

Untersuchungen zur Phototoxizität des endogenen Arylhydrocarbon-Rezeptor-Liganden FICZ

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katharina Maria Rolfes

aus Ratingen

Düsseldorf, November 2020

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. med. Jean Krutmann
2. Prof. Dr. rer. nat. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis..... v

Tabellenverzeichnisvii

Abkürzungsverzeichnis.....viii

Zusammenfassungxi

Summary.....xiii

1. Einleitung..... 1

1.1. Die Haut..... 1

1.2. Ultraviolette Strahlung und die Haut2

1.3. Adverse Effekte ultravioletter B-Strahlung (UVB)4

1.4. Der AHR als zentraler Mediator der UVB-Stressantwort 6

1.5. Photosensibilisatoren, UVA-Strahlung und FICZ8

1.6. Oxidativer Stress und NRF2 9

1.7. Der programmierte Zelltod (Apoptose) 12

1.8. Ziel der Arbeit..... 15

2. Material und Methoden..... 16

2.1. Allgemeines 16

2.2. Zellkulturtechnik..... 16

 Kultivierung humaner Keratinozyten..... 16

 Aushungern primärer Keratinozyten..... 19

 Belastung humaner Keratinozyten 19

2.3. In vivo Untersuchungen (Mausmodell)20

 Genotypisierung20

2.4. UV-Bestrahlung von humanen Keratinozyten und Mäusen 21

2.5. Aufbereitung der Hautproben von SKH-1 haarlosen Mäusen.....22

2.6. Caspase-3, -8 und -9 Aktivitäts-Assay 23

2.7. 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Assay24

 Kalibriergerade Resorufin.....24

 Proteinbestimmung mit dem CBQCA-Kit.....25

2.8. Nicoletti Färbung zur Bestimmung apoptotischer Zellen.....25

2.9. Nicoletti Färbung zur Bestimmung apoptotischer und γ H2AX-positiver Zellen 26

2.10. ROS Messung mit dem fluorogenen Farbstoff MitoSox26

2.11. Bestimmung der FICZ-Konzentration im Medium von HaCaT-Zellen26

2.12. mRNA-Analytik.....	27
Isolation und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA	27
Complementary Desoxyribonukleinsäure (cDNA) -Synthese	27
Quantitative Real-Time PCR	28
2.13. Western Blot-Analyse.....	30
Proteinisolation und Quantifizierung	30
SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
Western Blot.....	32
Immunodetektion von Proteinen	32
2.14. Southwestern Slot-Blot-Analyse.....	34
2.15. Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1. Die Aktivität des AHR beeinflusst die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Apoptose in Keratinozyten	36
3.1.1. FICZ induziert die Genexpression von CYP1A1 und sensibilisiert HaCaT-Zellen für die UVA-induzierte Apoptose.....	36
3.1.2. Ein AHR- <i>knockdown</i> führt zu einer Steigerung der durch FICZ/UVA- induzierte n Apoptose in Keratinozyten	38
3.1.3. Eine Aktivierung des AHR durch Tapinarof stimuliert die Enzymaktivität von CYP1A1 in Keratinozyten	40
3.1.4. Tapinarof reduziert AHR-abhängig die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in Keratinozyten.....	41
3.1.5. Eine simultane UVA- und UVB Bestrahlung stimuliert die Caspase-3 Aktivität in AHR- <i>knockdown</i> -Keratinozyten.....	44
3.2. Die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte oxidative Stressantwort wird durch den metabolischen Abbau von FICZ beeinflusst.....	45
3.2.1. Der metabolische Abbau von FICZ wird durch die Aktivität des AHR bestimmt.....	46
3.2.2. FICZ und UVA-Strahlung führen zu einem Anstieg von ROS in AHR- <i>knockdown</i> -Zellen	47
3.2.3. Eine Behandlung mit FICZ und UVA-Strahlung stimuliert die Genexpression des antioxidativ wirkenden Enzyms HOX-1 in Keratinozyten	48

