

Aus dem Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

**Die Bedeutung von HuR für die Induktion der
Cyclooxygenase-2-Expression durch Stimulation
des Arylhydrokarbon-Rezeptors in HaCat-
Keratinocyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie Kathrin Iris Gündel

2015

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

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

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Lars-Oliver Klotz

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Holger Steinbrenner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

iv-vi

1	Einleitung	1
1.1	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe	1
	1.1.1 Vorkommen und Entstehung	1
	1.1.2 Modulation zellulärer Signaltransduktion	1
	1.1.3 Zielgene des AhR	3
1.2	Induktion der COX-2	5
	1.2.1 Charakteristika der COX-2	5
	1.2.2 UVB und COX-2	7
	1.2.3 PAK und COX-2	9
1.3	Das RNA Bindeprotein HuR	10
	1.3.1 Struktur und Funktion	10
	1.3.2 Regulation UVB-induzierten COX-2-Expression durch HuR	12
1.4	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Zellkultur	14
	2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen	14
	2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung	15
	2.1.3 UVB-Bestrahlung von Zellen	15
	2.1.4 Stimulation von Zellen mit unterschiedlichen Liganden des Ah-Rezeptors	16
	2.1.5 Depletion von HuR mittels siRNA	16
2.2	Proteinanalytik	17
	2.2.1 Proteinquantifizierung nach Lowry (Lowry et al., 1951)	17
	2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18

2.2.3 Western-Blot	19
2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	20
2.2.5 „Strippen“ von PVDF-Membranen	21
2.3 RNA-Analytik	21
2.3.1 RNA-Isolation und Quantifizierung	21
2.3.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	22
2.3.3 Agarosegelelektrophorese	23
2.4 Densitometrische Auswertung	24
2.5 Statistische Auswertung	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Wirkung von UVB auf HaCat-Zellen: Induktion der COX-2	25
3.1.1 Charakterisierung der COX-2-Induktion durch UVB	24
3.1.2 Der Einfluss von UVB auf das mRNA Bindeprotein HuR	30
3.2 Wirkung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf HaCat-Zellen: Induktion der COX-2-Expression	32
3.2.1 Charakterisierung der COX-2-Expression durch PAK	32
3.2.2 Einfluss von PAK und FICZ auf HuR	36
3.3 Bedeutung des RNA-Bindeproteins HuR für die COX-2-Induktion	38
3.3.1 HuR und UVB-induzierte COX-2-Expression	38
3.3.2 Modulation der PAK-induzierten COX-2-Expression durch HuR	41
3.4 CYP1a1-Induktion und Regulation in HaCat-Zellen	45
3.4.1 Stimulatoren der CYP1a1-Induktion	45
3.4.2 Die Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Expression	47
4 Diskussion	51
4.1 Induktion und Regulation der COX-2-Expression	51
4.1.1 Mechanismen der AhR-Liganden-induzierten COX-2- und CYP1a1-Expression	51
4.1.2 Vergleich der zellulären Signalwege der durch UV und AhR-Liganden induzierten COX-2-Expression	53
4.2 Zur Bedeutung von HuR durch AhR-Agonisten und UVB induzierte Genexpression	54

4.2.1	COX-2-Expression wird HuR-abhängig reguliert	54
4.2.2	Die Rolle von HuR in der CYP1a1-Expression	57
4.3	UV und HuR	58
4.3.1	Regulation der Apoptose durch HuR	58
4.3.2	Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Induktion durch UVB	59
4.4	Ansätze in der Präventivmedizin und Krebstherapie: HuR	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Arylhydrokarbon-Rezeptor
AhRR	AhR-Repressor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
ARE	AU-reiches Element
ARNT	AhR Nuclear Translocator
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
AUF-1/2	AU-bindender Faktor 1/2
AIP1	Apoptose-induzierendes Protein 1
AP-1	Aktivatorprotein 1
BaP	Benzo(a)pyren
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bidest.	bidestilliert
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyclisches AMP
Cdk-1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i> (zyklinabhängige Kinase 1)
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
COX	Cyclooxygenase
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	CRE-bindendes Protein
CRM1	<i>chromosomal region maintenance protein 1</i>
CYP1a1	Cytochrom P450 1a1
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)

Abkürzungsverzeichnis

EGFR	EGF-Rezeptor
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FICZ	6-Formylindolo[3,2- <i>b</i>]carbazol
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT-1	Glucosetransporter 1
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HNS	<i>HuR-nukleocytoplasmatic shuttling sequence</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HuR	Humanes Antigen R
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	kilodalton
Konz.	Konzentration
Ktrl.	Kontrolle
Lsg.	Lösung
LT	Leukotrien
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK-APK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MC	3-Methylcholanthren
miRNA	microRNA
MMP	Magermilchpulver
n. Bestr.	nach Bestrahlung
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositid-3'-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTPase	Protein-Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	Retinoblastomprotein
RBP	RNA-bindendes Protein
RhoB	<i>Ras homolog gene family B</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen (rotations) pro Minute
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP-1	Spezifisches Protein 1
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS + Tween-20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TGF- α	transformierender Wachstumsfaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TX	Thromboxan
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen

Abkürzungsverzeichnis

w/v	Masse pro Volumen
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XRE	Xenobiotika-responsive Elemente

1 Einleitung

1.1 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

1.1.1 Vorkommen und Entstehung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) kommen in der Umgebungsluft vor. Es sind mehrere hundert verschiedene PAK-Verbindungen bekannt. Sie entstehen hauptsächlich bei unvollständigen Verbrennungsprozessen aus Kohlenstoffverbindungen. Durch Dieselerbrennungs- und Industrieabgase gelangen sie in die Luft und in den Erdboden (Nam et al., 2009; Tsai et al., 2011). Nur in geringen Spuren sind sie permanent in der Umwelt vorhanden (z.B. durch Waldbrände). Wegen ihrer Persistenz, Toxizität und Verbreitung haben PAK große Bedeutung als Umweltschadstoffe. Hautkontakt, Inhalation oder orale Aufnahme ist für Menschen gesundheitsschädlich (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Statement, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 1995).

Zu der Gruppe der PAK gehört Benzo(a)pyren (BaP), einer der am längsten bekannten und untersuchten karzinogenen Stoffe in Zigarettenrauch (Armstrong and Gibbs, 2009). Auch synthetisch hergestelltes 3-Methylcholanthren (MC), aufgrund seiner tumorpromovierenden Wirkung häufig als Standardkarzinogen eingesetzt, gehört zu den PAK.

1.1.2 Modulation zellulärer Signaltransduktion

Die zelluläre Wirkung der PAK beruht hauptsächlich auf ihrer Aktivierung des Arylkohlenwasserstoff- (Arylhydrokarbon-) Rezeptors (AhR), auch bekannt als Dioxin-Rezeptor. Einer der prominentesten und für den Menschen gefährlichsten Vertreter der AhR-Agonisten ist 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). TCDD wurde 1957 erstmals synthetisiert. Menschen reagieren auf TCDD u.a. mit Chlorakne (Bertazzi et al., 1998) oder Tumorbildung, z.B. Brustkrebs (Warner et al., 2002).

BaP, MC und TCDD gehören zu den klassischen (synthetischen) AhR-Agonisten. Ein natürlicher AhR-Ligand ist 6-Formylindolo(3,2-b)carbazol (FICZ). FICZ entsteht nach Ultraviolett (UV)-Bestrahlung als Photoprodukt zweier Tryptophanmoleküle. Es besitzt hohe Affinität zum AhR und kann auch synthetisch hergestellt werden (Rannug et al., 1995). **Abb. 1.1** sind die Strukturformeln einiger AhR-Liganden zu entnehmen.

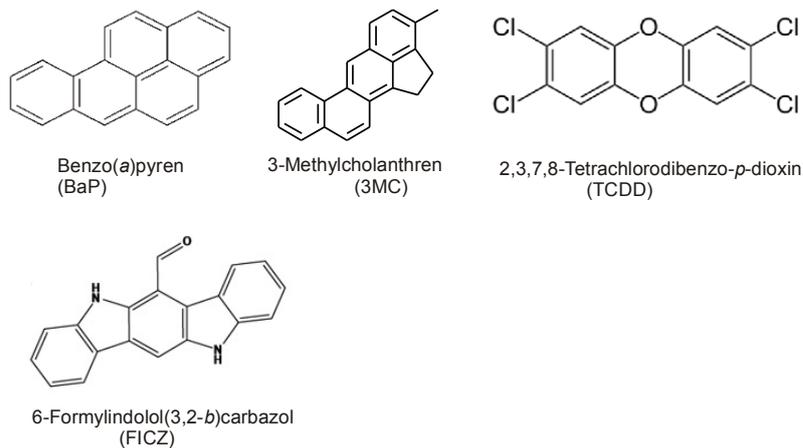


Abb. 1.1: AhR-Liganden Benzo(a)pyren, 3-Methylcholanthren und TCDD gehören zu den klassischen AhR-Agonisten. 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol ist ein natürlicher Ligand.

In seinem inaktiven Zustand liegt der AhR cytoplasmatisch als Teil eines Multiproteinkomplexes zusammen mit Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), Co-Chaperon p23, Tyrosinkinase c-Src und dem Apoptose-induzierendem Protein 1 (AIP1) vor. Die lipophilen PAK durchdringen die Zellmembran und binden an den AhR und aktivieren diesen. Es kommt zur Konformationsänderung, und der AhR transloziert in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit dem AhR nuclear translocator (ARNT). Der AhR-ARNT-Ligand-Komplex bindet an Xenobiotika-responsive Elemente (XRE) der DNA und induziert so eine gesteigerte Transkription verschiedener Gene des Fremdstoffmetabolismus. Neben diesem Signalweg existieren weitere Mechanismen der Signaltransduktion durch den AhR. Dazu gehört die Interaktion des AhRs mit Coregulatoren, wie dem Retinoblastomprotein (Rb) und dem Nukleären Faktor κ B (NF- κ B), „Cross-talks“ mit verschiedenen Proteinkinasen, z.B. mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) oder der Tyrosinkinase c-Src oder Liganden-unabhängige Aktivierung des AhR durch dessen Phosphorylierung (Bock and Kohle, 2006; Ikuta et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die AhR-Aktivierung von der Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) abhängig ist (Chen and Tukey, 1996; Cho et al., 2004;

Long et al., 1998). Die Aktivierung der PKC scheint eine wichtige Rolle für das Binden des AhR-ARNT-Komplexes an die DNA zu spielen (Chen and Tukey, 1996).

TCDD kann den EGF-Rezeptor (EGFR) und so auch die extrazellulärsignal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) direkt über den AhR aktivieren. Durch Aktivierung des EGFR wird Zellproliferation, -differenzierung und -migration reguliert, beispielsweise kommt es zur gesteigerten Expression des immunmodulatorischen Proteins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Cheon et al., 2007). TCDD erhöht außerdem in Keratinozyten den mitogen und neurotroph wirkenden transformierenden Wachstumsfaktor-alpha (TGF- α), welcher ebenfalls mit dem EGFR interagiert (Choi et al., 1991; Gaido et al., 1992).

Die Funktion des AhR wird außerdem antagonisiert durch den AhR-Repressor (AhRR), welcher mit dem AhR um die Bindung des ARNT konkurriert und so die Transkription von XRE-DNA-Elementen reduziert (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003).

Es lässt sich zusammenfassen, dass der AhR sowohl XRE-abhängig Genexpression reguliert als auch über sogenannte nichtgenomische Wege, also durch Interferenz mit Zelldifferenzierungs- und Zellwachstumssignalkomponenten, intrazelluläre Signaltransduktion moduliert (Enan and Matsumura, 1995).

1.1.3 Zielgene des AhR

AhR wird in den meisten humanen Zellen exprimiert. Er fungiert als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor verschiedener Gene des Fremdstoffmetabolismus, beispielsweise Isoformen von Cytochrom P450 (Phase I) oder der UDP-Glucuronosyltransferase (Phase II) (Schrenk, 1998). Über den AhR wird auch die Expression der COX-2 moduliert (s. **Kap. 1.2.3**).

Cytochrom P4501a1 (CYP1a1) ist das am besten erforschte Produkt der AhR-responsiven Gen-Batterie und gilt als klassisches Zielgen der AhR-Signalkaskade. CYP1a1 ist nur in geringem Maße konstitutiv exprimiert, jedoch rasch induzierbar (Whitlock, 1999). Es katalysiert u.a. die metabolische Wirkung der PAK über den AhR. Durch die Metabolisierung von Rezeptor-Agonisten moduliert CYP1a1 auch die Dauer der AhR-Aktivität. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden,

dass CYP1a1 in den AhR-vermittelten Zellzyklusarrest in der G1-Phase involviert ist (Levine-Fridman et al., 2004).

Wie in **Kap. 1.1.2** beschrieben entsteht FICZ aus 2 Molekülen Tryptophan. Es wurde gezeigt, dass basale CYP1a1-mRNA-Spiegel mit der totalen Tryptophanmenge korreliert sind (Wei et al., 1999). Kurzwellige ultraviolette Strahlung (UVB; 280-320 nm) ist auch Induktor der CYP1a1-Expression. Fritsche et al. haben 2007 gezeigt, dass die CYP1a1-Induktion durch UVB auf die intrazelluläre Bildung von FICZ zurückzuführen ist (Fritsche et al., 2007). 2004 konnte die Arbeitsgruppe um Bergander herausstellen, dass FICZ nicht nur CYP1a1 induziert, sondern auch durch CYP1a1 metabolisiert wird (Bergander et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass AhR-abhängige CYP1a1-Expression und Enzymaktivität im Zusammenhang mit pathologischen kardiovaskulären Geschehen und Tumorinisation steht (Cantrell et al., 1996; Guiney et al., 2000). Auch wird eine Korrelation zwischen CYP1a1-Polymorphismen und Lungenkrebs diskutiert (Shaffi et al., 2009; Shah et al., 2009). Reaktive Zwischenprodukte bei Metabolisierung von PAK zu deren ausscheidbaren hydrophilen Form können genotoxisch wirken (Nebert and Dalton, 2006). BaP ist ein bekanntes Beispiel dafür. BaP aktiviert den AhR und induziert so CYP1a1. CYP1a1 oxidiert BaP zu einem Epoxid. Nach Hydrolyse wird das Zwischenprodukt von CYP1a1 zu BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-Epoxid umgewandelt. Dieses Epoxid kann direkt mit der DNA interagieren und bildet DNA-Addukte (Culp et al., 2000).

Neben der Expression von CYP1a1 reguliert der AhR die Bildung etlicher anderer Proteine und scheint so eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation zu spielen. Beispielsweise kontrolliert der AhR die Expression der Protoonkogene c-jun und junD in Mäusehepatomzellen und induziert so Zellwachstum (Hoffer et al., 1996). Eine weitere Zielstruktur des AhR ist das proapoptotische Bax-Gen. In der PAK-induzierten Verminderung von fetalen ovariellen Keimzellen im Uterus spielt Bax eine zentrale Rolle (Matikainen et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass in Mäusen mit konstitutiv überexprimiertem AhR häufiger Tumore vorkommen (Andersson et al., 2002; Moennikes et al., 2004). Behandlung mit BaP in AhR-knock-out-Mäusen konnte keine Tumore induzieren (Shimizu et al., 2000). Dies unterstützt die Hypothese, dass der AhR in der

Kanzerogenese eine wichtige Rolle spielt. Andererseits konnte ein konstitutiv aktivierter AhR in Mamma-Karzinomen gezeigt werden, der für eine reduzierte Expression des Protoonkogens c-myc verantwortlich zu sein scheint (Yang et al., 2005).

Der AhR ist demnach von zentraler Bedeutung für die Regulation von Zellproliferation und -differenzierung und spielt insbesondere in der durch exogene Noxen geförderten Karzinogenese eine wichtige Rolle.

1.2 Induktion der COX-2

1.2.1 Charakteristika der COX-2

Cyclooxygenase ist ein globuläres Protein bestehend aus ca. 600 Aminosäuren (67-72 kDa). In den 1970er Jahren wurde es erstmals isoliert aus der Prostata von Schweinen und Rindern. Cyclooxygenasen sind im glatten endoplasmatischen Retikulum und der Kernhülle lokalisiert.

Von COX sind zwei Isoformen bekannt, COX-1 und COX-2. Des Weiteren gibt es eine Spleiß-Variante der COX-1, die COX-3 (Kis et al., 2005). COX-1 wird in fast allen Zellen konstitutiv exprimiert. COX-2 dagegen wird durch Zytokine, Mitogene und Endotoxine induziert und spielt insbesondere in der durch exogene Noxen geförderten Karzinogenese eine wichtige Rolle. Die COX-2 Promotoraktivität kann durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren kurzfristig reguliert werden. Dazu gehören Aktivatorprotein 1 (AP-1), NF- κ B, CRE-bindendes Protein (CREB) oder Spezifisches Protein 1 (SP-1) (Appleby et al., 1994; Dannenberg and Subbaramaiah, 2003). Im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden COX-1 und -2 Isoformen findet man COX-3 in Großhirnrinde und Herz.

COX sind Schlüsselenzyme der Prostaglandin-Synthese, auch Prostaglandin-Synthasen genannt. Prostaglandine (PG) gehören in die Gruppe der Eikosanoide, zusammen mit Thromboxanen (TX) und Leukotrienen (LT). Die Cyclooxygenasen katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin-H₂. Arachidonsäure wird aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A2 herausgelöst, und in zwei Reaktionsschritten entsteht durch Ringschluss und Oxygenierung des Rings

PGH₂, Ausgangssubstanz für weitere PG und TX. UV-Strahlung führt zur Aktivierung der Phospholipase A₂, sodass die Substratverfügbarkeit für COX gesteigert wird (Gresham et al., 1996; Kang-Rotondo et al., 1993). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zur COX-2-Induktion beiträgt, ist eine mRNA-Stabilisierung der COX-2, die in **Kap. 1.3** thematisiert wird.

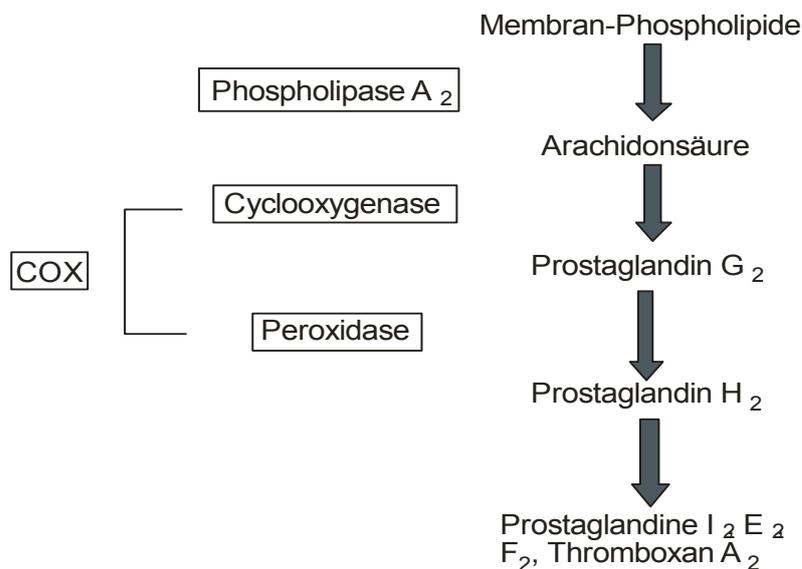


Abb. 1.2: Synthese von PG und TX COX = Cyclooxygenase- und Peroxidase-Reaktion

Konstitutive Expression von COX-1 hält durch Prostaglandinsynthese z.B. die physiologische Nierendurchblutung oder den Magenschleimhautschutz aufrecht. Physiologische COX-2-Induktion steht im Zusammenhang mit Fieber, Entzündung und Schmerz. COX-2 nimmt dabei eine zentrale Funktion in der Regulation von Entzündungen ein. Neben Fieber und Sensibilisierung von Schmerzneuronen bewirken PG auch Permeabilitätserhöhung und Hyperämie im betroffenen Gewebe.

Prostacyclin (PGI₂) wirkt vasodilatatorisch und hemmt die Thrombozyten-Aggregation. Den Antagonisten stellt TX A₂ dar, indem es vasokonstriktorisch und fördernd auf die Thrombozytenaggregation wirkt. Auf molekularer Ebene binden PG und TX an membranständige Rezeptoren und wirken über G-Proteine auf den cAMP- bzw. IP3/DAG-Signalweg.

Chronische Entzündungen können das Risiko der Tumorinitiation und –proliferation erhöhen. Wie in chronisch entzündlich veränderten Geweben, werden

inflammatorische Zellen und Mediatoren (z.B. Chemokine, Cytokine und PG) auch in Tumorgewebe präsentiert und können sich fördernd auf Metastasierungsprozesse auswirken (Mantovani et al., 2008). COX wird in einer Vielzahl von (prä-) malignen Tumoren sowohl in den Tumorzellen als auch im umgebenden Stroma überexprimiert (Dannenbergs and Subbaramaiah, 2003; Neufang et al., 2001; Oshima et al., 1996).

PGE₂ ist in Verbindung gebracht worden mit etlichen Karzinogenese fördernden Mechanismen. Im Tumor gebildetes PGE₂ kann sowohl das Tumorstroma, u.a. durch Aktivierung des vascular endothelial growth factor (VEGF) oder Matrixmetalloproteasen Angiogenese (Gupta et al., 2003; Steenport et al., 2009) oder Immunsuppression (Schwarz, 2005), als auch Tumorzellen durch Proliferation, z.B. über den EGFR (Kinoshita et al., 1999) modulieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass in Prostaglandin-E₂-Rezeptor-negativen Zellen Tumorstromawachstum reduziert ist (Sonoshita et al., 2001).

Des Weiteren gehen erhöhte COX-2-Spiegel mit vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einher, die entweder direkt DNA beschädigen oder Protoonkogene induzieren (Hussain et al., 2003).

Selektive COX-2-Hemmer (Coxibe) und Nicht-steroidale-Antirheumatika (NSAR) werden als neue Ansätze in der Krebstherapie eingesetzt (Gupta et al., 2002), da epidemiologische Studien zeigen konnten, dass das Risiko Krebs zu entwickeln durch NSAR und Coxibe gesenkt wird (Dannenbergs et al., 2005; Rahme et al., 2003; Thun et al., 2002).

