

Die Rolle des Arylhydrokarbon-Rezeptors in der UVB-induzierten Signaltransduktion

Inaugural-Dissertation

zur

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

Angefertigt am Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH (IUF)

vorgelegt von

Claudia Schäfer

aus Düsseldorf

Düsseldorf

Dezember 2006

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

Referent: Prof. Dr. Josef Abel

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2007



*Die wahren Optimisten sind nicht überzeugt, dass alles gut gehen wird,
aber sie sind überzeugt, dass nicht alles schief gehen kann.*

(Friedrich Schiller)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Familie der bHLH-PAS-Proteine.....	2
1.2	Der AhR Nuklear Transporter (ARNT).....	3
1.3	Die Struktur des Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR)	3
1.3.1	<i>Aktivierung des AhR</i>	3
1.3.2	<i>Liganden des AhR</i>	5
1.3.3	<i>Die AhR-Signaltransduktion</i>	7
1.4	Ultraviolette (UV) Strahlung	8
1.5	Pathologische Wirkungen von UV-Strahlung	10
1.5.1	<i>UV-induziertes Erythem</i>	10
1.5.2	<i>Photokarzinogenese</i>	11
1.5.3	<i>Immunsuppression</i>	12
1.5.4	<i>Vorzeitige Hautalterung</i>	13
1.6	UV-Schutz	13
1.7	Benefit der UV-Strahlung.....	14
1.8	Auswirkungen von UV-Strahlung auf zellulärer Ebene.....	15
1.8.1	<i>Kern</i>	15
1.8.2	<i>Membran</i>	16
1.8.3	<i>AhR und UVB</i>	18
1.9	Fragestellung	19
2	Material	20
2.1	Zellkultur	20
2.1.1	<i>Nährmedien</i>	20
2.1.2	<i>Zusätze</i>	20
2.1.3	<i>Komplettmedien</i>	20
2.2	Inhibitoren / Aktivatoren	21
2.3	Transiente Transfektion mit pEGFPmAhR	21

2.4	Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion	22
2.5	Isolierung von Kernprotein und Immunopräzipitation	22
2.6	Western Blotting	23
2.6.1	<i>Antikörper</i>	23
2.6.2	<i>Lösungen</i>	23
2.7	Immunocytochemie	24
3	Methoden	25
3.1	Zellkultur	25
3.1.1	<i>Kultivierung der humanen Keratinozyten</i>	25
3.1.2	<i>Kryokonservierung und Revitalisierung</i>	25
3.1.3	<i>Behandlung der Zellen</i>	26
3.2	UVB-Bestrahlung	27
3.3	Generierung der AhR Knockout Zellen	27
3.4	Transiente Transfektion mit pEGFPmAhR	29
3.5	Reverse Transkription (RT)-Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30
3.6	Isolierung von Kernprotein und Immunopräzipitation	32
3.7	Western Blotting	33
3.8	Immunocytochemie	33
3.9	Bestimmung der intrazellulären Tryptophankonzentration	34
3.10	Identifikation von intrazellulärem FICZ	35
3.11	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Einfluss der UVB-Strahlung auf die AhR-Aktivierung	37
4.2	Kontrolle verschiedener siRNA-Sequenzen	40
4.3	Überprüfung der transduzierten Zellen auf AhR-Expression und Effekte des AhR Knockout auf das Zielgen Cyp1A1	41
4.4	Einfluss der AhR-Aktivierung auf die EGFR-Internalisierung	43
4.5	Einfluss der AhR-Aktivierung auf EGFR-Zielmoleküle	45
4.6	Einfluss der AhR-Aktivierung auf die EGFR-Phosphorylierung	48
4.7	Einfluss des src-Inhibitors PP2 auf den EGFR und EGFR-abhängige Zielmoleküle	50
4.8	Auswirkungen einer Tryptophan-Depletion auf die AhR- und EGFR- Aktivierung	53

4.9	Identifikation von FICZ.....	56
4.10	Einfluss von FICZ auf die UVB-induzierte AhR-Signaltransduktion.....	59
5	Diskussion.....	63
5.1	Der AhR wird durch UVB aktiviert	63
5.2	Die Aktivierung des EGFR und -Zielmolekülen ist AhR-abhängig.....	65
5.3	Die src-Kinase mediiert die UVB-induzierte EGFR-Aktivierung	68
5.4	Der Nachweis von FICZ als endogener Ligand des AhR	69
5.5	FICZ imitiert die UVB-induzierte Signaltransduktion.....	71
5.6	Schlussfolgerung & Ausblick.....	72
6	Zusammenfassung.....	73
7	Literatur	75

Abkürzungsverzeichnis

6-4-PP	6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte
8-OxoG	8-Oxo-Guanin
Å	Ångström-Einheit (1 Å = 100 pm)
AHH	Arylhydrokarbon-Hydroxylase
AhR	Arylhydrokarbon-Rezeptor
AhRR	Arylhydrokarbon-Rezeptor-Repressor
AIP1	Apoptose-induzierendes Protein 1
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ARA9	AhR-assoziertes Protein
ARNT	AhR Nuklear Transporter
B(a)P	Benz(a)pyren
bHLH	basische Helix Loop Helix
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
Cyp	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGCG	Epigallocatechingallat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure-Dinatriumsalz
ERK 1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1 + 2

EZM	extrazelluläre Matrix
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FCS	Fötales Kälberserum
FICZ	6-Formylindolo[3,2- <i>b</i>]carbazol
g	Gravitation
GADD	“growth arrest- and damage-dependend”
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
G-Phase	„gap“-Phase
Grb2	“growthfactor receptor-bound protein 2”
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunden
HaCaT	“human adult high calcium low temperature”
HAH	halogenierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierender Faktor
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HRP	“horseradish peroxidase”
Hsp90	Heatshockprotein 90
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
J	Joule
KO	Knockout
LV	Leervektor
m	milli / meter
M	mol pro Liter
μ	mikro
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	“murine double minute 2“
MEK	MAPK-Kinase
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase

MNF	3-Methoxy-4-nitroflavon
mRNA	Boten-RNA
MS-MS	Tandem-Massenspektroskopie
n	nano
n.s.	non-silencing
NG	Nachweisgrenze
NLS	nukleare Lokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAI-2	“plasminogen activator inhibitor 2”
PAS	Per / Arnt / Sim
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	„proliferating cell nuclear antigene“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastomprotein
RIPA	Radio-Immunoprecipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	“reversed phase“
rpm	“rounds per minute“
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
SDS	Natriumdodekylsulfat
sec	Sekunde
SFFV	“spleen focus-forming virus“
shRNA	“small hairpin RNA“
siRNA	“small interfering RNA“
Sos	“son of sevenless“
S-Phase	Synthese-Phase
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	„tissue inhibitors of MMPs“
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen
XAP2	Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2
XRE	xenobiotisch responsive Elemente
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Organismen sind im Laufe ihres Lebens einer Vielzahl von Fremdstoffen ausgesetzt. Dazu gehören Pflanzeninhaltsstoffe, Pharmazeutika sowie Umweltkontaminanten. Um diese Substanzen exkretieren zu können, wurde im Laufe der Evolution der Fremdstoffmetabolismus entwickelt. In einem als Biotransformation bezeichneten Vorgang werden die Fremdstoffe in zwei Phasen in hydrophile Metaboliten umgewandelt und können dann über Niere und Leber exkretiert werden. In der ersten Phase werden durch Oxidation, Reduktion und Hydrolyse funktionelle Gruppen wie -OH, -SH, -NH₂ und -COOH eingeführt, die Angriffspunkte für Phase-II-Enzyme darstellen. Zu dieser ersten Gruppe gehören u.a. Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (Cyp-Familie), Flavin-abhängige Monooxygenasen und Peroxidasen. In Phase II werden die oxidierten, reduzierten oder hydrolysierten Stoffe an verschiedene niedermolekulare Substanzen wie z.B. Glucuronsäure gebunden. Diese Konjugation erhöht die Wasserlöslichkeit und fördert die Exkretion. Mitglieder dieser zweiten Gruppe sind u.a. Glucoronyl-, Sulfo- und Acetyltransferasen.

Ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Gene des Fremdstoffmetabolismus, wie z.B. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 (Phase I), sowie Glutathion-S-Transferase Ya, Aldehyd-3-Dehydrogenase und UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 (Phase II) (Nebert, D. W. & Gonzalez, F. J., 1987; Schrenk, D., 1998) aktiviert, ist der Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR). Obwohl die Entdeckung des AhR schon 30 Jahre zurückliegt (Poland, A. et al, 1976), ist er bis heute hauptsächlich im Zusammenhang mit Dioxin bekannt. Eine Tatsache, die sich im zweiten Namen des AhR äußert: Dioxin-Rezeptor. Die physiologische Rolle des AhR wurde lange Zeit nicht beachtet und hat erst in den letzten Jahren mehr Aufmerksamkeit erfahren. Mit ausschlaggebend war wohl das Faktum, dass der AhR genetisch gesehen 400-500 Mio. Jahre alt ist und sowohl vertebrale als auch invertebrale Homologe besitzt (Hahn, M. E. et al, 1997). Die weite Verbreitung des AhR im Tierreich stellt eine erfolgreiche Adaptation an die Umwelt während der Evolution dar.

1.1 Die Familie der bHLH-PAS-Proteine

Der AhR ist ein liganden-aktivierter zytosolischer Transkriptionsfaktor, der in den meisten Zellen und Geweben vorkommt. Er gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Proteine. Das Akronym PAS entstand aus den ersten drei identifizierten bHLH-PAS-Genen: *Drosophila period* (Per; das Homolog zum human *Clock*), human *ARNT* und *Drosophila single-minded* (Sim).

Die Mitglieder dieser Familie erstrecken sich von Bakterien über Pflanzen bis hin zu den Säugetieren (Taylor, B. L. & Zhulin, I. B., 1999) und sind für zahlreiche biologische Prozesse, wie z.B. Fremdstoffmetabolismus, circadianer Rhythmus, Stressantworten und Entwicklungsprozesse verantwortlich.

Die Signaltransduktion der bHLH-PAS-Proteine wird durch die Bildung von Homo- oder Heterodimeren initiiert. Die Interaktion der Proteine wird dabei über die PAS-Domäne und HLH-Region der bHLH-Domäne reguliert. Primär erfolgt die Dimerisierung über bHLH-Domäne, die PAS-Domäne ist für die Spezifizierung des Interaktionspartners verantwortlich. Letztere besteht aus 250-300 Aminosäuren und enthält zwei degenerierte, als A und B bezeichnete Subdomänen. Im Falle des AhR, der als einziges Familienmitglied Liganden-abhängig aktiviert wird, beinhaltet dieser Bereich auch die Ligandenbindungsstelle und den Interaktionsort mit dem Co-Chaperon Heatshockprotein 90 (Hsp90; Abb. 1.1). Die DNA-Bindung wird von der basischen Region der HLH-Domäne übernommen. Gegenüber den hochkonservierten bHLH- und PAS-Domänen ist die C-terminale Sequenz der bHLH-PAS-Proteine sehr variabel. Im Laufe der Evolution sind in diesem Bereich Transaktivierungs- (TAD) und Repressor-domänen entstanden.

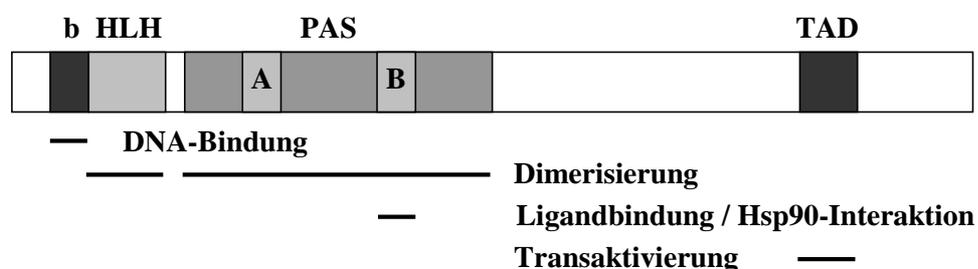


Abb. 1.1: Schematische Struktur des AhR

1.2 Der AhR Nuklear Transporter (ARNT)

Ein weiteres Mitglied der bHLH-PAS-Familie ist der AhR Nuklear Transporter (ARNT), ein genereller Interaktionspartner für andere Mitglieder der bHLH-PAS-Familie. Neben der HLH- und der PAS-Domäne, die die Dimerisierung steuern, besitzt ARNT außerdem eine hochreaktive C-terminale Transaktivierungsdomäne, die weitere Kofaktoren rekrutieren kann (Kobayashi, A. et al, 1997).

Die Rolle von ARNT als Interaktionspartner in der Heterodimerisierung mit anderen bHLH-PAS-Proteinen wie AhR, *Drosophila* Trachealess (Trh), Single-minded (Sim) und Hypoxie-induzierender Faktor 1a (HIF-1a) konnte in der Vergangenheit bereits belegt werden (Ema, M. et al, 1992; Wang, G. L. et al, 1995; Hoffman, E. C. et al, 1991; Swanson, H. I. et al, 1995; Isaac, D. D. & Andrew, D. J., 1996). Es wird außerdem vermutet, dass erst durch die Interaktion mit ARNT die Transaktivierungsdomäne des AhR in der Lage ist, die Genexpression zu starten (Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J., 2005). Im Gegensatz dazu ist die Funktion des ARNT-Homodimers noch weitestgehend unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass das Homodimer an E-Boxen bindet (Sogawa, K. et al, 1995). Bei der E-Box handelt es sich um die Basenabfolge CACGTG, die sich im Promoter verschiedener Gene befindet. Damit könnte das ARNT-Homodimer an der transkriptionellen Regulation weiterer Gene beteiligt sein.

1.3 Die Struktur des Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR)

1.3.1 Aktivierung des AhR

In seinem inaktiven Zustand ist der AhR Teil eines zytosolischen Multiprotein-komplexes. Über den AhR hinaus setzt sich dieser aus einem Hsp90-Dimer, dem Co-Chaperon p23, der Tyrosinkinase c-src und dem AhR-assoziierten Protein (ARA9), auch Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2 (XAP2) oder Apoptose-induzierendes Protein 1 (AIP1) genannt, zusammen. Während die Interaktion mit dem Hsp90-Dimer die PAS-Domäne in der Konformation zu halten scheint, die für die Bindung des Liganden essentiell ist, ist die Funktion der übrigen Komponenten bisher noch nicht ganz aufgeklärt. Bei ARA9 wird vermutet, dass es die Signaltransduktion durch Erhöhung der Rezeptoranzahl im Zytosol verstärkt und den Rezeptor stabilisiert (LaPres, J. J. et al, 2000; Meyer, B. K. & Perdew, G. H., 1999). p23 dagegen soll zur

Stabilisierung des AhR-Hsp90-Komplex beitragen (Kazlauskas, A. et al, 2000; Kazlauskas, A. et al, 2001). Zudem erleichtert der Hsp90-p23-Komplex *in vitro* die Bindung des AhR an Importin, woraus sich eine Rolle im nuklearen Import ergeben könnte (Kazlauskas, A. et al, 2001). Importin bindet an die nukleare Lokalisationssequenz (NLS), die auch der AhR im N-terminalen Bereich besitzt (Ikuta, T. et al, 1998). Dieser Komplex dockt dann an die zytoplasmatische Seite der Kernpore an. Liganden des AhR sind generell lipophil, so dass sie die Zellmembran leicht durchdringen und an den zytosolischen AhR-Multiproteinkomplex binden können. Die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Freisetzung der Rezeptor-assoziierten Proteine und legt die NLS des AhR frei. Ob die Trennung des Multiprotein-Komplexes im Zytosol oder erst im Zellkern stattfindet, ist bisher noch ungeklärt. Die Beobachtung, dass das Hsp90-Dimer jedoch die NLS maskiert und so die Translokation in den Zellkern verhindert, befürwortet die Annahme, dass zumindest die Abspaltung von Hsp90 und der an Hsp90 assoziierten c-src bereits im Zytosol stattfindet (Ikuta, T. et al, 1998). Im Zellkern dimerisiert der AhR mit dem AhR Nuklear Transporter (ARNT). Durch die Bindung des AhR-ARNT-Ligand-Komplex an Enhancer-Sequenzen namens XRE (xenobiotisch responsive Elemente) wird die Expression der Zielgene wie z.B. Cyp1A1 transkriptionell induziert (Abb. 1.2).

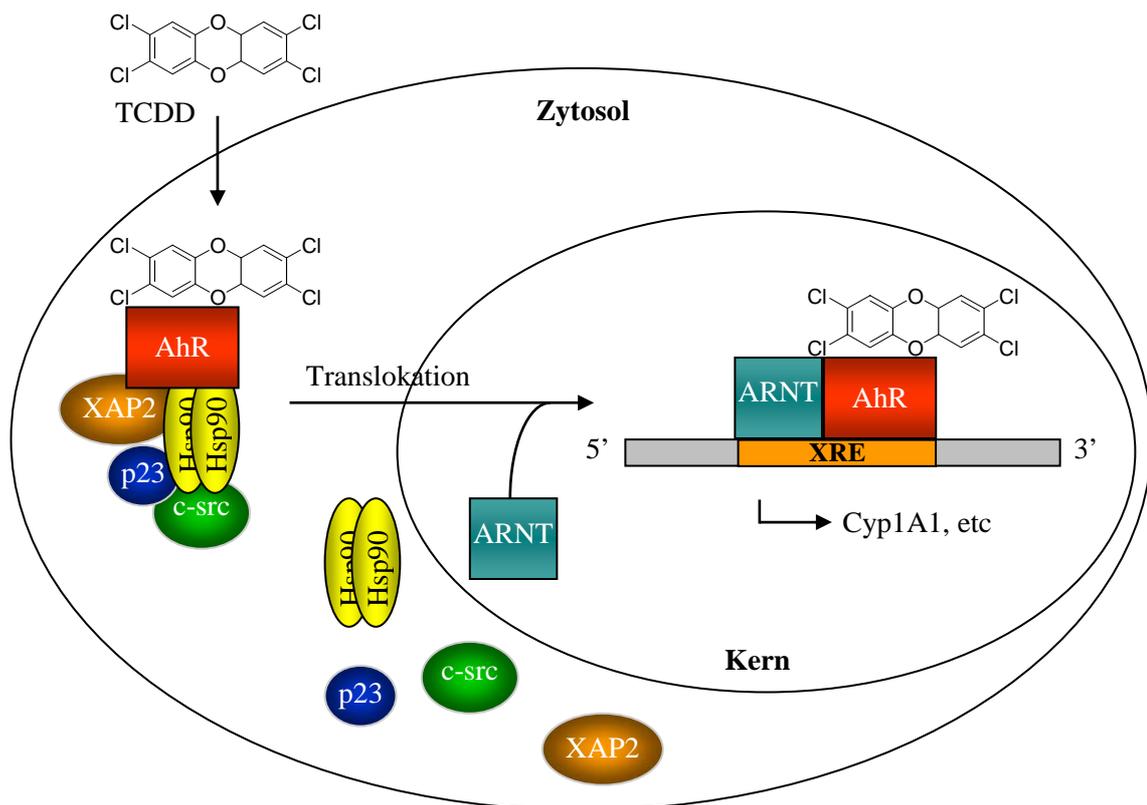


Abb. 1.2: Mechanismus der AhR-Aktivierung

Die Inhibierung des AhR erfolgt hingegen über die Dimerisierung von ARNT mit AhR-Repressor (AhRR). Der AhRR gehört wie ARNT und der AhR zu den PAS-Proteinen, unterscheidet sich von diesen beiden jedoch im Fehlen der PAS_B-Domäne und der C-terminalen TAD (Mimura, J. et al, 1999). Dadurch ist der AhRR zwar in der Lage, als Heterodimer mit ARNT an dieselben DNA-Erkennungssequenzen zu binden, löst aber keine transkriptionelle Aktivierung aus. Neben diesem kompetitiven Hemmungsmechanismus ist der AhRR auch ein Zielgen des AhR/ARNT-Transkriptionsfaktors, der damit durch eine negative Rückkopplung den AhR reguliert (Mimura, J. et al, 1999).

1.3.2 Liganden des AhR

Einer der stärksten AhR-Liganden ist 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), das bei nicht-kompletten Verbrennungsprozessen entsteht (Fiedler, H., 1996). Das Dioxin-Derivat gehört zur Gruppe der synthetischen (klassischen) AhR-Liganden, wozu ebenfalls die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) und die halogenierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAH) zählen. Allen

gemeinsam ist eine planare Struktur und maximale Größe von 14 Å x 12 Å x 5 Å. Die metabolisch stabileren HAHs besitzen Bindungsaffinitäten im pM- bis nM-Bereich und gehören damit zu den stärksten AhR-Liganden. Die metabolisch instabileren PAH binden mit geringeren Affinitäten im nM- bis µM-Bereich.

Neben den klassischen AhR-Liganden gibt es auch natürlich vorkommende Substanzen, die sich in der Struktur stark von der ersten Gruppe unterscheiden („nicht-klassische“ Liganden). Dazu gehören beispielsweise die AhR-Antagonisten 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) und Epigallocatechingallat (EGCG) (Henry, E. C. et al, 1999; Williams, S. N. et al, 2000). Einige Beispiele für klassische und nicht-klassische Liganden sind in Abb. 1.3 dargestellt.

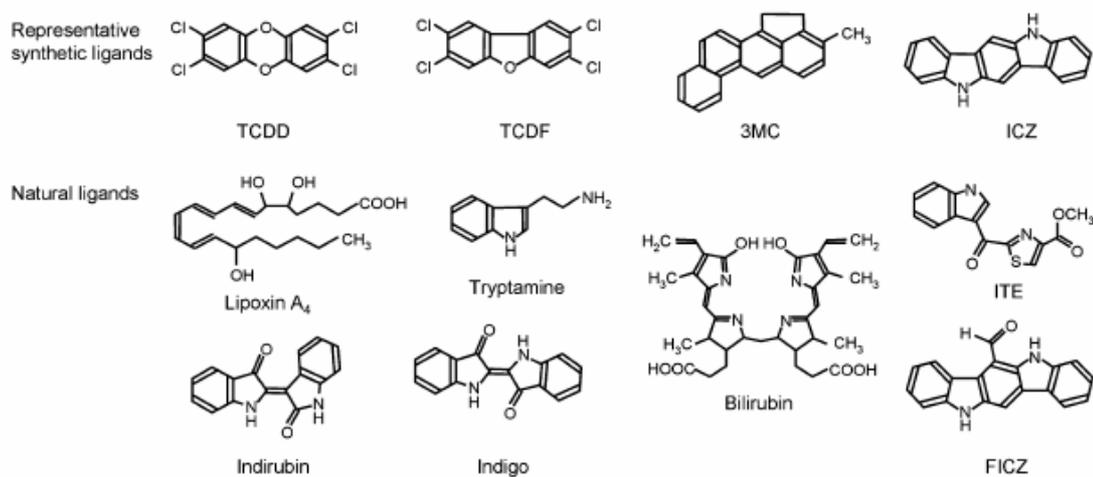


Abb. 1.3: Einige AhR-Liganden

TCDD: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDF: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran; 3MC: 3-Methylcholanthren; ICZ: Indro[3,2-*b*]carbazol; ITE: 2-(1'*H*-Indole-3'-carbonyl)-thiazol-4-karbonsäuremethylester; FICZ: 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol

(Quelle: (Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J., 2005))

Abgesehen von diesen hauptsächlich über die Nahrung aufgenommenen AhR-Liganden, gibt es zudem aber auch Hinweise für einen endogenen AhR-Liganden. Mehrere Veröffentlichungen zeigen, dass AhR-abhängige Cyp1A1-Expression, Enzymaktivität, nukleare Lokalisation des AhR und Induktion von Reporterassays auch in Abwesenheit eines exogenen Liganden auftreten (Hankinson, O. et al, 1985; RayChaudhuri, B. et al,

1990; Singh, S. S. et al, 1996; Weiss, C. et al, 1996; Chang, C. Y. & Puga, A., 1998; Roblin, S. et al, 2004; Shiizaki, K. et al, 2005).

1.3.3 Die AhR-Signaltransduktion

Die Aktivierung des AhR führt zur Induktion einer Reihe von Genen, welche als AhR-Genbatterie bezeichnet werden. Durch die Dioxin-vermittelnde toxische Wirkung des AhR konnten die Gene des Fremdstoffmetabolismus *Cyp1A*, *A2* und *B1* als erstes mit dem AhR in Zusammenhang gebracht werden, mittlerweile sind jedoch eine ganze Reihe von zelltypspezifischen Signalwegen bekannt, auf die der AhR Einfluss nehmen kann.

So kann u.a. die antiöstrogene Wirkung von TCDD konnte auf eine direkte Wechselwirkung des aktivierten AhR mit dem Östrogenrezeptor zurückgeführt werden (Buchanan, D. L. et al, 2002; Ohtake, F. et al, 2003), die für die Karzinogenese hormonabhängiger Tumore und deren Therapie von Bedeutung ist (Rowlands, J. C. & Gustafsson, J. A., 1997; Safe, S. et al, 1998; Safe, S. & Krishnan, V., 1995; Safe, S., 2001; Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y., 1997). Außerdem werden Mediatoren für Zellwachstum und –differenzierung wie TGF- α (transformierender Wachstumsfaktor α) und TGF- β 2, PAI-2 (plasminogen activator inhibitor 2), und Interleukin-1 β (IL-1 β) durch TCDD induziert. (Abott et al., 1998; Bock, 1994; Hankinson, 1995; Rowlands und Gustafsson, 1997). Zu diesem Bereich gehört auch die Induktion der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* durch TCDD in Maus-Hepatomzellen, die über den daraus entstehenden Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein 1) Zellwachstum verursachen (Puga, A. et al, 1992).

Darüber hinaus scheint der AhR eine nicht unbedeutende Rolle in der Zellzykluskontrolle zu spielen. So konnte die Arbeitsgruppe von Göttlicher anhand von 5L und AhR-defizienten BP8-Rattenhepatomzellen zeigen, dass der AhR das Fortschreiten des Zellzyklus in einer ligandenabhängigen Weise beeinflusst (Weiss, C. et al, 1996). Verantwortlich dafür ist der Zyklin-abhängige Kinase (CDK)2-Inhibitor p27 (Kip1), dessen Expression durch TCDD in 5L-Zellen erhöht wird (Kolluri, S. K. et al, 1999), wodurch die Zelle in der G₁-Phase zum Zellzyklusarrest kommt. Ein weiteres mögliches Ziel ist das Retinoblastomprotein (Rb) (Ge, N. L. & Elferink, C. J., 1998). Wörner und Schrenk (Wörner, W. & Schrenk, D., 1998) konnten ebenfalls zeigen, dass TCDD in

primären Rattenhepatozyten zur AhR-abhängigen Phosphorylierung von p53 und damit zum Zellzyklusarrest führt.

