

Die Rolle des Transkriptionsfaktor HIF-1 bei der strahlungsbedingten Hautschädigung und Signaltransduktion in Hautzellen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Kevin Sondenheimer
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Mai 2015

aus dem IUF-Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH
(Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

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

Referent: Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Vlada Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.15

*Meiner Freundin Katrin, meinen Eltern
und meiner Schwester Natascha, die immer zu mir gehalten haben,
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.*

Abkürzungsverzeichnis

6,4PP	6,4 Photoprodukt
Abb	Abbildung
°C	Grad Celsius
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNS	Komplementäre DNS
CE	<i>Cornified Envelope</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Cyclobutanpyrimidin-Dimer
CS	Cockayne Syndrom
CSA	Cockayne Syndrom Gruppe A
CSB	Cockayne Syndrom Gruppe B
Ct	<i>cycle threshold</i>
DDB	<i>damaged DNA-binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DPBS	Dulbeccos's PBS
ERCC-1	<i>Excision repair cross-complementation group-1</i>
FCS	Fötales Kälberserum
fw	vorwärts
g	Gramm

GGR	Globale Genom Reparatur
GLUT-1	Glucose Transporter-1
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histondeacetylase
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxie-responsives Element
IL	Interleukin
IR	Infrarot
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LOX	Lysyloxidase
mA	Milliampere
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
M-MLV	Moloney-Mausleukämievirus
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNS	Boten-RNS
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer

O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMFS	Phenylmehtylsulfonylfluorid
PFA	Paraformaldehyd
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rv	rückwärts
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxaminsäure
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	Transkriptions-gekoppelte Reparatur
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TTD	Trichothiodystrophie
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WB	Western Blot
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA-XPF	Xeroderma Pigmentosum group A-F

Zusammenfassung

Ultraviolette (UV) Strahlung, insbesondere der energiereichste Teil des solaren Spektrums, die UVB-Strahlung, gehört zu den wichtigsten Umweltfaktoren, die eine Schädigung der Haut, wie z.B. die Entwicklung von Hautkrebs und vorzeitiger Hautalterung, hervorrufen. Dies ist wesentlich bedingt durch die Fähigkeit von UVB-Strahlung direkte DNS-Schäden zu verursachen. Zellen haben zum Schutz vor exogenen und endogenen Noxen hochspezialisierte Kompensationsmechanismen entwickelt. Hierzu zählt die DNS-Reparatur. Eine funktionierende DNS-Reparatur ist essentiell für das Überleben der Zelle und die Vermeidung von Mutationen. Der Hypoxie-Induzierbare Faktor (HIF)-1 α ist ein wichtiger Regulator bei der zellulären Stressantwort und spielt besonders bei der Adaptation an Hypoxie eine große Rolle. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor auch in der Regulation der UVB-induzierten DNS-Reparatur von Bedeutung ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von HIF-1 in einem konditionalen Mausmodell, welches eine gezielte Deletion von HIF-1 α in den Keratinozyten der Oberhaut ermöglicht, bei der UVB-induzierten Stressantwort zu untersuchen. Darüber hinaus sollten neue Mechanismen in der Photokarzinogenese und der UV-induzierten Hautalterung aufgedeckt werden, die eine Beteiligung von HIF-1 α zeigen. In HIF-1 α profizienten murinen Keratinozyten konnte *in vitro* eine UVB-abhängige Stabilisierung von HIF-1 α nachgewiesen werden, die eine erhöhte mRNA- und Protein-Expression der DNS-Reparaturenzyme CSA, CSB, XPB und XPG zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu waren diese Reparaturproteine in HIF-1 α defizienten Zellen nicht verstärkt exprimiert und es zeigte sich eine deutlich verminderte UVB-induzierte CPD-Reparatur. In zwei *in vivo* Experimenten wurde ein bislang unbekannter HIF-1 α -spezifischer Einfluss auf die Pigmentierung und die Faltenbildung der Maushaut identifiziert. Eine die Keratinozyten betreffende Deletion von HIF-1 α führte zu einer erhöhten UVB-induzierten Pigmentierung, aber zu einer geringeren Faltenbildung. Zudem wiesen HIF-1 α defiziente Mäuse verstärkte UVB-induzierte Hautschäden auf. Es wurde eine verstärkte epidermale Hyperplasie, ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust und eine verstärkte Reduktion des subkutanen Fettgewebes beobachtet.

Die Entdeckung, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ein wichtiger Regulator in der UVB-induzierten DNS-Reparatur ist, könnte zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei der Photokarzinogenese beitragen. Zusätzliche durch HIF-1 α modulierte Signalwege bei der Melanogenese, der Faltenbildung und der strahlungsbedingten Hautschädigung lassen auf einen weitreichenden Einfluss dieses Transkriptionsfaktors in der Physiologie und Pathophysiologie der Haut schließen.

Summary

Ultraviolet (UV) radiation, especially the part of the solar spectrum with the highest energy, the UVB radiation, is the major environmental factor responsible for skin damage for example skin carcinogenesis and premature skin aging. This is mainly induced by the ability of UVB-radiation to cause direct DNA damage. Cells have developed highly specialized compensatory mechanisms including DNA repair to cope with exogenous and endogenous noxae. A functional DNA repair is essential for the cell survival and to avoid mutations. The hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is a major regulator of the cellular stress response and plays an important role especially in cellular adaptation to hypoxia. A few years ago, it was shown that this transcription factor is also involved in the regulation of the UVB-induced DNA repair.

The aim of this work was to investigate the function of HIF-1 in the UVB-induced stress response by the use of a conditional mouse model which allows a specific deletion of HIF-1 α in the keratinocytes of the epidermis. Moreover, new mechanisms of photocarcinogenesis and UV-induced skin aging should be revealed, showing the involvement of HIF-1 α . In HIF-1 α proficient murine keratinocytes a UVB-dependent stabilization of HIF-1 α was detected, which leads to an increased mRNA and protein expression of the DNA repair enzymes CSA, CSB, XPB and XPG. In contrast these repair proteins were not enhanced induced in HIF-1 α deficient cells which leads to a significantly decreased CPD-repair. In two *in vivo* experiments a previously unknown influence of HIF-1 α on the pigmentation and wrinkle formation of murine skin could be identified. A specific deletion of HIF-1 α in keratinocytes led to an enhanced UVB-induced pigmentation but results in a reduced wrinkle formation. In addition HIF-1 α deficient mice show several other UVB-induced changes of the skin including an enhanced epidermal hyperplasia, an increased loss of transepidermal water and an enhanced reduction of subcutaneous fat.

The detection of the transcription factor HIF-1 α as a regulator of the UVB-induced DNA repair can lead to development of new therapeutic strategies in photocarcinogenesis. Additional modulated HIF-1 α pathways in the melanogenesis, the wrinkle formation and the radiation-induced skin damage lead to the suggestion that this transcription factor has a wide influence on physiology and pathophysiology of the skin.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Aufbau und Funktion der Haut	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Epidermis	2
1.1.3	Dermis	3
1.2	Das solare Spektrum	3
1.3	UV-Strahlung und deren Wirkung auf die Haut	4
1.3.1	UV-induzierte DNS-Reparatur	6
1.3.2	Krankheitsbilder mit assoziierter NER-Defizienz	8
1.4	Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1)	10
1.4.1	Stabilisierung von HIF-1 α	11
1.4.2	Einfluss von HIF-1 α auf die Karzinogenese	12
1.5	Fragestellung	14
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Chemikalien	15
2.1.2	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	17
2.1.3	Puffer und Lösungen	17
2.1.4	Primersequenzen	20
2.1.5	Antikörper und Färbelösungen	21
2.1.6	Zubehör	22
2.1.7	Geräte	23
2.1.8	Computersoftware	24
2.2	Zellbiologische Methoden	24
2.2.1	Isolation von murinen Keratinozyten	24
2.2.2	Kultivierung muriner Keratinozyten	25
2.2.3	Kultivierung transformierter humaner CSB-defizienter Fibroblasten	25
2.3	Belastung der Zellen	25
2.3.1	UVB Bestrahlung der Zellen	25
2.3.2	Behandlung mit SAHA	26
2.4	<i>In vivo</i> Studien	26
2.4.1	Versuchstiere	26
2.4.2	Tierhaltung	27
2.4.3	UVB-Bestrahlung und Probenentnahme	27
2.4.4	Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)	27
2.5	Molekularbiologische Methoden	28
2.5.1	Isolation von DNS aus Schwanzbiopsien	28
2.5.2	Genotypisierung	28

2.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	31
2.5.4	Isolation von DNS aus kultivierten Zellen	31
2.5.5	Isolation von RNS aus kultivierten Zellen	31
2.5.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.5.7	South-Western-Slot Blot	32
2.5.8	Synthese komplementärer DNS (cDNS)	32
2.5.9	Quantitative Real Time PCR	33
2.6	Biochemische Methoden	34
2.6.1	Isolation von Proteinen aus kultivierten Zellen	34
2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
2.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	34
2.6.4	Western Blot	35
2.6.5	Immundetektion von Proteinen bzw. Nukleinsäuren	35
2.6.6	FACS-Analyse mit der Annexin V/Propidiumiodid-Färbung	35
2.7	Immunhistochemische Methoden	36
2.7.1	Präparation von Gewebe	36
2.7.2	Masson-Goldner Färbung von Paraffinschnitten	36
2.7.3	Fontana-Masson Färbung von Paraffinschnitten	36
2.8	Statistik	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Einfluss von HIF-1α auf die Expression von NER-relevanten Genen in murinen Keratinozyten	38
3.2	Einfluss von HIF-1α auf die UVB-induzierte Expression von p21 und MDM-2 in murinen Keratinozyten	40
3.3	UVB-abhängige Proteinstabilität von HIF-1α und die Auswirkung auf die Expression von NER-Proteinen	42
3.4.	Einfluss von HIF-1α auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in murinen Keratinozyten	44
3.5	Die Bedeutung von HIF-1α in der UVB-induzierten Photokarzinogenese in C57/Bl6 Mäusen	45
3.5.1	Bestrahlungsprotokoll	45
3.5.2	Aufzeichnung der Gewichtsentwicklung	46
3.5.3	Zeitliche fotografische Dokumentation der Versuchstiere	47
3.5.4	Masson Goldner-Färbung	50
3.5.5	Fontana Masson-Färbung	51
3.6	Die Bedeutung von HIF-1α in der UVB-induzierten Hautalterung in C57/Bl6 Mäusen	53
3.6.1	Bestrahlungsprotokoll	53
3.6.2	Zeitliche fotografische Dokumentation der Versuchstiere	54
3.6.3	Masson Goldner-Färbung	58
3.6.4	Fontana Masson-Färbung	59
3.7	Einfluss von SAHA auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in murinen CSB-defizienten Mauskeratinozyten	61

3.8	Einfluss von SAHA auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in humanen transformierten CSB-defizienten Fibroblasten	62
3.9	Einfluss von SAHA auf die UVB-induzierte Apoptose in humanen transformierten CSB-defizienten Fibroblasten	64
4.	DISKUSSION	66
4.1	Die Rolle von HIF-1α in der zellulären UVB-Antwort	67
4.2	Die Bedeutung von HIF-1α in der UVB-induzierten Photokarzinogenese und Hautalterung	70
4.3	Der Einfluss von SAHA bei der UVB-induzierten Zellschädigung in CSB-defizienten Hautzellen	74
5.	LITERATUR	78
6.	ANHANG	87

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

1.1.1 Allgemeines

Durchschnittlich beträgt die Fläche der Haut ca. eineinhalb bis zwei Quadratmeter. Sie ist somit das größte Organ des menschlichen Körpers. Obwohl ihre Dicke nur 1,5 bis 4 mm beträgt ist sie inklusive des Unterhautfettgewebes bis zu 15 kg schwer. Eine ihrer Hauptfunktionen ist die Ausbildung einer Barriere, die sowohl das Austrocknen des Körpers, als auch das Eindringen von exogenen Substanzen und pathogenen Keimen verhindert. Dadurch bietet die menschliche Haut Schutz vor chemischen, biologischen und physikalischen Einwirkungen. Weiterhin reguliert sie den Wasser-, Temperatur- und Elektrolythaushalt und spielt eine wichtige Rolle in der Vitamin D-Synthese.

In der Haut sind verschiedene Typen von Zellen eingebettet. Die Keratinozyten sind der in der Epidermis hauptsächlich vorkommende Zelltyp. Sie sind für die Produktion von Keratin verantwortlich und differenzieren im Laufe der Keratinisierung. Fibroblasten sind bewegliche, im Bindegewebe vorkommende Zellen. Sie sind von großer Bedeutung bei der Produktion der extrazellulären Matrix. Merkel- und Nervenzellen nehmen Druck, Temperatur und Schmerz wahr. Immunzellen, wie Langerhanszellen, dermale dendritische Zellen, Mastzellen und Makrophagen stellen eine direkte Verbindung zum Immunsystem her.

Im Allgemeinen ist die menschliche Haut in drei Schichten gegliedert: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Fettgewebe). In Abbildung 1 ist der Aufbau der Haut schematisch verdeutlicht.

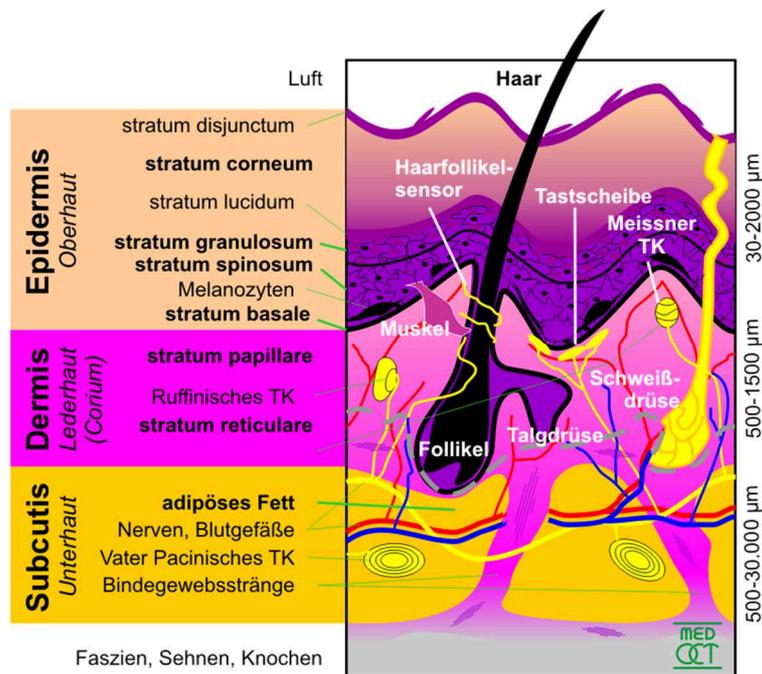


Abbildung 1: Aufbau der humanen Haut. Allgemeiner Aufbau der drei Hautschichten. Gegliedert in Epidermis, Dermis und Subcutis mit den dazugehörigen Substrukturen. Abbildung aus medOCT (medOCTgroup, 2006)

1.1.2 Epidermis

Die Epidermis bildet bei Wirbeltieren die äußerste Schicht der Haut. Sie ist ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel und wird in fünf Substrukturen unterteilt: Die Basalschicht (Stratum basale), die Stachelzellschicht (Stratum spinosum), die Körnerschicht (Stratum granulosum), die Glanzschicht (Stratum lucidum) und die Hornschicht (Stratum corneum). Mit nahezu 90 % bilden Keratinozyten die Hauptpopulation der Epidermiszellen. Nach ihrer Differenzierung aus epidermalen Stammzellen wandern die Zellen unter fortwährender weiterer Differenzierung bis ins stratum corneum, wo sie in Form von toten Keratinozyten ohne Organellen, angefüllt mit Keratin und umgeben von dem sogenannten Cornified Envelope (CE) die äußerste Hornschicht bilden (Chu, 2003). Neben Keratinozyten spielen besonders die pigmentbildenden Melanozyten und die immunkompetenten Langerhans-Zellen eine bedeutende Rolle. Das durch die Melanozyten synthetisierte und in Keratinozyten eingelagerte Pigment Melanin bietet aufgrund seiner starken Absorption im UV-Bereich (insbesondere UVB) einen speziellen Schutz vor energiereicher Strahlung. Eine direkte Verbindung zwischen den Keratinozyten wird durch sogenannte Desmosomen sichergestellt, interzellulärer Stoffaustausch erfolgt über „gap junctions“ (Fritsch, 1998).

1.1.3 Dermis

Die als Lederhaut bezeichnete Dermis ist das oberhalb der Subcutis gelegene Bindegewebe. Dieses ist durch hohe Elastizität und Reißfestigkeit charakterisiert. Neben ihrer Rolle bei der Verankerung und Versorgung der Epidermis, verfügt sie über viele exokrine Drüsen, bildet den Ursprung der Haarwurzeln und umfasst die meisten Sinneszellen (Fritsch, 1998). Mit ca. 75% ist der Hauptbestandteil der Dermis das Kollagen, welches das Grundgerüst der extrazellulären Matrix bildet. Hierin eingebettet sind die vom Mesenchym abstammenden spindelförmigen Fibroblasten, Zellen mit langen Fortsätzen, die in der Lage sind durch das dermale Gewebe zu migrieren (Chu, 2003) und über Integrine untereinander in Kontakt stehen (Hynes, 1992). Fibroblasten zeichnen eine hohe Synthesekapazität aus, da sie an der Neubildung von Strukturproteinen wie Kollagen und Elastin beteiligt sind. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix. Verantwortlich hierfür sind spezifische Proteasen, die Matrixmetalloproteasen (MMPs), die von den Fibroblasten synthetisiert und sezerniert werden können. Neben dem Abbau des Bindegewebes sind sie in viele physiologische und pathologische Prozesse, wie beispielsweise Wundheilung, Morphogenese, Angiogenese oder Metastasierung involviert. Neben Fibroblasten beinhaltet die Dermis auch dendritische Zellen, wie Mastzellen und Makrophagen. Mastzellen, die Botenstoffe wie Histamin und Heparin gespeichert haben, sind von großer Bedeutung bei der Wundheilung und der Abwehr von Pathogenen, sind aber auch für hypersensitive Hautreaktionen verantwortlich. Makrophagen gehören zu den Phagozyten und nehmen körperfremde Organismen oder Proteine, aber auch Abbaustoffe wie Melanin oder Fette auf und tragen somit ebenso zum Erhalt der normalen Hautstruktur und -funktion bei.

1.2 Das solare Spektrum

Die Gesamtheit aller elektromagnetischen Strahlung wird als elektromagnetisches Spektrum bezeichnet. Dieses reicht von kurzwelliger Gamma- und Röntgenstrahlung ($\lambda = 0,01\text{nm} - 10\text{nm}$) über mittelwelliges sichtbares Licht bis hin zu langwelliger Mikrowellen- und Radiostrahlung ($\lambda = 1\text{mm} - 10\text{km}$). Geschützt durch die Atmosphäre erreicht allerdings nur ein Teil die Erdoberfläche und damit die. Dieser Bereich, auch solares Spektrum genannt, besteht aus der ultravioletten (UV) Strahlung ($\lambda = 280\text{nm} - 400\text{nm}$), dem sichtbaren Licht (VIS; $\lambda = 400\text{nm} - 760\text{nm}$) und der Infrarotstrahlung (IR; $\lambda = 760\text{nm} - 1\text{mm}$). Hierbei wird die UV-Strahlung in UVA ($\lambda = 320\text{nm} - 400\text{nm}$) und UVB ($\lambda = 280\text{nm} -$

320nm), die Infrarotstrahlung in IRA ($\lambda = 760\text{nm} - 1440\text{nm}$), IRB ($\lambda = 1440\text{nm} - 3000\text{nm}$) und IRC ($\lambda = 3000\text{nm} - 1\text{mm}$) unterteilt (Abbildung 2).

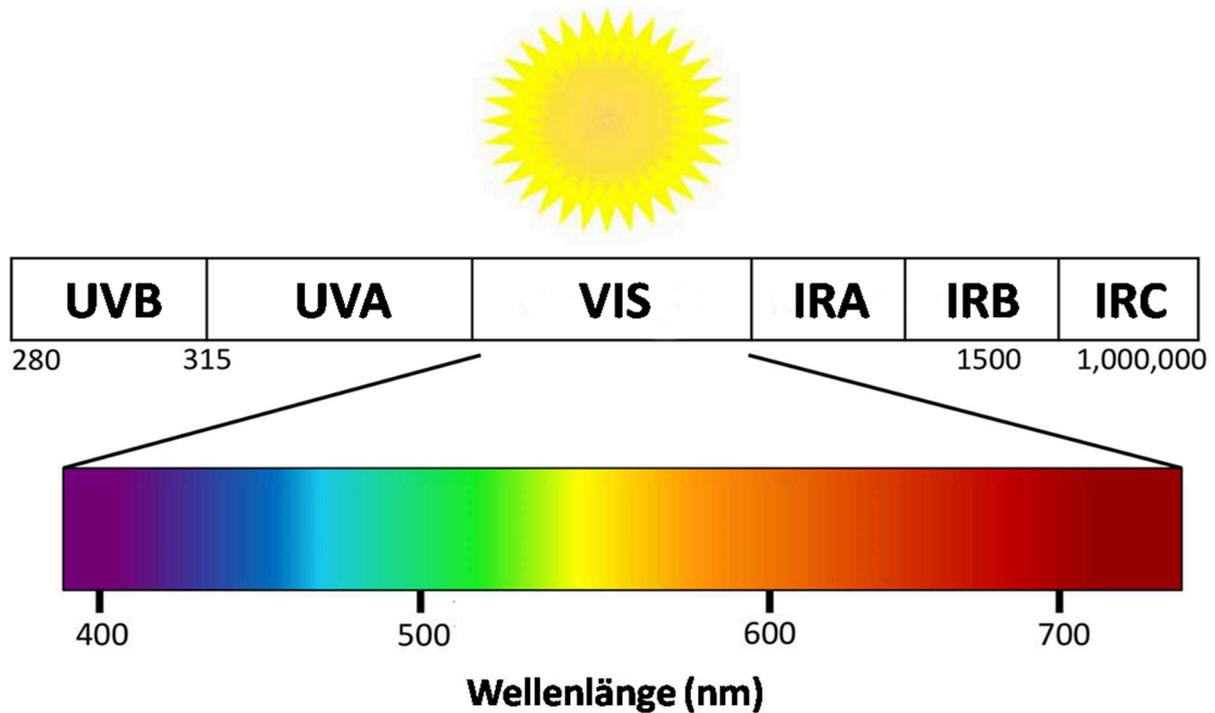


Abbildung 2: Darstellung des solaren Spektrums. Abgebildet ist der Wellenlängenbereich von 280nm – 400nm (UV) über das sichtbare Licht 400nm – 760nm bis hin zur Infrarotstrahlung 760nm – 1mm. Abbildung verändert nach Paskin et al. (2014).

Die Photonenenergie nimmt mit zunehmender Wellenlänge ab, d.h. IR-Strahlung ist wesentlich energieärmer als UV-Strahlung. Diese stellt, obwohl sie die höchste Energie pro Photon besitzt, mit 7% einen eher geringen Anteil an der Gesamtenergie dar. Im Gegensatz dazu ist IR-Strahlung für ca. die Hälfte der Strahlenbelastung verantwortlich, wobei alleine die energiereiche IR-A-Strahlung ca. 30% der Gesamtstrahlungsenergie ausmacht (Schroeder & Krutmann, 2009). Die genaue Zusammensetzung und die daraus entstehende Dosis wird von vielen Faktoren beeinflusst. Wichtig ist beispielsweise die Dichte der Ozonschicht, die Position der Sonne, der Breiten- bzw. Längengrad, die Bewölkung sowie auftretende Bodenreflexionen (Schroeder et al., 2008).

1.3 UV-Strahlung und deren Wirkung auf die Haut

In der Physiologie und Pathophysiologie der Haut spielt die Sonnenstrahlung eine wichtige Rolle. Sie reguliert die Vitamin D-Synthese, ist essentiell für den zirkadianen Rhythmus und beeinflusst über die Haut die Körpertemperatur. Eine Überdosierung, insbesondere der UV-Strahlung, kann allerdings zu

akut und chronisch pathologischen Effekten führen. Typische akute UV-induzierte Hautveränderungen sind Sonnenbrand, epidermale Hyperplasie, Immunsuppression und eine erhöhte Pigmentierung. Bei chronischer Exposition kann es letztendlich zu Hautalterung und Photokarzinogenese kommen (Sklar et al., 2013). Hierbei ist der Wirkmechanismus stark von der Wellenlänge der einwirkenden Strahlung abhängig. Die kurzwellige UVB-Strahlung wird bereits zum großen Teil durch die DNS in der Epidermis absorbiert. Infolgedessen entstehen sogenannte DNS-Photoaddukte, hauptsächlich in Form von Cyclobutanpyrimidin-Dimeren (CPD's; Merk et al., 2004) oder 6-4-Photoprodukten (6-4 PP; Cadet et al., 2004). Die energieärmere UVA-Strahlung hingegen kann durch die Epidermis bis in die Dermis penetrieren (Marrot und Meunier, 2008) und ebenso wie UVB-Strahlung die Bildung von CPD's hervorrufen, wenn auch mit geringerer Effizienz. Charakteristisch für UVA-Strahlung ist jedoch die Induktion oxidativer DNS-Schäden, die indirekt über die Bildung von ROS erfolgt (Pfeifer et al., 2005). Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die UVA-induzierte Entstehung von CPD's in Melanozyten nicht alleine durch einen direkten Strahlungseffekt zu erklären ist, sondern innerhalb der ersten 3-4h nach Bestrahlung konstant verläuft (Premi et al., 2015). Dies lässt vermuten, dass auch indirekte Mechanismen bei der Entstehung von DNS-Photoaddukten eine große Rolle spielen. Abbildung 3 zeigt die molekulare Basenmodifikation bei der Entstehung von CPD's und 6-4 PPs.

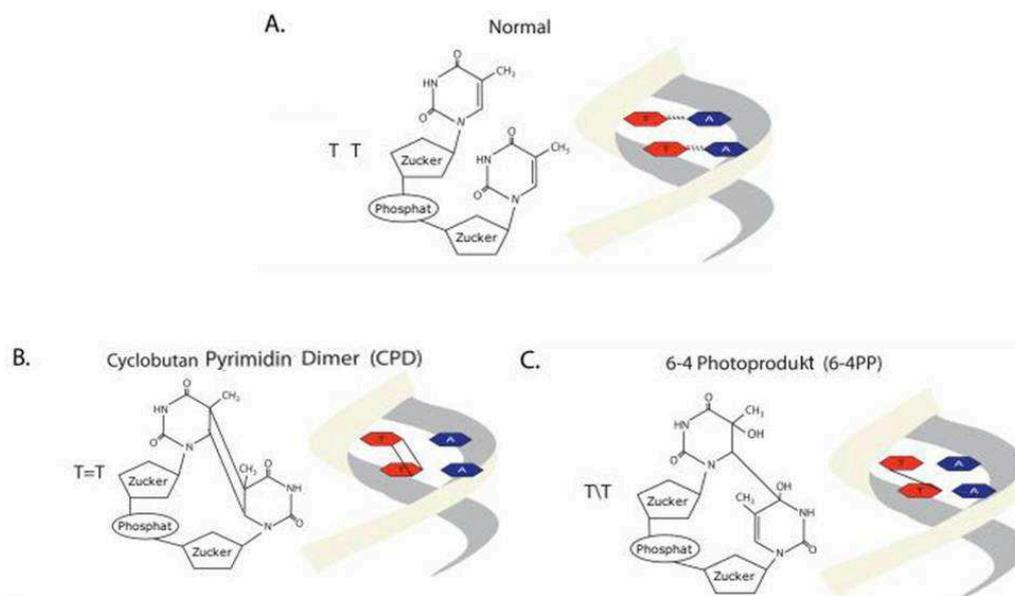


Abbildung 3: Chemischer Aufbau der DNS bei der Entstehung von Photoaddukten. Unbeschädigte DNS in der Basenpaarung Thymin-Thymin mit dem dazugehörigen Zucker-Phosphat Grundgerüst (A). Ausbildung einer Dimer Struktur verknüpft über ein Cyclobutan (CPD; B). Grundstruktur eines Photo-Dimer verknüpft über eine kovalente Bindung zweier Thymin-Basen (6,4 PP; C). Verändert nach Cadet et al.(2004).

Die oben gezeigte Ausbildung von CPD's erfolgt durch eine [2+2] Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidin-Basen, wobei eine Verknüpfung zweier Thymine die häufigste Form darstellt (Rumora et al., 2008). Im Falle des 6,4 PP bildet sich vorzugsweise eine kovalente Bindung zwischen zwei Cytosin-Basen bzw. einer Cytosin- und einer Thymin-Base aus (Pfeifer et al., 2005).

Solche DNS-Schäden können bei ausbleibender Reparatur zu manifestierten Mutationen werden. Betrifft diese DNS-Läsion Onkogene oder Tumorsuppressorgene kann es zur Hautkrebsentstehung kommen. So gilt die Bildung von CPD's als einer der wichtigsten Schritte in der Entstehung und Entwicklung von Hauttumoren, da direkte DNS-Addukte mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen bei UVB-induzierten Hauttumoren assoziiert werden (Brash und Ponten, 1998). Darüber hinaus beschrieben Berneburg und Krutmann im Jahr 2000, dass es eine kausale Verbindung zwischen diesen Dimeren und der UVB-vermittelten Immunsuppression gibt, welche bereits mutierten Zellen eine ungehinderte Proliferation erlaubt und somit das Wachstum und Progression des Tumors fördert.