1.2.2 UVB und COX-2

UV-Strahlung gilt als potentes Karzinogen. UVB (280-320nm) kann sowohl durch direkte Einwirkung auf die DNA als auch über die photochemische Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu DNA-Schäden beitragen, die zu Mutationen führen können. Durch ROS stimulierte Signalprozesse können weiterhin zur Förderung von Promotion und Progression beitragen, z.B. in Hauttumoren (Nishigori et al., 2004).

Bekanntermaßen werden COX-Expression und PG-Spiegel durch UVB erhöht (Black et al., 2008; Buckman et al., 1998). UV-Strahlung induziert neben COX-2

auch CYP1A1 (Katiyar et al., 2000). Im Folgenden werden Signalkaskaden vorgestellt, die zur Steigerung der COX-Expression durch UV führen.

UV-Strahlung wirkt nicht über die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor, sondern wirkt durch photochemisch gebildete ROS auf redox-sensitive Strukturen, was Signaleffekte zur Folge hat (Klotz, 2002). Zu diesen Strukturen gehören z.B. Proteintyrosinphosphatasen, Thioredoxin und Gluthation (Barthel and Klotz, 2005). Intrazellulär können durch UV ROS, beispielsweise H_2O_2 , entstehen. ROS aktivieren MAPK (in 3 Gruppen unterteilt, ERK, JNK und p38) und modulieren die Aktivität von Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPasen) (Klotz et al., 1999). Durch Inhibierung von PTPasen werden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) aktiviert. Auf diesem Weg kann UVA den EGFR aktivieren (von Montfort et al., 2006). ROS aktivieren auch die PKC, beispielsweise PKC- α , - β , - δ , - ϵ (Amberg et al., 2010; DelCarlo and Loeser, 2006; Gopalakrishna and Jaken, 2000; Gundimeda et al., 2012; Hua et al., 2003; Wang and Zheng, 2010). PKC ist außerdem an der ROS-induzierten Aktivierung der MAPK beteiligt (Lee and Esselman, 2002).

UVB-Stimulation kann über Aktivierung der MAPK (Ashida et al., 2003; Assefa et al., 1997; Chen et al., 2001; Xu et al., 2006) Transkriptionsfaktoren und letztendlich Genexpression modulieren. UVB-vermittelte COX-2-Expression wird über den EGFR und durch aktivierte MAPK ERK1/2 AhR-abhängig induziert (Fritsche et al., 2007). Bekannte durch UVB aktivierte Transkriptionsfaktoren sind AP-1 oder NF- κ B. Beide wurden in Zusammenhang gebracht mit vermehrter COX-2-Genexpression. AP-1 scheint an der durch p38-MAPK vermittelten UVB-induzierten COX-2-Expression eine wichtige Rolle zu spielen (Bachelor et al., 2005). p38 reguliert über den aktivierenden Transkriptionsfaktor 2 (ATF-2) oder CREB COX-2-Expression (Appleby et al., 1994; Tang et al., 2001) und hat so eine besondere Stellung in der Regulation der Transkription des COX-2-Gens (Chen et al., 2001; Dean et al., 1999). Zwischen den hier beschriebenen Signalkaskaden sind auch so genannte „cross-links“, d.h. Querverbindungen beschrieben. Die Bedeutung von JNK in der UVB-induzierten COX-2-Expression scheint untergeordnet zu sein (Black et al., 2011).

Welche der MAPK die größte Bedeutung in der UV-induzierten COX-2-Expression hat, hängt von Faktoren wie der untersuchten Zelllinie und der verwendeten UV-Strahlung sowie der Dosis ab (Dickinson et al., 2011; Einspahr et al., 2008; Lee et al., 2010).

1.2.3 PAK und COX-2

Im Gegensatz zu den vielfältigen Signalkaskaden, welche UV-Strahlung auslösen kann, ist über durch PAK induzierte Signaltransduktion wenig bekannt. Wie in **Kap. 1.1.2** beschrieben, wirken PAK aktivierend auf den Ah-Rezeptor. Das am längsten bekannte und untersuchte Zielgen des AhR ist CYP1a1 (s. **Kap. 1.1.2**). PAK und FICZ führen AhR-abhängig zu COX-2-Expression (Fritsche et al., 2007). Über AhR-unabhängige Signalkaskaden ist wenig bekannt. Im Folgenden werden Ansätze weiterer Mechanismen, über welche PAK und FICZ intrazellulär wirken können, erläutert.

Es wurde untersucht, ob PAK und FICZ wie UVB durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies Signaltransduktion regulieren (Elbekai et al., 2004). So werden über den AhR induzierte Phase I Enzyme in Verbindung mit der Bildung von ROS gebracht (Kopf and Walker, 2010). Das Ausmaß der durch BaP bzw. BaP-Derivate induzierten COX-2-Expression in glatten Muskelzellen ist von dem antioxidativen Potential der Zellen abhängig. Es gibt Hinweise darauf, dass COX-2 bei niedrigen Glutathion-Spiegeln vermehrt exprimiert wird (Yan et al., 2000).

Eine weitere Signalkomponente, die mit PAK-vermittelter Gen-Expression in Verbindung gebracht wird ist der Östrogen-Rezeptor (Kharat and Saatcioglu, 1996; Santodonato, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass durch CYP1a1 metabolisierte BaP-Derivate in der Lage sind, den Östrogen-Rezeptor zu aktivieren (Fertuck et al., 2001; Gozgit et al., 2004). Die Arbeitsgruppe konnte jedoch nicht zeigen, ob BaP-Derivate östradiol-responsive Gene regulieren. Allerdings scheint in Östrogen-Rezeptor-negativen Brustkrebszellen die BaP-induzierte COX-2-Expression AhR-abhängig zu sein (Miller et al., 2005).

AhR-unabhängige BaP-induzierte COX-2-Expression konnte bisher nur in Lungenepithelzellen gezeigt werden (Chang et al., 2007). Tsai et al. konnten 2004 zeigen, dass BaP in Osteoblasten über ERK-MAPK und PI3K/Akt Signalkaskaden die COX-2-Expression AhR- und p38-MAPK-unabhängig induziert (Tsai et al., 2004). Yan et al. zeigten 2000, dass in glatten Muskelzellen die BaP-induzierte COX-2-Expression durch NF- κ B und ERK-MAPK (ohne Einfluss von p38-MAPK) reguliert wird (Yan et al., 2000). Ma et al. konnten 2011 eine BaP-induzierte von NF- κ B abhängige COX-2-Expression bestätigen (Ma et al., 2011).

Es ist bekannt, dass TCDD AhR-abhängig COX-2-Genexpression induziert (Puga et al., 1997). TCDD kann jedoch c-Phospholipase A2, ERK und Src Kinase in sehr kurzer Zeit aktivieren und so kurzfristig Genexpression regulieren. Das heißt, TCDD wirkt nicht nur über die Modulation der Genexpression, sondern kann auch über einen „non-genomic-pathway“ Signaltransduktion und so COX-2-Expression modulieren (Dong and Matsumura, 2008; Dong et al., 2010).

Weiter konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung des AhR der Multiproteinkomplex zerfällt und dabei die Tyrosinkinase c-Src cytosolisch verbleibt. Src kann beispielsweise den EGFR aktivieren und moduliert so Proteinexpression (Fritsche et al., 2007; Kohle et al., 1999; Park et al., 2007).

Die Hauptwirkung der PAK und von FICZ scheint trotz neuer, noch nicht vollständig geklärter Ansätze, in der Aktivierung des AhR zu liegen.

1.3 Das RNA Bindeprotein HuR

1.3.1 Struktur und Funktion

Mitglieder der Hu-Familie sind Homologe der ELAV (embryonic lethal abnormal vision) -Proteine aus *Drosophila melanogaster* (Ma et al., 1996). Hu Proteine sind RNA-bindende Proteine mit gemeinsamer charakteristischer Struktur von 3 RNA-erkennenden Domänen (RNA recognition motifs (RRMs)). RRM's einer Hu-Familie stimmen in ihrer Aminosäuresequenz über 90% überein und haben unterschiedliche Funktionen. Humanes Antigen R (HuR) ELAV (embryonic ELAV1) wird ubiquitär exprimiert, im Gegensatz zu den primär im neuronalen Gewebe vorkommenden ELAV-like-Proteinen wie HuB, HuC oder HuD (Ma et al., 1996).

HuR bindet mit hoher Affinität und Spezifität an Ziel-mRNAs, welche destabilisierende AREs (AU-reiche Elemente) enthalten und modifiziert so deren Stabilität und/oder deren Translationsrate (Brennan and Steitz, 2001; Mazan-Mamczarz et al., 2003). AREs sind 17-20 Basen lange RNA-Motive. Sie beinhalten multiple Kopien von AUUUA-Pentameren und befinden sich in der 3'-untranslatierten Region der mRNA (Lopez de Silanes et al., 2004). Ohne das dritte

der RRM3 verliert HuR seine Eigenschaft, AREs zu stabilisieren (Fan and Steitz, 1998).

HuR ist in unstimulierten Zellen überwiegend (>90%) im Nukleus lokalisiert (Fan and Steitz, 1998). Als Antwort auf verschiedene Signale, z.B. UV-Strahlung (Wang et al., 2000b), H₂O₂-Behandlung (Abdelmohsen et al., 2009) oder oxidativem Stress (Tran et al., 2003) kann HuR mit den nukleären Liganden pp32 und APRIL assoziieren und CRM1 (chromosomal region maintenance protein 1) -abhängig ins Zytoplasma exportiert werden (Gallouzi et al., 2001; Gallouzi and Steitz, 2001; Keene, 1999). APRIL scheint für den nukleären Export von HuR notwendig zu sein (Gallouzi et al., 2001; Moore and Rosbash, 2001). Wichtig für die nukleäre Translokation von HuR ist außerdem eine „Shuttling-Sequenz“ (HuR-nukleocytoplasmatic shuttling sequence (HNS)) zwischen zweitem und dritten RRM.

Hu-Proteine sind wichtige Regulatoren physiologischer zellulärer Funktionen, wie Zellteilung, Muskelzellendifferenzierung, replikative Seneszenz, Migration und Stressantwort (Antic and Keene, 1997; Atasoy et al., 1998; Dormoy-Raclet et al., 2007; Kim et al., 2008; van der Giessen et al., 2003). HuR reguliert den Abbau von mRNAs, die für Zellzyklus-Regulatoren, Wachstumsfaktoren, Cytokine oder proinflammatorischen Enzyme kodieren (Doller et al., 2008; Eberhardt et al., 2007). Zu den durch HuR stabilisierten mRNAs gehören beispielsweise die mRNAs für Glucosetransporter 1 (GLUT-1) (Gantt et al., 2006), Cyclin A und B (Wang et al., 2000a), zahlreiche Interleukine, beispielsweise IL-13 (Casolaro et al., 2008), VEGF (Wang et al., 2009) oder Fas-Ligand (Drury et al., 2010). Für diese Arbeit ist der mRNA-stabilisierende Einfluss von HuR für COX-2 von Interesse (Denkert et al., 2004; Dixon et al., 2001; Subbaramaiah et al., 2003). Hu-Proteine sind nicht nur als Regulator der Transkription, sondern auch der Translation etlicher Proteine in der Literatur beschrieben (Antic et al., 1999; Jain et al., 1997; Kullmann et al., 2002).

HuR spielt im pathologischen Geschehen, wie bei chronischen Entzündungen, kardiovaskulären Erkrankungen und der Kanzerogenese, eine bedeutende Rolle. Erhöhte HuR-Spiegel und in Folge erhöhte COX-2-Expression können als negative prognostische Faktoren bei Magenkarzinomen dienen (Mrena et al., 2005). Der Einfluss und die Bedeutung von HuR in malignen Tumoren ist

Gegenstand aktueller Forschung (Lopez de Silanes et al., 2005; Yuan et al., 2010).

1.3.2 Regulation UVB-induzierter COX-2-Expression durch HuR

UVB-Strahlung kann durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden COX-2-Expression sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell regulieren. UV-induzierte Überexpression von COX-2 wird durch eine erhöhte Stabilität der COX-2-mRNA in Keratinozyten durch Induktion der cytoplasmatischen Expression von HuR erreicht (Tong et al., 2007). D.h., UV erhöht nicht nur die translationale Induktion von COX-2, sondern kann auch posttranskriptionell durch das mRNA-bindende Protein HuR COX-2-mRNA-Stabilität beeinflussen (Cok et al., 2003; Fernau et al., 2009; Zhang and Bowden, 2008).

Es ist beschrieben worden, dass eine Vielzahl von UV-induzierten Stimuli, wie ROS oder H₂O₂, den Export von nukleärem HuR ins Cytoplasma induzieren (Abdelmohsen et al., 2007; Wang et al., 2000b). Mindestens vier durch ROS aktivierte Kinasen sind in Verbindung mit der Regulation der Translokation von HuR gebracht worden: AMP-aktivierte Kinase (AMPK), MAPK, Mitglieder der PKC-Familie und cyclin-abhängige Kinase 1(Cdk1). Die MAPK scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen. So wurde gezeigt, dass oxidative Stimuli die Translokation von HuR ins Zytoplasma p38-MAPK-abhängig induzieren (Abdelmohsen et al., 2008; Lasa et al., 2000; Song et al., 2005) und so COX-2-mRNA-Stabilität regulieren (Bachelor et al., 2002; Dean et al., 2004; Subbaramaiah et al., 2003). Aktivierte p38-MAPK phosphoryliert HuR und erhöht so dessen Fähigkeit, mRNA zu stabilisieren, indem es Deadenylierung der mRNA und so deren Abbau verhindert (Lafarga et al., 2009). MAPKAPK-2 wird ebenfalls durch oxidativen Stress aktiviert und induziert so cytoplasmatische HuR-Akkumulation in HeLa-Zellen (Tran et al., 2003). Auch aktivierte AMPK kann regulierend auf cytoplasmatische HuR-Spiegel wirken (Wang et al., 2002; Zhang and Bowden, 2008). Eine weitere Signalkaskade ist die direkte, stress-induzierte Phosphorylierung von HuR durch PKC- α und so dessen Translokation ins Zytoplasma (Doller et al., 2007). Allerdings wurde gezeigt, dass eine Inhibition von

PKC die COX-2-Induktion durch UVB abschwächt, aber nicht komplett aufhebt (Fernau et al., 2009).

1.4 Fragestellung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe kommen ubiquitär in der Umwelt vor und sind bekannt für ihre kanzerogene Wirkung. Sie führen als Liganden des cytoplasmatischen Arylkohlenwasserstoff- (Arylhydrokarbon-) Rezeptors (AhR) zu dessen nukleärer Translokation sowie Bindung an Xenobiotika-responsive Elemente der DNA und so zu einer gesteigerten Transkription verschiedener Gene des Fremdstoffmetabolismus – beispielsweise des Cytochroms P450 1a1 – sowie der Cyclooxygenase-2 (COX-2).

Kurzweilige ultraviolette Strahlung (UVB; 280-320 nm) ist bekanntermaßen ein starker Induktor der COX-2-Expression. Die Induktion wird durch das RNA bindende Protein HuR (humanes Antigen R) posttranskriptionell reguliert. HuR bindet dabei in stimulierten Zellen nach Translokation aus dem Kern in das Cytoplasma an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der Cox-2-mRNA und stabilisiert diese.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Regulation der COX-2-Bildung durch PAK in menschlichen HaCat-Keratinocyten untersucht.

Es sollte geklärt werden,

1. ob die Expression von COX-2 im Zellmodell durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffen induziert wird und inwiefern sich diese Induktion hinsichtlich Intensität und Mechanismus von der durch UVB hervorgerufenen Induktion der COX-2-Expression unterscheidet.
2. ob das mRNA bindende Protein HuR die COX-2-Expression durch PAK moduliert.

2 Material und Methoden

Die Beschreibung der Methoden in diesem Kapitel folgt in den allgemeinen Teilen der Beschreibung im Labor von Prof. Klotz eingesetzter Methoden, wie sie in Arbeiten aus der AG Klotz erfolgt, so etwa den Dissertationen von Dr. Niklas Fernau, Dr. Anna Eckers und Dr. André Bartholomé (Fernau 2009; Eckers 2010; Bartholome 2010).

Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer Millipore Direct-Q® 3 UV-Anlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Die Einmalgebrauchsmaterialien der Zellkultur wurden von der Fa. Greiner Bio-One (Frickenhausen) bezogen.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie handelt es sich ausschließlich um HaCat Zellen, immortalisierte humane Keratinozyten aus der distalen Peripherie eines Melanoms. Bezugsquelle ist Prof. P. Boukamp, Heidelberg, über Prof. P. Brenneisen und Prof. Dr. E. Fritsche, Düsseldorf (Boukamp et al., 1988).

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

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

Die Zellen wurden bis zur 90-100 %-igen Konfluenz herangezogen. Zum Passagieren und zur Aussaat auf Kulturschalen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung in PBS (PAA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach ca. 10 Minuten durch Zugabe von Kompletmedium gestoppt, die Zellen resuspendiert und in entsprechendem Verhältnis auf Kulturflaschen und -schalen ausgesät.

2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Zur Langzeitlagerung wurde nach der Inaktivierung des Trypsins (s.o.) die Zellsuspension zentrifugiert, das Zellpellet in Einfriermedium (Kompletmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in speziellen Kryogefäßen (Greiner) bei -80 °C eingefroren. Dabei wurden die Zellen einer 175 cm²-Kulturflasche jeweils auf 4 Kryogefäße aufgeteilt.

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut und umgehend in eine 175 cm²-Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Nach 3-4 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um DMSO zu entfernen.

2.1.3 UVB-Bestrahlung von Zellen

Auf Kulturschalen ausgesäte und bis zur ca. 90 % Konfluenz kultivierte Zellen wurden 24 Stunden vor Bestrahlung mit PBS gewaschen und in serumfreiem Medium inkubiert (Serumdepletion).

Am nächsten Tag wurden nach dem Waschen mit PBS die Zellen mit PBS bedeckt und mit einer Lampe aus 4 TL20W/12RS-UV-Röhren (Philips, Eindhoven, Niederlande) bestrahlt, welche den größten Teil ihrer Energie im UVB-Bereich ($\lambda = 280-320$ nm) emittieren und ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 310$ nm aufweisen. Die Zellen wurden für die entsprechende Zeit bestrahlt, um eine UVB-Dosis von 100 J/m² zu erreichen. Danach wurden sie mit PBS gewaschen und in serumfreiem Kompletmedium bis zu ihrer Lyse inkubiert.

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

Expositionszeit [s] = Dosis [J/m²] / (10 x Strahlungsintensität (TL01-Wert) [mW/cm²]).

Die zur Berechnung verwendete Strahlungsintensität wurde durch Mittelwertbildung gleichmäßig verteilter Messpunkte im Strahlungsfeld der Lampe ermittelt. Das verwendete UV-Meter wies für Messwerte im UVB-Bereich eine Toleranz von ca. ±10 % (Herstellerangaben) auf.

2.1.4 Stimulation von Zellen mit unterschiedlichen Liganden des Ah-Rezeptors

Die zu ca. 90 % konfluenten Zellen wurden 24 Stunden vor Behandlung serumdepletiert. Als Liganden des Ah-Rezeptors wurden 100 nM 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), 10 µM 3-Methylcholanthren (3-MC) und 10 µM Benzo(a)pyren (BaP) (jeweils finale Konzentrationen, gelöst in DMSO) verwendet. Inkubiert wurde jeweils in Kompletmedium ohne FCS bis zur Lyse. Die AhR-Liganden wurden freundlicherweise von Prof. Dr. E. Fritsche, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Depletion von HuR mittels siRNA

Transfektion von Zellen mit synthetisch hergestellter siRNA (*small interfering RNA*) bezweckt, dass die mRNA eines Zielgens abgebaut und somit die Menge des entsprechenden Proteins abnimmt. Die siRNA stellt den komplementären Anti-Sense-Strang zur Ziel-mRNA dar.

Es wurden 175.000 HaCat-Zellen je Kulturschale à 6 cm Durchmesser ausgesät. Zum Auszählen wurde eine Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld) verwendet. Das für eine bestimmte Zellzahl benötigte Volumen wurde dabei wie folgt ermittelt:

$$\begin{aligned} \text{Volumen (ml)} &= \text{gewünschte Zellzahl} / \text{Zahl der Zellen pro Kulturvolumen} \\ &= \text{gewünschte Zellzahl} / (10.000 \times \text{Zahl der Zellen pro } 0.1 \text{ ul})^* \end{aligned}$$

*Es werden 4 Eckquadrate in der Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Der Durchschnittswert für ein Quadrat entspricht der Zellzahl pro 0.1 μ l.

Ca. 32 Stunden später, bei einer Konfluenz von ca. 20 %, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je Kulturschale erst 1 ml „OptiMEM® I + GlutaMAX™-I“ (Gibco), dann 1 ml Transfektionsmischung vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Transfektionsmischung wurde zuvor 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und setzte sich wie folgt zusammen:

1000 μ l „OptiMEM® I + GlutaMAX™-I“ (Gibco)

20 μ l Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen, Karlsruhe)

15 μ l siRNA (20 μ M; Qiagen), d.h. 150 nM final.

Als Kontroll-siRNA wurde Ktrl (Qiagen), d.h. nicht-depletierende Kontrollsequenz (Sense-Sequenz 5'-3': UUC UCC GAA CGU GUC ACG UUU) verwendet. Als HuR-siRNA wurde HuR#1 (Qiagen), Sequenz im kodierenden Bereich von HuR (Sequenz des Sense-Stranges GAG GCA AUU ACC AGU UUC A) verwendet.

Nach ca. 16 Stunden wurde je 1,5 ml Komplettmedium hinzugefügt. Acht Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Komplettmedium versetzt. Am Tag vor der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und in serumfreiem Komplettmedium inkubiert. Die Lyse der Zellen nach den entsprechenden Experimenten erfolgte schließlich ca. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion.