Ein drittes Indiz ist, dass das Onkogen c-myc, welches durch den AhR konstitutiv reprimiert wird (Yang, X. et al, 2005), den Zellzyklus progressiert (Dang, C. V., 1999; Amati, B., 2001). Die Zielgene von Myc beeinflussen die Regulation der Zellmatrix-Interaktionen, die DNA-Synthese, besonders aber den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus (Coller, H. A. et al, 2000; Guo, Q. M. et al, 2000; Schuhmacher, M. et al, 2001; Fernandez, P. C. et al, 2003).

Hinzu kommt, dass der AhR auch am Clustering der Membranrezeptoren beteiligt ist, da AhR-Liganden ähnlich wie UVB die Aktivierung der Membranrezeptoren auslösen und die Signalkaskade initiieren kann (Puga, A. et al, 1997; Lawrence, B. P. & Kerkvliet, N. I., 1998). Dieser Effekt könnte durch die im AhR-Multiproteinkomplex vorkommende c-src Tyrosinkinase vermittelt werden. Experimente mit c-src Knockout Mäusen demonstrieren, dass die Induktion der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) nach AhR-Aktivierung c-src-abhängig ist (Vogel, C. et al, 2000). Für die tumorpromovierende Wirkung von TCDD ist das möglicherweise von großer Bedeutung, denn man findet sowohl in transformierten Zelllinien (Muller-Decker, K. et al, 1995; Subbaramaiah, K. et al, 1996) als auch in menschlichem Tumorgewebe (Sano, H. et al, 1995) eine erhöhte Expression der COX-2.

1.4 Ultraviolette (UV) Strahlung

Nichtionisierende elektromagnetische Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 200 - 400 nm wird als Ultraviolette (UV) Strahlung bezeichnet. Obwohl UV-Strahlung nicht sichtbar ist, wird aufgrund der Zugehörigkeit zur Gruppe der optischen Wellenlängen häufig auch der irreführende Begriff „UV-Licht“ benutzt. Abhängig von der Wellenlänge wird UV-Strahlung in UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) und UVC (200 – 280 nm) unterteilt. Da Wellenlängen unter 290 nm von der Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert werden und so die Erdoberfläche nicht erreichen, ist die UVC-Strahlung und der kurzwellige Anteil der UVB-Strahlung des Sonnenlichts für den menschlichen Organismus nicht relevant (Gasparro, F. P. et al, 1998).

Abhängig von der Wellenlänge der Strahlung finden Wechselwirkungen mit der Haut statt, die dazu führen, dass die biologische Wirkung der UV-Strahlung mit zunehmender

Eindringtiefe in die Haut abnimmt. Die kurzwellige UVB-Strahlung wird stärker abgeschwächt als die längerwellige UVA-Strahlung und gelangt daher nur bis zur Basalmembran der Oberhaut, dem Entstehungsort des pathologischen UV-Erythems (Sonnenbrand). Dagegen dringt die UVA-Strahlung bis zur Lederhaut ein, schädigt dort durch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Elastin- und Kollagenfaserstruktur des Bindegewebes und führt damit zur vorzeitigen Hautalterung (Lademann, J. et al, 2000) (Abb. 1.4)

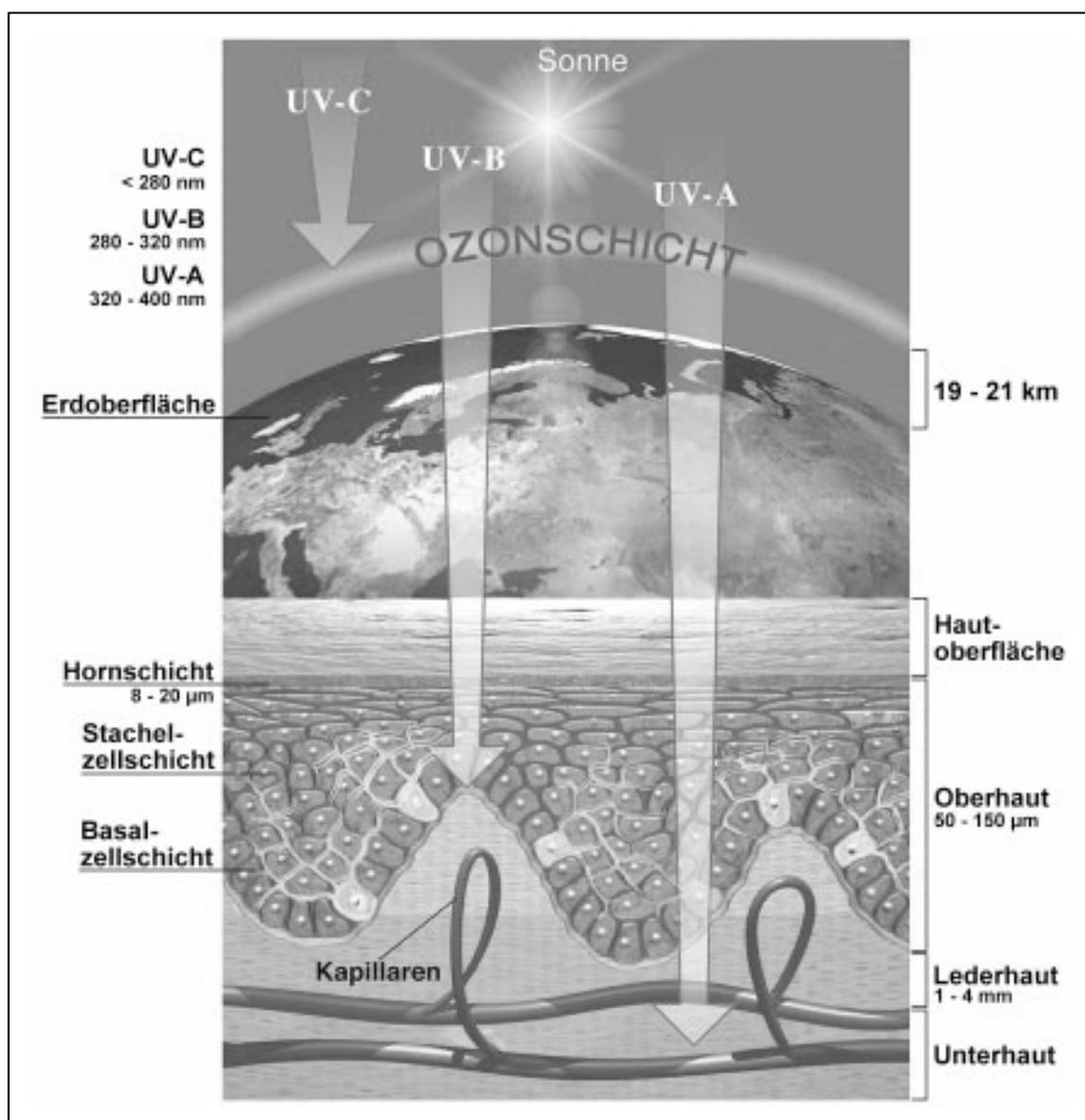


Abb. 1.4: Wege der UV-Strahlung von der Sonne bis zur Haut (Abb. nach Strahlenschutzkommission, 1998)

1.5 Pathologische Wirkungen von UV-Strahlung

UV-Strahlung bewirkt pathologische Veränderungen der Haut, zu denen das UV-induzierte Erythem, Tumorentstehung und vorzeitige Hautalterung, das so genannte Photoaging, gehören.

1.5.1 UV-induziertes Erythem

UV-Bestrahlung kann eine entzündliche Rötung der menschlichen Haut verursachen, die als UV-Erythem (Sonnenbrand, Dermatitis solaris) bekannt ist. Die akute Entzündung der Haut zeigt sich als eine schmerzhafte Rötung, Schwellung und gelegentliche Blasenbildung, beschränkt auf den Ort der Lichteinwirkung. Neben diesen für das bloße Auge sichtbaren Veränderungen kommt es jedoch auch zur Bildung so genannter „sunburn cells“ in der Epidermis. Bei diesen Zellen handelt es sich um UV-geschädigte Keratinozyten, die zytoplasmatisch vergrößert sind und innerhalb von 24-72 Stunden der Apoptose unterliegen. UVB-Bestrahlung von Keratinozyten ist ein typischer Initiator des extrinsischen Weges der Apoptose (Leverkus, M. et al, 1997). Treten UV-induzierte Mutationen in den für die Apoptose verantwortlichen Genen (z.B. *p53*) auf, kann es zu einer Störung im Gleichgewicht kommen, die zu einer Akkumulation genetisch veränderter Zellen und damit verbunden erhöhten Hautkrebsrisiko führen kann.

Der programmierte Selbstmord der Zelle beginnt mit der Initiationsphase, die sich in den extrinsischen (Typ I) und in den intrinsischen Weg (Typ II) unterscheiden lässt. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptor Familie veranlasst. Den am besten untersuchten Rezeptor stellt der Todesrezeptor Fas (auch Apo1, CD95) mit dem Liganden FasL (Apo1L, CD95L) dar. Durch die Ligandenbindung trimerisiert der Rezeptor und es kommt zur Assoziation der zytoplasmatischen Todesdomänen (Death Domain), an welche nun Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne binden können. Über die Adapterproteine TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne) und FADD (Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne) bindet die Prokaspase 8 an diesen Komplex und kann sich nun durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktivieren (Borgerson, K. L. et al, 1999). Die aktive Kaspase 8 löst ihrerseits die so genannte Kaspase-Kaskade aus, die die enzymatische und katabolischen Reaktionen, die zum Zelltod führen, katalysieren (Cohen, G. M., 1997).

Beim intrinsischen Weg werden Mitochondrien durch die FADD-vermittelte Kaspase 8-Aktivierung aktiviert. Infolgedessen kommt es zur Störung des transmembranen Potentials des Mitochondriums und zur Formation von Poren in der Membran, wodurch Cytochrom C freigesetzt wird. Dies bewirkt die Aktivierung der Kaspase 3, die wiederum imstande ist, die Kaspase 9 zu aktivieren. Analog zu Kaspase 8 initiiert die aktive Kaspase 9 die Kaspase-Kaskade. Durch die Aktivierung der Effektor-kaspasen kommt es zur Auflösung der Kernhülle, Störung der Transkription und Translation, Chromatinkondensation und zur DNA-Spaltung durch erhöhte Nukleaseaktivität (Scaffidi, C. et al, 1998). Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die durch Phagozyten aufgenommen werden. Die Zellmembran bleibt bei der Apoptose jedoch intakt, so dass im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktionen erfolgen und es somit zu keinen negativen Auswirkungen für benachbarte, überlebende Zellen kommt.

1.5.2 Photokarzinogenese

Karzinogenese durch UV-Strahlung involviert oft die Inaktivierung eines oder mehrere Tumorsuppressorgene oder die gesteigerte Aktivierung wachstumsstimulierender Protoonkogene. Während Tumorsuppressorgene gewöhnlich rezessiv sind, d.h. dass sie in beiden Allelen geschädigt sein müssen, um einen Funktionsverlust herbeizuführen, reicht bei den Protoonkogenen meist schon die Mutation in einem Allel, um einen Effekt zu erzielen.

Neben den Protoonkogenen *bcl-2*, ein Apoptose-Inhibitor, und *c-fos*, ein Dimerpartner des in Zellwachstum und Differenzierung involvierten Transkriptionsfaktors AP-1, gehört *Ras* wohl zu den wichtigsten Protoonkogenen in der Photokarzinogenese (Sato, H. et al, 1997). *Ras* ist ein zentraler Punkt in verschiedenen Signaltransduktionswegen, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren. Als GTP-bindendes Protein nimmt es die Funktion eines molekularen Schalters ein, mit dem zelluläre Prozesse durch gebundenes GTP an- oder hydrolysiertes GDP abgeschaltet werden können. Etwa 10 – 40 % aller Hauttumore enthalten Mutationen in *Ras* (Ananthaswamy, H. N. & Pierceall, W. E., 1990), die allesamt zum Verlust der GTPase-Aktivität führen. Da damit der Wechsel von der GTP-gebundenen Form zur GDP-Form blockiert ist, kommt es zu einer Akkumulation von aktivem Ras und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle.

Neben den Protoonkogenen sind auch eine ganze Reihe an Tumorsuppressorgenen an der UV-induzierten Karzinogenese beteiligt, darunter *p16*, *p21*, *p27* und *Rb*, alle in den Zellzyklus eingreifende Regulatoren (Hussein, M. R., 2005; Mallikarjuna, G. et al, 2004). Den zentralen Part in der Photokarzinogenese übernimmt jedoch *p53*, dessen mutierte Variante in über 50 % aller Hauttumore vorkommt (Hollstein, M. et al, 1996). UV-Strahlung bewirkt über DNA-Schädigungen eine Phosphorylierung von *p53*, womit *p53* stabilisiert wird und in der Zelle akkumuliert (Maltzman, W. & Czyzyk, L., 1984). Durch die Anhäufung von *p53* kommt es entweder zu einem G₀-Arrest, der der Zelle die Möglichkeit gibt, vor der Zellteilung die entstandenen DNA-Schäden zu reparieren oder die Apoptose einleitet, falls die Schäden sich als zu massiv herausstellen sollten.

1.5.3 Immunsuppression

Die immunsuppressiven Effekte der UV-Strahlung wurden vor 20 Jahren zum ersten Mal anhand von Mäusen dokumentiert, bei denen UV-Strahlung die immunologisch vermittelte Abstoßung von transplantierten Tumoren ähnlich wie bei immunsuppressiven Medikamenten verhinderte (Kripke, M. L., 1986).

UV-Strahlung unterdrückt das Immunsystem in mehrfacher Weise. Zunächst einmal verringert UVB-Strahlung durch Induktion von Apoptose und Migration in die Lymphknoten die Anzahl der antigen-präsentierenden Immunzellen in der Haut (Langerhans-Zellen) (Kolgen, W. et al, 2002). Dieser Effekt wird noch dadurch verstärkt, dass UV-Strahlung ebenfalls die Expression der Oberflächenmarker unterdrückt, die bei der Antigen-Präsentation eine wichtige Rolle spielen (Weiss, J. M. et al, 1995). Des weiteren werden durch UV-Strahlung die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine wie IL-10, IL-4, Prostaglandin E₂ und TNF- α stimuliert (Shreedhar, V. et al, 1998) und T-Lymphozyten vom regulatorischen Typ induziert (Elmets, C. A. et al, 1983). Bei letzterem handelt es sich um eine Untergruppe von T-Zellen, die Immunreaktionen unterdrücken, auch als T-Suppressorzellen bekannt.

Demnach kommt der UV-Strahlung eine Doppelrolle zu: Einmal die Induktion der Karzinogenese durch DNA-Schädigung, auf die im Kapitel 1.8.1 noch detaillierter eingegangen wird, und zweitens die Suppression der immunologischen Tumorabwehr.

1.5.4 Vorzeitige Hautalterung

Als extrazelluläre Matrix (EZM) wird der Anteil des Gewebes bezeichnet, der von tierischen Zellen in den Interzellularraum sezerniert wird. Der Abbau und Umbau der Hauptbestandteile der EZM, Kollagen und Elastin, erfolgt überwiegend durch die Matrixmetalloproteinasen (MMP), von denen bislang über 20 identifiziert wurden. Diese Zinkhaltigen Enzyme werden entweder in die EZM durch entsprechende Zellen sezerniert oder befinden sich an der Zellmembran, wobei das katalytische Zentrum des Enzyms in den extrazellulären Raum ragt. Reguliert werden die MMP durch die „tissue inhibitors of MMP“ (TIMP) aufgrund der spezifische 1:1-Bindung an deren katalytische Zentren.

Nach UV-Strahlung kommt es zur verstärkten Expression und Aktivierung von MMP, und damit zum Abbau und zur Zerstörung des dermalen Bindegewebes (Brenneisen, P. et al, 1996; Koivukangas, V. et al, 1994; Scharffetter, K. et al, 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass UVB-Bestrahlung zu einer temporären Störung der Prokollagen-1-Synthese in humanen dermalen Fibroblasten, der ausschließlichen Quelle für Kollagen-1, führt (Berneburg, M. et al, 2000). Außer über diesen indirekten Weg über die MMP kann Kollagen auch direkt über UVA-induzierte ROS geschädigt werden (Kawaguchi, Y. et al, 1996), was mit der Inaktivierung der TIMP und der Aktivierung von MMP einhergeht.

1.6 UV-Schutz

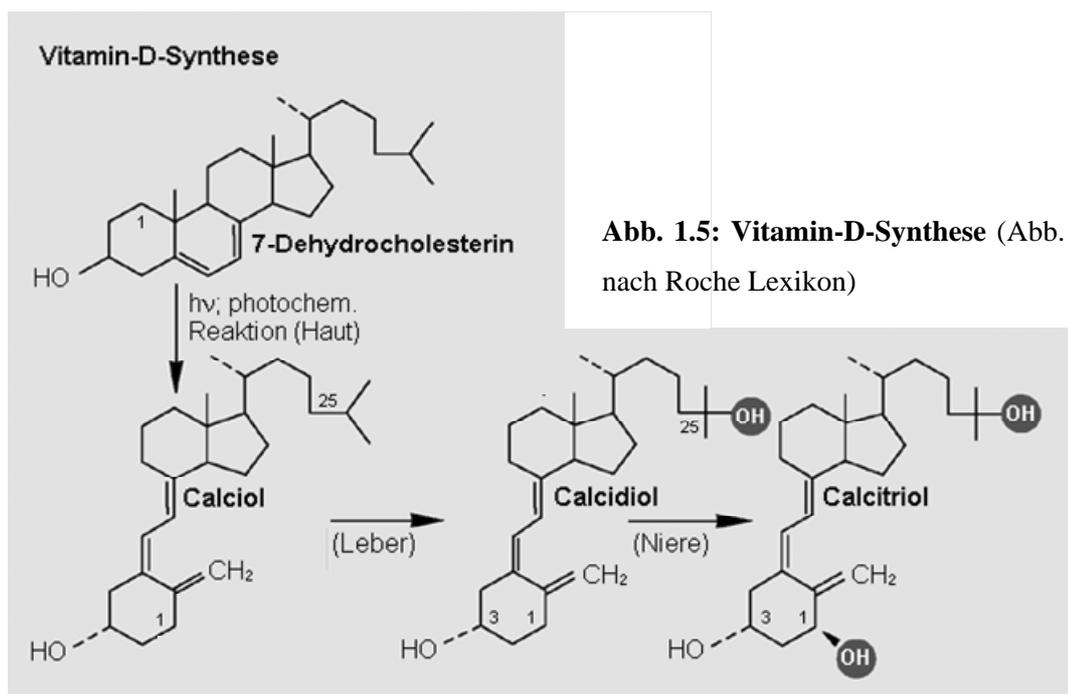
Zum Schutz vor UV-Strahlung hat die Haut unterschiedliche körpereigene Mechanismen entwickelt, um die UV-Dosis, die die Zellen letztendlich erreicht, zu vermindern. Keratinozyten bilden eine Lichtschwiele der Hornhaut durch Hyperkeratose bzw. der Oberhaut durch Akanthose.

Ein weiterer Zelltyp, der die körpereigene Protektion unterstützt, sind die Melanozyten. Sie bilden das Hautpigment Melanin und übertragen es anschließend mit Hilfe der Melanosomen in die angrenzenden Keratinozyten. Dort legt es sich wie ein Schutzschirm über den Zellkern und erzeugt die typische Bräunung der Haut. Die Melanine liegen in den Melanosomen als Partikel vor, deren Größe das optische Verhalten und damit den Schutzmechanismus gegenüber der UV-Strahlung bestimmt. Haben die Melaninpartikel einen Durchmesser von über 300 nm leiten sie die UV-Strahlung durch

Streuung weiter. Liegt der Durchmesser hingegen unter 30 nm wirkt es vor allem absorbierend (Cesarini, J. P., 1988; Cesarini, J. P. & Msika, P., 1995). Während UVA eine sofortige kurze Bräunung durch Photooxidation ungefärbter Melaninvorstufen auslöst (Riley, P. A., 1994), sorgt das kurzwellige, energiereichere UVB durch eine Steigerung der Melanogenese für eine langfristige Bräunung (Czarnetzki, B. et al, 1992).

1.7 Benefit der UV-Strahlung

Melanin hat jedoch eine nachteilige Rolle. Je mehr Melanin in der Haut ist, umso weniger lebensnotwendiges, für die Calciumaufnahme im Darm verantwortliches Vitamin D kann in der Haut produziert werden. Vitamin D oder Calciferol ist eine Sammelbezeichnung für eine Gruppe fettlöslicher Vitamine, von denen aber nur das Vitamin D₃ (1,25-Hydroxycholecalciferol, Calcitriol) durch UVB-Einstrahlung in der Haut synthetisiert wird. Ausgangspunkt dabei ist das in der Leber über die Cholesterindehydrogenase zu 7-Dehydrocholesterin umgewandelte Cholesterin. Das in die Haut aufgenommene 7-Dehydrocholesterin wird dann in einer UVB-abhängigen Reaktion zu Cholecalciferol (Calcidiol) umgewandelt und nochmals in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) hydroxyliert. Nach einer erneuten Hydroxylierung in der Niere entsteht 1,25-Hydroxycholecalciferol (Holick, M. F., 1985) (Abb. 1.5).



1.8 Auswirkungen von UV-Strahlung auf zellulärer Ebene

Die Gesamtheit der zellulären Reaktionen auf UV-Strahlung bezeichnet man als UV-Antwort. Sie hat die Funktion, die Zelle vor Schäden durch UV-Strahlung zu schützen. Dabei sind verschiedene Zellkompartimente beteiligt.

1.8.1 Kern

DNA absorbiert elektromagnetische Strahlung im Bereich von 230 - 300 nm, weshalb UVB-Strahlung hauptsächlich für die DNA-Schädigungen verantwortlich ist. Durch Photoadditionsreaktionen bilden sich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) (Ley, R. D. et al, 1983) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4-PP) (Rosenstein, B. S. & Mitchell, D. L., 1987). Allerdings kann auch längerwellige UVA-Strahlung unter Entstehung von ROS DNA-Schäden induzieren, was primär zur Entstehung von 8-Oxo-Guanin (8-OxoG) führt (Floyd, R. A. et al, 1988). Die Schädigung der DNA durch UV-Strahlung kann durch verschiedene körpereigene Mechanismen repariert werden (Photoreaktivierung, Exzisionsreparatur, Postreplikationsreparatur) (Kim, S. T. & Sancar, A., 1993; Moan, J. & Peak, M. J., 1989; Sancar, A. & Tang, M. S., 1993). Diese Reparaturmechanismen unter Zuhilfenahme eines Zellzyklusarrests zu induzieren oder die Apoptose zu veranlassen, um so die Gefahr der malignen Entartung zu umgehen (Sanchez, Y. & Elledge, S. J., 1995), ist die Aufgabe des Proteins p53.

Im Normalfall wird p53 durch die Ubiquitin-Ligase MDM2 (murine double minute 2) ubiquitiniert und abgebaut (Kubbutat, M. H. & Vousden, K. H., 1998). Kommt es nun aber zu einer DNA-Schädigung durch z.B. UV-Strahlung, wird p53 durch eine posttranslationale Phosphorylierung stabilisiert (Meek, D. W., 1998) und leitet damit die notwendigen Maßnahmen zur Schadensbehebung ein.

Grundsätzlich aktivieren Zykline die CDK, welche dann unter anderem das Retinoblastomprotein phosphorylieren können (Stevaux, O. & Dyson, N. J., 2002; Li, A. & Blow, J. J., 2001). Damit wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und dieser kann dann als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus anschalten. Durch seine Fähigkeit als Transkriptionsfaktor induziert p53 bei DNA-Schädigungen p21 (Waf1, Kip1), das wiederum den Zyklin-CDK-Komplex, der notwendig für den Übergang in die S-Phase ist, hemmt (Pei, X. H. & Xiong, Y., 2005). Es kommt zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase.

Gleichzeitig wird GADD45 (growth arrest- and damage-dependend) induziert, welches im Komplex mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) die Reparatur der DNA veranlasst (Sanchez, Y. & Elledge, S. J., 1995). Die Aktivierung der MDM2-Expression beendet über eine negative Feedback-Schleife die transkriptionelle Aktivität von p53, da es im Komplex mit MDM2 nicht mehr in der Lage ist, an p53-DNA-Bindungsmotive zu binden (Momand, J. et al, 1992).

Durch irreparable DNA-Schäden wird über p53 der Apoptose-Initiator *bax* aktiviert (Selvakumaran, M. et al, 1994), womit die Apoptose eingeleitet wird, um der Tumorentstehung zuvorzukommen.

1.8.2 *Membran*

Neben dem Zellkern ist die Zellmembran ein weiteres Zielobjekt des UVB-Signaltransduktion. In diesem Fall ist das Chromophor für UVB unbekannt, die Aktivierung der Membranrezeptoren läuft aber unabhängig von der nuklearen UVB-Antwort ab, wie mit enukleierten Zelle eindeutig nachgewiesen werden konnte (Devary, Y. et al, 1993; Kulms, D. et al, 1999).

Ausgangspunkt der Rezeptorenaktivierung ist die Phosphorylierung des zytosolischen Teils, die durch externe Kinasen oder Autophosphorylierung durch die Kinasedomäne zustande kommen kann (Abb. 1.6). Dadurch werden Andockungsstellen für die SH2-Domäne von Adapterproteinen generiert, die das Signal weiter ins Zellinnere leiten. Bei der Mehrheit von Signaltransduktionen die Wachstumsfaktoren beinhalten, agiert Grb2 (growthfactor receptor-bound protein 2) als Adapterprotein, so auch im Falle des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR). Die Bindung von Grb2 bewirkt eine Konformationsänderung, die wiederum zur Bindung des GDP-GTP-Austauschproteins Sos (son of sevenless) führt, wodurch die GTPase Ras aktiviert wird. Die Ras-Aktivierung kann unterschiedliche Folgen haben, die wohl am besten untersuchte ist aber die Aktivierung der Proteinkinase Raf. Diese phosphoryliert MAPK-Kinasen (MEK), die wiederum MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinasen) aktiviert, zu denen auch die durch den EGFR extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK 1/2) gehört (Seger, R. & Krebs, E. G., 1995).