Um eine Mutation bzw. Entartung der Zelle zu verhindern gibt es diverse Kontrollmechanismen. Nach einem detektierten DNS-Schaden stoppt die Zelle den Zellzyklus und initiiert die DNS-Reparatur. Ist das Ausmaß des Schadens zu hoch wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet. Die wichtigsten und in diesem Zusammenhang relevanten DNS-Reparaturmechanismen werden im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

1.3.1 UV-induzierte DNS-Reparatur

Die zelluläre DNS ist einer Vielzahl von endogenen und exogenen Noxen ausgesetzt, die zu direkten oder indirekten Schädigungen führen können. Neben elektromagnetischer Strahlung und chemischen Stoffen gibt es auch biologische Prozesse, die während oder abseits der DNS-Replikation, spontane Veränderungen bewirken. Die UV-induzierte Reparatur genomischer DNS wird generell in zwei Mechanismen unterteilt: Die Basenexzisionsreparatur (BER) und die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Hierbei ist die BER für die Entfernung von Basenmodifikationen, die durch Alkylierung, Oxidation und Einzelstrangbrüche zustande kommen, zuständig (Wallace, 2014). Auch die NER ist für die Reparatur von Basenmodifikationen zuständig. Hierbei spielen aber besonders die sogenannten "bulky adducts" (engl.: sterisch anspruchsvolle Addukte) eine große Rolle. Dies sind Helix-deformierende Strukturen, die durch viele chemische Substanzklassen ausgebildet werden können.

Typische Beispiele sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B.: Benzo[a]pyren) und Zytostatika (z.B: Cisplatin; Wood 1999; Schärer 2013). Neben dieser Form von Läsionen sind besonders die oben beschriebenen DNS-Photoaddukte von großer Bedeutung, die spezifisch von der NER repariert werden. In Abbildung 4 ist der Mechanismus der NER aufgezeigt.

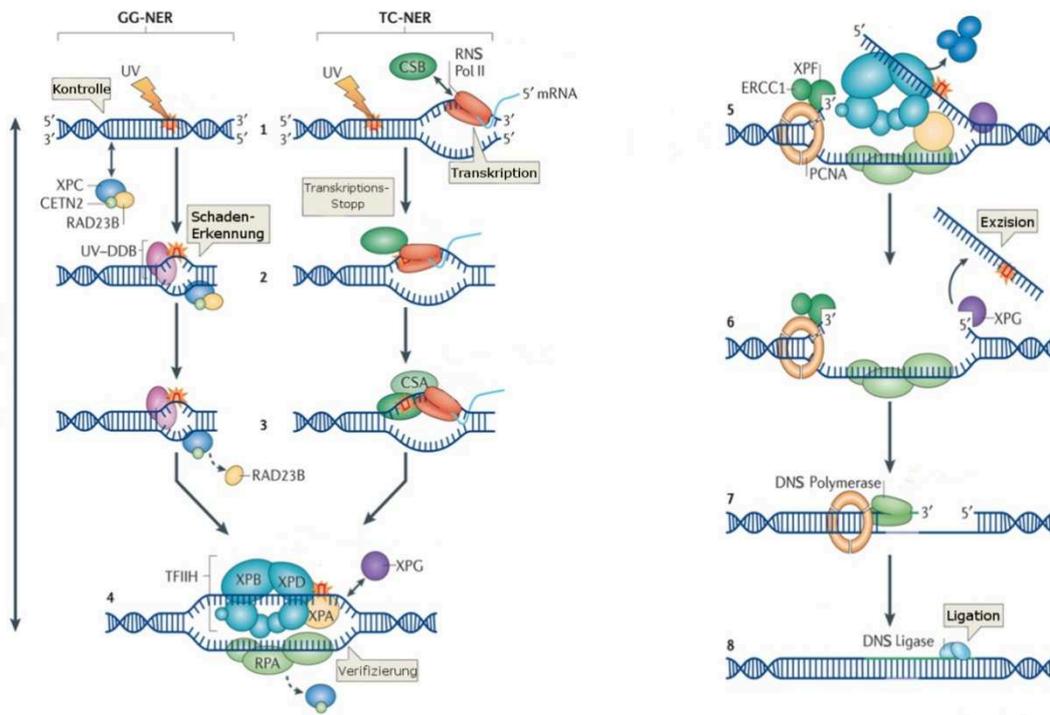


Abbildung 4: Der Mechanismus der NER schematisch dargestellt. Links: Modell der Detektion und Verifizierung des DNS Schadens mit den dazugehörigen Mechanismen und wichtigen Proteinen der GG-NER und TCR-NER. Rechts: Modell der Exzision, Polymerisation und Ligation. Abbildung verändert nach Marteiijn et al.(2014).

Das Verfahren der NER ist primär in zwei Teile gegliedert: Die Schadenserkenkung und die Entfernung der fehlerhaften Teile des DNS-Strangs mit anschließender Neusynthese. In Abhängigkeit von der Natur und Position des DNS-Schadens lassen sich hierbei zwei grundlegend verschiedene NER-Mechanismen unterscheiden, die als GGR (engl.: Global Genome Repair) und TCR (engl.: Transcription Coupled Repair) bezeichnet werden.

Wie bereits der Name andeutet, ist die Aufgabe der GGR die Detektion von Helix-Deformationen im gesamten Genom. Im ersten Schritt hat die Kontrolleinheit, bestehend aus XPC (engl.: Xeroderma Pigmentosum group C), RAD23B und centrin 2 (CETN 2), die Aufgabe den Schaden zu detektieren. Hierbei bindet der Komplex, ausgelöst durch die fehlerhafte Basenpaarung, an die Einzel-Strang DNS. Infolgedessen kommt es zu einer Anlagerung eines zweiten Enzyms, dem UV-DDB (engl.: ultra violet radiation-DNA damage-binding protein). Nach Abspaltung der RAD-23B Untereinheit kann die Schadensverifizierung eingeleitet werden.

Der Mechanismus der TCR beschränkt sich auf transkriptionsaktive DNS-Bereiche. Hierbei kommt es infolge des DNS-Schadens zu einer Blockade der RNS-Polymerase. Dies kann fatale Folgen haben, die von der Schädigung bis zum Absterben der betroffenen Zelle reichen können, sofern die Transkription nicht möglichst bald wieder aufgenommen werden kann. Da die GGR relativ langsam arbeitet, kann durch diesen Mechanismus nicht gewährleistet werden, dass der DNS-Schaden rechtzeitig repariert wird. Aus diesem Grund ist die TCR von essentieller Bedeutung bei der Reparatur derartiger Läsionen, da sie eine rasche Behebung des Schaden und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ermöglicht. Die Rekrutierung von CSB (Cockayne Syndrom Gruppe B) erlaubt eine Entfernung der RNS-Polymerase und die anschließende Anlagerung von CSA (Cockayne Syndrom Gruppe A) leitet die Verifizierung ein.

Die folgenden Schritte sind in beiden Reparaturmechanismen identisch. Nach Detektion und Registrierung des DNS-Schadens erfolgt eine Bindung des TFIIH-Faktors (engl. transcription initiation factor IIH), was zugleich zu einer Abspaltung des XPC- bzw. CS-Komplexes führt. Dieser Reparaturkomplex besteht aus zwei Helikase-Unterheiten, XPB (engl.: Xeroderma Pigmentosum group B) und XPD (engl.: Xeroderma Pigmentosum group D), die aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität zu einer weiteren Öffnung der DNS-Konfiguration führen (Marteijn et al., 2014). Neben TFIIH bindet XPA (engl.: Xeroderma Pigmentosum group A) an der DNS-Läsion, was wiederum zu einer Rekrutierung der Endonuklease XPG (engl.: Xeroderma Pigmentosum Group G) führt. Begleitet wird dieser Schritt von einer Abschirmung des gegenüberliegenden DNS-Strangs durch das Enzym RPA (engl.: replicationprotein A) und einer Anlagerung einer zweiten Endonuklease, dem Heterodimer XPF-ERCC-1 (engl.: Xeroderma Pigmentosum group F – Excision repair cross-complementation group-1). Im nächsten Schritt wird nun der fehlerhafte DNS-Abschnitt entfernt und es erfolgt eine Neusynthese über spezifische DNS-Polymerasen. Im abschließenden Schritt kommt es zu einer Verknüpfung der beiden DNS-Stränge über eine DNS-Ligase (Kamarthapu & Nudler, 2015; Iyama & Wilson, 2013; Marteijn et al., 2014).

1.3.2 Krankheitsbilder mit assoziierter NER-Defizienz

Die NER stellt einen hochspezifischen Reparaturmechanismus gegen eine Vielzahl endogener und exogener Agentien dar, an dem 30 unterschiedliche Enzyme beteiligt sind. Neben biologischen Faktoren und mutagenen Substanzen ist die elektromagnetische Strahlung, insbesondere die UV-Strahlung, von großer Bedeutung.

Eine fehlerhafte bzw. beeinträchtigte Funktion der DNS-Reparatur kann zu einer Reihe unterschiedlichster Krankheitsbilder führen. Hierzu zählen das Cockayne Syndrom (CS), Xeroderma Pigmentosum (XP), Trichothiodystrophie (TTD) und das UV-Sensitivitäts-Syndrom (UVSS; Moriwaki & Kraemer, 2001; Hosseini et al., 2015). Diese Krankheiten sind durch vererbare, autosomal rezessive genetische Defekte charakterisiert, welche unterschiedliche NER-Reparaturenzyme betreffen.

Die hierbei auftretenden Symptome haben eine große klinische Bandbreite. In milden Ausprägungen, wie beispielsweise dem UVSS, zeigen die Patienten eine vermehrte Erythembildung und Hautrockenheit an sonnenexponierten Stellen. In einigen Fällen kommt es darüber hinaus zu Teleangiektasien an Ohren und Nase mit einer erhöhten Neigung zu Sommersprossen (Spivak, 2005).

XP-Patienten hingegen zeigen eine deutlich intensivere Symptomatik. Bereits im Kindesalter kann es zu einer erhöhten Photosensitivität kommen, die durch starke Hautreaktionen sonnenexponierter Areale gekennzeichnet ist und von einer Lichtscheue (Photophobie) begleitet wird. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine erhöhte Pigmentierung (Hyperpigmentierung) mit zunehmender Schuppung (Xerosis cutis) der Haut an UV-exponierten Körperpartien. Zudem ist das Hautkrebsrisiko von XP-Patienten stark erhöht. Statistiken zufolge besteht eine 10.000-fach erhöhte Inzidenz für Basalzellen- und Plattenepithelkarzinome sowie ein 2.000-fach erhöhtes Risiko für das maligne Melanom. Der Verlauf der Krankheit und das damit verbundene Krankheitsbild ist allerdings stark von der Lebensweise der Erkrankten und der damit verbundenen Prävention abhängig, vor allem aber auch von der jeweiligen betroffenen Komplementationsgruppe (XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG und XPV) bzw. Mutation im entsprechenden Gen (Hosseini et al., 2015; DiGiovanna et al.; 2012). Neben den beschriebenen Hautsymptomen tritt bei 20-30 % der Erkrankten auch ein neurologischer Phänotyp auf (Komplementationsgruppen XPA, XPC, XPD, XPG), der nicht allein durch die Rolle des Proteins in der DNS-Reparatur erklärt werden kann, was darauf hindeutet, dass zumindest manche XP-Proteine noch andere Funktionen neben der DNS-Reparatur haben. Progressive, neuronale Degeneration, begleitet von Ataxie und Areflexie können die Folge sein. Neben Mikrozephalie kann auch eine Beeinträchtigung der Sehkraft auftreten (Lehmann et al.; 2011).

Ein anderes Bild zeigt sich beim Cockayne Syndrom. Das dermale Krankheitsbild ist hauptsächlich durch eine starke Photosensitivität geprägt, welcher eine zelluläre UV-Empfindlichkeit zu Grunde liegt. Kurze UV-Exposition führt hier bereits zu einer starken Erythembildung. Ältere Patienten zeigen zudem eine vermehrte Pigmentbildung in sonnenexponierten Arealen. Begleitet werden diese Symptome von einer verminderten Schweißsekretion (Anhidrose) und einer starken Atrophie, ausgelöst durch den Abbau von subkutanem Fettgewebe. Im Gegensatz zu XP ist bei CS-Patienten allerdings kein erhöhtes Hautkrebsrisiko beschrieben (Kraemer et al., 2007; Laugel, 2013). Die klassischen Merkmale des Syndroms beschreiben hauptsächlich den neurologischen Phänotyp. Die

Symptomatik ist geprägt von Kleinwuchs, starker mentaler Retardierung mit Mikrozephalie, Gangstörungen und Progerie-ähnlicher Anatomie (Ozdirim et al., 1996). Im Allgemeinen wird das Cockayne Syndrom in zwei Komplementationsgruppen unterteilt: Cockayne Syndrom Gruppe A (CSA) und Gruppe B (CSB; Tanaka et al.; 1981). Mutationen im CSB-Gen treten mit rund 80 % am häufigsten auf (Mallery et al., 1998).

1.4 Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1)

Die ausreichende Sauerstoffversorgung ist bei aeroben Organismen von entscheidender Bedeutung für Wachstum und das Aufrechterhalten gewebespezifischer Funktionen. Der O_2 -Partialdruck (pO_2) unterliegt jedoch gewissen Schwankungen im Körper und variiert zwischen verschiedenen Organen. So beträgt der pO_2 in der Epidermis beispielsweise nur 5 % des pO_2 in der Atemluft (Wang, 2003). Um die Funktion derartiger Gewebe aufrechtzuerhalten, gibt es zelluläre Mechanismen zur Anpassung an Sauerstoffmangel (Hypoxie). Semenza und Wang identifizierten mit dem Protein HIF-1 1992 den bedeutendsten Faktor. Bis heute sind zwei weitere Isoformen von HIF-1 α bekannt, die Proteine HIF-2 α und HIF-3 α . Ihre Funktion ist gewebespezifisch und spielt besonders im Endothel, der Niere und der Leber eine wichtige Rolle (Majmundar et al., 2010). Hypoxie ist allerdings auch von entscheidender Bedeutung bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie z.B. Gefäßkrankheiten, Lungenerkrankungen und der Krebsentstehung. Zusätzlich reduziert chronischer Sauerstoffmangel die Effektivität von Radio- und Chemotherapie und korreliert mit der systemischen Metastasierung. Intrazelluläre Hypoxie limitiert zunächst das Zellwachstum durch Inhibition der Proliferation und sorgt für einen verstärkten Zellzyklusarrest, was zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Vaupel et al., 2004). Ein chronischer Zustand kann aber zu erhöhtem Selektionsdruck führen, der die Entstehung von Hypoxie adaptierten Zellen begünstigt. Eine Folge sind entartete Zellen, die sauerstoffunabhängig proliferieren und daher eine Tumorprogression begünstigen (Graeber et al., 1996). Seit diesen Entdeckungen ist die Modulation von HIF-Transkriptionsfaktoren in der Arzneimitte- und insbesondere der Zytostatika-Entwicklung von großer Bedeutung.

1.4.1 Stabilisierung von HIF-1 α

Der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF-1 gehört zur großen Familie der bHLH-PAS (engl.: basic helix-loop-helix PER-ARNT-SIM) Proteine. Diese Gruppe von Enzymen reagiert auf äußere Umwelteinflüsse (z.B.: Polyaromatische Kohlenwasserstoffe) oder auf physiologische Signale (z.B.: Hypoxie, zirkadianer Rhythmus). Die bHLH-Domäne ist für die Bindung an die DNS verantwortlich, wobei die PAS-Domäne eine direkte Interaktion mit anderen Proteinen oder kleinen Molekülen erlaubt (Bersten et al., 2013). HIF-1 setzt sich zusammen aus einer konstitutiv exprimierten Untereinheit β (HIF-1 β bzw. ARNT) und einer sauerstoffsensitiven α -Untereinheit (HIF-1 α). Obwohl die Transkription und Synthese von HIF-1 α sauerstoffunabhängig ist, beträgt die Halbwertszeit unter normoxischen Bedingungen (Sauerstoffkonzentration über 5 %) nur ca. 5 min (Salceda und Caro, 1997). Dies führt zu einer Fe(II)-abhängigen Hydroxylierung der Prolinreste P402 und P564 über die Prolylhydroxylasen (PHD) 1-3. Dies dient im weiteren Verlauf als Erkennungssequenz für das tumorsuppressive von-Hippel-Lindau Protein (pVHL), welches ein Teil eines Ubiquitin E3 Ligase Komplexes ist. In einem mehrstufigen Prozess erfolgt eine Poly-Ubiquitinylierung, die das Protein für den nachfolgenden proteasomalen Abbau markiert (Ke und Costa, 2006). Mangelnde Sauerstoffversorgung führt zu einer Inhibition der PHD-vermittelten Hydroxylierung und letztendlich zu einer Stabilisierung von HIF-1 α . Mit Unterstützung diverser Co-Chaperone, wie z.B. HSP90 (Hitzeschockprotein 90), kommt es zu einer Translokation in den Nukleus und einer Dimerisierung mit ARNT (Fandrey et al., 2006). Hier bindet der Transkriptionsfaktor an regulatorische DNS-Sequenzen seiner Zielgene, den so genannten HRE's (Hypoxie-responsive Elemente). Diese DNS-Motive sind in der Promoter- oder Enhancer-Region HIF-relevanter Zielgene lokalisiert (Wenger et al., 2005). Zu den klassischen Hypoxie-vermittelten HIF-1 Zielgenen zählen der Vascular Endothelial Growth factor (VEGF), der eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt und der Glukose-Transporter-1 (GLUT-1; Semenza 1998; Wenger 2000). Es wird vermutet, dass der HIF-1 Transkriptionskomplex ca. 2-5% des gesamten humanen Genoms regulieren kann (Fandrey et al., 2006).

Neben der Sauerstoffkonzentration ist die Entstehung bzw. Reaktivität von ROS (engl.: reactive oxygen species) bedeutend für Stabilisierung von HIF-1 α . Eine unmittelbare Bildung von ROS, z.B. durch UVB induziert, kann zu einem sofortigen Abbau von HIF-1 α führen, der über die membranständige NADPH (Nicotinamidadeninukleotidphosphat)-Oxidase vermittelt wird. Hierbei ist der Mechanismus der Hydroxylierung ungeklärt, der zu einer Anlagerung des pVHL führt und den anschließenden proteasomalen Abbau zur Folge hat. Eine verzögerte ROS-Entwicklung nach UVB-Bestrahlung allerdings, die grundlegend mitochondrial gesteuert wird, kann zu einer Akkumulation von HIF-1 α führen. Somit ist UVB-Strahlung in der Lage, HIF-1 α zu stabilisieren und den

entsprechenden Signalweg zu aktivieren. Es wird vermutet, dass infolge der mitochondrialen ROS-Generierung JNK's (C-Jun-N-terminale Kinasen) gesteuert werden, die wiederum zu einer Inhibition von PHD's führen. Darüber hinaus zeigt sich eine Aktivierung der p38 MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase), was zu einer Phosphorylierung von HIF-1 α führt, welche eine Translokation in den Nukleus begünstigt (Rezvani et al., 2007; Kietzmann et al., 2003; Bell et al., 2005). Dieser Mechanismus lässt auf eine UV-induzierte biphasische ROS-vermittelte Regulation des Proteins schließen.

1.4.2 Einfluss von HIF-1 α auf die Karzinogenese

In den letzten Jahren wurde Hypoxie als eine der wichtigsten Eigenschaften maligner Tumore identifiziert. Dieser Zustand spielt eine entscheidende Rolle in verschiedenen zellulären Mechanismen und Signalwegen, die sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von großer Bedeutung sind. Dazu zählen Zellproliferation, Angiogenese, Immunüberwachung, Stoffwechsel und Metastasierung (Ruan et al., 2009). Der bedeutendste Faktor für die Anpassung an Hypoxie ist HIF-1. Seit der Entdeckung dieses Transkriptionsfaktors steht seine Modulation im Zentrum der Entwicklung von Krebstherapien. Erhöhte Proteinkonzentrationen von HIF-1 α sind in einer großen Bandbreite von Tumoren bekannt. Hierzu zählen unter anderem Gebärmutterhals-, Lungen-, Brust- und Eierstockkrebs (Semenza, 2003). Diese Situation muss bei Hautkrebs allerdings differenzierter betrachtet werden. Es ist beschrieben, dass in vielen Melanomen eine erhöhte Expression von HIF-1 α und HIF-2 α , die wiederum auf eine erhöhte VEGF-Konzentration schließen lässt, detektiert wird. Dieser Befund geht mit einer verminderten Überlebensrate des Patienten einher (Nys et al., 2011). In hypoxischen Melanom-Arealen sind ebenfalls erhöhte Proteinlevel von anti-apoptotischem BCL-2 (engl.: B-cell lymphoma 2) detektierbar. Es wird vermutet, dass BCL-2 zu einer erhöhten HIF-1 α Stabilität beiträgt. Dies führt zu einer schnelleren Tumorprogression und kann zu einer erhöhten Therapieresistenz beitragen (Patel et al., 2009; Neckers und Ivy, 2003). Studien an Plattenepithelkarzinomen zeigten ein anderes Bild. In einem mehrstufigen Hautkrebsmodell in FVB/n Mäusen mit einer erhöhten HIF-1 α Aktivität in Keratinozyten wurde ein verlangsamtes Wachstum der Tumore beobachtet. Diese wiesen eine geringere Proliferationsrate, sowie eine beeinträchtigte maligne Progression auf (Scortegagna et al., 2009).

In humanen Keratinozyten zeigte sich, dass HIF-1 α für die Expression wichtiger DNS-Reparaturenzyme verantwortlich ist. Nach UVB-Bestrahlung stellte sich heraus, dass die beiden

Enzyme XPC und XPD sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene HIF-1-spezifisch reguliert werden (Rezvani et al., 2009).

Diese Forschungsergebnisse deuten potenziell auf eine zellspezifische Funktion von HIF-1 α in der Photokarzinogenese hin. Jedoch mangelt es an Studien, die die Rolle von HIF-1 bei der Entstehung/Progression strahlungsbedingter Tumoren näher untersuchen. Insbesondere die Durchführung von *in vivo*-Studien würde hierbei wertvolle Hinweise bei der Untersuchung dieser Fragestellung liefern.

1.5 Fragestellung

Es ist wissenschaftlich belegt, dass UV-Strahlung der größte Risikofaktor für viele Hautkrebsarten ist. Allerdings ist nach heutigem Stand der Forschung die zelluläre Stressreaktion auf diese physikalischen Stimuli nur unvollständig bekannt. Eine bedeutende Rolle in der zellulären Antwort spielen hierbei Kompensationsmechanismen, wobei DNS-Reparaturmechanismen, insbesondere die Nukleotid-Exzisions Reparatur, zu den Wichtigsten zählen. Essentielle, in der NER involvierte Proteine, werden über Transkriptionsfaktoren gesteuert. Einer dieser Transkriptionsfaktoren, der sowohl in der DNS-Reparatur, als auch in der Krebsentstehung von entscheidender Bedeutung ist, ist der Hypoxie-induzierte Faktor. Die Rolle von HIF-1 bei der strahlungsbedingten Hautschädigung, der dadurch induzierten DNS-Reparatur und der Signaltransduktion in Hautzellen, ist allerdings weitestgehend ungeklärt.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) Welchen Einfluss hat Ultraviolett-B Strahlung auf die Stabilität bzw. Aktivität von HIF-1 im murinen Keratinozytenmodell? Welche UVB-induzierten zellulären Signalwege werden hierbei durch HIF-1 α beeinflusst? Welche Rolle spielt HIF-1 α in der DNS-Reparatur, insbesondere der NER?
- 2) Welche Auswirkung hat die konditionelle HIF-1 α Defizienz in Keratinozyten im Mausmodell? Kommt es hierbei zu einer gestörten UV-Antwort?
- 3) Welche Bedeutung hat HIF-1 auf die UVB- induzierte Photokarzinogenese bzw. Hautalterung im Mausmodell?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
Acrylamid 30 %	Applichem / Darmstadt
Agarose	Invitrogen / Carlsbad, USA
Antibiotika / Antimykotika (100x)	Invitrogen / Carlsbad, USA
APS	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
BPE	CellnTec / Bern, Schweiz
Bromphenolblau	Merck / Darmstadt
BSA Albumin Fraktion V	Carl Roth / Karlsruhe
CaCl ₂	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
CitiFluor	Citifluor / London, UK
DAPI	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
DEPC	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
DirectPCR-Tail	Peqlab / Erlangen
DMEM High Glucose	PAA Laboratories / Pasching, Österreich
DMSO	Carl Roth / Karlsruhe
DNS-Molekulargewichtsmarker X	Roche / Basel, Schweiz
DNase I	Promega / Madison, USA
DNase Puffer I	Promega / Madison, USA
DPBS	Invitrogen / Carlsbad, USA
DTT	Carl Roth / Karlsruhe
EDTA	Merck / Darmstadt
Ethanol	Carl Roth / Karlsruhe
FCS	Invitrogen / Carlsbad, USA
GelRed (10.000x)	Biotium / Hayward, USA
GoTaq Polymerase	Promega / Madison, USA
GoTaqReaktionspuffer (5x)	Promega / Madison, USA

HCl	Carl Roth / Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth / Karlsruhe
Keratinocytenmedium (CnT 57)	CellnTec / Bern, Schweiz
KCl	Carl Roth / Karlsruhe
L-Glutamin (100x)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Meerrettich-Peroxidase Substrat-Lösung	Biozym / Hessisch Oldendorf
Methanol	Carl Roth / Karlsruhe
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Milchpulver	Carl Roth / Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega / Madison, USA
NaCl	Carl Roth / Karlsruhe
Paraffin Paraplast Plus	McCormick Richmond, USA
PCR Nucleotide Mix	Promega / Madison, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth / Karlsruhe
PMSF	Applichem / Darmstadt
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
Precision Plus Protein Standard	BioRad / Hercules, USA
Primer	Operon / Köln
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
Proteinase K (20µg/ml)	Qiagen / Hilden
Random Hexamer Primer (100 ng/µl)	Promega / Madison, USA
rRNasin	Promega / Madison, USA
RotiQuant Bradford Reagenz	Carl Roth / Karlsruhe
SAHA (engl.: suberoylanilide hydroxamic acid)	Cayman Chemical Company / Michigan, USA
SDS	Carl Roth / Karlsruhe
Stop Solution	Promega / Madison, USA
SYBR Green	Invitrogen / Carlsbad, USA
TEMED	Carl Roth / Karlsruhe
Thermolysin	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
Tris	Carl Roth / Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich / St-Louis, USA
TRIzol	Invitrogen / Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	Invitrogen / Carlsbad, USA
Tween-20	Carl Roth / Karlsruhe
Xylol	Carl Roth / Karlsruhe

2.1.2 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Nährmedium für primäre transformierte Fibroblasten

500 ml DMEM High Glucose
1 % Antibiotika / Antimykotika
1 % L-Glutamin
10 % FCS

Nährmedium für primäre murine Keratinozyten (CnT 57)

Das Medium wurde nach Anweisung des Herstellers zusammensetzt

500 ml CnT Basal Medium
1x Antibiotika / Antimykotika
1x Zusatzstoff A
1x Zusatzstoff B
1x Zusatzstoff C
1x BPE

2.1.3 Puffer und Lösungen

1x PBS pH 7,4

0,9 mM CaCl_2
0,5 mM MgCl_2
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
137,9 mM NaCl
8,1 mM Na_2HPO_4

4% PFA-Lösung

4 %	Paraformaldehyd
0,02 M	Na ₂ HPO ₄ PH 7,0
5 %	Succrose

1x RIPA

1%	NONIDENT
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
50 mM	Tris-HCl pH 8,0
0,5 %	Desoxycholat

6x SDS-Auftragspuffer

0,35 mM	Tris / HCl pH6,8
10 %	SDS
33 %	Glycerin
0,6 M	DTT
0,01 %	Bromphenolblau

1x TAE

40 mM	Tris
20 mM	Acetat
1 mM	EDTA

1x TBS pH7,6 (WB)

50 mM	Tris
150 mM	NaCl

1x TE

10 mM	Tris / HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

Thermolysin-Puffer

10 mM	HEPES
142 mM	NaCl
6,7 mM	NaOH
1 mM	CaCl ₂
0,05 %	Gentamicin
13 µM	Thermolysin

1x Transferpuffer

50 mM	Tris
40 mM	Glycin
0,037 %	SDS
20 %	Methanol

1x Tris-Glycin-Puffer (Laemmli-Puffer)

0,2 M	Glycin
0,02M	Tris
0,1 %	SDS

1x TBS (SW)

10 mM	Tris
150 mM	NaCl

2.1.4 Primersequenzen

CSB	FW	5'-gctgtggtcactcttcgact-3'
CSB	RV	5'-ggcaaaataagacctgctca-3'
CSA	FW	5'-accaagcactgtctggtagc-3'
CSA	RV	5'-ccgttaactttcccattgtg-3'
XPA	FW	5'-gctcccaaatgattgacac-3'
XPA	RV	5'-tcttcacaaggaacctgagc-3'
XPB	FW	5'-aggaggaggaggaagagaca-3'
XPB	RV	5'-ccacaggaagaacaatgac-3'
XPC	FW	5'-actgtcaacgctgacctttc-3'
XPC	RV	5'-ccctttgtcacagctgactt-3'
XPD	FW	5'-cactggacatctacccaag-3'
XPD	RV	5'-catcctgggtctcaatgaag-3'
XPF	FW	5'-gaaaagacgtcgagtccaga-3'
XPF	RV	5'-ctttgccatccttctcaaaa-3'
XPG	FW	5'-ctccgctgctaaagaaacag-3'
XPG	RV	5'-tggtaaaggtggcaaacat-3'
P21	FW	5'-agtacttcctctgccctgct-3'
P21	RV	5'-atctgcgcttggagtgatag-3'
MDM-2FW		5'-atgaggtctatcgggtcaca-3'
MDM-2RV		5'-ttccagtttgctttttcag-3'
18S	FW	5'-gccgctagaggtgaaattcttg-3'
18S	RV	5'-cattcttggcaaatgctttcg-3'

CSB 4 5'-gctgcttataataaatcctcatctcc-3'

CSB 5 5'-atcgtcgtgttcgaattcgccaatg-3'