2.2 Proteinanalytik

2.2.1 Protein-Quantifizierung nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die mit 0,5%-iger SDS-Lösung auf Eis erzeugten und bei -20 °C aufbewahrten Zelllysate wurden zunächst für ca. 5s sonifiziert und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, 4 °C) von Zelltrümmern bereinigt. Die Proben wurden mit einem DC (dertegenskompatiblen) Protein-Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 96-well-Platten nach Angaben des Herstellers behandelt. Anschließend wurde die Absorption bei 750 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration aus dieser Absorption wurde mittels der bei jeder Messung mit BSA-Standardlösungen

(0-5 mg/ml) erzeugten Eichgeraden vorgenommen. Je Probe wurden 10 µg Gesamt-Protein mit 4x Laemmli-Probenpuffer verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen Gelelektrophorese-System (Laemmli, 1970), bestehend aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proteine und einem Trenngel zur Auftrennung.

Vor dem Auftragen wurden die Proben in Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde vertikal mit einer Novex Mini Cell-Apparatur (Invitrogen, Carlsbad, USA) in Elektrophoreselaufpuffer bei einer maximalen Stromstärke von 35 mA/Gel durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgetragen, Prestained Protein (BioLabs).

4x Laemmli-Probenpuffer

250 mM Tris-HCl (pH 8)

20 % (w/v) Glycerol

5 % (w/v) SDS

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

100 mM DTT (Dithiothreitol)

Elektrophoreselaufpuffer (pH 8,3)

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

0,5 % (w/v) SDS

Trenngel, 10 % (w/v) Acrylamid

2,7 ml dH₂O

4 ml Trenngelpuffer

3,3 ml PAA (Polyacrylamid) Stammlösung

2,5 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin)

31 µl APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel, 5 % (w/v) Acrylamid

2,3 ml dH₂O

0,8 ml Sammelgelpuffer

0,6 ml PAA Stammlösung

2,5 µl TEMED

31,1 µl APS

Trenngelpuffer (2,5x)

1,9 M Tris (pH 8,9)

0,25 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer (5x)

0,3 M Tris/HCl (pH 6,7)

0,5 % (w/v) SDS

PAA Stammlösung (Roth, Karlsruhe)

30 % (w/v) Acrylamid

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

APS

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

2.2.3 Western-Blot

Für den Transfer der Proteine von SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen wurden Novex Mini Cell-Tank-Blot-Apparaturen (Invitrogen) gebraucht. Gel-Blotting-Papiere (Roth) und Hybond™-P PVDF-Membranen (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, UK) wurden mindestens 15 Minuten in Blot-Transferpuffer eingelegt. Die PVDF-Membranen wurden zuvor für 20 s mit Methanol versetzt.

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

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

Der Elektrotransfer erfolgte in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,5) für 150 min bei 25 V.

2.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (MMP) gelöst in TBS-T-Puffer geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen dreimal 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundärem Antikörper-HRP-Konjugat (s. **Tab. 2.1**) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T-Puffer (3-6x 10 min) wurde das nachzuweisende Protein mit Hilfe des ECL-System SuperSignal® West Pico (Pierce, Rockford, USA) oder im Falle der Cyclooxygenase-2 SuperSignal® West Femto (Pierce) detektiert. Der Gebrauch erfolgte nach Herstellerangaben, die Dokumentation durch das Belichten eines Röntgenfilms (Amersham).

TBS-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)

137 mM NaCl

TBS-T-Puffer

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

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Antikörper (in TBS-T verdünnt)

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-COX-2	Cayman (#160112)/Maus	1:1000 in 5% MMP/TBST
Anti-HuR	Santa Cruz (#sc-5261)/Maus	1:1000 in 5% MMP/TBST
Anti-GAPDH	Chemicon (#MAB374)/Maus	1:16000 in 5% MMP/TBST
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus-HRP	Amersham (#NA931V)/Schaf	1:5000 in 5% MMP/TBST

2.2.5 „Strippen“ von PVDF-Membranen

Zum Ablösen von gebundenen Antikörpern wurde die jeweilige Membran für 30 Minuten in Stripping-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten konnte die Membran erneut geblockt werden (s. **Kap. 2.2.4**).

Stripping-Puffer

25 mM Glycin-HCl (pH 2)

1 % (w/v) SDS

2.3 RNA-Analytik

2.3.1 RNA-Isolation und Quantifizierung

Es wurde das „Rneasy-mini“-Kit (Quiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C eingefroren oder direkt quantifiziert. Um die RNA-Konzentration zu ermitteln, wurden je 3 μl 1:50 in bidest. H_2O verdünnt und an einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) photometrisch bei 260 nm gegen bidest. H_2O als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1 entsprach dabei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

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

Reverse Transkription

Um RNA mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umzuschreiben wurde das Omniscript RT-Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Neben den Komponenten aus dem Kit wurden des Weiteren Oligodesoxythymidin (dT16, Invitrogen) sowie RNase-Inhibitor (RNaseOUT™; Invitrogen) verwendet. Die einstündige Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37°C im Thermocycler T-Personal (Biometra, Göttingen). Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Realtime-PCR Analysen wurden mit einem LightCycler unter Verwendung des „FastStart DNA Master SYBR Green I PCR Master Mix“-Kits von Roche (Penzberg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Wurden 0,5 µg RNA in die Reverse Transkription (2.3.3) eingesetzt, so wurde die cDNA 1:3 in bidest H₂O verdünnt. Pro Realtime-PCR-Ansatz wurden 4 µl der verdünnten cDNA eingesetzt.

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Primer

Genprodukt	Primerpaare	Amplifikatgröße (bp)
COX-2	5'-cttcacgcatcagttttcaag-3' 3'-tcaccgtaaataatgatttaagtccac-5'	96
HuR	5'-gggtcctcgtggatcagac-3' 3'-gggggttatgaccattgaa-5'	112
CYP1a1	5'-tccaagagtccaccctcc-3' 3'-aagcatgatcagttagggatct-5'	72
HPRT	5'-gaccagtcaacaggggacat-3' 3'-gtgtcaattatatctccacaatcaag-5'	95

Der Ablauf des Programms für die Amplifikation ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tabelle 2.3 Ablauf der Realtime-PCR (eines Zyklus)

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
Initiale Denaturierung	95	10min
Denaturierung	95	5s
Annealing	59	5s
Elongation	72	5s

Abweichend von der Tabelle betrug die Annealingzeit für HuR 6s. Die Amplifikation erfolgte stets in 50 Zyklen durch Repetition der Schritte zwei bis vier, gefolgt vom Aufschmelzen der Amplifikate. Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der zum LightCycler gehörigen Software.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese fand in der vorliegenden Arbeit ihre Anwendung nach RNA-Isolation (**Kap. 2.3.1**) und bei der Analyse von Produkten der PCR (**Kap. 2.3.2**).

Die Matrix der Gele bestand aus 1% (w/v) Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer). Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Die aufgekochte Agaroselösung wurde auf unter 60°C abgekühlt und dann mit Gelred Nucleic Acid Stain (Biotium) 1:10000 versetzt.

Nach Zugabe von DNA-Probenpuffer wurden die Proben in die Taschen der ausgehärteten Agarose-Gele appliziert. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von 75 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Zur Dokumentation der Gele diente eine FluoroChem™ 8900-Anlage (Alpha Innotech, San Leandro, USA).

TAE-Puffer (pH 8,3)

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

5x DNA-Probenpuffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1 mM EDTA

30 % (v/v) Glycerol

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.4 Densitometrische Auswertung

Für densitometrische Analysen der Ergebnisse der Western-Untersuchungen wurde die Analyse Funktion „Spot Denso“ des Programms AlphaEaseFC (FluorChem 8900, Alpha Innotech) verwendet. Die Werte zu den jeweiligen Banden wurden zunächst auf den Hintergrund, dann auf die zugehörigen Werte zu den Ladungskontrollen normiert.

2.5 Statistische Auswertung

Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte durch einen ANOVA-Test, gefolgt von einem Student Newman Keuls Post-Test. Vor der Studie wurde $P < 0.05$ als Maß für Signifikanz festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von UVB auf HaCat-Zellen: Induktion der COX-2

3.1.1 Charakterisierung der COX-2-Induktion durch UVB

Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Induktion durch UVB in HaCat-Zellen wurde sowohl für COX-2-mRNA als auch für COX-2-Protein charakterisiert. Dazu wurde jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten Gesamtprotein bzw. -RNA isoliert und über Western-Blot bzw. quantitative RT-PCR analysiert (s. **Kap. 2.3**). Die Zellen wurden mit PBS bedeckt und mit einer Dosis von 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen für ca. 24 Stunden serumdepletiert. Soweit nicht anders erwähnt, wurden diese Bestrahlungsbedingungen in allen Experimenten beibehalten.

Diese Bestrahlungsbedingungen waren subtoxisch: mittels MTT-Test war zuvor festgestellt worden, dass 8h und 24 h nach Bestrahlung von Zellen mit einer Dosis von 100 J/m^2 90% bzw 75% der Zellen metabolisch aktiv sind (Fernau, 2009).

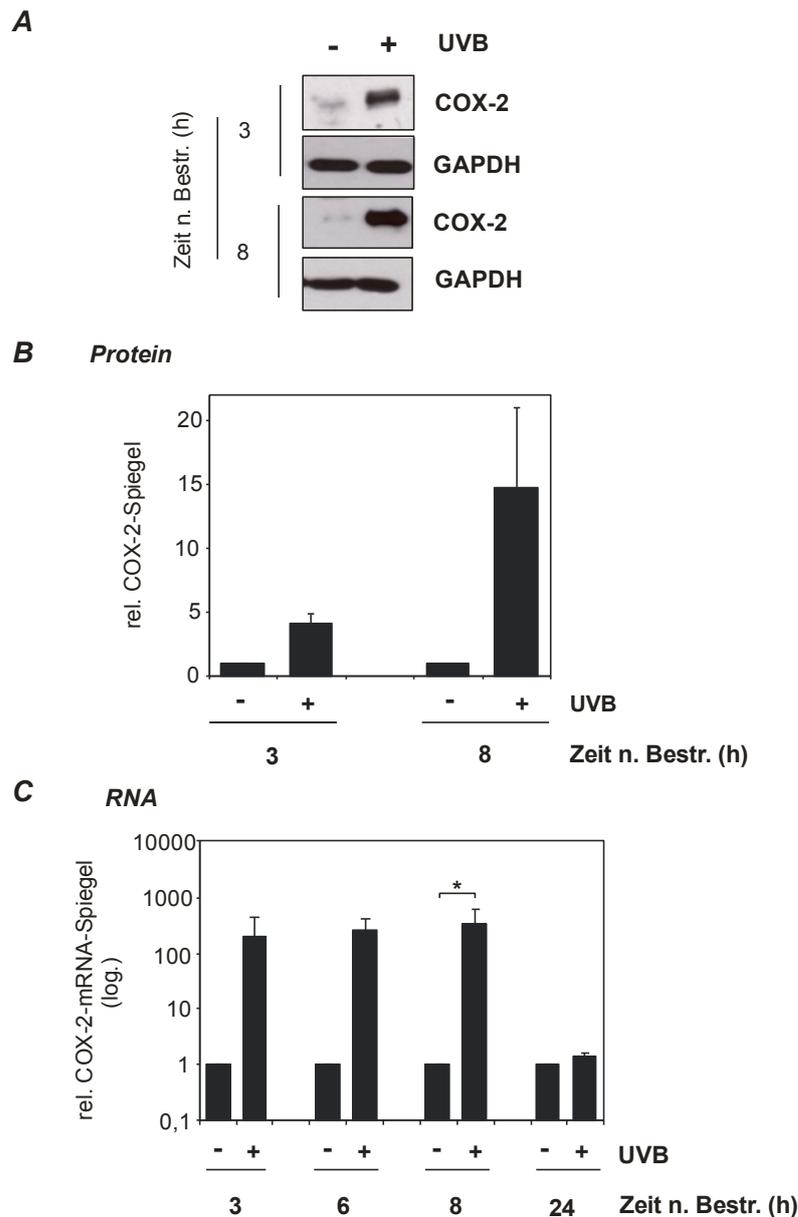


Abb. 3.1: Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Expression in HaCat-Zellen durch UVB.

(A) HaCat-Zellen wurden nach 24h-stündiger Serumdepletion mit PBS bedeckt und mit 100 J/m^2 bestrahlt oder scheinbestrahlt. Es wurde 3 bzw. 8 Std. nach Bestrahlung lysiert und mittels Western-Blot auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der Blot ist repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche. (B) Densitometrische Auswertung des unter (A) beschriebenen Experiments. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Abweichung vom Mittelwert aus 2 voneinander unabhängigen Versuchen. (C) HaCat-Zellen wurden wie unter (A) behandelt und nach den angegebenen Zeiten die Gesamt-RNA isoliert. Dargestellt ist das Ergebnis der realtime-PCR auf die mRNA zu COX-2, normiert auf HPRT (Ladekontrolle). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$).

Wie **Abb. 3.1** zu entnehmen ist, führte UVB-Exposition zu einer zeitabhängigen, deutlichen Steigerung der Spiegel von COX-2-Protein und -mRNA gegenüber Kontrollbedingungen. Die Ladekontrollen, GAPDH bzw. HPRT, veränderten sich nicht. Bereits nach 3 Stunden konnte eine Zunahme an COX-2-Protein und -mRNA nachgewiesen werden. Die Proteinexpression ist maximal vierfach erhöht, wohingegen die COX-2-mRNA bis zu dreihundertfach gegenüber der Kontrolle gesteigert ist.

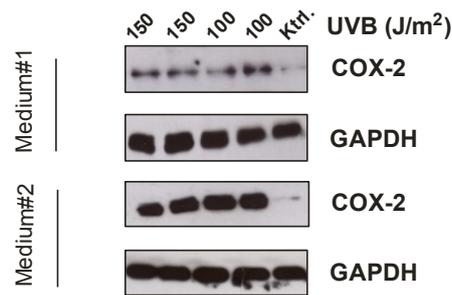
Der Maximaleffekt innerhalb der untersuchten Zeitpunkte wurde für COX-2-Expression sowohl auf Protein- (bis zu 14-fach erhöht) als auch auf mRNA-Ebene (bis zu 700-fach erhöht) bei 8 Stunden nach Bestrahlung erreicht. Für alle weiteren Experimente wurde somit der Zeitpunkt von 8 Stunden nach Bestrahlung, soweit nicht anders erwähnt, festgelegt.

Zur Festlegung der für weitere Experimente zum molekularen Mechanismus der UVB-induzierten COX-2-Expression geeigneten Bedingungen sollte der Einfluss des Inkubationsmediums im Zeitraum von Bestrahlung bis Lyse untersucht werden.

Dazu wurde untersucht, welchen Effekt Wiederverwendung von serumdepletiertem Medium, in dem die Zellen bereits vor Bestrahlung seit 24 Stunden inkubierten („konditioniertes Medium“), auf die COX-2-Induktion hat. Hierzu wurde das Medium vor Bestrahlung abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch PBS bestrahlt und dann das alte Medium wieder auf die Zellen gegeben.

Die anschließende Western-Blot-Analyse ergab das in **Abb. 3.2** gezeigte Bild.

A



B

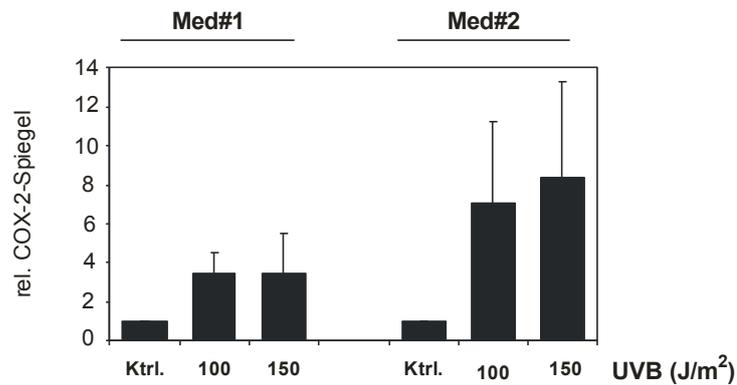


Abb. 3.2: Einfluss des Inkubationsmediums auf die COX-2-Expression nach UVB-Bestrahlung

(A) HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² und 150 J/m² durch eine Schicht aus PBS hindurch bestrahlt. Nach Bestrahlung wurde entweder konditioniertes Medium (Medium#1) oder frisches serumfreies Medium (Medium#2) auf die Zellen gegeben. 8 Std. nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Versuche. **(B)** Densitometrische Auswertung des unter (A) beschriebenen Experiments. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

Die Analysen der Western Blots zeigen, dass durch frisches, serumfreies Medium etwa doppelt so hohe COX-2-Spiegel durch UVB-Bestrahlung erreicht werden wie mit konditioniertem Medium. HaCat-Zellen wurden deshalb 24 Stunden vor Bestrahlung serumdepletiert, um nicht durch die im fötalen Kälberserum (FCS) enthaltenen Wachstumsfaktoren eine basal gesteigerte COX-2-Expression hervorzurufen und auch nach Bestrahlung in serumfreiem Medium inkubiert, d.h. in allen Experimenten wurde nach Bestrahlung serumfreies Komplettmedium frisch auf die Zellen gegeben.

Weiter sollte die Dosisabhängigkeit der COX-2-Induktion durch UVB zu einem festen Zeitpunkt von 8 Stunden nach der Bestrahlung analysiert werden.

HaCat-Zellen wurden UVB-Dosen von 100 J/m^2 und 150 J/m^2 ausgesetzt. Den Proteingehalt von COX-2 in Abhängigkeit zur UVB-Dosis zeigt **Abb. 3.2** (Med#2), für den mRNA-Spiegel **Abb. 3.3**.

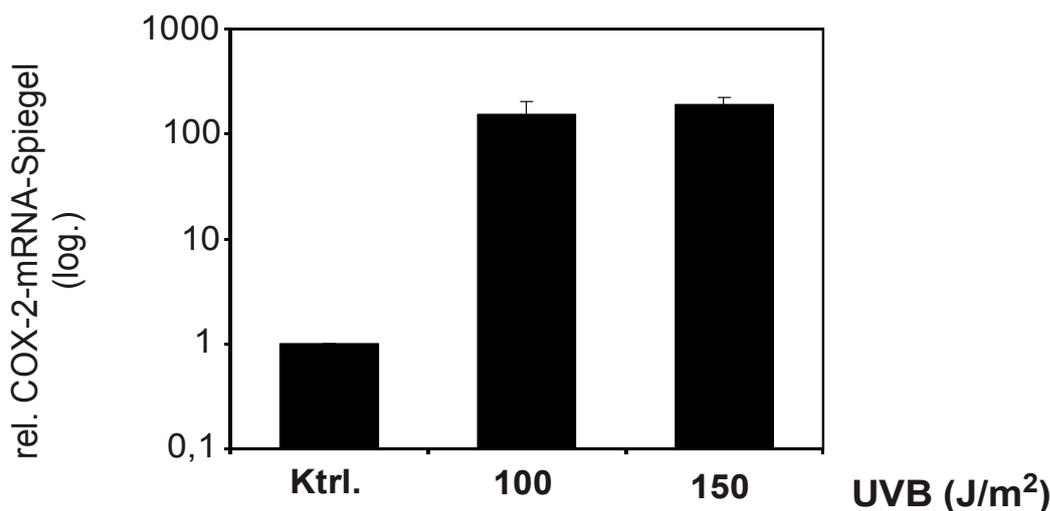


Abb. 3.3 Dosisabhängigkeit der COX-2-Induktion durch UVB HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit PBS bedeckt und mit 100 J/m^2 und 150 J/m^2 bestrahlt. 8 Std. nach Bestrahlung wurde die Gesamt-RNA isoliert. Gezeigt ist das Ergebnis der reversen Transkription mit anschließender realtime-PCR auf die mRNA zu COX-2 normiert auf HPRT (Ladekontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Abweichung vom Mittelwert aus Doppeltbestimmungen zweier unabhängiger Versuche.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die von 100 J/m^2 auf 150 J/m^2 um 50 % erhöhte UVB-Dosis sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene eine nur gering gesteigerte Zunahme der COX-2-Expression zur Folge hat. 150 J/m^2 UVB ist wie in 3.1.1 beschrieben für HaCat-Zellen nicht toxisch.

Zusammenfassen lässt sich, dass die UVB-induzierte COX-2-Protein- und -mRNA-Expression in HaCat-Zellen eine vergleichbare Zeitabhängigkeit mit Maximum bei ca. 8 Stunden nach Bestrahlung aufweist. Die Protein-Expression ist zusätzlich gesteigert durch Verwendung von frischem, serumfreiem Medium zur Inkubation nach UVB-Bestrahlung im Vergleich zu konditioniertem Medium. Keinen signifikanten Effekt hat die Dosiserhöhung von UVB von 100 J/m^2 auf 150 J/m^2 . Für alle weiteren Experimente wurde deshalb, soweit nicht anders

angegeben, mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach Bestrahlung in frischem serumfreiem Medium inkubiert und nach 8 Stunden lysiert.

3.1.2 Der Einfluss von UVB auf das mRNA Bindeprotein HuR

HuR ist als RNA-stabilisierendes Protein bekannt (Dixon et al., 2001; Ma et al., 1996) (vgl. **Kap. 1.3.1**). Da der Einfluss von HuR auf die UVB-induzierte COX-2-Expression durch Proteindepletion von HuR mittels siRNA untersucht werden sollte (**Kap. 3.3.1**), sollte zunächst getestet werden, ob UVB-Bestrahlung in HaCat-Zellen einen Effekt auf die HuR-Spiegel hat.

HaCat-Keratinocyten wurden 24 Stunden vor Exposition serumdepletiert und dann mit UVB bestrahlt. Die Zellen wurden mit verschiedenen UVB-Dosen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung lysiert und mittels RT-PCR auf HuR-mRNA analysiert. Das Resultat ist in **Abb. 3.4** zu sehen.