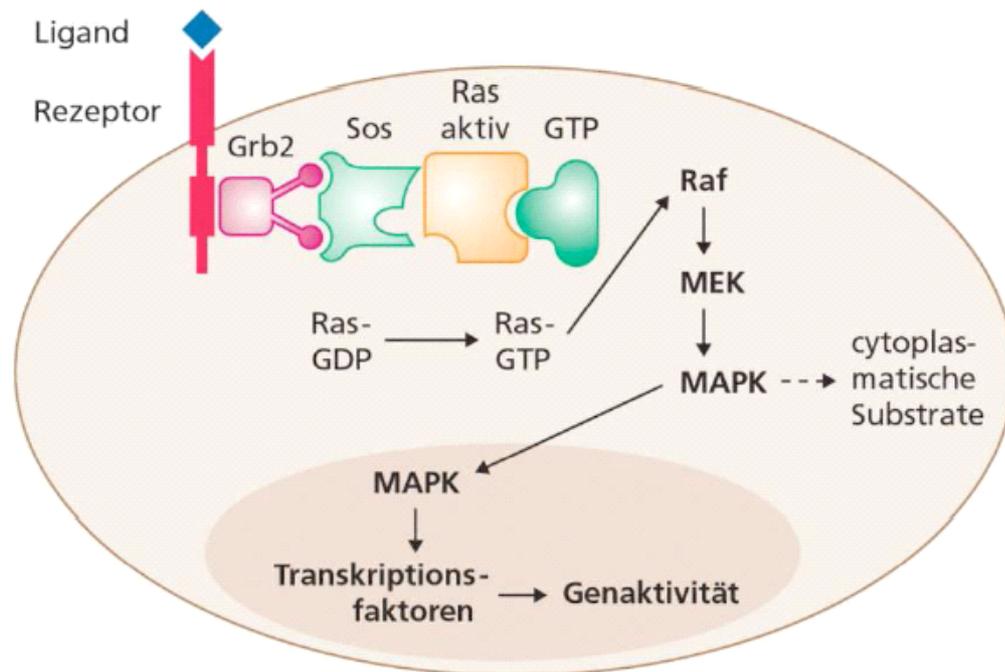


Abb. 1.6: Schema der MAPK-Kaskade (Quelle: Schmidt, R. F. & Unsicker, K., Lehrbuch Vorklinik, 2003)

Dass der EGFR auch in die Bildung UV-induzierter Tumore involviert ist, konnte El-Abaseri 2005 zeigen. Durch die Inhibierung des EGFR mittels Tyrphostin AG1478 kam es bei Mäusen zu einer Reduzierung der UV-induzierten Tumore in Größe und Anzahl (El Abaseri, T. B. et al, 2005). Der genaue Mechanismus der Rezeptorenaktivierung nach UVB, einschließlich des Chromophors für UVB, welches die Membraneffekte auslöst, ist bisher nicht bekannt. Es gibt zwar Belege, dass die durch UVB generierten ROS Membranrezeptoren wie den EGFR aktivieren können, jedoch scheint diese Art der Aktivierung vor allem bei hohen Dosen (über 400 J/m^2) zum Zuge zu kommen (Peus, D. et al, 1998).

1.8.3 AhR und UVB

Ein weiteres wichtiges Zellkompartiment für die UVB-Signaltransduktion ist das Zytoplasma. Es ist bekannt, dass UVB Cyp1A1 und Cyp1B1, Gene des Fremdstoffmetabolismus, in Hautzellen induziert (Wei, Y. D. et al, 1999). Beide Gene werden durch den AhR kontrolliert. Ferner führte bei Mäusen die topische Applikation von EGCG, einem AhR-Antagonisten, zu einer signifikanten Reduktion von UVB-induzierten Hauttumoren (Gensler, H. L. et al, 1996). Es gibt darüber hinaus Arbeiten, die eine tageszeitabhängige Veränderungen des Cyp1A1-Levels in Rattenleber und -hypophyse belegen (Plewka, A. et al, 1992; Huang, P. et al, 2002). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass UV-Strahlung die Genexpression fremdstoffmetabolisierender Enzyme in kutanen und extrakutanen Geweben *in vivo* beeinflussen kann.

Diese Beobachtungen an Tieren werden durch verschiedene Studien am Menschen bestätigt. UVB-Bestrahlung menschlicher Haut induziert die AhR-abhängigen Gene *Cyp1A1* und *Cyp1B1* *in vivo* auf mRNA- und Proteinebene (Katiyar, S. K. et al, 2000). Frühere Arbeiten mit humanen Lymphozyten belegen außerdem eine Jahreszeitabhängige Veränderung der Arylhydrokarbon-Hydroxylase (AHH)-Aktivität. Dabei konnte die maximale AHH-Aktivität im Spätsommer und im frühen Herbst gemessen werden, während die minimale Aktivität sechs Monate später auftrat (Paigen, B. et al, 1981). Diese Jahreszeit-abhängige Veränderung zeigte sich auch in der Cyp1B1 mRNA-Expression peripherer mononuklearer Blutzellen (Tuominen, R. et al, 2003).

Im Bezug auf UV-Strahlung ist weiterhin interessant, dass die essentielle Aminosäure Tryptophan eine der am stärksten UVB-absorbierenden Aminosäuren ist. Schon in den späten 70ern konnte die Arbeitsgruppe um Paine zeigen, dass Tryptophan-haltiges Zellkulturmedium AHH-Aktivität, ein Marker für Cyp1A1-Aktivität induziert (Paine, A. J., 1976; Paine, A. J. & Francis, J. E., 1980). Es stellte sich heraus, dass verschiedene Photoprodukte des Tryptophans eine AhR-Affinität haben, die mit der von TCDD zu vergleichen ist (Rannug, A. et al, 1987). Das Photoprodukt mit der stärksten Affinität wurde 1995 als 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol (FICZ) identifiziert (Rannug, U. et al, 1995). FICZ verursacht eine Cyp1A1-Induktion (Bergander, L. et al, 2003; Bergander, L. et al, 2004) und wird durch die Cyp1-Familie metabolisiert (Bergander, L. et al, 2004), konnte bisher jedoch nicht intrazellulär nachgewiesen werden.

1.9 Fragestellung

Seit der Entdeckung der ultravioletten Strahlung durch Johann Wilhelm Ritter im Jahr 1802 hat, bedingt durch anthropogene Einflüsse, die UVB-Belastung des Menschen zugenommen. Dies hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass in den westlichen Industrieländern das Risiko für maligne Erkrankungen der Haut stetig zugenommen hat.

In diesem Zusammenhang können mechanistische Untersuchungen der UVB-induzierten Signaltransduktion neue Aspekte zur Hautkrebsprävention beitragen. Am Beispiel von HaCaT-Zellen, die ein etabliertes *in vitro*-Modell der menschlichen Keratinozyten sind, welche die erste Barriere bei UVB-Bestrahlung darstellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des AhR in der UVB-induzierten Signaltransduktion aufgeklärt werden.

Speziell wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wird der AhR durch UVB aktiviert?
2. Sind die UVB-induzierten Membraneffekte und Signalkaskaden AhR-abhängig und falls ja, über welchen Mechanismus vermittelt der AhR die Aktivierung?
3. Ist die Generierung eines Photoprodukts verantwortlich für die AhR-Aktivierung ?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte dazu beitragen, einen neuen initiierenden Mechanismus der UVB-Signaltransduktion zu identifizieren und neue Strategien für einen zukünftigen Sonnenschutz zu ermöglichen.

2 Material

Lösungen und Puffer wurden in Millipore-Wasser angesetzt.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Nährmedien

DMEM; 1 g / l D-Glucose	PAA
DMEM ohne Tryptophan	Sonderanfertigung, PAA

2.1.2 Zusätze

Antibiotikum/ Antimykotikum; 10.000 U / ml	PAA
FCS	PAA
Geneticin; 50 mg / ml	Gibco
L-Glutamin; 200 mM	PAA
PBS	PAA

2.1.3 Komplettmedien

Kulturmedium, HaCaTs / HCA-7		DMEM
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum
	10 % (v/v)	FCS
Kulturmedium, Knockouts		DMEM
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum
	10 % (v/v)	FCS
	305 mg	Geneticin

Einfriermedium		DMEM
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum
	20 % (v/v)	FCS
	10 % (v/v)	DMSO
Synchronisationsmedium		DMEM
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum
Tryptophan-freies Medium		DMEM ohne Tryptophan
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum
PBS	1 % (v/v)	Antibiotikum/ Antimykotikum

2.2 Inhibitoren / Aktivatoren

Die folgenden Substanzen sind in der verwendeten Stammkonzentration angegeben.

B(a)P (10 mM, gelöst in DMSO)	Sigma
EGF (10 µg / ml, gelöst in H ₂ O)	Biosource
FICZ (angegeben, gelöst in DMSO)	Frau Agnetha Rannug, Karolin- ska Institut, Stockholm, Schwe- den
MNF (10 mM, gelöst in DMSO)	Frau Dr. Vielhaber, Symrise, Holzminden, Deutschland
PP2 (10 mM, gelöst in DMSO)	Calbiochem
Tyrphostin (10 mM, gelöst in DMSO)	Calbiochem

2.3 Transiente Transfektion mit pEGFPmAhR

FuGENE 6	Roche
Mounting Mediums Vectashield	Vector Laboratories
pEGFPmAhR	generiert durch Susanne Donat im Rahmen ihrer Dissertation

2.4 Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion

DEPC-Wasser	Roth
DNase	Qiagen
dNTP-Mix	Peqlab
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen
p(dT) ₁₅ Primer	Roche
Prime RNase Inhibitor	Eppendorf
Primer	MWG
SYBR Green	Qiagen

2.5 Isolierung von Kernprotein und Immunopräzipitation

Hypoton-Puffer	20 mM	Hepes / KOH, pH 7,5
	20 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	125 nM	Ocadaic Acid
	0,2 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail III (Calbiochem)
High-Salt-Puffer		Hypoton-Puffer
	420 mM	NaCl
	20 % (v/v)	Glyzerol
Protein G Immunoprecipitation Kit		Sigma
anti-AhR, monoklonal, Maus		Affinity BioReagents
Triton X-100 - Lysispuffer	1 mM	EDTA, pH 8,0
	50 mM	Hepes / KOH, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	10 % (v/v)	Glyzerol
	1 % (v/v)	Triton X-100
anti-EGFR, polyklonal, Kaninchen		Upstate
Protein A Agarose, Fast Flow		Upstate

2.6 Western Blotting

Autoradiographiefilme	Amersham
BC-Assay	Uptima
ECL plus Detection System	Amersham
Entwickler-Lösung	Kodak
Fixierer-Lösung	Kodak
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG
Precision Plus Protein Standards (Dual Color)	BioRad
PVDF-Membran (Hybond-P)	Amersham
TEMED	Sigma

2.6.1 Antikörper

anti-Cox-2, monoklonal, Maus	1:1000	Cayman Chemical
anti- β -Aktin, monoklonal, Maus	1:10000	Sigma
anti-ERK1&2 [pTpY ^{185/187}], polyklonal, Kaninchen	1:1000	Biosource
anti-GAPDH [6C5], monoklonal, Maus	1:10000	Abcam
anti-EGFR, polyklonal, Kaninchen	1:1000	Upstate
anti-EGFR [pY ¹⁰⁶⁸], polyklonal, Kaninchen	1:2000	Biosource
anti-pTyr-100, monoklonal, Maus	1:1000	Cell Signaling
anti-AhR, monoklonal, Maus	1:1000	Affinity BioReagents
anti-Kaninchen IgG, HRP gekoppelt, Esel	1:5000	Amersham
anti-Maus IgG, HRP gekoppelt, Schaf	1:5000	Amersham

2.6.2 Lösungen

APS	20 %	in dH ₂ O
RIPA-Puffer		PBS
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 % (v/v)	NP40
	0,1 % (v/v)	SDS
	0,2 % (v/v)	Protease-Inhibitor-Cocktail III

Sammelgel, SDS-PAGE	100 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	5 % (v/v)	Acrylamid
	0,1 % (v/v)	SDS
	0,1 % (v/v)	APS
	0,04 % (v/v)	TEMED
SDS	0,5 %	in dH ₂ O
SDS-PAGE-Probenpuffer, 4x	125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	40 % (v/v)	Glyzerol
	2,5 % (w/v)	SDS
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	16 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
TBS-T, 10x	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,2
	1,5 M	NaCl
	1 % (v/v)	Tween 20
Transferpuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	380 mM	Glyzin
	20 % (v/v)	Methanol
Trenngel, SDS-PAGE	390 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	10 % (v/v)	Acrylamid
	0,1 % (v/v)	SDS
	0,1 % (v/v)	APS
	0,04 % (v/v)	TEMED
Tris-Glycin-Laufpuffer, 10x	0,2 M	Tris
	2 M	Glyzin
	1 % (w/v)	SDS

2.7 Immunozytochemie

anti-EGFR, polyklonal, Kaninchen	1:100	Upstate
anti-Kaninchen IgG, Rhodamin-gekoppelt, Ziege	1:50	Amersham
Mounting Mediums Vectashield		Vector Laboratories

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der humanen Keratinozyten

Die spontan immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie HaCaT (Prof. Sies, Universität Düsseldorf) sowie die humane epitheliale Darmkrebszelllinie HCA-7 (ATCC-LGC Promochem), die aufgrund ihrer erhöhten Cox-2-Expression als Positivkontrolle bei der Proteindetektion benutzt wurde, wurden als adhärenente Zelllinien in DMEM mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Antibiotikum / Antimykotikum auf Plastik-Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % [v/v] CO₂ im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 - 3 Tage mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium durchgeführt.

Die Zellen wurden bei Erreichen 70 – 80 %iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst. Anschließend wurde die Accutase durch Zugabe von 8 ml auf 37 °C vorgewärmtes DMEM inklusive Supplementen inaktiviert, die Zellen mit einer Pipette vom Boden der Kulturflasche abgespült, resuspendiert und im Verhältnis 1:10 in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm²) bis zur Konfluenz kultiviert und wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben abgelöst und anschließend 10 min bei 100 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1,5 ml Einfriermedium pro Kulturflasche resuspendiert, in ein Kryoröhrchen pipettiert, bei -80 C eingefroren und nach 24 h zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Reaktivierung wurden die eingefrorenen Zellen auf 37 °C erwärmt, in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

3.1.3 *Behandlung der Zellen*

Die Zellen wurden in der in Tab. 3.1 angegebenen Dichte ausgesät und für ca. 24 h bis zu einer Konfluenz von 70 - 80% in Kompletmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei allen Experimenten zur EGFR-Signalübertragung mit PBS gewaschen und zur Zellzyklussynchronisation für weitere 24 h in serumfreiem Medium gehalten.

Tab. 3.1: Zelleinsaatdichten

<i>Zellkulturgefäße</i>	<i>Zelldichte</i>
Objektträgerkammer	6×10^4
Six-Well-Platte	2×10^5
145 mm Petrischale	1×10^7

Die Behandlung mit Inhibitoren vor der Bestrahlung erfolgte jeweils für eine Stunde, wobei die Endkonzentration des jeweiligen Lösungsmittels bei 0,1 % lag. Für Positivkontrollen wurden die Zellen zusätzlich mit EGF (1 min) und B(a)P (1 h) inkubiert. Die Lösungsmittelkonzentration lag hier ebenfalls bei 0,1 %.

Um die Zellen für Tryptophan zu depletieren, wurden sie für den angegebenen Zeitraum in Tryptophan-freiem Medium kultiviert. Um die Zellen anschließend erneut mit Tryptophan anzureichern, wurden sie für eine Stunde mit 1 mM Tryptophan kultiviert.

3.2 UVB-Bestrahlung

Für die UVB-Bestrahlung wurde eine TL20W/12RS Lampe mit vier parallel angeordneten Röhren benutzt (Philips, Eindhoven, Niederlande). Dazu wurden das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Bestrahlung erfolgte in PBS, wobei die Kontrolle derselben Behandlung ohne Bestrahlung unterzogen wurde. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen im alten, vorher abgenommenen Medium weiterkultiviert.

3.3 Generierung der AhR Knockout Zellen

Um die Expression des AhR in HaCaT Zellen stabil zu reprimieren, wurden folgende shRNA-Sequenzen zwischen die Pac I und Cla I (New England Biolabs) Schnittstelle des lentiviralen pCLIP.THPC Vektors kloniert, der freundlicherweise von Prof. Helmut Hanenberg (Kinderklinik, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde. Die der shRNA-Sequenz angefügten Basen zur Generierung der entsprechenden Schnittstellen sind fett hervorgehoben:

N1 (AhR Knockout):

forward 5'-CGTTTACCTTCAA**ACTTT**ATTCAAGAGATAAAGTTTGAAGGTAAA-CGTTTTTGGAA**AT**

reward 5'-CG**ATTT**CCAAAAACGTTTACCTTCAA**ACTTT**TATCTCTTGAATAAA-GTTTGAAGGTAAAC**GAT**

N3 (Vektor mit nicht-funktionellem Insert):

forward 5'-TACTTCCACCTCAGTTGGCTTCAAGAGAGCCAACTGAGGTGGAA-GTATTTTTGGAA**AT**

reward 5'-CG**ATTT**CCAAAAATACTTCCACCTCAGTTGGCTCTCTTGAAGCCA-ACTGAGGTGGAAGTA**AT**

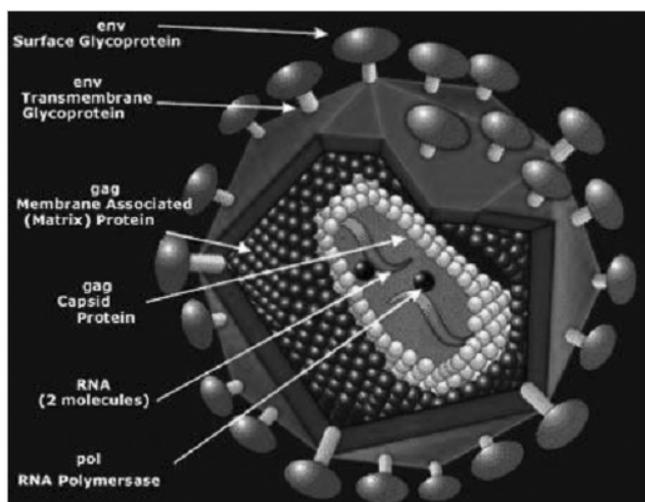
Die Transfektion wurde gemäß dem Protokoll nach Wiznerowicz und Trono (2003) durchgeführt. Exprimiert wurde die shRNA durch den humanen H1-Promotor. Als Selektionsmarker diente das Gen *pac*, welches eine Penicillinacylase kodiert und somit zur Ausbildung einer Penicillinresistenz führt. Dieses wurde durch die SFFV (spleen

focus-forming virus) U3 Region exprimiert. Klone, die die shRNA enthielten, wurden per Sequenzanalyse verifiziert.

Die weiteren Arbeiten zur Herstellung stabil transduzierter HaCaTs wurden von Frau Melanie Wurm (Kinderklinik, Universität Düsseldorf) übernommen. Der theoretische Hintergrund dieser Methode sieht wie folgt aus und ist in Abb. 3.1 zur besseren Verdeutlichung auch noch einmal graphisch dargestellt: Die einzelnen Elemente des retroviralen Genoms werden voneinander getrennt, so dass die Gene für den viralen Proteinmantel (*gag*) und die viralen Enzyme (*pol*) auf einem Plasmid zu finden sind und das Gen für das Hüllprotein (*env*) auf einem anderen. Die Elemente, die die Transkription des retroviralen Genoms regulieren und ein sog. Verpackungssignal, das dafür sorgt, dass das retrovirale Genom in einen Proteinmantel gehüllt wird, sind in dem als Transferkonstrukt bezeichneten Teil enthalten. Diesem Konstrukt wird auch das entsprechende Gen oder in unserem Falle die shRNA zugefügt. Alle drei Konstrukte werden in eine Verpackungszelllinie übertragen und zur Expression aktiviert, so dass der eigentliche retrovirale Vektor entsteht und geerntet und gereinigt werden kann.

Anschließend werden die infektiösen Vektoren auf die eigentlich Zielzelllinie gegeben und die transduzierten Zellen mit Hilfe eines Markers selektiert. Die Ausbreitung des Vektors ist auf die infizierte Zielzelllinie beschränkt, da die Gene der viralen Proteine aufgrund des fehlenden Verpackungssignals nicht eingebaut wurden.

Abb. 3.1: Theoretischer Hintergrund zur Generierung stabil transduzierter Zelllinien



Vektor mit shRNA-
Expressionkassette (SEC)

Vektor mit env
(envelope)

Verpackungszelllinie mit gag (group-specific
antigen) und pol (RNA polymerase)

Virus

Transduktion der
gewünschten Zelllinie

Selektion der
transduzierten Zellen
durch den
Selektionsmarker

3.4 Transiente Transfektion mit pEGFPmAhR

Pro Probe wurde eine Objektträgerkammer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 6×10^4 HaCaTs eingesät, die zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 80 % konfluent waren. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE 6 der Firma Roche benutzt. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine Objektträgerkammer. Für die Transfektion wurden 6 μ l FuGENE 6 in 26,7 μ l serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium verdünnt und durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Dieser Schritt sollte möglichst schnell geschehen und dabei ist zu beachten, dass das unverdünnte Transfektionsreagenz nicht mit Plastikoberflächen außer der Pipettenspitze in Berührung kommt. Zur Bildung der Komplexe wurden anschließend 4 μ g des Plasmids pEGFPmAhR (generiert durch Susanne Donat im Rahmen ihrer Dissertation) für ein Totalvolumen von 40 μ l hinzugegeben, erneut vorsichtig geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml neues Medium mit Serum und Antibiotika ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 40 μ l Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken mit dem übrigen Medium vermischt. Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, die Objektträgerkammern entfernt und der Objektträger nach kurzem Schwenken in Millipore mit Zugabe des Mounting Mediums Vectashield zur Verringerung der Ausbleichung eingedeckelt.

Untersucht wurden die Proben abschließend am Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Bilder wurden mit einer ColorViewXS Digitalkamera (Olympus) aufgenommen und mit dem Softimaging Programm analySIS ausgewertet.

3.5 Reverse Transkription (RT)-Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die RNA wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen oder mit dem PeqGOLD total RNA Kit der Firma Peqlab nach Angaben der Hersteller isoliert. Für die Synthese der cDNA wurde 1 µg RNA auf ein Volumen von 15,5 µl verdünnt und mit den in Tab. 3.2 angegebenen Konzentrationen für Primer und dNTP-Mix versetzt.

Tab. 3.2: Erste Teilreaktionspartner der RT

1 µg	RNA
1 µg	p(dT) ₁₅ Primer
1 mM	dNTP-Mix

Die Proben wurden anschließend gevortext, kurz abzentrifugiert und zum Anlagern der Primer an die 3`-Enden der RNA für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. In einem zweiten Schritt kamen die in Tab. 3.3 aufgelisteten weiteren Materialien der RT hinzu.

Tab. 3.3: Materialien zum zweiten RT-Schritt

1 µl	5x RT-Puffer
30 U	Prime RNase Inhibitor
20 mM	DTT
400 U	M-MLV Reverse Transkriptase

Die Proben mit einem Totalvolumen von 40 µl wurden für die reverse Transkription dann für 52 Minuten bei 37 °C inkubiert und abschließend für 15 Minuten auf 70 °C erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren.

Die so synthetisierte cDNA wurde anschließend PCR eingesetzt und in einem Reaktionsvolumen von 20 μl durchgeführt. Dazu wurden 2 μl cDNA mit 10 μl 2x SYBR Green Mix und jeweils 0,5 μM Primer gemischt und wie folgt inkubiert:

Tab. 3.4: PCR-Temperaturprofil

Schritt	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95	15 min
Denaturierung	94	15 sec
Annealing	s. Tab.	25 sec
Elongation	72	30 sec
Fluoreszenzmessung	72	2 sec
Schmelzkurve	65-95	15 min
40 Zyklen		

Die Sequenz der Primer und die dazugehörigen PCR-Bedingungen sind in Tab. 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5: Primer-Sequenzen und PCR-Bedingungen

<i>Gen</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Annealing-Temp. [$^{\circ}\text{C}$]</i>	<i>Länge [bp]</i>
Cyp1A1	fp: TAG ACA CTG ATC TGG CTG CAG rp: GGG AAG GCT CCA TCA GCA TC	60	146
Cox-2	fp: CCC TTG GGT GTC AAA GGT AA rp: AAC TGA TGC GTG AAG TGC TG	52	143
AhR	fp: TGG TCT CCC CCA GAC AGT AG rp: TTC ATT GCC AGA AAA CCA GA	60	132
β -Aktin	fp: CCC CAG GCA CCA GGG CGT GAT rp: GGT CAT CTT CTC GCG GTT GGC CTT GGG GT	60	263

3.6 Isolierung von Kernprotein und Immunopräzipitation

Um eine Translokation des AhR in den Zellkern zu quantifizieren, wurden Kernextrakte isoliert, mit denen anschließend eine AhR-Immunopräzipitation durchgeführt wurde. 2×10^8 Zellen HaCaT Zellen wurden zunächst für 100 J/m^2 UVB bestrahlt, um eine Translokation des AhR in den Zellkern zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem PBS, das $1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ und 5 mM NaF enthielt, geerntet. Die Zellen wurden durch 10 min bei 450 g pelletiert und mit Hypoton-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 450 g für 10 min wurden die Zellen in $1,5 \text{ ml}$ Hypoton-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Lysate homogenisiert, die Zellkerne bei 3300 g für 10 min pelletiert und in $100 - 200 \mu\text{l}$ High-Salt-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für eine halbe Stunde unter Schütteln bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die Zellen dann für 15 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand mit den Kernproteinen wurde einer Proteinmessung unterzogen und 1 mg Kernprotein für die nun folgende Immunopräzipitation (IP) eingesetzt. Dazu wurde ein AhR-Antikörper und das Protein G Immunoprecipitation Kit der Firma Sigma nach Angaben des Herstellers benutzt. Die präzipitierten Proteine wurden im letzten Schritt in $2 \times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert.