3.2.4. NRF2-defiziente Keratinozyten zeigen eine gesteigerte durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität.....	49
3.3. Die Therapeutika Vemurafenib und Ketoconazol verstärken die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität	54
3.3.1. Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1	55
3.3.2. Vemurafenib und Ketoconazol hemmen den metabolischen Abbau von FICZ ..	58
3.3.3. Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose	60
3.3.4. AHR und CYP1A1-Inhibitoren steigern die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Genexpression der HOX-1.....	63
3.4. Eine simultane Bestrahlung mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden.....	65
3.4.1. Eine simultane Exposition mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-Aktivität in Keratinozyten	66
3.4.2. Die Anzahl der durch UVB-Strahlung induzierten apoptotischen und γ H2AX-positiven Zellen wird bei gleichzeitiger UVA-Bestrahlung reduziert	67
3.4.3. Die durch UVB-Strahlung induzierten CPD werden durch simultane UVA-Bestrahlung reduziert	71
3.4.4. UVB-Strahlung hemmt die Expression der HOX-1	72
3.4.5. Die Menge UVB-induzierter CPD (<i>in vivo</i>) wird durch simultane UVA-Exposition verringert	74
4. Diskussion	76
4.1. Eine Modulierung der AHR-Aktivität beeinflusst die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität	76
4.2. NRF2-defiziente Keratinozyten sind sensitiver gegenüber der durch FICZ und UVA-Strahlung induzierten Phototoxizität	81
4.3. Die photosensibilisierenden Therapeutika Vemurafenib und Ketoconazol verstärken die FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität.....	84
4.4. Eine simultane Bestrahlung mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden.....	88
5. Literaturverzeichnis	94
6. Danksagung	120

7. Eidesstattliche Erklärung..... 122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut	1
Abbildung 2: Eindringtiefe ultravioletter Strahlung in die menschliche Haut	3
Abbildung 3: AHR-Aktivierung durch UVB-Bestrahlung sowie exogene Liganden	7
Abbildung 4: Die Wirkung von UVB-Strahlung in der Epidermis nach Inhibierung des AHR.....	8
Abbildung 5: Der NRF2-Signalweg	11
Abbildung 6: Der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalwegs.....	14
Abbildung 7: Arbeitshypothese: Der AHR besitzt eine protektive Wirkung gegenüber einer simultanen Exposition mit UVA- und UVB-Strahlung.....	15
Abbildung 8: FICZ induziert die Genexpression von CYP1A1 und sensibilisiert HaCaT- Zellen für die UVA-induzierte Apoptose.	37
Abbildung 9: Längere Inkubationszeiten mit FICZ reduzieren die durch FICZ und UVA- Strahlung induzierte Caspase-3 Aktivität.	37
Abbildung 10: Längere Inkubationszeiten mit FICZ reduzieren die durch FICZ und UVA- Strahlung induzierte Apoptose.	38
Abbildung 11: Eine gentechnische Hemmung der AHR Expression führt zu einer Steigerung der durch FICZ/UVA- induzierten Apoptose in Keratinozyten.....	39
Abbildung 12: Tapinarof stimuliert die Enzymaktivität von CYP1A1 in Keratinozyten. ..	41
Abbildung 13: Tapinarof vermindert AHR-abhängig die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in HaCaT-Keratinozyten.	42
Abbildung 14: Tapinarof reduziert die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NHEK.	43
Abbildung 15: Eine simultane UVA- und UVB-Bestrahlung stimuliert die Caspase-3 Aktivität in AHR-knockdown-Keratinozyten.	44
Abbildung 16: Der metabolische Abbau von FICZ wird durch die Aktivität des AHR bestimmt.	46
Abbildung 17: FICZ und UVA-Strahlung induzieren ROS in AHR-knockdown- Keratinozyten.	48
Abbildung 18: FICZ und UVA-Strahlung steigert die Genexpression von HOX-1 in Keratinozyten.	49
Abbildung 19: Charakterisierung der NRF2-knockout Keratinozyten.....	50
Abbildung 20: Die Genexpression der HOX-1 ist in NRF2-defizienten Keratinozyten reduziert.....	51