CSB 6 5'-gtcttctgatgacgtagctatgag-3'

HIF 24 5'-gcagttaagagcactagttg-3'

HIF 25 5'-ggagctatctctctagacc-3'

K5 Cre FW 5'-atgccaatgccccctcagttcct-3'

K5 Cre RV 5'-tgccccctttttatcccttccaga-3'

2.1.5 Antikörper und Färbelösungen

Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
β-Actin	Maus	1:5.000	WB	Sigma Aldrich / St Louis, USA
Anti-Thymin Dimer	Maus	1:1.000	SW / IHC	Kamiya Biomedicals / Seattle, USA
HIF-1α	Kaninchen	1:500	WB	GeneTex / Irvine, USA
CSA	Kaninchen	1:1.000	WB	GeneTex / Irvine, USA
CSB	Maus	1:1.000	WB	Abcam / Cambridge, UK
XPB	Maus	1:1.000	WB	Cell Signalling / Cambridge, UK
XPG	Kaninchen	1:500	WB	Sigma Aldrich / St Louis, USA

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Markierung	Hersteller
Anti-Maus	Kaninchen	1:5.000	Peroxidase	GE Healthcare / Chalfont St Giles, USA
Anti- Kaninchen	Ziege	1:2.500	Peroxidase	GE Healthcare / Chalfont St Giles, USA

2.1.6 Zubehör

Bezeichnung		Hersteller / Firmensitz
6er Zellkulturplatte (Beschichtung: Kollagen Typ I)		BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
Petrischale (Beschichtung: Kollagen Typ I)	Ø 100mm	BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
Petrischale (Beschichtung: Kollagen Typ I)	Ø 60mm	BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
Petrischale	Ø 100mm	Greiner Bio One / Frickenhausen
Biosphere Filter Spitzen	1 – 1.000 µl	Sarstedt / Nümbrecht
Kryomold		Sakura / Torrence, USA
Erlenmeyerkolben		Schott / Mainz
Filterpapier		Whatman / Springfield Mill, UK
Glasflaschen		Schott / Mainz
Mikroliterpipetten	1 – 1.000 µl	Eppendorf / Hamburg
Neubauer – Zählkammer		
Nitrozellulose-Membran		Whatman / Springfield Mill, UK
Nylonmembran		
Pipettenspitzen ohne Filter	1 – 1.000 µl	Sarstedt / Nümbrecht
Pipettierhilfe Pipetus		Hirschmann / Eberstadt
Plastikküvette		Sarstedt / Nümbrecht
PVDF-Membran		
Reaktionsgefäße	0,5 – 2,0 ml	Eppendorf / Hamburg
Realtime-PCR Platte		Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Skalpell		Braun / Melsungen
Ssniff Futtermittel		Ssniff Spezialdiäten / Soest
Superfrost Ultra plus Objektträger		Thermo Fischer Scientific / Schwerte
UV Küvette mikro		Brand / Wertheim
Zellkulturflasche Cellstar	T 75	Greiner Bio One / Frickenhausen
Zellkulturflasche Cellstar	T 175	Greiner Bio One / Frickenhausen
Zellsieb		BD Biosciences / Franklin Lakes, USA
Zentrifugierröhrchen	15 ml	TPP / Trasadingen, Schweiz
Zentrifugierröhrchen	50 ml	TPP / Trasadingen, Schweiz

2.1.7 Geräte

Bezeichnung	Hersteller / Firmensitz
Analysenwaage CP124S	Sartorius / Göttingen
Annexin V-FITC Apoptosis-Kit	BioCat / Heidelbergtzhuj7p
Blottingapparatur	Biometra / Göttingen
Bestrahlungsquelle	Phillips / Eindhoven, Niederlande
DNA Mini Kit	Qiagen / Hilden
Elektrische Haarschneider	Procter & Gamble / Schwalbach am Taunus
Elektrophoresekammer	BioRad / Hercules, USA
FluorChem 8900	Biozym / Hessisch Oldendorf
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss / Jena
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr / Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C Hera Freeze	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Gelkammer für SDS-PAGE	BioRad / Hercules, USA
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Narkosegerät	Groppler Medizintechnik / Deggendorf
Kühlschrank +4 °C	Liebherr / Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss / Jena
Netzgerät für Elektrophorese E835	Consort / Turnhout, Belgien
Netzgerät für die SDS-PAGE EV202	Peqlab / Erlangen
Photometer Bio	Eppendorf / Hamburg
Realtime-PCR System iQ5	BioRad / Hercules, USA
Schlittenmikrotom HM400	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fischer Scientific / Schwerte
Tewameter TM300	Courage + Khazaka Electronic / Köln
Thermocycler T Gradient	Biometra / Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf / Hamburg
TissueLyser II	Qiagen / Hilden
UV-Sensor Variocontrol	Waldmann / Villingen Schwenningen
Visioscan VC 98	Courage + Khazaka Electronic / Köln
Wasserbad	Memmert / Schwabach
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fischer Scientific / Schwerte

2.1.8 Computersoftware

Programm	Verwendung
Alpha View SA	Fluoreszenz- und Chemilumineszenzdetektion Densitometrische Auswertungen
AxioVision	Mikroskopische Bildanalyse
BioRad iQ5	BioRad / Hercules, USA
GraphPadPrism	Statistische Auswertung
Image J	Bildbearbeitung
Zen 2012 (blue edition)	Mikroskopische Bildanalyse

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von murinen Keratinozyten

Für die Isolation von murinen Keratinozyten wurden Tiere im Alter von 4-8 Wochen durch Begasung mit hochprozentigem CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Mit geeignetem Präparationsbesteck wurden den Mäusen beide Ohren und der Schwanz abgetrennt und das Gewebe anschließend in 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Proben wurden in DPBS gelagert und alle weiteren Schritte unter einer Sicherheitswerkbank Klasse II unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden störendes Fettgewebe und etwaige Blutreste in einer sterilen Petrischale vom Gewebe entfernt. Der Schwanz wurde mit einem Skalpell in drei Teile geschnitten und die Haut mit Hilfe einer Pinzette vom Knochen getrennt. Die Ohren wurden an der Knorpelstelle gebrochen und die Hauthälften vorsichtig voneinander gelöst. Nach kurzem Waschen in DPBS wurden die Hautstücke anschließend in eine vorbereitete Petrischale in Thermolysin-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine schonende Trennung von Dermis und Epidermis zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurde mittels einer sterilen Pinzette die Epidermis von der Dermis abgezogen und beide Hautschichten erneut in DPBS gewaschen. Ein Zellsieb wurde in eine Petrischale (Ø 100mm), mit 10 ml Nährmedium, gesetzt und die gesammelte Epidermis vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels das Gewebe vorsichtig durch das Sieb gedrückt und durch eine Pipette so lange mit dem Medium gemischt bis sich eine homogene trübe Lösung ergab. Diese wurde daraufhin in einem 50 ml Zentrifugierrohrchen gesammelt und für 6 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in Medium aufgenommen, die Zellzahl mit Hilfe

einer Neubauer Zählkammer bestimmt, und auf eine mit Kollagen Typ I beschichtete, Kulturplatte ausgesät.

2.2.2 Kultivierung muriner Keratinozyten

Die ausgesäten Mauskeratinozyten wurden einen Tag nach der Isolation mit DPBS gewaschen um mögliche Zellreste und Verunreinigungen zu entfernen. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte jeden zweiten Tag bis eine Konfluenz von ca. 80% erreicht wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.3 Kultivierung transformierter humaner CSB-defizienter Fibroblasten

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten SV-40 transformierten Fibroblasten wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut sofort in 20 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche T175 ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% wurden sie einmal mit DPBS gewaschen und durch fünfminütige Inkubation mit 0,05% Trypsin-EDTA bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Durch die Zugabe von 10 ml Nährmedium erfolgte eine Blockierung der Trypsin-Aktivität und die abgelösten Zellen wurden in einem 15 ml Zentrifugierrohrchen gesammelt. Nach anschließendem Pelletieren (1.200 rpm; 5 min) wurden die Fibroblasten in Nährmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in Petrischalen (Ø 100mm) eine anschließende Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jean-Marc Egly (IGBMC, Straßburg, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2.3 Belastung der Zellen

2.3.1 UVB Bestrahlung der Zellen

Die UVB Bestrahlung der Zellen erfolgte in DPBS um eine mögliche Absorption von im Medium enthaltener Substanzen und die Ausbildung phototoxischer Reaktionen auszuschließen. Nach Abnehmen des Nährmediums wurden die Zellen in DPBS gewaschen und im folgenden Schritt pro Petrischale (Ø 100mm) mit 5 ml, pro Petrischale (Ø 60mm) mit 2,5 ml DPBS versetzt. Als

Bestrahlungsquelle diente eine Lampe, bestehend aus vier TL20W / 12 RS-UV Röhren mit einem Emissionsspektrum im UVB Bereich ($\lambda = 280-320$ nm) und einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 310$ nm. Die Intensität der UV-Röhren wurde monatlich mit einem UV-Sensor kontrolliert und die Bestrahlungszeit dementsprechend angepasst. Eine Bestrahlungsdosis von 20 mJ/cm^2 bedurfte einer ungefähren Bestrahlungszeit von ca. 24 Sekunden. Die eigentliche Bestrahlung der Zellen erfolgte ohne Deckel, so dass etwaige Absorptionen ausgeschlossen wurden. Nach UVB-Bestrahlung wurden die Zellen in Kulturmedium für 0 h, 4 h, 18 h oder 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Mit Kontrollzellen wurde bis auf das eigentliche Bestrahlungsverfahren gleichermaßen verfahren.

2.3.2 Behandlung mit SAHA

Vor der Zugabe wurde SAHA in einem entsprechenden Volumen DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und auf 200nM eingestellt. Die Konzentration von DMSO wurde im Medium konstant bei 0,1 % gehalten, um zytotoxische Effekte auszuschließen. Kontrollzellen wurden nur mit DMSO-versetztem Nährmedium behandelt.

2.4 In vivo Studien

2.4.1 Versuchstiere

Als Mausmodell für die *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden C57/Bl6 Mäuse mit einer konditionellen HIF-1 α -Defizienz in Keratinozyten verwendet. Für deren Generierung wurden C57/Bl6 HIF-1 $\alpha^{+/+}$ Mäuse (Ryan et al., 2000) mit C57/Bl6 Keratin K5-Cre (K5-Cre) Mäusen verpaart (Ramirez et al., 2004). Diese Verkreuzung erlaubt eine gewebe-spezifische Deletion des flox-markierten Gens durch die DNS-Rekombinase Cre. Keratin-5 erlaubt hierbei eine zellspezifische Expression dieses Enzyms. Die verwendeten Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Irmgard Foerster (Limes Institut, Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse und aus den Mäusen generierte Zellen werden im Weiteren zur Vereinfachung als HIF-1 $\alpha^{+/+}$ und HIF-1 $\alpha^{-/-}$ bezeichnet. Des Weiteren wurden C57/Bl6 Mäuse mit einer CSB-Defizienz für *in vitro* Versuche verwendet. Diese Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Harry van Steeg (RIVM, Bilthoven, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Tierhaltung

Die Haltung und Zucht der verwendeten C57BL/6 Mäuse erfolgte unter standardisierten Bedingungen (12 h Hell-Dunkel-Zyklus, Raumtemperatur: 20-24 °C, 70% Luftfeuchtigkeit). Das Umsetzen der Tiere in saubere Käfige und das damit verbundene Wechseln des Futters und Wassers wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Wasser und Futter standen den Mäusen *ad libitum* zu Verfügung. Das Absetzen der Nachkommen erfolgte 4-5 Wochen nach der Geburt, anschließend wurden sie mit gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen Tieren gehalten.

2.4.3 UVB-Bestrahlung und Probenentnahme

Die UVB-Bestrahlung erfolgte durch eine Lampe, bestehend aus vier TL20W / 12 RS-UV Röhren (siehe 2.3.1). Hierfür wurden die Mäuse in Gruppen zu fünf Tieren in einer gesonderten Box platziert. Die verwendete Bestrahlungsdosis variierte von 60 mJ/cm² bis 100 mJ/cm² UVB.

Die Probenentnahme erfolgte 24 h nach der jeweils letzten UVB-Bestrahlungseinheit.

2.4.4 Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)

Die Messung des TEWL erfolgte durch die Verwendung eines Tewameters unter gleichen Rahmenbedingungen. Hierfür wurden die Haare auf dem Rücken der Tiere mittels eines elektrischen Haarschneiders entfernt und die Messsonde des Tewameters an vorher markierten Stellen auf dem Rücken aufgelegt. Nach Erreichen einer Messwertstabilität nach ca. 1 min wurde der TEWL-Wert der Computersoftware entnommen.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolation von DNS aus Schwanzbiopsien

Für die Genotypisierung der Tiere wurde DNS, die aus Schwanzbiopsien gewonnen wurde, verwendet. Hierfür wurde das DirectPCR-Tail Lysisreagenz verwendet. Das biopsierte Schwanzgewebe wurde in 100 µl Lysispuffer aufgenommen und mit 1 µl Proteinase K (20µg/µl) versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C mit anschließender Inaktivierung der Proteinase K bei 85°C für 45 min. Die DNS wurde direkt in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt und anschließend bei 4°C gelagert.

2.5.2 Genotypisierung

Die Amplifikation der DNS aus Maus-Gewebe erfolgte über sequenzspezifische Primer, die je nach Genotyp unterschiedlich große Fragmente amplifizieren. Hierbei werden unter Verwendung des Primerpaares HIF 24 und HIF 25 für ein Wildtyp-Fragment ein Amplifikat von 200 bp, für ein Flox-Fragment ein Amplifikat von 250 bp, amplifiziert. Die Keratin-5 PCR verwendet das Primerpaar K5 FW und K5 RV, das nur das transfizierte Konstrukt erkennt und ein Fragment von 300 bp amplifiziert. Unter Verwendung der Primer CSB 4, CSB 5 und CSB 6 wird ein Wildtyp-Fragment von 195 bp und ein Knockout-Fragment von 490 bp amplifiziert.

Für die Amplifikation der DNS wurden folgende Ansätze erstellt:

HIF-PCR	
dH ₂ O	40 µl
10x MgCl ₂ Gelatine Puffer	5 µl
PCR-Nucleotide Mix	1 µl
Primer HIF 24	1 µl
Primer HIF 25	1 µl
Taq Polymerase	1 µl
DNS	1 µl
<hr/>	
Σ	50 µl

Keratin-5 PCR

dH ₂ O	38 µl
GoTaq Reaktionspuffer (5x)	5 µl
BSA (4mg/ml)	2 µl
PCR-Nucleotide Mix	1 µl
Primer K5 FW	1 µl
Primer K5 RV	1 µl
GoTaq Polymerase	1 µl
DNS	1 µl

Σ	50 µl
---	-------

CSB-PCR

dH ₂ O	12,5 µl
GoTaq Reaktionspuffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl
PCR-Nucleotide Mix	0,5 µl
Primer CSB 4	2,0 µl
Primer CSB 5	1,0 µl
Primer CSB 6	2,0 µl
GoTaq Polymerase	0,5 µl
DNS	1 µl

Σ	25,0 µl
---	---------

Für die Amplifikation der DNS ist die PCR in drei Schritte gegliedert:

1. Die Hitzedenaturierung sorgt für eine vollständige Zerlegung der Doppelstrang-DNS in Einzelstränge.

2. Die Anlagerung der Primer wird durch ein Absenken der Reaktionstemperatur gewährleistet, bei der sich stabile Doppelstrangbereiche zwischen den Primern und der Einzelstrang-DNS bilden.
3. Amplifikation der DNS-Fragmente durch Verlängerung der angelagerten Primer. Der Temperaturanstieg auf 72°C sorgt für die größte Aktivität der TaqPolymerase und stellt eine optimale Elongation der Primer sicher.

Im Thermocycler fand die Reaktion unter folgenden Bedingungen statt:

HIF-PCR

	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	} 36x
Anlagerung	57°C	45 sek	
Elongation	72°C	1 min	
	72°C	10 min	

Keratin-5 PCR

	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	45 sek	} 36x
Anlagerung	60°C	45 sek	
Elongation	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

CSB-PCR

	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	1 min	} 40x
Anlagerung	63°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
	72°C	5 min	

2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Die Auftrennung der DNS-Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese im elektrischen Feld. Die Aufspaltung erfolgte für die HIF-PCR in einem 2,5%igen, für die Keratin-5 PCR in einem 1%igen Agarosegel. Dazu wurden bestimmte Agarose-Mengen abgewogen in 1x TAE-Puffer aufgekocht und mit GelRed versetzt. Die erhaltene Lösung wurde in eine Gießkammer mit Schlitten zur Aushärtung gegossen. Danach wurde der Schlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden zusammen mit einem DNS-Molekulargewichtsmarker (100 bp – 1kbp) in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V durchgeführt. Die aufgetrennten DNS-Fragmente wurden mittels UV-Strahlung im FluorChem 8900 detektiert und dokumentiert.

2.5.4 Isolation von DNS aus kultivierten Zellen

Für die Isolation genomischer DNS aus kultivierten Zellen wurde das Qiagen DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.5 Isolation von RNS aus kultivierten Zellen

Die Zellen wurden nach der Behandlung, 1x mit DPBS gewaschen und anschließend je nach Zellzahl in 500 µl bzw. 1 ml TRIzol aufgenommen. Nach fünf-minütiger Inkubationsdauer und mehrmaligem Spülen wurde die Suspension abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurden 200 µl Chloroform pro ml TRIzol hinzugegeben und kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltene RNS wurde mit 500 µl Isopropanol präzipitiert und wiederrum bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend das Pellet in 1 ml Ethanol (75%) aufgenommen. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 5 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die RNS in 30 µl DEPC-H₂O bei 56°C gelöst. Die anschließende Zwischenlagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

2.5.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photometer Bio mittels einer Absorptionsbestimmung bei $\lambda = 260$ nm. Um die Reinheit der Probe zu untersuchen wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm ebenfalls aufgezeichnet und ein Quotient der Werte gebildet. Ein Wert von unter 1,8 ließ auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine schließen.

2.5.7 South-Western-Slot Blot

Die Methode des South-Western-Slot Blots basiert auf dem Transfer von denaturierten DNS-Proben auf eine positiv geladene Nylonmembran. Die wie vorher in 2.4.6 beschriebene isolierte und quantifizierte DNS wurde in TE-Puffer auf 200 ng Gesamt-DNS pro 50 μ l Volumen eingestellt. Zur Denaturierung der DNS wurden die Proben für 5 min bei 96°C im Wasserbad inkubiert und anschließend für kurze Zeit auf Eis gelagert. Die Nylonmembran wurde für 10 min in ddH₂O aktiviert und mittels einer Schlauch-Vakuum Pumpe wurden die Proben, mit einem Druck von 30 bis 40 kPa, auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Denaturierung für 45 min auf ein in 0,4 N NaOH getränktes Filterpapier gelegt. Über Nacht erfolgte ein Blockierungsschritt in 5% Magermilch- in TBS/T bei 4°C. Die anschließende Immundetektion ist in 2.6.5 beschrieben.

2.5.8 Synthese komplementärer DNS (cDNS)

Die in 2.4.5 isolierte mRNA wurde mittels M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverser Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Zuerst wurde die mRNA einem DNase-Verdau unterzogen, bei dem 1 μ g Probe in einem Gesamtvolumen von 10 μ l mit 1xDNase Puffer und 1 U DNase in DEPC-H₂O vorgelegt wurden. Die Entfernung von DNS-Kontaminationen erfolgte bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde 1 μ l Stop Solution hinzugegeben und die enzymatische Reaktion bei 65°C für 10 min inkubiert, was zu einer Inaktivierung der DNase führt. Im nächsten Schritt wurde für 5 min bei 60°C durch Zugabe von 1 μ l Random Hexamer Primer die Oligonukleotid-Anlagerung durchgeführt. Durch Zugabe des folgenden Ansatzes und der Inkubation bei 37°C für 1h wurde die eigentliche cDNS-Synthese gestartet:

DEPC-H ₂ O	12µl
M-MLV Puffer (5x)	8 µl
PCR Nucleotide Mix (10mM)	4 µl
rRNasin	2 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	2 µl

Die Reaktion wurde bei 70°C für 10 min beendet und die cDNS kurzfristig bei 4°C langfristig bei -20°C gelagert.

2.5.9 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR ist eine Amplifikationsmethode, die eine Quantifizierung amplifizierter Transkripte in Echtzeit erlaubt. Dies erfolgt durch den Einsatz fluoreszierender DNS-interkalierender (z.B.: SYBR Green) oder an die DNS bindender Farbstoffe. Hierbei ist deren Signal somit proportional zur Menge an amplifizierten DNS-Strängen. Anhand einer anschließenden Schmelzkurve kann die Länge des amplifizierten DNS-Fragments untersucht werden und somit die Spezifität der benutzten Primer nachgewiesen werden.

Die Quantitative Real Time PCR erfolgte nach folgendem Ansatz:

DEPC-H ₂ O	9,00 µl
SYBR Green	12,50 µl
Primer FW (10µM)	1,25 µl
Primer RV (10µM)	1,25 µl
cDNS (aus 2.5.8)	1,00 µl

Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen im Realtime-PCR System iQ5:

Denaturierung	94°C	20 sek	} 40 x
Anlagerung	56°C	20 sek	
Elongation	72°C	20 sek	

Als interne Kontrolle wurde das Gen 18S verwendet. Die Auswertung erfolgte nach der Delta Delta Ct-Methode.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Isolation von Proteinen aus kultivierten Zellen

Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in eiskaltem DPBS unter ständiger Kühlung von der Petrischale abgelöst und anschließend bei 2.000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 50µl RIPA-Puffer, unter Zugabe von 1% Protease-Inhibitor Cocktail und 1% PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Lyse-Puffer bei 4°C für 45 min unter mehrmaligem durchmischen der Probe. Hierauf wurden die Proben bei 14.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Quantifizierung der in 2.6.1 isolierten Proteinproben erfolgte mit Hilfe des Bradford Tests. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 799 µl dH₂O mit 1µl Proteinlysate und 200µl RotiQuant Bradford Reagenz in einer Plastikkuvette für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Abgleich der Extinktion mit einer BSA Eichgeraden.

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Es wurden 15 µg Protein mit 6x SDS-Auftragspuffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Die aufgearbeiteten Proben wurden zusammen mit einem Precision Plus Protein Standard auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Bei einer Spannung von 80 V wurden die Proben im Sammelgel konzentriert und bei 120 V für ca. 1,5 h im Trenngel aufgetrennt (Laemmli, 1970).

2.6.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden über eine Semi-Dry Apparatur von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Dauer des Transfers betrug ca. 90 min bei einer Stromstärke von 100 mA. Die PVDF-Membran wurde zuvor für 10 Sekunden in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Gel und Blottingpapier für mindestens 15 min in Transferpuffer äquilibriert.

2.6.5 Immundetektion von Proteinen bzw. Nukleinsäuren

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF- bzw. Nylonmembran für 1 h bei Raumtemperatur in Magermilch in TBS/T oder BSA in TBS/T inkubiert. Über Nacht bei 4°C folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gefolgt von dreimaligem Waschen mit 1x TBS/T. Anschließend wurde die Membran für 1h bei RT mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert gefolgt von erneutem dreimaligen Waschen mit 1x TBS/T. Für die Detektion wurde eine Meerrettich-Peroxidase Substrat Lösung verwendet. Hierfür wurden die beiden Substrat-Komponenten zusammengefügt und nach einer fünfminütigen Inkubationsphase auf die Membran aufgetragen. Die Detektion des Chemilumineszenz Signals erfolgte mit Hilfe des FluorChem 8900. Als Ladekontrolle zur Immundetektion von Proteinen diente β -Aktin.

2.6.6 FACS-Analyse mit der Annexin V/Propidiumiodid-Färbung

Mit Hilfe der Annexin V/Propidiumiodid-Färbung kann der Anteil apoptotischer und spätapoptotischer Zellen innerhalb einer Zellpopulation bestimmt werden. Das Enzym Annexin V bindet hierbei spezifisch an Phosphatidylserine an der Zellmembran. Diese liegen normalerweise auf der Innenseite werden aber während der Apoptose auf die Außenseite der Zellmembran transloziert.

Für die Durchführung wurde das Annexin V-FITC Apoptosis-Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.7 Immunhistochemische Methoden

2.7.1 Präparation von Gewebe

Die nach den Tierversuchen entnommene Haut wurde mit Hilfe einer 4%igen PFA-Lösung perfundiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Xylol entwässert. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und von den entstandenen Blöcken mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Paraffinschnitte wurden auf Superfrost Ultra Plus Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet.

2.7.2 Masson-Goldner Färbung von Paraffinschnitten

Die Masson Goldner Färbung dient als Übersichtsfärbung für Paraffinschnitte. Hierfür wurden die Schnitte in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Im nächsten Schritt wurde die Proben kurz in dH₂O gewaschen und für 5 min in Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut kurz in dH₂O gewaschen und es erfolgte eine Differenzierung durch eine 1%ige HCl-Ethanol Lösung. Zur Verstärkung der Kernfärbung wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für ca. 2 min gebläut. Im nächsten Schritt erfolgte eine 5-minütige Färbung in Säurefuchsin-Ponceau-Azophlozin gefolgt von kurzem Spülen in 1%iger Essigsäure. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 2 min in Phosphomolybdänsäure-Orange G Lösung inkubiert bis das Bindegewebe wieder weitgehend entfärbt war. Nach erneutem kurzem Waschen in 1%iger Essigsäure folgte eine fünfminütige Inkubation in Lichtgrün. Im letzten Schritt wurden die Schnitte in 1%iger Essigsäure und anschließend in dH₂O gewaschen. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe und nachfolgende Xylolinkubation. Zum Eindecken der Schnitte wurde Mounting Medium verwendet. Die fotografischen Aufnahmen der Färbung erfolgten am Lichtmikroskop.

2.7.3 Fontana-Masson Färbung von Paraffinschnitten

Die Fontana-Masson Färbung dient als Nachweis von Melanin in Paraffinschnitten. Hierfür wurden die Schnitte in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach kurzem Waschen in dH₂O wurden die Proben in einer ammoniakalischen Silberlösung für 1,5h bei 60°C

inkubiert. Nach Spülen in dH₂O und 1%iger Goldchlorid-Lösung wurden die Schnitte für 5 min in eine reduzierende Natriumthiosulfat-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser für ca. 10 min gewaschen und für eine Kernfärbung 5 min in Kernechtrot inkubiert. Nach kurzem Waschen in dH₂O wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe mit nachfolgender Xylol-Inkubation dehydriert und mit Hilfe von Mounting Medium eingedeckt. Die fotografischen Aufnahmen der Färbung erfolgten am Lichtmikroskop.

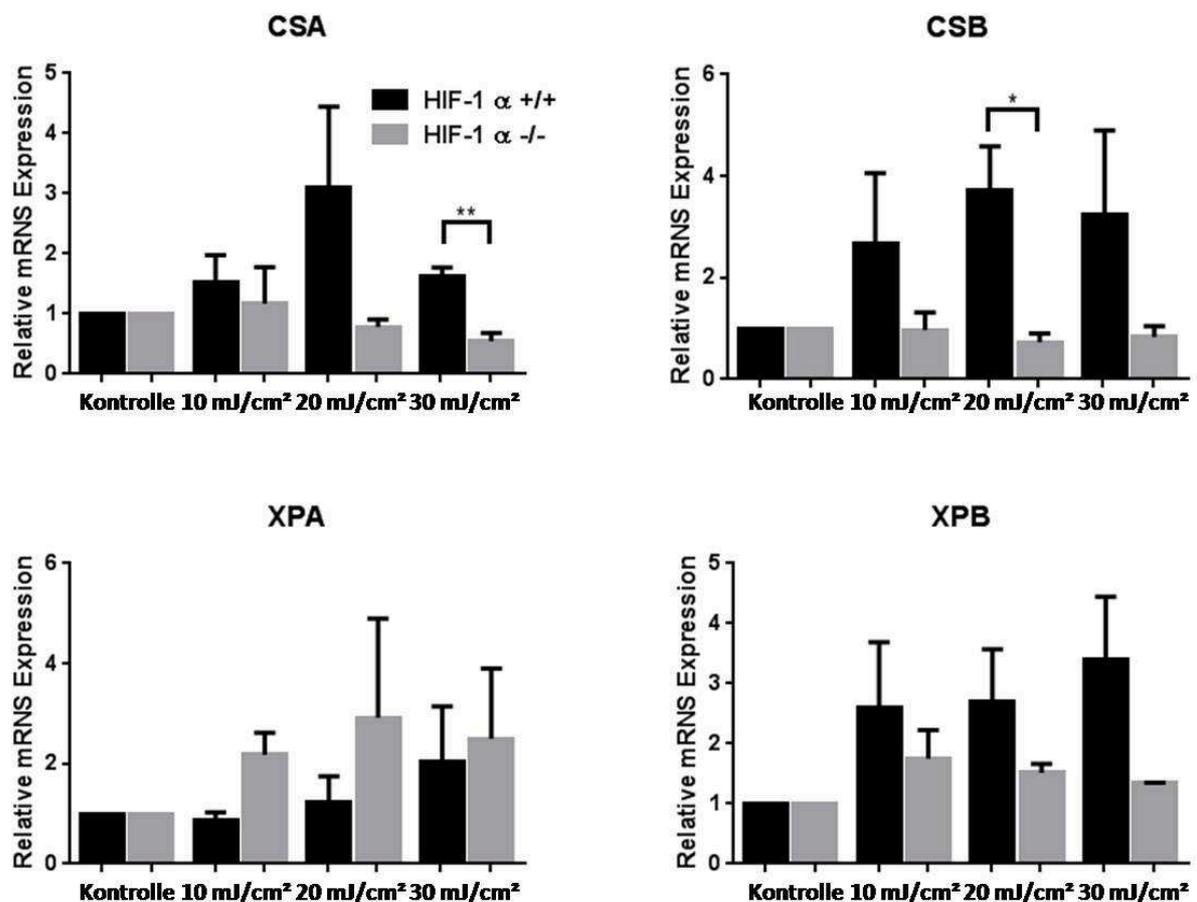
2.8 Statistik

Die in der Arbeit vorliegenden Daten wurden tabellarisch erfasst und mit der Statistiksoftware GraphPad Prism analysiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der normal verteilten Daten wurde der Student'sche t-Test verwendet, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) als signifikant gewertet wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von HIF-1 α auf die Expression von NER-relevanten Genen in murinen Keratinozyten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit der Transkriptionsfaktor HIF-1 an der Regulation der NER beteiligt ist. Grundlage der *in vitro* Untersuchungen waren Keratinozyten, die aus Epidermis-spezifischen HIF-1 α defizienten Mäusen bzw. den entsprechenden Wildtyp-Kontroll Mäusen isoliert wurden. Bereits bekannt ist, dass nach UVB-Bestrahlung HIF-1 α die Expression von bestimmten XP-Genen in humanen Keratinozyten moduliert (Rezvani et al., 2009). Um zu untersuchen, ob ein gleicher oder ähnlicher Effekt in Mauskeratinozyten auftritt, wurden die Transkriptmengen mehrerer NER-relevanter Gene 18 h nach UVB-Bestrahlung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.



