.

6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² wurde die Transkriptmenge von Bax mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β-Aktin normiert.

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass sich die basale Bax-Transkription nicht signifikant zwischen den NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten unterschied. Auch 6 Stunden nach einer UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² waren die Transkriptmengen von Bax in beiden Zelllinien noch etwa gleich hoch. Somit kann in diesem Fall auch eine AHR-abhängige Regulation von Bax ausgeschlossen werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die gesteigerte UVB-induzierte Apoptose in den NCTC-shAHR Zellen nicht über den molekularen Weg E2F1-p73-Bax erfolgt.

In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass der AHR als Kofaktor für die E2F1-abhängige Transkription von PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) dienen kann (Watabe et al., 2010). PCNA spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation, DNA-Reparatur sowie Zellzyklusregulation und hat damit auch einen Einfluss auf die Apoptose (Strzalka und Ziemienowicz, 2011). In einem weiteren Versuch wurde daher die PCNA-Transkription in den

NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen 6 Stunden nach Bestrahlung mit 200 J/m² unter Verwendung der qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

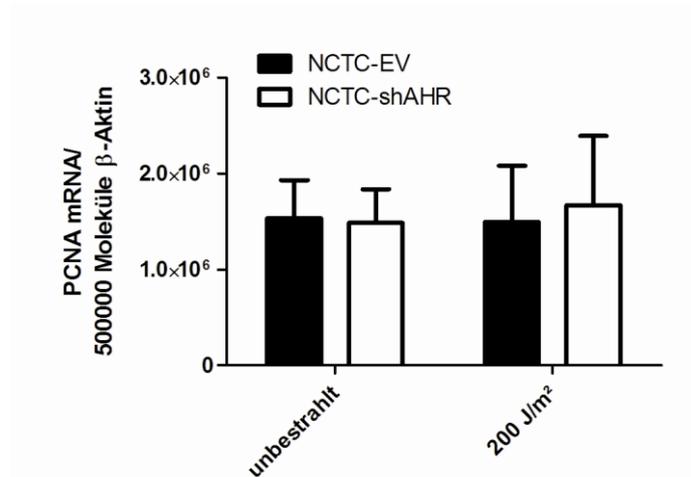


Abbildung 27: Transkription von PCNA in NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.

6 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 200 J/m² wurde die Transkriptmenge von PCNA mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert.

Die PCNA-Expressionsraten waren in den unbehandelten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen gleich hoch und veränderten sich auch nach UVB-Bestrahlung nicht. Daher kann sowohl eine AHR-abhängige Regulation von PCNA als auch die Beteiligung von PCNA an der erhöhten UVB-induzierten Apoptoserate in den AHR-*knockdown* Keratinozyten als unwahrscheinlich angesehen werden.

3.8 Einfluss des AHR auf die Sensibilität von A431 Zellen gegenüber genotoxischem Stress

Eine transiente Hemmung des AHR durch MNF-Behandlung führte in humanen immortalisierten NCTC Keratinozyten zu einer Erhöhung der UVB-induzierten Apoptoserate (vgl. Abbildung 11). Diese Induktion des programmierten Zelltodes kann als vorteilhaft gewertet werden, um stark UVB-geschädigte Zellen zu eliminieren und eine Krebsentstehung zu vermeiden. In einem weiteren Schritt der vorliegenden Arbeit sollte nun überprüft

werden, ob eine Hemmung des AHR auch zur erhöhten Apoptoserate von Tumorzellen unter genotoxischem Stress führt und damit zur Beseitigung von diesen Zellen beitragen kann. Als Untersuchungsmodell wurde die humane epitheliale Karzinomzelllinie A431 verwendet. Die Zellen wurden mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) behandelt. 5-FU ist ein Pyrimidinanalog und wird als Zytostatikum bei der Chemotherapie von NMSC eingesetzt (Desai et al., 2012; Nguyen und Ho, 2002). Anfängliche Western Blot Analysen zeigen, dass eine 72-stündige Belastung der A431 Zellen mit 10 μM 5-FU zur Spaltung von PARP-1 führte und demnach den programmierten Zelltod induzierte (vgl. Abbildung 28).

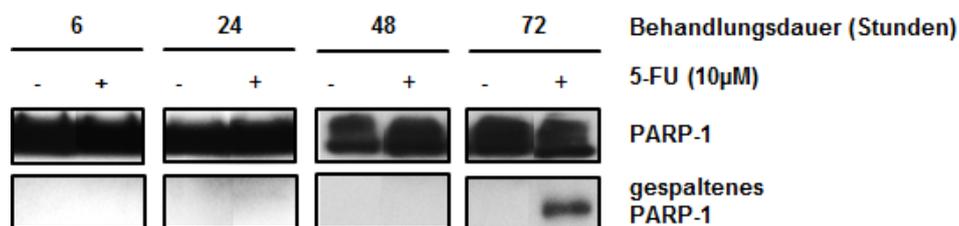


Abbildung 28: PARP-1 nach 5-FU-Behandlung in A431 Zellen.

A431 Zellen wurden mit 10 μM 5-FU bzw. 0,1% DMSO behandelt und 6, 24, 48 oder 72 Stunden später geerntet. Zur Detektion von PARP-1 und dessen Spaltprodukt wurden Western Blot Analysen durchgeführt. n=1.

Um den Einfluss des AHR auf die Wirkung des Chemotherapeutikums 5-FU zu untersuchen, wurden die A431 Zellen nun zusätzlich mit dem spezifischen AHR-Antagonisten MNF behandelt. Abbildung 29 zeigt die Menge an gespaltenem PARP-1 nach der kombinierten Behandlung mit MNF (20, 60 μM) und 5-FU (10 μM) über einen Zeitraum von 72 Stunden.

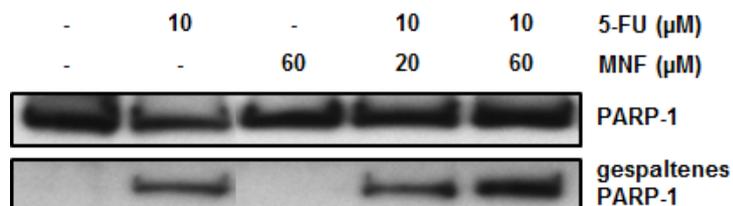


Abbildung 29: PARP-1 nach 72-stündiger MNF- und 5-FU-Behandlung der A431 Zellen.

A431 Zellen wurden mit 20 oder 60 μM MNF und 10 μM 5-FU bzw. 0,1% DMSO behandelt und 72 Stunden später geerntet. Zur Detektion von PARP-1 und dessen Spaltprodukt wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot. n=2.

In ersten Untersuchungen ist zu erkennen, dass eine chemische Hemmung des AHR durch 60 μM MNF die Menge an gespaltenem PARP-1 bei einer 3-tägigen 5-FU-Behandlung erhöhte.

Um zu überprüfen, ob MNF in der Lage ist, den AHR-Signalweg über einen Zeitraum von 72 Stunden zu hemmen, wurde zusätzlich die mRNA-Expression von CYP1A1, dem Markergen für AHR-Aktivität, unter Verwendung der qRT-PCR bestimmt.

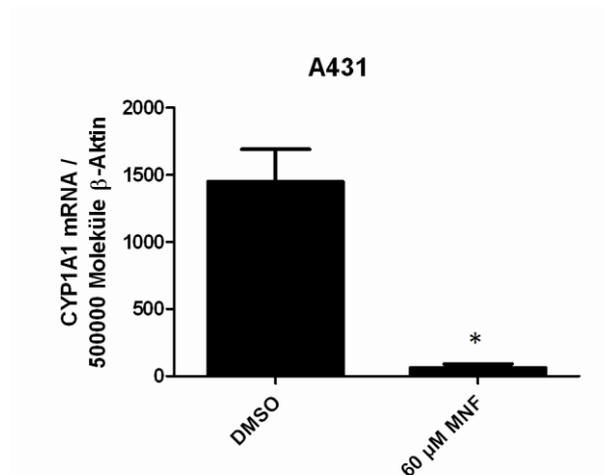


Abbildung 30: mRNA-Expression von CYP1A1 nach MNF-Behandlung in A431 Zellen.

A431 Zellen wurden mit 60 μM MNF bzw. 0,1% DMSO behandelt. 72 Stunden später wurden die Transkriptmengen von CYP1A1 mit Hilfe der qRT-PCR bestimmt und auf 500000 Moleküle β -Aktin normiert. n=3.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass eine Behandlung der A431 Zellen mit 60 μM MNF auch noch nach 3 Tagen die CYP1A1-Transkriptmenge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stark reduzierte. Folglich konnte von einer gewünschten Hemmung der AHR-Aktivität für den Untersuchungszeitraum ausgegangen werden.

Zusammenfassend scheint eine Hemmung der AHR-Aktivität die 5-FU-induzierte Apoptose in den Tumorzellen A431 zu erhöhen. Weitere Studien sind erforderlich, um diese Beobachtungen zu bestätigen.

4 Diskussion

Die Haut ist derjenige Körperbestandteil des Menschen, der am meisten der Sonnenstrahlung ausgesetzt ist. Eine Überdosierung von UVB-Strahlung führt zu schädlichen Wirkungen in der Haut, einschließlich Sonnenbrand, Hautalterung sowie Nicht-Melanom-Hautkrebs (NMSC). UVB-Strahlung stellt ein komplettes Karzinogen dar, welches sich durch Tumor-initiiierende sowie durch Tumor-promovierende Eigenschaften auszeichnet. So kann eine UVB-Einwirkung einerseits direkte Schäden in der DNA bewirken, die zu Mutationen führen und folglich die Tumorentwicklung initiieren können. Andererseits werden durch UVB-Exposition zahlreiche andere Signalwege aktiviert, die mitogene, pro-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkungen nach sich ziehen, somit promovierend wirken können und die Tumorentstehung begünstigen.

NMSC ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsform des Menschen. Mit dem Rückgang der Ozonschicht und dem Wandel von Freizeitgewohnheiten (z.B. Benutzung von Solarien, extensives Sonnenbaden) kann eine ansteigende Exposition mit UVB-Bestrahlung und somit ein Anstieg der NMSC-Inzidenz erwartet werden. Die Entdeckung neuer Angriffspunkte und die Entwicklung neuer Strategien sind daher dringend notwendig, um die Prävention bzw. Behandlung von UVB-induziertem Hautkrebs zu verbessern.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der AHR an der UVB-Stressantwort von Keratinozyten beteiligt ist. Neben seiner Rolle als Regulator für fremdstoffmetabolisierende Enzyme, hat der AHR auch einen Einfluss auf Proliferation, Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung. Eine Modulierung der AHR-Aktivität könnte daher einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung und auf den Verlauf von NMSC haben.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekulare Funktion des AHR in der UVB-Stressantwort zu erforschen. Als Untersuchungsobjekt wurden immortalisierte NCTC Keratinozyten, epitheliale Karzinomzellen (A431) und SKH-1 *hairless* Mäuse verwendet. Eine Aufklärung der größtenteils ungeklärten physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen des AHR in Keratinozyten könnte zur Prävention bzw. Behandlung von UVB-induzierten Hauterkrankungen beitragen.

4.1 Charakterisierung der AHR-abhängigen UVB-Antwort in NCTC Keratinozyten

4.1.1 CYP1A1- und COX2-Induktion

In dieser Arbeit wurden die humanen, stabil transfizierten NCTC-EV (Leervektor-Kontrollzellen) und NCTC-shAHR (AHR-*knockdown*) Zellen verwendet. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden diese zunächst hinsichtlich ihrer AHR mRNA-Expression charakterisiert. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der AHR-Transkription zwischen den NCTC-EV und den Wildtyp NCTC 2544 Keratinozyten beobachtet. In den NCTC-shAHR Zellen betrug die AHR-Transkriptmenge noch ca. 25% im Vergleich zu den AHR-profizienten Zellen. Der AHR-*knockdown* führte demnach zur erwünschten, signifikanten Hemmung der AHR-Expression.

In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass eine UVB-Einwirkung in Keratinozyten zu der Bildung des Tryptophan FICZ führt. FICZ ist ein hochaffiner AHR-Ligand. Nach Bindung an den Rezeptor erfolgt eine Translokation in den Zellkern und eine nachfolgende Dimerisierung mit dem Partnermolekül ARNT. Das Heterodimer bindet an spezifische Elemente (XRE) in der Promotorregion von Zielgenen. Das klassische Zielgen ist CYP1A1, welches gleichzeitig auch als das Markergen für die AHR-Aktivität angesehen wird (Fritsche et al., 2007).