Abbildung 21: NRF2-defiziente Keratinozyten zeigen eine gesteigerte durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität.....	52
Abbildung 22: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1 in HaCaT-Zellen.	56
Abbildung 23: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1 in NHEK.	57
Abbildung 24: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen den metabolischen Abbau von FICZ.....	59
Abbildung 25 MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in HaCaT-Zellen.....	60
Abbildung 26: MNF, 7-HF und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NHEK.....	62
Abbildung 27: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NHEK nach einer vierstündigen Inkubation mit FICZ/DMSO.....	63
Abbildung 28: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Genexpression der HOX-1 in NHEK.	64
Abbildung 29: Eine simultane Exposition mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-3 Aktivität in NHEK.	66
Abbildung 30: Eine simultane Exposition mit UVA- hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität in HaCaT-Keratinozyten.	67
Abbildung 31: Die gleichzeitige Bestrahlung mit UVA reduziert die Anzahl der durch UVB-Strahlung induzierten apoptotischen und γ H2AX-positiven HaCaT-Zellen.	69
Abbildung 32: Eine simultane UVA-Bestrahlung reduziert die Zahl der durch UVB-Strahlung induzierten γ H2AX-positiven HaCaT-Zellen.	70
Abbildung 33: Die durch UVB-Strahlung induzierten CPD werden durch simultane UVA-Bestrahlung reduziert.....	71
Abbildung 34: Die durch FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität wird durch die Aktivität des AHR beeinflusst	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien	17
Tabelle 2: Zellzahl und Plattenformate für die verschiedenen Experimente	18
Tabelle 3: Belastung der Zellen mit Substanzen und deren Endkonzentration	19
Tabelle 4: Verwendete Primer für die Genotypisierung	20
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die PCR	21
Tabelle 6: cDNA-Synthese Schritt 1 (Annealing)	27
Tabelle 7: cDNA-Synthese Schritt 2 (Reverse Transkription)	28
Tabelle 8: Reaktionsansatz qRT-PCR	28
Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten Primer	29
Tabelle 10: Zusammensetzung RIPA-Lyse Puffer	30
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die SDS-PAGE.....	31
Tabelle 12: Zusammensetzung des Transferpuffers	32
Tabelle 13: Reagenzien für die Proteindetektion.....	33
Tabelle 14: Verwendete Antikörper.....	33
Tabelle 15: Reagenzien für den Southwestern Slot-Blot	34

Abkürzungsverzeichnis

6-4PP	6-4 Photoprodukte
7-HF	7-Hydroxyflavon
A/A	Antibiotika/Antimykotika
AD	atopische Dermatitis
ADP	Adenosindiphosphat
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AMP	antimikrobielle Peptide
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
ARNT	<i>AHR Nuclear Translocator</i>
BAK	<i>BCL-2 Antagonist Killer</i>
BaP	Benzo[<i>a</i>]pyren
BAX	<i>BCL-2-associated X Protein</i>
BID	<i>BH3 Interacting-Domain Death Agonist</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Caspase	<i>Cysteine-Aspartate Proteases</i>
CBQCA	3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2Carboxaldehyde
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CHK1	Checkpoint Kinase-1
CICZ	Indol[3,2- <i>b</i>]carbazol-6-Carbonsäure
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom P450
D3T	3H-1, 2-Dithiole-3-Thione
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dFICZ	6,12-Di-Formylindol[3,2- <i>b</i>]carbazol
DISC	<i>Death-inducing Signaling Complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase
EV	Leervektor-Kontrollzellen
FADD	<i>FAS-Associated Protein with Death Domain</i>
FASLG	FAS Ligand
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FICZ	6-Formylindol[3,2b]carbazol
FLG	Filaggrin
GSH	Glutathion
HaCaT	<i>Human, Adult, low Calcium, high Temperature</i>
HOX-1	Hämoxygenase-1
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRR	Homologe Rekombinationsreparatur
ICZ	Indol[3,2-b]carbazol
IL	Interleukin
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i>
KO	<i>Knockout</i>
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinasen
MMP	Metalloproteinasen
MitoSox	<i>Red Mitochondrial Superoxid Indicator</i>
MMLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
MNF	3'Methoxy-4'Nitroflavon
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NADPH	Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe Endjoining
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NQO-1	NADPH:Chinon-Oxidoreduktase-1
NRF2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>