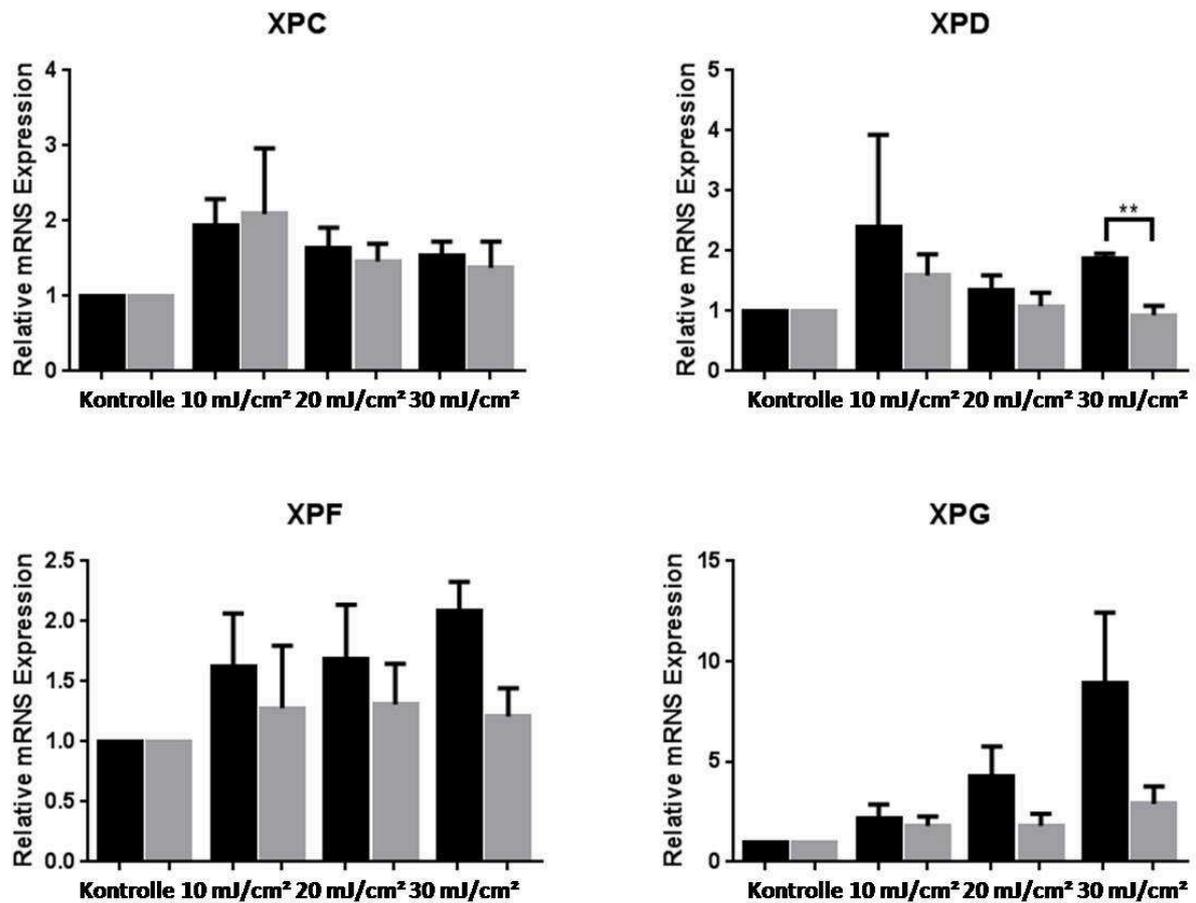


Abbildung 5: UVB-induzierte mRNA-Expression der Gene CSB, CSA, XPA, XPB, XPC, XPD, XPF und XPG in HIF-1α +/+ und HIF-1α -/- Mauskeratinozyten. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 10, 20 oder 30 mJ/cm² UVB bestrahlt. 18 h später wurden die Transkriptmengen der Reparaturgene unter Verwendung der qRT-PCR Methode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf die Expression von 18 S. Die Werte der profizienten Zellen wurden auf die Wildtyp-Kontrolle bezogen, die Werte der defizienten Zellen auf die Knockout-Kontrolle. *p<0,05; **p<0,01 Student'scher t-Test.

Abbildung 5 zeigt, dass die Expression mehrerer Reparaturgene HIF-1α abhängig reguliert wird. In HIF-1α +/+ Mauskeratinozyten ist ein ca. 4-facher signifikanter Anstieg des CSB-Gens nach Bestrahlung mit 20mJ/cm² UVB beobachtet worden. Eine Erhöhung oder Erniedrigung der Strahlungs-dosis führte zu einem geringen Abfall der Transkriptmenge auf das 3-bzw. 3,5-fache. Im Gegensatz dazu zeigten HIF-1α defiziente Keratinozyten keinen Anstieg der mRNA-Expression nach Bestrahlung. Für das CSA-Gen ergab sich ein ähnliches Bild. Profiziente Zellen zeigten einen bis zu 3-fachen Anstieg der Transkriptmenge bei einer Strahlungs-dosis von 20 mJ/cm². Ein Anstieg der UVB-Dosis auf 30 mJ/cm² resultierte in einer ca. 1,8-fachen signifikanten Zunahme der CSA-Expression. In HIF-1α defizienten Zellen wurde kein Anstieg beobachtet. Die Expression des XPA-Gens hingegen verlief unterschiedlich. Wildtypzellen wiesen einen dosisabhängigen Anstieg der Transkriptmenge auf

das ca. 2-fache auf, HIF-1 α defiziente Zellen erreichten eine bis zu 3-fache Erhöhung. Die Regulation des XPB-Gens verlief in beiden Zelltypen dosisabhängig. Profiziente Keratinozyten zeigten einen Anstieg auf das bis zu ca. 3,5-fache mit zunehmender UVB-Dosis. In HIF-1 α defizienten Zellen hingegen sank die Transkriptmenge mit ansteigender UVB-Dosis bis auf das Ausgangsniveau ab. Für XPC wurde eine Zunahme der mRNS-Expression auf das ca. 2-fache beobachtet, wobei kein Unterschied zwischen Wildtypzellen und HIF-1 α defizienten Zellen beobachtet werden konnte. Die XPD Expression verlief in murinen Keratinozyten HIF-1 α abhängig. In Wildtypzellen stellte sich eine Erhöhung nach Bestrahlung mit 10 mJ/cm² auf das ca. 2,5-fache ein, in defizienten Zellen erreichte die Transkriptmenge nur das 1,5-fache. Ein Anstieg der Bestrahlungsdosis auf 30 mJ/cm² hatte einen Abfall der Expression in beiden Zelltypen zur Folge, wobei die Wildtypkeratinozyten jedoch eine signifikante erhöhte Expression zeigten. Die mRNS-Expression für XPF war in beiden Zelltypen vergleichbar. In HIF-1 α +/- Keratinozyten erfolgte maximal eine 2-fache Expression, HIF-1 α -/- Zellen erreichten nur einen 1,5-fachen Anstieg. Die Transkriptmenge für XPG verlief in Wildtypzellen dosisabhängig bei einer maximal 10-fach erhöhten Expression. Im Gegensatz dazu war die Transkription in HIF-1 α defizienten Keratinozyten kaum erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 α ein kritischer Faktor bei der UVB-vermittelten Regulation von bestimmten NER-relevanten Genen in murinen Keratinozyten ist.

3.2 Einfluss von HIF-1 α auf die UVB-induzierte Expression von p21 und MDM-2 in murinen Keratinozyten

Eine funktionierende DNS-Reparatur ist ein wichtiger Kontrollmechanismus bei der UV-induzierten Zellschädigung und steht in direktem Zusammenhang mit dem Zelltod, insbesondere der Apoptose. Wenn die DNS-Schädigung so schwerwiegend ist, dass keine Reparatur mehr möglich ist, führt dies zur Initiation der Apoptose. Auf diese Weise werden Zellen eliminiert, die potentiell Mutationen akkumulieren, welche sie zur Tumorzellen transformieren könnten.

Ein zentraler zellulärer Schalter, der den Zellzyklusarrest nach DNS-Schädigung initiiert und die Entscheidung kontrolliert, ob es zur DNS-Reparatur oder zur Induktion der Apoptose kommt, ist p53. Hierbei spielt das Protein p21, als direktes transkriptionelles Zielgen von p53, eine große Rolle in der zellulären Apoptose und im Verlauf des Zellzyklus (El-Deiry et al., 1994). Eine Überexpression von p21 resultiert in einen G₁-G₂ (Niculescu et al., 1998) oder S-Phase Arrest (Ogryzko et al., 1997) des Zellzyklus. Auch MDM-2 (engl.: Mouse double minute 2 homolog) gilt als direktes Zielgen von p53. Im Unterschied zu p21 fungiert MDM-2 allerdings als negativer Regulator von p53 und reguliert dessen

Stabilität und Aktivität (Golubovskaya & Cance, 2013). Bekanntermaßen gibt es eine direkte Interaktion, sowie eine wechselseitige funktionale Beeinflussung zwischen p53 und HIF-1 (Obacz et al., 2013).

Aus diesem Grund wurde der Einfluss von HIF-1 α auf die Expression von p21 und MDM-2 in murinen Keratinozyten untersucht. Die Expression wurde 18 h nach UVB-Bestrahlung untersucht. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse dargestellt.

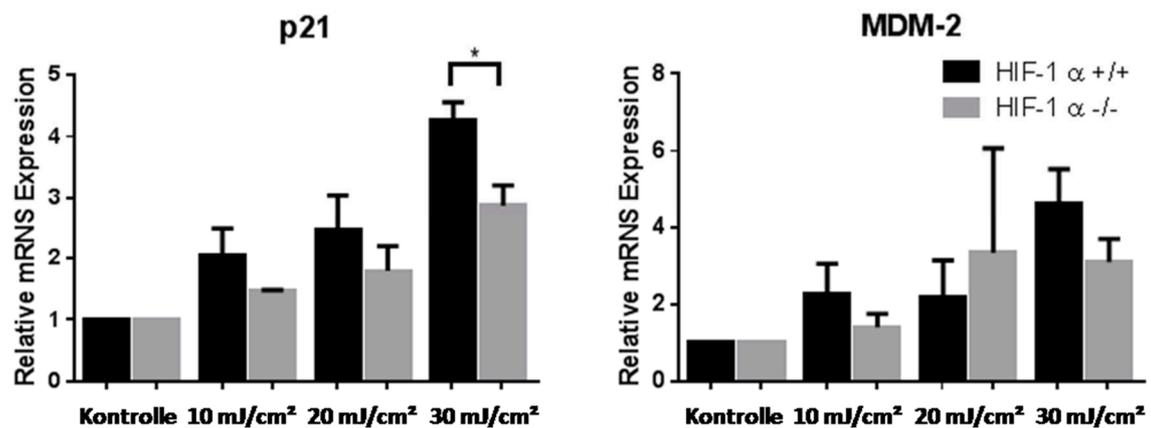
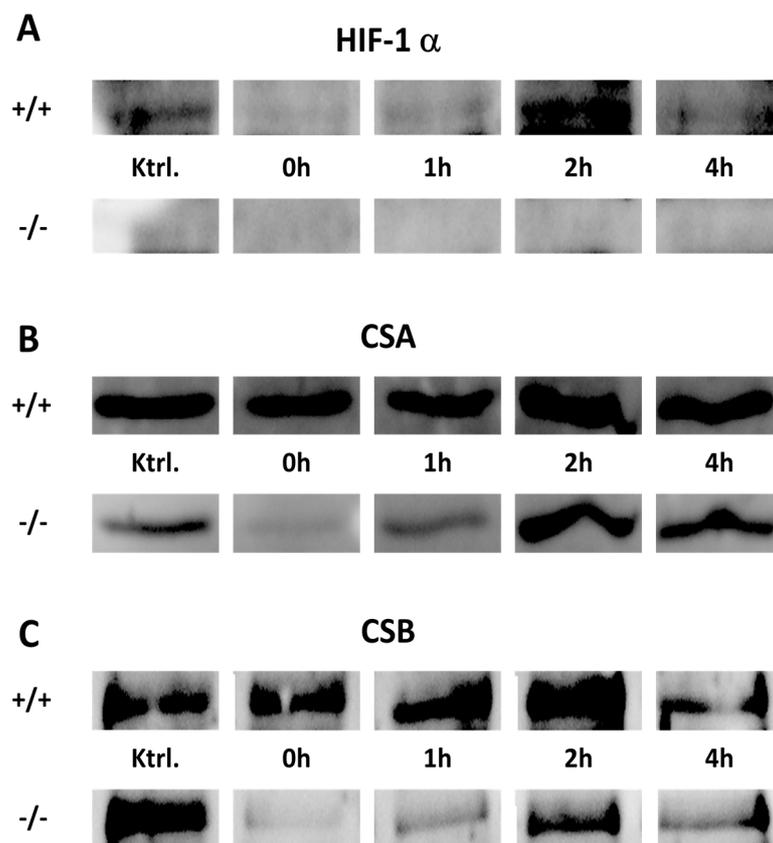


Abbildung 6: UVB-induzierte Genexpression der Gene p21 und MDM-2 in HIF-1 α +/+ und HIF-1 α -/- Mauskeratinozyten. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 10, 20 und 30 mJ/cm² UVB bestrahlt und 18 h später die Transkriptmenge mittels der qRT-PCR Methode bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf die Expression von 18 S. Die Werte der profizienten Zellen wurden auf die Wildtyp-Kontrolle bezogen, die Werte der defizienten Zellen auf die Knockout-Kontrolle. *p<0,05;

Abbildung 6 zeigt die HIF-1 α abhängige Expression von p21 und MDM-2 in murinen Keratinozyten 18 h nach UVB-Bestrahlung. Für p21 wurde ein dosisabhängiger Anstieg in der mRNA-Transkriptmenge beobachtet. Wildtypzellen erreichten eine ca. 4,5-fache, HIF-1 α defiziente Keratinozyten hingegen nur eine ca. 3-fache Erhöhung. Die unterschiedliche Zunahme der Expression war signifikant für eine Bestrahlungsdosis von 30 mJ/cm². Die Transkription von MDM-2 hingegen verlief unterschiedlich. Eine Bestrahlung mit 10 und 30 mJ/cm² UVB resultierte in einen höheren Anstieg in den Wildtypzellen. Eine Bestrahlung mit 20 mJ/cm² führte allerdings zu einem höheren Anstieg in den defizienten Zellen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass HIF-1 die p53-abhängige Genexpression in murinen Keratinozyten beeinflusst.

3.3 UVB-abhängige Proteininstabilität von HIF-1 α und die Auswirkung auf die Expression von NER-Proteinen

In murinen Keratinozyten spielt HIF-1 α eine essentielle Rolle bei der Regulation der Expression von Reparaturgenen. Da dessen Aktivität stark mit der Stabilität verknüpft ist wurde in den nächsten Experimenten die Frage geklärt ob UVB-Strahlung die Stabilität von HIF-1 α modulieren kann. Ebenso wurde mittels Western Blot die Expression der transkriptionell HIF-1 abhängig regulierten Gene CSA, CSB, XPB und XPG analysiert. Für diese Untersuchungen wurden murine HIF-1 α Wildtyp- und HIF-1 α defiziente Keratinozyten mit UVB bestrahlt, nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und in Hinblick auf die Proteinmenge mittels Western Blot analysiert (Abb. 7).



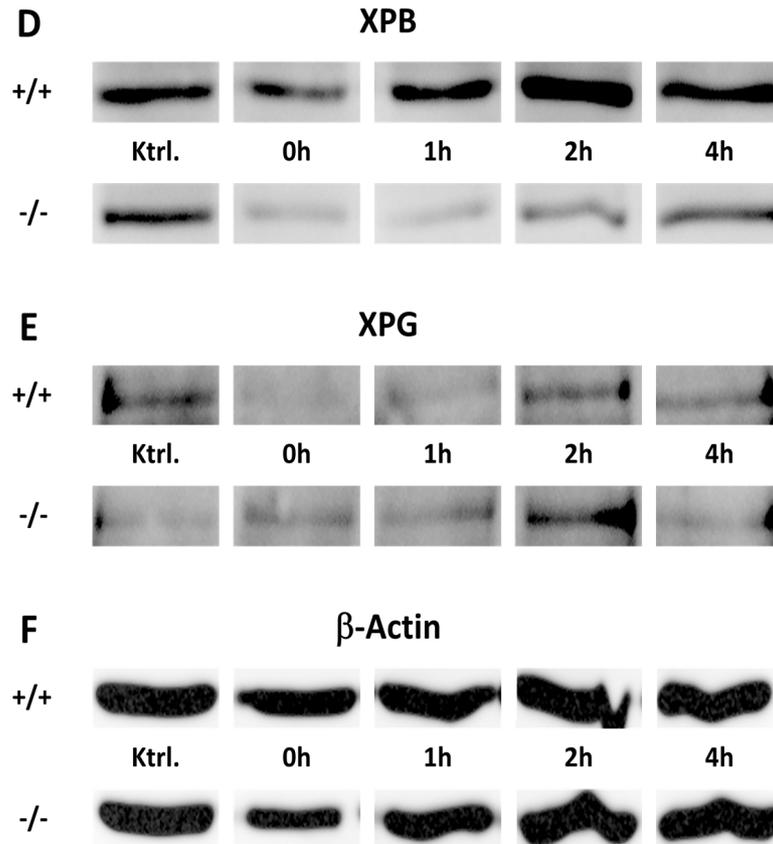


Abbildung 7: UVB-abhängige Expression von HIF-1 α , CSA, CSB, XPB und XPG in HIF-1 α +/+ und HIF-1 α -/- Mauskeratinozyten . Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 20 mJ/cm² bestrahlt und nach 0 h, 1 h, 2 h und 4 h mittels Western-Blot analysiert. Für jedes Protein ist ein Western Blot exemplarisch dargestellt. Als Transferkontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Wie in Abbildung 7A zu sehen ist, moduliert UVB-Strahlung die HIF-1 α Stabilität in murinen Keratinozyten. Es wurde ein deutlicher Abfall der Proteinmenge vom basalen Wert unmittelbar bzw. 1 h nach Bestrahlung beobachtet. Zwei Stunden nach Bestrahlung stieg die Konzentration stark, so dass sie den basalen Wert deutlich überschritt. Nach vier Stunden war wiederum ein leichter Abfall zu beobachten. Für HIF-1 α -/- Zellen wurde wie erwartet keine Bande detektiert. Die CSA-Proteinmenge blieb innerhalb der ersten Stunde nach Behandlung konstant gefolgt von einem Anstieg nach zwei Stunden. Murine HIF-1 α defiziente Keratinozyten zeigten im Vergleich eine deutlich geringere basale Expression, die im zeitlichen Verlauf erst stark abfiel und danach leicht anstieg. Auch hier ist zwei Stunden nach Bestrahlung ein Maximum zu beobachten, allerdings wurde im gesamten Verlauf eine deutlich geringere Proteinmenge im Vergleich zu den profizienten Zellen erfasst (Abb. 7B). Für CSB zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Auch hier war kein Abfall nach den ersten beiden Zeitpunkten zu beobachten, erst nach zwei Stunden wurde die maximale Konzentration erreicht. In HIF-1 α defizienten Mauskeratinozyten war die basale Menge an CSB ähnlich dem der

Wildtypzellen. Im UVB-abhängigen zeitlichen Verlauf fiel die Proteinmenge aber stark ab und stieg erst nach zwei Stunden an, erreichte allerdings nicht mehr die basale Ausgangskonzentration (Abb. 7C). In Abbildung 7D ist der zeitliche Verlauf von XPB dargestellt. In profizienten Zellen wurde eine konstante Proteinmenge für den 0h-, 1h- und 4h-Wert beobachtet. Zwei Stunden nach Bestrahlung zeigte sich eine starke Erhöhung. Ein starker Abfall wurde in defizienten Keratinozyten analysiert. Hier lag die Menge des XPB-Proteins konstant unter der von Wildtypzellen. Die Proteinkonzentration von XPG fiel in HIF-1 α profizienten Zellen kurze Zeit nach Bestrahlung ab und erreicht nach zwei bzw. vier Stunden das Ausgangsniveau. In defizienten Zellen war die konstitutive Menge an XPG-Protein gering erreichte allerdings nach zwei Stunden ein Maximum (Abb 7E).

3.4. Einfluss von HIF-1 α auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in murinen Keratinozyten

Die durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, dass HIF-1 die UVB-vermittelte Expression von NER-Genen in murinen Keratinozyten reguliert. Nachfolgend sollte analysiert werden, inwiefern sich diese differentielle Genexpression direkt auf die Reparatur UVB-induzierter DNS-Schäden auswirkt. Dazu wurden Wildtyp- und HIF-1 α defiziente Keratinozyten mit UVB bestrahlt und unmittelbar bzw. 24 h nach Bestrahlung mittel South-Western-Slot Blot bezüglich ihres CPD-Gehalts untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

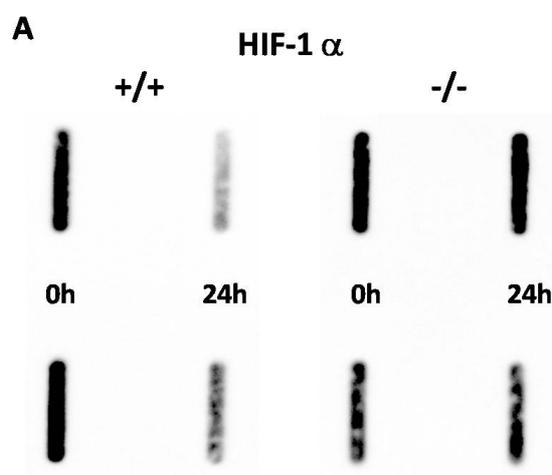


Abbildung 8: Reparatur von CPD-Addukten nach UVB-Bestrahlung in HIF-1 α +/+ und HIF-1 α -/- Mauskeratinozyten . Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 20 mJ/cm² bestrahlt und nach 0h und 24h mittels South-Western-Slot Blot analysiert. Dargestellt sind Duplikate, die untereinander aufgeführt sind.

HIF-1 α profiziente Mauskeratinozyten zeigten eine deutliche Reparatur von CPD's nach 24 h. Es wurde eine Reduktion der CPD-Menge von ca. 50 % des Ausgangsschadens beobachtet. In defizienten Zellen wurde keine Reduktion des Ausgangsschadens detektiert.

Die beschriebenen Experimente zeigen einen deutlichen Einfluss von HIF-1 α auf die UVB-induzierte Zellschädigung, insbesondere auf die DNS-Reparatur, aber auch auf den p21-vermittelten Zellzyklusarrest. Da in der Literatur bereits beschrieben ist, dass UVB induzierte DNS-Addukte in Tumorsuppressorgenen in direktem Zusammenhang mit Photokarzinogenese stehen (Brash und Ponten, 1998), ist zu vermuten, dass HIF-1 α bei diesem Prozess von Bedeutung ist.

3.5 Die Bedeutung von HIF-1 α in der UVB-induzierten Photokarzinogenese in C57/Bl6 Mäusen

3.5.1 Bestrahlungsprotokoll

Um die physiologische Bedeutung von HIF-1 α in der UVB-induzierten Photokarzinogenese zu untersuchen, wurde eine *in vivo* Studie an dem in 2.4.1 beschriebenen Mausmodell durchgeführt. Für den Versuch wurden Gruppen aus sechs Tieren zusammengestellt, um eine statistische Auswertung der zu erzielenden Ergebnisse sicherzustellen. Abbildung 9 zeigt das verwendete Bestrahlungsprotokoll für das beschriebene Karzinogeneseexperiment.

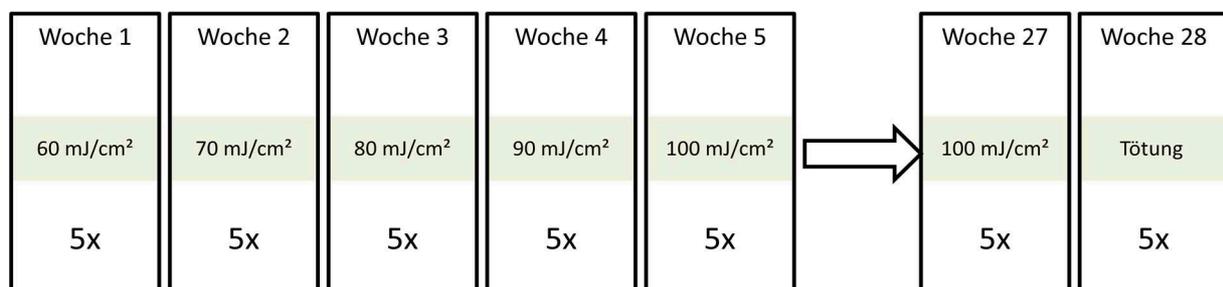


Abbildung 9: Bestrahlungsprotokoll Karzinogeneseversuch in C57 BL/6 Wildtyp- und HIF-1 α defizienten Mäusen. HIF-1 α Wildtyp und HIF-1 α Knockoutmäuse wurden 5x pro Woche mit einer Dosis von 60, 70, 80, 90 oder 100 mJ/cm² UVB bestrahlt. In Woche 28 wurde 24 h nach der letzten Bestrahlung das Experiment beendet und die Mäuse mittels hochprozentiger CO₂-Begasung getötet.

Das Bestrahlungsprotokoll sah eine langsame Steigerung der UVB-Dosis von 60 mJ/cm² auf 100 mJ/cm² innerhalb der ersten fünf Wochen vor. Dies erfolgte um die Mäuse langsam an die Maximaldosis zu gewöhnen und so unerwünschten Hautreaktionen vorzubeugen. Auf eine weitere Steigerung der Bestrahlungsdosis wurde verzichtet, da die vorher beschriebenen *in vitro* Daten eine erhöhte Empfindlichkeit HIF-1 α defizienter Tiere vermuten ließ. Die Bestrahlung wurde fünf Mal pro Woche mit einer anschließenden Pause von zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Diese zweitägige Unterbrechung der Bestrahlung diente als Regenerationsphase. Um eine effektive Bestrahlung zu gewährleisten, wurden die Haare auf dem Rücken der Tiere zweimal wöchentlich mit einem elektrischen Haarschneider entfernt. Unerwünschte Augenreizungen oder Augenschäden wurden durch die Applikation einer Dexpanthenol-haltigen Salbe vermieden. In Woche 28 wurden die Tiere 24 h nach der letzten Behandlung durch hochprozentige CO₂-Begasung getötet.

3.5.2 Aufzeichnung der Gewichtsentwicklung

Um den Gesundheitszustand der Mäuse zu überwachen, wurden die Tiere alle vier Wochen gewogen und die Gewichtsentwicklung aufgezeichnet (Abb. 10).