Um zu prüfen, ob dieser klassische AHR-Signalweg in dem verwendeten Zellmodell durch UVB-Exposition aktivierbar ist, wurde die Induktion von CYP1A1 6 Stunden nach Bestrahlung mit 200 J/m² UVB unter Verwendung der qRT-PCR gemessen. In den NCTC 2544 Zellen wurde eine über 2-fach erhöhte CYP1A1-Transkriptmenge im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen gezeigt. In den stabil transfizierten NCTC-EV wurde eine ähnlich hohe Induktion beobachtet, während diese UVB-vermittelte CYP1A1-Induktion in den NCTC-shAHR etwa 50% schwächer ausfiel. Die Induktion der CYP1A1-Transkription war demnach AHR-abhängig und in den NCTC 2544 und NCTC-EV etwa gleich stark ausgeprägt. Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluss zu, dass eine UVB-Bestrahlung von AHR-profizienten NCTC Zellen zu einer Aktivierung des klassischen Signalweges führt. Darüber hinaus verursachte der durch eine stabile Transfektion erreichte AHR-*knockdown* die gewünschte Hemmung des klassischen AHR-Signalweges. Eine ähnlich starke CYP1A1-Induktion nach UVB-Einwirkung wurde auch in HaCaT Keratinozyten beobachtet. Hier wurde 4 Stunden nach 100 J/m² UVB eine ca. 3-fach erhöhte CYP1A1-Transkriptmenge gemessen

(Fritsche et al., 2007). Durch eine 8-stündige Behandlung mit 10 μM BaP, einem AHR-Agonisten mit hoher Bindungsaffinität, konnte eine 20-fache CYP1A1-Induktion in HaCaT Zellen erreicht werden (Haarmann-Stemmann et al., 2010). *In-vivo* führte eine einmalige i.p. Applikation von 10 mg/kg BaP 24 Stunden später sogar zu einer ca. 6600-fachen Erhöhung der CYP1A1-Transkription in der Rattenleber (Harrigan et al., 2006). Aufgrund dieser Studien kann die CYP1A1-Induktion durch UVB-Einwirkung im Vergleich zur Wirkung des AHR-Agonisten BaP als gering eingestuft werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte die geringe metabolische Stabilität von FICZ sein, da es ein affines Substrat für CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 darstellt und innerhalb von wenigen Minuten verstoffwechselt wird (Wincent et al., 2009).

Neben der beschriebenen Aktivierung des AHR/ARNT-abhängigen Signalweges kommt es durch die Freisetzung der Tyrosinkinase c-src nach der AHR-Ligandenbindung zur Stimulation des sogenannten nicht-genomischen AHR-Signalweges. c-src ist in der Lage den membranständigen EGFR zu aktivieren. Daraufhin wird über die Aktivierung von MAP Kinasen die Transkription weiterer AHR-Zielgene (z.B. COX2) induziert (Fritsche et al., 2007).

Im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen führte eine Bestrahlung der NCTC 2544 und NCTC-EV Zellen mit 200 J/m^2 UVB nach 6 Stunden zu einer ca. 13-fachen Induktion der COX2-Transkription. In den NCTC-shAHR Keratinozyten wurde COX2 nur etwa 6-fach erhöht exprimiert. Eine UVB-Bestrahlung in AHR-profizienten NCTC Zellen führte demnach auch zur Aktivierung des nicht-genomischen AHR-Signalweges und der durch die stabile Transfektion erreichte AHR-*knockdown* verursachte die gewünschte Hemmung von diesem Signalweg. Da auch hier die Induktion der COX2-Transkription in den NCTC 2544 und NCTC-EV Keratinozyten etwa gleich stark war, wurden diese beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer Responsivität gegenüber UVB-Strahlung als gleich bewertet. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden daher nur NCTC-EV sowie NCTC-shAHR Keratinozyten verwendet.

In HaCaT Keratinozyten wurde mit einer ca. 5-fachen Erhöhung der Transkription 4 Stunden nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB eine etwas geringere COX2-Induktion beobachtet (Fritsche et al., 2007). Auch eine sechsstündige Behandlung mit dem AHR-Agonisten TCDD (10nM) resultierte nur in eine etwa 1,8-fache COX2-Induktion in HepG2 Zellen (Li et al., 2010). Eine einmalige Verabreichung von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD an Mäusen führte zu einem ca. 3,5-fachen Anstieg der COX2-Transkription in der Leber (Li et al., 2010). Die in dieser Arbeit

beobachtete 13-fache Erhöhung der COX2-Transkription nach UVB-Bestrahlung kann demnach im Vergleich zur Wirkung des Agonisten TCDD als eine hohe Induktion eingestuft werden.

Da sowohl eine erhöhte CYP-Aktivität die Bildung von ROS begünstigt (Puntarulo und Cederbaum, 1998) als auch COX2 an UV-induzierten Entzündungsprozessen und Tumorentstehung beteiligt ist (Pentland et al., 1999), spielt der AHR eine wichtige Rolle in der UVB-Stressantwort von Keratinozyten. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten zusätzliche UVB-induzierbare und AHR-abhängige Zielgene herausgearbeitet werden, die einen Einfluss auf die Entstehung und auf den Verlauf von UV-induzierten Hauterkrankungen haben könnten.

4.1.2 AHR-abhängige mRNA-Expression von PAI-2 nach UVB-Behandlung

PAI-2 gehört zur Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) und hemmt vor allem die tumorassoziierte Protease uPA (*Urokinase Plasminogen Aktivator*), welche inaktives Plasminogen in aktives Plasmin umwandelt. PAI-2 ist in vielen Zellen und Gewebsflüssigkeiten weit verbreitet. Es hemmt die Proliferation von Keratinozyten und wirkt als Inhibitor von Proteasen, die Matrixproteine abbauen. Möglicherweise ist eine Reduktion der PAI-2-Expression an der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt, da die vorhandene Matrix durch aktivierte Proteasen abgebaut wird, sodass die Tumorzellen ihren Standort verlassen können (Hibino et al., 1999).

Eine UVB-Bestrahlung der NCTC-EV Zellen führte zu einer 5-fachen Induktion der PAI-2 mRNA-Expression. In den AHR-defizienten Zellen wurde keine Induktion beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Transkription von PAI-2 nach UVB-Bestrahlung AHR-abhängig reguliert wird.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem AHR-Agonist TCDD zu einem dosisabhängigen Anstieg der PAI-2 mRNA-Expression in humanen Brustkrebszellen und in Zellen des Endometriumkarzinoms führte (Dohr et al., 1995; Jana et al., 2000). Yang zeigte eine dosisabhängige Erhöhung der PAI-2-Expression nach TCDD-Behandlung in humanen endometrialen Zellen, wobei die maximale Transkriptmenge bei einer Konzentration von 100 nM TCDD beobachtet wurde. In einem

mRNA-Stabilitätsassay mit Actinomycin D wurde gezeigt, dass die PAI-2-mRNA in den TCDD-behandelten Zellen etwa zweifach stabiler war als in den Kontrollzellen, woraufhin der Autor eine TCDD-abhängige Regulation von PAI-2 auf posttranskriptioneller Ebene vermutete (Yang, 1999). Analysen der humanen PAI-2-Promotorregion enthüllten eine DNA-Sequenz, welche mit der XRE-Basenabfolge 5'-GCGTG-3' übereinstimmte und eine Bindungsstelle für den AHR sein könnte (Sutter et al., 1991). Ob diese Sequenz eine aktive physiologische Relevanz hat, wurde bis jetzt jedoch noch nicht untersucht (Li et al., 2010). Sekine et al. zeigten, dass der AHR direkt die PAI-2-Expression in murinen Makrophagen reguliert, wobei eine Beteiligung von ARNT nicht erforderlich zu sein scheint. Im murinen PAI-2-Promotor wurden Bindungsstellen für NF- κ B gefunden und eine ChIP-Analyse zeigte, dass die NF- κ B-Untereinheit RelA nur in Anwesenheit des AHR zum PAI-2-Promotor rekrutiert wird (Sekine et al., 2009). Li et al. konnten eine deutliche Erhöhung der PAI-2 mRNA-Expression bereits nach einer einstündigen Behandlung mit 10 nM TCDD in HepG2 Zellen zeigen. Diese sehr schnelle Reaktion auf die TCDD-Behandlung wurde mit der bereits erwähnten mRNA-Stabilisierung erklärt. Die Autoren nehmen an, dass die TCDD-induzierte Erhöhung der mRNA-Transkriptmenge zu den späteren Zeitpunkten über den klassischen AHR-Signalweg reguliert wird (Li et al., 2010). Diese Vermutung würde jedoch gegen eine Studie von Dong et al. sprechen, in der eine Regulation von PAI-2 über den c-src-gesteuerten, nicht-genomischen AHR-Signalweg in humanen Brustkrebszellen beschrieben wurde (Dong und Matsumura, 2009). Der Mechanismus der AHR-abhängigen Regulation von PAI-2 könnte demnach je nach Spezies und Zelltyp von unterschiedlicher Natur sein.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die PAI-2 mRNA-Expression in humanen NCTC Keratinozyten auch nach einer UVB-Bestrahlung AHR-abhängig reguliert wird. Welcher AHR-Signalweg verantwortlich ist oder ob noch weitere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B beteiligt sind, lässt sich zum heutigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit sagen und sollte in zukünftigen Studien aufgeklärt werden.

PAI-2 ist als Inhibitor an einer Vielzahl von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen, einschließlich Differenzierung von Keratinozyten, Inflammation und Apoptose, beteiligt (Kruithof et al., 1995). Es wurde gezeigt, dass PAI-2 die Apoptose in gestressten Zellen (z.B. durch Tumornekrosefaktor- α) hemmen kann (Jensen, 1997). So kann beispielsweise die anti-apoptotische Wirkung von TCDD auf gestresste Hepatozyten (Worner

und Schrenk, 1996) mit einer TCDD-induzierten Erhöhung der PAI-2-Expression erklärt werden. Eine PAI-2-Überexpression in murinen Keratinozyten resultierte in eine verstärkte Ausbildung von Papillomen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Wahrscheinlich wurde dies durch eine Hemmung der Apoptose verursacht (Zhou et al., 2001). Die molekulare Rolle der AHR-abhängigen Regulation von PAI-2 in UVB-bestrahlten Keratinozyten bzw. in Sonnenlicht-ausgesetzter Haut sollte in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden und könnte interessantes Wissen über die Physiologie aber auch über die Entstehung von UVB-induzierten Hauterkrankungen hervorbringen.

4.1.3 Der Einfluss des AHR auf die UVB-induzierte mRNA-Expression von IL-6 und IL-8

Interleukin-6 (IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, welches von verschiedenen Zelltypen, einschließlich Tumorzellen, produziert wird und eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Aktivitäten, wie Immunregulation, Hämatopoese und Krebsentstehung spielt. Über die Bindung an einen IL-6-Rezeptor werden Janus-aktivierte Kinasen (JAK) phosphoryliert, wodurch der JAK-STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*)-Signalweg aktiviert wird. Im Folgenden kommt es zur Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in den Nukleus und zur Transkription von Zielgenen, welche eine Rolle bei der Apoptose, Proliferation und beim Überleben der Zelle spielen (Guo et al., 2012).

Es ist bekannt, dass UVB-Strahlung zu einer schnellen Freisetzung von IL-6 in primären sowie in immortalisierten humanen Keratinozyten führt (Petit-Frere et al., 2000). Darüber hinaus wird eine Induktion der IL-6-Produktion in Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung mit der lokalen und systemischen Immunantwort des Körpers auf eine intensive Einwirkung von Sonnenstrahlen in Verbindung gebracht (Kirnbauer et al., 1991; Urbanski et al., 1990). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die UVB-induzierte IL-6 mRNA-Expression in humanen NCTC Keratinozyten AHR-abhängig reguliert wird. Dabei hemmte eine eingeschränkte AHR-Aktivität die Induktion von IL-6.