Für die Immunopräzipitation des EGFR, die von der AG Klotz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Universität Düsseldorf) vorgenommen wurde, wurden die Zellen nach 5 min in Triton X-100-Lysispuffer auf Eis geerntet und die Lysate anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Einfrieren der Proben bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ und dem Wiederauftauen wurden sie 5 sec sonifiziert, für 10 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Von jeder Probe wurden $200 \mu\text{g}$ Protein in RIPA-Puffer zu einem Endvolumen von $200 \mu\text{l}$ für die IP eingesetzt und über Nacht mit je $2 \mu\text{l}$ anti-EGFR inkubiert. Anschließend wurden pro Probe $20 \mu\text{l}$ Protein A Agarose Beads 50:50 Slurry in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert, 2 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Die Beads wurden dreimal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen, danach wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und zu jeder Probe gegeben. Nach einer Inkubation von $2-3 \text{ h}$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden die IPs viermal mit RIPA-Puffer gewaschen und im letzten Schritt wie bei der AhR-Präzipitation in $2 \times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert.

3.7 Western Blotting

Zur Proteindetektion wurden die Zelllysate, sofern nicht vorher eine Immunopräzipitation vorgenommen wurde, in RIPA geerntet. Bei Präzipitatbildung wurden die Proben 5 sec auf niedriger Stufe sonifiziert. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer und 5-minütigem Erhitzen bei 95 °C. Zur Reduktion der Disulfidbrücken enthielt der Auftragspuffer DTT oder β -Mercaptoethanol. Die Proteintrennung erfolgte über ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel bei zunächst 100 V. Beim Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 120 V erhöht und bis zur größtmöglichen Auftrennung der Proben gehalten. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine für 90 min bei 100 mA pro Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Hinterher wurde die Membran für 1 h bei RT mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T geblockt und mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C mit der im Materialteil angegebenen Verdünnung inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, für 1 h bei 4 °C mit dem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert und erneut dreimal für 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Banden mit dem ECL-Plus System der Firma Amersham und Autoradiographiefilmen detektiert und durch die Software Quantity One 4.1.0 (Biorad) quantifiziert.

Die Western Blots zur Detektion von phosphoryliertem ERK wurden zum größten Teil von Herrn Christian Calles (IUF, Düsseldorf) übernommen und wie in seiner Dissertation beschrieben durchgeführt.

3.8 Immunozytochemie

Um eine Veränderung der EGFR-Lokalisation nachweisen zu können, wurden immunozytochemische Analysen durchgeführt. Hierzu wurde eine Absolutzellzahl von 6×10^4 HaCaTs in Objektträgerkammern (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingesät und nach 24 h zur Zellzyklussynchronisierung für weitere 24 h auf serumfreies Medium gesetzt. Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Kammern entfernt und die Zellen dann mit einem polyklonalen anti-EGFR Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit PBS-T für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte nach einem abermaligen Waschschrift (dreimal

für 10 min) die Inkubation mit dem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min bei 37 °C. Darauf folgend wurden die Objektträger wieder gewaschen, kurz getrocknet und nach Zugabe von Vectashield Mounting Medium mit einem Deckgläschen versehen und mit Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenzfärbung wurde abschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) untersucht und durch eine Color-ViewXS Digitalkamera (Olympus) fotografiert.

3.9 Bestimmung der intrazellulären Tryptophankonzentration

Um den intrazellulären Gehalt an Tryptophan zu bestimmen, wurden 1×10^7 HaCaTs 24 h nach Einsaat für 6 h auf Tryptophan-freies Medium gesetzt und anschließend optional wieder mit 1 mM Tryptophan für eine Stunde inkubiert. Vor dem Ernten wurde extrazelluläres Tryptophan durch wiederholtes Waschen mit PBS entfernt, die Zellen dann in 10 ml kaltem PBS geerntet und durch 10 min zentrifugieren bei 700 rpm (Rotanta RPC, Hettich, Schweiz) pelletiert. Nachdem das Gewicht der Pellets bestimmt worden war, wurden die Pellets in 1 ml Millipore resuspendiert und durch wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff vollends aufgeschlossen. Anschließend wurde je 1 ml 10 % Trichloressigsäure (TCA) zu den Lysaten gegeben. Als Kontrollen wurden dem Gewicht der Zellen entsprechende Volumina an Tryptophan-freiem und normalem Medium eingesetzt, die ebenfalls mit 1 ml Millipore und 1 ml 10 % TCA versetzt wurden. Dann wurde abermals für 10 min bei 700 rpm zentrifugiert und die Überstände in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit um möglichst alle hochmolekularen Komponenten zu pelletieren. Die Überstände wurden bis zur Analysierung durch die Gaschromatographie-Tandem-Massenspektroskopie (GC-MS-MS) bei -80 °C eingefroren.

Für die GC-MS-MS-Analyse durch Hossein Hajimiragha (IUF, Düsseldorf) wurden die Proben in zwei Schritten derivatisiert. Für die Methylierung wurde 1 ml jeder Probe mit N_2 bei 40 °C bis zur Trockene verdampft, der Rückstand in 1,5 ml 1,5 M HCl/MeOH gelöst und bei 65 °C für 30 min inkubiert. Für die danach folgende Acetylierung wurden die Proben erneut mit N_2 bei 40 °C bis zur Trockene verdampft, dann in 1,5 ml Trifluoressigsäure-Anhydrid (TFA) aufgenommen und für 1 h bei RT inkubiert.

Abschließend wurden die Proben abermals getrocknet, in 200 µl Ethylacetat resuspendiert und 1 µl wurde in die GC-MS-MS-Anlage injiziert.

Die GC Konditionen waren wie folgt: 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Film, J&W-DB5MS, Durchflussrate 1 ml Helium / min, Temperaturprogramm 60 °C (5 min) – 190 °C (0 min) bei 7 °C / min – 250 °C (10 min) bei 15 °C / min, Injektionstemperatur 250°C. Die MSMS (VARIAN Saturn 2000 GC-MSMS) wurde mit der klassischen Elektronenstoß-Ionisation (EI) durchgeführt, wobei die Quantifizierungsionen ein Masse-Ladungsverhältnis (m / z) von 198, 178, 156 und 128 aufwiesen.

3.10 Identifikation von intrazellulärem FICZ

Um intrazellulär gebildetes FICZ zu detektieren, wurden HaCaT Zellen 6 h für Tryptophan depletiert. Danach wurde einem Teil der Zellen 1 mM $^{13}\text{C}_{11}^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan für 1 h angeboten. Anschließend wurden die Zellen wiederholt gründlich mit PBS gewaschen, um sämtliches extrazelluläres Tryptophan zu entfernen, mit 600 J/m² UVB bestrahlt, für 10 min bei 37 °C inkubiert und dann mit eiskaltem PBS auf Eis geerntet. Die Suspensionen wurden bei 700 rpm (Rotanta RPC, Hettich, Schweiz) zentrifugiert und die pelletierten Zellen bis zur weiteren Verarbeitung durch Dr. Thorsten Bernsmann (Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Münster) bei -80 °C gelagert.

Die Zellpellets wurden mit Wasser gefolgt von Acetonitril extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend auf eine RP18-HPLC in einer Konzentration von 250 mg / 5 ml gegeben und FICZ mit Acetonitril eluiert. Die Eluate wurden mit N₂ verdampft und danach in 150 µl Acetonitril-Wasser-Gemisch mit einem Verhältnis von 1:9 resuspendiert. Nach Aufreinigung mit einem 0,45 µm Filter wurde das Filtrat mittels der Hochdruck-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektroskopie (HPLC-MS-MS) auf FICZ untersucht. Dazu wurden 25 µl in eine RP-Amid-C₁₆-Säule injiziert (5 µm, 15 cm x 2,1 mm) und mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten nach folgendem Schema eluiert:

Lösung A: Wasser / 1 % Ameisensäure; Lösung B: Acetonitril / 1 % Ameisensäure

10 % A zu 90 % B in 10 min

90 % B für 10 min halten

Flussrate: 0,15 ml / min

Säulenofentemperatur: 20 °C

Zur FICZ-Detektierung wurde das Tandem-Massenspektroskop Quattro II der Firma Micromass (Manchester, Großbritannien) mit folgenden Bedingungen benutzt:

Elektrospray-Ionisation (ESI) / positive Ionen

Beschleunigungsspannung: 3 kV

Kernspannung: 55 V

Quellentemperatur: 120 °C

Desolvationstemperatur: 280 °C

Kollisionsspannung: 50 eV für $285,2 \text{ m/z} \geq 255,2 \text{ m/z}$

65 eV für $285,2 \text{ m/z} \geq 128,4 \text{ m/z}$

$^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -FICZ-Parameter: 55 eV für $306,2 \text{ m/z} \geq 276,5 \text{ m/z}$

65 eV für $306,2 \text{ m/z} \geq 138,2 \text{ m/z}$

3.11 Statistik

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders vermerkt, mindestens dreimal wiederholt, und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Datenbewertung erfolgte über den Studentischen t-Test. Die Differenz von Werten mit $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant beurteilt, die mit $p \leq 0,01$ als hoch signifikant.

4 Ergebnisse

Ultraviolette Strahlung (UV), insbesondere UVB kann diverse pathologische Effekte verursachen, wie z.B. Entzündungsreaktionen (Clydesdale, G. J. et al, 2001), Hautalterung (Nishigori, C. et al, 2003), Immunsuppression (Schwarz, A. and Schwarz, T., 2002) und die Entstehung von Hautkrebs (De Gruijl, F. R. et al, 1993). Obwohl der größte Teil der UV-Strahlung durch die Erdatmosphäre zurückgehalten wird, steigt durch den Rückgang der Ozonschicht die UV-Strahlenbelastung auf der Erde derzeit jedoch ständig an. Pro Jahr erkranken in Deutschland über 100.000 Menschen neu an Hautkrebs, über 3.000 Menschen sterben daran. Er ist der weltweit am häufigsten auftretende Krebs.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern der AhR in die UVB-Signaltransduktion involviert ist, um so eventuell neue Ansatzpunkte zur Krebsprävention präsentieren zu können.

4.1 Einfluss der UVB-Strahlung auf die AhR-Aktivierung

UVB-Strahlung führt zur Induktion von Cyp1A1 in Keratinozyten (Wei, Y. D. et al, 1999) und Leberzellen (Goerz, G. et al, 1983). Um festzustellen, ob die UVB-induzierte Cyp1A1-Expression durch die Aktivierung des AhR zustande kommt, wurde die spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT mit einem Konstrukt transfiziert, das zur Expression eines Fusionsproteins zwischen dem AhR und GFP (Grünfluoreszierendes Protein) führt. Im Falle einer Aktivierung wird der AhR in den Nukleus transloziert, was durch das Konstrukt am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

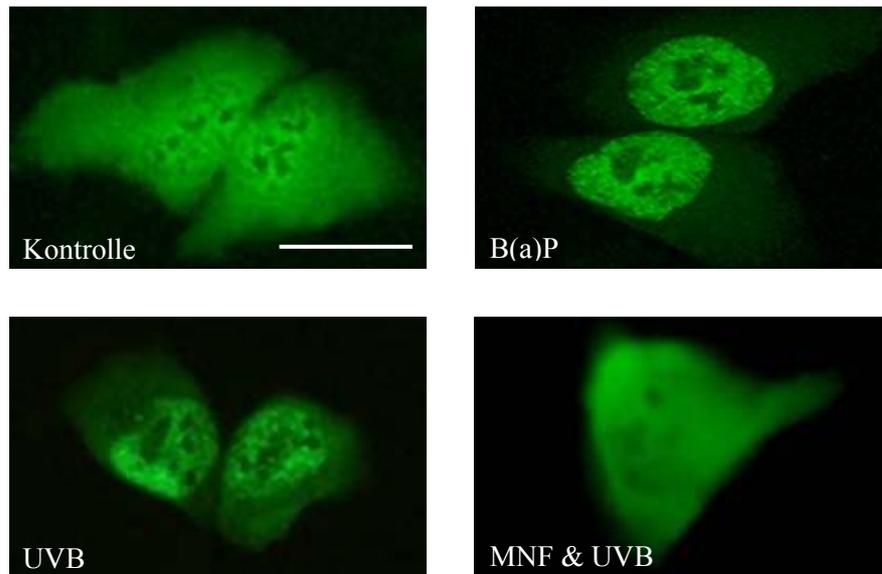


Abb. 4.1: Transiente Transfektion zur Überprüfung der AhR-Translokation

HaCaT-Zellen wurden mit einem GFP-gekoppeltem AhR zur Überprüfung der AhR-Aktivierung transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 40 min mit 10 μM B(a)P als Positivkontrolle belastet oder mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Im Falle einer Aktivierung findet eine nukleäre Translokation des AhR statt, die am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden kann. Optional wurden die Zellen zur Inhibierung des AhR vor der Bestrahlung 1 h mit 10 μM MNF inkubiert. Der Balken repräsentiert 20 μm .

Die Kontrolle (Abb. 4.1) zeigt die Verteilung des AhR über die gesamte Zelle, während die Behandlung mit dem AhR-Liganden B(a)P in einer Konzentration von 10 μM zur nukleären Translokation des Rezeptors führt, einer Bedingung zur Rezeptoraktivierung. Bestrahlung der Zellen mit 100 J/m^2 UVB akkumuliert den Rezeptor ebenfalls im Zellkern. Dieser Effekt wird durch Behandlung der Zellen mit 10 μM des AhR-Antagonisten 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) eine Stunde vor Bestrahlung blockiert.

Die anhand des AhR-GFP-Plasmids mikroskopisch nachgewiesene Akkumulation des AhR im Zellkern durch UVB, konnte mittels Isolierung von Kernprotein mit anschließender Immunopräzipitation und Western Blot des AhR aus bestrahlten und unbestrahlten Proben bestätigt werden. Abb. 4.2 zeigt, dass die mit 100 J/m^2 UVB bestrahlte Probe, deutlich mehr AhR im Kern enthält als die dazugehörige Kontrolle. Dieser Western Blot bestätigt damit die Ergebnisse der Transfektion aus, dass der AhR nach UVB-Bestrahlung in den Zellkern transloziert.

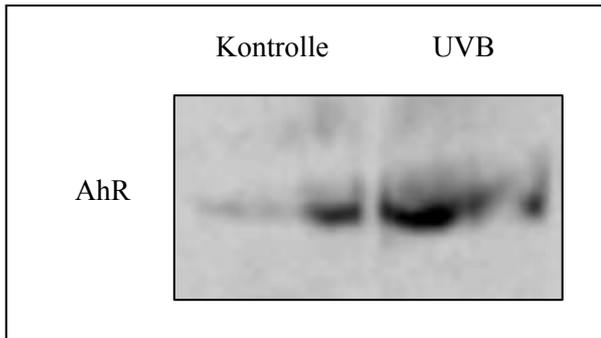


Abb. 4.2: Nachweis der AhR-Translokation mittels Western Blot

HaCaTs wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt. Der Isolierung von Kernprotein folgte eine AhR-Immunopräzipitation, die anhand eines Western Blots ausgewertet wurde.

Die nukleäre Translokation durch UVB, die in der Transfektion und dem Western Blot zu sehen sind, führte vier Stunden nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB auch zu einer signifikanten mRNA-Induktion von 3,1 des AhR-Zielgens Cyp1A1 (Abb. 4.3). Wurden die Zellen eine Stunde vor der Bestrahlung mit dem spezifischen AhR-Inhibitor MNF in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ behandelt, lag die UVB-induzierte Cyp1A1-Expression mit 0,5 unter der Expression der Kontrolle und unterschied sich signifikant von der bestrahlten Probe ohne MNF-Behandlung. Die Behandlung mit MNF alleine zeigt, dass auch die basale Cyp1A1-Expression AhR-abhängig ist, da die konstitutive Expression auf 0,07 sank.

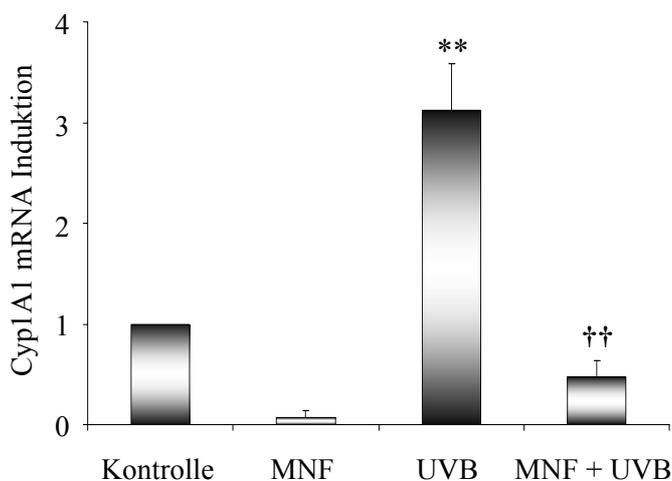


Abb. 4.3: Cyp1A1 mRNA Induktion nach UVB

HaCaTs wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cyp1A1 mRNA untersucht. Die Behandlung mit MNF erfolgte in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 1 h vor Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen dreier unabhängiger Experimente. ** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu UVB, $p \leq 0,01$

4.2 Kontrolle verschiedener siRNA-Sequenzen

Um die aufwändige Herstellung transduzierter Zellen so weit es ging zu verringern, wurden vor der Generierung der stabilen AhR KO verschiedene siRNA (small interfering RNA) auf ihre Eignung, die AhR-Expression transient zu vermindern, untersucht. Generiert wurde die siRNA-Sequenzen nach einem Algorithmus der Firma Qiagen. In Tab. 4.1 ist die Wirksamkeit der einzelnen Sequenzen in der Inhibierung der AhR mRNA-Expression in Prozent der Kontrolle dargestellt.

Tab. 4.1: AhR siRNA-Sequenzen und ihre Wirksamkeit

Soweit nicht anders angegeben handelt es sich um Mittelwerte und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen dreier (1.1 – 2.2) bzw. zweier (4.1 – 5.1) unabhängiger Experimente. Negative Mittelwerte drücken Induktionen aus.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (sense)</i>	<i>Inhibierung [%]</i>
1.1	UCC UUC CAA GCG GCA UAG A	-73,4 ± 82,7
1.2	UUU CAG CGU CAG CUA CAC U	-102,5 ± 77,6
1.3	CUA GAC UUC ACA CCU AUU G	-44,1 ± 90,6
1.4	UCC UGA CGU AUG UCC AAG A	-46,4 ± 48,5
2.1	GGA ACA CCU ACA UCU AGA A	-15,6 ± 112,1
2.2	ACU UUA UCA GGG AAA CUA A	46,5 ± 26,4
3.1	CCU GUA AUU CCA AGC CCA A	47,2 ± 2,1 (min/max)
3.2	GCA UAG AGA CCG ACU UAA U	51,7 ± 2,7 (min/max)
4.1	CGU UUA CCU UCA AAC UUU A	90,7 ± 6,0
4.2	CCG UCU ACA UUU CAC AUU A	94,2 ± 9,5
5.1	UAC UUC CAC CUC AGU UGG C	32,6 ± 52,4

Aufgrund der hohen Inhibitionseffizienz wurde die Sequenz 4.1 benutzt, um einen stabilen AhR Knockout (AhR KO) zu generieren. Dazu wurde die siRNA in eine shRNA (small hairpin RNA) für den Vektor pCL1.THPC umkonstruiert, indem ein Loop zur Bildung des hairpin und die entsprechenden Schnittstellen für den Vektor eingefügt wurden. Anschließend wurde die shRNA-Standardprozedur nach Wiznerowicz und Trono (2003) benutzt, die unter 3.3 genauer erläutert ist.

4.3 Überprüfung der transduzierten Zellen auf AhR-Expression und Effekte des AhR Knockout auf das Zielgen Cyp1A1

Für die Untersuchung AhR-abhängiger zellulärer Effekte wurden durch eine stabile Lentivirustransduktion HaCaT-Zellen generiert, die AhR shRNA überexprimieren und damit den AhR „ausknocken“ (AhR KO). Diese AhR KO Zellen exprimieren signifikant ca. 80 % weniger AhR mRNA im Vergleich zum Leervektor (LV) oder einer nicht funktionierenden AhR shRNA (n.s.) (Abb. 4.4)

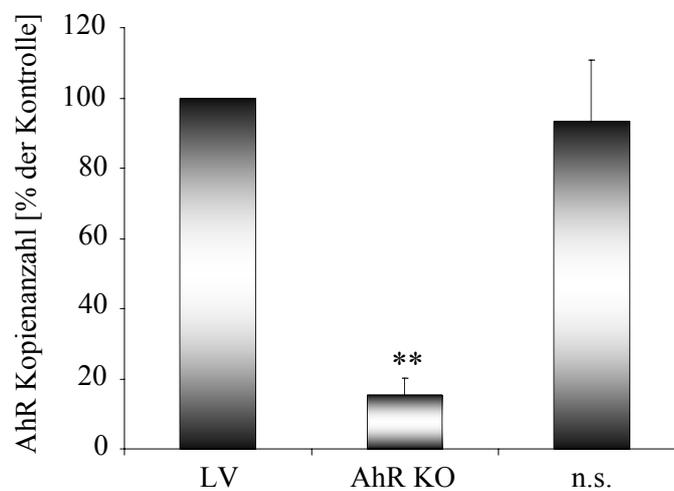


Abb. 4.4: Vergleich der AhR-Kopienanzahl von AhR KO und Kontrollen

Zur Überprüfung der mittels Lentiviren und AhR shRNA stabil transduzierten AhR Knockout Zellen (AhR KO) wurde anhand von RT-PCRs die Kopienanzahl in den AhR KO mit der der Leervektor-Zellen (LV) und der nicht funktionierenden AhR shRNA (n.s.) verglichen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen zweier unabhängiger Experimente.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,01$

Vergleichbar dazu zeigten die AhR KO auf Proteinebene eine geringere AhR-Expression als in der mit dem Leervektor transduzierten Kontrolle (Abb. 4.5)

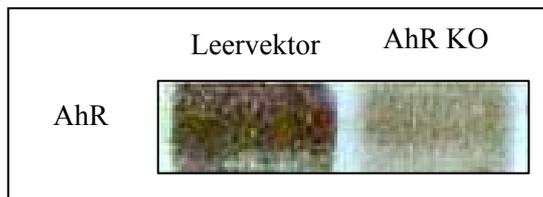


Abb. 4.5: Auswirkungen des AhR KO auf die AhR-Proteinexpression

Zum Vergleich der AhR-Expression auf Proteinebene wurden je 200 µg Gesamtprotein von AhR KO und Leervektorkontrolle für eine Western Blot-Analyse benutzt.

Die verminderte AhR-Expression in den AhR KO führt ähnlich wie durch Behandlung mit MNF zu einer signifikanten Reduktion der basalen und UVB-induzierten Cyp1A1-Expression auf das 0,06 bzw. 0,09fache (Abb. 4.6). Die UVB-induzierte Cyp1A1-Expression der Leervektorkontrolle bleibt dagegen mit 2,5fachen und somit signifikanten Induktion im Größenbereich der nicht-transduzierten HaCaTs.

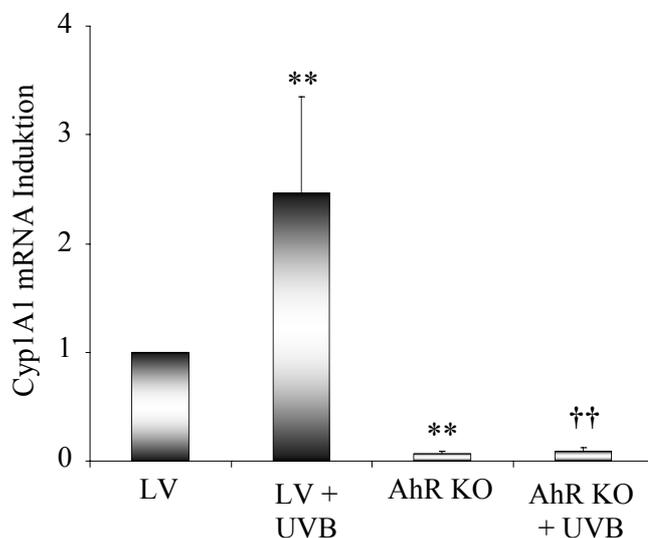


Abb. 4.6: Cyp1A1 mRNA Induktion nach UVB bei AhR KO

AhR KO und Leervektorkontrolle (LV) wurden mit 100 J/m² UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cyp1A1 mRNA untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Drei- bzw. Sechsfachbestimmungen zweier unabhängiger Experimente.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu LV + UVB, $p \leq 0,01$

4.4 Einfluss der AhR-Aktivierung auf die EGFR-Internalisierung

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob der AhR nicht nur die UVB-Signaltransduktion in den Zellkern, sondern auch an die Zellmembran vermittelt. Dazu wurde die Internalisierung des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) über einen Zeitraum von 10 bis 120 min nach 100 J/m^2 UVB mit Hilfe der EGFR-Immunocytochemie visualisiert.

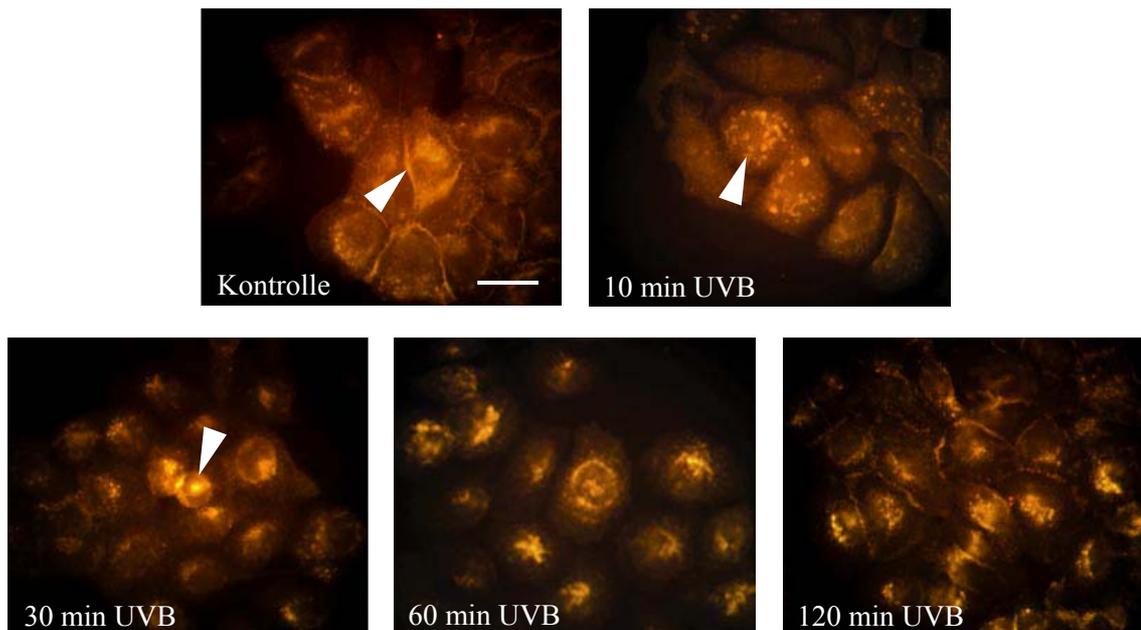


Abb. 4.7: EGFR-Immunocytochemie-Zeitreihe von 10 bis 120 min nach 100 J/m^2 UVB

HaCaT-Zellen wurden zur Visualisierung der EGFR-Internalisierung mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde die Zellen mit einem EGFR-Antikörper und darauf folgend mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Lokalisierung des so angefarbten EGFR konnte abschließend am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Pfeile zeigen den EGFR an, der Balken repräsentiert $20 \mu\text{m}$.