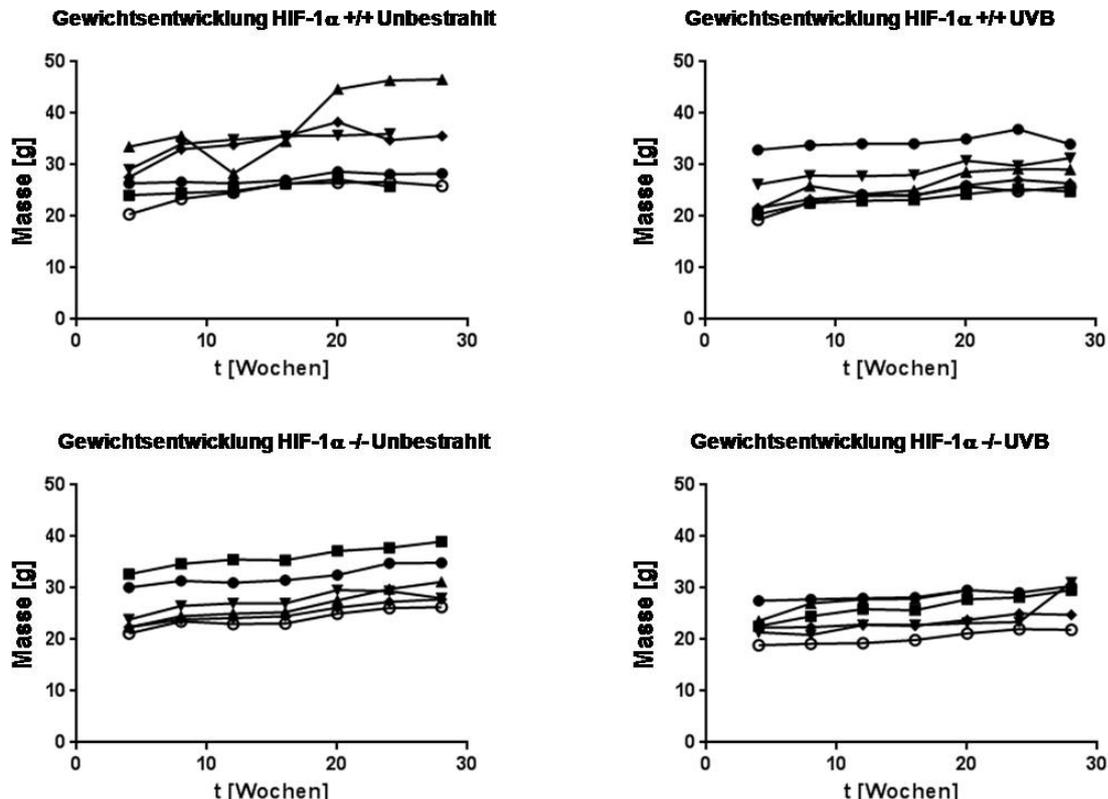


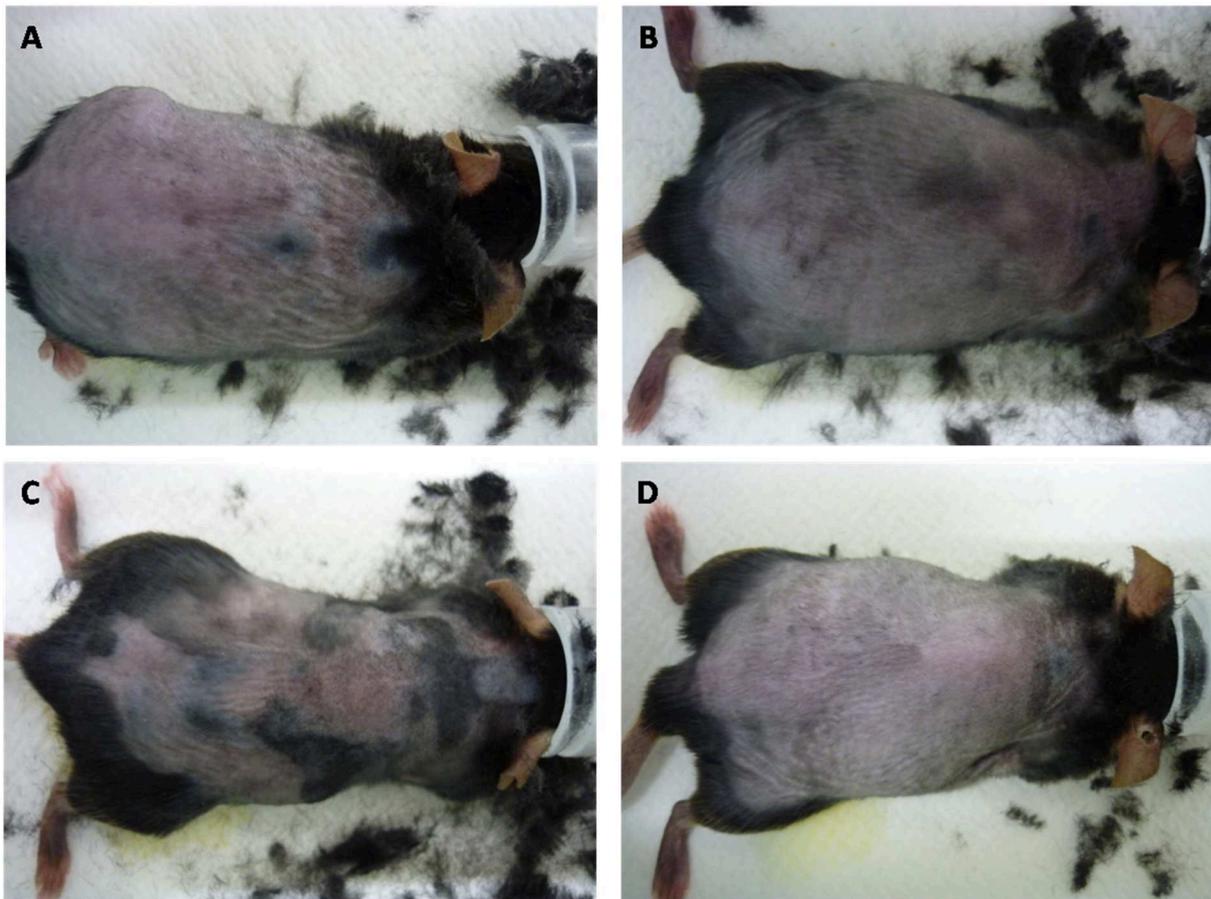
Abbildung 10: Gewichtsentwicklung innerhalb des 28-wöchigen Photokarzinogenese-Versuchs. Dargestellt sind die absoluten Tiergewichte für jedes Individuum innerhalb der vier Behandlungsgruppen. Die Dokumentation des Gewichts erfolgte alle vier Wochen.

Im gesamten Verlauf des Versuches und in allen Gruppen ist keine bedeutsame Reduktion des Gewichts zu beobachten. Dies wies auf eine gute Verträglichkeit der Behandlung hin.

3.5.3 Zeitliche fotografische Dokumentation der Versuchstiere

Um eine zeitliche und visuelle Dokumentation der Tiere zu gewährleisten, wurden mittels einer Digitalkamera in den Wochen 12 und Woche 28 Fotos von der Rückenhaut gemacht. Hierfür wurden nach zwölf Wochen die Tiere mit Hilfe eines Narkosegerätes betäubt, um etwaige Bewegung der Mäuse auszuschließen. In Woche 28 konnte auf eine Narkose verzichtet werden, da die Versuchstiere bereits zuvor durch hochprozentige CO₂-Begasung getötet wurden.

In Abbildung 11 sind exemplarisch Fotos für jeweils 2 Tiere pro Gruppe aus Woche 12 dargestellt.



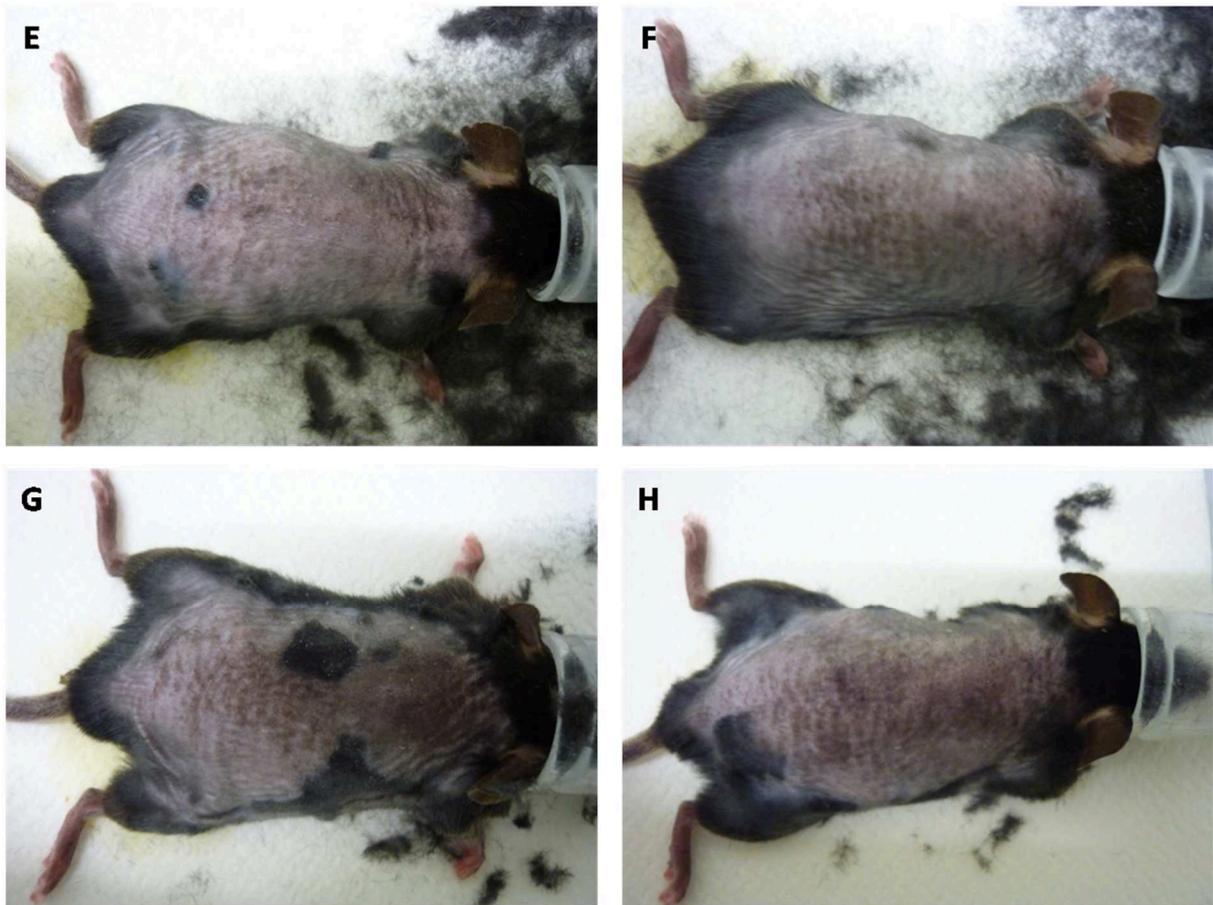


Abbildung 11: Makroskopisches Erscheinungsbild der Haut von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen nach 12-wöchiger UVB-Bestrahlung. Dargestellt sind jeweils zwei Tiere aus der Gruppe HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, B), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (C, D), HIF-1 α +/+ UVB (E, F) und HIF-1 α -/- UVB (G,H). Die Tiere wurden während der Aufnahme mittels eines Narkosegerätes ruhig gestellt.

Abbildung 11A und B zeigen unbehandelte HIF-1 α profiziente Mäuse. Makroskopisch konnten, wie auch bei den unbehandelten HIF-1 α defizienten Tieren (Abb. 11C,D) keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Die UVB-behandelten Mäuse zeigten deutliche Anzeichen erhöhter Pigmentierung und Faltenbildung (Abb. 11E-H). Hierbei war die Pigmentierung der behandelten defizienten Tiere im Vergleich zu den behandelten profizienten Tieren erhöht. Bei HIF-1 α ^f/_f Mäusen wurde eine starke Faltenbildung beobachtet. In Abbildung 12 sind exemplarisch Fotos für jeweils 2 Tiere pro Gruppe aus Woche 28 dargestellt.

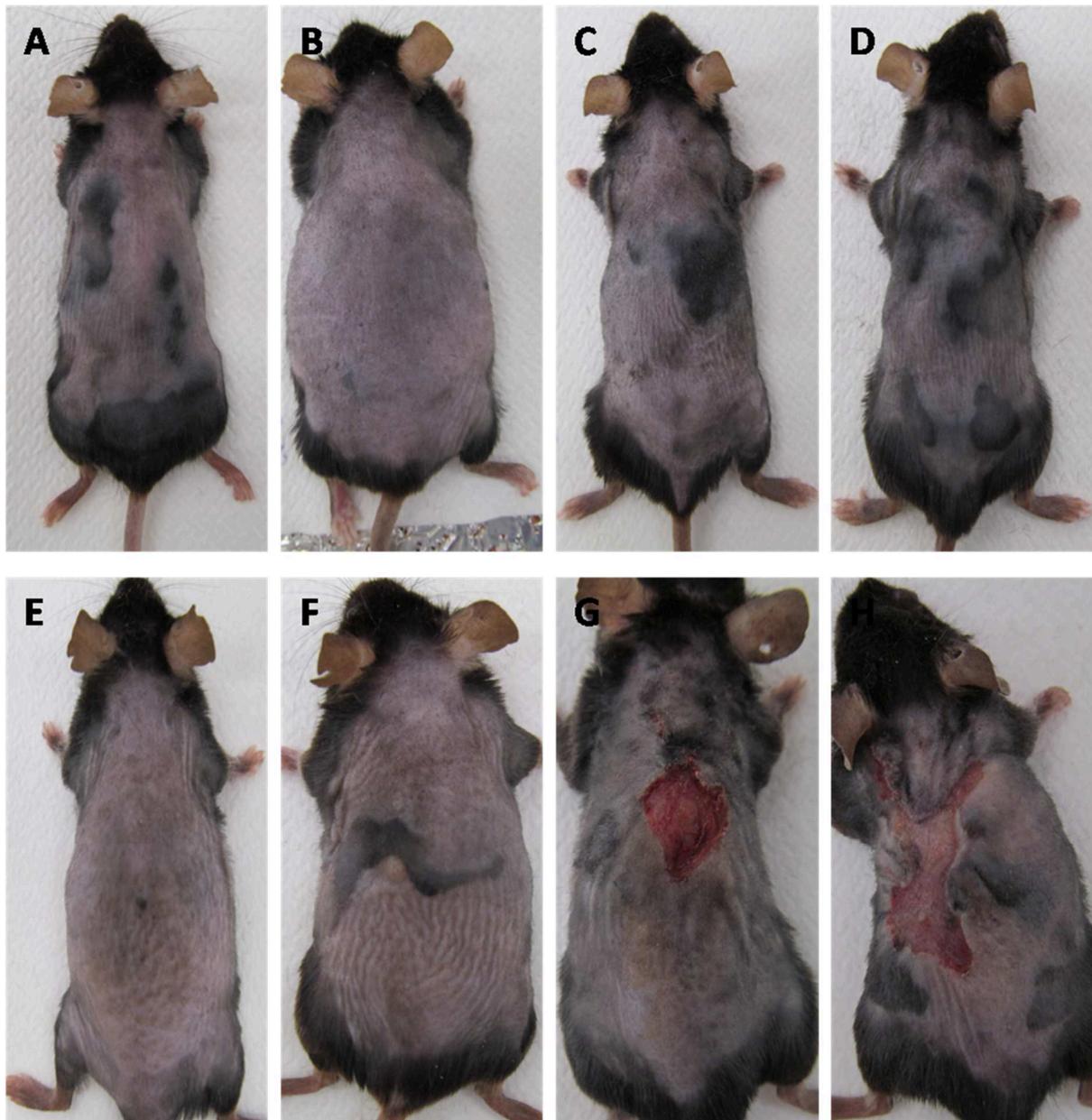


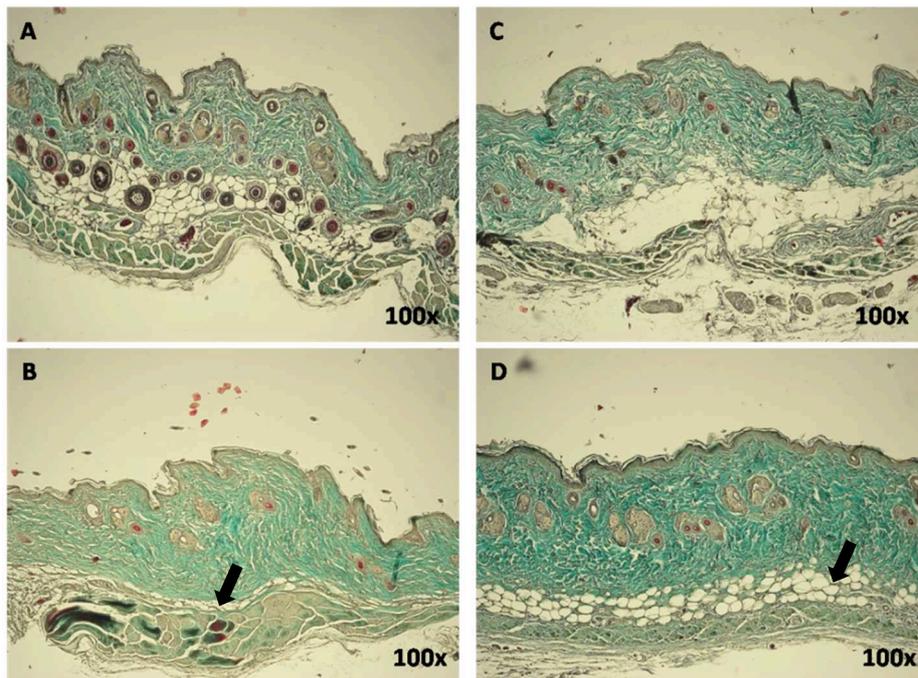
Abbildung 12: Makroskopisches Erscheinungsbild der Haut von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung. Dargestellt sind jeweils zwei Tiere aus der Gruppe HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, B), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (C, D), HIF-1 α +/+ UVB (E, F) und HIF-1 α -/- UVB (G,H).Die Tiere wurden in Woche 28 vor der Aufnahme durch hochprozentige CO₂-Begasung getötet.

Abbildung 12 A und B zeigen unbehandelte HIF-1 α profiziente Tiere, Abbildung 12C und D HIF-1 α defiziente Tiere. Bis auf leichte Rötungen durch die durchgeführte Rasur waren makroskopisch keine Auffälligkeiten zu beobachten. Bestrahlte Wildtyp-tiere wiesen eine leichte Pigmentierung und eine verstärkte Faltenbildung auf (Abb. 12E,F). Gleiche Behandlung löste in HIF-1 α defizienten Tiere eine vermehrte Bildung von tiefen Wunden aus (Abb 12G, H). Ab Woche 25 / 26 waren alle bestrahlten HIF-1 α +^f/_f * K5 Cre Tiere betroffen. Durch Aussetzen der Bestrahlung und Behandlung der Wunden

mit Gewebekleber konnte keine Besserung erzielt werden. Trat eine zu große Wundbildung auf, wurden die Tiere bereits vor Woche 28 durch hochprozentige CO₂-Begasung getötet. Da nach 3-4 wöchiger Behandlung keine Besserung des Hautbildes auftrat, wurde daraufhin der Versuch abgebrochen. Eine makroskopische Formation von Hauttumoren konnte nicht beobachtet werden.

3.5.4 Masson Goldner-Färbung

Um eine Aussage über die histologische Veränderung der Haut zu treffen wurde zuerst eine Übersichtsfärbung von Paraffinschnitten durchgeführt. Hierfür wurde die Masson Goldner-Färbung gewählt. In Abbildung 13 sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der Masson Goldner-Färbung für jeweils ein Tiere pro Gruppe in 100- und 200-facher Vergrößerung dargestellt.



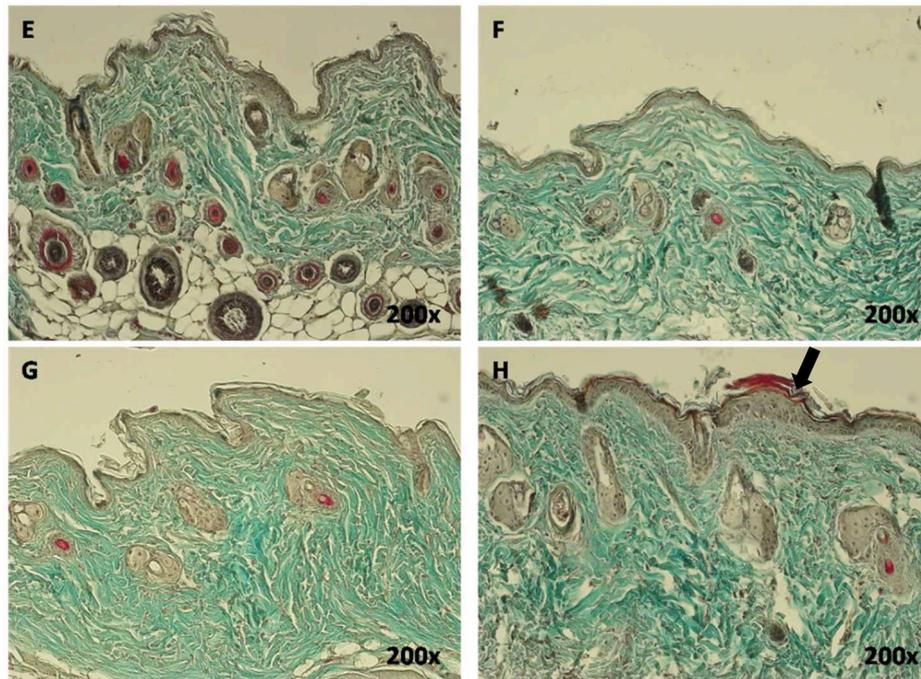


Abbildung 13: Masson Goldner Färbung von HIF-1 α Wildtyp- und Knockoutmäusen. Dargestellt ist die Masson Goldner-Färbung von je einem Tier pro Gruppe in 100- und 200-facher Vergrößerung. HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, E), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (B, F), HIF-1 α +/+ UVB (C, G) und HIF-1 α -/- UVB (D,H).

Unbehandelte HIF-1 α profiziente (Abb.13A, E) und defiziente Tiere (Abb.13B, F) zeigten keine anatomischen Auffälligkeiten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war in bestrahlten Wildtypmäusen (Abb.13C, G) eine leichte Verdickung der Epidermis zu beobachten, die in defizienten Tieren (Abb.13D, H) ausgeprägter war (siehe Pfeil Abb.13H). Darüber hinaus konnte in allen bestrahlten Tieren eine deutliche Reduktion des subkutanen Fettgewebes festgestellt werden (siehe Pfeil Abb.13B, D).

3.5.5 Fontana Masson-Färbung

In Bestrahlungswoche 12 wurde bereits eine erhöhte Pigmentierung in den Versuchstieren analysiert. Es wurde nach Beendigung des Experiments mittels Fontana Masson-Färbung die Lokalisation und Intensität von Melaninpigmenten untersucht (Abb. 14).

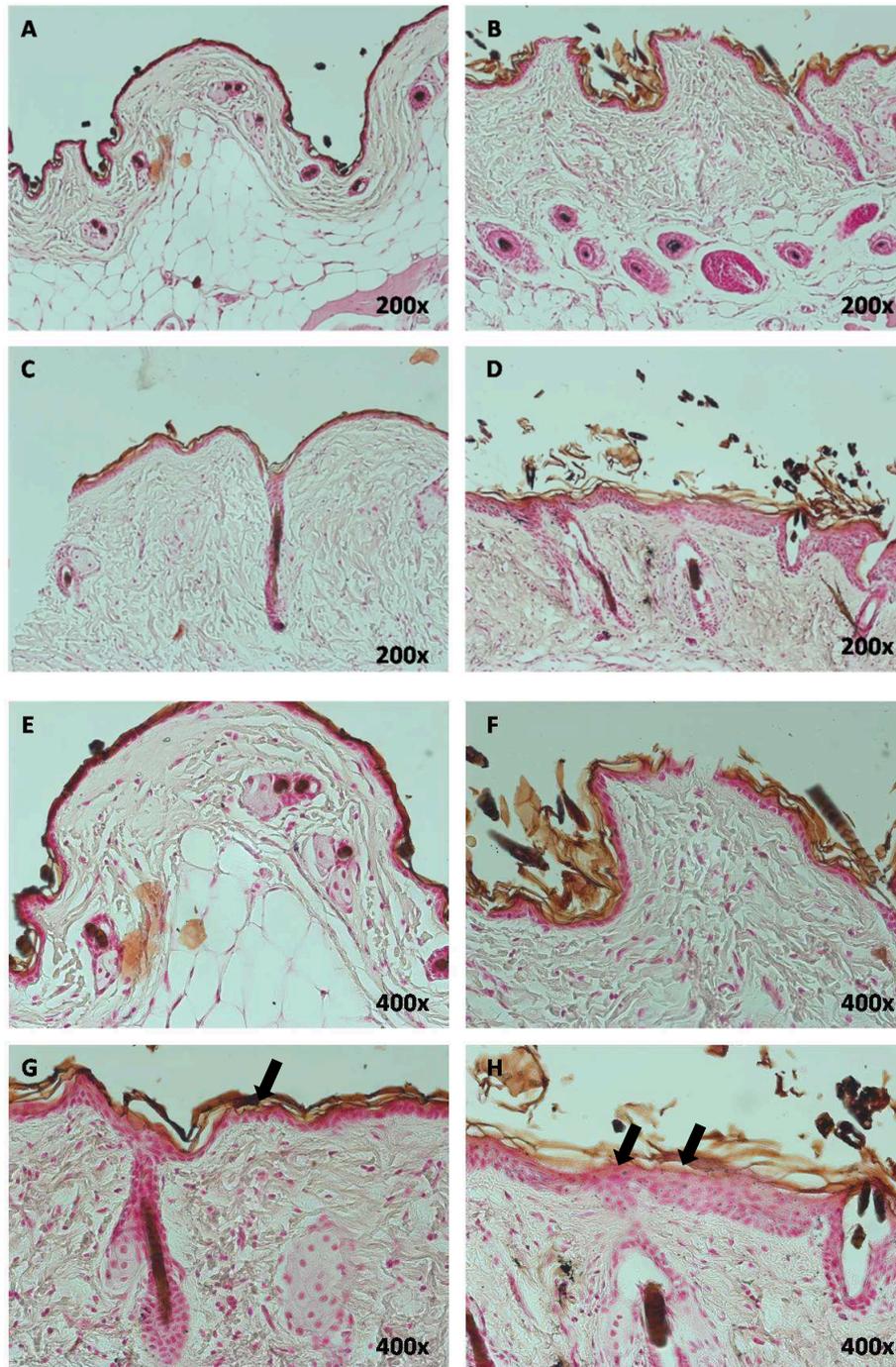


Abbildung 14: Fontana Masson-Färbung HIF-1 α Wildtyp- und Knockoutmäusen. Dargestellt ist die Fontana Masson-Färbung von je einem Tier pro Gruppe in 200- und 400-facher Vergrößerung. HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, E), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (B, F), HIF-1 α +/+ UVB (C, G) und HIF-1 α -/- UVB (D,H).

Abbildung 14 stellt die Ergebnisse der Fontana Masson-Färbung dar. In Kontrolltieren konnten keine Melaninpigmente analysiert werden (Abb. 14 A, B, E, F). Abbildung 14G und H zeigen für bestrahlte Versuchstiere hingegen eine Färbung (siehe Pfeil Abb. 14G, H). Hierbei entwickelten HIF-1 α defiziente Tiere eine deutlich vermehrte Akkumulation von Melaninpigmenten in der Epidermis im

Gegensatz zu bestrahlten Wildtyptieren. Dies weist darauf hin, dass die Pigmente sich nicht homogen in der Epidermis verteilen, sondern an bestimmten Stellen akkumulieren.

Die erhobenen Daten dieses Tierversuches konnten den Einfluss von HIF-1 α auf die Photokarzinogenese nicht analysieren. Die eingetretene UVB-induzierte Wundbildung in HIF-1 α -/- Tieren trat vor der Formation von strahlungsbedingten Hauttumoren auf. Da von einer erhöhten UVB-Empfindlichkeit HIF-1 α defizienter Mäuse ausgegangen wurde war die maximale Bestrahlungsdosis und die Bestrahlungsdauer nicht ausreichend um eine Formation von Hauttumoren in Wildtyptieren auszulösen. Die wöchentliche Dokumentation der Tiere und anschließende Auswertung zeigten Genotyp-bedingte Unterschiede. Besonders fiel hierbei die konsistente verstärkte Pigmentierung defizienter Mäuse aber auch die erhöhte Faltenbildung profizienter Tiere auf. Dies weist auf eine elementare Rolle von HIF-1 in der UVB-induzierten Faltenbildung und Pigmentierung hin. Darüber hinaus lässt die Wundbildung HIF-1 α defizienter Mäuse auf eine erhöhte UV-Sensitivität schließen.

3.6 Die Bedeutung von HIF-1 α in der UVB-induzierten Hautalterung in C57/Bl6 Mäusen

3.6.1 Bestrahlungsprotokoll

Um den Einfluss von HIF-1 α auf die UVB-induzierte Faltenbildung und Pigmentierung zu untersuchen wurde eine zweite *in vivo*-Studie an dem in 2.4.1 beschriebenen Mausmodell durchgeführt. Für den zweiten Tierversuch wurde eine Gruppengröße von zehn Tieren gewählt, um eine statistische Auswertung der zu erzielenden Ergebnisse sicherzustellen. Abbildung 15 zeigt das verwendete Bestrahlungsprotokoll für das beschriebene Hautalterungsexperiment.

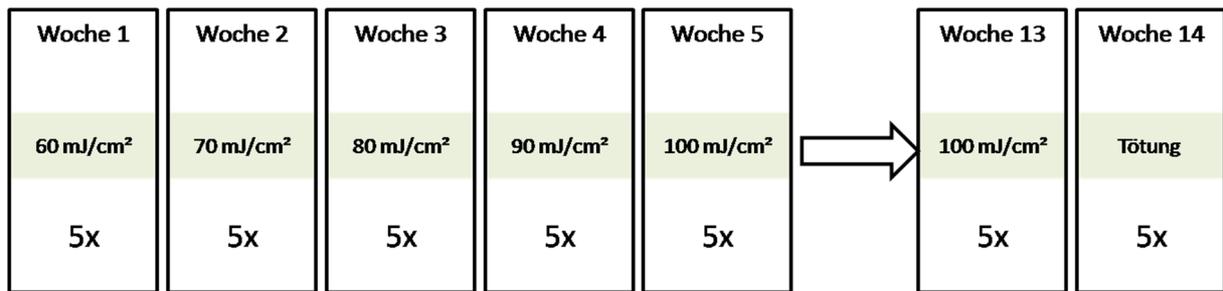


Abbildung 15: Bestrahlungsprotokoll Hautalterungsversuch in C57 BL/6 HIF-1 α Wildtyp- und Knockoutmäusen. HIF-1 α Wildtyp und HIF-1 α Knockoutmäuse wurden 5x pro Woche mit einer Dosis von 60, 70, 80, 90 oder 100 mJ/cm² UVB bestrahlt. In Woche 14 wurde 24 h nach der letzten Bestrahlung das Experiment beendet und die Mäuse mittels hochprozentiger CO₂-Begasung getötet.