Bereits in einer Studie von Hennig et al. konnte demonstriert werden, dass coplanare polychlorierte Biphenyle (PCB), die als Agonisten des AHR wirken, in der Lage sind die IL-6-Produktion zu induzieren (Hennig et al., 2002). Auch in einer weiteren Untersuchung wurde

beobachtet, dass eine Aktivierung des AHR durch TCDD in eine verstärkte IL-6-Expression in Brustkrebszellen resultierte (Hollingshead et al., 2008). Ebenso induzierte eine Bindung des endogenen Liganden Kynurensäure an den AHR die IL-6 mRNA-Expression unter Anwesenheit des pro-inflammatorischen IL-1 β (DiNatale et al., 2010). Vicentini et al. konnten zeigen, dass Quercetin die UV-induzierte IL-6-Expression in Keratinozyten um 80% reduzieren konnte. Dieser Effekt wurde mit einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in Verbindung gebracht (Vicentini et al., 2011). Interessanterweise handelt es sich bei dem Flavonoid Quercetin um einen AHR-Antagonisten (Ciolino et al., 1999). Ähnliche Effekte wurden beim Catechin EGCG beobachtet. Diese Substanz hemmt ebenfalls die Aktivität des AHR (Palermo et al., 2005) und führte zu einer reduzierten NF- κ B-Aktivierung sowie IL-6-Sekretion nach UVB-Bestrahlung von humanen Keratinozyten (Luo et al., 2006; Xia et al., 2005). Eine weitere Studie zeigte schließlich, dass der AHR mit der NF- κ B-Untereinheit RelA im Cytoplasma und im Nukleus von humanen Lungenzellen interagieren kann. AHR und RelA können gemeinsam an der NF- κ B-Bindungsstelle im IL-6-Promotor binden und so die Transkription des Zytokins induzieren (Chen et al., 2011). Eine ähnliche Assoziation zwischen AHR und RelA wurde auch am c-myc-Promotor in Brustkrebszellen beschrieben (Kim et al., 2000).

IL-6 ist ein Zytokin, welches in nahezu allen Tumoren überexprimiert wird. Es steuert in vielfältiger Weise die Tumorbilogie, indem es die Entwicklung, Migration, Invasion, Proliferation, Progression, Angiogenese, Differenzierung und Apoptose von Krebszellen beeinflusst (Guo et al., 2012). In Zellen von verschiedenen Plattenepithelkarzinomen wurde der AHR konstitutiv gebunden an den IL-6-Promotor vorgefunden, was zumindest zum Teil für die hohe basale und darüber hinaus leicht induzierbare IL-6-Transkription verantwortlich sein könnte. Wurden diese Zellen mit einem AHR-Antagonisten behandelt, löste sich der AHR vom IL-6-Promotor und die Transkription des Zytokins wurde unterdrückt (DiNatale et al., 2011). Da in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt wurde, dass auch nach UVB-Strahlung die IL-6 mRNA-Expression AHR-abhängig reguliert wird, könnten AHR-Antagonisten ein neuer Ansatzpunkt für die Prävention oder Behandlung von NMSC sein.

Interleukin-8 (IL-8) ist ein pro-inflammatorisches Chemokin, welches an zwei membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2) bindet. Im Folgenden werden Phosphoinositid-3-Kinasen, Phospholipase C, Proteinkinase B,

Proteinkinase C und MAP Kinasen aktiviert. Über diese Signalwege kann die Translation von Proteinen und die Aktivität von vielen Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden (Waugh und Wilson, 2008).

Es wurde bereits in früheren Studien beschrieben, dass eine UVB-Bestrahlung von humanen Keratinozyten zu einer induzierten IL-8 mRNA-Expression und IL-8-Sezernierung ins Zellkulturmedium führt (Grandjean-Laquerriere et al., 2002; Kondo et al., 1993; Yoshizumi et al., 2008). Auch in dieser Arbeit konnte eine Induktion der IL-8-Transkription 6 Stunden nach UVB-Einwirkung gezeigt werden. Dabei waren die Transkriptmengen in den NCTC-EV Zellen zwar höher, aber nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den NCTC-shAHR Keratinozyten. Eine eindeutige AHR-abhängige Regulation der IL-8-Transkription nach UVB-Bestrahlung kann demnach nicht abgeleitet werden. Dagegen unterschied sich die basale IL-8 mRNA-Expression zwischen den AHR-profizienten und AHR-defizienten NCTC Keratinozyten signifikant: In den AHR-*knockdown* Keratinozyten war die IL-8-Transkription um etwa 70% reduziert. Der AHR scheint demnach an der basalen Regulation von IL-8 in NCTC Keratinozyten beteiligt zu sein. Auch in unbehandelten AHR-defizienten HaCaT Keratinozyten wurde eine veränderte IL-8-Proteinmenge im Überstand festgestellt, allerdings war diese im Vergleich zu AHR-profizienten HaCaT Zellen ca. 5-fach erhöht (Kalmes et al., 2011). Demnach scheint es bereits Unterschiede in der AHR-abhängigen IL-8-Regulation zwischen den beiden Zelltypen NCTC und HaCaT zu geben. Der AHR-abhängige Unterschied in der basalen IL-8-Expression deutet auf einen konstitutiv aktiven AHR in diesen Zellen hin. Dass der Rezeptor auch konstitutiv, d.h. ohne Einwirkung eines exogenen Liganden oder Stimulus, aktiv sein kann, wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben. So zeigten HaCaT Zellen und primäre Keratinozyten eine basale CYP1A1-Expression, welches als das Markergen für die AHR-Aktivität gilt (Fritsche et al., 2007; Katiyar et al., 2000). Auch für die in dieser Arbeit verwendeten NCTC Keratinozyten wurde eine basale CYP1A1-Transkription beobachtet. Eine konstitutiv aktive Form des AHR wurde mittlerweile in vielen weiteren Zelltypen vorgefunden und kann eventuell auf die Aktivität endogener Liganden zurückgeführt werden (Hahn et al., 2009; Nebert und Karp, 2008; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005).

Dass der AHR einen Einfluss auf die IL-8-Expression hat, zeigen bereits mehrere Studien. So modulierten verschiedene pflanzliche Polyphenole, einschließlich Resveratrol und Quercetin,

die Transkription und Proteinfreisetzung von IL-8 über den AHR-Signalweg (Potapovich et al., 2011). Ebenso führte BaP zu einer IL-8-Induktion in primären humanen Makrophagen und Keratinozyten, welche nach einem AHR-*knockdown* reduziert war (Podechard et al., 2008; Tsuji et al., 2011). Eine Studie von Vogel et al. zeigte, dass nach TCDD-Behandlung von humanen Makrophagen die NF- κ B-Untereinheit RelB mit dem AHR physikalisch interagiert, an RelB/AHR-Erkennungsstellen im IL-8-Promotor bindet und so die IL-8-Transkription induziert (Vogel et al., 2007). In dieser Arbeit konnte nach UVB-Bestrahlung keine eindeutige AHR-abhängige IL-8-Transkription gezeigt werden. Hier können zelltypspezifische Unterschiede eine Rolle spielen. Darüber hinaus unterscheidet sich UVB-Strahlung in ihrer molekularen Wirkung von anderen AHR-Liganden wie BaP oder TCDD. Dass im IL-8-Promotor noch weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (*Aktivator* Protein-1) und Oct-1, identifiziert wurden, die an der transkriptionellen Kontrolle des IL-8-Gens beteiligt sind (Mukaida et al., 1990; Wu et al., 1997), darf ebenso nicht außer Acht gelassen werden.

IL-8 beeinflusst in vielfältiger Weise die Tumorbiologie. Beispielsweise wird über autokrine Sekretion die Proliferation und das Überleben von Tumorzellen gefördert. Von den Tumorzellen sekretiertes IL-8 aktiviert Endothelzellen und hat so einen induzierenden Einfluss auf Angiogenese. Es führt zur Infiltration von Neutrophilen und fördert die Migration von Zellen (Waugh und Wilson, 2008). Aufgrund dieser multiplen Effekte von IL-8 kann es als Angriffspunkt für die Behandlung von Tumorerkrankungen dienen. Kenntnisse über die molekulare Regulation von diesem Zytokin, z.B. über den AHR, könnten die chemotherapeutischen Ansätze weiter verbessern.

4.2 Identifizierung einer neuen E2F1-CHK1-vermittelten, anti-apoptischen Funktion des AHR in NCTC Keratinozyten

Der programmierte Zelltod stellt einen entscheidenden Faktor bei der Entstehung und beim Verlauf der Kanzerogenese dar. Eine verstärkte Induktion der UVB-induzierten Apoptose könnte daher einen positiven Einfluss auf Prävention und Behandlung von NMSC haben. In diesem Kontext sollte die Rolle des AHR in der UVB-induzierten Apoptose in humanen Keratinozyten aufgeklärt werden. In der Literatur wird der Einfluss des AHR auf die Apoptose recht kontrovers diskutiert. So wurde einerseits eine erhöhte Apoptoserate nach TGF- β Stimulation in AHR-defizienten Hepatozyten beobachtet (Zaher et al., 1998). Andererseits wurde eine pro-apoptische Rolle des AHR beim Fas-mediertem programmierten Zelltod in Hepatozyten beschrieben (Park et al., 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine shRNA-vermittelte oder chemische Hemmung der AHR-Aktivität eine erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate in Keratinozyten verursacht. In einer *in-vivo* Untersuchung wurde dargelegt, dass diese Beobachtung von physiologischer Bedeutung ist. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die anti-apoptische Funktion des AHR über die Regulation der basalen Expression von E2F1 und CHK1 vermittelt werden könnte. Eine Übersicht über den vermuteten molekularen Mechanismus gibt Abbildung 31.

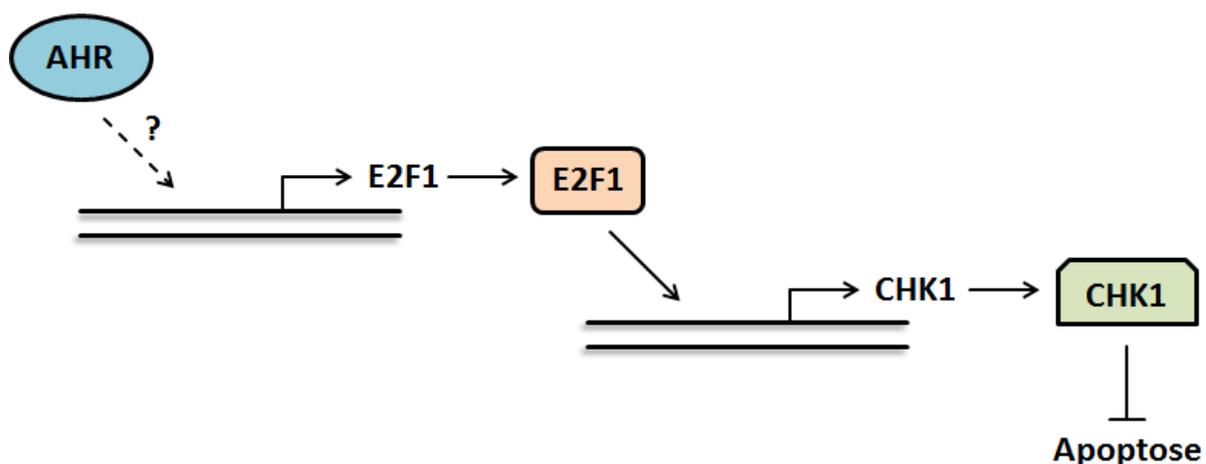


Abbildung 31: Die anti-apoptische Funktion des AHR in NCTC Keratinozyten wird über die basale Expression von E2F1 und CHK1 vermittelt.

Der AHR induziert auf bisher unbekannte Weise die basale Expression von E2F1. E2F1 induziert die Expression von seinem Zielgen CHK1, welches eine bedeutende Funktion bei der Regulation von Kontrollpunkten im Zellzyklus besitzt. Eine hohe CHK1-Expression hemmt den programmierten Zelltod. AHR, Arylhydrokarbon Rezeptor; CHK1, *Checkpoint Kinase 1*.

Eine shRNA-vermittelte Hemmung des AHR in Keratinozyten führte zu einer verringerten Expression von E2F1. Wurde die E2F1-Expression experimentell erhöht, reduzierte sich die Apoptoserate nach UVB-Einwirkung. E2F1 gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren (E2F-Familie) und reguliert sowohl Zellzyklusverlauf als auch Apoptose. Es trägt demnach maßgeblich zur Entscheidung über das Schicksal einer Zelle über „Leben oder Tod“ bei (Bell und Ryan, 2004). E2F1 kann über verschiedene Wege Einfluss auf Apoptose ausüben. Beispielsweise kann es p53 stabilisieren und so zur Aktivierung der Caspase-9 führen. Studien an murinen Fibroblasten zeigten, dass der AHR die E2F1-induzierte Apoptose hemmen kann. Dabei wurde eine mögliche Interaktion des AHR mit E2F1 beschrieben, welche eine E2F1-Phosphorylierung und somit eine Einleitung der Apoptose verhindert (Marlowe et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine reduzierte E2F1-Proteinexpression mit einer erhöhten Apoptoserate in Verbindung gebracht. Dies spricht dagegen, dass in diesem Fall eine mögliche AHR-E2F1-Interaktion für die erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate in NCTC-shAHR Zellen verantwortlich ist. Die Studie von Marlowe et al. zeigte weiterhin, dass die Expression des pro-apoptotischen p73 durch die AHR-E2F1-Interaktion beeinflusst wird (Marlowe et al., 2008). Daraufhin wurde die mRNA-Transkription von p73 in UVB-bestrahlten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen untersucht. Jedoch konnte in diesen Zellen keine AHR-abhängige p73 mRNA-Expression festgestellt werden. Zudem konnte eine Beteiligung des AHR an der Transkription von dem p73-Zielgen Bax in den NCTC Zellen ausgeschlossen werden, obwohl die Regulation von diesem pro-apoptotischen Protein in murinen Oozyten bereits als AHR-abhängig beschrieben wurde (Matikainen et al., 2001). Auch diese Ergebnisse sprechen dagegen, dass eine Interaktion zwischen AHR und E2F1 und nachfolgender Regulation von p73 an der erhöhten UVB-induzierten Apoptose in den AHR-*knockdown* NCTC Keratinozyten beteiligt ist.