Abb. 4.7 zeigt, dass sich der EGFR in der unbestrahlten Kontrolle an der Zellmembran befindet, 10 min nach der Bestrahlung clustert und anschließend internalisiert (30 und 60 min). Nach 120 min kehrt er an die Zelloberfläche zurück. Aus diesen Resultaten stellte sich der Zeitpunkt von 30 min, wenn der EGFR vollständig internalisiert ist, als geeignet dar, um den Einfluss des AhR auf die EGFR-Internalisierung zu überprüfen.

Dafür wurden HaCaTs und AhR KO untersucht. Wie in Abb. 4.8 deutlich zu sehen ist, ist der EGFR 30 min nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB fast vollständig internalisiert. Wurden die Zellen eine Stunde vor der Bestrahlung mit $10 \mu\text{M}$ MNF behandelt oder handelte es sich um AhR KO, trat diese Internalisierung des EGFR nicht oder nur teilweise auf. In den Leervektor- und non-silencing-HaCaTs internalisierte der EGFR nach UVB wie in den nicht-transduzierten HaCaTs. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass der AhR die Aktivierung des membranständigen EGFR kontrolliert.

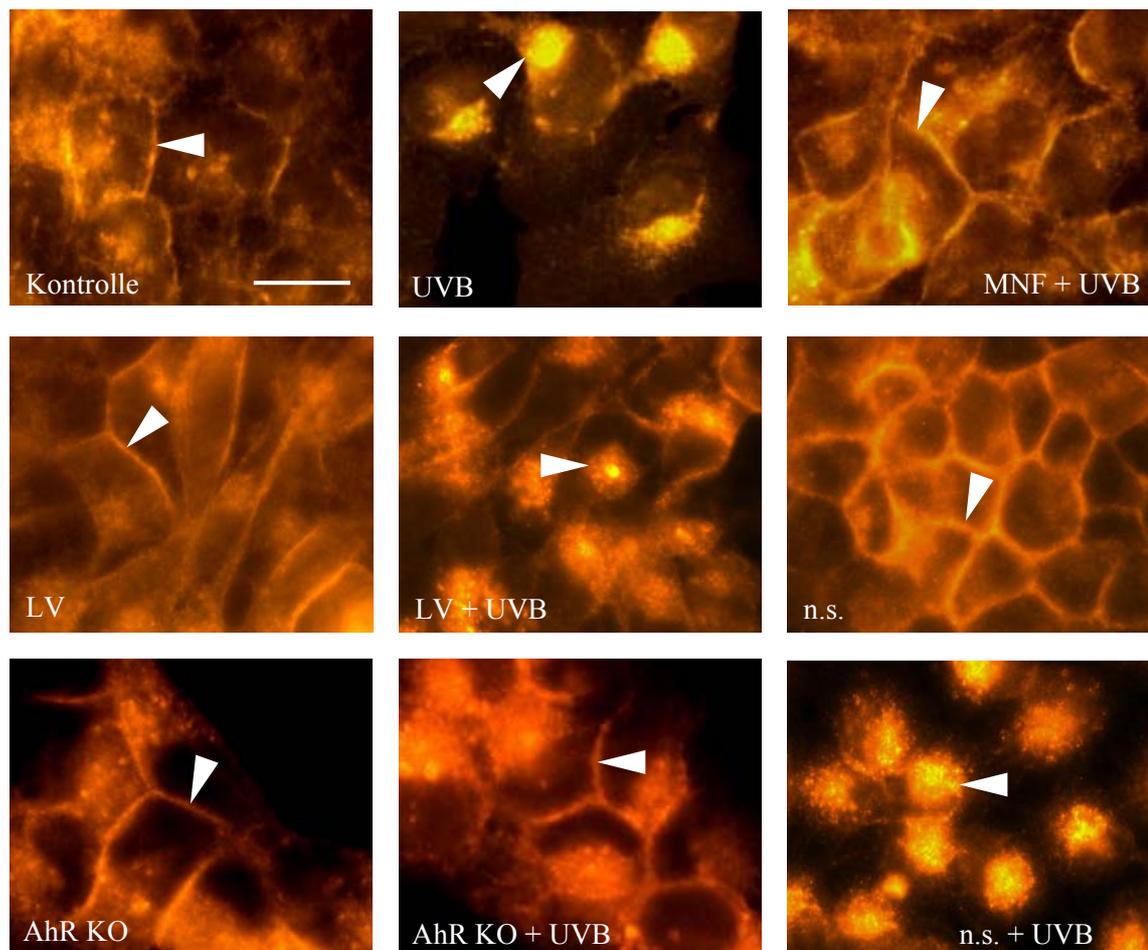


Abb. 4.8: EGFR-Immunozytochemie von HaCaTs und AhR KO nach 100 J/m^2 UVB

HaCaTs, AhR KO und Transduktionskontrollen (LV und n.s.) wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt und nach 30 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Behandlung mit MNF erfolgte in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 1 h vor Bestrahlung. Anschließend wurde die Zellen mit einem EGFR-Antikörper und darauf folgend mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Lokalisierung des so angefärbten EGFR konnte abschließend am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Pfeile zeigen den EGFR, der Balken repräsentiert $20 \mu\text{m}$.

4.5 Einfluss der AhR-Aktivierung auf EGFR-Zielmoleküle

Weiterhin wurde untersucht, ob auch durch UVB phosphorylierte oder transkriptionell induzierte, EGFR-abhängige Zielmoleküle, wie z.B. die mitogen-aktivierte Proteinkinase Erk 1/2 (Extrazellulär regulierte Kinase) und die Cyclooxygenase-2 (Cox-2), AhR-abhängig reguliert werden.

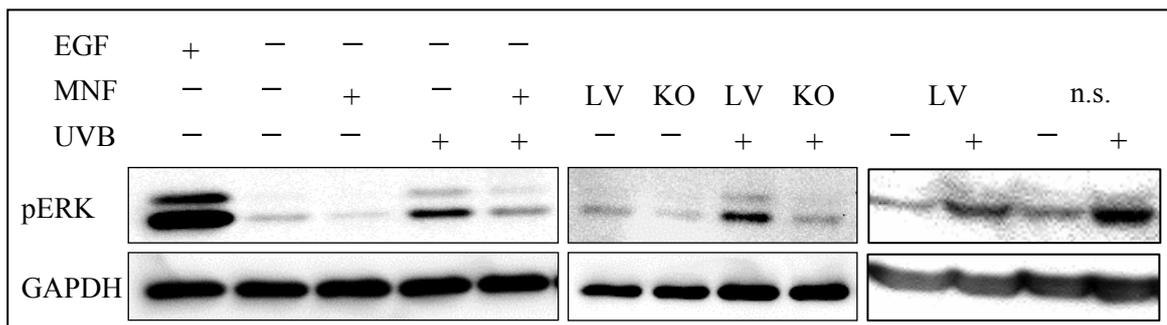


Abb. 4.9: Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 nach 100 J/m² UVB bei HaCaTs und AhR KO (KO)

HaCaT-Zellen, AhR KO, sowie Leervektor (LV)- und non silencing (n.s.)-HaCaTs als Kontrollen der transduzierten Zellen wurden mit 100 J/m² UVB bestrahlt, nach 20 min geerntet und mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung der nicht-transduzierten HaCaTs mit 10 µM MNF erfolgte 1 h vor Bestrahlung. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 1 min mit 10 ng/µl EGF behandelt. Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Ladekontrolle. Der dargestellte Western Blot demonstriert repräsentative Daten aus drei (HaCaTs; KO) bzw. zwei (n.s.) unabhängigen Experimenten.

Western Blot Analysen ergaben, dass in HaCaTs die ERK 1/2-Phosphorylierung nach 100 J/m² UVB zunimmt (Abb. 4.9). Durch AhR-Antagonisierung mit 10 µM MNF eine Stunde vor Bestrahlung verringert sich die Phosphorylierung. Untersuchungen der transduzierten HaCaTs ergaben, dass in Leervektor- und non-silencing-Kontrollen die ERK 1/2-Phosphorylierung durch UVB ebenfalls deutlich ansteigt, während bei einem AhR KO nur eine ganz geringe Zunahme erkennbar ist. Damit bestätigte sich die Vermutung, dass der AhR auch auf die EGFR-Signaltransduktion Einfluss nehmen kann.

Ein zweites EGFR-Zielmolekül ist Cox-2, welches nach UVB-Strahlung EGFR- und Erk 1/2-abhängig reguliert wird (Ashida, M. et al, 2003).

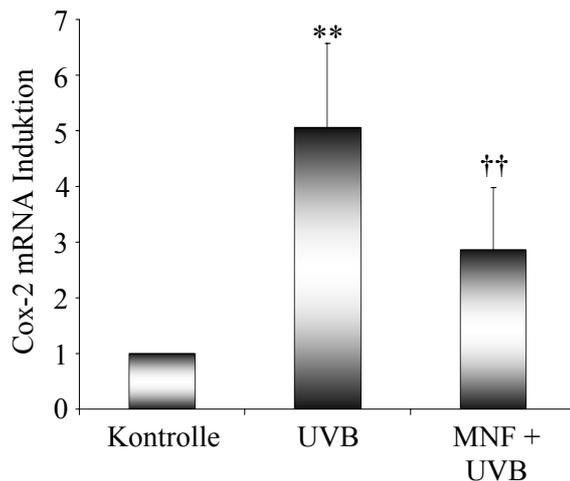


Abb. 4.10: Cox-2 mRNA Induktion nach UVB

HaCaTs wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Die Behandlung mit MNF erfolgte in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 1 h vor Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen fünf unabhängiger Experimente.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu UVB, $p \leq 0,01$

Anhand von RT-PCR-Analysen konnte veranschaulicht werden, dass die Bestrahlung von HaCaTs mit 100 J/m^2 UVB zu einer signifikanten 5,05-fachen Induktion der Cox-2 mRNA-Expression führt (Abb. 4.10). Erfolgte vor der Bestrahlung eine Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ MNF für eine Stunde, sank die Induktion dagegen signifikant auf 2,86 ab. Eine zweite Versuchsreihe zur Untersuchung der transduzierten HaCaTs (Abb. 4.11) zeigte, dass die Cox-2 mRNA-Expression in den Leervektor- und n.s.-Kontrollen durch 100 J/m^2 UVB signifikant auf das 6,89- bzw. 13,26-fache induziert wird, während sie in den AhR KO nur um das 2,41-fache ansteigt. Die Beteiligung des AhR an der EGFR-Signaltransduktion wurde daher durch den Einfluss des AhR-Antagonisten MNF oder der AhR KO bestätigt, welche zu einer 43,4 bzw. 65,0 %igen Reduktion der UVB-induzierten Cox-2 mRNA-Expression führten.

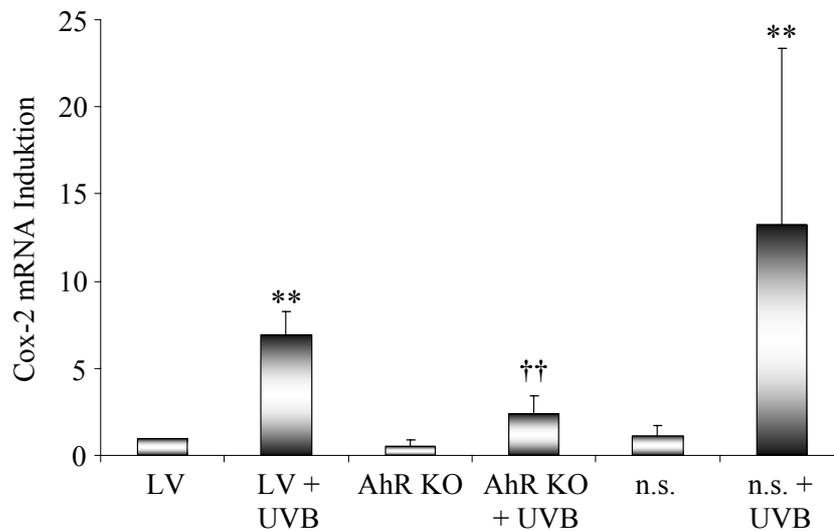


Abb. 4.11: Cox-2 mRNA-Induktion nach UVB bei AhR KO

AhR KO wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Als Kontrolle dienten Leervektor (LV)- und non-silencing (n.s.)-HaCaTs. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen von drei (LV; AhR KO) bzw. sechs (n.s.) unabhängigen Experimenten.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Leervektorkontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu Leervektor + UVB, $p \leq 0,01$

Desgleichen wird durch UVB auch auf Proteinebene (Abb. 4.12) die Expression von Cox-2 in HaCaTs induziert. Neben der Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ MNF eine Stunde vor Bestrahlung führt auch der AhR KO zu einer verminderten Expression, während das Cox-2-Protein in Leervektor- und non-silencing-Kontrollen durch UVB weiterhin induziert wird.

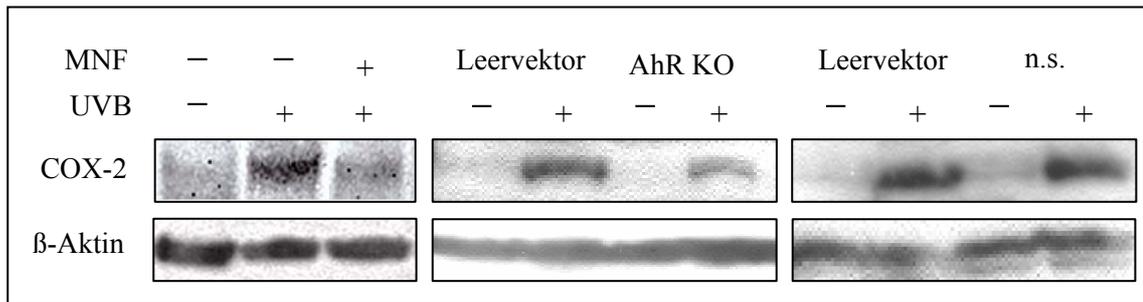


Abb. 4.12: COX-2 Induktion nach 100 J/m² UVB bei HaCaTs und AhR KO

HaCaT-Zellen, AhR KO, sowie Leervektor (LV)- und non silencing (n.s.)-HaCaTs als Kontrollen der transduzierten Zellen, wurden mit 100 J/m² UVB bestrahlt, nach 6 h geerntet und mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung der nicht-transduzierten HaCaTs mit 10 μM MNF erfolgte 1 h vor Bestrahlung. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Der dargestellte Western Blot zeigt repräsentative Daten aus drei (HaCaTs; n.s.) bzw vier (AhR KO) unabhängigen Experimenten.

4.6 Einfluss der AhR-Aktivierung auf die EGFR-Phosphorylierung

Die Aktivierung des EGFR ist über die Internalisierung hinaus durch seine Phosphorylierung gekennzeichnet. Daher wurde neben dem Aufenthaltsort des EGFR in der Zelle auch sein Phosphorylierungsstatus nach UVB-Bestrahlung durch den Einsatz eines Antikörpers gegen Phosphotyrosin-Sites geprüft. Da der Antikörper nicht nur an spezifische Phosphotyrosin-Sites des EGFR bindet, wurden die Zellysate vor der Western Blot-Analyse einer Immunopräzipitation unterzogen. Der präzipitierte EGFR wurde anschließend, wie in Abb. 4.13 zu sehen, auf phosphorylierte Tyrosin-Sites, die spezifische Autophosphorylierungsstelle 1068 des EGFR und, zum quantitativen Proteinabgleich, auf den EGFR immunologisch untersucht.

Die Überprüfung von Phosphotyrosin-Sites ergab, dass Phosphorylierung an diesen Stellen durch 100 J/m² UVB zunimmt und bei 200 J/m² noch stärker auftritt. Entgegen der Hypothese wird die Phosphorylierung jedoch nicht durch den Inhibitor MNF antagonisiert, sondern im Gegenteil noch verstärkt. Die Behandlung mit EGF als Positivkontrolle ruft dagegen eine weitaus stärkere Phosphorylierung hervor. Ähnlich verhält es sich bei Autophosphorylierungsstelle Tyr1068. Beide Bestrahlungsdosen führen nur zu einer sehr schwachen Phosphorylierung an dieser spezifischen Stelle. Hier zeigt die Behandlung mit MNF vor Bestrahlung keinerlei Auswirkungen. Andererseits

ruft die Inkubation mit EGF wiederum eine sehr starke Phosphorylierung hervor. Wie die Abbildung zeigt, ist die Beladung mit EGFR in allen Proben annähernd gleich.

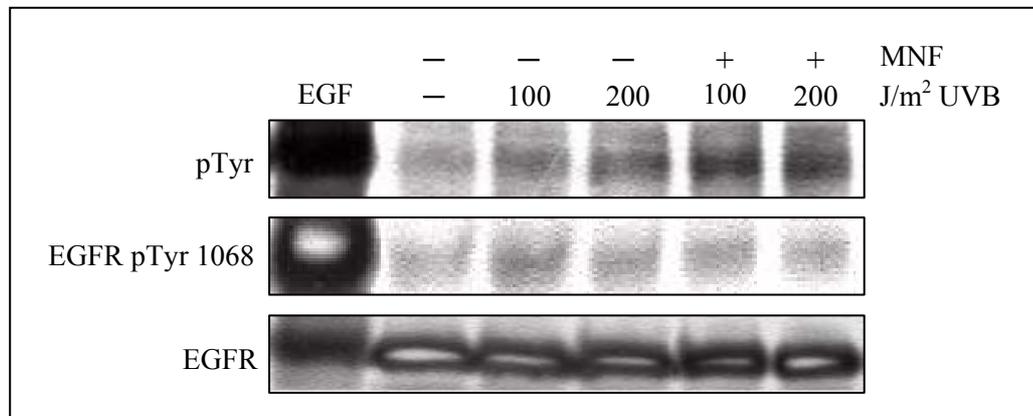


Abb. 4.13: Phosphorylierungsstatus des EGFR bei HaCaTs nach UVB

HaCaT-Zellen wurden mit 100 J/m² und 200 J/m² UVB bestrahlt, nach 5 min geerntet und einer EGFR-Immunopräzipitation unterzogen. Anschließend wurden die Präzipitate auf Phosphorylierungen an Tyrosin-Sites und auf die Phosphorylierung an der spezifischen Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 1068 mittels Western Blot untersucht. Die Behandlung mit 10 μM MNF erfolgte 1 h vor Bestrahlung. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 1 min mit 10 ng/μl EGF behandelt. Als Ladekontrolle diente total-EGFR.

Da kein signifikanter Einfluss des AhR auf die EGFR-Phosphorylierung gefunden werden konnte, wurde im folgenden untersucht, ob die UVB-medierte Aktivierung der EGFR-Signalkaskade EGFR-abhängig ist. Dazu wurden HaCaTs mit dem spezifischen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin (AG 1478) eine Stunde vor Bestrahlung behandelt. Der Western Blot in Abb. 4.14 zeigt, die Phosphorylierung von ERK 1/2 in unbehandelten Zellen durch UVB zunimmt. Die Behandlung mit Tyrphostin hingegen unterdrückt die konstitutive ERK-Phosphorylierung. Bestrahlung der mit Tyrphostin-behandelten Zellen führt nur zu einer sehr geringen ERK-Phosphorylierung und demonstriert damit, dass die UVB-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung EGFR-abhängig ist.

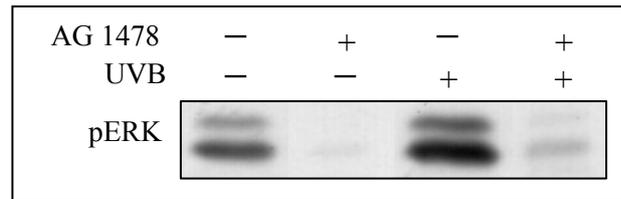


Abb. 4.14: Auswirkungen von Tyrphostin auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 nach UVB bei HaCaTs

HaCaT-Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 20 min geerntet und mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ Tyrphostin (AG1478) zur Inhibierung der EGFR-Tyrosinkinase erfolgte 1 h vor Bestrahlung.

4.7 Einfluss des src-Inhibitors PP2 auf den EGFR und EGFR-abhängige Zielmoleküle

Zur Überprüfung der Hypothese, dass c-src das Verbindungsglied zwischen AhR und EGFR in der UVB-Signaltransduktion darstellt, wurden die Auswirkungen des src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Internalisierung des EGFR und auf Phosphorylierung bzw. Induktion der EGFR-abhängigen Ziele ERK 1/2 und Cox-2 getestet.

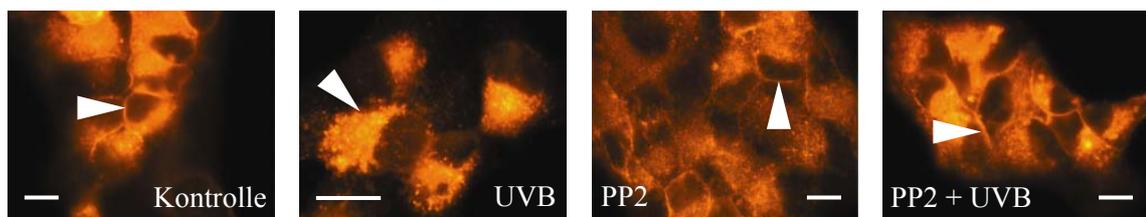


Abb. 4.15: Einfluss des src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die UVB-induzierte EGFR-Internalisierung

HaCaTs wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt und nach 30 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Behandlung mit PP2 erfolgte in einer Konzentration von $10 \text{ }\mu\text{M}$ 1 h vor Bestrahlung. Anschließend wurde die Zellen mit einem EGFR-Antikörper und darauf folgend mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Lokalisierung des so angefärbten EGFR konnte abschließend am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Pfeile zeigen den EGFR an, die Balken repräsentieren $20 \text{ }\mu\text{m}$.

Die EGFR-Immunozytochemie in Abb. 4.15 veranschaulicht, dass die durch 100 J/m^2 UVB induzierte Internalisierung des EGFR durch die Anwendung von $10 \text{ }\mu\text{M}$ PP2 eine Stunde vor Bestrahlung blockiert wird. In den mit PP2 vorbehandelten Zellen verbleibt der EGFR auch nach UVB-Bestrahlung wie in der Kontrolle an der Zellmembran.

Daraufhin wurde nachgeprüft, ob die Aktivierung des EGFR-abhängigen Zielmoleküls ERK 1/2 nach UVB-Strahlung ebenfalls c-src-abhängig ist. Western Blot-Analysen von Zelllysaten, die mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ PP2 eine Stunde vor der Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB behandelt wurden, zeigen eine verminderte ERK 1/2-Phosphorylierung im Gegensatz zu nicht mit PP2 behandelten Zellen (Abb. 4.16). Außerdem wird durch PP2 die geringe konstitutive ERK-Phosphorylierung vollständig unterdrückt.

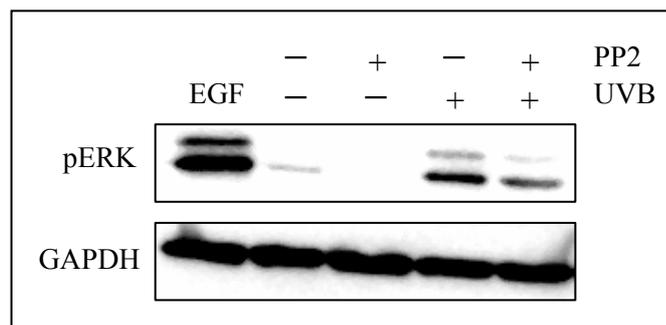


Abb. 4.16: Einfluss von PP2 auf die UVB-induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2

HaCaT-Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 20 min geerntet und mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung mit $10 \text{ }\mu\text{M}$ PP2 erfolgte 1 h vor Bestrahlung. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 1 min mit $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ EGF behandelt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Der dargestellte Western Blot demonstriert repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch das zweite EGFR-Zielmolekül, Cox-2, wurde auf Effekte durch PP2 und damit auf seine c-src-Abhängigkeit geprüft. Hier zeigten zunächst RT-PCR-Analysen, dass die UVB-induzierte Cox-2-mRNA-Expression nach PP2-Behandlung signifikant von einer 4,06-fachen Induktion auf 1,57 sinkt (Abb. 4.17). Die konstitutive Cox-2-Expression wurde durch PP2 ebenfalls auf 0,49 halbiert.

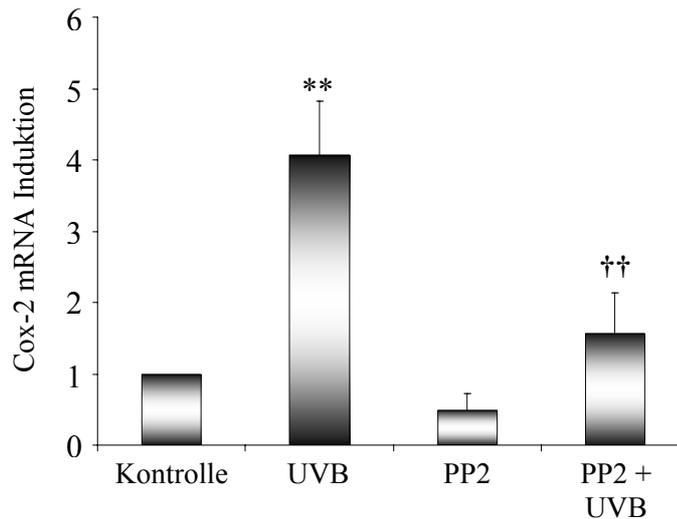


Abb. 4.17: Einfluss von PP2 auf die UVB-induzierte Cox-2 mRNA-Expression

HaCaTs wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ PP2 erfolgte 1 h vor Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen von drei unabhängigen Experimenten.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu UVB, $p \leq 0,01$

Zusätzlich wurden Zelllysate durch Western Blots auf die UVB-induzierte Cox-2-Proteinexpression kontrolliert. Auch auf dieser Ebene konnte die c-src-Abhängigkeit dokumentiert werden. Korrelierend zu den mRNA-Daten wird die UVB-induzierte COX-2-Expression durch die Behandlung mit dem Inhibitor PP2 verringert (Abb. 4.18) und die konstitutive Expression leicht verringert.