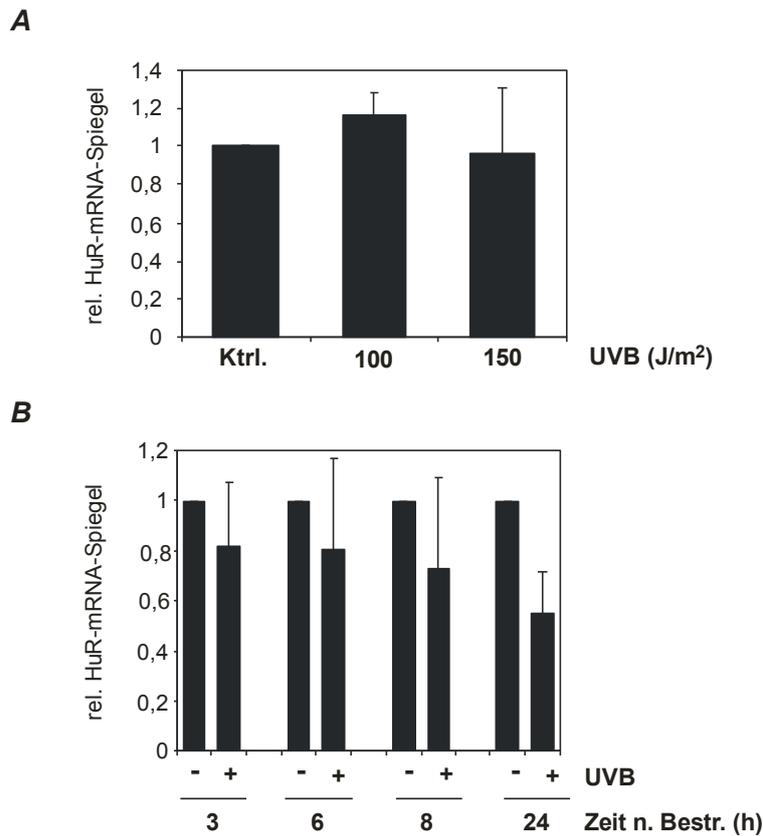


Abb. 3.4: Einfluss von UVB auf HuR in HaCat-Zellen (A) Nach 24-stündiger Serumdepletion wurde mit 100 J/m² oder 150 J/m² UVB bestrahlt. 8 Std. nach Bestrahlung wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und der relative mRNA-Spiegel von HuR bezogen auf HPRT (Ladekontrolle) mittels realtime-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Abweichung vom Mittelwert aus Doppelbestimmungen zweier unabhängiger Experimente. **(B)** HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion mit 100 J/m² UVB bestrahlt und nach den angegebenen Zeiten lysiert. Gezeigt ist das Ergebnis der HuR realtime-PCR normiert auf HPRT (Ladekontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

Abb. 3.4 A zeigt, dass es nach UVB-Bestrahlung mit den hier verwendeten Dosen nach acht Stunden zu keiner deutlichen Veränderung des HuR-Spiegels kommt. Auch in **Abb. 3.4 B** verändert sich der HuR-mRNA-Gehalt nach UVB-Bestrahlung mit 100 J/m² zunächst nicht signifikant gegenüber der Kontrollbehandlung. 24 Stunden nach Bestrahlung sinken jedoch die HuR-mRNA-Spiegel etwa auf die Hälfte gegenüber der Kontrollbehandlung ab. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass UVB bis 8 Stunden nach Bestrahlung keinen Effekt auf den HuR-mRNA-Spiegel hat. Für HuR-Protein-Spiegel wurden diese Versuche wiederholt, allerdings ohne verwertbares Ergebnis.

3.2 Wirkung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf HaCat-Zellen: Induktion der COX-2

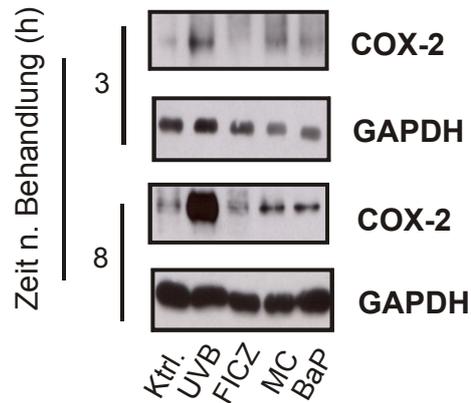
3.2.1 Charakterisierung der COX-2-Induktion durch PAK

Es ist bekannt, dass polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) als Liganden des Arylkohlenwasserstoff-Rezeptors (AhR) Enzyme des Fremdstoffmetabolismus induzieren können. Zu den bekanntesten zählt Cytochrom P450 1a1 (s. **Kap. 3.4**). In diesem Teil der Arbeit soll zunächst der Effekt von PAK auf die COX-2-Induktion in HaCat-Zellen untersucht werden.

Bei den Vertretern der verwendeten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe handelt es sich um den synthetischen Kohlenwasserstoff 3-Methylcholanthren (MC) und das bei Verbrennungsprozessen entstehende Benzo(a)pyren (BaP). Zusätzlich wurde der Effekt eines Tryptophanderivats, 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), untersucht, der die Aktivierung des AhR induziert.

HaCat-Zellen wurden 24 Stunden vor Behandlung serumdepletiert und dann mit 100 nM FICZ, 10 µM 3-MC und 10 µM BaP (jeweils Endkonzentrationen, verdünnt aus Stammlösungen in DMSO) behandelt. Inkubiert wurde in serumfreiem Komplettmedium bis zur Lyse. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert und Western-Blot- und quantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Die Daten der Behandlung mit DMSO als Kontrolle wurden gleich eins gesetzt. Dies gilt für alle nachfolgenden Experimente, in denen mit FICZ, MC und BaP gearbeitet wurde.

A



B

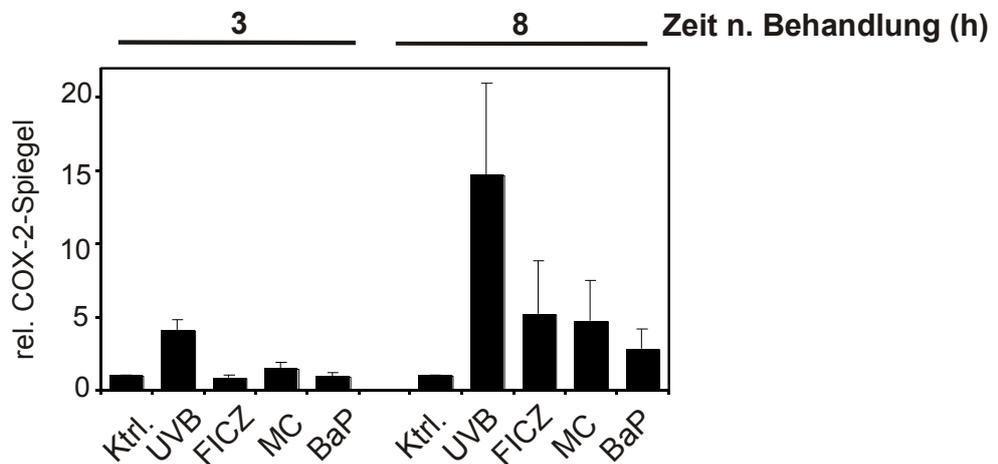


Abb. 3.5 Zeitabhängigkeit der Bildung von COX-2-Protein nach Belastung mit PAK und FICZ
(A) HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 µM MC oder 10 µM BaP behandelt bzw. mit UVB bestrahlt. 3 bzw. 8 Std. nach Behandlung wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurde mittels Western-Blot auf COX-2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für 2 voneinander unabhängige Versuche. **(B)** Densitometrische Auswertung des unter (A) beschriebenen Experiments. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

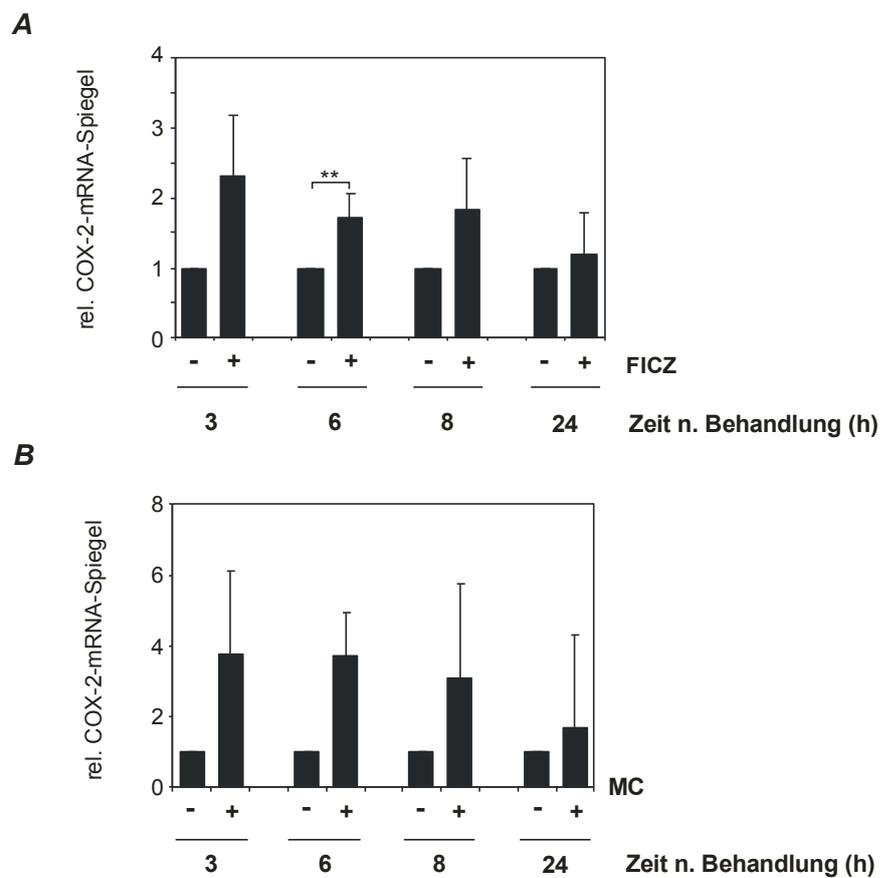
In **Abb. 3.5** konnte eine zeitabhängige COX-2-Induktion durch PAK und FICZ nachgewiesen werden. Man erkennt eine gesteigerte Zunahme des COX-2-Proteingehalts nach 8 Stunden Behandlung im Vergleich zu 3 Stunden nach Behandlung.

Zusätzlich kann in **Abb. 3.5** das Ausmaß der PAK-induzierten im Vergleich zur UVB-induzierten COX-2-Expression verglichen werden. UVB induziert zu beiden

Zeitpunkten COX-2 wesentlich stärker als polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe oder FICZ.

Für alle nachfolgenden Experimente wurde zur Analyse des COX-2-Proteinspiegels durch FICZ, MC und BaP entsprechend diesen Ergebnissen der Zeitpunkt von 8 Stunden nach Behandlung gewählt.

Abb. 3.6 zeigt die Ergebnisse der Analyse des COX-2 mRNA-Spiegels.



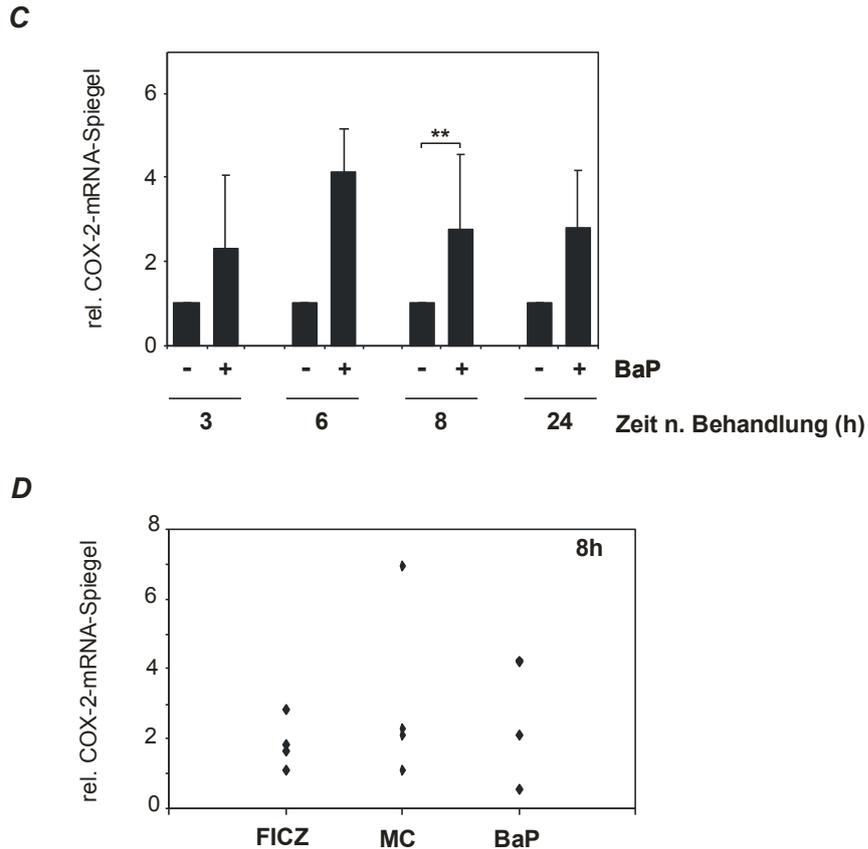


Abb. 3.6: COX-2-Induktion durch AhR-Agonisten HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 μ M MC oder 10 μ M BaP behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Gezeigt ist das Ergebnis der reversen Transkription mit anschließender realtime-PCR auf die mRNA zu COX-2 normiert auf HPRT (Ladekontrolle). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 4 (3 und 8 Std.) bzw. 3 (6 und 24 Std.) voneinander unabhängigen Versuchen. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Die quantitative RT-PCR ergab eine deutliche Induktion der COX-2-Expression durch FICZ und MC nach 3-8 Stunden, nach 24 Stunden sind die COX-2-mRNA-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr sichtbar erhöht (**Abb. 3.6**). Für die BaP-induzierte COX-2-Expression werden signifikant erhöhte COX-2-Spiegel nach 8 Stunden erreicht.

Da zu einem Zeitpunkt von 8 Stunden Behandlungsdauer sowohl für FICZ, MC als auch BaP gesteigerte COX-2-mRNA-Expression nachweisbar war, wurden die Zellen in allen weiteren Experimenten nach einer Behandlung von 8 Stunden lysiert.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigt sich, dass die Induktion der COX-2 durch UVB weitaus stärker ist als durch PAK und FICZ (**Abb. 3.5** und **3.6**).

Zusammenfassen lässt sich, dass PAK und FICZ COX-2 in HaCat-Zellen nachweisbar induzieren. Auffällig ist, dass COX-2-Protein- und -mRNA-Spiegel in deutlich geringerem Ausmaß gesteigert werden als durch UVB-Bestrahlung.

3.2.2 Einfluss von PAK und FICZ auf HuR

Vor Analyse des Einflusses von HuR auf den COX-2-Signalweg sollte untersucht werden, ob Stimulation von HaCat-Zellen mit AhR-Agonisten zu einer Veränderung des HuR-Spiegels führt.

Abb. 3.7 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen für die Behandlung mit FICZ, MC und BaP nach 3, 6, 8 und 24 Stunden. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels RT-PCR auf HuR und HPRT (Ladekontrolle) untersucht.

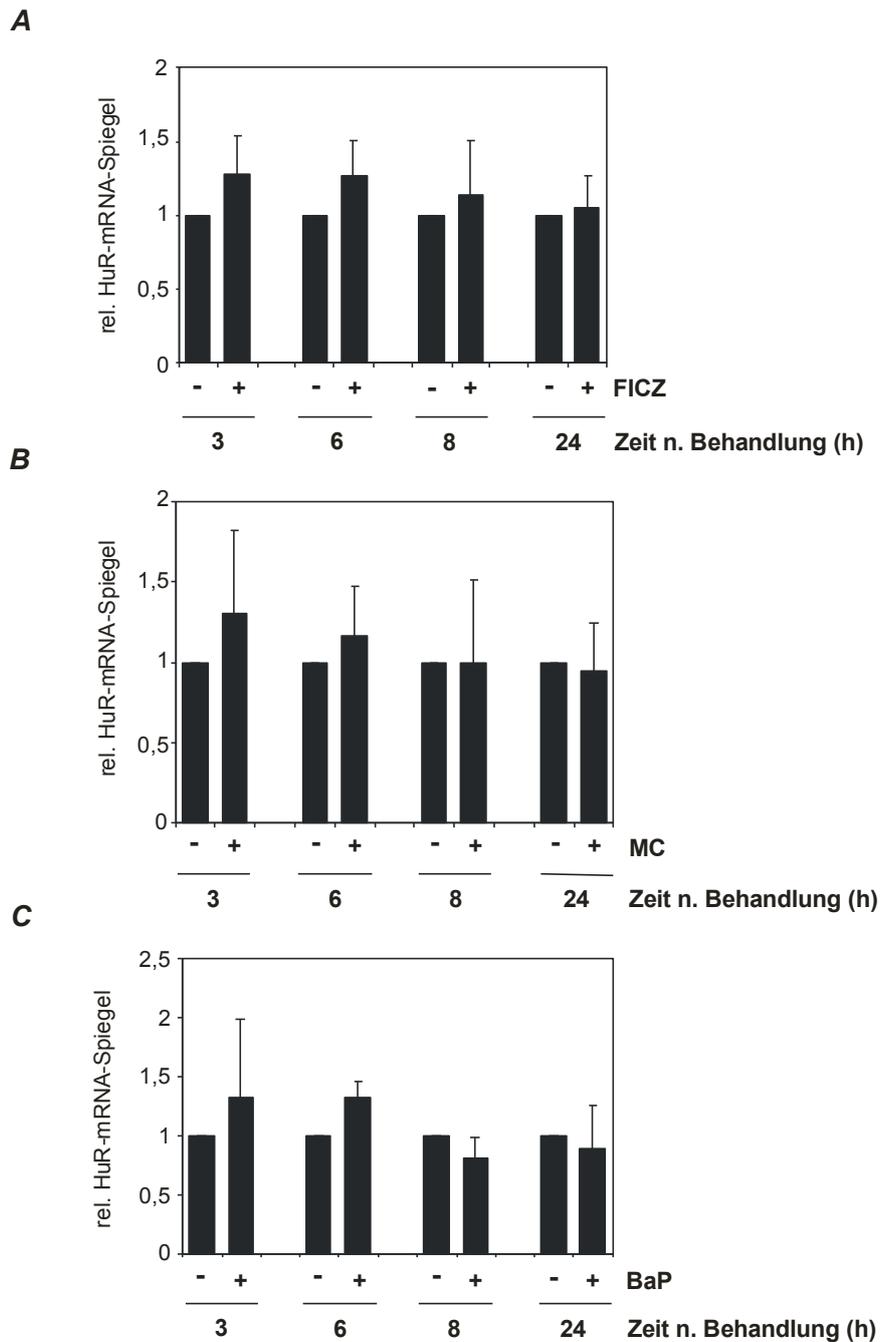


Abb. 3.7: Einfluss von PAK auf HuR in HaCat-Zellen HaCat-Zellen wurden nach 24-stündiger Serumdepletion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 μ M MC oder 10 μ M BaP behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA isoliert. Gezeigt ist das Ergebnis der realtime-PCR-Analyse auf die mRNA von HuR normiert auf HPRT (Ladekontrolle). Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 4 (3 und 8 Std.) bzw. 3 (6 und 24 Std.) voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung mit PAK in den hier verwendeten Dosen hatte keine signifikanten Veränderungen des mRNA-Spiegels von HuR zur Folge. HuR-mRNA-Expression wird also durch FICZ, MC und BaP nicht signifikant beeinflusst. Für HuR-Protein-

Expression wurden diese Versuche wiederholt, allerdings ohne verwertbares Ergebnis.

3.3 Bedeutung des RNA-Bindeproteins HuR für die COX-2-Induktion

3.3.1 HuR und UVB-induzierte COX-2-Expression

Von HuR war bereits bekannt, dass es durch UVB-Bestrahlung zwar nicht induziert (vgl. **Kap. 3.1.2**) aber aktiviert werden kann und die UVB-vermittelte molekulare Signalkaskade von COX-2 moduliert (Fernau et al., 2009). Diese Funktion von HuR sollte bezüglich der Induktion von COX-2 durch AhR-Liganden im untersuchten System auf Protein- und RNA-Ebene gezeigt werden.

Um festzustellen, welchen Einfluss HuR auf die COX-2-Expression hat, wurde der zelluläre HuR-Spiegel mittels siRNA verringert. Das Verfahren der Depletion von HuR mittels siRNA wurde für alle weiteren Experimente wie in **Kap. 2.1.5** beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle zu der im kodierenden Bereich der HuR-mRNA komplementären siRNA wurde mit nicht depletierender siRNA transfiziert, um unspezifische Effekte auszuschließen.

Die Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt und nach 8 Stunden, d.h. 72 Stunden nach Beginn der Transfektion lysiert. Die Lysate wurden durch Western-Blot auf COX-2, HuR und GAPDH (Ladekontrolle) analysiert.