Wie im ersten beschriebenen Versuch wurde mittels langsamer Steigerung der UVB-Dosis eine Gewöhnung an die Maximaldosis gewährleistet. Die Bestrahlung erfolgte fünfmal pro Woche mit einer anschließenden Pause von zwei Tagen, um eine Regenerationsphase der Haut zu garantieren. Die Rückenbehaarung der Versuchstiere wurde zweimal wöchentlich entfernt, vor jeder Bestrahlung wurde eine Dexpanthenol-haltige Salbe auf die Augen der Tiere aufgetragen. In Woche 14 wurde das Experiment 24 h nach der letzten Bestrahlung beendet. Die Versuchstiere wurden mittels hochprozentiger CO₂-Begasung getötet.

3.6.2 Zeitliche fotografische Dokumentation der Versuchstiere

Um die Pigmentierung und Faltenbildung der bestrahlten Tiere zu dokumentieren wurde in den Wochen 9, 11 und 14 mittels einer Digitalkamera die Rückenhaut fotografiert. In den Wochen 9 und 11 wurden die bestrahlten Tiere mit Hilfe eines Narkosegerätes betäubt um etwaige Bewegungen der Tiere auszuschließen. Am Ende des Experimentes wurden auch die Kontrolltiere fotografiert. Die Entwicklung der Pigmentierung und Faltenbildung ist in Abbildung 16 dargestellt.



Abbildung 16: Makroskopisches Erscheinungsbild der Haut von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen . Dargestellt sind jeweils zwei Tiere aus der Gruppe HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (B), HIF-1 α +/+ UVB (C, D) und HIF-1 α -/- UVB (E, F). Die Aufnahmen der Kontrolltiere stammen aus Woche 14, die Aufnahmen der UVB bestrahlten Tiere sind in chronologischer Reihenfolge von Woche 9 über Woche 11 bis Woche 14 geordnet. Die Tiere wurden in den Wochen 9 und 11 mittels eines Narkosegerätes ruhig gestellt. In Woche 14 sind die Tiere vor der Aufnahme durch hochprozentige CO₂-Begasung getötet worden.

Versuchstiere aus der Kontrollgruppe wiesen keine Faltenbildung oder Pigmentierung auf (Abb. 16A, B) Eine leichte Rötung der Haut entstand durch die Entfernung der Rückenbehaarung. Die UVB-behandelten Tiere zeigten deutliche Hautalterungsmerkmale. In HIF-1 α +/+ Mäusen wurde eine verstärkte Faltenbildung, beginnend in Woche 9, beobachtet wobei in Woche 14 die stärkste

Ausprägung beobachtet wurde. Alle Individuen zeigten nur eine schwache Pigmentierung der Rückenhaut (Abb. 16 C,D). Im Gegensatz hierzu war diese in HIF-1 α -/- Tieren stark ausgeprägt. Bereits nach neun Wochen war eine spezifische Pigmentierung im Bereich der Wirbelsäule zu beobachten, wobei in Woche 14 die deutlichsten Veränderungen detektiert wurden. Die Faltenbildung setzte bei diesen Tieren deutlich verzögert ein. Auch nach Beendigung des Experiments wurde eine deutlich geringere Ausprägung im Vergleich zu Wildtyptieren detektiert (Abb. 16 E, F).

Die Faltenbildung der Versuchstiere wurde mit Hilfe einer hochauflösenden UVA-Kamera mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden mehrere Fotos der Rückenhaut an bestimmten Stellen gemacht, die eine genaue Analyse der Hautstruktur erlaubten. In Abbildung 17 ist exemplarisch die Hautstruktur mehrerer Versuchstiere dargestellt.

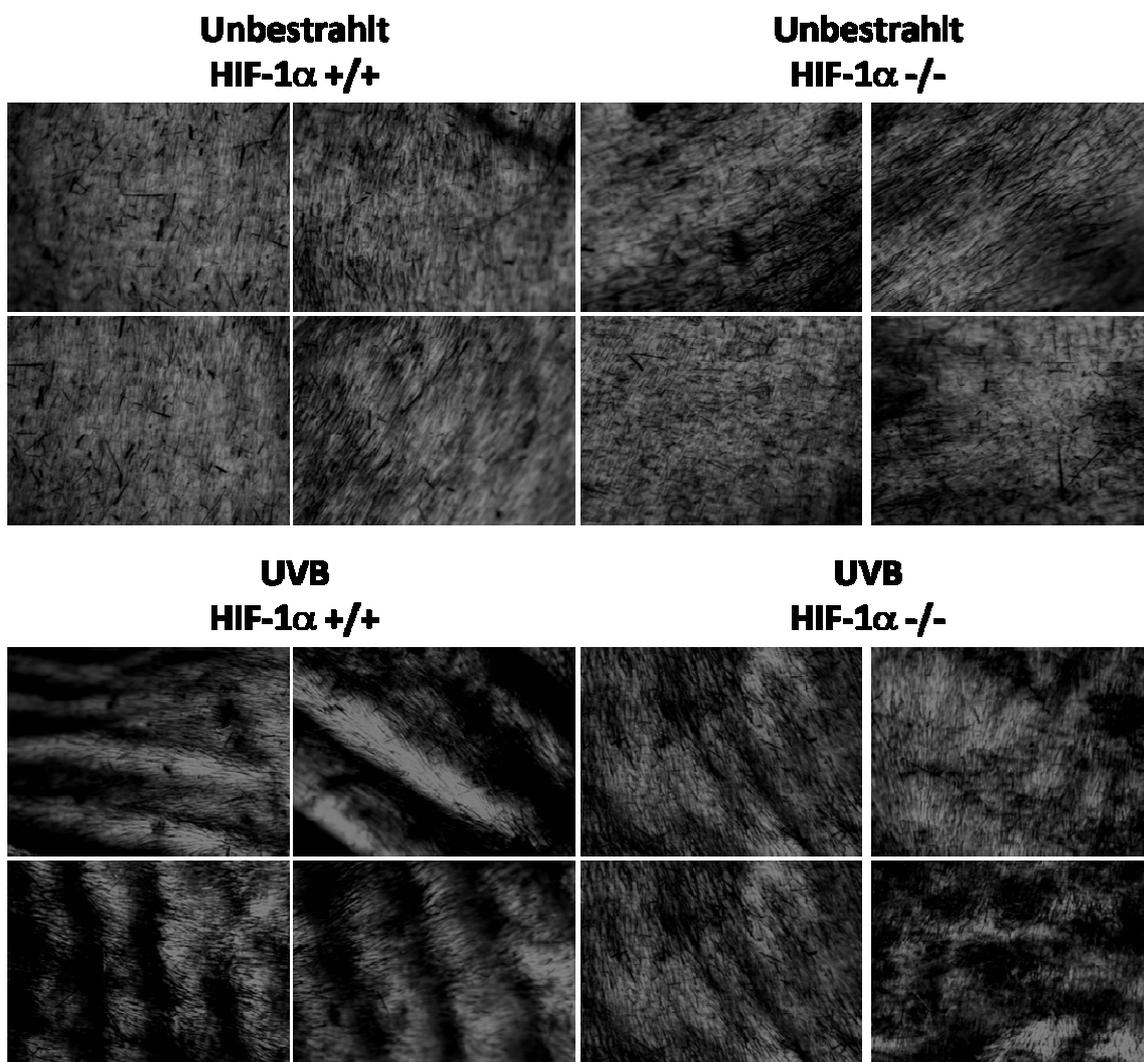


Abbildung 17: Faltenbildung und Hautstruktur von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung. Dargestellt sind exemplarisch vier Fotos aus den Gruppen HIF-1 α +/+ Unbestrahlt, HIF-1 α -/- Unbestrahlt, HIF-1 α +/+ UVB und HIF-1 α -/- UVB.

Innerhalb der Aufnahmen der Kontrolltiere wurden keine auffälligen Hautveränderungen analysiert. Die Hautstruktur der bestrahlten Tiere zeigte jedoch eine deutliche Faltenbildung mit auffallenden Vertiefungen. Diese Symptomatik war in Wildtyptieren deutlich stärker ausgeprägt. Eine Analyse zeigte, dass nicht nur eine größere Anzahl von Falten beobachtet wurde, sondern auch die Faltentiefe ausgeprägter war. In defizienten Tieren wurde zudem bei mehreren Individuen eine starke Hautschuppung beobachtet.

Chronische UV-Strahlung kann nicht nur Faltenbildung hervorrufen, sondern die Haut auch insoweit schädigen, dass ihre Barrierefunktion nur noch eingeschränkt funktioniert. Eine derart beeinträchtigte Barrierefunktion der Haut wird bekanntermaßen mit vermehrter Schuppung in Verbindung gebracht (Rawlings & Voegeli, 2013). Um zu untersuchen, inwieweit sich das Fehlen von HIF-1 α auf die Barrierefunktion der Haut auswirkt, wurde der transepidermale Wasserverlust von chronisch UVB-bestrahlten sowie unbestrahlten HIF-1 α profizienten und defizienten Mäusen mit Hilfe eines TEWAmeters gemessen.

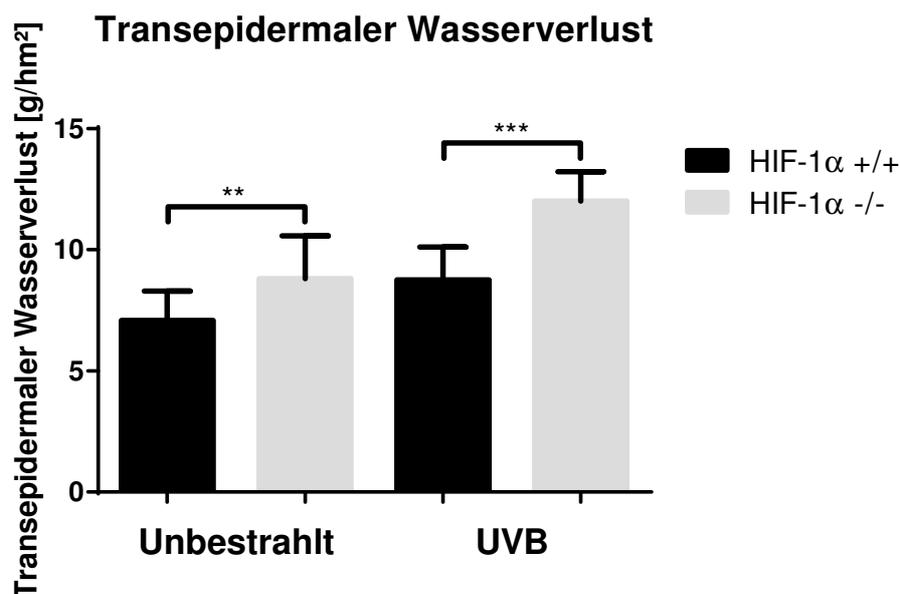


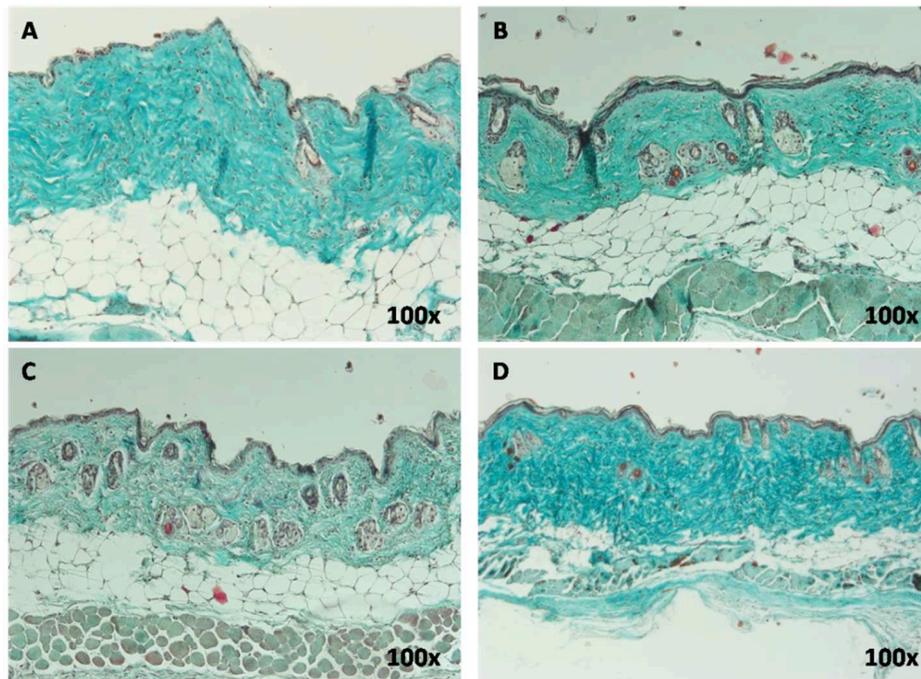
Abbildung 18: Messung des transepidermalen Wasserverlusts in unbehandelten und chronisch UVB-bestrahlten HIF-1 α +/+ bzw. HIF-1 α -/- Mäusen. Nach 14-wöchiger UVB-Bestrahlung wurde der transepidermale Wasserverlust in zehn Tieren pro Gruppe mit Hilfe eines Tewameters gemessen. Dargestellt sind die absoluten Mittelwerte +SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Bereits in unbestrahltem Zustand wurde ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen beobachtet. Wildtyptiere verloren im Durchschnitt bis zu 7,5 g/hm² H₂O, wohingegen bei HIF-1 α -/- Mäusen ein Anstieg auf bis zu 9 g/hm² beobachtet wurde. Nach 14-wöchiger UVB-

Bestrahlung ist ein Anstieg in beiden Genotypen zu beobachten. In HIF-1 α profizienten Tieren stieg der Verlust auf bis zu 9 g/hm² an, was ungefähr dem Wert der unbestrahlten HIF-1 α defizienten Tieren entspricht. In HIF-1 α defizienten Mäusen betrug der durchschnittliche transepidermale Wasserverlust ca. 12,5 g/hm². Der gezeigte Unterschied in beiden Mausstämmen ist hochsignifikant.

3.6.3 Masson Goldner-Färbung

Um eine genauere Aussage über die beobachteten pathologischen Veränderungen treffen zu können, wurde die Maushaut erneut mittels Masson Goldner-Färbung genauer untersucht (Abb.19).



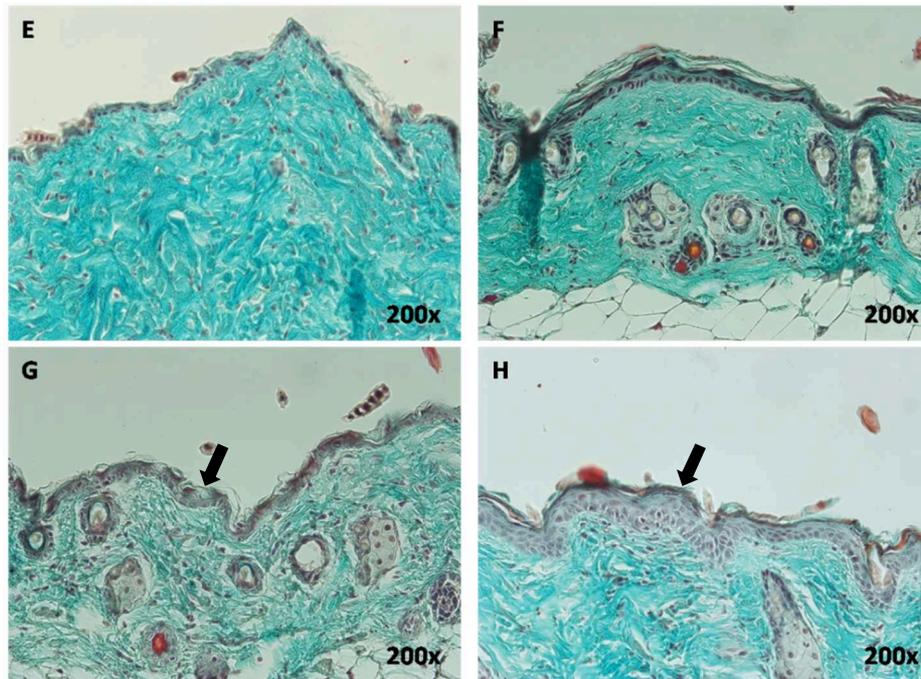


Abbildung 19: Hautstruktur von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung. Dargestellt ist die Masson Goldner-Färbung von je einem Tier pro Gruppe in 100- und 200-facher Vergrößerung. HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, F), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (B, F), HIF-1 α +/+ UVB (C, G) und HIF-1 α -/- UVB (D,H).

Unbehandelte Tiere zeigten keinen Genotyp-spezifischen Unterschied in der Hautstruktur. Sowohl die Struktur des Bindegewebes als auch die der Epidermis waren ohne Auffälligkeiten (Abb. 19A, B, E, F). Nach 24-wöchiger Bestrahlung wurde in Wildtyp-tieren eine leichte Zunahme der Epidermisdicke analysiert (siehe Pfeil Abb.19G). Ein Abbau des Bindegewebes wurde allerdings nicht beobachtet (Abb. 19C, G). Die Hautstruktur von HIF-1 α defizienten Tieren zeichnete sich besonders durch eine UVB-induzierte epidermale Hypertrophie aus (siehe Pfeil Abb.19H). Darüber hinaus wurde in diesen Tieren ein verstärkter Abbau des subkutanen Fettgewebes beobachtet (Abb. 19D).

3.6.4 Fontana Masson-Färbung

Eine genauere Untersuchung der Pigmentierung erfolgte erneut mittels der Fontana Masson-Färbung (Abb. 20).

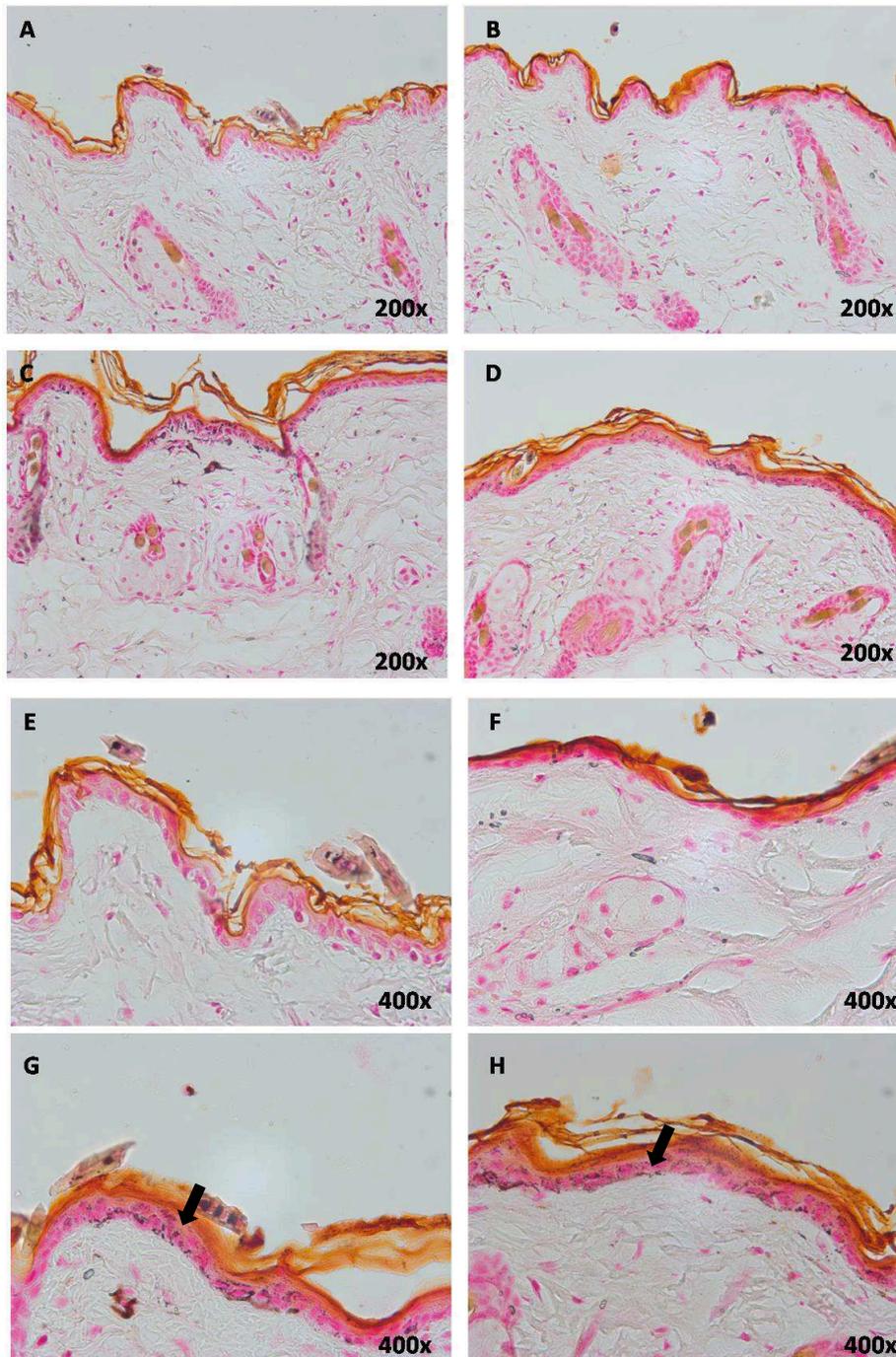


Abbildung 20: Melanin-Verteilung in der Haut von HIF-1 α defizienten und profizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung. Dargestellt ist die Fontana Masson-Färbung von je einem Tier pro Gruppe in 200- und 400-facher Vergrößerung. HIF-1 α +/+ Unbestrahlt (A, E), HIF-1 α -/- Unbestrahlt (B, F), HIF-1 α +/+ UVB (C, G) und HIF-1 α -/- UVB (D,H).

Kontrolltiere zeigten keine Anfärbung von Melaninpigmenten (Abb. 20A, B, E, F). In bestrahlten Tieren ist allerdings eine deutliche Melanin-Färbung zu erkennen. In Wildtyptieren wurde an vereinzelt Stellen eine deutliche Akkumulation von Pigmenten beobachtet (siehe Pfeil Abb.20G). Diese ist allerdings auf wenige epidermale Bereiche beschränkt. HIF-1 α defizienten Tiere hingegen

wiesen diese verstärkte Akkumulation nicht auf, es wurde allerdings eine durchgehende Anfärbung der Epidermis beobachtet (siehe Pfeil; Abb. 20H).

3.7 Einfluss von SAHA auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in murinen CSB-defizienten Mauskeratinozyten

Wie in 3.1 und 3.3 bereits gezeigt, ist HIF-1 α ein essentieller Transkriptionsfaktor bei der Regulation von NER-Proteinen in murinen Keratinozyten. Besonders die UVB-vermittelte Induktion der Proteine CSA und CSB erfolgt in Abhängigkeit von HIF-1 α . Diese Proteine spielen unumstritten eine wichtige Rolle in der Transkriptions-gekoppelten DNS-Reparatur. Ein Zusammenhang zwischen HIF-1 und CSB ist auch bereits aus der Literatur bekannt (Filippi et al., 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CSB eine bedeutende Rolle bei der Zuordnung des Co-Aktivators p300 zwischen HIF-1 und p53 während der hypoxischen Signalantwort spielt. p300 gehört zu den sogenannten Histonacetyltransferasen, Enzymen, die in der Lage sind, Acetylgruppen reversibel auf andere Proteine zu übertragen. Ähnlich wie die Phosphorylierung beeinflusst diese post-translationale Modifikation eines Proteins seine Eigenschaften einschließlich Stabilität, Interaktion mit anderen Proteinen, Aktivität und zelluläre Lokalisation. Diese vielfältigen Einflüsse machen deutlich welche weitreichenden Konsequenzen ein derartiger Mechanismus für die Regulation zellulärer Funktion hat. Es wird sogar davon ausgegangen, dass CSB eine ähnliche Rolle einnimmt, indem es modifizierenden Enzymen einen Zugang zu Histonen erleichtert (Citterio et al., 1998; Beerens et al., 2005). Die Entfernung der Acetylgruppen wird wiederum von einer anderen Enzymfamilie, den sogenannten Histondeacetylasen (HDACs) katalysiert. Diese Befunde deuten an, dass CSB über epigenetische Modifikationen zelluläre Prozesse wie z.B. die DNS-Reparatur beeinflussen könnte und selbst durch HIF-1 gesteuert werden kann.

In unserer Arbeitsgruppe wird bereits seit langer Zeit der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf CSB und CSA defiziente Zellen untersucht. Unveröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung CSB-defizienter Zellen mit HDAC-Inhibitoren zumindest zum Teil zu einer Revertierung des Phänotyps führt. Besonders der HDAC-Inhibitor SAHA zeigt hier einen großen Effekt.

Um zu untersuchen, ob CSB die DNS-Reparatur über epigenetische Modifikation der Proteinacetylierung steuert, wurden CSB-profiziente und -defiziente murine Keratinozyten mit SAHA behandelt und die Reparatur von UVB-induzierten CPDs mittels South-Western-Slot Blot in diesen Zellen analysiert (Abb. 21).

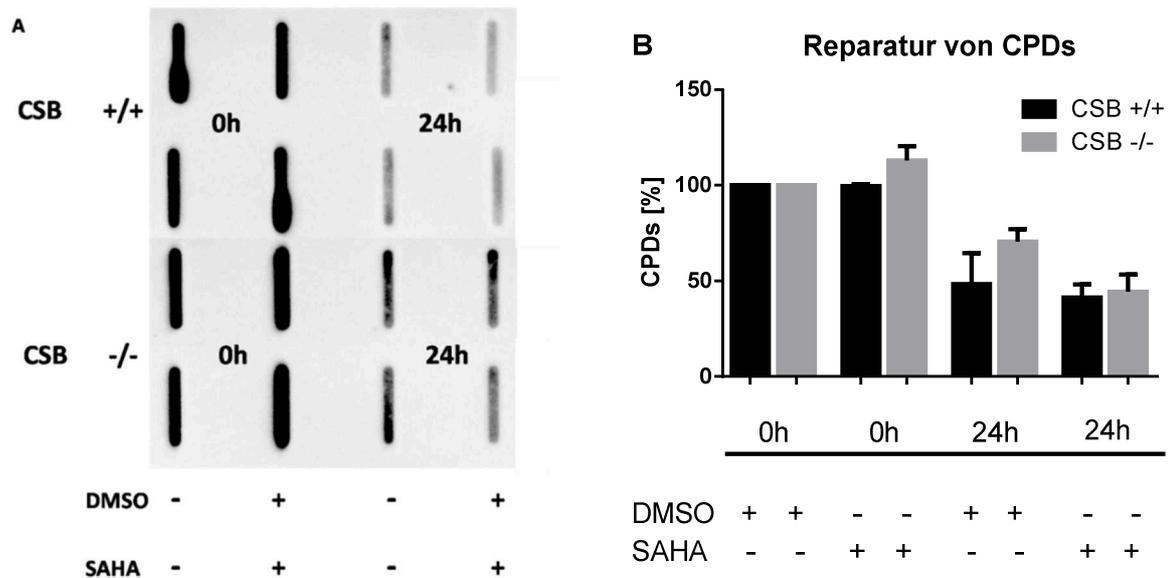


Abbildung 21: Reparatur von CPD-Addukten nach UVB Bestrahlung in CSB-defizienten und profizienten murinen Keratinozyten. CSB +/+ und CSB -/- Mausekeratinozyten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 200 nM SAHA bzw. DMSO vorbehandelt und danach mit 20 mJ/cm² UVB bestrahlt. Nach 0 h oder weiteren 24 h Inkubation mit SAHA bzw. DMSO wurden die Proben mittels South-Western-Slot Blot analysiert. Dargestellt sind Duplikate untereinander. A: exemplarischer South-Western-Slot Blot. B: Densitometrische Auswertung der CPD-Reparatur. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf die 0 h Wildtyp-Probe bzw. 0 h Knockout-Probe.

Wie erwartet zeigen CSB -/- Zellen eine im Vergleich zu CSB +/+ Zellen eine abgeschwächte CPD-Reparatur. In Wildtypzellen waren nach 24 h noch ca. 50 % in HIF-1 α defizienten Zellen noch ca. 70 % CPD's detektierbar. Eine Vorbehandlung mit SAHA führte in CSB +/+ Keratinozyten nur zu einer geringen Senkung des DNS-Schadens auf bis zu 45 %. In defizienten Keratinozyten hingegen war die Anzahl von CPD's auf ca. 50 % gefallen, was einer Reduktion von 20 % entspricht. Eine Vorbehandlung mit DMSO bzw. 200 nM SAHA hatte nach 0 h keinen signifikanten Effekt auf die CPD-Entstehung (Abb. 21A, B).