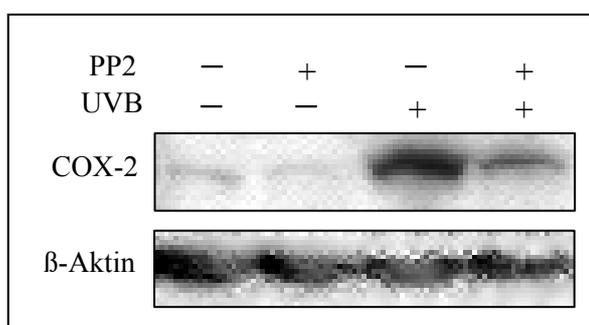


Abb. 4.18: Einfluss von PP2 auf die UVB-induzierte COX-2-Expression

HaCaT-Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 6 h geerntet und mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ PP2 erfolgte 1 h vor Bestrahlung. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Der dargestellte Western Blot demonstriert repräsentative Daten aus fünf unabhängigen Experimenten.

4.8 Auswirkungen einer Tryptophan-Depletion auf die AhR- und EGFR-Aktivierung

Vorarbeiten einer schwedischen Arbeitsgruppe haben *ex vitro* demonstriert, dass Bestrahlung einer wässrigen Tryptophan-Lösung zur Bildung des hochaffinen AhR-Liganden Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) führt (Rannug, A. et al, 1987). Aus diesen Arbeiten leitete sich unsere Hypothese ab, dass der AhR durch den endogen gebildeten Liganden FICZ nach UVB aktiviert wird, wobei die Aminosäure Tryptophan als Chromophor für UVB die Vorstufe des Liganden darstellt.

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden HaCaTs einer Tryptophan-Depletion unterzogen und anschließend auf Auswirkungen auf die UVB-induzierte Aktivierung des AhR und des EGFR untersucht. Dieser Vorgang wurde durch Inkubation von HaCaTs in Tryptophan-freiem Medium für sechs Stunden vor Bestrahlung bewerkstelligt. Zuvor jedoch wurde die Tryptophan-Konzentration von normalem und Tryptophan-freiem Medium bestimmt, sowie in unbehandelten Zellen, Zellen die sechs Stunden in Tryptophan-freiem Medium kultiviert wurden und Zellen, die nach dem Tryptophan-Entzug zur Wiederanreicherung an Tryptophan eine Stunde mit 1 mM Tryptophan inkubiert wurden (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Tryptophan (Trp)-Konzentration von Medien und verschieden behandelten HaCaTs

<i>Probe</i>	<i>Tryptophan-Konz. [μM]</i>
Nachweisgrenze (NG)	0,13
Normales Medium	176,33
Trp-freies Medium	< NG
Unbehandelte HaCaTs	2,22
HaCaTs nach 6 h Trp-Entzug	< NG
HaCaTs nach 6 h Trp-Entzug und 1 h Wiederanreicherung mit 1mM Trp	21,07

Während normales Medium 176,33 μM Tryptophan enthält, liegt der Tryptophan-Gehalt von Tryptophan-freiem Medium unter der Nachweisgrenze (NG) von 0,13. In den Zellen sinkt die Tryptophan-Konzentration von 2,22 μM in unbehandelten Zellen unter die Nachweisgrenze bei Zellen, die sechs Stunden in dem Tryptophan-freiem Medium kultiviert wurden. Wurde nach dem Tryptophan-Entzug 1 mM Tryptophan für eine Stunde zu den Zellen gegeben, stieg der Tryptophan-Gehalt auf 21,07 μM an.

Die Auswirkung der durch die Inkubation in Tryptophan-freiem Medium hervorgerufene Senkung der Tryptophan-Konzentration auf die AhR-vermittelte UVB-Signaltransduktion wurde mittels RT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass die UVB-induzierte Cyp1A1-mRNA-Expression durch eine Tryptophan-Depletion vor der Bestrahlung signifikant von 7,18 auf 0,33 sank (Abb. 4.19).

Durch die einstündige Zugabe von 1 mM Tryptophan nach dem Entzug, aber vor der Bestrahlung, konnte die Cyp1A1-Expression wieder auf 10,89 induziert werden und lag damit sogar um 51,7 % höher als die Induktion der Kontroll-HaCaTs.

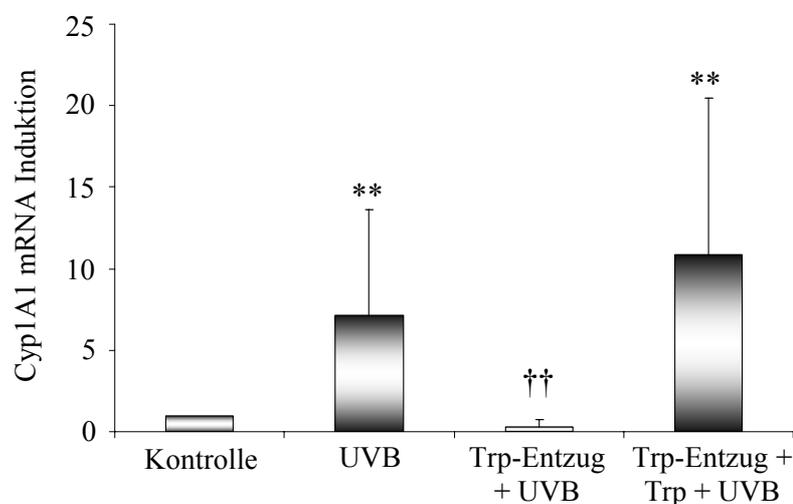


Abb. 4.19: Auswirkungen der Trp-Depletion auf die Cyp1A1 mRNA Induktion nach UVB
HaCaT-Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cyp1A1 mRNA untersucht. Für die Trp-Depletion wurden die Zellen 6 h vor Bestrahlung auf Trp-freies Medium gesetzt. Zur Wiederanhebung der Trp-Konzentration wurden die Zellen nach der Depletion für 1 h in 1 mM Trp kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen fünf unabhängiger Experimente.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu UVB, $p \leq 0,01$

Die Resultate aus Abb. 4.19 zeigen, dass UVB-induzierte Cyp1A1-Expression Tryptophan-abhängig ist. Um auch UVB-induzierten Membraneffekte auf diese Abhängigkeit zu untersuchen, wurden HaCaTs erneut einer Tryptophan-Depletierung unterzogen und mittels immunozytochemischer Methoden untersucht. Dabei zeigte der Tryptophan-Entzug auch Auswirkungen auf die UVB-induzierte Internalisierung des EGFR (Abb. 4.20). Wurden die Zellen direkt nach dem Tryptophan-Entzug mit 100 J/m^2 bestrahlt, kam es zu keiner Internalisierung des EGFR. Erfolgte hingegen nach dem Tryptophan-Entzug eine einstündige Inkubation mit 1 mM Tryptophan, konnte die UVB-Antwort wieder hervorgerufen werden.

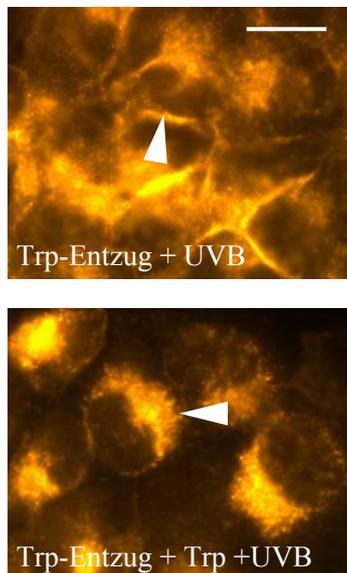


Abb. 4.20: Auswirkungen einer Tryptophan-Depletion auf die UVB-induzierte EGFR-Internalisierung

HaCaTs wurden 6 h für Tryptophan depletiert, anschließend mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt und nach 30 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Zur Wiederanreicherung des Tryptophangehalts wurden die Zellen nach der Depletion 1 h vor Bestrahlung in 1 mM Tryptophan inkubiert. Anschließend wurde die Zellen mit einem EGFR-Antikörper und darauf folgend mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Lokalisierung des so angefärbten EGFR konnte abschließend am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden. Die Pfeile zeigen den EGFR an, der Balken repräsentiert $20 \mu\text{m}$.

Als Beispiel für ein Zielmolekül des EGFR wurde die UVB-induzierte Cox-2-mRNA-Expression nach dem Tryptophan-Entzug untersucht. Abb. 4.20 dokumentiert, dass durch die Tryptophan-Depletion die UVB-induzierte mRNA-Expression signifikant von 6,40 auf 3,89 abfällt und damit eine Tryptophan-Abhängigkeit für die UVB-induzierte Cox-2-Expression besteht.

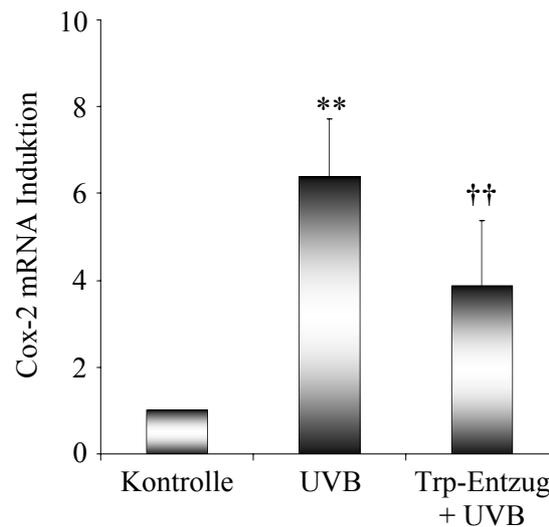


Abb. 4.21: Effekt einer Tryptophan-Depletion auf die UVB-induzierte Cox-2 mRNA-Expression

HaCaTs wurden 6 h das Tryptophan durch Inkubation in Tryptophan-freiem Medium entzogen, anschließend mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen von vier unabhängigen Experimenten.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu UVB, $p \leq 0,01$

4.9 Identifikation von FICZ

Der Beweis für die Hypothese, dass FICZ nicht nur in zellfreien Systemen nach UVB entsteht, sondern tatsächlich auch in der Zelle gebildet wird, wurde in Kooperation mit Dr. Thorsten Bernsmann (Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Münster) durch die Hochdruck-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektroskopie (HPLC-MS-MS) erbracht (Abb. 4.22). Für dieses Experiment wurden HaCaTs zunächst für Tryptophan depletiert und anschließend mit $1 \text{ mM } ^{13}\text{C}_{11} \text{ } ^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan für eine Stunde inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Zellen schließlich bestrahlt und die Zelllysate mittels HPLC-MS-MS analysiert. Durch die Zugabe von $^{13}\text{C}_{11} \text{ } ^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan und dem Entfernen von extrazellulären Tryptophan vor der Bestrahlung konnte gewährleistet werden, dass das detektierte FICZ tatsächlich intrazellulär gebildet worden ist. Bild A aus Abb. 4.22 zeigt einen FICZ-Standard bei 17,71 min. Nach der Feststellung des Detektionszeitpunktes konnten die Kontrolle (B)

und die bestrahlte Probe (C) untersucht werden. Während bei der Kontrolle nur die Basislinie in einer vergrößerten Ansicht zu sehen ist, konnte in der mit 600 J/m^2 UVB bestrahlten Probe *in-vivo*-gebildetes $^{13}\text{C}_{11}^{15}\text{N}_2\text{-FICZ}$ nachgewiesen werden (Pfeil).

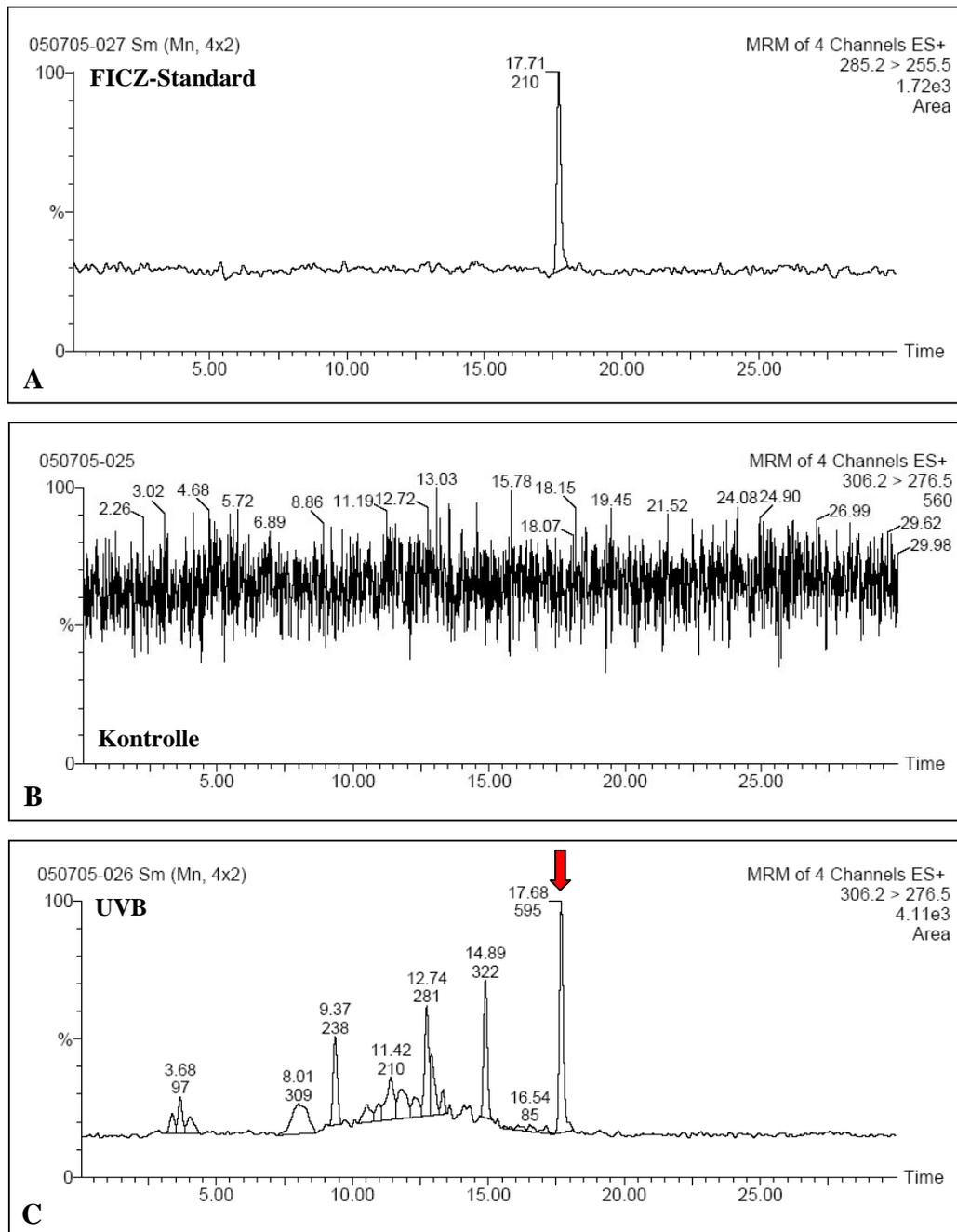


Abb. 4.22: HPLC-MS-MS-Analyse eines FICZ-Standards, einer unbestrahlten und einer bestrahlten Probe

HaCaTs wurden 6 h für Tryptophan depletiert. Danach wurde einem Teil der Zellen 1 mM $^{13}\text{C}_{11}$ $^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan für 1 h angeboten. Anschließend wurden die Zellen gründlich gewaschen, um sämtliches extrazelluläres Tryptophan zu entfernen, mit 600 J/m² UVB bestrahlt und die nach 10 min geernteten Zelllysate mittels HPLC-MS-MS analysiert. (A) FICZ-Standard; (B) Kontrolle; (C) UVB. Der Pfeil bei (C) indiziert $^{13}\text{C}_{11}$ $^{15}\text{N}_2$ -FICZ.

4.10 Einfluss von FICZ auf die UVB-induzierte AhR-Signaltransduktion

Um die Hypothese weiter zu untermauern, dass FICZ ein endogener, durch UVB generierter AhR-Ligand ist, wurde der Einfluss von FICZ auf die Cyp1A1 mRNA-Expression untersucht. Dazu wurden HaCaTs mit verschiedenen FICZ-Konzentrationen belastet, wobei die höchste Konzentration für die Belastung von AhR KO und den entsprechenden Vektor-Kontrollen eingesetzt wurde. Abb. 4.23 veranschaulicht, dass FICZ einen dosisabhängigen Effekt auf die Cyp1A1 mRNA-Expression hat. Cyp1A1 wird in den Konzentrationen von 1, 10 und 100 nM signifikant auf das 19,67-fache über 168,98 auf das 209,38-fache induziert. Die Kontrollen der AhR-defizienten HaCaTs zeigen ebenfalls eine signifikante Cyp1A1-Induktion nach Zugabe von 100 nM FICZ von 105,96 bei der Leervektor- und 114,87 bei der non-silencing-Kontrolle, während der AhR KO nur auf das 10,01-fache induziert wird und sich damit signifikant von der Kontrolle unterscheidet.

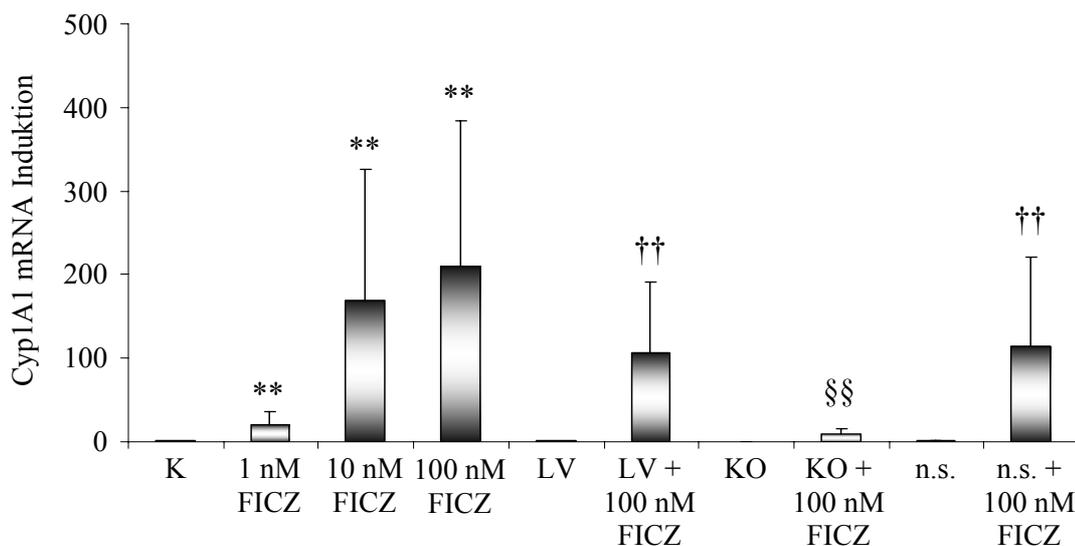


Abb. 4.23: Cyp1A1 mRNA Induktion nach FICZ bei HaCaTs und AhR KO

HaCaTs, AhR KO (KO) und Vektorkontrollen (Leervektor (LV); non-silencing (n.s.)) wurden mit den angegebenen Konzentrationen FICZ belastet, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cyp1A1 mRNA untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen von fünf (HaCaTs) bzw. vier (AhR KO und Kontrollen) unabhängigen Experimenten.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu LV, §§ hoch signifikant unterschiedlich zu LV + 100 nM FICZ, $p \leq 0,01$

Auch die UVB-induzierten Membraneffekte wurden auf ihre Beeinflussung durch den AhR-Liganden FICZ überprüft. RT-PCR-Analysen des EGFR-Zielmoleküls Cox-2 demonstrieren, dass FICZ die Expression ebenfalls dosisabhängig induziert. Dabei steigt die mRNA-Expression von HaCaTs bei den FICZ-Konzentrationen 10 und 100 nM signifikant auf das 1,61- bzw. 3,51-fache an, während bei einer Konzentration von 1 nM FICZ keine signifikanten Expressionsänderungen zu verzeichnen sind.

Die Untersuchung der AhR-defizienten HaCaTs ergab bei den Kontrollen einen signifikanten Anstieg auf 2,35 bei dem Leervektor bzw. 2,41 bei der non-silencing-Kontrolle. Dagegen sank bei den AhR KO die Cox-2-Expression mit 0,45 unter das konstitutive Expressionslevel und wies einen signifikanten Unterschied zur Leervektor-Kontrolle auf.

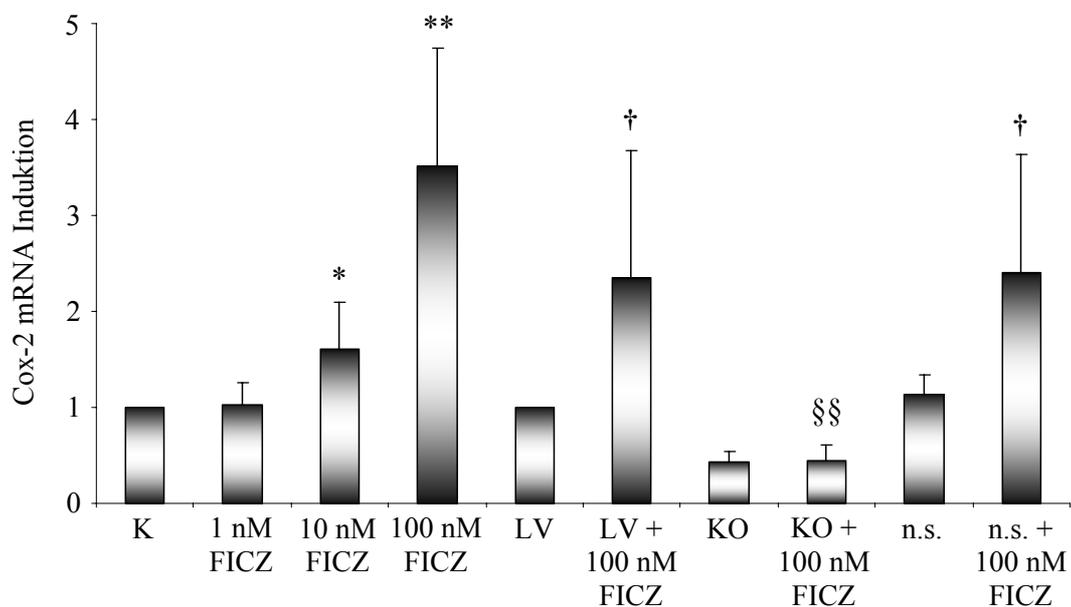


Abb. 4.24: Cox-2 mRNA Induktion nach FICZ bei HaCaTs und AhR KO

HaCaTs, AhR KO (KO) und Vektorkontrollen (Leervektor (LV); non-silencing (n.s.)) wurden mit den angegebenen Konzentrationen FICZ belastet, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen von drei bzw. zwei (AhR KO) unabhängigen Experimenten.

* signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, † signifikant unterschiedlich zu LV, $p \leq 0,05$

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, §§ hoch signifikant unterschiedlich zu LV + 100 nM FICZ, $p \leq 0,01$

Die Ergebnisse der RT-PCR zu Cox-2 werden durch Western Blots noch gestützt. Dazu wurden HaCaTs, AhR KO und Kontrollen mit 100 nM FICZ belastet, nach sechs Stunden geerntet und die Zelllysate auf COX-2 untersucht. Dabei offenbarte sich, dass auch auf Proteinebene die durch 100 nM FICZ induzierte Cox-2-Expression bei HaCaTs, Leervektor- und non-silencing-Zellen bei den AhR KO unterbleibt (Abb. 4.25).

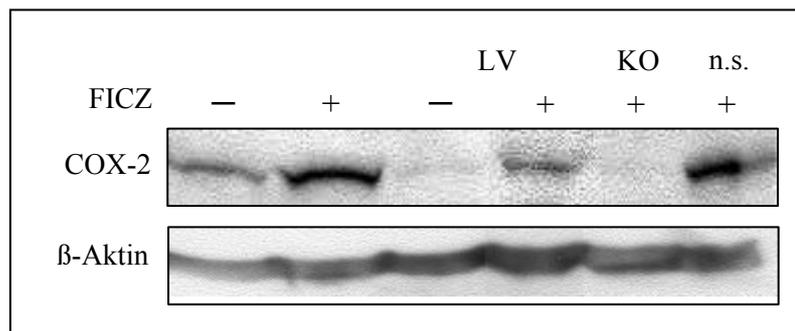


Abb. 4.25: COX-2 Induktion nach 100 nM FICZ bei HaCaTs und AhR KO

HaCaT-Zellen, AhR KO (KO), sowie Leervektor (LV)- und non silencing (n.s.)-HaCaTs als Kontrollen der transduzierten Zellen, wurden mit 100 nM FICZ belastet, nach 6 h geerntet und mittels Western Blot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Der dargestellte Western Blot zeigt repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Experimenten.

Abschließend wurde untersucht, ob die FICZ-induzierte Cox-2-Expression c-src-abhängig ist. RT-PCR-Ergebnisse der Cox-2 mRNA demonstrieren, dass die durch FICZ auf das 2,2-fache induzierte Cox-2-Expression durch Zugabe des Inhibitors PP2 vor der FICZ-Behandlung auf 0,43 vermindert wird (Abb. 4.26). Die konstitutive Cox-2-Expression wird durch PP2 ebenfalls auf 0,22 verringert.

Diese Versuche weisen darauf hin, dass Belastung von HaCaT-Zellen mit FICZ die UVB-induzierte Signaltransduktion mimikriert.