Ergebnisse

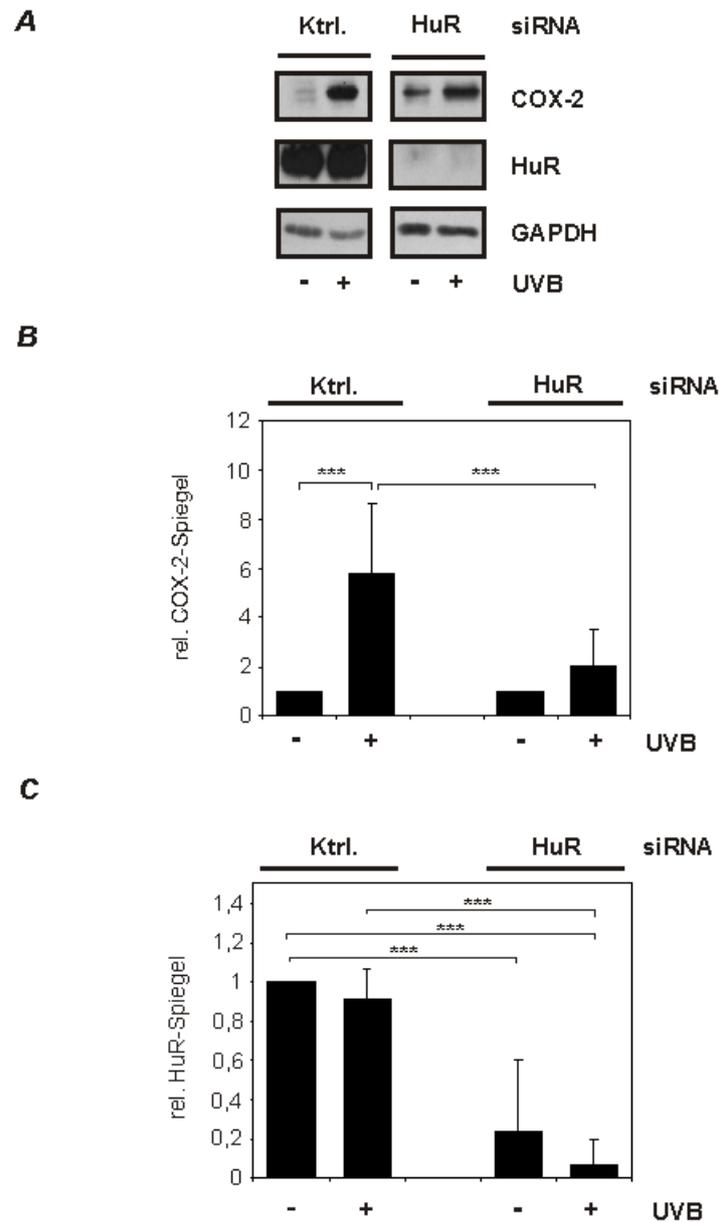
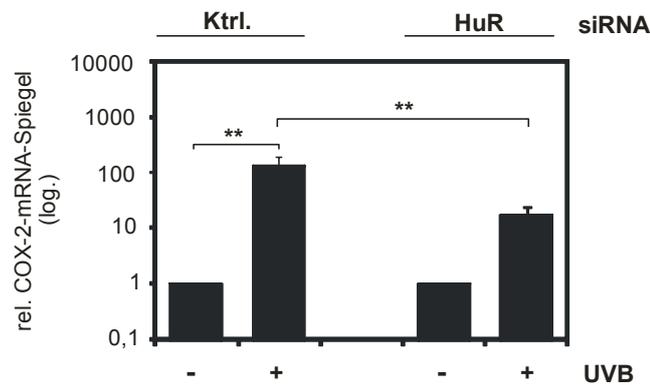


Abb. 3.8: Einfluss von HuR auf die Induktion von COX-2 durch UVB (A) HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. Die Zellen wurden 48 Std. nach Transfektion für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektionsbeginn mit 100 J/m^2 UVB durch PBS bestrahlt und nach weiteren 8 Std. lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot auf COX-2, HuR und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 7 voneinander unabhängige Experimente. **(B) & (C)** Densitometrische Auswertung des in (A) beschriebenen Versuchs für die COX-2- und HuR-Expression. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 7 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

Abb. 3.8 C ist zu entnehmen, dass die Depletionseffizienz für HuR bei mindestens 70 % lag. Nach Depletion von HuR ist im Vergleich zur bestrahlten Kontroll-Behandlung die UVB-induzierte COX-2-Expression signifikant, von einer 5-fachen auf eine 2-fache Erhöhung des COX-2-Proteingehaltes gesunken. Dies bestätigt die wichtige Regulatorfunktion von HuR in der zur COX-2-Expression führenden Signalkaskade.

Auch auf mRNA-Ebene kommt es zu einem vergleichbaren Ergebnis für COX-2 und HuR (**Abb. 3.9**).

A



B

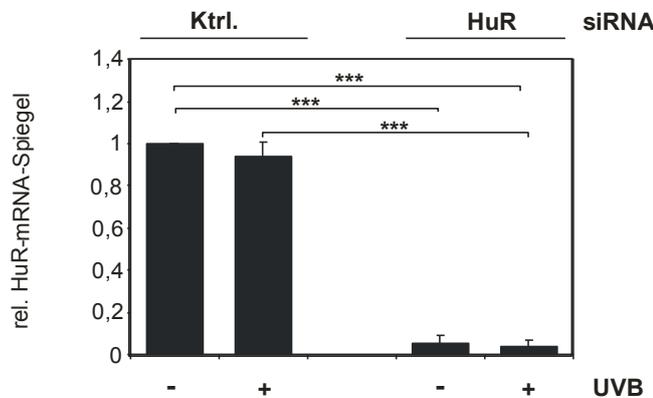


Abb. 3.9: Einfluss von HuR auf die Induktion von COX-2-mRNA durch UVB HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt und nach 8 Std. wurde die Gesamt-RNA isoliert. Mittels realtime-PCR wurde mRNA zu COX-2, HuR und HPRT (Kontrolle) untersucht. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (*P<0,05; **P<0,01, ***P<0,0001).

HuR ist in HaCat-Zellen für die UVB-induzierte COX-2-Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene ein wichtiger Regulator. Die Reduktion von COX-2 nach Depletion von HuR diente in den folgenden Experimenten unter anderem zur Kontrolle, ob die Transfektion mit siRNA erfolgreich war.

3.3.2 Modulation der PAK-induzierten COX-2-Expression durch HuR

Es stellte sich die Frage, ob HuR auch in der durch AhR-Agonisten induzierten COX-2-Expression von Bedeutung ist. Um dies zu untersuchen, wurde HuR in HaCat-Zellen wie in **Kap. 3.3.1** beschrieben mittels siRNA depletiert und die Zellen für 8 Stunden mit FICZ, MC und BaP behandelt. Die Depletionseffizienz betrug für die folgenden Versuche mindestens 60 % und im Mittel 76 %.

In **Abb. 3.10** ist neben einem repräsentativen Western Blot die densitometrische Auswertung der COX-2- und HuR-Spiegel nach Behandlung mit PAK und FICZ dargestellt.

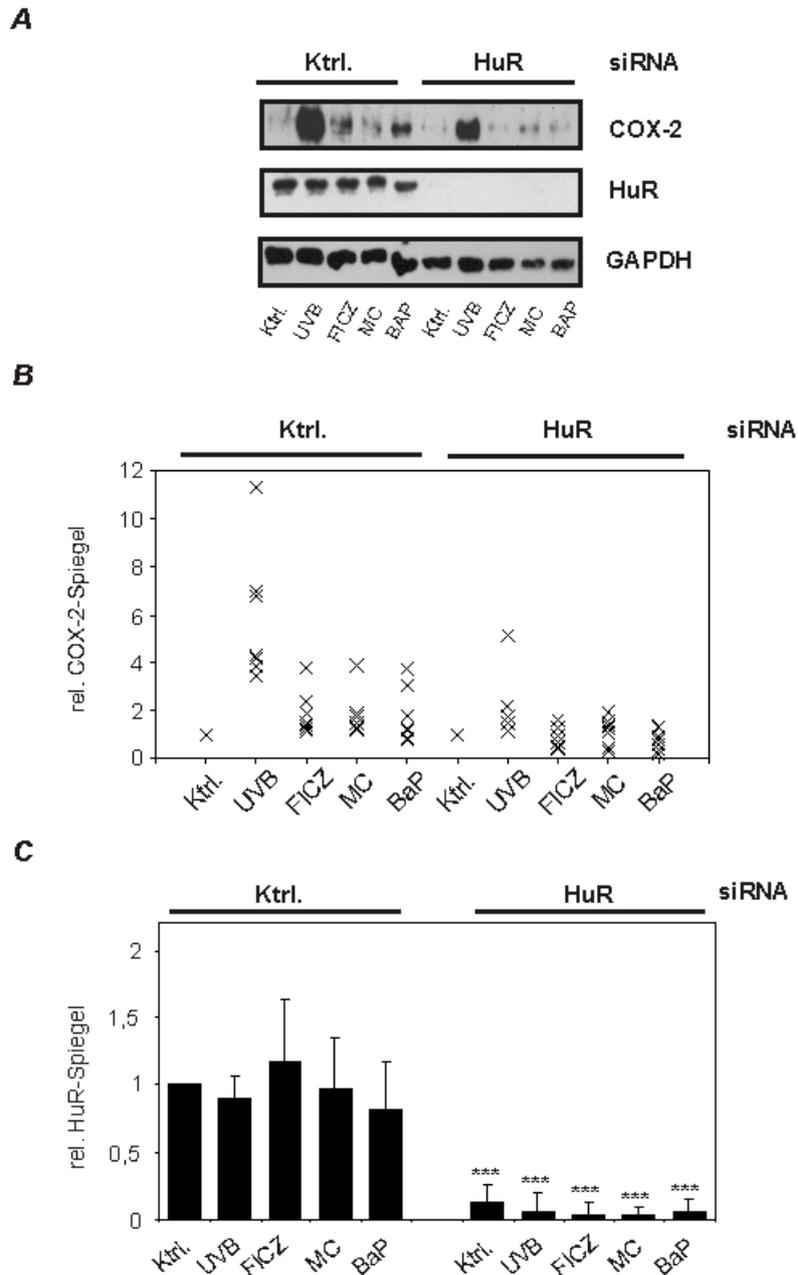


Abb. 3.10: Einfluss von HuR auf die Induktion von COX-2 durch PAK (A) HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 μ M MC und 10 μ M BaP behandelt bzw. mit UVB bestrahlt und nach 8 Std. lysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot auf COX-2, HuR und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für 7 voneinander unabhängige Experimente. **(B) & (C)** Densitometrische Auswertung des in (A) beschriebenen Versuchs für die COX-2- und HuR-Expression. Die gezeigten Werte sind aus 7 voneinander unabhängigen Experimenten, in (C) als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

Den Diagrammen in **Abb. 3.10** ist zu entnehmen, dass sich Depletion von HuR auf das Ausmaß der durch FICZ, MC und BaP induzierten COX-2-Expression auf Proteinebene auswirkt. Man erkennt für die Behandlung mit FICZ und BaP im Durchschnitt eine Verringerung des COX-2-Proteingehalts um etwa 60 % im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die MC-induzierte COX-2-Proteinexpression verringert sich nach Depletion von HuR um etwa 40 %. Die detektierte Abnahme des COX-2-Protein-Gehaltes bei Verwendung von HuR-siRNA im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Ktrl-siRNA ist nicht statistisch signifikant, es ist lediglich eine Tendenz zu erkennen. Depletion von HuR führt also zu einer geringeren Induzierbarkeit von COX-2.

Im Folgenden wurde untersucht, ob dieser Effekt auch für COX-2-RNA gezeigt werden kann. **Abb. 3.11** sind die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analysen zu entnehmen.

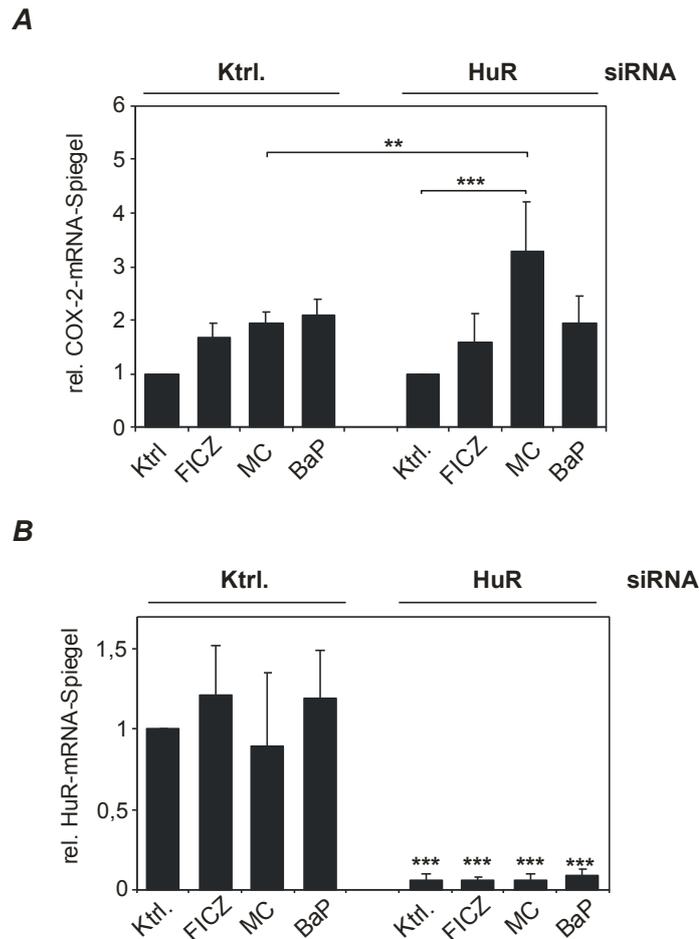


Abb. 3.11: Einfluss von HuR auf die Induktion von COX-2-mRNA durch PAK HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 μ M MC und 10 μ M BaP behandelt und nach 8 Std. lysiert. Die Lysate wurden mittels realtime-PCR auf COX-2, HuR und HPRT (Ladekontrolle) untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0001$).

Vergleicht man das durch PAK und FICZ induzierte Ausmaß der COX-2-mRNA-Expression (s. **Abb. 3.6**) mit den COX-2-mRNA-Spiegel in mit Ktrl.-siRNA behandelten Zellen, fällt auf, dass sich die COX-2-Induzierbarkeit verringert.

Durch Behandlung mit FICZ wird die COX-2-Expression in mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle induziert. In mit HuR-siRNA transfizierten Zellen wird im Mittel derselbe COX-2-Spiegel erreicht. Die Depletion von HuR scheint für das Ausmaß der Induktion auf mRNA-Ebene durch FICZ nicht von Bedeutung zu sein.

Die durch MC erzielte relative Steigerung der COX-2-mRNA lag bei einer 2-fachen Erhöhung gegenüber der DMSO-Behandlung bei Anwesenheit von HuR. Ist HuR depletiert, ist dagegen im Mittel eine etwa 3-fache Erhöhung detektierbar, d.h. das Ausmaß der COX-2-mRNA-Expression wird signifikant gesteigert.

Ähnlich wie die Behandlung mit FICZ resultiert auch die Behandlung mit BaP in keiner signifikanten Erniedrigung des COX-2-mRNA-Spiegels nach Transfektion mit HuR-siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HuR nicht die durch FICZ, MC und BaP induzierte, zur COX-2-mRNA-Bildung führende Signalkaskade in HaCats moduliert. Anders als auf Proteinebene gezeigt, ließ sich auf RNA-Ebene nicht nachweisen, dass HuR für die Erhöhung des COX-2-Spiegels von Bedeutung wäre. Für die Behandlung mit MC ist die Induktion von COX-2 nach Depletion von HuR signifikant erhöht.

3.4 Induktion und Regulation von CYP1a1 in HaCat-Zellen

3.4.1 Stimulatoren der CYP1a1-Induktion

Wie in **Kap. 1.1.3** beschrieben führen AhR-Agonisten zu einer Induktion von CYP1a1. Auch für UVB konnte eine CYP1a1-Induktion in HaCat-Zellen bereits gezeigt werden. Im Folgenden sollte die Zeitabhängigkeit der CYP1a1-Induktion in HaCat-Keratinocyten gezeigt werden. Die Zellen wurden mit UVB bestrahlt bzw. mit FICZ, MC und BaP behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA mittels Realtime-PCR auf CYP1a1 analysiert (**Abb. 3.12**).

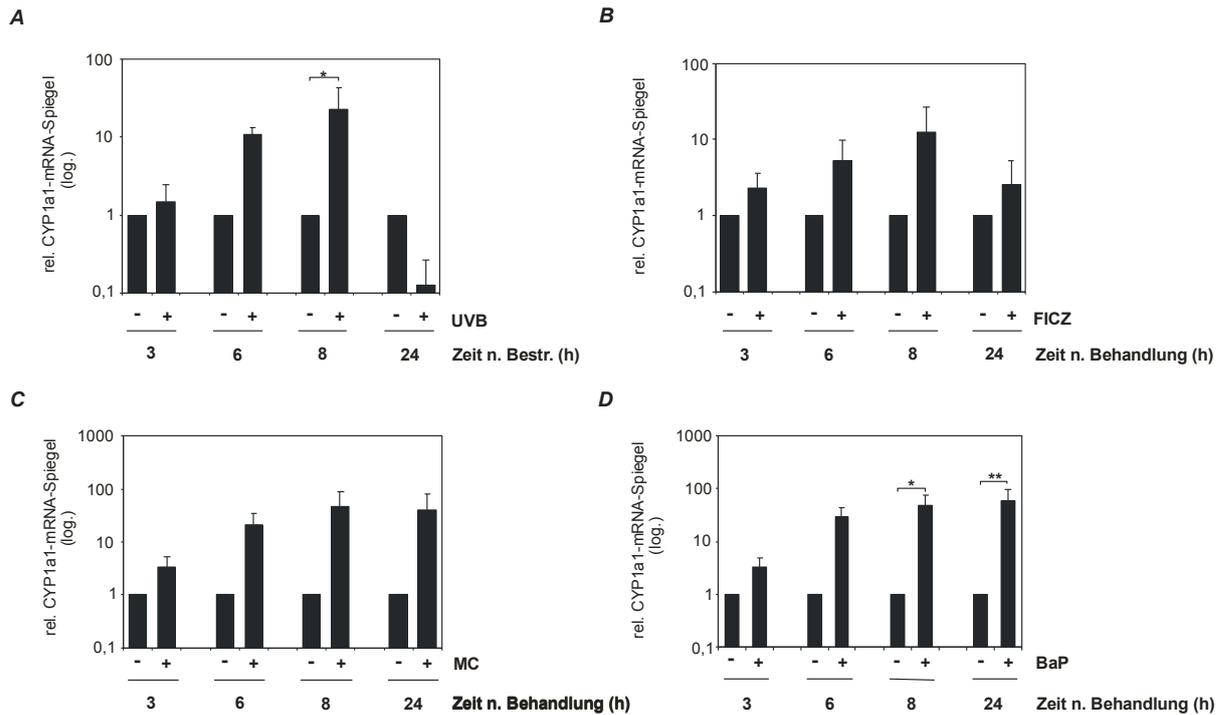


Abb. 3.12: Induktion von CYP1a1 (A) Nach 24-stündiger Serumdepletion wurde mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt bzw. mit DMSO (0,1 %), 100 nM FICZ, 10 μM MC oder 10 μM BaP behandelt und nach 8 Stunden lysiert. Der relative mRNA-Spiegel von CYP1a1, bezogen auf HPRT (Ladekontrolle) wurde mittels realtime-PCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über einen ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

UVB-Bestrahlung führt zu einer signifikanten Induktion des AhR-Zielgens CYP1a1. Bereits nach 3 Stunden ist eine deutliche Erhöhung nachweisbar, die ihr Maximum bei 8 Stunden nach Behandlung hat. Auffällig ist ein um im Mittel 85 % verminderter CYP1a1-Gehalt nach 24 Stunden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (**Abb. 3.12 A**).

Die Behandlung der Zellen mit FICZ resultierte in einer nach 8 Stunden durchschnittlich zwölffachen Erhöhung des CYP1a1-Spiegels (**Abb. 3.12 B**). Die Induktion ist im Vergleich zur Behandlung mit MC und BaP geringer.

MC und BaP führten zu einer vergleichbaren deutlichen Steigerung der CYP1a1-mRNA-Bildung. Durch beide Stimulanzen ist CYP1a1 ab 3 bis 24 Stunden erhöht. Bei MC ist das Maximum nach 8 Stunden erreicht, d.h. nach 24 Stunden ist der CYP1a1-Spiegel bereits gesunken. Für die Behandlung mit BaP ist eine Abnahme der CYP1a1-Induktion nach 24 Stunden noch nicht detektierbar (**Abb. 3.12 D**). Im

Vergleich zu UVB und FICZ sind die durch MC und BaP induzierten relativen CYP1a1-mRNA-Spiegel erhöht und über einen längeren Zeitraum nachweisbar.

Zusammenfassen lässt sich, dass die Belastung von HaCat-Zellen mit FICZ, MC und BaP zu einer Erhöhung von CYP1a1 führen. CYP1a1-Spiegel sind für MC und BaP vergleichbar. Stimulation der Zellen mit BaP führt zu einer über 24 Stunden anhaltenden CYP1a1-Induktion. Die Behandlung mit FICZ weist im Vergleich zu MC, BaP und UVB-Bestrahlung die geringste CYP1a1-Induktion auf.

Hervorzuheben ist, dass UVB ein stärkerer Induktor für COX-2 ist, die AhR-Agonisten jedoch CYP1a1 mehr (MC und BaP) induzieren. Die Expression von CYP1a1-mRNA ist nach Bestrahlung mit UVB bzw. Belastung der Zellen mit FICZ in etwa gleich.

Für alle Stimulanzen wurde 8 Stunden nach Behandlung eine deutliche Induktion für CYP1a1 gezeigt. Allerdings ist nur für UVB-Bestrahlung und BaP Behandlung nach 8 h die CYP1a1-mRNA-Expression signifikant gesteigert. FICZ und MC führen zwar zu einer deutlichen Induktion, im Mittel 12-fach bzw. 45-fach), allerdings ist die Standardabweichung zu hoch für eine signifikante Erhöhung der CYP1a1-mRNA. In den folgenden Experimenten wurde deshalb die Zeitspanne von 8 Stunden nach Behandlungsbeginn bis zur Isolation der RNA gewählt um den CYP1a1-Gehalt zu untersuchen.

3.4.2 Die Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Expression

Im letzten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob HuR die CYP1a1-Induktion durch UVB bzw. AhR-Agonisten moduliert.