Eine Hemmung der E2F1-Expression bzw. Aktivität erhöhte die Apoptoserate in vielen Zelltypen (Ghosh et al., 2005; Spyridopoulos et al., 1998; Zheng et al., 2009). Eine UVB-Bestrahlung von E2F1-*knockout* Mäusen führte zu einer gesteigerten Anzahl an apoptotischen Keratinozyten. Und eine gezielte Überexpression von E2F1 in der Epidermis reduzierte die Apoptose (Wikonkal et al., 2003). In einer Studie von Watabe et al. wurde eine E2F1-abhängige Transkription von PCNA beschrieben, bei der der AHR als Kofaktor diente (Watabe et al., 2010). PCNA ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und beeinflusst die Apoptose (Strzalka und Ziemienowicz, 2011). Da jedoch die PCNA-Transkriptmengen in

unbehandelten sowie UVB-bestrahlten NCTC-EV und NCTC-shAHR Zellen unverändert blieben, ist eine AHR-abhängige Regulation von PCNA und die Beteiligung von PCNA an der erhöhten UVB-induzierten Apoptose in den AHR-defizienten Zellen unwahrscheinlich.

Die reduzierte E2F1-Expression in den NCTC-shAHR Keratinozyten resultierte in einer verringerten mRNA- und Proteinexpression von CHK1. Eine Überexpression von E2F1 erhöhte wiederum die CHK1-Proteinexpression. Eine Aktivierung des AHR-Signalweges durch den Liganden BaP hatte dagegen keinen Einfluss auf die CHK1-Transkription. Somit scheint die CHK1-Expression nicht direkt durch den AHR reguliert zu sein. Diese Beobachtungen zusammen mit den Angaben in der Literatur (Carrassa et al., 2003) lassen den Schluss zu, dass CHK1 direkt durch E2F1 in den NCTC Keratinozyten reguliert wird. CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*) ist eine Serin/Threonin Protein Kinase und reguliert G2/M- und S-Phase Kontrollpunkte (*Checkpoints*) des Zellzyklus. Sie wird zellzyklusabhängig in der S- und G2-Phase von proliferierenden Zellen exprimiert. Nach einem DNA-Schaden (z.B. UV-induziert) wird CHK1 durch Phosphorylierungen an Position Ser345 und Ser317 aktiviert. CHK1 selber phosphoryliert im Folgenden eine Vielzahl weiterer Proteine, wie die Phosphatase CDC25A. CDC25A wird im phosphorylierten Status degradiert und kann somit nicht mehr die Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) 1 und 2 dephosphorylieren und damit aktivieren. Die Zelle arretiert schließlich in der S- und G2-Phase. CHK1 kann ebenso CDC25C phosphorylieren, was einen G2-Phase Arrest zur Folge hat (Zhou und Bartek, 2004). Dass CHK1 ebenso einen Einfluss auf die Apoptose hat, zeigt eine erst kürzlich veröffentlichte Studie. So führte eine Hemmung der CHK1-Expression bzw. -Aktivität p53-unabhängig zu einer erhöhten Apoptoserate in UVB-bestrahlten primären Keratinozyten (Heffernan et al., 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit könnte die reduzierte CHK1-Expression in den NCTC-shAHR Keratinozyten für die verstärkte UVB-induzierte Apoptose verantwortlich sein. Unterstützt wird diese Vermutung mit der Beobachtung, dass eine experimentelle Überexpression von CHK1 die Apoptoserate in den AHR-*knockdown* Zellen wieder reduzierte.

Eine Erhöhung der Apoptose nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen wurde in vielen Tumorzelllinien durch eine Hemmung der CHK1-Expression erzielt (Brazelle et al., 2010; Cho et al., 2005; Luo et al., 2001; Tse et al., 2007; Tu et al., 2011; Xiao et al., 2003). Auch *in-vivo* führte eine CHK1-Hemmung zu einer verstärkten Eliminierung von Tumorzellen

nach Behandlung mit der genotoxischen Substanz 5-Fluorouracil (Ganzinelli et al., 2008). Darüber hinaus verstärkte eine topische Anwendung UVB-bestrahlter Mäusehaut mit Koffein, ein Inhibitor der CHK1-Aktivität, die Beseitigung von DNA-geschädigten Keratinozyten (Koo et al., 2007; Lu et al., 2002a). All diese Literaturangaben untermauern die Hypothese, dass die reduzierte CHK1-Expression in den NCTC-shAHR Zellen für die verstärkte UVB-induzierte Apoptose verantwortlich ist.

4.3 AHR-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1

In den NCTC-shAHR Zellen wurde im Vergleich zu den AHR-profizienten Keratinozyten eine Reduktion sowohl der E2F1-Proteinexpression als auch der E2F1-Promotoraktivität beobachtet. Vergleichbare Ergebnisse zeigt eine Studie mit AHR-*knockout* Mäusen. Hier wurde ebenfalls eine reduzierte E2F1-Expression in der Leber vorgefunden (Fan et al., 2010).

Eine Behandlung der AHR-profizienten Keratinozyten mit dem Agonisten BaP führte zu keiner Veränderung der E2F1-Promotoraktivität. Dies deutet darauf hin, dass E2F1 nicht zu den XRE-abhängigen Zielgenen des AHR gehört. Auch eine Hemmung des nicht-genomischen Signalweges durch den src-Inhibitor PP2 und den Mek-Inhibitor PD98059 hatte keinen Effekt auf die Promotoraktivität. Somit wird E2F1 auch nicht über diesen Teil des AHR-Signalweges reguliert. Die E2F1-Promotorregion enthält putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Sp1 (Neuman et al., 1994). Bei beiden Molekülen ist beschrieben, dass sie mit dem AHR interagieren und so die Genexpression modulieren können (Kim et al., 2000; Vogel et al., 2007; Wang et al., 1999). Jedoch führte weder eine Stimulation sowie Hemmung von NF- κ B noch eine Inhibierung von Sp1 zu einer signifikanten Veränderung der E2F1-Promotoraktivität. Daher kann in diesem Fall eine NF- κ B- oder Sp1-abhängige Regulation von E2F1 ausgeschlossen werden. Eine weitere Bindungsstelle im E2F1-Promotor erkennt den Transkriptionsfaktor ATF (Neuman et al., 1994). Die cAMP-abhängige PKA aktiviert ATF (Rehfuss et al., 1991) und es wurde gezeigt, dass sie zudem die AHR-Aktivität beeinflusst (Oesch-Bartlomowicz und Oesch, 2009). Eine Hemmung der PKA-Aktivität führte in dieser Arbeit jedoch nicht zu einer signifikanten Veränderung der E2F1-Promotoraktivität, was eine Beteiligung von ATF ausschließt.

Die Transkription von E2F1 kann zusätzlich durch die Bindung von Proteinen der E2F-Familie auto-reguliert werden (Neuman et al., 1994). Das Retinoblastom-Protein (Rb) spielt bei der Regulation der E2F-Aktivität eine wichtige Rolle. Bildet es mit E2F einen Komplex, hemmt es dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor. Die Regulation der E2F1-Transkription ist äußerst wichtig für eine normale und kontrollierte Zellproliferation. So führt beispielsweise ein Anstieg der E2F1-Expression zu einem Übergang der Zelle in die S-Phase. Abhängig vom Rb-verursachten Aktivitätsstatus von E2F kann die Transkription von E2F1 induziert oder gehemmt werden. Rb wird durch CDK, insbesondere CDK2, reguliert. Nach einer Phosphorylierung von Rb zerfällt der Rb/E2F-Komplex und E2F wird als Transkriptionsfaktor aktiv. So kann eine Akkumulation von E2F1 in der G1-Phase erreicht und ein Übergang in die S-Phase eingeleitet werden (Johnson et al., 1994). Der natürliche CDK2-Inhibitor p27^{KIP1} sichert das korrekte *Timing* der CDK2-Aktivität im Verlauf des Zellzyklus (Lee und Kim, 2009). Eine erhöhte p27^{KIP1}-Aktivität hemmt die Phosphorylierung von Rb. Dadurch befindet sich vermehrt E2F, gebunden an Rb, im inaktiven Status vor und eine Akkumulation von E2F1 wird verhindert.

In dieser Arbeit führte eine Hemmung der CDK2-Aktivität durch Behandlung mit Roscovitin zu einer deutlichen Reduktion der E2F1-Promotoraktivität in den AHR-profizienten Keratinozyten. Zudem wurde in NCTC-shAHR und in MNF-behandelten NCTC-EV Zellen eine reduzierte Proliferationsrate gezeigt. Beide Beobachtungen deuten auf eine reduzierte CDK2-Aktivität in den NCTC-shAHR Zellen hin. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wurde in den AHR-defizienten Zellen eine erhöhte Expression des endogenen CDK2-Inhibitor p27^{KIP1} gemessen. Bei der Expression des Inhibitors p21^{CIP1} ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den NCTC-EV und NCTC-shAHR Keratinozyten.

Im Gegensatz zu einer früheren Studie, in der Dioxin die p27^{KIP1}-Expression AHR-abhängig induzierte (Kolluri et al., 1999), wurde kürzlich ebenfalls eine erhöhte basale Expression vom CDK2-Inhibitor in AHR-defizienten HaCaT Keratinozyten und Medulloblastomzellen gezeigt (Dever und Opanashuk, 2012; Kalmes et al., 2011). Dass der konstitutiv aktive AHR die Transkription seiner Zielgene nicht nur induzieren sondern auch hemmen kann, wurde bereits bei der Expression von c-myc (Yang et al., 2005) und Smoc2 (Liu et al., 2009) beobachtet. Die proliferationshemmenden und pro-apoptotischen Eigenschaften vom AHR-Inhibitor EGCG wurden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit bereits in

früheren Studien mit einer erhöhten Expression von p27^{KIP1} in Verbindung gebracht (Gupta et al., 2003; Nihal et al., 2005).

Diese Literaturangaben zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass der AHR an der Regulation von E2F1 beteiligt ist und dass dieser Prozess über die basale Expression von p27^{KIP1} vermittelt wird (vgl. Abbildung 32). Der genaue molekulare Mechanismus der AHR-abhängigen Regulation des endogenen CDK2-Inhibitors bleibt jedoch zunächst unbekannt. Der AHR könnte sich auf die Stabilität der p27^{KIP1}-mRNA und/oder des p27^{KIP1}-Proteins auswirken oder die Promotoraktivität des Inhibitors reduzieren. Alternativ könnte der AHR die Expression des Transkriptionsfaktors Hes1 induzieren (Thomsen et al., 2004), der bereits als negativer Regulator der p27^{KIP1}-Expression beschrieben wurde (Murata et al., 2005). Die Aufklärung des Regulationsmechanismus sollte die Aufgabe zukünftiger Studien sein.