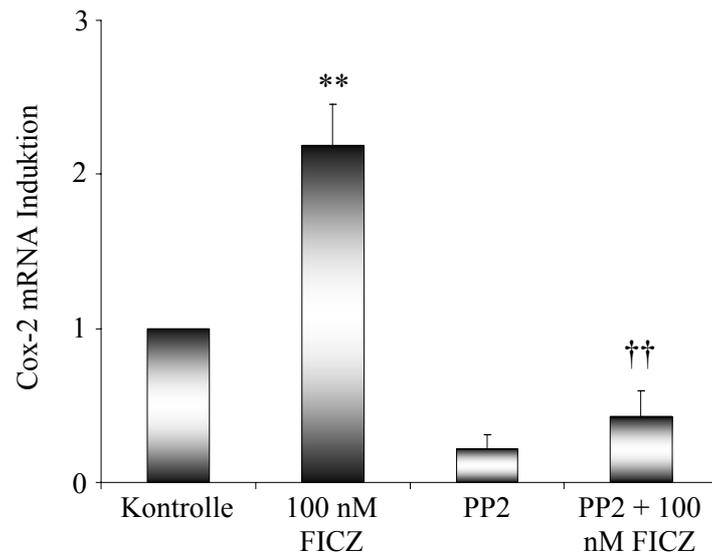


Abb. 4.26: Einfluss von PP2 auf die FICZ-induzierte Cox-2 mRNA-Expression

HaCaTs wurden mit 100 nM FICZ belastet, nach 4 h geerntet und mittels RT-PCR auf Cox-2 mRNA untersucht. Die Behandlung mit 10 μ M PP2 erfolgte 1 h vor Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen von zweier unabhängiger Experimente.

** hoch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, †† hoch signifikant unterschiedlich zu 100 nM FICZ, $p \leq 0,01$

5 Diskussion

In den letzten 20 bis 30 Jahren hat die Zahl der an Hautkrebs erkrankten Personen stark zugenommen. Allein in Deutschland treten schätzungsweise jährlich etwa 7000 neue Fälle auf, womit sich die Zahl seit 1970 etwa vervierfacht hat (DKFZ, Heidelberg). Der Anstieg ist größtenteils auf das veränderte Freizeitverhalten und die damit verbundene erhöhte UV-Exposition der Haut zurückzuführen.

Ein essentieller Schritt in der Präkanzerogenese sind chronische Entzündungsreaktionen in der Haut, wie sie auch durch polyzyklische aromatische Hydrokarbone (PAH) verursacht werden. Der genaue Mechanismus der PAH-medierten Entzündungsreaktionen ist unbekannt. Ein möglicher Signalweg könnte die Aktivierung der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR)-Kaskade sein, da PAH eine hohe Affinität zum AhR aufweisen (Tauchi, M. et al, 2005).

Die PAH-medierten Entzündungsreaktionen ähneln den Symptomen einer chronischen UV-Bestrahlung. Hinzu kommt, dass bei Mäusen die topische Applikation von Epigallocatechingallat (EGCG), einem AhR-Antagonisten, die Größe und Anzahl von UV-induzierten Hauttumoren signifikant reduziert (Gensler, H. L. et al, 1996). Aufgrund dieser Anhaltspunkte wurde im Rahmen dieser Arbeit die Involvierung des AhR in die UVB-induzierte Signaltransduktion untersucht.

5.1 Der AhR wird durch UVB aktiviert

Die zellulären Reaktionen auf UV-Strahlung sind in den letzten Jahren besonders in Hinsicht auf die Entwicklung auf Hautkrebs intensiv untersucht worden. Hauptsächlich zwei Zellkompartimente standen dabei im besonderen Interesse der Forschung: der Zellkern und die Membran. Es wird angenommen, dass die durch UV induzierten Signaltransduktionen in diesen beiden Kompartimenten initiiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde demonstriert, dass der AhR und somit das Zytoplasma als drittes UV-sensitives Kompartiment, ebenfalls an der UVB-induzierten Signaltrans-

duktion beteiligt sind. Erste Hinweise dafür gaben Untersuchungen an humanen Zellen, die die transkriptionelle Induktion des AhR-Zielgens Cyp1A1 durch UVB-Bestrahlung auslösen konnten (Wei, Y. D. et al, 1999; Katiyar, S. K. et al, 2000).

Der Mechanismus der UVB-medierte Cyp1A1-Induktion und insbesondere die Beteiligung des AhR waren bislang unbekannt. Wie in der vorliegenden Arbeit durch eine transiente Transfektion mit einem GFP-AhR-Plasmid demonstriert werden konnte, erfolgt nach UVB-Bestrahlung eine nukleare Translokation des AhR (Abb. 4.1). Ein ähnliches Bild zeigt sich nach der Behandlung mit Benz(a)pyren (B(a)P), einem klassischen AhR-Liganden. Bei einer Blockade der AhR-Aktivierung durch den spezifischen Inhibitor 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) (Henry, E. C. et al, 1999), unterbleibt die Translokation und gibt damit einen eindeutigen Hinweis auf die AhR-abhängige Aktivierung durch UVB.

Die Translokationsstudien konnten durch Western-Blot-Analysen von Kernprotein bestrahlter und unbestrahlter Zellen bestätigt werden (Abb. 4.2). Diese veranschaulichen, dass das Kernprotein bestrahlter Zellen weitaus mehr AhR enthält als der Zellkern unbestrahlter Keratinozyten. Begleitet wurde die UVB-induzierte AhR-Translokation des weiteren von der Aktivierung des AhR-Zielgens Cyp1A1 (Abb. 4.3). Zur weiteren Bestätigung wurden AhR-defiziente Zellen generiert und mit UVB bestrahlt. Bei diesen Untersuchungen schlug die Induktion von Cyp1A1 durch UVB fehl (Abb. 4.6). Desgleichen unterblieb die UVB-induzierte Cyp1A1-Expression bei einer Inhibierung des AhR durch MNF. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an murinen Hepatoma-Zellen, Mutantenzelllinie c12, die sehr wenig AhR exprimieren und die Cyp1A1-Expression nach UVB nicht steigern können (Wei, Y. D. et al, 1999).

Ähnliche Befunde wurden von anderen Arbeitsgruppen entdeckt. Die Arbeitsgruppe von Goerz konnte schon vor 20 Jahren belegen, dass UV-Bestrahlung (UVA & UVB) von Mäusen zu einer Zunahme der Arylhydrokarbon-Hydroxylase (AHH)-Aktivität, einem Marker der Cyp1A-Enzymaktivität, in der Leber führt (Goerz, G. et al, 1983). Bekräftigt wurden diese Resultate durch Versuche der gleichen Arbeitsgruppe an Ratten, die eine verstärkte Cyp1A-Enzymaktivität in der Leber bestrahlter Tiere detektieren konnten (Goerz, G. et al, 1996). Allerdings konnte in beiden Studien keine Enzymaktivität in der Haut nach UVB-Bestrahlung festgestellt werden. Dies könnte auf

die langen Bestrahlungszeiten (24 h bzw. 1-3 Wochen) zurückzuführen sein, die eine adaptive Herabregulierung von Cyp1A zur Folge haben könnten. Ein möglicher Regulationsmechanismus könnte über den AhR Repressor ablaufen, der in HaCaTs durch UVB induzierbar ist (Fritsche & Abel, unveröffentlichte Beobachtungen). Das würde außerdem die Diskrepanz zu den Ergebnissen in neonatalen Ratten erklären, in denen UVB-Bestrahlung zu einer Induktion der Cyp1A-Enzymaktivität in der Haut führt (Goerz, G. et al, 1983; Mukhtar, H. et al, 1986). In diesem Fall wurde die Haut bereits nach 24 h untersucht. Des weiteren konnten Villard *et al* zeigen, dass in primären Keratinozyten und HaCaTs die UVB-induzierte Expression von Cyp1B1 durch die zielgerichtete Mutation von xenobiotisch responsiven Elementen (XRE) geblockt wird (Villard, P. H. et al, 2002).

5.2 Die Aktivierung des EGFR und -Zielmolekülen ist AhR-abhängig

Ein weiteres wichtiges Zellkompartiment in der UVB-Signaltransduktion ist die Membran. Das Chromophor für dieses Kompartiment ist unbekannt (Xu, Y. et al, 2006). Daher wurde untersucht, ob der membranständige epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) in HaCaTs durch UVB aktiviert werden kann und ob der AhR daran beteiligt ist (Abb. 4.8).

Die Aktivierung des EGFR ist u.a. durch seine Internalisierung in den Zellkern gekennzeichnet, die mit Hilfe der Immunocytochemie visualisiert wurde. Bei der Untersuchung zeigte sich, dass die UVB-induzierte EGFR-Internalisierung sowohl durch den AhR-Inhibitor MNF als auch durch einen AhR KO blockiert wurde. Die AhR-Abhängigkeit der EGFR-Aktivierung wird durch Versuche mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in Hinblick auf die EGFR-Aktivierung untermauert. Publikationen zeigen, dass der „klassische“ AhR-Ligand TCDD in Keratinozyten (Choi, E. J. et al, 1991), endozervikalen Zellen von Makaken (Enan, E. et al, 1998) und in epithelialen Rattenleberzellen (Kohle, C. et al, 1999) eine EGFR-Aktivierung auslöst.

Das UVB-initiierte Clustering mit anschließender Internalisierung des Rezeptors wurde schon für mehrere Zellmembranrezeptoren beschrieben. Rosette und Karin demonstrierten in Hela-Zellen, dass UV-Bestrahlung das Clustern und die Internalisierung der Rezeptoren für EGF, Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1) auslöst

(Rosette, C. & Karin, M., 1996; Aragane, Y. et al, 1998). Auch für den in der Apoptose relevanten CD95-Rezeptor wurde in HaCaT-Zellen gezeigt, dass UV-Bestrahlung den Rezeptor unabhängig von seinem Liganden CD95L aktiviert (Aragane, Y. et al, 1998).

Die EGFR-Aktivierung kann über verschiedene Signalwege zu Proliferation, Differenzierung und Apoptose führen. Zu den Signalmolekülen, die in Abhängigkeit von der Aktivierung des EGFR aktiviert und reguliert werden, gehören die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die an der zellulären Antwort auf mitogene Signale sowie umweltbedingten Stress beteiligt sind. Sie regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und das Gleichgewicht zwischen Überleben der Zelle und apoptotischem Zelltod.

Als Endpunkte der UV-induzierten EGFR-Aktivierung wurden in dieser Arbeit die Phosphorylierung der MAPK ERK 1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2; Abb. 4.9) und die transkriptionelle Induktion der Cyclooxygenase 2 (Cox-2) (Abb. 4.10-12) auf ihre AhR-Abhängigkeit untersucht. Die UVB-induzierte Phosphorylierung des EGFR-Zielmoleküls ERK 1/2 (Fisher, G. J. et al, 1998) wurde durch ein Ausschneiden der AhR-Signalkaskade antagonisiert. Analog dazu bestätigten die Ergebnisse der UVB-induzierten Cox-2 mRNA- und Proteinexpression (Fisher, G. J. et al, 1998; Buckman, S. Y. et al, 1998; Soriani, M. et al, 1999), dass Blockierung oder Abwesenheit des AhR sich in einer verringerten Expression manifestieren. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung der AhR-Signalkaskade essentiell für die UVB-induzierte Aktivierung des EGFR und nachfolgender Zielmoleküle ist.

Die Aktivierung von MAPK durch den EGFR ist für UVB-induzierte Entzündungen der Haut und die Photokarzinogenese relevant (Katsanakis, K. D. et al, 2002a; Katsanakis, K. D. et al, 2002b; Bode, A. M. & Dong, Z., 2003; El Abaseri, T. B. et al, 2005; Bourcier, C. et al, 2006). Durch die UV-induzierte Aktivierung der MAPK kommt es zu einer transkriptionell erhöhten Expression an Cox-2, dem Schlüsselenzym in der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen (Buckman, S. Y. et al, 1998; Ashida, M. et al, 2003). Seine Inhibierung reduziert die Bildung von UV-induzierten Hauttumoren (Pentland, A. P. et al, 1999).

Der Mechanismus der UV-medierte Cox-2-Induktion ist unklar, jedoch haben frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die TCDD-medierte COX-2-Induktion *in vivo* AhR-abhängig ist (Vogel, C. et al, 1998). Diese Induktion ist jedoch unabhängig

von AhR-bindenden Elementen (XRE) im COX-2-Promoter. Möglicherweise ist die Cox-2-Induktion Folge der AhR-abhängigen Aktivierung durch UVB.

Für die UVB-induzierte EGFR-Aktivierung, sowie die ERK 1/2-Phosphorylierung und die Expression von Cox-2 konnte bisher gezeigt werden, dass sie durch Polyphenole wie EGCG gehemmt werden kann (Peng, G. et al, 2006; Hong, J. et al, 2001; Kundu, J. K. et al, 2003; Sah, J. F. et al, 2004; Hussain, T. et al, 2005; Shimizu, M. et al, 2005; Masuda, M. et al, 2001; Katiyar, S. K. et al, 2001). Da EGCG jedoch pleiotrope Auswirkungen in der Zellkultur zeigt, kann man nur spekulieren, ob die Hemmung auf antioxidative oder AhR-blockierende Eigenschaften (Palermo, C. M. et al, 2003) zurückzuführen ist.

Der Mechanismus der EGFR-Aktivierung nach UVB ist unbekannt. Man vermutet, dass durch Phosphorylierung des EGFR an Tyrosinresten (Miller, C. C. et al, 1994) die Adapterproteine Grb2 (growthfactor receptor-bound protein 2) und Shc (src-homology 2 domain containing) an den Rezeptor binden und so die Ras-Raf-MEK-MAPK-Signalkaskade initiieren.

Im Gegensatz dazu verliefen im Rahmen dieser Arbeit die Studien mit UVB negativ (Abb. 4.13). Unterstützt werden diese Ergebnisse von der Arbeitsgruppe um Oksvold, die zeigen konnten, dass der EGFR nach UVB-Bestrahlung unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors oder der Tyrosinkinase-Aktivität internalisieren kann (Oksvold, M. P. et al, 2002).

Weitere Studien mit dem EGFR-Kinase-Inhibitor Tyrphostin weisen jedoch darauf hin, dass der EGFR an der UVB-Signaltransduktion beteiligt ist (Abb. 4.14). Eine Erklärung dafür wäre die Phosphorylierung des EGFR an Threonin- oder Serinresten statt an Tyrosinresten (Sunada, H. et al, 1990). Ob Threonin- oder Serinreste des EGFR nach UVB-Bestrahlung phosphoryliert werden oder ob es möglicherweise zu einer schnellen Aktivierung von Phosphatasen kommt, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3 Die src-Kinase mediiert die UVB-induzierte EGFR-Aktivierung

Die Signalübertragung vom AhR auf den EGFR ist ungeklärt. Es gibt mehrere Hinweise in der Literatur, dass die Tyrosin-Kinase c-src an der Signalübertragung beteiligt ist. c-src wurde bereits 1996 als ein Bestandteil des zytosolischen AhR-Multiproteinkomplex identifiziert (Enan, E. & Matsumura, F., 1996). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte, dass c-src verantwortlich ist für die TCDD-induzierte EGFR-Aktivierung (Enan, E. et al, 1998). In den Rattenleberepithelzellen WB-F344 konnte eine TCDD-mediierte Translokation von c-src vom Zytosol zur Zellmembran mit einer subsequenten Aktivierung des EGFR belegt werden (Kohle, C. et al, 1999). Blockierung der Abdissoziation der Heatshockprotein 90 (Hsp90)-assoziierten c-src durch Geldanamycin resultierte in einer verminderten Translokation.

Es zeigte sich (Abb. 4.15-18), dass nicht nur die EGFR-Internalisierung nach UVB durch den src-Kinase-Inhibitor PP2 blockiert wird, sondern auch die UVB-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung und Cox-2-Induktion.

Basierend auf diesen Daten lässt sich folgende Hypothese ableiten: Nach UVB-Aktivierung zerfällt der AhR-Multiproteinkomplex, wodurch die c-src freigesetzt wird. Das aktivierte Enzym phosphoryliert und nachfolgend aktiviert den EGFR. Inhibierung von c-src müsste dieser Vermutung zufolge also Auswirkungen auf die Internalisierung des EGFR, die Phosphorylierung von ERK 1/2 und die Induktion von Cox-2 haben.

Für ERK 1/2 konnte von Kitagawa demonstriert werden, dass die UV-induzierte ERK 1/2-Aktivierung durch PP2 gehemmt wird (Kitagawa, D. et al, 2002). Die Rolle von c-src bei der TCDD-mediierten Induktion von Cox-2 konnte durch Untersuchungen mit Knockout-Mäusen belegt werden. In der Leber dieser Tiere war die TCDD-mediierte Induktion blockiert (Vogel, C. et al, 2000).

5.4 Der Nachweis von FICZ als endogener Ligand des AhR

Die bisherigen Untersuchungen belegen, dass die UVB-induzierte AhR-Aktivierung liganden-abhängig ist. Es gelang in dieser Arbeit erstmals, das Chromophor und den intrazellulären Liganden nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Tryptophan das Chromophor ist und 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazol (FICZ) der intrazellulär gebildete Ligand.

Tryptophan-depletierte Zellen erwiesen sich als nicht in der Lage, die Cyp1A1- und Cox-2-Expression nach UVB zu induzieren (Abb. 4.19, 21). Ebenso verringerte sich die Internalisierung des EGFR (Abb. 4.20). Wurde Tryptophan intrazellulär angereichert, waren die Induktionen stärker ausgeprägt. Diese Ergebnisse werden durch Wei et al (1999) bestätigt, die zeigen konnten, dass sich die UVB-induzierte Cyp1A1-Expression in Gegenwart von Tryptophan erhöht.

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis der intrazellulären Bildung von FICZ aus freiem Tryptophan. Die HPLC-MS-MS-Analyse der vor der Bestrahlung depletierten und anschließend mit $^{13}\text{C}_{11}^{15}\text{N}_2$ -Tryptophan inkubierten Zellen zeigte, dass UVB-Bestrahlung *in vivo* zur Generierung von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markiertem FICZ führt. Die Konzentration lag im unterem pikomolaren Bereich (Abb. 4.22).

Mit diesem Ergebnis konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Photoprodukt FICZ in die endogene AhR-Aktivierung involviert ist und die UVB-induzierte Aktivierung des AhR initiiert.

Ein Kandidat als UVB-Chromophor war Tryptophan (Trp), das als heterozyklische Aminosäure mit eine der am stärksten UVB-absorbierenden Aminosäuren ist (Creed, D., 1984). Bereits vor 30 Jahren wurde in Publikationen spekuliert, dass UV-Bestrahlung von Tryptophan-enthaltenem Zellkulturmedium eine Induktion der AHH-Aktivität zur Folge haben (Paine, A. J., 1976; Paine, A. J. & Francis, J. E., 1980). 1987 gelang es der Arbeitsgruppe von Rannug zwei Tryptophan-Photoprodukte zu identifizieren, die eine hohe AhR-Bindeaffinität in Leberzytosol-Präparationen aus Ratten aufwiesen (Rannug, A. et al, 1987; Rannug, U. et al, 1995). 1995 wurde das Photoprodukt FICZ erstmals als AhR-Ligand identifiziert (Rannug, U. et al, 1995). Die in kompetitiven Ligandenbindungsstudien gemessene AhR-Bindungsaffinität war 10x höher als TCDD.

Der Mechanismus der FICZ-Generierung ist nicht im Detail bekannt, es wird aber angenommen, dass Indol-3-Acetaldehyd (IAAld) eine Zwischenstufe in der FICZ-Generierung ist (Saito, I. et al, 1984). Dabei müsste Tryptophan durch die Photoreaktion einer Desaminierung sowie einer Decarboxylierung unterzogen werden. Aufgrund seiner Instabilität konnte der Metabolit bisher nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass das durch weitere Oxidation gebildete α -Hydroxyacetaldehyd (Narumiya, S. et al, 1979) zu FICZ kondensiert (Rannug, U. et al, 1995).

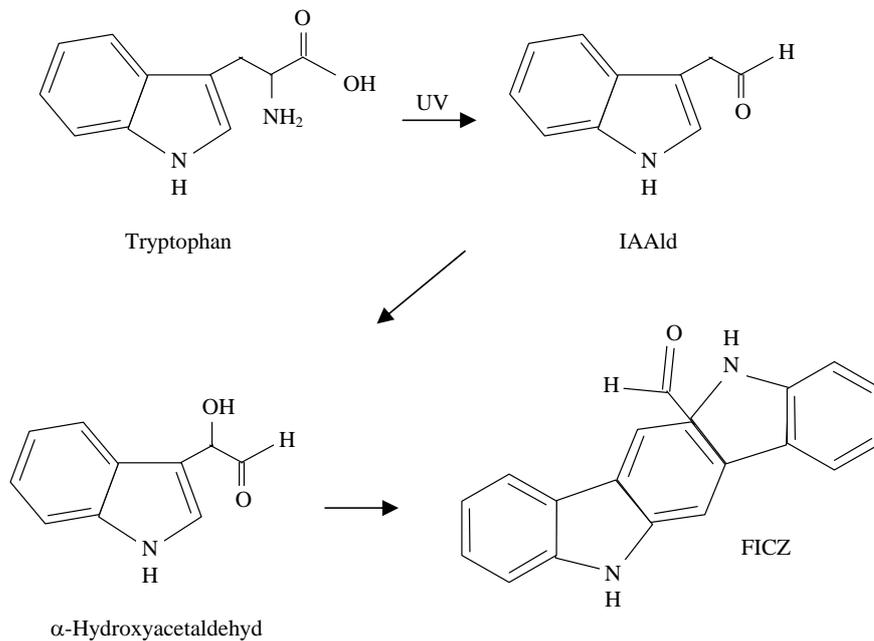


Abb. 5.1: Möglicher Mechanismus zur Generierung von FICZ durch UVB

5.5 FICZ imitiert die UVB-induzierte Signaltransduktion

Um die Rolle von FICZ als UVB-generierter endogener AhR-Ligand weiter zu belegen, wurde in HaCaTs untersucht, ob FICZ die gleichen zellulären Antworten wie UVB hervorruft und darüber hinaus eine AhR-Abhängigkeit vorliegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass FICZ die Cyp1A1-Expression in HaCaTs erhöht und die Expression zudem AhR-abhängig ist (Abb. 4.23). Die Resultate stimmen mit anderen Arbeiten überein, worin eine FICZ-induzierte Cyp1A1-Expression in Maushepatomzellen (Wei, Y. D. et al, 2000) und C57BL/6J-Mäusen (Mukai, M. & Tischkau, S. A., 2006) ermittelt werden konnte.

Ferner verursachte FICZ eine AhR-abhängige Steigerung der Cox-2-Expression auf mRNA- und Proteinlevel (Abb. 4.24, 25) und wies dadurch auf die Involvierung von FICZ in die Membran-abhängige Signaltransduktion hin. Mittels PP2 konnte außerdem eine c-src-Abhängigkeit der FICZ-induzierten Cox-2-Expression ermittelt werden (Abb. 4.26).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass FICZ verantwortlich ist für die UVB-induzierte AhR-abhängige Signaltransduktion zum Zellkern und zur Zellmembran. Darüber hinaus imitiert die FICZ-induzierte Signaltransduktion die zelluläre Antwort, die nach UVB-Bestrahlung beobachtet wird. Das würde bedeuten, dass der AhR als zytoplasmatischer Sensor fungiert und die durch UVB initiierte Signaltransduktion via FICZ vom Zytoplasma zum Kern und zur Membran übermittelt.

5.6 Schlussfolgerung & Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das bisherige Modell von Rosette und Karin (1996) zur UVB-Aktivierung des EGFR erweitert werden, indem gezeigt wurde, dass ein Teil der UVB-Antwort im Zytoplasma beginnt und der EGFR-Aktivierung vorgeschaltet ist. Darüber hinaus wurde zum ersten Mal intrazellulär generiertes FICZ nachgewiesen und auf diese Weise belegt, dass der hochaffine AhR-Ligand FICZ intrazellulär nach UVB gebildet wird.

Die *in vivo*-Relevanz der UVB-medierten AhR-Aktivierung konnte durch Untersuchungen an AhR KO-Tieren belegt werden. Eine Bestrahlung der Tiere mit UVB resultierte in einer Hemmung der Cyp1A1 und Cox-2 mRNA-Induktion in der Haut (Fritsche et al, unveröffentlichte Daten).

UVB ist eine hochrelevante Umwelttoxine, da das Hautkrebsrisiko in den westlichen Industrieländern durch das Freizeitverhalten konstant zunimmt. Es wäre denkbar, durch Entwicklung nicht-toxischer AhR-Hemmer den beschriebenen Signalweg zu unterbrechen, um in die UVB-induzierte Photokarzinogenese präventiv einzugreifen.

6 Zusammenfassung

Seit der Entdeckung der ultravioletten Strahlung hat die UVB-Belastung des Menschen, bedingt durch anthropogene Einflüsse, zugenommen. Dies hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass in den westlichen Industrieländern das Risiko für maligne Erkrankungen der Haut stetig zugenommen hat. Bisher wurde angenommen, dass die UV-induzierten Signaltransduktionen im Zellkern und in der Membran initiiert werden. Während beim Zellkern die DNA das Chromophor für UVB darstellt, ist das Chromophor der UVB-induzierten Membraneffekte unbekannt. Am Beispiel von HaCaT-Zellen, die ein etabliertes *in vitro*-Modell der menschlichen Keratinozyten sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des AhR in der UVB-induzierten Signaltransduktion aufgeklärt werden.

Der ligandenabhängige Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener Gene des Fremdstoffmetabolismus kontrolliert. Die Bindung eines Liganden führt nach Dissoziation des Multiproteinkomplexes zu einer nuklearen Translokation des AhR. Dort heterodimerisiert der Rezeptor mit ARNT (AhR Nuklear Transporter), bindet an xenobiotisch-responsible Elemente der DNA und aktiviert so die Transkription verschiedener Gene des Fremdstoffmetabolismus, wie Cytochrom P450 (Cyp) 1A1.

Im Rahmen der Arbeit wurden mRNA- und Proteinexpressionen mittels RT-PCR und Western Blot untersucht. Lokalisation des AhR und EGFR wurden durch transiente Transfektionen bzw. immunozytochemische Studien visualisiert. Des Weiteren wurden AhR Knockout-Zellen generiert, um die AhR-Abhängigkeit der UVB-induzierten Signaltransduktion belegen zu können. Zum Nachweis der intrazellulären Bildung des AhR-Liganden FICZ durch UVB wurde die HPLC-MS-MS benutzt.

Bestrahlung von immortalisierten Keratinozyten in einer physiologisch relevanten UVB-Dosis zeigte einen Anstieg in der Cyp1A1- und EGFR (epidermaler

Wachstumsfaktor-Rezeptor)-kontrollierten Cyclooxygenase 2 (Cox-2)-Expression. Durch Behandlung mit dem spezifischen AhR-Inhibitor 3-Methoxy-4-nitroflavon (MNF) und Generierung von AhR Knockout (KO)-Zellen konnte die AhR-Abhängigkeit bewiesen werden. Immunozytochemische Analysen haben gezeigt, dass UVB-Bestrahlung zu einer Internalisierung des EGFR führt. Die Aktivierung der EGFR-Kinaseaktivität wurde zusätzlich durch eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1&2) nachgewiesen. Beide UVB-induzierten Effekte konnten durch MNF-Behandlung oder AhR KO blockiert werden.