HaCat-Zellen wurden nach Depletion von HuR mit UVB bestrahlt und der CYP1a1-Spiegel mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

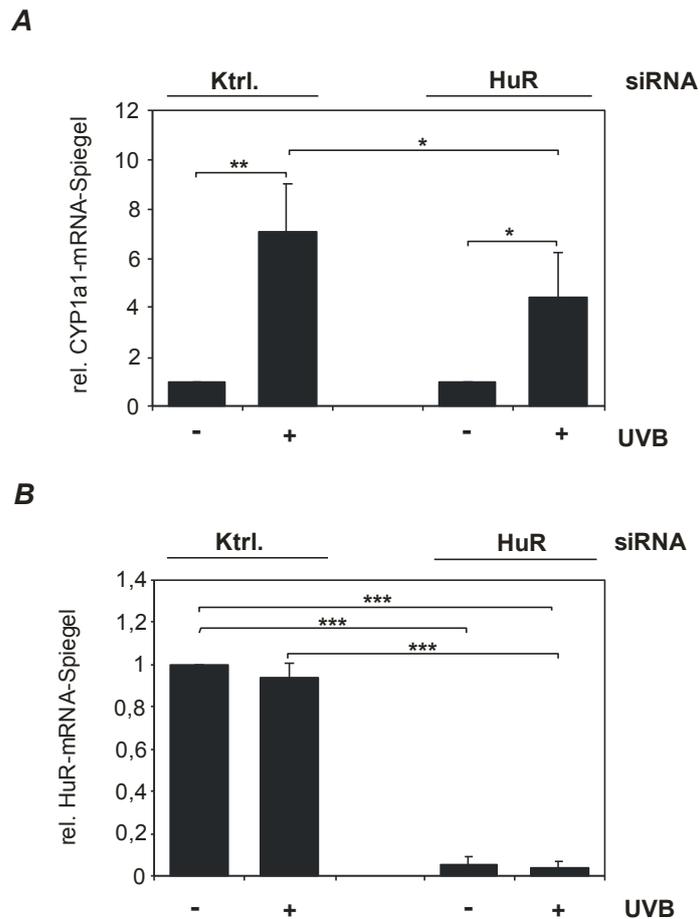


Abb. 3.13: Einfluss von HuR auf die Induktion von CYP1a1-mRNA durch UVB HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektion mit 100 J/m² UVB durch PBS bestrahlt und nach 8 Std. wurde die Gesamt-RNA isoliert. Mittels realtime-PCR wurde mRNA zu CYP1a1, HuR und HPRT (Ladekontrolle) untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (*P<0,05; **P<0,01, ***P<0,0001).

Zu erkennen ist eine signifikante Abnahme der Induktion des CYP1a1-Spiegels nach UVB-Bestrahlung bei Depletion von HuR. HuR kann also sowohl die UVB-induzierte COX-2 als auch die CYP1a1-mRNA-Expression signifikant modulieren.

Weiter sollte untersucht werden, ob auch durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe induzierte CYP1a1-mRNA HuR-abhängig reguliert wird (**Abb. 3.14**).

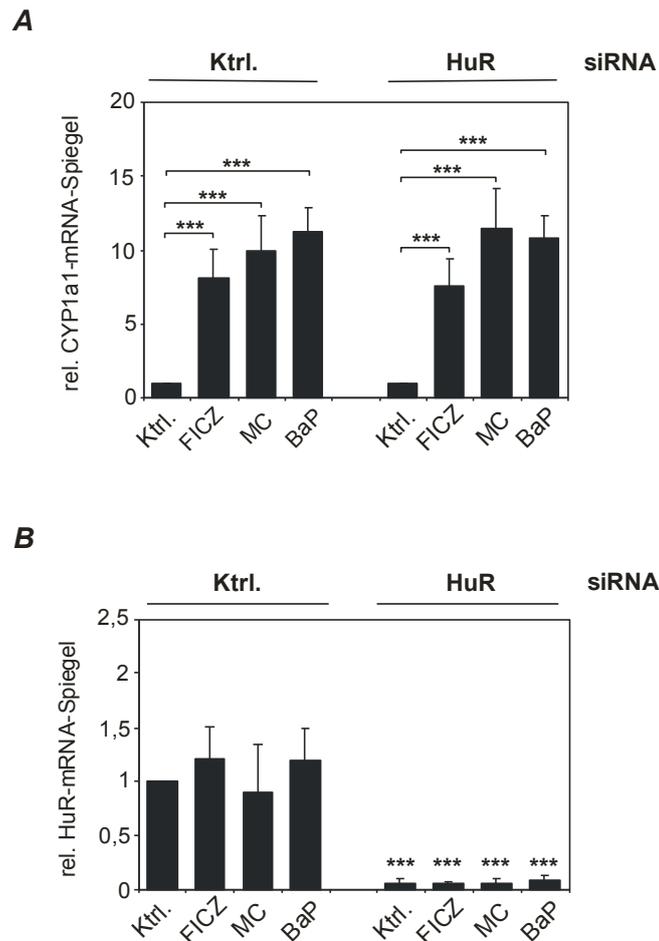


Abb. 3.14: Einfluss von HuR auf die Induktion von CYP1a1-mRNA durch PAK (A) HaCat-Zellen wurden mit 150 nM gegen HuR gerichteter siRNA (HuR) oder nicht depletierender Kontroll-siRNA (Ktrl.) transfiziert. 48 Std. nach Transfektion wurden die Zellen für 24 Std. serumdepletiert, 72 Std. nach Transfektion zur Kontrolle mit DMSO (0,1 %) bzw. mit 100 nM FICZ, 10 µM MC und 10 µM BaP behandelt und nach 8 Std. lysiert. Die Lysate wurden mittels realtime-PCR auf CYP1a1, HuR und HPRT (Ladekontrolle) untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde über ANOVA mit Student-Newman-Keuls Post-Test ermittelt (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,0001).

Die relative Erhöhung des CYP1a1-Spiegels war je nach Stimulus unterschiedlich stark ausgeprägt. Die im Mittel achtfache Steigerung von CYP1a1 unter FICZ ist bei Depletion von HuR in etwa gleich geblieben. Ähnlich das Ergebnis für MC und BaP, deren durchschnittlich etwa zehnfache Steigerung von CYP1a1-mRNA im Vergleich zur Kontrollbehandlung sich nach Depletion von HuR nicht signifikant veränderte. Für alle drei Stimulanzen zeigt HuR keine Wirkverstärkung in der CYP1a1-mRNA-Expression. Diesen Ergebnissen nach zeigt Depletion von HuR keinen signifikanten Einfluss auf die durch AhR-Agonisten induzierte CYP1a1-

mRNA-Expression. Die Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Induktion durch Behandlung der Zellen mit FICZ, MC und BaP ist demnach gering. Dies unterscheidet sich von der oben beschriebenen Funktion von HuR, die durch UVB vermittelte CYP1a1-Expression zu modulieren.

Ein vergleichbares Ergebnis sollte schon für die COX-2-mRNA-Expression durch PAK und FICZ gezeigt werden können (s. **Abb. 3.11**).

4 Diskussion

4.1 Induktion und Regulation der COX-2-Expression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Belastung von HaCat-Zellen mit den AhR-Liganden FICZ, MC und BaP zu COX-2- und CYP1a1-Induktion führt. Dies ist in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Ma, 2011; Maaetoft-Udsen et al., 2012; Pastore et al., 2012).

Es konnte weiter gezeigt werden, dass PAK und FICZ CYP1a1 im Vergleich zu COX-2 auf transkriptioneller Ebene stärker induzieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass UVB verglichen mit AhR-Liganden ein stärkerer Induktor der COX-2 ist. Belastung der Zellen mit FICZ, MC bzw. BaP induziert CYP1a1 jedoch stärker als UVB-Bestrahlung.

Im Folgenden soll auf zelluläre Mechanismen der AhR-Liganden- und UVB-induzierten Signaltransduktionsprozesse eingegangen werden.

4.1.1 Mechanismen der AhR-Liganden-induzierten COX-2- und CYP1a1-Expression

Der AhR fungiert als Chemosensor für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und FICZ. Wie in **Kap. 1.1.2** beschrieben, bindet der AhR-ARNT-Komplex nach Aktivierung an Xenobiotika-responsive Elemente (XRE) der DNA und reguliert die Expression vieler Gene (Puga et al., 2000). XRE AhR-abhängig modulierte Genexpression wird als Konsequenz der Stimulation des klassischen AhR-Signalweges verstanden, und CYP1a1 gilt als ein klassisches Zielgen, das zur AhR-Genbatterie gehört und oft als Markergen der AhR-Aktivierung dient.

In der vorliegenden Arbeit fiel die Induktion der CYP1a1-mRNA durch FICZ, MC und BaP (s. **Abb. 3.12**) höher aus als der COX-2-mRNA (s. **Abb. 3.6**). Es stellt sich die Frage, ob COX-2 durch andere Signalwege als CYP1a1 induziert wird. So gehört COX-2 nicht wie CYP1a1 zu der klassischen AhR-Genbatterie. Ob die COX-2-Promotorregion AhR-regulierte XRE-Motive aufweist, ist noch nicht vollständig geklärt. Kosaka et al charakterisierten verschiedene transkriptionell-

regulatorische Elemente des COX-2-Genabschnitts, darunter XRE, in U937-Zellen (Kosaka et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um Degner wies eine Verbindung von AhR und XREs in der COX-2-Promotorregion in MCF-7 Brustkrebszellen nach (Degner et al., 2007). 2000 konnten Vogel et al jedoch zeigen, dass in Hepatozyten CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-DNA-Element entscheidend für die Transkription TCDD-induzierter COX-2-Expression ist. Die XRE-DNA-Region dagegen scheint untergeordnet zu sein (Vogel et al., 2000).

Die im Vergleich zu CYP1a1 geringe COX-2-Induktion nach Belastung mit AhR-Agonisten könnte also darauf zurückzuführen sein, dass COX-2 nicht wie CYP1a1 primär durch erhöhte XRE- bzw. AhR-abhängige Genexpression, sondern über andere die AhR-Signalkaskade modulierende Wege induziert wird (Vogel et al., 1998). Unter den die AhR-Signalkaskade modulierenden Wegen versteht man die sog. „non-genomic pathways“, die über Aktivierung von Membranrezeptoren und Proteinkinasen die Transkription von nicht zur klassischen XRE-regulierten AhR-Genbatterie zugehörigen Genen stimulieren (s. **Kap. 1.2.3**). Im Folgenden werden verschiedene dieser sekundären AhR-abhängigen Signalkaskaden vorgestellt, die zur COX-2-Induktion beitragen könnten.

Madhukar et al hegten bereits 1984 die Vermutung, dass der klassische AhR-Ligand TCDD mit der EGFR-Signalkaskade interferiert (Madhukar et al., 1984). Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase c-Src (pp60^{src}) nach Aktivierung des AhR von dem cytosolischen AhR-Multiproteinkomplex dissoziiert und den EGFR aktiviert (Biscardi et al., 1999; Blankenship and Matsumura, 1997; Randi et al., 2008). Die AhR-abhängige Aktivierung des EGFR über c-Src führt wiederum zur Aktivierung der MAPK ERK1/2 (Kwon et al., 2003; Park et al., 2004; Park et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Vogel konnte zeigen, dass TCDD-induzierte COX-2-Expression, im Gegensatz zu CYP1a1, c-Src-abhängig ist. Sie stellen die Hypothese auf, dass TCDD über Aktivierung des AhR und der c-Src Kinase die C/EBP-Promotorregion der COX-2 aktiviert und auf diesem Weg die COX-2-Expression induziert (Vogel et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher nicht vollständig geklärt ist, ob der Effekt von AhR-Liganden für die im Vergleich zu CYP1a1 schwache COX-2-Induktion eine primäre, durch gesteigerte Aktivität des COX-2-Promotors, eine sekundäre durch AhR-abhängige Signalwege oder eine Kombination der beiden ist. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wäre anzunehmen, dass COX-2 anders

als CYP1a1 durch AhR-Agonisten über einen „non-genomic-pathway“ induziert wird.

4.1.2 Vergleich der zellulären Signalwege der durch UV und AhR-Liganden induzierten COX-2-Expression

Die zelluläre Antwort auf UV-Strahlung konnte wie in **Kap. 1.2.2** beschrieben in zwei Hauptwege unterteilt werden: a) UV-Strahlung führt durch Bildung von ROS zu DNA-oder RNA-Schäden und verändert so die Genexpression; b) Zelloberflächenrezeptoren und intrazelluläre Signalkomponenten werden durch UV-stimulierte ROS-Bildung aktiviert.

Wie oben beschrieben wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass UVB, genau wie die verwendeten AhR-Agonisten, sowohl COX-2 als auch CYP1a1 auf transkriptioneller Ebene induziert. Die CYP1a1-Induktion durch UVB ist jedoch geringer als durch MC und BaP, aber größer als durch FICZ induzierte CYP1a1-Expression.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Fritsche konnte zeigen, dass UVB-Strahlung zur intrazellulären Bildung des AhR-Liganden FICZ führt und AhR-abhängig COX-2 und CYP1a1 induziert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass UVB über Bildung von FICZ den AhR aktiviert und abhängig von AhR-vermittelten Signalwegen sowohl COX-2 als auch CYP1a1 induziert (Fritsche et al., 2007).

Da die COX-2- und CYP1a1-Induktion durch UVB jedoch wesentlich stärker als durch FICZ ist (s. **Kap. 3.4.1**), liegt die Vermutung nahe, dass UVB COX-2 und CYP1 hauptsächlich über andere Signalwege, beispielsweise durch die Bildung von ROS induziert. Des Weiteren ist zu beachten, dass sich die Menge des intrazellulär gebildeten FICZ durch UVB im picomolaren Bereich bewegt, wohingegen die Behandlung mit 100 nM FICZ eine deutlich schwächere COX-2 Antwort induziert. Dieses Phänomen, vorausgesetzt, dass 100 nM FICZ Belastung die Zellen erreicht, spricht ebenfalls gegen eine ausschließlich durch FICZ vermittelte UVB-Antwort in der COX-2- und CYP1a1-Induktion.

MC und BaP induzieren CYP1a1 stärker als UVB und FICZ (s. **Abb. 3.12**). MC und BaP zeigen also in den verwendeten Konzentrationen eine FICZ gegenüber stärkere AhR-agonistische Wirkung.

Die Arbeitsgruppe um Quintana zeigte an TH17- und T-reg-Zellen, dass die AhR-Liganden TCDD und FICZ entgegengesetzte Effekte auf die Differenzierung der Zellen bewirkten und stellten die Hypothese auf, dass der AhR ligandenspezifisch wirkt (Quintana et al., 2008). Es bleibt zu klären, ob die Spezifität des AhR für FICZ, MC und BaP für die unterschiedlich starke CYP1a1-Expression verantwortlich ist.

Einen Erklärungsansatz für die geringere CYP1a1-Expression durch UVB liefert die Arbeitsgruppe um Luecke: durch UVB-Strahlung induzierte NF- κ B-Expression inhibiert initial die CYP1a1-Induktion (Luecke et al., 2010). Die Verbindung zwischen NF- κ B und UVB würde geringere CYP1a1-Induktion durch UVB im Vergleich zu MC und BaP zum Teil erklären. Der vor einigen Jahren entdeckte AhR-Repressor stellt einen neuen potentiellen Regulationsmechanismus der AhR-Signaltransduktion dar, dessen Bedeutung noch unklar ist (Haarmann-Stemmann and Abel, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Induktion von COX-2 und CYP1a1 durch UVB nicht ausschließlich auf durch UVB gebildetes FICZ zurückzuführen ist, sondern dass andere durch UVB regulierte Signalwege beteiligt sind. Trotzdem scheinen diese Signalwege abhängig von AhR-Aktivierung zu sein, da die COX-2-Expression durch UVB sich in vivo in AhR-defizienten Mäusen ungefähr halbiert (Fritsche et al., 2007). Ob AhR-unabhängige COX-2- oder CYP1a1-Induktion durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und FICZ existiert, ist nicht bekannt.

4.2 Zur Bedeutung von HuR für die durch AhR-Agonisten und UVB induzierte Genexpression

4.2.1 COX-2-Expression wird HuR-abhängig reguliert

Es ist bereits bekannt, dass HuR eine wichtige Rolle als Regulator in der COX-2-Expression durch UV-Strahlung spielt (s. **Kap.1.3.2**). Im hier untersuchten System konnte dieses Ergebnis sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene bestätigt werden (s. **Kap 3.3.1**). Ob die AhR-Liganden induzierte COX-2-Expression durch HuR reguliert wird, ist bislang nicht in der Literatur beschrieben.

Adaptive Genexpression kann vielseitig reguliert werden, transkriptionell, posttranskriptionell (Spleißen, Transport und Stabilität der mRNA) und translational. Die Kontrolle des mRNA-Umsatzes ist von besonderer Bedeutung, da selbst geringe Unterschiede in der Halbwertszeit von mRNA die Proteinexpression verändern können. Erhöhte Proteinexpression kann durch posttranskriptionelle Regulation der AU-reichen Elemente (AREs) in der 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA moduliert werden. HuR gilt als multifunktionales Protein, welches primär für seine mRNA-stabilisierende Eigenschaft als posttranskriptioneller Regulator bekannt ist (s. **Kap. 1.3.1**).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HuR-Depletion die COX-2-Expression durch die AhR-Agonisten FICZ, MC und BaP tendenziell abschwächt. Auf RNA-Ebene konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (s. **Kap. 3.2.2**). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HuR die COX-2-Expression nicht auf posttranskriptioneller Ebene, sondern auf translationaler Ebene moduliert.

HuR wirkt stabilisierend auf COX-2-mRNA und erhöht so die COX-2-Proteinexpression (Sengupta et al., 2003; Young et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit war die COX-2-mRNA Menge nach HuR-Depletion nicht signifikant verändert (s. **Abb. 3.11**). HuR reguliert demnach COX-2-Expression translational oder posttranslational. Ob HuR die COX-2-Translationsrate erhöht, COX-2-Protein stabilisiert oder den Abbau des COX-2-Proteins beeinflusst, ist nicht bekannt.

Katsanou et al fanden bei HuR-Überexprimierung trotz erhöhter COX-2-mRNA-Stabilität eine reduzierte COX-2-Translation (Katsanou et al., 2005). Für andere mRNA-Bindeproteine wurde bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der mRNA-Stabilität die Proteinexpression nicht beeinflussen muss. So zeigten Mukhopadhyay et al., dass das mRNA-Bindeprotein CUGBP2 an die AREs der 3'UTR von COX-2-mRNA bindet und sowohl die mRNA-Menge als auch die Stabilität erhöht, aber die Translation von COX-2 hemmt (Mukhopadhyay et al., 2003).

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Hu-Proteine mRNA-Menge, -Stabilität und Translation gleichsinnig regulieren (Chock et al., 2010; Jain et al., 1997; Licata et al., 2010). Die Arbeitsgruppe um Kawai et al fanden 2006, ähnlich dem Ergebnis dieser Arbeit, dass HuR Cytochrom c-mRNA-Menge nicht beeinflusst aber die Cytochrom c-Translation steigert (Kawai et al., 2006). HuR scheint demnach durch

Binden in der 3'UTR von mRNAs deren Translation zu steigern (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Bindet HuR an der 5'UTR von p27-mRNA führt dies zur Inhibition der p27-Translation (Kullmann et al., 2002). Tran et al zeigten 2003, dass nach HuR-Silencing mittels siRNA sich die basalen mRNA-Spiegel für Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) verringerten, jedoch die uPA-mRNA-Stabilität unbeeinflusst blieb (Tran et al., 2003).

Die hier aufgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass die HuR-Regulation von COX-2 wahrscheinlich stressor-, spezie- und zelltypabhängig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Depletion von HuR erniedrigte COX-2-Protein-Spiegel bei unveränderten COX-2-mRNA-Spiegel gefunden.

COX-2 wird nicht ausschließlich durch HuR sondern durch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) reguliert, welche die Expression von COX-2 sowohl induzieren als auch inhibieren können (Barreau et al., 2005). Sureban et al zeigten 2007, dass das RBP CUGBP2 mit HuR interferiert, indem HuR und CUGBP2 zunächst heterodimerisieren und dann um die Bindung des ARE der COX-2-mRNA konkurrieren (Sureban et al., 2007). CUGBP2 inhibiert so kompetitiv die HuR-medierte Translation von COX-2. RBPs können also um die Bindung an ARE-beinhaltende mRNAs konkurrieren.

Kim et al zeigten, dass die Art der Bindung der RBPs HuR und TIAR an AREs von mRNA sich unterscheidet. HuR bindet weniger stark an Desoxynukleotide der RNA als TIAR, aber zeigt eine höhere Affinität zu 2'-Hydroxylgruppen (Kim et al., 2011).

Das ARE-Bindeprotein TIA-1 beeinflusst die mRNA-Stabilität von COX-2 nicht, inhibiert jedoch die COX-2-Translation und wirkt so antagonistisch zu HuR (Dixon et al., 2003). Galbán et al. zeigten verminderte p53-Proteinspiegel bei unbeeinflusster p53-mRNA-Halbwertszeit nach Depletion von HuR mittels siRNA (Galban et al., 2003). Die Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass die gesteigerte Translation von p53 mit der Interaktion zwischen HuR und dem poly(A)-bindendem Protein und anderen heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) zusammenhängen könnte. Ob die Halbwertszeit von COX-2-mRNA sich nach Behandlung von AhR-Agonisten verändert ist nicht bekannt. Millard et al. fanden, dass HuR und die hnRNPs C1/C2 an der 5'UTR der

mRNA von p27 binden, aber nur C1/C2 die p27-Translation induzieren (Millard et al., 2000).

Ob andere RBPs mit HuR im untersuchten System interferieren und die HuR-regulierte COX-2-Induktion nach Behandlung mit AhR-Agonisten modulieren, ist nicht bekannt.

HuR reguliert in der vorliegenden Arbeit zwar die durch AhR-Liganden induzierte COX-2-Proteinexpression, beeinflusst jedoch nicht die COX-2-mRNA-Menge. Die regulative Funktion von HuR wird durch Interferenz mit anderen Proteinen moduliert. Wie in **Kap. 1.3.1** beschrieben, assoziiert HuR mit den Liganden pp32 und APRIL beim nukleären Export in das Zytoplasma. Williams et al. fanden, dass pp32 in MiaPaCa2 Zellen Binden von HuR an Ziel-mRNA inhibiert (Williams et al., 2010).

Fries et al. konnten zeigen, dass der nukleäre Export von CD38-mRNA abhängig von dem HuR-Ligand APRIL, jedoch nicht von pp32 ist (Fries et al., 2007).