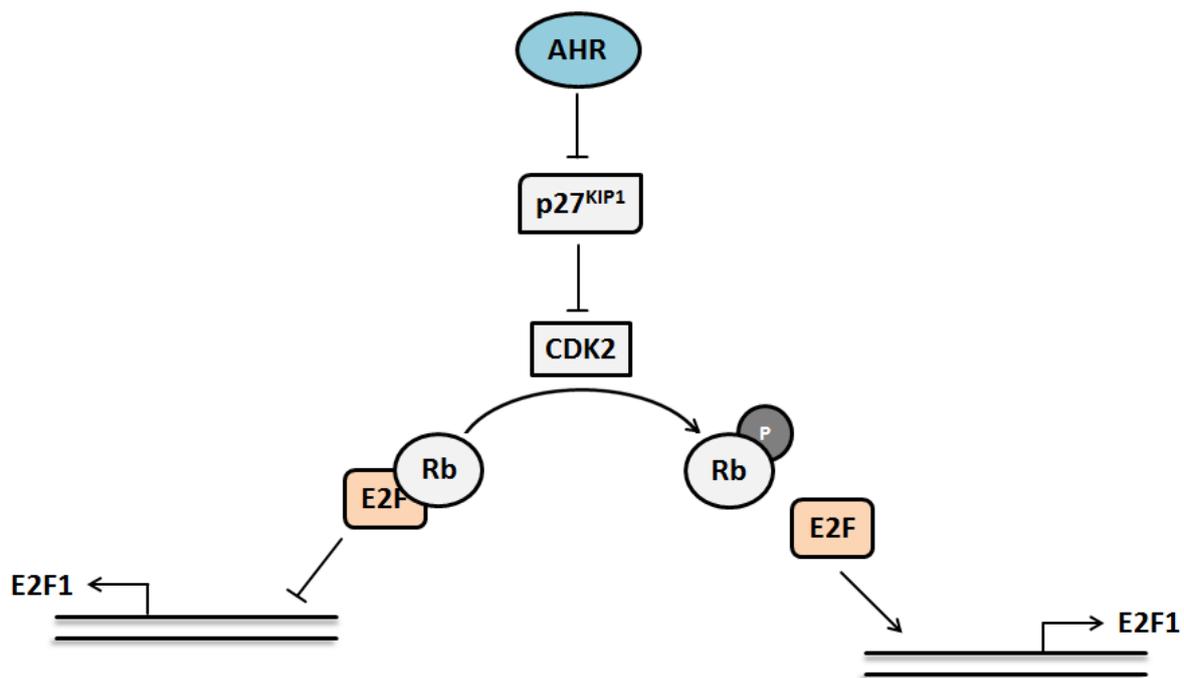


Abbildung 32: AHR-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors E2F1 in NCTC Keratinozyten.

Die E2F1-Transkription wird über die Aktivität der E2F-Familie auto-reguliert und kann auf diese Weise entweder induziert oder gehemmt werden. Der AHR hemmt die Expression von p27^{KIP1}, welches als ein natürlicher CDK2-Inhibitor beschrieben ist. CDK2 phosphoryliert Rb und führt so zur Dissoziation des E2F/Rb-Komplex. E2F in freier Form ist als Transkriptionsfaktor aktiv. AHR, Arylhydrokarbon Rezeptor; CDK2, Cyclin-abhängige Kinase 1; Rb, Retinoblastom-Protein; P, Phosphorylierung.

4.4 Ausblick: Der AHR als ein neuer Angriffspunkt für Chemoprävention und Chemosensibilisierung?

Die Apoptose ist eine wichtige Strategie, Zellen mit geschädigter DNA zu eliminieren. Es ist bekannt, dass unkontrolliertes Zellwachstum, was durch Defekte in der Zellzyklusregulation und im Apoptosemechanismus hervorgerufen werden kann, für die Entstehung von Krebserkrankungen, einschließlich Hautkrebs, verantwortlich ist. Eine Induktion der Apoptose kann die Beseitigung der geschädigten Zellen erhöhen und damit die Initiation der Krebsentstehung hemmen (Chemoprävention). Außerdem kann die Apoptoseresistenz von bereits mutierten Tumorzellen überbrückt werden (Chemosensibilisierung) (Johnstone et al., 2002).

Dass der AHR Tumor-relevante Prozesse beeinflusst und damit eine wichtige pathophysiologische Rolle in der Tumorbilogie spielt, ist schon länger bekannt. So sind beispielsweise AHR-defiziente Mäuse vor der Kanzerogenität von PAKs geschützt (Nakatsuru et al., 2004; Shimizu et al., 2000). Eine Überexpression des AHR induziert dagegen die Kanzerogenese in diversen Organen (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004). In vielen Krebsarten wird eine erhöhte AHR-Expression vorgefunden (Hayashibara et al., 2003; Koliopanos et al., 2002; Pinpin et al., 2003; Schlezinger et al., 2006). Und erst kürzlich wurde eine konstant hohe AHR-Aktivität aufgrund eines endogenen Liganden in humanen Hirntumoren beobachtet (Opitz et al., 2011).

An NMSC, wie Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom, erkranken in Deutschland jährlich 198.000 Menschen (Deutsche Krebshilfe e.V., 2012). Für eine primäre Prävention dieser UV-induzierten Erkrankung wurde sich um eine Aufklärung über die schädlichen Effekte der im Sonnenlicht enthaltenen UV-Strahlung, über die Notwendigkeit übermäßiges Sonnenbaden zu vermeiden und über die Benutzung von Sonnenschutzmitteln bemüht. Jedoch stoßen diese Präventionsstrategien an ihre Grenzen und neue Ansatzpunkte sind erforderlich, um die Entstehung von UV-induzierten Hauterkrankungen zu verhindern. Eine solche Vorgehensweise wäre die Chemoprävention, welche die Entstehung der Erkrankung durch die topische oder orale Verabreichung von nicht-toxischen Verbindungen komplett vermeidet oder verlangsamt (Afaq et al., 2005).

In einem SKH-1 *hairless* Mausmodell, mit hohem Risiko für die Ausbildung von Hauttumoren, wurde von Aziz et al. die chemopräventive Wirkung von Resveratrol untersucht. Dabei

wurden die Mäuse entweder 30 Minuten vor oder 5 Minuten nach einer UVB-Bestrahlung mit dem AHR-Antagonisten topisch behandelt. Es wurde über einen Zeitraum von 28 Wochen zweimal pro Woche bestrahlt und 24 Stunden nach der letzten Bestrahlungseinheit wurden die Mäuse für die Untersuchungen getötet. Resveratrol führte zu einer signifikant reduzierten Tumorzinzidenz und zu einem verzögerten Auftreten der Tumore. Dabei war es egal, ob die Mäuse vor oder nach der Bestrahlung mit dem AHR-Antagonisten behandelt wurden, somit konnte eine Absorption der Strahlen durch Resveratrol (Sonnenschutz Effekt) ausgeschlossen werden (Aziz et al., 2005). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei lokaler Anwendung von Apigenin, ebenfalls ein AHR-Antagonist, beobachtet (Amakura et al., 2003; Birt et al., 1997). Unter Berücksichtigung, dass Koffein die CHK1-Aktivität hemmt, ist der epidemiologische Zusammenhang zwischen hohem Konsum von koffeinhaltigen Getränken und niedriger NMSC-Rate äußerst interessant (Abel et al., 2007; Hakim et al., 2000; Jacobsen et al., 1986; Rees et al., 2007). In einer Studie von Lu et al. wurden die chemopräventiven Effekte von Koffein bzw. koffeinhaltigen Getränken bei UV-Bestrahlung von SKH-1 *hairless* Mäusen auf eine Erhöhung der Anzahl an apoptotischen *sunburn cells* zurückgeführt (Lu et al., 2000). Die in dieser Arbeit beobachtete AHR-vermittelte CHK1-Inhibierung könnte ein ähnliches chemopräventives Potential entfalten. Da AHR-defiziente NCTC Keratinozyten eine erhöhte UVB-induzierte Apoptoserate aufweisen, könnte eine transiente Hemmung des AHR, besonders zu Zeiten hoher UV-Exposition, hinsichtlich der NMSC-Prävention von Vorteil sein.

E2F1 und CHK1 sind bereits wichtige und gebräuchliche Zielstrukturen in der Tumorthherapie, um die Zytotoxizität von genotoxischen Chemotherapeutika zu erhöhen (Bartek und Lukas, 2003; Bell und Ryan, 2004; Zhou und Bartek, 2004). Da eine Hemmung des AHR zur reduzierten E2F1- und CHK1-Expression in NCTC Keratinozyten führte, könnte dieser Transkriptionsfaktor nun ein neuer Angriffspunkt sein, um Tumorzellen verstärkt zu eliminieren. Diese Hypothese wird durch eine Kanzerogenese-Studie in Mäusen unterstützt. Bei dieser Untersuchung von Lu et al. wurden SKH-1 *hairless* Mäuse zweimal pro Woche für 20 Wochen mit UVB bestrahlt. Die SKH-1 *hairless* Mäuse haben nach dieser Bestrahlungsepisode ein sehr hohes Risiko, einen Hauttumor zu entwickeln. Im Folgenden wurden die Mäuse mit Koffein oder EGCG für weitere 18 Wochen behandelt. Sowohl der CHK1-Inhibitor Koffein als auch der AHR-Inhibitor EGCG erhöhten signifikant die Anzahl an apoptotischen Zellen in den Hauttumoren. In tumorfreien Hautbereichen wurde dagegen

kein Effekt auf die Apoptose beobachtet (Lu et al., 2002b). Eine besonders hohe Transkription von E2F1 und CHK1 wurde in gering differenzierten, malignen Brustkrebszellen gemessen (Verlinden et al., 2007). Ebenso wurde ein hohes Niveau an konstitutiv aktivem AHR in Tumorzellen der Brustdrüse beobachtet (Schlezinger et al., 2006). Weiterhin führte eine Überexpression des AHR zur malignen Transformation von humanen epithelialen Brustzellen (Brooks und Eltom, 2011) und der AHR begünstigte zusätzlich eine Tamoxifen-Resistenz von Brustkrebszellen (Dubrovskaja et al., 2012). In einer klinischen Studie an Lungenkrebspatienten korrelierte eine erhöhte p27^{KIP1}-Expression mit einem guten Erfolg einer Platin-basierten Chemotherapie (Oshita et al., 2000). Ein, wie in der vorliegenden Arbeit beobachteter, p27^{KIP1}-vermittelter Effekt auf die E2F1-Transkription, könnte in dieser Studie zu den positiven Auswirkungen auf den Behandlungserfolg beigetragen haben.

All diese Beobachtungen zeigen, dass die in dieser Arbeit identifizierte AHR-E2F1-CHK1-Verbindung eine wichtige Rolle für das Überleben und die Progression von Tumorzellen spielen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss des AHR auf die chemotherapeutische Wirkung von 5-FU bei der epithelialen Tumorzelllinie A431 untersucht. 5-FU wird aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen in die DNA und RNA eingebaut. Es hemmt die Thymidylat-Synthase, welche essentiell für die DNA-Synthese ist. Aufgrund einer unterbrochenen Proteinsynthese kommt es schließlich zum Tod der Zelle. Diese Wirkungen sind besonders deutlich in atypischen und schnell proliferierenden Zellen und scheinen hauptsächlich für die chemotherapeutischen Effekte des 5-FU verantwortlich zu sein (Desai et al., 2012; Goette, 1981). Wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Behandlung der A431 Zellen mit 5-FU gleichzeitig die AHR-Aktivität durch MNF inhibiert, konnte eine höhere Apoptoserate erreicht werden, als durch die 5-FU-Behandlung allein. Eine Hemmung des AHR-Signalweges scheint daher von Vorteil zu sein, um die Effektivität des Chemotherapeutikums zu erhöhen. Diese Beobachtung könnte zur Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien bei NMSC beitragen. In zukünftigen Untersuchungen sollte die Wirkung weiterer AHR-Antagonisten auf das Überleben von Tumorzellen unter genotoxischem Stress charakterisiert werden. Weiterhin sollte sich eine *in-vivo* Kanzerogenese-Studie anschließen, um die physiologische Relevanz zu bestätigen.

Erwähnenswert ist, dass sowohl in Melanozyten als auch in Melanom-Zellen ein funktioneller AHR-Signalweg beschrieben wurde (Jux et al., 2011; Luecke et al., 2010;

O'Donnell et al., 2012). Es wäre daher interessant zu prüfen, ob die in dieser Arbeit identifizierte anti-apoptotische Funktion des AHR auch für die Entstehung von malignen Melanomen von Bedeutung sein könnte.

Literatur

Abel, E.L., Hendrix, S.O., McNeeley, S.G., Johnson, K.C., Rosenberg, C.A., Mossavar-Rahmani, Y., Vitols, M., und Kruger, M. (2007). Daily coffee consumption and prevalence of nonmelanoma skin cancer in Caucasian women. *Eur. J. Cancer Prev.* 16, 446-452.

Abel, J. und Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.* 391, 1235-1248.

Afaq, F., Adhami, V.M., und Mukhtar, H. (2005). Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 571, 153-173.

Agostinis, P., Garmyn, M., und Van Laethem, A. (2007). The Aryl hydrocarbon receptor: an illuminating effector of the UVB response. *Sci. STKE.* 2007, e49.

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Yoshida, T., und Maitani, T. (2003). Screening of the inhibitory effect of vegetable constituents on the aryl hydrocarbon receptor-mediated activity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1754-1760.

Ananthaswamy, H.N. und Pierceall, W.E. (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 52, 1119-1136.

Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A., und Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9990-9995.

Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T.A., und Schwarz, T. (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* 140, 171-182.