3.8 Einfluss von SAHA auf die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in humanen transformierten CSB-defizienten Fibroblasten

In CSB-defizienten Keratinozyten wurde durch eine Vorbehandlung mit SAHA eine Reduktion der CPD-Menge nach 24 h auf ca. 50 % beobachtet. Dies entspricht ungefähr der Reparaturkapazität von murinen Wildtypkeratinozyten. Um den Einfluss von SAHA auf die Reparatur in menschlichen

Hautzellen zu untersuchen, wurde im folgenden Experiment der Einfluss auf transformierte humane Fibroblasten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

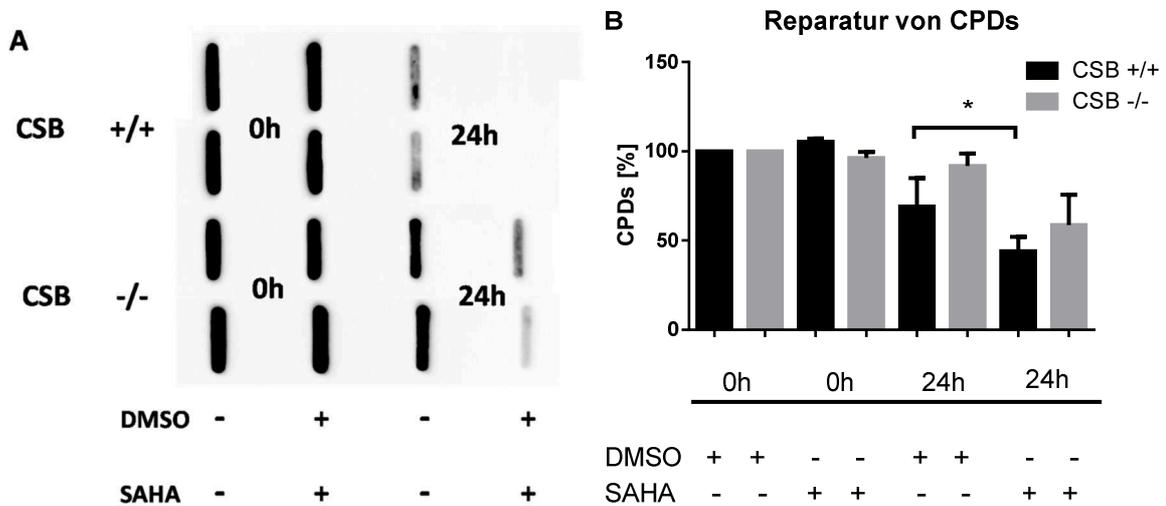


Abbildung 22: Reparatur von CPD-Addukten nach UVB Bestrahlung in CSB-defizienten und profizienten transformierten Fibroblasten. CSB +/+ und CSB -/- transformierte Fibroblasten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 200 nM SAHA bzw. DMSO vorbehandelt und danach mit 20 mJ/cm² UVB bestrahlt. Nach 0 h oder weiteren 24 h Inkubation mit SAHA bzw. DMSO wurden die Proben mittels South-Western-Slot Blot analysiert. Dargestellt sind Duplikate untereinander. A: exemplarischer South-Western-Slot Blot. B: Densitometrische Auswertung der CPD-Reparatur. Dargestellt sind die Mittelwerte +SEM, normiert auf die 0 h Wildtyp-Probe bzw. die 0 h Knockout-Probe. *p<0,05

Die UVB-induzierte Entstehung von CPDs nach 0 h verlief unabhängig vom Genotyp und der Vorbehandlung der Zelllinien. In CSB +/+ Fibroblasten wurden nach 24 h noch ca. 65 %, in CSB -/- Zellen noch ca. 90 % CPD's detektiert. Eine Behandlung mit 200 nM SAHA führte nach 24 h zu einer Verbesserung der Reparatur in beiden Zelltypen. Die Reduktion betrug ca. 20-30 %, so dass in defizienten Zellen noch ca. 60 %, in profizienten Zellen noch ca. 40 % CPD's detektiert wurden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Wiederherstellung der Reparaturkapazität sowohl in murinen Keratinozyten als auch in humanen transformierten Fibroblasten durch den HDAC-Inhibitor SAHA hin.

3.9 Einfluss von SAHA auf die UVB-induzierte Apoptose in humanen transformierten CSB-defizienten Fibroblasten

Wie in Abbildung 22 gezeigt, führte eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor SAHA zu einer Wiederherstellung der Reparaturkapazität von CPDs in CSB-defizienten Fibroblasten. Da in CS-Zellen ein Defekt in der transkriptions-gekoppelten Reparatur vorliegt, stellt sich allerdings die Frage ob durch SAHA eine direkte Modulation der CPD-Reparatur zu Stande kommt oder durch den größeren DNS-Schaden eine Induktion der Apoptose erfolgt. Infolgedessen wurde der Einfluss von SAHA auf die UVB-induzierte Apoptose mittels Annexin V/Propidiumiodid Färbung bestimmt (Abb. 23).

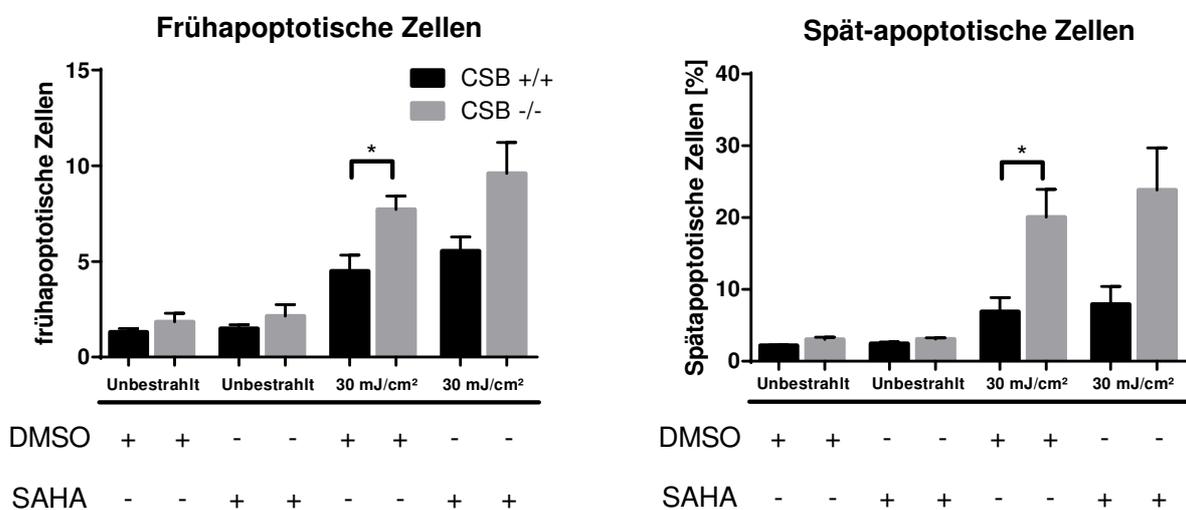


Abbildung 23: Analyse UVB-induzierter Apoptose in CSB-defizienten und profizienten humanen Fibroblasten. CSB +/+ und CSB -/- transformierte Fibroblasten wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 200 nM SAHA bzw. DMSO für 24 h vorbehandelt und daraufhin mit 30 mJ/cm² UVB bestrahlt. Nach 24 h wurden die Proben mittels FACS analysiert. Dargestellt sind die absolute Mittelwerte +SEM. *p<0,05

Eine Vorbehandlung mit SAHA hatte keinen Effekt auf die Apoptoserate von unbehandelten Zellen. Bestrahlung mit 30mJ/cm² führte zu einer signifikant erhöhten Apoptose CSB-defizienter Zellen. Hier lag die Anzahl frühapoptotischer Zellen bei ca. 7-8 %, die spätapoptotischer Zellen bei ca. 20 %. In Wildtypfibroblasten hingegen wurden ca. 5 % frühapoptotische und ca. 8 % spätapoptotische Zellen analysiert. Eine zusätzliche Behandlung mit SAHA führte zu einer erhöhten Apoptoserate in beiden Zelltypen. Hierbei war die absolute Zunahme in CSB-defizienten Zellen deutlicher höher.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine SAHA-induzierte Induktion der DNS-Reparatur in CSB-defizienten humanen Fibroblasten und murinen Keratinozyten hin. Zwar konnte ein pro-

apoptotischer Effekt nach UVB-Bestrahlung beobachtet werden, dieser kann die verbesserte CPD-Reparatur allerdings nur zum Teil erklären.

4. Diskussion

Die Sonne trägt dazu bei, die Entwicklung und das Fortbestehen aller Lebewesen auf der Erde zu sichern. Sie spendet Wärme, bestimmt das Klima, ist für die Entstehung der Jahreszeiten verantwortlich und regelt den notwendigen Tag- und Nachtrhythmus. Da die Haut derjenige Bestandteil des Körpers ist, der am meisten dem Sonnenlicht ausgesetzt ist, spielt die Sonnenstrahlung besonders in der Physiologie und Pathophysiologie der Haut eine wichtige Rolle. Besonders relevant in diesem Zusammenhang ist der energiereiche UV-Anteil, insbesondere die UVB-Strahlung.

Obwohl dieser Teil des Spektrums nur etwa 7 % der Gesamtenergie ausmacht, ist er unerlässlich für eine ausreichende Vitamin D-Synthese. Eine Überdosierung kann jedoch zu pathologischen Effekten führen, die z.B. Sonnenbrand, Immunsuppression und bei chronischer Überdosierung auch Hautalterung und Hautkrebs umfassen.

Hautalterung beginnt etwa in der Mitte der dritten Lebensdekade klinisch sichtbar zu werden und ist sowohl von intrinsischen als auch von extrinsischen Faktoren, wozu auch die UV-Strahlung zählt, abhängig. Typische Anzeichen einer extrinsischen Hautalterung sind eine grobe Faltenbildung, eine zunehmende Pigmentierung und eine gelblich lederartig verdickte Haut. Darüber hinaus kommt es zu einer verstärkten Atrophie des subkutanen Fettgewebes. Diese Veränderungen sind mit einer Einschränkung der physiologischen Hautfunktionen verbunden.

Darüber hinaus stellt die UVB-Strahlung, ebenso wie UVA-Strahlung, ein komplettes Karzinogen dar. Die kanzerogenen Eigenschaften von UVB-Strahlung reichen von Tumor-Initiation bis Tumor-Promotion und Progression. Durch die längere Lebenszeit des Menschen und der damit einhergehend höheren kumulativen UV-Belastung, den Rückgang der Ozonschicht, die damit verbundene erhöhte UV-Exposition und dem Lebenswandel des Menschen (z.B. ausgiebiges Sonnenbaden und Benutzung von Solarien) entwickeln sich Hautalterung und Hautkrebs zu bedeutsamen gesundheitlichen Problemen der heutigen Zeit. Die Zahl der Hautkrebserkrankungen stieg in den letzten Jahren stetig an, und allein in Deutschland werden jedes Jahr mehr als 200.000 Neuerkrankungen gemeldet (Quelle: Deutsche Krebshilfe).

Einen vielsprechenden Ansatzpunkt für die Prävention und / oder Therapie von Hautkrebs könnte der Transkriptionsfaktor HIF-1 darstellen. Unerlässlich für die zelluläre Antwort auf Hypoxie, moduliert dieses Protein die Apoptose, Proliferation, Metabolismus und Stoffwechsel und ermöglicht so eine flexible Anpassung an Sauerstoffmangel in Zellen und Geweben. HIF-1 besteht aus einer

regulierbaren α -Untereinheit sowie einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit (ARNT). HIF-1 α ist in Gegenwart von Sauerstoff instabil, da es durch die Prolylhydroxylasen markiert wird. Diese Modifikation fungiert als Signal, das vom von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor-Protein (pVHL) erkannt wird. PVHL ist ein Bestandteil eines E3-Ubiquitin Ligase-Komplexes, der nachfolgend HIF-1 α ubiquitiniliert und dieses somit zum Abbau durch das Proteasom zugänglich macht. Unter hypoxischen Bedingungen funktioniert dieser Mechanismus nicht, so dass HIF-1 α stabilisiert und die HIF-1 abhängige Signaltransduktion aktiviert wird. Hypoxie ist allerdings auch ein klassisches Charakteristikum vieler maligner Tumore. Chronischer Sauerstoffmangel steht im Verdacht, die Effektivität von Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen zu verringern und korreliert mit einer systemischen Metastasierung. Darüber hinaus ist die Signaltransduktion über HIF-1 in soliden Tumoren für die Entstehung neuer Blutgefäße und somit für Wachstum und Progression des Tumors von essentieller Bedeutung. Die Rolle von HIF-1 bei der UVB-induzierten Hautkarzinogenese und Hautschädigung ist allerdings bis heute unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 α bei der strahlungsbedingten Hautschädigung näher untersucht werden. Anhand des HIF-1 α ^{+f/+f} * K5 Cre Mausmodells, welches eine Deletion von HIF-1 α in den Keratinozyten erlaubt, sollte die Frage geklärt werden, wie groß der Einfluss dieses Faktors auf die UVB-induzierte Schädigung der Haut und ihre mögliche Relevanz für die Hautkarzinogenese und Hautalterung ist.

4.1 Die Rolle von HIF-1 α in der zellulären UVB-Antwort

Die Aktivität von HIF-Transkriptionsfaktoren ist wesentlich von der intrazellulären Stabilität ihrer α -Untereinheiten abhängig. Der wesentliche Faktor, der die Stabilität von HIF-1 α beeinflusst, ist die Sauerstoffkonzentration. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zur Stabilisierung und somit Aktivierung der HIF-1 vermittelten Signaltransduktion, die aufgrund einer Inhibition der Prolyl-Hydroxylase Aktivität und des Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbaus zu erklären sind (Michiels et al., 2002). Erst 2007 konnten Rezvani und Mitarbeiter zeigen, dass UVB-Strahlung ebenso in der Lage ist HIF-1 α in humanen Keratinozyten zu stabilisieren. Sie beobachteten einen biphasischen Effekt, bei dem nach Bestrahlung ein rascher Abbau von HIF-1 α beobachtet wurde, wohingegen eine erneute Akkumulation über einen Zeitraum von bis zu 10 h erfolgte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein ähnlicher zeitlicher Ablauf für murine Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung bestätigt werden. Hier wurde ebenfalls ein schneller Abbau, gefolgt von einer

Akkumulation nach 2 h detektiert (Abb. 7). Eine ähnliche biphasische Modulation wurde bereits unter chronischen hypoxischen Bedingungen für HIF-1 α und HIF-2 α beschrieben (Thrash-Bingham und Tartof, 1999; Uchida et al., 2004). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass eine biphasische Regulation von HIF-1 α ein physiologischer Mechanismus in der zellulären Hypoxie- und UVB-Antwort ist.

Die essentielle physiologische Bedeutung von HIF-1 bei vielen zellulären Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Zellzyklusregulation, Zelladhäsion oder Stoffwechsel ist bereits ausführlich in der Literatur beschrieben (Brahimi-Horn et al., 2011; Crossin, 2012). Grundlage für den Einfluss auf diese Prozesse ist allerdings eine Hypoxie-induzierte Stabilisierung von HIF-1 α . Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen vermuten, dass HIF-1 ebenso die UVB-vermittelte Apoptose und DNS-Reparatur steuern kann. Es wurde gezeigt, dass HIF-1 α essentiell für die Expression wichtiger Reparaturgene nach UVB-Bestrahlung ist. Die Induktion von CSA, CSB, XPB und XPG war in HIF-1 α defizienten Keratinozyten stark beeinträchtigt, wie sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abb. 5 und 7). Diese Defizienz in der Induktion von Reparaturproteinen wirkte sich direkt auf die DNS-Reparatur aus. In HIF-1 α defizienten Keratinozyten wurde eine stark reduzierte Reparatur von UVB-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin Dimeren beobachtet (Abb. 8). Darüber hinaus zeigte sich eine verminderte Induktion des Zellzyklus-regulierenden Faktors p21 nach UVB-Bestrahlung. Ebenso konnte eine tendenziell reduzierte Expression eines weiteren p53-Zielgens, nämlich MDM-2, in den HIF-1 α defizienten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 6). Dies lässt vermuten, dass HIF-1 α nach UVB-Bestrahlung die p53-vermittelte Transkription positiv reguliert.

Rezvani und Mitarbeiter konnten bereits 2009 in humanen Keratinozyten die funktionale Rolle von mehreren Hypoxie-responsiven Elementen (HREs) in der UVB-induzierten Modulation von XPC- und XPD-mRNA nachweisen. In diesen Experimenten konnte zudem ein direkter Einfluss von HIF-1 α auf die Proteinexpression von XPC und XPD gezeigt werden. Vergleichbar zu den hier beschriebenen Ergebnissen stand dies in direktem Zusammenhang mit einer verzögerten Reparatur von UVB-induzierten CPD's und 6,4 Photoprodukten (6,4 PPs; Rezvani et al., 2009). Auch eine UVB-induzierte HIF-1 abhängige Apoptose konnte beobachtet werden. Durch HIF-1 α abhängige Induktion der Caspase-8 und Caspase-9 wurde ein pro-apoptotischer Effekt auf die intrinsische und extrinsische Apoptose nachgewiesen. Zudem wird durch die Korrelation mit der p53-Proteinmenge eine direkte Interaktion beider Enzyme vermutet (Rezvani et al., 2007). Die Verschaltung beider Signalwege wird auch dadurch untermauert, dass HIF-1 α über die Modulierung der p21-Expression einen Zellzyklusarrest in humanen Keratinozyten induziert (Cho et al., 2007).

Eine Hypoxie-vermittelte Aktivierung von HIF-1 α zeigt allerdings ein anderes Bild. So wurden nach Kultivierung unter akuten und chronischen hypoxischen Bedingungen vermehrt DNS-Doppelstrangbrüche in Lungenfibroblasten nachgewiesen (Coquelle et al., 1998). In HeLa-Zellen wurde unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen eine vermehrte Expression spezifischer mikro-RNS detektiert, welche zumindest zum Teil die Aufgabe haben, spezifische DNS-Reparaturenzyme zu inhibieren (Crosby et al., 2009). Interessanterweise beschreiben Ergebnisse der gleichen Arbeitsgruppe eine reduzierte NER-Aktivität bei Sauerstoffmangel (Yuan und Glazer, 1998). Zudem scheint die Wirkung von HIF-1 auf die Apoptose unter hypoxischen Bedingungen nicht vollständig geklärt. So wurde gezeigt, dass HIF-1 α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt an MDM-2 bindet und somit eine Stabilisierung von p53 ermöglicht (Chen et al., 2003). Eine andere Arbeit allerdings zeigt eine direkte Interaktion mit p53, was eine beeinträchtigte Funktion von p53 und letztendlich eine eingeschränkte Apoptose zur Folge hat (Hansson et al., 2002). Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen, dass die wechselseitige Beeinflussung von HIF-1 und p53 hochkomplex und bisher nur unvollständig verstanden ist.

Da eine Dimerisierung mit ARNT für die Aktivierung vieler Transkriptionsfaktoren der bHLH-PAS Proteinfamilie notwendig ist, könnte eine Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit eine Veränderung dieser nachgeschalteten Signalwege bewirken, da nur noch eine verminderte Menge von ARNT für die Interaktion mit anderen Faktoren zur Verfügung stehen würde. Ein derartiger Mechanismus könnte zumindest einen Teil der oben beschriebenen Befunde erklären. Hierbei spielt besonders der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor eine große Rolle. Fritsche und Mitarbeiter konnten 2007 zeigen, dass in Keratinozyten durch UVB-Strahlung das Tryptophan-Photoprodukt FICZ (6-Formylindolo(3,2-b)carbazole) entsteht, was zu einer Aktivierung des AhR führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Behandlung mit mehreren AhR-Liganden in Hepatozyten zu einer erniedrigten mRNA-Expression NER-relevanter Gene führt (Schreck et al., 2009). Im Einklang mit den weiter oben aufgeführten Vermutungen könnte dieser Befund bedeuten, dass HIF-1 α und der AhR um die Bindung von ARNT konkurrieren und somit die Affinität zu ARNT entscheidend den Verlauf der Signalantwort beeinflusst. In diesem Fall würde die Aktivierung des AhR dazu führen, dass weniger ARNT für die Bindung an HIF-1 α und somit für die Regulation der Expression von NER-Genen zur Verfügung steht. Durch die Entdeckung des endogenen UVB-induzierten Liganden FICZ könnten weitere Forschungsergebnisse die Rolle des AhR in der UVB-Stressantwort untersuchen und somit den Einfluss auf den HIF-1 Signalweg intensiver analysieren.

4.2 Die Bedeutung von HIF-1 α in der UVB-induzierten Photokarzinogenese und Hautalterung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung des HIF-1 α ^{f/f} * K5 Cre Mausmodells untersucht welche Veränderungen HIF-1 abhängig durch chronische UVB-Bestrahlung *in vivo* verursacht werden. Das verwendete Bestrahlungsprotokoll wurde aufgrund der vorherigen *in vitro* Befunde, die auf eine stark erhöhte Empfindlichkeit der HIF-1 α defizienten Tiere hinwies, an diese angepasst und bewusst so gewählt, dass eine Tumorbildung in Wildtyptieren ausgeschlossen war. Unter Verwendung dieses Bestrahlungsprotokolls gelang es mir zu zeigen, dass chronische UVB-Bestrahlung zu (I) einer epidermalen Hyperplasie, (II) Hyperpigmentierung, (III) einer verringerten Faltenbildung, (IV) einem Verlust des subkutanen Fettgewebes und (V) einer unspezifischen Wundbildung in HIF-1 α defizienten Mäusen führte. Während einige dieser Ergebnisse Vorbefunde aus Untersuchungen anderer stützen und erweitern, stellen insbesondere die Beobachtungen zur reduzierten Faltenbildung, zur unspezifischen Wundbildung und zur Verstärkung des Verlustes des subkutanen Fettgewebes neue, zuvor nicht bekannte Ergebnisse dar.

Es ist unumstritten, dass HIF-1 α von entscheidender Bedeutung bei vielen Stufen der Karzinogenese ist. Hierzu zählen vor allem die Angiogenese, Proliferation, Metabolismus und Metastasenbildung. Der Einfluss von HIF-1 α ist allerdings stark von der Art des Tumors, des betroffenen Gewebes und des Zelltyps abhängig. Bei vielen Krebsarten, wie Brust-, Eierstock-, Gebärmutterhals- oder Magenkrebs, wird eine erhöhte HIF-1 α Expression mit einer verminderten Überlebensrate der Patienten in Verbindung gebracht. In der Photokarzinogenese spielt UVB-Strahlung eine große Rolle. Aufgrund seiner tumorinitiierenden und tumorpromovierenden Eigenschaften stellt UVB-Strahlung ein komplettes Karzinogen dar. Es ist der energiereichste Teil des für den Menschen relevanten solaren Spektrums und ist erwiesenermaßen der größte Risikofaktor bei der Entwicklung von Hautkrebs. Die Rolle von HIF-1 bei UV-induzierten Photokarzinogenese ist weitestgehend ungeklärt.

Ein bedeutendes Charakteristikum der menschlichen Haut ist die unterschiedliche Sauerstoffkonzentration in den einzelnen Geweben. Während der pO₂ in der Dermis bei ca. 10 % liegt, unterliegt die Epidermis starken Schwankungen von 0,5 %-5 % (Evans et al., 2006). Hierdurch variiert die Stabilisierung und Aktivierung von HIF-Transkriptionsfaktoren stark. Patientenstudien zeigen, dass die physiologisch milde Hypoxie der Epidermis die Transformation von Melanozyten begünstigt (Bedogni et al., 2005; Monsel et al., 2010). Darüber hinaus wurde in Melanomproben eine erhöhte Expression von HIF-1 α und HIF-2 α analysiert (Giatromanolaki, et al., 2003). Weiterhin zeigen *In vitro* Befunde, dass es unter normoxischen Bedingungen zu einer erhöhten HIF-1 α Expression in

Melanozyten über den zellspezifischen Transkriptionsfaktor MITF (engl.: microphthalmia-associated transcription factor) kommt (Busca et al., 2005). Allerdings beschreiben Studien an Plattenepithelkarzinomen einen widersprüchlichen Einfluss. Obwohl immunhistochemische Färbungen von Plattenepithelkarzinomen eine hohe Expression von HIF-1 α und HIF-2 α zeigen (Lining et al., 2009), beschreibt eine weitere Studie an Mäusen eine weitreichende Inhibition der Tumorentwicklung durch eine erhöhte HIF-1 α Aktivität in Keratinozyten (Scortegagna et al., 2009).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 28-wöchige UVB-Bestrahlung zu ersten strahlungsinduzierten Hautveränderungen, wie eine verstärkte Hautschuppung, Hyperpigmentierung und Verlust des subkutanen Fettgewebes in HIF-1 α defizienten Tieren führte (Abb. 11 und 13). Eine UV-induzierte Tumorbildung wurde nicht beobachtet, es trat jedoch eine vermehrte Wundbildung auf (Abb. 12). Mit Hilfe histochemischer Färbungen konnten zudem Anzeichen einer Hyperplasie der Epidermis nachgewiesen werden (Abb. 13). Diese frühen Hautveränderungen gelten als erste Anzeichen für möglicherweise später entstehende maligne Hautveränderungen und könnten über die verminderte Expression von NER-Proteinen und die Akkumulation nicht reparierter DNS-Läsionen erklärt werden. Die tumorigene Wirkung in HIF-1 α defizienten Mäusen könnte darüber hinaus durch einen eingeschränkten Zellzyklusarrest infolge einer verminderten Induktion von p21, wie im Rahmen dieser Arbeit in HIF-1 α defizienten murinen Keratinozyten beschrieben wurde, noch verstärkt werden. Ein eingeschränkter Zellzyklusarrest bei verminderter DNS-Reparaturkapazität würde bedeuten, dass mehr Zellen mit DNS-Schäden weiter proliferieren und sich so die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Mutationen erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf einen antikanzerogenen und pro-apoptotischen Einfluss von HIF-1 α hin.

Cho et al., 2009 fanden bereits zuvor heraus, dass HIF-1 α den Zellzyklus in Keratinozyten kontrolliert und beobachteten eine deutlich reduzierte Expression in UVB-induzierter epidermaler Proliferation. Eine Studie über ein ähnliches Mausmodell unterstützt die von mir erhobenen Befunde. Anstatt Keratin-5 wurde in diesem Tiermodell Keratin-14 als Cre-Promoter verwendet, was ebenfalls zu einer spezifischen Deletion von HIF-1 α in den Keratinozyten führt. Obwohl die Entwicklung dieser Mäuse in den ersten sechs Monaten ohne Auffälligkeiten verlief, bildete sich nachfolgend ein starker Hautphänotyp aus. Es wurde ein verminderter Haarwuchs und eine Hyperpigmentierung gefolgt von der Entwicklung einer hyperkeratotischen Epidermis beobachtet. Im Alter von zwölf Monaten entwickelten die Tiere eine zunehmende Lichenifikation und eine chronische Inflammation der Haut um die Augen, am Nacken und Schwanz. Histochemische Färbungen zeigten eine massive Einwanderung von Plasmazellen und eosinophilen Granulozyten in die Dermis (Rezvani et al., 2011). Die dargestellten Hautveränderungen in HIF-1 α defizienten Mäusen stehen zumindest zum Teil im Einklang mit den oben beschriebenen eigenen Befunden. Besonders die auftretende UVB-induzierte

Wundbildung könnte mit einer inflammatorischen Reaktion erklärt werden. Darüber hinaus ist die Hyperpigmentierung in beiden Mausmodellen beobachtet worden. Diese Resultate deuten auf eine essentielle Rolle von HIF-1 α in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der Haut hin und unterstreichen die Bedeutung in der UVB-induzierten Stressantwort.

Die Lichtalterung der Haut ist ein Jahrzehnte lang andauernder Prozess, bei dem sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren einen großen Einfluss haben. Zu den extrinsischen Faktoren zählen vor allem Zigarettenrauch, Umweltverschmutzung und besonders Sonnenstrahlung (Gilchrest, 1989; Bernhard et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass es durch UVA-, UVB- und IRA-Strahlung zu einem vermehrten Kollagenabbau in der Dermis durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs) kommt. Andauernde Bestrahlung führt zudem zu einer Hemmung der Kollagen-Neusynthese (Krutmann, 2011). Erst durch neuere Forschungsergebnisse ist bekannt geworden, dass IRA-Strahlung eine ebenso wichtige Rolle bei der strahlungsinduzierten Hautalterung spielt (Kim et al., 2005; Schieke et al., 2002; Schroeder et al., 2008; Krutmann und Schroeder, 2009). Der Verlust essentieller Bindegewebsanteile führt zu einem der Kardinalsymptome der Hautalterung, der Faltenbildung. Ein weiteres Symptom strahlungsinduzierter Hautalterung ist eine vermehrte Pigmentbildung. Raper identifizierte 1928 als erster das Enzym Tyrosinase als eines der wichtigsten Proteine bei der Biosynthese von Melanin. Bis heute ist die Verwendung von Tyrosinase-Inhibitoren zur Kontrolle der Melanogenese weit verbreitet (Chang, 2009). Zusätzlich ist die Subkutis durch chronische Bestrahlung betroffen. Da sie in der Haut neben der Speicherung von Lipiden und Vitaminen und der Wärmeisolation besonders zum Strukturerhalt beiträgt, erklärt ein Abbau des subkutanen Fettgewebes zumindest zum Teil den Verlust der Regenerationsfähigkeit und Elastizität. Da die Eindringtiefe von UV-Strahlung nicht bis in die Subkutis reicht, muss ein indirekter Mechanismus den Verlust des subkutanen Fettgewebes erklären. Kim et al., konnten 2011 zeigen, dass die UV-Bestrahlung von Keratinozyten und Fibroblasten die Sekretion verschiedener Zytokine induziert, die die Lipid-Synthese von Adipozyten inhibieren. Die Rolle von HIF-1 α in diesen komplexen Prozessen ist bislang nur unzureichend geklärt.

Die vorliegenden Ergebnisse meiner Arbeit weisen auf eine essentielle Bedeutung von HIF-1 α in der UVB-induzierten Faltenbildung und Pigmentierung hin. Es konnte über eine zeitliche fotografische Dokumentation eine deutliche Zunahme der Pigmentierung in bestrahlten HIF-1 α defizienten Mäusen beobachtet werden (Abb. 16). Mittels histochemischer Färbungen wurde eine gleichmäßige Verteilung im epidermalen Gewebe nachgewiesen. Die Pigmentierung war in Wildtyptieren dagegen deutlich schwächer ausgeprägt. In diesen Tieren zeigte sich eine Akkumulation von Melaninpigmenten innerhalb des epidermalen Gewebes an wenigen Stellen (Abb. 20). In HIF-1 α defizienten Mäusen wurde mittels histochemischer Färbungen zudem eine UVB-vermittelte

Reduktion des subkutanen Fettgewebes beobachtet, die in Wildtyptieren deutlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 19). Makroskopisch konnte auch ein deutlicher Unterschied in der UVB-induzierten Faltenbildung beobachtet werden. Sowohl die Anzahl als auch die Tiefe der Falten war in Wildtyptieren deutlich größer als in HIF-1 α defizienten Tieren (Abb. 16). Mittels einer UVA-Kamera konnte dieser Befund auch mikroskopisch bestätigt werden (Abb. 17). Hierbei wurde zudem eine vermehrte Schuppung der Haut in defizienten Mäusen gezeigt, die als Anzeichen einer gestörten Barrierefunktion gilt (Rawlings & Voegeli, 2013). Über die Messung des transepidermalen Wasserverlusts wurde diese Vermutung bestätigt. Sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Tieren wurde eine signifikante Erhöhung in HIF-1 α defizienten Mäusen gegenüber Wildtyptieren nachgewiesen (Abb. 18). Diese Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 α eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der UVB-induzierten Hautalterung spielt.