Hu Proteine interagieren auch miteinander. So zeigten Kasashima et al., dass HuR in HeLa Zellen dimerisiert (Kasashima et al., 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HuR mit microRNA (miRNA) interferiert (Kim et al., 2009), oder durch Interferenz mit IRES (internal ribosom entry sites) (Rivas-Aravena et al., 2009) die Proteinsynthese reguliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HuR ein multifunktionales Regulatorprotein ist. HuR moduliert unterschiedlichste Aspekte der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression im Zusammenspiel mit anderen Proteinen.

4.2.2 Die Rolle von HuR in der CYP1a1-Expression

Die durch PAK und FICZ induzierte CYP1a1-mRNA-Expression ist unabhängig von HuR (s. **Kap. 3.4.2**). Ob die CYP1a1-Proteinexpression ebenfalls HuR-unabhängig reguliert wird, ist nicht untersucht worden. Wie in **Kap. 4.2.1** gezeigt, beeinflusst HuR bei unveränderten COX-2-mRNA-Leveln die posttranskriptionelle Proteinexpression von COX-2. Daher ist keine abschließende Beurteilung der

Funktion von HuR in der AhR-Liganden-induzierten CYP1a1-Expression an dieser Stelle möglich.

4.3 UV und HuR

4.3.1 Regulation der Apoptose durch HuR

UV-Licht induziert in Keratinozyten dosisabhängig Apoptose (Chaturvedi et al., 1999; Serini et al., 2010). Erst nach chronischer Bestrahlung über Wochen entwickeln Zellen Apoptose-Resistenzen (He et al., 2006). Apoptose dient als Abwehrmechanismus gegen z.B. UV-induzierte DNA-Schäden und Karzinogenese. Es sind etliche UV-induzierte Regulationsmechanismen in Zusammenhang mit apoptotischen Geschehen in Keratinozyten bekannt (Van Laethem et al., 2009).

In **Kap. 3.1.2** wurde gezeigt, dass 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung sich der totale HuR-mRNA-Gehalt um ca. 40% verringert. Zu den vorherig gemessenen Zeitpunkten blieb die totale HuR-mRNA-Menge unbeeinflusst.

HuR gilt als wichtiger Regulator der Apoptose (Abdelmohsen et al., 2007). HuR stabilisiert die mRNA von anti-apoptotische Signalkomponenten und oder reguliert deren Translation. Dazu gehören beispielsweise bcl-2, ProT α oder XIAP (Durie et al., 2011; Filippova et al., 2011; Lal et al., 2005).

Allerdings konnte nach UV-induzierter cytoplasmatischer Translokation von HuR eine Stabilisierung von RhoB und dadurch ein pro-apoptotischer Effekt nachgewiesen werden (Westmark et al., 2005). Nach starkem Zellstress konnte weiter gezeigt werden, dass HuR gespalten wird und seine Spaltprodukte proapoptotisch wirken (Mazroui et al., 2008; von Roretz and Gallouzi, 2010).

Bislang wurde angenommen, dass Bestrahlung mit UV keinen Effekt auf die totale HuR-Menge hat (Wang et al., 2000b). Die meisten Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der quantitativen cytoplasmatischen bzw. nukleären HuR-Menge. Zeitabhängige Herabregulation der totalen Menge von HuR durch UV nach 24 Stunden wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Die Experimente dieser Arbeit beziehen sich auf die totale HuR-mRNA-Menge. Es wurde nicht untersucht, ob sich die cytoplasmatische oder nukleäre HuR-Menge

verändert hat. In der Arbeit von Fernau et al wurde unter denselben Bedingungen, wie in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten gearbeitet (Fernau et al., 2009). Fernau et al fanden eine maximale Verschiebung von nukleärem HuR in das Zellzytoplasma 4 Stunden nach UVB-Bestrahlung. Nach 8 Stunden ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Zu dem Zeitpunkt von 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung liegen keine Daten vor. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung HuR wieder größtenteils nukleär vorliegt. Das bedeutet, dass sich 24 Stunden post-Bestrahlung die nukleäre HuR-mRNA-Menge um 40% reduziert. Unklar bleibt, ob reduzierte nukleäre HuR-Menge einen proapoptotischen oder antiapoptotischen Effekt hat. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellen 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung dominieren tote Zellen das Bild im Gegensatz zu der Kontrollbehandlung. Falls hier ein Zusammenhang besteht, kann vermutet werden, dass die Reduktion der nukleären HuR-Menge 24 Stunden nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB einen proapoptotischen Effekt hat.

Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass im Rahmen der UV-induzierten Apoptose die totale HuR-mRNA-Menge durch UVB nach 24 Stunden reduziert wird um den proapoptotischen Effekt der UVB-Strahlung zu verstärken.

4.3.2 Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Induktion durch UVB

Wie in der Einleitung beschrieben konnte bereits gezeigt werden, dass UVB CYP1a1 in Hautzellen induziert (Wei et al., 1999). HuR ist auf unterschiedlichste Weise fähig, die Expression von mRNA und Proteinen zu modulieren (s. **Kap. 4.2.1**). Für UVB-induzierte CYP1a1-Expression ist bislang keine Regulierung durch HuR bekannt. CYP1a1 gehört nicht zu den klassischen durch HuR-regulierten Genen.

In dieser Arbeit konnte zum Zeitpunkt des Verfassens erstmalig gezeigt werden, dass das RNA-bindende Protein HuR eine wichtige Rolle für die UV-induzierte CYP1a1-mRNA-Expression spielt (s. **Kap. 3.4.2, Abb. 3.13**). Der CYP1a1-Spiegel ist nach HuR-Silencing signifikant geringer im Vergleich zur Kontrollbehandlung 8 Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 100 J/m^2 . Ein funktionsfähiger CYP1a1-Antikörper, um nicht nur die posttranskriptionelle sondern auch die translationale

Bedeutung von HuR für die CYP1a1-Expression zu untersuchen, war im untersuchten System nicht zu detektieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HuR eine bedeutende Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der CYP1a1-Expression hat.

Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung mit 100 J/m² nach 24 Stunden zu einem im Mittel um 85% reduzierten CYP1a1-mRNA-Gehalt im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrollbehandlung führt (s. **Kap. 3.4.1**). Die Vermutung liegt nahe, dass die in **Kap. 4.3.1** beschriebene reduzierte HuR-Menge mit der Reduktion des CYP1a1-Gehaltes in Verbindung steht.

4.4 Ansätze in der Präventivmedizin und Krebstherapie: HuR

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und FICZ gelten als Karzinogene und werden mit der Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht (s. **Kap. 1.1.1**). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AhR-Liganden COX-2 induzieren. Die Bedeutung von COX-2 in Tumorprozessen ist bekannt (s. **Kap. 1.2.1**). Weiter konnte gezeigt werden, dass HuR die COX-2-Expression moduliert (s. **Kap. 3.2.2**). Sollte HuR die Expression von PAK-induzierter COX-2 in Tumoren in vivo beeinflussen, wird es von klinischem Interesse, ob die mRNA-stabilisierende oder translational modulierende Eigenschaften von HuR in der Krebstherapie oder Präventivmedizin genutzt werden kann.

Es ist bereits bekannt, dass einige in Tumoren überexprimierte Proteine wie COX-2 durch mRNA-Stabilisierung oder vermehrter Transkription durch HuR modifiziert werden (Lopez de Silanes et al., 2005). COX-2-Inhibitoren werden bereits in der Krebstherapie eingesetzt (Harris et al., 2007; Steinbach et al., 2000). Selektive COX-2-Inhibitoren zeigten jedoch kardiovaskuläre Nebenwirkungen, sodass alternativ die Regulation von mRNA-Stabilität und COX-2-Proteinexpression durch HuR einen Ansatzpunkt für neue Therapeutika darstellt.

Cytoplasmatische HuR-Expression korreliert mit erhöhten COX-2-Spiegeln und so mit erhöhtem Malignitätsgrad, d.h. höherem Tumorstadium und schlechter klinischer Prognose in Ovarialtumoren (Denkert et al., 2004; Erkinheimo et al., 2003) und kolorektalen Carzinomen (Denkert et al., 2006; Dixon et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um Denkert zeigte 2004, dass die cytoplasmatische

Überexprimierung von HuR mit der COX-2-Expression und dem Tumorgrad korreliert: bei 13% der Grad I Mamma-CAs und 46% der Grad II Mamma-CAs fand man erhöhte cytoplasmatische HuR-Spiegel (Denkert et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte Heinonen et al 2005: In murinen duktalem Brustkrebszellen korreliert cytoplasmatisches HuR als unabhängiger prognostischer Faktor mit der COX-2-Expression. Bei erhöhten HuR-Spiegeln verschlechtert sich die klinische Prognose und Überlebensrate bei geringerer histologischer Tumor-Differenzierung und wachsender Tumorgröße (Heinonen et al., 2005).

Aufgrund der hier dargestellten Beispiele ist es von besonderem Interesse die Regulation von „Tumor-Genen“, wie COX-2 via HuR zu kennen. Da auch einige als pharmazeutisch eingesetzte Verbindungen wie Sulindac (Ciolino et al., 2006) zu der Gruppe synthetischer AhR-Liganden gehören, ist es außerdem von Interesse, ob unter diesen Medikamenten AhR-Liganden-induzierte Tumore auftreten und ob diese durch HuR-Inhibierung reduziert werden können. Zu beachten bleibt, dass wie in **Kap. 4.3.1** beschrieben, HuR sowohl anti- als auch proapoptotische Wirkung zugesprochen wird. Vor der Verwendung von HuR-Inhibitoren müssen diese Eigenschaften genau bekannt sein.

Zusammenfassen lässt sich, dass die medikamentöse Hemmung von HuR sich als sinnvoll in der onkologischen Pharmakotherapie erweisen könnte (Meisner et al., 2007).

5 Zusammenfassung

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe sind Umweltschadstoffe, die bei Verbrennungsprozessen entstehen. Als Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR)-Liganden sind sie gesundheitsschädlich. In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel von HaCat-Keratinocyten gezeigt werden, dass AhR-Liganden die Cyclooxygenase (COX)-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene zwar induzieren. Im Vergleich hierzu zeigt sich jedoch UVB-Strahlung als ein deutlich stärkerer Induktor der COX-2.

Es kann angenommen werden, dass bei der COX-2-Induktion durch AhR-Agonisten die AhR-Signalkaskade moduliert wird. So konnte gezeigt werden, dass polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) verglichen mit UVB stärkere Induktoren des klassischen AhR-Zielgens CYP1a1 sind. Trotz der bekannten photochemischen Bildung des AhR-Agonisten FICZ unter UVB-Bestrahlung führt UVB zu einer schwächeren CYP1a1-Expression als isolierte AhR-Agonisten.

HuR ist ein multifunktionales Protein, welches mRNA-stabilisierende Eigenschaft besitzt und als posttranskriptioneller sowie translationaler Regulator der Genexpression bekannt ist. In dieser Arbeit konnte durch Depletion von HuR mittels siRNA gezeigt werden, dass HuR die COX-2-Expression durch UV-Strahlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene moduliert. Auch für die durch AhR-Liganden induzierte COX-2-Expression konnte eine Beeinflussung der COX-2-Proteinspiegel durch HuR nachgewiesen werden.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass HuR für die durch AhR-Liganden induzierte CYP1a1-Expression keine Bedeutung hat, während es ein wichtiger Regulator der UVB-induzierten CYP1a1-Expression zu sein scheint.

COX-2 wird in malignen Tumoren und Entzündungen überexprimiert. Die Aufklärung der Bedeutung von HuR für die Genexpression in Xenobiotika-exponierten humanen Zellen soll als präventivmedizinischer Ansatz in der Tumorthherapie dienen.

6 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim, H.H., and Gorospe, M. (2008). Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem* 389, 243-255.

Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H., and Gorospe, M. (2007). Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* 6, 1288-1292.

Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Yang, X., Lal, A., Kim, H.H., Kuwano, Y., Galban, S., Becker, K.G., Kamara, D., de Cabo, R., Gorospe, M. (2009). Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J* 28, 1271-1282.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Statement, U.S. Department of Health and Human Services, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (1995)

Amberg, G.C., Earley, S., and Glapa, S.A. (2010). Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species. *Circulation research* 107, 1002-1010.

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

Antic, D., and Keene, J.D. (1997). Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet* 61, 273-278.

Antic, D., Lu, N., and Keene, J.D. (1999). ELAV tumor antigen, Hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells. *Genes Dev* 13, 449-461.

Appleby, S.B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., and Hla, T. (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 (Pt 3), 723-727.

Armstrong, B.G., and Gibbs, G. (2009). Exposure-response relationship between lung cancer and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Occup Environ Med* 66, 740-746.

Ashida, M., Bito, T., Budiyanoto, A., Ichihashi, M., and Ueda, M. (2003). Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp Dermatol* 12, 445-452.

Assefa, Z., Garmyn, M., Bouillon, R., Merlevede, W., Vandenheede, J.R., and Agostinis, P. (1997). Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108, 886-891.

Atasoy, U., Watson, J., Patel, D., and Keene, J.D. (1998). ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3145-3156.

Bachelor, M.A., Cooper, S.J., Sikorski, E.T., and Bowden, G.T. (2005). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Mol Cancer Res* 3, 90-99.

Bachelor, M.A., Silvers, A.L., and Bowden, G.T. (2002). The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT. *Oncogene* 21, 7092-7099.

Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33, 7138-7150.

Barthel, A., and Klotz, L.O. (2005). Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *Biol Chem* 386, 207-216.

Bartholome, A. (2010). Modulation Insulin-responsiver Signalwege durch Flavonoide (Diss., Düsseldorf).

Bergander, L., Wincent, E., Rannug, A., Foroozesh, M., Alworth, W., and Rannug, U. (2004). Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem Biol Interact* 149, 151-164.

Bertazzi, P.A., Pesatori, A.C., and Zocchetti, C. (1998). [Seveso. Dioxin: an example of environmental medicine. Epidemiologic data as guidelines for health programming]. *Giornale italiano di medicina del lavoro ed ergonomia* 20, 194-196.

Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H., and Parsons, S.J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274, 8335-8343.

Black, A.T., Gordon, M.K., Heck, D.E., Gallo, M.A., Laskin, D.L., and Laskin, J.D. (2011). UVB light regulates expression of antioxidants and inflammatory mediators in human corneal epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 81, 873-880.

Black, A.T., Gray, J.P., Shakarjian, M.P., Mishin, V., Laskin, D.L., Heck, D.E., and Laskin, J.D. (2008). UVB light upregulates prostaglandin synthases and prostaglandin receptors in mouse keratinocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 232, 14-24.

Blankenship, A., and Matsumura, F. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Mol Pharmacol* 52, 667-675.

Bock, K.W., and Kohle, C. (2006). Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 72, 393-404.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-771.

Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.

Buckman, S.Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., and Pentland, A.P. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19, 723-729.

Cantrell, S.M., Lutz, L.H., Tillitt, D.E., and Hannink, M. (1996). Embryotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): the embryonic vasculature is a physiological target for TCDD-induced DNA damage and apoptotic cell death in Medaka (*Orizias latipes*). *Toxicol Appl Pharmacol* 141, 23-34.

Casolaro, V., Fang, X., Tancowny, B., Fan, J., Wu, F., Srikantan, S., Asaki, S.Y., De Fanis, U., Huang, S.K., Gorospe, M., Atasoy, U.X., Stellato, C. (2008). Posttranscriptional regulation of IL-13 in T cells: role of the RNA-binding protein HuR. *J Allergy Clin Immunol* 121, 853-859 e854.

Chang, L.W., Chang, Y.C., Ho, C.C., Tsai, M.H., and Lin, P. (2007). Increase of carcinogenic risk via enhancement of cyclooxygenase-2 expression and hydroxyestradiol accumulation in human lung cells as a result of interaction between BaP and 17-beta estradiol. *Carcinogenesis* 28, 1606-1612.

Chaturvedi, V., Qin, J.Z., Denning, M.F., Choubey, D., Diaz, M.O., and Nickoloff, B.J. (1999). Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem* 274, 23358-23367.

Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M.S., and Bowden, G.T. (2001). Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 20, 3921-3926.

Chen, Y.H., and Tukey, R.H. (1996). Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 271, 26261-26266.

Cheon, H., Woo, Y.S., Lee, J.Y., Kim, H.S., Kim, H.J., Cho, S., Won, N.H., and Sohn, J. (2007). Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages. *Exp Mol Med* 39, 524-534.

Cho, Y.C., Zheng, W., and Jefcoate, C.R. (2004). Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 220-238.

Chock, K., Allison, J.M., and Elshamy, W.M. (2010). BRCA1-IRIS overexpression abrogates UV-induced p38MAPK/p53 and promotes proliferation of damaged cells. *Oncogene* 29, 5274-5285.

Choi, E.J., Toscano, D.G., Ryan, J.A., Riedel, N., and Toscano, W.A., Jr. (1991). Dioxin induces transforming growth factor- α in human keratinocytes. *J Biol Chem* 266, 9591-9597.

Ciolino, H.P., MacDonald, C.J., Memon, O.S., Bass, S.E., and Yeh, G.C. (2006). Sulindac regulates the aryl hydrocarbon receptor-mediated expression of Phase 1 metabolic enzymes in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 27, 1586-1592.

Cok, S.J., Acton, S.J., and Morrison, A.R. (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J Biol Chem* 278, 36157-36162.

Culp, S.J., Warbritton, A.R., Smith, B.A., Li, E.E., and Beland, F.A. (2000). DNA adduct measurements, cell proliferation and tumor mutation induction in relation to tumor formation in B6C3F1 mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 21, 1433-1440.

Dannenberg, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K., and DuBois, R.N. (2005). Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* 23, 254-266.

Dannenberg, A.J., and Subbaramaiah, K. (2003). Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 431-436.

Dean, J.L., Brook, M., Clark, A.R., and Saklatvala, J. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 274, 264-269.

Dean, J.L., Sully, G., Clark, A.R., and Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* 16, 1113-1121.

Degner, S.C., Kemp, M.Q., Hockings, J.K., and Romagnolo, D.F. (2007). Cyclooxygenase-2 promoter activation by the aromatic hydrocarbon receptor in breast cancer mcf-7 cells: repressive effects of conjugated linoleic acid. *Nutrition and cancer* 59, 248-257.

DelCarlo, M., and Loeser, R.F. (2006). Chondrocyte cell death mediated by reactive oxygen species-dependent activation of PKC- β 1. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C802-811.

Denkert, C., Koch, I., von Keyserlingk, N., Noske, A., Niesporek, S., Dietel, M., and Weichert, W. (2006). Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol* 19, 1261-1269.

Denkert, C., Weichert, W., Pest, S., Koch, I., Licht, D., Kobel, M., Reles, A., Sehoul, J., Dietel, M., and Hauptmann, S. (2004). Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a

prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer Res* 64, 189-195.

Dickinson, S.E., Olson, E.R., Zhang, J., Cooper, S.J., Melton, T., Criswell, P.J., Casanova, A., Dong, Z., Hu, C., Saboda, K., Jacobs, E.T., Alberts, D.S., Bowden, G.T. (2011). p38 MAP kinase plays a functional role in UVB-induced mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 50, 469-478.

Dixon, D.A., Balch, G.C., Kedersha, N., Anderson, P., Zimmerman, G.A., Beauchamp, R.D., and Prescott, S.M. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med* 198, 475-481.

Dixon, D.A., Tolley, N.D., King, P.H., Nabors, L.B., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (2001). Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 108, 1657-1665.

Doller, A., Huwiler, A., Muller, R., Radeke, H.H., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. (2007). Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell* 18, 2137-2148.

Doller, A., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. (2008). Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal* 20, 2165-2173.

Dong, B., and Matsumura, F. (2008). Roles of cytosolic phospholipase A2 and Src kinase in the early action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through a nongenomic pathway in MCF10A cells. *Mol Pharmacol* 74, 255-263.

Dong, B., Nishimura, N., Vogel, C.F., Tohyama, C., and Matsumura, F. (2010). TCDD-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by the nongenomic pathway in mouse MMDD1 macula densa cells and kidneys. *Biochem Pharmacol* 79, 487-497.

Dormoy-Raclet, V., Menard, I., Clair, E., Kurban, G., Mazroui, R., Di Marco, S., von Roretz, C., Pause, A., and Gallouzi, I.E. (2007). The RNA-binding protein HuR promotes cell migration and cell invasion by stabilizing the beta-actin mRNA in a U-rich-element-dependent manner. *Mol Cell Biol* 27, 5365-5380.

Drury, G.L., Di Marco, S., Dormoy-Raclet, V., Desbarats, J., and Gallouzi, I.E. (2010). FasL expression in activated T lymphocytes involves HuR-mediated stabilization. *J Biol Chem* 285, 31130-31138.

Durie, D., Lewis, S.M., Liwak, U., Kisilewicz, M., Gorospe, M., and Holcik, M. (2011). RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* 30, 1460-1469.

Eberhardt, W., Doller, A., Akool el, S., and Pfeilschifter, J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacology & therapeutics* 114, 56-73.

Eckers, A. (2010). Regulation von FoxO-Transkriptionsfaktoren durch Umwelttoxene: Einfluss von Metallionen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Diss., Düsseldorf).

Einspahr, J.G., Bowden, G.T., Alberts, D.S., McKenzie, N., Saboda, K., Warneke, J., Salasche, S., Ranger-Moore, J., Curiel-Lewandrowski, C., Nagle, R.B., Nickoloff, B.J., Brooks, C., Dong, Z., Stratton, S.P. (2008). Cross-validation of murine UV signal transduction pathways in human skin. *Photochemistry and photobiology* 84, 463-476.

Elbekai, R.H., Korashy, H.M., Wills, K., Gharavi, N., and El-Kadi, A.O. (2004). Benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic Res* 38, 1191-1200.

Enan, E., and Matsumura, F. (1995). Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem Pharmacol* 49, 249-261.

Erkinheimo, T.L., Lassus, H., Sivula, A., Sengupta, S., Furneaux, H., Hla, T., Haglund, C., Butzow, R., and Ristimäki, A. (2003). Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* 63, 7591-7594.

Fan, X.C., and Steitz, J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 17, 3448-3460.

Fernau, N.S., Fugmann, D., Leyendecker, M., Reimann, K., Grether-Beck, S., Galban, S., Ale-Agha, N., Krutmann, J., and Klotz, L.O. (2009). Role of HuR and p38MAPK in ultraviolet B-induced post-transcriptional regulation of COX-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Biol Chem* 285, 3896-3904.