Ashkenazi, A. und Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Autier, P., Dore, J.F., Reis, A.C., Grivegnee, A., Ollivaud, L., Truchetet, F., Chamoun, E., Rotmensz, N., Severi, G., und Cesarini, J.P. (2000). Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind randomized trial using personal dosimeters. *Br. J. Cancer* 83, 1243-1248.

Aziz, M.H., Reagan-Shaw, S., Wu, J., Longley, B.J., und Ahmad, N. (2005). Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J.* 19, 1193-1195.

Bartek, J. und Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.

Bell, L.A. und Ryan, K.M. (2004). Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death. Differ.* 11, 137-142.

Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Jordanov, M., Herrlich, P., und Rahmsdorf, H.J. (1997). UV-induced signal transduction. *J. Photochem. Photobiol. B* 37, 1-17.

Berneburg, M. und Krutmann, J. (2000). Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B* 54, 87-93.

- Birt,D.F., Mitchell,D., Gold,B., Pour,P., und Pinch,H.C. (1997). Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res.* 17, 85-91.
- Black,H.S. (2004). Reassessment of a free radical theory of cancer with emphasis on ultraviolet carcinogenesis. *Integr. Cancer Ther.* 3, 279-293.
- Bock,K.W. (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 125, 1-42.
- Bock,K.W. und Köhle,C. (2009). The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver. *Biol. Chem.* 390, 1225-1235.
- Bothe,H., Gotz,C., Stobbe-Maicherski,N., Fritsche,E., Abel,J., und Haarmann-Stemmann,T. (2010). Luteolin enhances the bioavailability of benzo(a)pyrene in human colon carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 498, 111-118.
- Brash,D.E. und Ponten,J. (1998). Skin precancer. *Cancer Surv.* 32, 69-113.
- Brash,D.E., Ziegler,A., Jonason,A.S., Simon,J.A., Kunala,S., und Leffell,D.J. (1996). Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1, 136-142.
- Brazelle,W., Kreaehling,J.M., Gemmer,J., Ma,Y., Cress,W.D., Haura,E., und Altiok,S. (2010). Histone deacetylase inhibitors downregulate checkpoint kinase 1 expression to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *PLoS. One.* 5, e14335.
- Brooks,J. und Eltom,S.E. (2011). Malignant transformation of mammary epithelial cells by ectopic overexpression of the aryl hydrocarbon receptor. *Curr. Cancer Drug Targets.* 11, 654-669.
- Campbell,C., Quinn,A.G., Angus,B., Farr,P.M., und Rees,J.L. (1993). Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res.* 53, 2697-2699.
- Cao,G., Chen,M., Song,Q., Liu,Y., Xie,L., Han,Y., Liu,Z., Ji,Y., und Jiang,Q. (2012). EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK1/c-Jun pathway in ARPE19 cells. *Mol. Med. Report.* 5, 54-59.
- Carrassa,L., Brogginini,M., Vikhanskaya,F., und Damia,G. (2003). Characterization of the 5'flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *Cell Cycle* 2, 604-609.
- Catalano,R.D., Yanaihara,A., Evans,A.L., Rocha,D., Prentice,A., Saidi,S., Print,C.G., Charnock-Jones,D.S., Sharkey,A.M., und Smith,S.K. (2003). The effect of RU486 on the gene expression profile in an endometrial explant model. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 465-473.
- Chen,P.H., Chang,H., Chang,J.T., und Lin,P. (2011). Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. *Oncogene.*
- Cho,S.H., Toouli,C.D., Fujii,G.H., Crain,C., und Parry,D. (2005). Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* 4, 131-139.
- Chopra,M., Dharmarajan,A.M., Meiss,G., und Schrenk,D. (2009). Inhibition of UV-C Light-Induced Apoptosis in Liver Cells by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin. *Toxicological Sciences* 111, 49-63.

- Christensen,J., Cloos,P., Toftegaard,U., Klinkenberg,D., Bracken,A.P., Trinh,E., Heeran,M., Di,S.L., and Helin,K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res.* 33, 5458-5470.
- Ciolino,H.P., Daschner,P.J., Wang,T.T., und Yeh,G.C. (1998). Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 56, 197-206.
- Ciolino,H.P., Daschner,P.J., und Yeh,G.C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* 340 (Pt 3), 715-722.
- Ciolino,H.P. und Yeh,G.C. (1999). Inhibition of aryl hydrocarbon-induced cytochrome P-450 1A1 enzyme activity and CYP1A1 expression by resveratrol. *Mol. Pharmacol.* 56, 760-767.
- Delescluse,C., Ledirac,N., Li,R., Piechocki,M.P., Hines,R.N., Gidrol,X., und Rahmani,R. (2001). Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochem. Pharmacol.* 61, 399-407.
- Denis,M., Cuthill,S., Wikstrom,A.C., Poellinger,L., und 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.
- Denison,M.S. und Nagy,S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309-334.
- Desai,T., Chen,C.L., Desai,A., und Kirby,W. (2012). Basic pharmacology of topical imiquimod, 5-fluorouracil, and diclofenac for the dermatologic surgeon. *Dermatol. Surg.* 38, 97-103.
- Deutsche Krebshilfe e.V. Hautkrebs. <http://www.krebshilfe.de/gesundheitsfoerderung-hautkrebs.html> . 2012. 29-9-2012.
- Dever,D.P. und Opanashuk,L.A. (2012). The aryl hydrocarbon receptor contributes to the proliferation of human medulloblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 81, 669-678.
- Dinatale,B.C., Schroeder,J.C., und Perdew,G.H. (2011). Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* 50, 173-183.
- DiNatale,B.C., Murray,I.A., Schroeder,J.C., Flaveny,C.A., Lahoti,T.S., Laurenzana,E.M., Omiecinski,C.J., und Perdew,G.H. (2010). Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences* 115, 89-97.
- Dohr,O., Vogel,C., und Abel,J. (1995). Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 321, 405-412.
- Dolwick,K.M., Schmidt,J.V., Carver,L.A., Swanson,H.I., und Bradfield,C.A. (1993). Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 44, 911-917.
- Dong,B. und Matsumura,F. (2009). The conversion of rapid TCDD nongenomic signals to persistent inflammatory effects via select protein kinases in MCF10A cells. *Mol. Endocrinol.* 23, 549-558.

- Dubrovskaja, A., Hartung, A., Bouchez, L.C., Walker, J.R., Reddy, V.A., Cho, C.Y., und Schultz, P.G. (2012). CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *Br. J. Cancer*.
- Enan, E. und 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.
- Everett, M.A., Yeagers, E., Sayre, R.M., und Olson, R.L. (1966). Penetration of epidermis by ultraviolet rays. *Photochem. Photobiol.* 5, 533-542.
- Fan, Y., Boivin, G.P., Knudsen, E.S., Nebert, D.W., Xia, Y., und Puga, A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 70, 212-220.
- Farber, J.L. (1994). Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 10, 17-24.
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., und Gonzalez, F.J. (1996). Arylhydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 173-179.
- Fernandez-Soria, V., Leonart, M.E., Diaz-Fuertes, M., Villuendas, R., Sanchez-Prieto, R., Fabra, A., und Ramon, Y.C. (2006). Adenovirus E1A orchestrates the urokinase-plasminogen activator system and upregulates PAI-2 expression, supporting a tumor suppressor effect. *Int. J. Oncol.* 28, 143-148.
- Fritsche, E., Cline, J.E., Nguyen, N.H., Scanlan, T.S., und Abel, J. (2005). Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ. Health Perspect.* 113, 871-876.
- 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., und 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.
- Ganzinelli, M., Carrassa, L., Crippa, F., Tavecchio, M., Broggin, M., und Damia, G. (2008). Checkpoint kinase 1 down-regulation by an inducible small interfering RNA expression system sensitized in vivo tumors to treatment with 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 14, 5131-5141.
- Gelardi, A., Morini, F., Dusatti, F., Penco, S., und Ferro, M. (2001). Induction by xenobiotics of phase I and phase II enzyme activities in the human keratinocyte cell line NCTC 2544. *Toxicol. In Vitro* 15, 701-711.
- Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J.E., Alworth, W.L., Slaga, T.J., und Kumar, A.P. (2005). Eugenol Causes Melanoma Growth Suppression through Inhibition of E2F1 Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* 280, 5812-5819.
- Goette, D.K. (1981). Topical chemotherapy with 5-fluorouracil. A review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 4, 633-649.
- Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., T'kint de, R.C., Gilson, E., Malaquin, N., Wernert, N., Slijepcevic, P., Ashtari, M., Chelli, F., Deruy, E., Vandebunder, B., De, L.Y., und Abbadie, C. (2009). Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res.* 69, 7917-7925.

- Grandjean-Laquerriere,A., Antonicelli,F., Gangloff,S.C., Guenounou,M., und Le Naour,R. (2007). UVB-induced IL-18 production in human keratinocyte cell line NCTC 2544 through NF-kappaB activation. *Cytokine* 37, 76-83.
- Grandjean-Laquerriere,A., Gangloff,S.C., Le,N.R., Trentesaux,C., Hornebeck,W., und Guenounou,M. (2002). Relative contribution of NF-kappaB and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine* 18, 168-177.
- Gu,Y.Z., Hogenesch,J.B., und Bradfield,C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 519-561.
- Guo,Y., Xu,F., Lu,T., Duan,Z., und Zhang,Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat. Rev.* 38, 904-910.
- Gupta,S., Hussain,T., und Mukhtar,H. (2003). Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 410, 177-185.
- Haarmann-Stemmann,T., Abel,J., Fritsche,E., und Krutmann,J. (2012). The AhR-Nrf2 pathway in keratinocytes: on the road to chemoprevention? *J Invest Dermatol* 132, 7-9.
- Haarmann-Stemmann,T., Bothe,H., und Abel,J. (2009). Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 508-520.
- Haarmann-Stemmann,T., Bothe,H., Kohli,A., Sydlik,U., Abel,J., und Fritsche,E. (2007). Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. *Drug Metab Dispos.* 35, 2262-2269.
- Haarmann-Stemmann,T., Sendker,J., Gotz,C., Krug,N., Bothe,H., Fritsche,E., Proksch,P., und Abel,J. (2010). Regulation of dioxin receptor function by different beta-carboline alkaloids. *Arch. Toxicol.* 84, 619-629.
- Hahn,M.E., Allan,L.L., und Sherr,D.H. (2009). Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.* 77, 485-497.
- Hakim,I.A., Harris,R.B., und Weisgerber,U.M. (2000). Tea intake and squamous cell carcinoma of the skin: influence of type of tea beverages. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 727-731.
- Harrigan,J.A., McGarrigle,B.P., Sutter,T.R., und Olson,J.R. (2006). Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro* 20, 426-438.
- Hayashibara,T., Yamada,Y., Mori,N., Harasawa,H., Sugahara,K., Miyanishi,T., Kamihira,S., und Tomonaga,M. (2003). Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 128-134.
- Heffernan,T.P., Kawasumi,M., Blasina,A., Anderes,K., Conney,A.H., und Nghiem,P. (2009). ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV treatment in primary human keratinocytes: potential basis for the UV protective effects of caffeine. *J. Invest Dermatol.* 129, 1805-1815.

- Hennig,B., Meerarani,P., Slim,R., Toborek,M., Daugherty,A., Silverstone,A.E., und Robertson,L.W. (2002). Proinflammatory properties of coplanar PCBs: in vitro and in vivo evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *181*, 174-183.
- Herrlich,P., Karin,M., und Weiss,C. (2008). Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Mol. Cell* *29*, 279-290.
- Hibino,T., Matsuda,Y., Takahashi,T., und Goetinck,P.F. (1999). Suppression of keratinocyte proliferation by plasminogen activator inhibitor-2. *J. Invest Dermatol.* *112*, 85-90.
- Hill,L.L., Ouhtit,A., Loughlin,S.M., Kripke,M.L., Ananthaswamy,H.N., und Owen-Schaub,L.B. (1999). Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* *285*, 898-900.
- Hoejberg,L., Bastholt,L., und Schmidt,H. (2012). Interleukin-6 and melanoma. *Melanoma Res.* *22*, 327-333.
- Hollingshead,B.D., Beischlag,T.V., DiNatale,B.C., Ramadoss,P., und Perdew,G.H. (2008). Inflammatory Signaling and Aryl Hydrocarbon Receptor Mediate Synergistic Induction of Interleukin 6 in MCF-7 Cells. *Cancer Research* *68*, 3609-3617.
- Hu,Y., Benedict,M.A., Ding,L., und Nunez,G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* *18*, 3586-3595.
- Huang,Q., Cheung,A.P., Zhang,Y., Huang,H.F., Auersperg,N., und Leung,P.C. (2009). Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *296*, E1344-E1353.
- Ihm,C.G., Park,J.K., Kim,H.J., Lee,T.W., und Cha,D.R. (2002). Effects of high glucose on interleukin-6 production in human mesangial cells. *J. Korean Med. Sci.* *17*, 208-212.
- Ikuta,T., Eguchi,H., Tachibana,T., Yoneda,Y., und Kawajiri,K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 2895-2904.
- Jacobsen,B.K., Bjelke,E., Kvale,G., und Heuch,I. (1986). Coffee drinking, mortality, and cancer incidence: results from a Norwegian prospective study. *J. Natl. Cancer Inst.* *76*, 823-831.
- Jain,S. (2012). Basic Science and Immunology. In *Dermatology: Illustrated Study Guide and Comprehensive Board Review*, Springer; 2012 edition (March 29, 2012), pp. 1-16.
- Jana,N.R., Sarkar,S., Ishizuka,M., Yonemoto,J., Tohyama,C., und Sone,H. (2000). Comparative effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on MCF-7, RL95-2, and LNCaP cells: role of target steroid hormones in cellular responsiveness to CYP1A1 induction. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* *4*, 174-180.
- Jensen,P. (1997). Structure and function of plasminogen activator inhibitor-2. *Int. J. Oncol.* *11*, 557-570.
- Jiang,W., Ananthaswamy,H.N., Muller,H.K., und Kripke,M.L. (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* *18*, 4247-4253.
- Johnson,C., Han,Y., Hughart,N., McCarra,J., Alpini,G., und Meng,F. (2012). Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl. Gastrointest. Cancer* *1*, 58-70.
- Johnson,D.G., Ohtani,K., und Nevins,J.R. (1994). Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* *8*, 1514-1525.