Als Verbindungsglied zwischen dem AhR- und EGFR-Signalweg wurde die Tyrosinkinase c-src postuliert, die durch Aktivierung des AhR vom AhR-Multiproteinkomplex freigesetzt wird. Experimente mit c-src KO-Mäusen haben gezeigt, dass die Induktion von Cox-2 nach AhR-Aktivierung c-src-abhängig ist. Aufbauend auf dieser Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden, dass der src-Kinase-Inhibitor PP2 die UVB-induzierte EGFR-Internalisierung, Erk1/2-Phosphorylierung und Cox-2-Expression hemmt.

Das Tryptophan-Photoprodukt mit der stärksten AhR-Affinität ist 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), welches ebenfalls eine Cyp1A1-Induktion verursacht, bisher jedoch nicht intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Mittels HPLC-MS-MS-Analysen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung zu einer *in-vivo* Generierung von FICZ im unterem pikomolaren Bereich führt.

In der Arbeit konnte demonstriert werden, dass das Zytoplasma neben Kern und Zellmembran ein wichtiges Target der UVB-Wirkung ist. Das Zielmolekül ist der AhR über den nukleare und Membraneffekte vermittelt werden. Es gelang erstmals, das Tryptophanprodukt FICZ als einen endogenen Liganden des AhR nachzuweisen. Eine Hemmung der AhR-Signalkaskade durch spezifische, nicht toxische Liganden könnte präventiv das UVB-medierte Tumorrisiko vermindern.

7 Literatur

1. Amati, B. (2001) Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat.Cell Biol.* **3** (5), E112-E113
2. Ananthaswamy, H. N. & Pierceall, W. E. (1990) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol* **52** (6), 1119-1136
3. Aragane, Y., Kulms, D., Metzger, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J.Cell Biol.* **140** (1), 171-182
4. Ashida, M., Bito, T., Budiyo, 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** (4), 445-452
5. Bergander, L., Wahlstrom, N., Alsberg, T., Bergman, J., Rannug, A., and Rannug, U. (2003) Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR. *Drug Metab Dispos.* **31** (2), 233-241
6. 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** (2-3), 151-164
7. Berneburg, M., Plettenberg, H., and Krutmann, J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol.Photoimmunol.Photomed.* **16** (6), 239-244
8. Bode, A. M. & Dong, Z. (2003) Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci.STKE.* **2003** (167), RE2
9. Borgerson, K. L., Bretz, J. D., and Baker, J. R., Jr. (1999) The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* **30** (4), 251-264

10. Bourcier, C., Jacquel, A., Hess, J., Peyrottes, I., Angel, P., Hofman, P., Auberger, P., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2006) p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **66** (5), 2700-2707
11. Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H., and Scharffetter-Kochanek, K. (1996) Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol* **64** (5), 877-885
12. Buchanan, D. L., Ohsako, S., Tohyama, C., Cooke, P. S., and Iguchi, T. (2002) Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor-beta expression. *Toxicol.Sci.* **66** (1), 62-68
13. 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** (5), 723-729
14. Cesarini, J. P. (1988) Photo-induced events in the human melanocytic system: photoaggression and photoprotection. *Pigment Cell Res.* **1** (4), 223-233
15. Cesarini, J. P. & Msika, P. (1995) Photoprotection from UV-induced and melanin introduced in sunscreens. In: *Melanin:Its role in human photoprotection* , 239-244
16. Chang, C. Y. & Puga, A. (1998) Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol.Cell Biol.* **18** (1), 525-535
17. Choi, E. J., Toscano, D. G., Ryan, J. A., Riedel, N., and Toscano, W. A., Jr. (1991) Dioxin induces transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *J Biol.Chem.* **266** (15), 9591-9597
18. Clydesdale, G. J., Dandie, G. W., and Muller, H. K. (2001) Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol.Cell Biol.* **79** (6), 547-568

19. Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J* **326** (Pt 1), 1-16
20. Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97** (7), 3260-3265
21. Creed, D. (1984) The Photophysics and Photochemistry of the Near-UV Absorbing Amino-Acids. I: Tryptophan and Its Simple Derivatives. *Photochemistry and Photobiology* **39** (4), 537-562
22. Czarnetzki, B., Kerl, H., and Sterry, W. (1992) *Dermatologie und Venerologie*
23. Dang, C. V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol.Cell Biol.* **19** (1), 1-11
24. De Gruijl, F. R., Sterenborg, H. J., Forbes, P. D., Davies, R. E., Cole, C., Kelfkens, G., van Weelden, H., Slaper, H., and van der Leun, J. C. (1993) Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Res.* **53** (1), 53-60
25. Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J. A., and Karin, M. (1993) NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261** (5127), 1442-1445
26. DKFZ, Heidelberg. www.dkfz.de
27. El Abaseri, T. B., Fuhrman, J., Trempus, C., Shendrik, I., Tennant, R. W., and Hansen, L. A. (2005) Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* **65** (9), 3958-3965
28. Elmetts, C. A., Bergstresser, P. R., Tigelaar, R. E., Wood, P. J., and Streilein, J. W. (1983) Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp.Med.* **158** (3), 781-794

-
29. Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **184** (1), 246-253
 30. Enan, E. & Matsumura, F. (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem.Pharmacol.* **52** (10), 1599-1612
 31. Enan, E., El Sabeawy, F., Scott, M., Overstreet, J., and Lasley, B. (1998) Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **151** (2), 283-293
 32. Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* **17** (9), 1115-1129
 33. Fiedler, H. (1996) Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment. *Chemosphere* **32** (1), 55-64
 34. Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li, X., Wan, Y., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1998) Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J.Clin.Invest* **101** (6), 1432-1440
 35. Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L., Hogsett, W. E., and Tingey, D. T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Arch.Biochem.Biophys.* **262** (1), 266-272
 36. Fujii-Kuriyama, Y. & Mimura, J. (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **338** (1), 311-317
 37. Gasparro, F. P., Mitchnick, M., and Nash, J. F. (1998) A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem.Photobiol.* **68** (3), 243-256

-
38. Ge, N. L. & Elferink, C. J. (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol.Chem.* **273** (35), 22708-22713
 39. Gensler, H. L., Timmermann, B. N., Valcic, S., Wachter, G. A., Dorr, R., Dvorakova, K., and Alberts, D. S. (1996) Prevention of photocarcinogenesis by topical administration of pure epigallocatechin gallate isolated from green tea. *Nutr.Cancer* **26** (3), 325-335
 40. Goerz, G., Merk, H., Bolsen, K., Tsambaos, D., and Berger, H. (1983) Influence of chronic UV-light exposure on hepatic and cutaneous monooxygenases. *Experientia* **39** (4), 385-386
 41. Goerz, G., Barnstorf, W., Winnekendonk, G., Bolsen, K., Fritsch, C., Kalka, K., and Tsambaos, D. (1996) Influence of UVA and UVB irradiation on hepatic and cutaneous P450 isoenzymes. *Arch.Dermatol.Res.* **289** (1), 46-51
 42. Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., and Liu, E. T. (2000) Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res.* **60** (21), 5922-5928
 43. Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., and Perera, S. A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** (25), 13743-13748
 44. Hankinson, O., Andersen, R. D., Birren, B. W., Sander, F., Negishi, M., and Nebert, D. W. (1985) Mutations affecting the regulation of transcription of the cytochrome P1-450 gene in the mouse Hepa-1 cell line. *J Biol.Chem.* **260** (3), 1790-1795
 45. Henry, E. C., Kende, A. S., Rucci, G., Totleben, M. J., Willey, J. J., Dertinger, S. D., Pollenz, R. S., Jones, J. P., and Gasiewicz, T. A. (1999) Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. *Mol.Pharmacol.* **55** (4), 716-725

46. Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**, 954-958
47. Holick, M. F. (1985) The photobiology of vitamin D and its consequences for humans. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **453**, 1-13
48. Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., and Harris, C. C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* **24** (1), 141-146
49. Hong, J., Smith, T. J., Ho, C. T., August, D. A., and Yang, C. S. (2001) Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem.Pharmacol.* **62** (9), 1175-1183
50. Huang, P., Ceccatelli, S., and Rannug, A. (2002) A study on diurnal mRNA expression of CYP1A1, AHR, ARNT, and PER2 in rat pituitary and liver. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11** (2), 119-126
51. Hussain, T., Gupta, S., Adhami, V. M., and Mukhtar, H. (2005) Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int.J.Cancer* **113** (4), 660-669
52. Hussein, M. R. (2005) Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan.Pathol.* **32** (3), 191-205
53. Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., and Kawajiri, K. (1998) Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol.Chem.* **273** (5), 2895-2904
54. Isaac, D. D. & Andrew, D. J. (1996) Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the tracheless gene product. *Genes Dev.* **10** (1), 103-117
55. 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** (2), 328-333

-
56. Katiyar, S. K., Afaq, F., Azizuddin, K., and Mukhtar, H. (2001) Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **176** (2), 110-117
 57. Katsanakis, K. D., Gorgoulis, V., Papavassiliou, A. G., and Zoumpourlis, V. K. (2002a) The progression in the mouse skin carcinogenesis model correlates with ERK1/2 signaling. *Mol.Med.* **8** (10), 624-637
 58. Katsanakis, K. D., Owen, C., and Zoumpourlis, V. (2002b) JNK and ERK signaling pathways in multistage mouse carcinogenesis: studies in the inhibition of signaling cascades as a means to understand their in vivo biological role. *Anticancer Res.* **22** (2A), 755-759
 59. Kawaguchi, Y., Tanaka, H., Okada, T., Konishi, H., Takahashi, M., Ito, M., and Asai, J. (1996) The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch.Dermatol.Res.* **288** (1), 39-44
 60. Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2000) The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol.Chem.* **275** (52), 41317-41324
 61. Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2001) The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol.Cell Biol.* **21** (7), 2594-2607
 62. Kim, S. T. & Sancar, A. (1993) Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem Photobio* **57** (5), 895-904
 63. Kitagawa, D., Tanemura, S., Ohata, S., Shimizu, N., Seo, J., Nishitai, G., Watanabe, T., Nakagawa, K., Kishimoto, H., Wada, T., Tezuka, T., Yamamoto, T., Nishina, H., and Katada, T. (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor

- receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J.Biol.Chem.* **277** (1), 366-371
64. Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997) CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem.(Tokyo)* **122** (4), 703-710
65. 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** (3), 152-158
66. Koivukangas, V., Kallioinen, M., Autio-Harminen, H., and Oikarinen, A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm.Venereol.* **74** (4), 279-282
67. Kolgen, W., Both, H., van Weelden, H., Guikers, K. L., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knol, E. F., van Vloten, W. A., and De Gruijl, F. R. (2002) Epidermal langerhans cell depletion after artificial ultraviolet B irradiation of human skin in vivo: apoptosis versus migration. *J Invest Dermatol.* **118** (5), 812-817
68. Kolluri, S. K., Weiss, C., Koff, A., and Gottlicher, M. (1999) p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev.* **13** (13), 1742-1753
69. Kripke, M. L. (1986) Immunology and photocarcinogenesis. New light on an old problem. *J Am.Acad.Dermatol.* **14** (1), 149-155
70. Kubbutat, M. H. & Vousden, K. H. (1998) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol.Med.Today* **4** (6), 250-256
71. Kulms, D., Poppelmann, B., Yarosh, D., Luger, T. A., Krutmann, J., and Schwarz, T. (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** (14), 7974-7979
72. Kundu, J. K., Na, H. K., Chun, K. S., Kim, Y. K., Lee, S. J., Lee, S. S., Lee, O. S., Sim, Y. C., and Surh, Y. J. (2003) Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 ex-

- pression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *J.Nutr.* **133** (11 Suppl 1), 3805S-3810S
73. Lademann, J., Weigmann, H. J., Meffert, H., and Sterry, W. (2000) Sonnenschutz - ein heißes Thema. *Humboldt Spektrum* **3**, 4-8
74. LaPres, J. J., Glover, E., Dunham, E. E., Bunger, M. K., and Bradfield, C. A. (2000) ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J Biol.Chem.* **275** (9), 6153-6159
75. Lawrence, B. P. & Kerkvliet, N. I. (1998) Role of altered arachidonic acid metabolism in 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced immune suppression in C57Bl/6 mice. *Toxicol.Sci.* **42** (1), 13-22
76. Leverkus, M., Yaar, M., and Gilchrist, B. A. (1997) Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp.Cell Res.* **232** (2), 255-262
77. Ley, R. D., Peak, M. J., and Lyon, L. L. (1983) Induction of pyrimidine dimers in epidermal DNA of hairless mice by UVB: an action spectrum. *J.Invest Dermatol.* **80** (3), 188-191
78. Li, A. & Blow, J. J. (2001) The origin of CDK regulation. *Nat.Cell Biol.* **3** (8), E182-E184
79. Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Singh, R. P., Agarwal, C., and Agarwal, R. (2004) Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Res.* **64** (17), 6349-6356
80. Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol.Cell Biol.* **4** (9), 1689-1694
81. Masuda, M., Suzui, M., and Weinstein, I. B. (2001) Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin.Cancer Res.* **7** (12), 4220-4229

-
82. Meek, D. W. (1998) Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal.* **10** (3), 159-166
 83. Meyer, B. K. & Perdew, G. H. (1999) Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry* **38** (28), 8907-8917
 84. Miller, C. C., Hale, P., and Pentland, A. P. (1994) Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. *J.Biol.Chem.* **269** (5), 3529-3533
 85. Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13** (1), 20-25
 86. Moan, J. & Peak, M. J. (1989) Effects of UV radiation of cells. *J Photochem Photobiol B* **4** (1), 21-34
 87. Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69** (7), 1237-1245
 88. Mukai, M. & Tischkau, S. A. (2006) Effects of Tryptophan Photoproducts in the Circadian Timing System: Searching for a Physiological Role for Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol.Sci.* [Epub ahead of print]
 89. Mukhtar, H., DelTito, B. J., Jr., Matgouranis, P. M., Das, M., Asokan, P., and Bickers, D. R. (1986) Additive effects of ultraviolet B and crude coal tar on cutaneous carcinogen metabolism: possible relevance to the tumorigenicity of the Goeckerman regimen. *J.Invest Dermatol.* **87** (3), 348-353
 90. Muller-Decker, K., Scholz, K., Marks, F., and Furstenberger, G. (1995) Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol.Carcinog.* **12** (1), 31-41

-
91. Narumiya, S., Takai, K., Tokuyama, T., Noda, Y., Ushiro, H., and Hayaishi, O. (1979) A new metabolic pathway of tryptophan initiated by tryptophan side chain oxidase. *J.Biol.Chem.* **254** (15), 7007-7015
 92. Nebert, D. W. & Gonzalez, F. J. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu.Rev.Biochem.* **56**, 945-993
 93. Nishigori, C., Hattori, Y., Arima, Y., and Miyachi, Y. (2003) Photoaging and oxidative stress. *Exp.Dermatol.* **12 Suppl 2**, 18-21
 94. Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., and Kato, S. (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* **423** (6939), 545-550
 95. Oksvold, M. P., Huitfeldt, H. S., Ostvold, A. C., and Skarpen, E. (2002) UV induces tyrosine kinase-independent internalisation and endosome arrest of the EGF receptor. *J.Cell Sci.* **115** (Pt 4), 793-803
 96. Paigen, B., Ward, E., Reilly, A., Houten, L., Gurtoo, H. L., Minowada, J., Steenland, K., Havens, M. B., and Sartori, P. (1981) Seasonal variation of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human lymphocytes. *Cancer Res.* **41** (7), 2757-2761
 97. Paine, A. J. (1976) Induction of benzo[a]pyrene mono-oxygenase in liver cell culture by the photochemical generation of active oxygen species. Evidence for the involvement of singlet oxygen and the formation of a stable inducing intermediate. *Biochem.J* **158** (1), 109-117
 98. Paine, A. J. & Francis, J. E. (1980) The induction of benzo[a]pyrene-3-mono-oxygenase by singlet oxygen in liver cell culture is mediated by oxidation products of histidine. *Chem.Biol.Interact.* **30** (3), 343-353
 99. Palermo, C. M., Hernando, J. I., Dertinger, S. D., Kende, A. S., and Gasiewicz, T. A. (2003) Identification of potential aryl hydrocarbon receptor antagonists in green tea. *Chem.Res.Toxicol.* **16** (7), 865-872

100. Pei, X. H. & Xiong, Y. (2005) Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* **24** (17), 2787-2795
101. Peng, G., Dixon, D. A., Muga, S. J., Smith, T. J., and Wargovich, M. J. (2006) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol.Carcinog.* **45** (5), 309-319
102. Pentland, A. P., Schoggins, J. W., Scott, G. A., Khan, K. N., and Han, R. (1999) Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* **20** (10), 1939-1944
103. Peus, D., Vasa, R. A., Meves, A., Pott, M., Beyerle, A., Squillace, K., and Pittelkow, M. R. (1998) H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* **110** (6), 966-971
104. Plewka, A., Czekaj, P., Kaminski, M., and Plewka, D. (1992) Circadian changes of cytochrome P-450-dependent monooxygenase system in the rat liver. *Pol.J Pharmacol.Pharm.* **44** (6), 655-661
105. Poland, A., Glover, E., and Kende, A. S. (1976) Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J.Biol.Chem.* **251** (16), 4936-4946
106. Puga, A., Nebert, D. W., and Carrier, F. (1992) Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol.* **11** (4), 269-281
107. 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** (12), 1287-1296
108. Rannug, A., Rannug, U., Rosenkranz, H. S., Winqvist, L., Westerholm, R., Agurell, E., and Grafstrom, A. K. (1987) Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J.Biol.Chem.* **262** (32), 15422-15427

-
109. 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** (12), 841-845
 110. RayChaudhuri, B., Nebert, D. W., and Puga, A. (1990) The murine Cyp1a-1 gene negatively regulates its own transcription and that of other members of the aromatic hydrocarbon-responsive [Ah] gene battery. *Mol.Endocrinol.* **4** (12), 1773-1781
 111. Riley, P. A. (1994) Photopigmentation. In Jori, G., Pottier, R.H., Rodgers, M.A.J., Truscott, T.G.: *Photobiology in Medicine.NATO ASI Series A: Lief Sciences* **272**, 99-112
 112. Roblin, S., Okey, A. B., and Harper, P. A. (2004) AH receptor antagonist inhibits constitutive CYP1A1 and CYP1B1 expression in rat BP8 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **317** (1), 142-148
 113. Rosenstein, B. S. & Mitchell, D. L. (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem.Photobiol.* **45** (6), 775-780
 114. Rosette, C. & Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274** (5290), 1194-1197
 115. Rowlands, J. C. & Gustafsson, J. A. (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev.Toxicol.* **27** (2), 109-134
 116. Safe, S. & Krishnan, V. (1995) Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch.Toxicol.Suppl* **17**, 99-115
 117. Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., and McDougal, A. (1998) Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol.Lett.* **102-103**, 343-347
 118. Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol.Lett.* **120** (1-3), 1-7

119. Sah, J. F., Balasubramanian, S., Eckert, R. L., and Rorke, E. A. (2004) Epigallocatechin-3-gallate inhibits epidermal growth factor receptor signaling pathway. Evidence for direct inhibition of ERK1/2 and AKT kinases. *J.Biol.Chem.* **279** (13), 12755-12762
120. Saito, I., Sugiyama, H., and Matsuura, T. (1984) Photochemical reaction between tryptophan and thymine. *Tetrahedron Letters* **25** (30), 3243-3246
121. Sancar, A. & Tang, M. S. (1993) Nucleotide excision repair. *Photochem Photobiol* **57** (5), 905-921
122. Sanchez, Y. & Elledge, S. J. (1995) Stopped for repairs. *Bioessays* **17** (6), 545-548
123. Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R. L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., and Hla, T. (1995) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **55** (17), 3785-3789
124. Sato, H., Suzuki, J. S., Tanaka, M., Ogiso, M., Tohyama, C., and Kobayashi, S. (1997) Gene expression in skin tumors induced in hairless mice by chronic exposure to ultraviolet B irradiation. *Photochem Photobiol* **65** (5), 908-914
125. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17** (6), 1675-1687
126. Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Schothorst, A., Goerz, G., Krieg, T., and Plewig, G. (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch.Dermatol.Res.* **283** (8), 506-511
127. Schmidt, R. F. & Unsicker, K. (2003) *Lehrbuch Vorklinik*
128. Schrenk, D. (1998) Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem.Pharmacol.* **55** (8), 1155-1162
129. Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001)

- The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res.* **29** (2), 397-406
130. Seger, R. & Krebs, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9** (9), 726-735
131. Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B., and Liebermann, D. (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9** (6), 1791-1798
132. Shiizaki, K., Ohsako, S., Koyama, T., Nagata, R., Yonemoto, J., and Tohyama, C. (2005) Lack of CYP1A1 expression is involved in unresponsiveness of the human hepatoma cell line SK-HEP-1 to dioxin. *Toxicol.Lett.* **160** (1), 22-33
133. Shimizu, M., Deguchi, A., Joe, A. K., Mckoy, J. F., Moriwaki, H., and Weinstein, I. B. (2005) EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *J.Exp.Ther.Oncol.* **5** (1), 69-78
134. Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W., and Ullrich, S. E. (1998) A cytokine cascade including prostaglandin E-2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *Journal of Immunology* **160** (8), 3783-3789
135. Singh, S. S., Hord, N. G., and Perdew, G. H. (1996) Characterization of the activated form of the aryl hydrocarbon receptor in the nucleus of HeLa cells in the absence of exogenous ligand. *Arch.Biochem.Biophys.* **329** (1), 47-55
136. Sogawa, K., Nakano, R., Kobayashi, A., Kikuchi, Y., Ohe, N., Matsushita, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1995) Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** (6), 1936-1940
137. Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. (1997) Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem.(Tokyo)* **122** (6), 1075-1079
138. Soriani, M., Luscher, P., and Tyrrell, R. M. (1999) Direct and indirect modulation of ornithine decarboxylase and cyclooxygenase by UVB radiation in human skin cells. *Carcinogenesis* **20** (4), 727-732

-
139. Stevaux, O. & Dyson, N. J. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr.Opin.Cell Biol.* **14** (6), 684-691
140. Strahlenschutzkommission. (1998) Schutz des Menschen vor solarer UV-Strahlung. *Empfehlungen und Stellungnahmen der Strahlenschutzkommission* Nr. **4**
141. Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J. T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B. B., and Dannenberg, A. J. (1996) Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **56** (19), 4424-4429
142. Sunada, H., Yu, P., Peacock, J. S., and Mendelsohn, J. (1990) Modulation of tyrosine, serine, and threonine phosphorylation and intracellular processing of the epidermal growth factor receptor by antireceptor monoclonal antibody. *J.Cell Physiol* **142** (2), 284-292
143. Swanson, H. I., Chan, W. K., and Bradfield, C. A. (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol.Chem.* **270** (44), 26292-26302
144. Tauchi, M., Hida, A., Negishi, T., Katsuoka, F., Noda, S., Mimura, J., Hosoya, T., Yanaka, A., Aburatani, H., Fujii-Kuriyama, Y., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2005) Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol.Cell Biol.* **25** (21), 9360-9368
145. Taylor, B. L. & Zhulin, I. B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63** (2), 479-506
146. Tuominen, R., Warholm, M., Moller, L., and Rannug, A. (2003) Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ.Res.* **93** (2), 138-148
147. Villard, P. H., Sampol, E., Elkaim, J. L., Puyou, F., Casanova, D., Seree, E., Durand, A., and Lacarelle, B. (2002) Increase of CYP1B1 transcription in human keratinocytes and HaCaT cells after UV-B exposure. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **178** (3), 137-143

148. 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** (2), 265-271
149. 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** (12), 2267-2274
150. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** (12), 5510-5514
151. 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** (2), 127-140
152. Wei, Y. D., Bergander, L., Rannug, U., and Rannug, A. (2000) Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Arch.Biochem.Biophys.* **383** (1), 99-107
153. Weiss, C., Kolluri, S. K., Kiefer, F., and Gottlicher, M. (1996) Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp.Cell Res.* **226** (1), 154-163
154. Weiss, J. M., Renkl, A. C., Denfeld, R. W., de Roche, R., Spitzlei, M., Schopf, E., and Simon, J. C. (1995) Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur.J Immunol.* **25** (10), 2858-2862
155. Williams, S. N., Shih, H., Guenette, D. K., Brackney, W., Denison, M. S., Pickwell, G. V., and Quattrochi, L. C. (2000) Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chem.Biol.Interact.* **128** (3), 211-229
156. Wiznerowicz, M. & Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J.Virol.* **77** (16), 8957-8961

-
157. Wörner, W. & Schrenk, D. (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses apoptosis and leads to hyperphosphorylation of p53 in rat hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **6** (4), 239-247
158. 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** (3), 823-830
159. 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. *Oncogene* **24** (53), 7869-7881

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Josef Abel für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die umfassende Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Frank Wunderlich danke ich dafür, dass er als Koreferent zur Verfügung steht und die fakultätsübergreifende Betreuung ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ellen Fritsche für ihre jederzeit gewährte Unterstützung. Ohne ihre Hilfe hätten diese zwei Buchstaben ihren Weg zu meinem Namen wohl nur sehr schwierig gefunden.

Herrn Dr. Thorsten Bernsmann, sowie Herrn Prof. Helmut Hanenberg und Frau Melanie Wurm danke ich für ihre Kooperation, die einige Ergebnisse überhaupt erst möglich gemacht haben.

Ich möchte ebenfalls den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen danken. Ulrike Hübenthal danke ich für ihre technische Unterstützung, sowie Maria Soufi, die in Western Blot-Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus gilt mein Dank besonders meiner Laborkollegin Michaela Moors für unzählige Spaziergänge zu Kaiser's.

Allen Mitarbeitern des Instituts für umweltmedizinische Forschung danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, besonders Christian Calles für die umfangreiche Hilfe bei den ERK-Western Blots und Hossein Hajimiragha für die Bestimmung der Tryptophan-Konzentrationen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Meinem Freund Kai danke ich von ganzem Herzen für seine moralische Unterstützung und die Geduld, mit der er manchen Ausbruch an schlechter Laune ertragen hat.

Eidesstattliche Erklärung

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

(Claudia Schäfer)

Düsseldorf, den 13. Dezember 2006