Fernau, NS. (2009). Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Induktion der Cyclooxygenase-2-Expression durch UVB-Strahlung in HaCaT-Keratinocyten (Diss., Düsseldorf).

Fertuck, K.C., Matthews, J.B., and Zacharewski, T.R. (2001). Hydroxylated benzo[a]pyrene metabolites are responsible for in vitro estrogen receptor-mediated gene expression induced by benzo[a]pyrene, but do not elicit uterotrophic effects in vivo. *Toxicol Sci* 59, 231-240.

Filippova, N., Yang, X., Wang, Y., Gillespie, G.Y., Langford, C., King, P.H., Wheeler, C., and Nabors, L.B. (2011). The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Mol Cancer Res* 9, 648-659.

Fries, B., Heukeshoven, J., Hauber, I., Gruttner, C., Stocking, C., Kehlenbach, R.H., Hauber, J., and Chemnitz, J. (2007). Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CD83 expression. *J Biol Chem* 282, 4504-4515.

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., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J., Krutmann, J. (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8851-8856.

Gaido, K.W., Maness, S.C., Leonard, L.S., and Greenlee, W.F. (1992). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors- α and - β 2 expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *J Biol Chem* 267, 24591-24595.

Galban, S., Martindale, J.L., Mazan-Mamczarz, K., Lopez de Silanes, I., Fan, J., Wang, W., Decker, J., and Gorospe, M. (2003). Influence of the RNA-binding protein HuR in pVHL-regulated p53 expression in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 23, 7083-7095.

Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* 7, 1348-1361.

Gallouzi, I.E., and Steitz, J.A. (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* 294, 1895-1901.

Gantt, K.R., Cherry, J., Richardson, M., Karschner, V., Atasoy, U., and Pekala, P.H. (2006). The regulation of glucose transporter (GLUT1) expression by the RNA binding protein HuR. *J Cell Biochem* 99, 565-574.

Gopalakrishna, R., and Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28, 1349-1361.

Gozgit, J.M., Nestor, K.M., Fasco, M.J., Pentecost, B.T., and Arcaro, K.F. (2004). Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 196, 58-67.

Gresham, A., Masferrer, J., Chen, X., Leal-Khoury, S., and Pentland, A.P. (1996). Increased synthesis of high-molecular-weight cPLA2 mediates early UV-induced PGE2 in human skin. *Am J Physiol* 270, C1037-1050.

Guiney, P.D., Walker, M.K., Spitsbergen, J.M., and Peterson, R.E. (2000). Hemodynamic dysfunction and cytochrome P4501A mRNA expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during embryonic stages of lake trout development. *Toxicol Appl Pharmacol* 168, 1-14.

Gundimeda, U., McNeill, T.H., Elhiani, A.A., Schiffman, J.E., Hinton, D.R., and Gopalakrishna, R. (2012). Green tea polyphenols precondition against cell death induced by oxygen-glucose deprivation via stimulation of laminin receptor, generation of reactive oxygen species, and activation of protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem* 287, 34694-34708.

Gupta, R.A., DuBois, R.N., and Wallace, M.C. (2002). New avenues for the prevention of colorectal cancer: targeting cyclo-oxygenase-2 activity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 945-956.

Gupta, R.A., Tejada, L.V., Tong, B.J., Das, S.K., Morrow, J.D., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2003). Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res* 63, 906-911.

Haarmann-Stemmann, T., and Abel, J. (2006). The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function. *Biol Chem* 387, 1195-1199.

Harris, R.E., Beebe-Donk, J., and Alshafie, G.A. (2007). Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of a case control study. *Int J Biol Sci* 3, 328-334.

He, Y.Y., Pi, J., Huang, J.L., Diwan, B.A., Waalkes, M.P., and Chignell, C.F. (2006). Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance. *Oncogene* 25, 3680-3688.

Heinonen, M., Bono, P., Narko, K., Chang, S.H., Lundin, J., Joensuu, H., Furneaux, H., Hla, T., Haglund, C., and Ristimaki, A. (2005). Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res* 65, 2157-2161.

Hoffer, A., Chang, C.Y., and Puga, A. (1996). Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 141, 238-247.

Hua, H., Munk, S., Goldberg, H., Fantus, I.G., and Whiteside, C.I. (2003). High glucose-suppressed endothelin-1 Ca²⁺ signaling via NADPH oxidase and diacylglycerol-sensitive protein kinase C isozymes in mesangial cells. *J Biol Chem* 278, 33951-33962.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 276-285.

Ikuta, T., Namiki, T., Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. (2009). AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol* 77, 588-596.

Jain, R.G., Andrews, L.G., McGowan, K.M., Pekala, P.H., and Keene, J.D. (1997). Ectopic expression of Hel-N1, an RNA-binding protein, increases glucose transporter (GLUT1) expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17, 954-962.

Kang-Rotondo, C.H., Miller, C.C., Morrison, A.R., and Pentland, A.P. (1993). Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity. *Am J Physiol* 264, C396-401.

Kasashima, K., Sakashita, E., Saito, K., and Sakamoto, H. (2002). Complex formation of the neuron-specific ELAV-like Hu RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 30, 4519-4526.

Katiyar, S.K., Matsui, M.S., and Mukhtar, H. (2000). Ultraviolet-B exposure of human skin induces cytochromes P450 1A1 and 1B1. *J Invest Dermatol* 114, 328-333.

Katsanou, V., Papadaki, O., Milatos, S., Blackshear, P.J., Anderson, P., Kollias, G., and Kontoyiannis, D.L. (2005). HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell* 19, 777-789.

Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2006). Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol* 26, 3295-3307.

Keene, J.D. (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5-7.

Kharat, I., and Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* 271, 10533-10537.

Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Lal, A., Pullmann, R., Jr., Yang, X., Galban, S., Srikantan, S., Martindale, J.L., Blethrow, J., Shokat, K.M., Gorospe, M. (2008). Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes Dev* 22, 1804-1815.

Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev* 23, 1743-1748.

Kim, H.S., Wilce, M.C., Yoga, Y.M., Pardini, N.R., Gunzburg, M.J., Cowieson, N.P., Wilson, G.M., Williams, B.R., Gorospe, M., and Wilce, J.A. (2011). Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. *Nucleic Acids Res* 39, 1117-1130.

Kinoshita, T., Takahashi, Y., Sakashita, T., Inoue, H., Tanabe, T., and Yoshimoto, T. (1999). Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1438, 120-130.

Kis, B., Snipes, J.A., and Busija, D.W. (2005). Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 1-7.

Klotz, L.O. (2002). Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* 383, 443-456.

Klotz, L.O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J.M., and Sies, H. (1999). Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur J Biochem* 260, 917-922.

Kohle, C., Gschaidmeier, H., Lauth, D., Topell, S., Zitzer, H., and 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.

Kopf, P.G., and Walker, M.K. (2010). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases reactive oxygen species production in human endothelial cells via induction of cytochrome P4501A1. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 91-99.

Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E., and Tanabe, T. (1994). Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221, 889-897.

Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B., and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev* 16, 3087-3099.

Kwon, M.J., Jeong, K.S., Choi, E.J., and Lee, B.H. (2003). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in Jurkat T cells. *Pharmacol Toxicol* 93, 186-190.

Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O., and Nebreda, A.R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol Cell Biol* 29, 4341-4351.

Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *EMBO J* 24, 1852-1862.

Lasa, M., Mahtani, K.R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J., and Clark, A.R. (2000). Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 20, 4265-4274.

Lee, K., and Esselman, W.J. (2002). Inhibition of PTPs by H(2)O(2) regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic Biol Med* 33, 1121-1132.

Lee, K.M., Lee, K.W., Jung, S.K., Lee, E.J., Heo, Y.S., Bode, A.M., Lubet, R.A., Lee, H.J., and Dong, Z. (2010). Kaempferol inhibits UVB-induced COX-2 expression by suppressing Src kinase activity. *Biochem Pharmacol* 80, 2042-2049.

Levine-Fridman, A., Chen, L., and Elferink, C.J. (2004). Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol Pharmacol* 65, 461-469.

Licata, L.A., Hostetter, C.L., Crismale, J., Sheth, A., and Keen, J.C. (2010). The RNA-binding protein HuR regulates GATA3 mRNA stability in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 122, 55-63.

Long, W.P., Pray-Grant, M., Tsai, J.C., and Perdew, G.H. (1998). Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol Pharmacol* 53, 691-700.

Lopez de Silanes, I., Lal, A., and Gorospe, M. (2005). HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2, 11-13.

- Lopez de Silanes, I., Zhan, M., Lal, A., Yang, X., and Gorospe, M. (2004). Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2987-2992.
- Luecke, S., Wincent, E., Backlund, M., Rannug, U., and Rannug, A. (2010). Cytochrome P450 1A1 gene regulation by UVB involves crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and nuclear factor kappaB. *Chem Biol Interact* *184*, 466-473.
- Ma, J.Q., Liu, C.M., Qin, Z.H., Jiang, J.H., and Sun, Y.Z. (2011). Ganoderma applanatum terpenes protect mouse liver against benzo(alpha)pyren-induced oxidative stress and inflammation. *Environmental toxicology and pharmacology* *31*, 460-468.
- Ma, Q. (2011). Influence of light on aryl hydrocarbon receptor signaling and consequences in drug metabolism, physiology and disease. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* *7*, 1267-1293.
- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., and Furneaux, H. (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* *271*, 8144-8151.
- Maaetoft-Udsen, K., Shimoda, L.M., Frokiaer, H., and Turner, H. (2012). Aryl hydrocarbon receptor ligand effects in RBL2H3 cells. *Journal of immunotoxicology* *9*, 327-337.
- Madhukar, B.V., Brewster, D.W., and Matsumura, F. (1984). Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 7407-7411.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.
- Matikainen, T.M., Moriyama, T., Morita, Y., Perez, G.I., Korsmeyer, S.J., Sherr, D.H., and Tilly, J.L. (2002). Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells. *Endocrinology* *143*, 615-620.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D., and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8354-8359.
- Mazroui, R., Di Marco, S., Clair, E., von Roretz, C., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Saleh, M., and Gallouzi, I.E. (2008). Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol* *180*, 113-127.
- Meisner, N.C., Hintersteiner, M., Mueller, K., Bauer, R., Seifert, J.M., Naegeli, H.U., Ottl, J., Oberer, L., Guenat, C., Moss, S., Harrer, N., Woisetschlaeger, M., Buehler, C., Uhl, V., Auer, M. (2007). Identification and mechanistic

characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat Chem Biol* 3, 508-515.

Millard, S.S., Vidal, A., Markus, M., and Koff, A. (2000). A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 5947-5959.

Miller, M.E., Holloway, A.C., and Foster, W.G. (2005). Benzo-[a]-pyrene increases invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells via increased COX-II expression and prostaglandin E2 (PGE2) output. *Clin Exp Metastasis* 22, 149-156.

Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.

Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L., and Schwarz, M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res* 64, 4707-4710.

Moore, M.J., and Rosbash, M. (2001). Cell biology. TAPping into mRNA export. *Science* 294, 1841-1842.

Mrena, J., Wiksten, J.P., Thiel, A., Kokkola, A., Pohjola, L., Lundin, J., Nordling, S., Ristimaki, A., and Haglund, C. (2005). Cyclooxygenase-2 is an independent prognostic factor in gastric cancer and its expression is regulated by the messenger RNA stability factor HuR. *Clin Cancer Res* 11, 7362-7368.

Mukhopadhyay, D., Houchen, C.W., Kennedy, S., Dieckgraefe, B.K., and Anant, S. (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol Cell* 11, 113-126.

Nam, J.J., Sweetman, A.J., and Jones, K.C. (2009). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in global background soils. *J Environ Monit* 11, 45-48.

Nebert, D.W., and Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 947-960.

Neufang, G., Fürstenberger, G., Heidt, M., Marks, F., and Müller-Decker, K. (2001). Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7629-7634.

Nishigori, C., Hattori, Y., and Toyokuni, S. (2004). Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6, 561-570.

Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803-809.

Park, S., Dong, B., and Matsumura, F. (2007). Rapid activation of c-Src kinase by dioxin is mediated by the Cdc37-HSP90 complex as part of Ah receptor signaling in MCF10A cells. *Biochemistry* 46, 899-908.

Park, S., Mazina, O., Kitagawa, A., Wong, P., and Matsumura, F. (2004). TCDD causes suppression of growth and differentiation of MCF10A, human mammary epithelial cells by interfering with their insulin receptor signaling through c-Src kinase and ERK activation. *J Biochem Mol Toxicol* 18, 322-331.

Park, S.J., Yoon, W.K., Kim, H.J., Son, H.Y., Cho, S.W., Jeong, K.S., Kim, T.H., Kim, S.H., Kim, S.R., and Ryu, S.Y. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in RAW 264.7 cells. *Anticancer Res* 25, 2831-2836.

Pastore, S., Lulli, D., Pascarella, A., Maurelli, R., Dellambra, E., Potapovich, A., Kostyuk, V., De Luca, C., and Korkina, L. (2012). Resveratrol enhances solar UV-induced responses in normal human epidermal keratinocytes. *Photochemistry and photobiology* 88, 1522-1530.

Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J.M., Leikauf, G.D., and Shertzer, H.G. (1997). Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin. *Biochem Pharmacol* 54, 1287-1296.

Puga, A., Maier, A., and Medvedovic, M. (2000). The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1129-1142.

Quintana, F.J., Basso, A.S., Iglesias, A.H., Korn, T., Farez, M.F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65-71.

Rahme, E., Barkun, A.N., Toubouti, Y., and Bardou, M. (2003). The cyclooxygenase-2-selective inhibitors rofecoxib and celecoxib prevent colorectal neoplasia occurrence and recurrence. *Gastroenterology* 125, 404-412.

Randi, A.S., Sanchez, M.S., Alvarez, L., Cardozo, J., Pontillo, C., and Kleiman de Pisarev, D.L. (2008). Hexachlorobenzene triggers AhR translocation to the nucleus, c-Src activation and EGFR transactivation in rat liver. *Toxicol Lett* 177, 116-122.

Rannug, U., Rannug, A., Sjoberg, U., Li, H., Westerholm, R., and Bergman, J. (1995). Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2, 841-845.

Rivas-Aravena, A., Ramdohr, P., Vallejos, M., Valiente-Echeverria, F., Dormoy-Raclet, V., Rodriguez, F., Pino, K., Holzmann, C., Huidobro-Toro, J.P., Gallouzi, I.E., López-Lastra, M. (2009). The Elav-like protein HuR exerts translational control of viral internal ribosome entry sites. *Virology* 392, 178-185.

Santodonato, J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 34, 835-848.

Schrenk, D. (1998). Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 55, 1155-1162.

Schwarz, T. (2005). Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J Med* 54, 165-171.

Sengupta, S., Jang, B.C., Wu, M.T., Paik, J.H., Furneaux, H., and Hla, T. (2003). The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 278, 25227-25233.

Serini, S., Donato, V., Piccioni, E., Trombino, S., Monego, G., Toesca, A., Innocenti, I., Missori, M., De Spirito, M., Celleno, L., Fasano, E., Ranelletti, F.O., Calviello, G., (2010). Docosahexaenoic acid reverts resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes: involvement of COX-2 and HuR. *J Nutr Biochem* 22, 874-885.

Shaffi, S.M., Shah, M.A., Bhat, I.A., Koul, P., Ahmad, S.N., and Siddiqi, M.A. (2009). CYP1A1 polymorphisms and risk of lung cancer in the ethnic Kashmiri population. *Asian Pac J Cancer Prev* 10, 651-656.

Shah, P.P., Saurabh, K., Pant, M.C., Mathur, N., and Parmar, D. (2009). Evidence for increased cytochrome P450 1A1 expression in blood lymphocytes of lung cancer patients. *Mutat Res* 670, 74-78.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., and 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, I.S., Tatebe, S., Dai, W., and Kuo, M.T. (2005). Delayed mechanism for induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit mRNA stability by oxidative stress involving p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 280, 28230-28240.

Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2001). Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med* 7, 1048-1051.

Steenport, M., Khan, K.M., Du, B., Barnhard, S.E., Dannenberg, A.J., and Falcone, D.J. (2009). Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *J Immunol* 183, 8119-8127.

Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L.K., Levin, B. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342, 1946-1952.

Subbaramaiah, K., Marmo, T.P., Dixon, D.A., and Dannenberg, A.J. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR. *J Biol Chem* 278, 37637-37647.

Sureban, S.M., Murmu, N., Rodriguez, P., May, R., Maheshwari, R., Dieckgraefe, B.K., Houchen, C.W., and Anant, S. (2007). Functional antagonism between RNA

binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. *Gastroenterology* 132, 1055-1065.

Tang, Q., Chen, W., Gonzales, M.S., Finch, J., Inoue, H., and Bowden, G.T. (2001). Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene* 20, 5164-5172.

Thun, M.J., Henley, S.J., and Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94, 252-266.

Tong, X., Van Dross, R.T., Abu-Yousif, A., Morrison, A.R., and Pelling, J.C. (2007). Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. *Mol Cell Biol* 27, 283-296.

Tran, H., Maurer, F., and Nagamine, Y. (2003). Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol* 23, 7177-7188.

Tsai, J.H., Chen, S.J., Huang, K.L., Lee, W.J., Kuo, W.C., and Lin, W.Y. (2011). Characteristics of particulate emissions from a diesel generator fueled with varying blends of biodiesel and fossil diesel. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 46, 204-213.

Tsai, K.S., Yang, R.S., and Liu, S.H. (2004). Benzo[a]pyrene regulates osteoblast proliferation through an estrogen receptor-related cyclooxygenase-2 pathway. *Chem Res Toxicol* 17, 679-684.

van der Giessen, K., Di-Marco, S., Clair, E., and Gallouzi, I.E. (2003). RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 278, 47119-47128.

Van Laethem, A., Garmyn, M., and Agostinis, P. (2009). Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochem Photobiol Sci* 8, 299-308.

Vogel, C., Boerboom, A.M., Baechle, C., El-Bahay, C., Kahl, R., Degen, G.H., and Abel, J. (2000). Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. *Carcinogenesis* 21, 2267-2274.

Vogel, C., Schuhmacher, U.S., Degen, G.H., Bolt, H.M., Pineau, T., and Abel, J. (1998). Modulation of prostaglandin H synthase-2 mRNA expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice. *Arch Biochem Biophys* 351, 265-271.

von Montfort, C., Fernau, N.S., Beier, J.I., Sies, H., and Klotz, L.O. (2006). Extracellular generation of hydrogen peroxide is responsible for activation of EGF receptor by ultraviolet A radiation. *Free Radic Biol Med* 41, 1478-1487.

- von Roretz, C., and Gallouzi, I.E. (2010). Protein kinase RNA/FADD/caspase-8 pathway mediates the proapoptotic activity of the RNA-binding protein human antigen R (HuR). *J Biol Chem* 285, 16806-16813.
- Wang, J., Zhao, W., Guo, Y., Zhang, B., Xie, Q., Xiang, D., Gao, J., Wang, B., and Chen, Z. (2009). The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis. *Oncology* 76, 420-429.
- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H., and Gorospe, M. (2000a). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J* 19, 2340-2350.
- Wang, W., Fan, J., Yang, X., Furer-Galban, S., Lopez de Silanes, I., von Kobbe, C., Guo, J., Georas, S.N., Fougere, F., Hardie, D.G., Carling, D., Gorospe, M. (2002). AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 22, 3425-3436.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. (2000b). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20, 760-769.
- Wang, Y.X., and Zheng, Y.M. (2010). ROS-dependent signaling mechanisms for hypoxic Ca(2+) responses in pulmonary artery myocytes. *Antioxid Redox Signal* 12, 611-623.
- Warner, M., Eskenazi, B., Mocarelli, P., Gerthoux, P.M., Samuels, S., Needham, L., Patterson, D., and Brambilla, P. (2002). Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 110, 625-628.
- Wei, Y.D., Rannug, U., and Rannug, A. (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem Biol Interact* 118, 127-140.
- Westmark, C.J., Bartleson, V.B., and Malter, J.S. (2005). RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light. *Oncogene* 24, 502-511.
- Whitlock, J.P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 103-125.
- Williams, T.K., Costantino, C.L., Bildzukewicz, N.A., Richards, N.G., Rittenhouse, D.W., Einstein, L., Cozzitorto, J.A., Keen, J.C., Dasgupta, A., Gorospe, M., Gonye, G.E., Yeo, C.J., Witkiewicz, A.K., Brody, J.R. (2010). pp32 (ANP32A) expression inhibits pancreatic cancer cell growth and induces gemcitabine resistance by disrupting HuR binding to mRNAs. *PLoS One* 5, e15455.
- Xu, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2006). Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am J Pathol* 169, 823-830.

Yan, Z., Subbaramaiah, K., Camilli, T., Zhang, F., Tanabe, T., McCaffrey, T.A., Dannenberg, A.J., and Weksler, B.B. (2000). Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase and NF-kappaB. *J Biol Chem* 275, 4949-4955.

Yang, X., Liu, D., Murray, T.J., Mitchell, G.C., Hesterman, E.V., Karchner, S.I., Merson, R.R., Hahn, M.E., and Sherr, D.H. (2005). The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses c-myc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24, 7869-7881.

Young, L.E., Sanduja, S., Bemis-Standoli, K., Pena, E.A., Price, R.L., and Dixon, D.A. (2009). The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology* 136, 1669-1679.

Yuan, Z., Sanders, A.J., Ye, L., and Jiang, W.G. (2010). HuR, a key post-transcriptional regulator, and its implication in progression of breast cancer. *Histol Histopathol* 25, 1331-1340.

Zhang, J., and Bowden, G.T. (2008). UVB irradiation regulates Cox-2 mRNA stability through AMPK and HuR in human keratinocytes. *Mol Carcinog* 47, 974-983.

Danksagung:

Ich danke Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz für die Betreuung und Bereitstellung des Themas.

Ich danke PD Dr. Steinbrenner für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Nilo Ale-Agha, die mir immer eine große Hilfe und Unterstützung war.

Außerdem bedanke ich mich bei dem Rest der ehem. AG Klotz für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01.04.2014, Marie Gündel