- Johnstone,R.W., Ruefli,A.A., und Lowe,S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.
- Jonason,A.S., Kunala,S., Price,G.J., Restifo,R.J., Spinelli,H.M., Persing,J.A., Leffell,D.J., Tarone,R.E., und Brash,D.E. (1996). Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 14025-14029.
- Jux,B., Kadow,S., Luecke,S., Rannug,A., Krutmann,J., und Esser,C. (2011). The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J. Invest Dermatol.* 131, 203-210.
- Kalmes,M., Hennen,J., Clemens,J., und Blomeke,B. (2011). Impact of aryl hydrocarbon receptor (AhR) knockdown on cell cycle progression in human HaCaT keratinocytes. *Biol. Chem.* 392, 643-651.
- Katiyar,S.K., Matsui,M.S., und Mukhtar,H. (2000). Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1. *J. Invest Dermatol.* 114, 328-333.
- Kawahara,M., Hori,T., Chonabayashi,K., Oka,T., Sudol,M., und Uchiyama,T. (2008). Kpm/Lats2 is linked to chemosensitivity of leukemic cells through the stabilization of p73. *Blood* 112, 3856-3866.
- Kazlauskas,A., Poellinger,L., und Pongratz,I. (1999). Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 13519-13524.
- Kim,D.W., Gazourian,L., Quadri,S.A., Romieu-Mourez,R., Sherr,D.H., und Sonenshein,G.E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498-5506.
- Kina,S., Nakasone,T., Takemoto,H., Matayoshi,A., Makishi,S., Sunagawa,N., Liang,F., Phonaphonh,T., und Sunakawa,H. (2009). Regulation of chemokine production via oxidative pathway in HeLa cells. *Mediators. Inflamm.* 2009, 183760.
- Kirnbauer,R., Kock,A., Neuner,P., Forster,E., Krutmann,J., Urbanski,A., Schauer,E., Ansel,J.C., Schwarz,T., und Luger,T.A. (1991). Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J. Invest Dermatol.* 96, 484-489.
- Ko,H.P., Okino,S.T., Ma,Q., und Whitlock,J.P., Jr. (1997). Transactivation domains facilitate promoter occupancy for the dioxin-inducible CYP1A1 gene in vivo. *Mol. Cell Biol.* 17, 3497-3507.
- Köhle,C., Gschaidmeier,H., Lauth,D., Topell,S., Zitzer,H., und Bock,K.W. (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Arch. Toxicol.* 73, 152-158.
- Koliopanos,A., Kleeff,J., Xiao,Y., Safe,S., Zimmermann,A., Buchler,M.W., und Friess,H. (2002). Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Oncogene* 21, 6059-6070.
- Kolluri,S.K., Weiss,C., Koff,A., und Gottlicher,M. (1999). p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* 13, 1742-1753.
- Kondo,S., Kono,T., Sauder,D.N., und McKenzie,R.C. (1993). IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. *J. Invest Dermatol.* 101, 690-694.

- Koo,S.W., Hirakawa,S., Fujii,S., Kawasumi,M., und Nghiem,P. (2007). Protection from photodamage by topical application of caffeine after ultraviolet irradiation. *Br. J. Dermatol.* *156*, 957-964.
- Kraemer,K.H. (1997). Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 11-14.
- Kruithof,E.K., Baker,M.S., und Bunn,C.L. (1995). Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* *86*, 4007-4024.
- Krutmann,J., Morita,A., und Chung,J.H. (2012). Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J. Invest Dermatol.* *132*, 976-984.
- Kulms,D., Poppelmann,B., Yarosh,D., Luger,T.A., Krutmann,J., und Schwarz,T. (1999). Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 7974-7979.
- Kulms,D. und Schwarz,T. (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *16*, 195-201.
- Kulms,D. und Schwarz,T. (2002). Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 837-841.
- Lee,J. und Kim,S.S. (2009). The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp. Mol. Med.* *41*, 765-771.
- Li,W., Vogel,C.F., Wu,D., und Matsumura,F. (2010). Non-genomic action of TCDD to induce inflammatory responses in HepG2 human hepatoma cells and in liver of C57BL/6J mice. *Biol. Chem.* *391*, 1205-1219.
- Liu,P., Pazin,D.E., Merson,R.R., Albrecht,K.H., und Vaziri,C. (2009). The developmentally-regulated Smoc2 gene is repressed by Aryl-hydrocarbon receptor (Ahr) signaling. *Gene* *433*, 72-80.
- Lu,Y.F., Santostefano,M., Cunningham,B.D., Threadgill,M.D., und 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.
- Lu,Y.P., Lou,Y.R., Li,X.H., Xie,J.G., Brash,D., Huang,M.T., und Conney,A.H. (2000). Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21(WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer Res.* *60*, 4785-4791.
- Lu,Y.P., Lou,Y.R., Li,X.H., Xie,J.G., Lin,Y., Shih,W.J., und Conney,A.H. (2002a). Stimulatory effect of topical application of caffeine on UVB-induced apoptosis in mouse skin. *Oncol. Res.* *13*, 61-70.
- Lu,Y.P., Lou,Y.R., Xie,J.G., Peng,Q.Y., Liao,J., Yang,C.S., Huang,M.T., und Conney,A.H. (2002b). Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 12455-12460.
- Luecke,S., Backlund,M., Jux,B., Esser,C., Krutmann,J., und Rannug,A. (2010). The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 828-833.

- Luo,D., Min,W., Lin,X.F., Wu,D., Xu,Y., und Miao,X. (2006). Effect of epigallocatechingallate on ultraviolet B-induced photo-damage in keratinocyte cell line. *Am. J. Chin Med.* 34, 911-922.
- Luo,Y., Rockow-Magnone,S.K., Kroeger,P.E., Frost,L., Chen,Z., Han,E.K., Ng,S.C., Simmer,R.L., und Giranda,V.L. (2001). Blocking Chk1 expression induces apoptosis and abrogates the G2 checkpoint mechanism. *Neoplasia.* 3, 411-419.
- Ma,Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 125, 376-393.
- Ma,Q. und Whitlock,J.P., Jr. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 272, 8878-8884.
- Marlowe,J.L., Fan,Y., Chang,X., Peng,L., Knudsen,E.S., Xia,Y., und Puga,A. (2008). The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 19, 3263-3271.
- Marrot,L. und Meunier,J.R. (2008). Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58, S139-S148.
- Martin,A., Odajima,J., Hunt,S.L., Dubus,P., Ortega,S., Malumbres,M., und Barbacid,M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* 7, 591-598.
- Matikainen,T., Perez,G.I., Jurisicova,A., Pru,J.K., Schlezinger,J.J., Ryu,H.Y., Laine,J., Sakai,T., Korsmeyer,S.J., Casper,R.F., Sherr,D.H., und Tilly,J.L. (2001). Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat. Genet.* 28, 355-360.
- Matsumura,Y. und Ananthaswamy,H.N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 298-308.
- Merk,H.F., Abel,J., Baron,J.M., und Krutmann,J. (2004). Molecular pathways in dermatotoxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 267-277.
- Mimura,J., Yamashita,K., Nakamura,K., Morita,M., Takagi,T.N., Nakao,K., Ema,M., Sogawa,K., Yasuda,M., Katsuki,M., und Fujii-Kuriyama,Y. (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.
- Moennikes,O., Loeppen,S., Buchmann,A., Andersson,P., Ittrich,C., Poellinger,L., und Schwarz,M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 64, 4707-4710.
- Mukaida,N., Mahe,Y., und Matsushima,K. (1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265, 21128-21133.
- Murata,K., Hattori,M., Hirai,N., Shinozuka,Y., Hirata,H., Kageyama,R., Sakai,T., und Minato,N. (2005). Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Mol. Cell Biol.* 25, 4262-4271.

- Nakatsuru,Y., Wakabayashi,K., Fujii-Kuriyama,Y., Ishikawa,T., Kusama,K., und Ide,F. (2004). Dibenzo[A,L]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Int. J. Cancer* *112*, 179-183.
- Nebert,D.W. und Karp,C.L. (2008). Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology. *J. Biol. Chem.* *283*, 36061-36065.
- Neuman,E., Flemington,E.K., Sellers,W.R., und Kaelin,W.G., Jr. (1994). Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol. Cell Biol.* *14*, 6607-6615.
- Nguyen,T.H. und Ho,D.Q. (2002). Nonmelanoma skin cancer. *Curr. Treat. Options. Oncol.* *3*, 193-203.
- Nihal,M., Ahmad,N., Mukhtar,H., und Wood,G.S. (2005). Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int. J. Cancer* *114*, 513-521.
- Nishimura,N., Tohyama,C., Satoh,M., Nishimura,H., und Reeve,V.E. (1999). Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice. *Immunology* *97*, 77-83.
- Nomura,M., Nomura,N., und Yamashita,J. (2005). Geldanamycin-induced degradation of Chk1 is mediated by proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *335*, 900-905.
- O'Donnell,E.F., Kopparapu,P.R., Koch,D.C., Jang,H.S., Phillips,J.L., Tanguay,R.L., Kerkvliet,N.I., und Kolluri,S.K. (2012). The aryl hydrocarbon receptor mediates leflunomide-induced growth inhibition of melanoma cells. *PLoS. One.* *7*, e40926.
- Obara,Y., Kurose,H., und Nakahata,N. (2005). Thromboxane A2 promotes interleukin-6 biosynthesis mediated by an activation of cyclic AMP-response element-binding protein in 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.* *68*, 670-679.
- Oesch-Bartlomowicz,B., Huelster,A., Wiss,O., Antoniou-Lipfert,P., Dietrich,C., Arand,M., Weiss,C., Bockamp,E., und Oesch,F. (2005). Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 9218-9223.
- Oesch-Bartlomowicz,B. und Oesch,F. (2009). Role of cAMP in mediating AHR signaling. *Biochem. Pharmacol.* *77*, 627-641.
- Omicinski,C.J., Redlich,C.A., und Costa,P. (1990). Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* *50*, 4315-4321.
- Opitz,C.A., Litzenburger,U.M., Sahm,F., Ott,M., Tritschler,I., Trump,S., Schumacher,T., Jestaedt,L., Schrenk,D., Weller,M., Jugold,M., Guillemain,G.J., Miller,C.L., Lutz,C., Radlwimmer,B., Lehmann,I., von,D.A., Wick,W., und Platten,M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* *478*, 197-203.
- Oshita,F., Kameda,Y., Nishio,K., Tanaka,G., Yamada,K., Nomura,I., Nakayama,H., und Noda,K. (2000). Increased expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 correlate with good responses to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* *7*, 491-495.