In einer ähnlichen UVB-Hautalterungs-Studie wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet. Hierbei wurden Albino HOS:HR-1 Mäuse für zwei Stunden nach Bestrahlung unter hyperoxischen Bedingungen gehalten, um einer UVB-induzierten HIF-1 α Induktion entgegenzuwirken. Diese Mäuse entwickelten weniger Falten als nur UVB-behandelte Tiere. Zudem wurde eine erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 analysiert, die allerdings keinen Unterschied zwischen normoxisch- und hyperoxisch-behandelten Mäusen zeigte (Kawada et al., 2010). *In vitro* Experimente in humanen Fibroblasten deuten auf eine IL-1 β und HIF-1 α modulierte Expression der Proteine MMP-1 und MMP-13 hin. Es wurde gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen die Expression von MMP-1 signifikant erhöht, die MMP-13 Expression allerdings erniedrigt ist (Lee et al., 2011). Diese Hypothese wird durch ähnliche Befunde in weiteren Zelltypen unterstützt. Eine shRNS-vermittelte HIF-1 α Defizienz führte unter hypoxischen Bedingungen in Melanomzelllinien zu einer deutlich reduzierten Expression von MT-MMP-1 mRNA (Hanna et al., 2013). In primären Keratinozyten wurde nach hypoxischen Kulturbedingungen eine erhöhte Expression von MMP-9 mRNA beobachtet, die Expression von MMP-1 mRNA blieb allerdings unverändert (O'Toole et al., 2007). Diese Studien weisen auf eine Schlüsselrolle von HIF-1 α bei der Regulation von MMPs und dem damit verbundenen Abbau der extrazellulären Matrix hin.

Der Einfluss von HIF-1 auf die Melanogenese ist allerdings umstritten. Slominski und Mitarbeiter beschrieben 2014 nach dem Vergleich pigmentierter und unpigmentierter humaner Melanomzellen eine Zunahme der HIF-1 α Expression nach einsetzender Melanogenese. Hiermit war auch eine Induktion klassischer HIF-1 Zielgene verbunden. Ein Einfluss von HIF-1 α auf die Induktion der Melanogenese wurde allerdings nicht beschrieben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass HIF-1 α zwar ein Zielgen des Melanozyten-spezifischen Transkriptionsfaktors MITF ist (Busca et al., 2005), eine Stabilisierung von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen allerdings zu dessen Abbau führt (Feige et

al., 2011). Diese Ergebnisse deuten zwar auf eine Rolle von HIF-1 α in Melanozyten hin, beschreiben aber keinen direkten Einfluss auf die Melanogenese. Eine mögliche Erklärung der in dieser Arbeit beschriebenen Befunde liefert die bereits beschriebene erhöhte Aktivierung des AhR-Signalwegs in Abwesenheit von HIF-1 α durch erhöhte Verfügbarkeit von ARNT. Luecke und Mitarbeiter konnten 2010 zeigen, dass die Aktivierung des AhR sowohl durch den klassischen Dioxin-Liganden TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin) als auch durch den endogenen UVB-induzierten Liganden FICZ eine erhöhte Tyrosinase-Aktivität in primären Melanozyten zur Folge hat. Eine weitere Studie über die UVB-Bestrahlung AhR-defizienter Mäuse unterstützt diese Hypothese. Es wurde gezeigt, dass in AhR-defizienten Mäusen eine deutlich geringere UVB-induzierte Pigmentierung als in Wildtypmäusen beobachtet wird. Dies korrelierte mit einer erhöhten Tyrosinase-Aktivität in Wildtypmäusen, wobei allerdings kein Unterschied in der Melaninproduktion pro Zelle beobachtet wurde (Jux et al., 2010). Diese Daten lassen auf eine Rolle von HIF-1 in der Regulation von Melanozyten und der damit verbundenen Melanin-Biosynthese schließen. Die Befunde meiner Arbeit unterstützen zudem die beschriebene Rolle des AhR in der UVB-induzierten Pigmentierung.

4.3 Der Einfluss von SAHA bei der UVB-induzierten Zellschädigung in CSB-defizienten Hautzellen

Zwei der auffälligsten Gene, die eine verminderte Induktion in HIF-1 α defizienten murinen Keratinozyten zeigten, waren CSA und CSB. Funktionale Mutationen in diesen Genen führen zu einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, die als Cockayne Syndrom (CS) bezeichnet wird. Das Krankheitsbild der betroffenen Patienten ist vielschichtig und beinhaltet unter anderem sowohl neurologische als auch Hautsymptome. Zu der neuronalen Symptomatik zählt eine starke mentale Retardierung mit einhergehender Mikrozephalie und Gangstörungen. Das dermale Krankheitsbild ist geprägt von einer erhöhten Photosensitivität, die UV-induzierte Hautausschläge verursacht, eine vermehrte Pigmentbildung sonnenexponierter Areale und einer starken Atrophie, ausgelöst durch den Abbau subkutanen Fettgewebes (Ozdirim et al., 1996; Kraemer et al., 2007; Laugel, 2013). Die auftretende Symptomatik lässt sich allerdings nicht alleine durch die Rolle des Proteins in der NER erklären, was auch durch die Tatsache, dass CS-Patienten kein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen, untermauert wird. Deswegen wird eine weitreichendere Bedeutung von CSA und CSB diskutiert. Die in meiner Arbeit beschriebene Untersuchung des Proteins HIF-1 α könnte zumindest zum Teil zur weiteren Aufklärung beitragen.

In meiner Dissertation habe ich daher den Einfluss des Transkriptionsfaktors HIF-1 α auf die Expression NER-relevanter Proteine untersucht. Dabei konnte ich erstmals zeigen, dass ein Verlust von HIF-1 α in murinen Keratinozyten zu einer gestörten UVB-induzierten Induktion von CSA und CSB sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene führt. Die Untersuchung des HIF-1 α Mausmodells deutete ebenfalls auf eine gestörte zelluläre UVB-Stressantwort hin. Die beschriebene Symptomatik einer Hyperpigmentierung und eines vermehrten Abbaus von subkutanem Fettgewebe ähneln stark den beschriebenen dermalen Symptomen in CSB-defizienten Mäusen (Kamenisch et al., 2010). Darüber hinaus könnte die beobachtete UVB-induzierte Wundbildung mit einer erhöhten UV-Sensitivität einhergehen. Diese Befunde weisen auf eine besondere Bedeutung von CSA und CSB bei der UVB-vermittelten Hautschädigung von HIF-1 α defizienten Mäusen hin.

Ein Zusammenhang zwischen HIF-1 und CSB ist auch bereits in der Literatur beschrieben. In humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass CSB ein direktes Zielgen von HIF-1 α bei der Hypoxievermittelten Signalantwort ist. Darüber hinaus kommt dem CSB-Protein eine wichtige Rolle bei der Zuordnung des Co-Aktivators p300 zwischen HIF-1 und p53 zu (Filippi et al., 2008). Dies verdeutlicht, wie bedeutsam CSB für die Modulierung der HIF-1 bzw. p53 abhängigen Signalantwort ist. p300 gehört zu den sogenannten Histonacetyltransferasen (HATs). Diese Gruppe von Enzymen ist in der Lage, Acetylgruppen reversibel auf andere Proteine zu übertragen. Diese Modifikation kann die Stabilität, Aktivität, zelluläre Lokalisation oder auch die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen und spielt somit eine große Rolle bei der zellulären Funktion vieler Enzyme. Die Deacetylierung wird wiederum von einer anderen Proteinfamilie katalysiert, den Histondeacetylasen (HDACs). Somit reguliert die Aktivität von HATs und HDACs den Acetylierungsstatus des gesamten Proteoms. Eine Inhibition der Deacetylierung durch HDAC-Inhibitoren führt deshalb zu einer Verschiebung des Gleichgewichts und bewirkt eine Zunahme der Acetylierung bei zahlreichen Proteinen. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Funktion dieser Proteine und somit für die ganze Zelle, z.B. durch Veränderung des Expressionsmusters. Dieser Effekt ist bereits seit längerem bekannt und wird bei der Entwicklung neuer Krebstherapien bzw. der Zytostatikaforschung bereits ausgenutzt. Der HDAC-Inhibitor SAHA ist ein zugelassenes Arzneimittel und wird für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms verwendet. Er gehört zu den Breitband HDAC-inhibitoren, da er zahlreiche Mitglieder der HDAC-Familie inhibieren kann. Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Behandlung CSB-defizienter Fibroblasten mit SAHA zumindest zum Teil zu einer Revertierung des Phänotyps führt.

Die beschriebenen Experimente konzentrierten sich auf die Effekte von SAHA bei der UVB-induzierten Zellschädigung in CSB-defizienten Keratinozyten und Fibroblasten. Wie erwartet war die Reparatur von UVB-induzierten CPD's in beiden CSB-defizienten Zelltypen gestört. Es wurden nach

24 h eine ca. 20-30 % höhere Anzahl an CPDs detektiert. Eine Behandlung mit SAHA führte in beiden CSB-defizienten Zelltypen zu einer Wiederherstellung der Reparaturkapazität und verbesserte zudem auch die Reparatur in profizienten Fibroblasten (Abb. 21 und 22). Diese Befunde lassen vermuten, dass CSB über epigenetische Regulation der Proteinacetylierung die Reparatur von DNS-Läsionen durch die Transkriptions-gekoppelte DNS-Reparatur (TCR) reguliert und deuten somit auch den Mechanismus an, über den HIF-1 die NER beeinflussen kann.

Die Bedeutung von CSB für die TCR ist unumstritten, die Rolle von HDAC-Inhibitoren in diesem Prozess ist allerdings weitestgehend unklar. Bis hier konnte in *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt werden, dass p300 einen Komplex mit PCNA (engl.: Proliferating cell nuclear antigen) bildet und dieser eine bedeutende Rolle in der DNS-Neusynthese nach der DNS-Reparatur spielt, was eine weitreichendere Rolle von HATs vermuten lässt (Hasan et al., 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass die HAT- und HDAC-vermittelte Veränderung der Chromatin-Struktur durch Acetylierung und Deacetylierung verschiedener Histone ein wichtiger Mechanismus in der DNS-Reparatur ist, der die Bindung von DNS-Reparaturproteinen an die DNS-Läsion katalysiert (Acuna et al., 2010; Tamburini und Tyler, 2005). In humanen Fibroblasten wurde zudem in den ersten 30 min nach UV-Bestrahlung eine deutlich verbesserte DNS-Reparatur durch eine Hyperacetylierung verschiedener Nucleosome beobachtet (Ramanathan und Smerdon, 1989). Diese Befunde belegen, dass der Acetylierungsstatus von Histonen und die daraus folgende Veränderung der Chromatinstruktur die Kinetik der DNS-Reparatur stark beeinflusst. Allerdings ist auch bekannt, dass HDAC-Inhibitoren eine direkte Veränderung der Chromatin-Struktur bewirken können. Dies wurde bereits in mehreren primären Zelltypen, aber auch in Tumorzellen gezeigt (Lee et al., 2010). Bakkenist und Kastan, berichteten 2003 zwar von einer induzierten DNS-Reparatur durch eine HDAC-Inhibitor-vermittelte Veränderung der Chromatin-Struktur. Andere Studien hingegen zeigen eine direkte DNS-Schädigung durch Behandlung mit HDAC-Inhibitoren (Chen et al., 2007; Gaymes et al., 2006; Petruccelli et al., 2011). Es wird vermutet, dass diese direkte DNS-Schädigung über eine vermehrte Generierung von ROS verläuft. So wurde gezeigt, dass die Behandlung leukämischer T-Zellen mit SAHA zu einer vermehrten ROS-Produktion führt, die wiederum eine erhöhte Apoptoserate zur Folge hat (Ruefli et al., 2001). Diese pro-apoptotische Wirkung gilt als einer der zentralen Wirkmechanismen der HDAC-Inhibitor-vermittelten Krebstherapie und ist in weiteren Studien beschrieben (Frew et al., 2009; Marks und Xu, 2000).

Der beschriebene proapoptotische Einfluss von HDAC-Inhibitoren unterstützt die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse. Wie erwartet war die UVB-induzierte Apoptoserate in CSB-defizienten Zellen deutlich höher als in Wildtypzellen. Eine Behandlung mit SAHA führte zudem, zu einer gesteigerten Anzahl frühapoptotischer, als auch spätapoptotischer Fibroblasten nach UVB-

Bestrahlung. Dieser Effekt war sowohl in Wildtyp-, als auch in CSB-defizienten Zellen zu beobachten (Abb. 23).

Diese Ergebnisse deuten auf einen weitreichenden Einfluss von HDAC-Inhibitoren in der zellulären UV-Antwort hin. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass durch SAHA-Behandlung eine Wiederherstellung der CPD-Reparaturkapazität in humanen CSB-defizienten Fibroblasten erreicht wird. Darüber hinaus konnte der in der Literatur bereits beschriebene pro-apoptische Einfluss von HDAC-Inhibitoren bestätigt werden, der allerdings nur zum Teil die Induktion der CPD-Reparatur erklären kann. Die Aufklärung der Wirkmechanismen dieser Substanzen bedarf allerdings weiterer intensiver Forschung.

5. Literatur

- 1 Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506 (2003).
- 2 Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB: The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8:443-454 (2005).
- 3 Bell EL, Emerling BM, Chandel NS: Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion* 5:322-332 (2005).
- 4 Berneburg M, Krutmann J: Photoimmunology, DNA repair and photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol B* 54:87-93 (2000).
- 5 Bernhard D, Moser C, Backovic A, Wick G: Cigarette smoke--an aging accelerator? *Exp Gerontol* 42:160-165 (2007).
- 6 Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ, Whitelaw ML: bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 13:827-841 (2013).
- 7 Brahim-Horn MC, Bellot G, Pouyssegur J: Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 21:67-72 (2011).
- 8 Brash DE, Ponten J: Skin precancer. *Cancer Surv* 32:69-113 (1998).
- 9 Busca R, Berra E, Gaggioli C, Khaled M, Bille K, Marchetti B, Thyss R, Fitsialos G, Larribere L, Bertolotto C, Virolle T, Barbry P, Pouyssegur J, Ponzio G, Ballotti R: Hypoxia-inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol* 170:49-59 (2005).
- 10 Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL: Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531:5-23 (2003).
- 11 Cadet J, Bellon S, Douki T, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Pouget JP, Ravanat JL, Romieu A, Sauvaigo S: Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 23:33-43 (2004).
- 12 Chang TS: An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10:2440-2475 (2009).
- 13 Chen CS, Wang YC, Yang HC, Huang PH, Kulp SK, Yang CC, Lu YS, Matsuyama S, Chen CY, Chen CS: Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res* 67:5318-5327 (2007).
- 14 Chen D, Li M, Luo J, Gu W: Direct interactions between HIF-1 α and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* 278:13595-13598 (2003).

- 15 Cho YS, Bae JM, Chun YS, Chung JH, Jeon YK, Kim IS, Kim MS, Park JW: HIF-1alpha controls keratinocyte proliferation by up-regulating p21(WAF1/Cip1). *Biochim Biophys Acta* 1783:323-333 (2008).
- 16 Cho YS, Kim CH, Park JW: Involvement of HIF-1alpha in UVB-induced epidermal hyperplasia. *Mol Cells* 28:537-543 (2009).
- 17 Citterio E, Rademakers S, van der Horst GT, van Gool AJ, Hoeijmakers JH, Vermeulen W: Biochemical and biological characterization of wild-type and ATPase-deficient Cockayne syndrome B repair protein. *J Biol Chem* 273:11844-11851 (1998).
- 18 Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M: A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell* 2:259-265 (1998).
- 19 Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM: MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res* 69:1221-1229 (2009).
- 20 Crossin KL: Oxygen levels and the regulation of cell adhesion in the nervous system: a control point for morphogenesis in development, disease and evolution? *Cell Adh Migr* 6:49-58 (2012).
- 21 DiGiovanna JJ, Kraemer KH: Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol* 132:785-796 (2012).
- 22 El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, .: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54:1169-1174 (1994).
- 23 Evans SM, Schrlau AE, Chalian AA, Zhang P, Koch CJ: Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol* 126:2596-2606 (2006).
- 24 Everett MA, Yeagers E, Sayre RM, Olson RL: Penetration of epidermis by ultraviolet rays. *Photochem Photobiol* 5:533-542 (1966).
- 25 Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M: Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 71:642-651 (2006).
- 26 Feige E, Yokoyama S, Levy C, Khaled M, Igras V, Lin RJ, Lee S, Widlund HR, Granter SR, Kung AL, Fisher DE: Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E924-E933 (2011).
- 27 Filippi S, Latini P, Frontini M, Palitti F, Egly JM, Proietti-De-Santis L: CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *EMBO J* 27:2545-2556 (2008).
- 28 Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE: Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280:125-133 (2009).

- 29 Fritsche E, Schafer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hubenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz LO, Rannug A, Furst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J: Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8851-8856 (2007).
- 30 Gaymes TJ, Padua RA, Pla M, Orr S, Omidvar N, Chomienne C, Mufti GJ, Rassool FV: Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI-dependent apoptosis? *Mol Cancer Res* 4:563-573 (2006).
- 31 Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoulis C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI: Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma Res* 13:493-501 (2003).
- 32 Gilchrest BA: Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* 21:610-613 (1989).
- 33 Golubovskaya VM, Cance WG: Targeting the p53 pathway. *Surg Oncol Clin N Am* 22:747-764 (2013).
- 34 Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91 (1996).
- 35 Hanna SC, Krishnan B, Bailey ST, Moschos SJ, Kuan PF, Shimamura T, Osborne LD, Siegel MB, Duncan LM, O'Brien ET, III, Superfine R, Miller CR, Simon MC, Wong KK, Kim WY: HIF1alpha and HIF2alpha independently activate SRC to promote melanoma metastases. *J Clin Invest* 123:2078-2093 (2013).
- 36 Hansson LO, Friedler A, Freund S, Rudiger S, Fersht AR: Two sequence motifs from HIF-1alpha bind to the DNA-binding site of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10305-10309 (2002).
- 37 Hasan S, Hassa PO, Imhof R, Hottiger MO: Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature* 410:387-391 (2001).
- 38 Hosseini M, Ezzedine K, Taieb A, Rezvani HR: Oxidative and energy metabolism as potential clues for clinical heterogeneity in nucleotide excision repair disorders. *J Invest Dermatol* 135:341-351 (2015).
- 39 Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25 (1992).
- 40 Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C: The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol* 131:203-210 (2011).

- 41 Kamarthapu V, Nudler E: Rethinking transcription coupled DNA repair. *Curr Opin Microbiol* 24C:15-20 (2015).
- 42 Kamenisch Y, Fousteri M, Knoch J, von Thaler AK, Fehrenbacher B, Kato H, Becker T, Dolle ME, Kuiper R, Majora M, Schaller M, van der Horst GT, van SH, Rocken M, Rapaport D, Krutmann J, Mullenders LH, Berneburg M: Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med* 207:379-390 (2010).
- 43 Kawada S, Ohtani M, Ishii N: Increased oxygen tension attenuates acute ultraviolet-B-induced skin angiogenesis and wrinkle formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R694-R701 (2010).
- 44 Kawada S, Ishii N: Suppression of UVB-induced HIF-1alpha up-regulation by hyperoxia does not prevent wrinkle formation associated with increased MMPs activity in mouse skin. *Biomed Res* 32:363-372 (2011).
- 45 Ke Q, Costa M: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70:1469-1480 (2006).
- 46 Kietzmann T, Jungermann K, Gorlach A: Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases. *Thromb Haemost* 89:666-673 (2003).
- 47 Kim EJ, Kim YK, Kim JE, Kim S, Kim MK, Park CH, Chung JH: UV modulation of subcutaneous fat metabolism. *J Invest Dermatol* 131:1720-1726 (2011).
- 48 Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH: Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mech Ageing Dev* 126:1170-1177 (2005).
- 49 Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ: Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145:1388-1396 (2007).
- 50 Krutmann J, Schroeder P: Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14:44-49 (2009).
- 51 Krutmann J: [How the sun ages our skin. The dermis as the driving force]. *Hautarzt* 62:588-590 (2011).
- 52 Laugel V: Cockayne syndrome: the expanding clinical and mutational spectrum. *Mech Ageing Dev* 134:161-170 (2013).
- 53 Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA: Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14639-14644 (2010).
- 54 Lee YA, Choi HM, Lee SH, Hong SJ, Yang HI, Yoo MC, Kim KS: Hypoxia differentially affects IL-1beta-stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like

- synoviocytes in an HIF-1alpha-dependent manner. *Rheumatology (Oxford)* 51:443-450 (2012).
- 55 Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M: Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis* 6:70 (2011).
- 56 Lining X, Uchi H, Hayashida S, Tsuji G, Kido M, Nakahara T, Takeuchi S, Takahara M, Moroi Y, Furue M: Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha with progression of keratinocytic neoplasms. *J Dermatol Sci* 56:135-136 (2009).
- 57 Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A: The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:828-833 (2010).
- 58 Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC: Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 40:294-309 (2010).
- 59 Mallery DL, Tanganelli B, Colella S, Steingrimsdottir H, van Gool AJ, Troelstra C, Stefanini M, Lehmann AR: Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome. *Am J Hum Genet* 62:77-85 (1998).
- 60 Marks PA, Xu WS: Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107:600-608 (2009).
- 61 Marrot L, Meunier JR: Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58:S139-S148 (2008).
- 62 Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JH: Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:465-481 (2014).
- 63 Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H: Light, including ultraviolet. *J Autoimmun* 34:J247-J257 (2010).
- 64 Mendez-Acuna L, Di Tomaso MV, Palitti F, Martinez-Lopez W: Histone post-translational modifications in DNA damage response. *Cytogenet Genome Res* 128:28-36 (2010).
- 65 Merk HF, Abel J, Baron JM, Krutmann J: Molecular pathways in dermatotoxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:267-277 (2004).
- 66 Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M: Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 33:1231-1242 (2002).
- 67 Monsel G, Ortonne N, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N: c-Kit mutants require hypoxia-inducible factor 1alpha to transform melanocytes. *Oncogene* 29:227-236 (2010).
- 68 Moriwaki S, Kraemer KH: Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 17:47-54 (2001).
- 69 Neckers L, Ivy SP: Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15:419-424 (2003).
- 70 Niculescu AB, III, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical

- determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18:629-643 (1998).
- 71 Nys K, Maes H, Dudek AM, Agostinis P: Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1alpha in skin carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1816:1-12 (2011).
 - 72 O'Toole EA, van KR, Chen M, Woodley DT: Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. *J Cell Physiol* 214:47-55 (2008).
 - 73 Obacz J, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R: Cross-talk between HIF and p53 as mediators of molecular responses to physiological and genotoxic stresses. *Mol Cancer* 12:93 (2013).
 - 74 Ogryzko VV, Wong P, Howard BH: WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17:4877-4882 (1997).
 - 75 Ozdirim E, Topcu M, Ozon A, Cila A: Cockayne syndrome: review of 25 cases. *Pediatr Neurol* 15:312-316 (1996).
 - 76 Paskin TR, Jellies J, Bacher J, Beane WS: Planarian Phototactic Assay Reveals Differential Behavioral Responses Based on Wavelength. *PLoS One* 9:e114708 (2014).
 - 77 Patel MP, Masood A, Patel PS, Chanan-Khan AA: Targeting the Bcl-2. *Curr Opin Oncol* 21:516-523 (2009).
 - 78 Petruccelli LA, Dupere-Richer D, Pettersson F, Retrouvey H, Skoulikas S, Miller WH, Jr.: Vorinostat induces reactive oxygen species and DNA damage in acute myeloid leukemia cells. *PLoS One* 6:e20987 (2011).
 - 79 Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A: Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res* 571:19-31 (2005).
 - 80 Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, Bechara EJ, Halaban R, Douki T, Brash DE: Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science* 347:842-847 (2015).
 - 81 Ramanathan B, Smerdon MJ: Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J Biol Chem* 264:11026-11034 (1989).
 - 82 Ramirez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, Jorcano JL: A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 39:52-57 (2004).
 - 83 Rawlings AV, Voegeli R: Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res* 351:217-235 (2013).
 - 84 Rezvani HR, Dedieu S, North S, Belloc F, Rossignol R, Letellier T, de VH, Taieb A, Mazurier F: Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure. *J Biol Chem* 282:16413-16422 (2007).

- 85 Rezvani HR, Mahfouf W, Ali N, Chemin C, Ged C, Kim AL, de VH, Taieb A, Bickers DR, Mazurier F: Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acids Res* 38:797-809 (2010).
- 86 Rezvani HR, Ali N, Serrano-Sanchez M, Dubus P, Varon C, Ged C, Pain C, Cario-Andre M, Seneschal J, Taieb A, de VH, Mazurier F: Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1alpha accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse. *J Cell Sci* 124:4172-4183 (2011).
- 87 Ruan K, Song G, Ouyang G: Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 107:1053-1062 (2009).
- 88 Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW: The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10833-10838 (2001).
- 89 Rumora AE, Kolodziejczak KM, Malhowski WA, Nunez ME: Thymine dimer-induced structural changes to the DNA duplex examined with reactive probes (dagger). *Biochemistry* 47:13026-13035 (2008).
- 90 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS: Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60:4010-4015 (2000).
- 91 Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272:22642-22647 (1997).
- 92 Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J: Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 119:1323-1329 (2002).
- 93 Schreck I, Chudziak D, Schneider S, Seidel A, Platt KL, Oesch F, Weiss C: Influence of aryl hydrocarbon- (Ah) receptor and genotoxins on DNA repair gene expression and cell survival of mouse hepatoma cells. *Toxicology* 259:91-96 (2009).
- 94 Schroeder P, Lademann J, Darvin ME, Stege H, Marks C, Bruhnke S, Krutmann J: Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: implications for protection. *J Invest Dermatol* 128:2491-2497 (2008).
- 95 Schroeder P, Haendeler J, Krutmann J: The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. *Exp Gerontol* 43:629-632 (2008).
- 96 Schroeder P, Krutmann J: [IRA protection. Needs and possibilities]. *Hautarzt* 60:301-304 (2009).

- 97 Scortegagna M, Martin RJ, Kladney RD, Neumann RG, Arbeit JM: Hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 69:2638-2646 (2009).
- 98 Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:5447-5454 (1992).
- 99 Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8:588-594 (1998).
- 100 Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-732 (2003).
- 101 Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I: Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci* 12:54-64 (2013).
- 102 Slominski A, Kim TK, Brozyna AA, Janjetovic Z, Brooks DL, Schwab LP, Skobowiat C, Jozwicki W, Seagroves TN: The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: melanogenesis leads to stimulation of HIF-1alpha expression and HIF-dependent attendant pathways. *Arch Biochem Biophys* 563:79-93 (2014).
- 103 Spivak G: UV-sensitive syndrome. *Mutat Res* 577:162-169 (2005).
- 104 Tamburini BA, Tyler JK: Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Mol Cell Biol* 25:4903-4913 (2005).
- 105 Tanaka K, Kawai K, Kumahara Y, Ikenaga M, Okada Y: Genetic complementation groups in cockayne syndrome. *Somatic Cell Genet* 7:445-455 (1981).
- 106 Thrash-Bingham CA, Tartof KD: aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J Natl Cancer Inst* 91:143-151 (1999).
- 107 Uchida T, Rossignol F, Matthey MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C: Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem* 279:14871-14878 (2004).
- 108 Vaupel P, Mayer A, Hockel M: Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 381:335-354 (2004).
- 109 Wallace SS: Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst)* 19:14-26 (2014).
- 110 Wang W: Oxygen partial pressure in outer layers of skin: simulation using three-dimensional multilayered models. *Microcirculation* 12:195-207 (2005).
- 111 Wenger RH: Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 203:1253-1263 (2000).

- 112 Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G: Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005:re12 (2005).
- 113 Yuan J, Glazer PM: Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. *Mutat Res* 400:439-446 (1998).

6. Anhang

Danksagung

Diese Danksagung ist allen Menschen gewidmet, die die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Ich möchte mich zuerst bei Herrn Prof. Krutmann für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die konstruktiven und motivierenden Gespräche und die damit verbunden positiven Impulse bedanken.

Frau Prof. Dr. Vlada Urlacher danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Dr. Marc Majora der mit seiner stetigen Gesprächsbereitschaft und seinem wissenschaftlichen Know-How mir immer unterstützend zur Seite stand. Das war eine großartige Betreuung die letzten Jahre.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die restlichen Mitarbeiter der AG Krutmann:

Ich danke Dr. Karin Aufenvenne für ihre nette Gesprächsbereitschaft, die wissenschaftliche Unterstützung und für die angenehmen Pausen, die wir miteinander verbracht haben.

Maren Schneider und Ingo Uthe habe ich besonders zu danken. Sie halfen nicht nur einmal in stressigen Situation mit einer helfenden Hand und hatten immer ein offenes Ohr für all meine Probleme. Eure Unterstützung war großartig. Danke euch Beiden. Ihr seid die Besten.

Dr. Sonja Didovic und Elisabeth Springer danke ich für die nette Zeit in unserem Großraumbüro und die fortwährende Unterstützung.

Dr. Thomas Haarmann-Stemmann und seiner AG danke ich für die Hilfsbereitschaft beim South-Western Blot und die netten Gespräche und Kaffeepausen in denen wir viel gelacht haben.

Zuletzt möchte ich einen ganz großen Dank an meine Familie aussprechen. Meine Freundin Katrin, meine Eltern und meine Schwester Natascha standen immer hinter mir und haben mich großartig unterstützt. Ich danke euch für euren jahrelangen Rückhalt. Ihr habt einen sehr großen Anteil an dieser Arbeit.

Erklärung

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

Düsseldorf, den 07.05.2015

Kevin Sondenheimer