- Palermo,C.M., Westlake,C.A., und Gasiewicz,T.A. (2005). Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry* 44, 5041-5052.
- Park,K.T., Mitchell,K.A., Huang,G., und Elferink,C.J. (2005). The Aryl Hydrocarbon Receptor Predisposes Hepatocytes to Fas-Mediated Apoptosis. *Molecular Pharmacology* 67, 612-622.
- Pentland,A.P., Schoggins,J.W., Scott,G.A., Khan,K.N., und Han,R. (1999). Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* 20, 1939-1944.
- Petit-Frere,C., Capulas,E., Lyon,D.A., Norbury,C.J., Lowe,J.E., Clingen,P.H., Riballo,E., Green,M.H., und Arlett,C.F. (2000). Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis* 21, 1087-1095.
- Pinpin,L., Han,C., Tsai,W.T., Wu,M.H., Liao,Y.S., Chen,J.T., und Su,J.M. (2003). Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas. *Toxicol Pathol* 31, 22-30.
- Podechard,N., Lecureur,V., Le,F.E., Guenon,I., Sparfel,L., Gilot,D., Gordon,J.R., Lagente,V., und Fardel,O. (2008). Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* 177, 130-137.
- Potapovich,A.I., Lulli,D., Fidanza,P., Kostyuk,V.A., De,L.C., Pastore,S., und Korkina,L.G. (2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 138-149.
- Probst,M.R., Reisz-Porszasz,S., Agbunag,R.V., Ong,M.S., und Hankinson,O. (1993). Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol. Pharmacol.* 44, 511-518.
- Puntarulo,S. und Cederbaum,A.I. (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1324-1330.
- Quattrochi,L.C. und Tukey,R.H. (1993). Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Mol. Pharmacol.* 43, 504-508.
- Rannug,A., Rannug,U., Rosenkranz,H.S., Winqvist,L., Westerholm,R., Agurell,E., und 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.
- Rees,J.R., Stukel,T.A., Perry,A.E., Zens,M.S., Spencer,S.K., und Karagas,M.R. (2007). Tea consumption and basal cell and squamous cell skin cancer: results of a case-control study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 56, 781-785.
- Reh fuss,R.P., Walton,K.M., Loriaux,M.M., und Goodman,R.H. (1991). The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 266, 18431-18434.
- Riccardi,C. und Nicoletti,I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1, 1458-1461.

- Rowlands,J.C., McEwan,I.J., und Gustafsson,J.A. (1996). Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Mol. Pharmacol.* *50*, 538-548.
- Schlezinger,J.J., Liu,D., Farago,M., Seldin,D.C., Belguise,K., Sonenshein,G.E., und Sherr,D.H. (2006). A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis. *Biol. Chem.* *387*, 1175-1187.
- Sekine,H., Mimura,J., Oshima,M., Okawa,H., Kanno,J., Igarashi,K., Gonzalez,F.J., Ikuta,T., Kawajiri,K., und Fujii-Kuriyama,Y. (2009). Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol. Cell Biol.* *29*, 6391-6400.
- Sheehan,J.M. und Young,A.R. (2002). The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects. *Photochem. Photobiol. Sci.* *1*, 365-377.
- Shimizu,Y., Nakatsuru,Y., Ichinose,M., Takahashi,Y., Kume,H., Mimura,J., Fujii-Kuriyama,Y., und Ishikawa,T. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 779-782.
- Song,J., Clagett-Dame,M., Peterson,R.E., Hahn,M.E., Westler,W.M., Sicinski,R.R., und DeLuca,H.F. (2002). A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 14694-14699.
- Sorensen,C.S., Syljuasen,R.G., Falck,J., Schroeder,T., Ronnstrand,L., Khanna,K.K., Zhou,B.B., Bartek,J., und Lukas,J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* *3*, 247-258.
- Spyridopoulos,I., Principe,N., Krasinski,K.L., Xu,S.h., Kearney,M., Magner,M., Isner,J.M., und Losordo,D.W. (1998). Restoration of E2F Expression Rescues Vascular Endothelial Cells From Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Apoptosis. *Circulation* *98*, 2883-2890.
- Stewart,M.S., Cameron,G.S., und Pence,B.C. (1996). Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J. Invest Dermatol.* *106*, 1086-1089.
- Strzalka,W. und Ziemienowicz,A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.* *107*, 1127-1140.
- Sutter,T.R., Guzman,K., Dold,K.M., und Greenlee,W.F. (1991). Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* *254*, 415-418.
- Thompson,C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* *267*, 1456-1462.
- Thomsen,J.S., Kietz,S., Strom,A., und Gustafsson,J.A. (2004). HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* *65*, 165-171.
- Tian,Y. (2009). Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochem. Pharmacol.* *77*, 670-680.
- Tse,A.N., Rendahl,K.G., Sheikh,T., Cheema,H., Aardalen,K., Embry,M., Ma,S., Moler,E.J., Ni,Z.J., Lopes de Menezes,D.E., Hibner,B., Gesner,T.G., und Schwartz,G.K. (2007). CHIR-124, a Novel Potent Inhibitor of Chk1, Potentiates the Cytotoxicity of Topoisomerase I Poisons In vitro and In vivo. *Clinical Cancer Research* *13*, 591-602.

- Tsuji,G., Takahara,M., Uchi,H., Takeuchi,S., Mitoma,C., Moroi,Y., und Furue,M. (2011). An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* *62*, 42-49.
- Tu,Y.S., Kang,X.L., Zhou,J.G., Lv,X.F., Tang,Y.B., und Guan,Y.Y. (2011). Involvement of Chk1-Cdc25A-cyclin A/CDk2 pathway in simvastatin induced S-phase cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Eur. J. Pharmacol.* *670*, 356-364.
- Urbanski,A., Schwarz,T., Neuner,P., Krutmann,J., Kirnbauer,R., Kock,A., und Luger,T.A. (1990). Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J. Invest Dermatol.* *94*, 808-811.
- Vanden Heuvel,J.P., Clark,G.C., Thompson,C.L., McCoy,Z., Miller,C.R., Lucier,G.W., und Bell,D.A. (1993). CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* *14*, 2003-2006.
- Verlinden,L., Vanden,B., I, Eelen,G., Drijkoningen,M., Verlinden,I., Marchal,K., De Wolf-Peeters,C., Christiaens,M.R., Michiels,L., Bouillon,R., und Verstuyf,A. (2007). The E2F-regulated gene Chk1 is highly expressed in triple-negative estrogen receptor /progesterone receptor /HER-2 breast carcinomas. *Cancer Res.* *67*, 6574-6581.
- Vicentini,F.T., He,T., Shao,Y., Fonseca,M.J., Verri,W.A., Jr., Fisher,G.J., und Xu,Y. (2011). Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway. *J. Dermatol. Sci.* *61*, 162-168.
- Vogel,C.F., Li,W., Wu,D., Miller,J.K., Sweeney,C., Lazennec,G., Fujisawa,Y., und Matsumura,F. (2011). Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF-kappaB subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. *Arch. Biochem. Biophys.* *512*, 78-86.
- Vogel,C.F., Sciuolo,E., Li,W., Wong,P., Lazennec,G., und Matsumura,F. (2007). RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* *21*, 2941-2955.
- Wang,F., Wang,W., und Safe,S. (1999). Regulation of constitutive gene expression through interactions of Sp1 protein with the nuclear aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* *38*, 11490-11500.
- Wang,Y., Qu,Y., Niu,X.L., Sun,W.J., Zhang,X.L., und Li,L.Z. (2011). Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* *56*, 365-375.
- Watabe,Y., Nazuka,N., Tezuka,M., und Shimba,S. (2010). Aryl hydrocarbon receptor functions as a potent coactivator of E2F1-dependent transcription activity. *Biol. Pharm. Bull.* *33*, 389-397.
- Waugh,D.J. und Wilson,C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 6735-6741.
- Wei,Y.D., Helleberg,H., Rannug,U., und 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.

- Wikonkal,N.M., Remenyik,E., Knezevic,D., Zhang,W., Liu,M., Zhao,H., Berton,T.R., Johnson,D.G., and Brash,D.E. (2003). Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice. *Nat. Cell Biol.* 5, 655-660.
- Wincent,E., Amini,N., Luecke,S., Glatt,H., Bergman,J., Crescenzi,C., Rannug,A., and Rannug,U. (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J. Biol. Chem.* 284, 2690-2696.
- Worner,W. und Schrenk,D. (1996). Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 56, 1272-1278.
- Wu,G.D., Lai,E.J., Huang,N., und Wen,X. (1997). Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 272, 2396-2403.
- Wu,R., Zhang,L., Hoagland,M.S., und Swanson,H.I. (2007). Lack of the aryl hydrocarbon receptor leads to impaired activation of AKT/protein kinase B and enhanced sensitivity to apoptosis induced via the intrinsic pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 448-457.
- Xia,J., Song,X., Bi,Z., Chu,W., und Wan,Y. (2005). UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 16, 943-950.
- Xiao,Z., Chen,Z., Gunasekera,A.H., Sowin,T.J., Rosenberg,S.H., Fesik,S., und Zhang,H. (2003). Chk1 Mediates S and G2 Arrests through Cdc25A Degradation in Response to DNA-damaging Agents. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21767-21773.
- Yang,J.H. (1999). Expression of dioxin-responsive genes in human endometrial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 259-263.
- Yang,X., Liu,D., Murray,T.J., Mitchell,G.C., Hesterman,E.V., Karchner,S.I., Merson,R.R., Hahn,M.E., und Sherr,D.H. (2005). The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24, 7869-7881.
- Yoshizumi,M., Nakamura,T., Kato,M., Ishioka,T., Kozawa,K., Wakamatsu,K., und Kimura,H. (2008). Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol. Int.* 32, 1405-1411.
- Zaher,H., Fernandez-Salguero,P.M., Letterio,J., Sheikh,M.S., Fornace,A.J., Jr., Roberts,A.B., und Gonzalez,F.J. (1998). The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 54, 313-321.
- Zhang,L., Zhi,H., Liu,M., Kuo,Y.L., und Giam,C.Z. (2009). Induction of p21(CIP1/WAF1) expression by human T-lymphotropic virus type 1 Tax requires transcriptional activation and mRNA stabilization. *Retrovirology.* 6, 35.
- Zheng,C., Ren,Z., Wang,H., Zhang,W., Kalvakolanu,D.V., Tian,Z., und Xiao,W. (2009). E2F1 Induces tumor cell survival via nuclear factor-kappaB-dependent induction of EGR1 transcription in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 69, 2324-2331.
- Zhou,B.B. und Bartek,J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat. Rev. Cancer* 4, 216-225.

Zhou,H.M., Bolon,I., Nichols,A., Wohlwend,A., und Vassalli,J.D. (2001). Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. *Cancer Res.* 61, 970-976.

Ziegler,A., Jonason,A.S., Leffell,D.J., Simon,J.A., Sharma,H.W., Kimmelman,J., Remington,L., Jacks,T., und Brash,D.E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372, 773-776.

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Jean Krutmann für die Überlassung des interessanten Themas und die fortwährend wohlwollende und hilfreiche Unterstützung bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Frau Prof. Dr. Charlotte Esser möchte ich für die höfliche Bereitstellung der SKH-1 Tiere danken.

Darüber hinaus möchte ich mich sehr herzlich bei meinem AG-Leiter Dr. Thomas Haarmann-Stemmann bedanken. Von seiner wissenschaftlichen Erfahrung sowie seinen hilfreichen Ideen und Ratschlägen konnte ich immens profitieren. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich, auch wenn es mal nicht so richtig weiterging, und stand mit Rat und Tat sowie viel Kaffee zur Seite. Vielen Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen (und nicht-wissenschaftlichen) Gespräche. Ebenso möchte ich mich bei allen weiteren aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe bedanken. Insbesondere danke ich Birgit Neumann für die tatkräftige Unterstützung in Sachen PCR. Ein sehr großes Dankeschön geht auch an Natalie Stobbe-Maicherski für die beispiellose kollegiale Zusammenarbeit sowie die häufigen freundschaftlichen und lustigen Gespräche. Was haben wir manchmal Tränen gelacht!

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Ulrich Sydlik für die tatkräftige Unterstützung bei Western Blot - Problemen und netten Plaudereien beim Kaffee bedanken. Ein Dankeschön für die Einführung in die Welt des FACSens geht an Dr. Stephan Schmidt. Mein Dank gilt ebenso Dr. Marc Majora und Ingo Uthe für die exzellente technische Unterstützung bei den histologischen Untersuchungen. Für das Überprüfen meiner Arbeit in Sachen deutscher Rechtschreibung und Grammatik möchte ich mich bei Jan-Henrik bedanken. Weiterhin danke ich für moralische Unterstützung aus der Ferne sowie fürs Korrekturlesen Dr. Henne Peuschel. Alles wird gut!

Bei meinen Eltern möchte ich mich von ganzem Herzen für die immerwährende Unterstützung und ihr Vertrauen in mich bedanken! Ohne euch wäre dies alles nie für mich möglich gewesen! Vielen, vielen Dank! Zuletzt danke ich besonders meinem Freund Bernd. Danke, dass du immer für mich da warst, an mich geglaubt hast und mich mit viel Geduld unterstützt hast!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 30.10.2012

Katrin Frauenstein