PAK	polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA-Lyse- Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	<i>short hairpin</i> Ribonukleinsäure
STAT6	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription-6</i>
sMaF	<i>small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma</i>
SOD	Superoxiddismutase
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
Th2	T-Helfer-2
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UDP-GT	Uridine 5'-Diphospho- Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtprozent

Die Abkürzungen chemischer Elemente und Verbindungen entsprechen der IUPAC-Nomenklatur.

Zusammenfassung

Die Haut stellt die äußere Barriere unseres Körpers dar und ist regelmäßig einer Vielzahl umweltbedingter Stressfaktoren, wie ultravioletter (UV) Strahlung, ausgesetzt. Die UV-Strahlung, die auf unsere Körperoberfläche einwirkt, umfasst den Wellenlängenbereich von 280-400 nm und wird in die Bereiche UVA (315-400 nm) und UVB (280-315 nm) untergliedert. Die UVA-Photonen penetrieren tief in die Haut und erreichen sogar dermale Fibroblasten. Durch Generierung von oxidativem Stress werden diese geschädigt, wodurch es zu vorzeitigen Alterungsprozessen der Haut kommen kann. Die kurzwelligere UVB-Strahlung wird von makromolekularen Strukturen der epidermalen Keratinozyten, insbesondere der Desoxyribonukleinsäure (DNA), absorbiert, wodurch das Erbgut geschädigt und schließlich Krebserkrankungen der Haut induziert werden können.

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR), ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, wurde als einer der wichtigsten Mediatoren der kutanen UVB-Stressantwort identifiziert. Der AHR wird durch das Tryptophan-Photoprodukt 6-Formylindol[3,2b]carbazol (FICZ) aktiviert, welches im Zytosol von UVB-exponierten Keratinozyten entsteht. Eine Inhibierung des kutanen AHR-Signalweges führt zu einer Verringerung der UVB-induzierten Expression pro-inflammatorischer Enzyme, steigert die UVB-induzierte Apoptose, reduziert die UVB-induzierte Immunsuppression und hemmt somit die Photokarzinogenese. Daher wird eine transiente Hemmung des AHR weithin als eine geeignete Strategie betrachtet, die Haut vor der schädigenden Wirkung der UVB-Strahlung zu schützen. Interessanterweise wurde das Tryptophan-Photoprodukt FICZ als ein potenter Photosensibilisator für UVA-Strahlung identifiziert. Eine UVA-Bestrahlung FICZ-behandelter Keratinozyten resultierte in einer vermehrten Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, oxidativen DNA-Schäden und programmiertem Zelltod (Apoptose). Die Tatsache, dass UVB-Strahlung bzw. FICZ die Expression von Cytochrom P450 (CYP) 1A1 induziert, welches hauptsächlich für den schnellen Abbau des Tryptophan-Photoprodukts verantwortlich ist, impliziert, dass eine Modulation der AHR-Aktivität einen direkten Einfluss auf die UVA-induzierte Phototoxizität von FICZ hat. In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass eine Inhibierung des AHR zu einer gesteigerten UVA-induzierten Apoptose führt, wohingegen eine Exposition mit einem AHR-Agonisten und einer daraus gesteigerten CYP1A1 Expression, die Zellen vor den schädlichen Wirkungen der FICZ/UVA-Behandlung schützt. So zeigen die Befunde, dass die phototoxischen Therapeutika Vemurafenib und Ketoconazol möglicherweise ihre

photosensibilisierenden Eigenschaften durch eine Inhibierung des AHR und einer damit einhergehenden Akkumulierung von FICZ und/oder anderen phototoxischen Molekülen entfalten. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde geben erstmalig einen Anhaltspunkt für die klinische Relevanz des AHR in der Entstehung von Arzneimittel-induzierten phototoxischen Reaktionen der Haut.

Überraschenderweise konnte im Hinblick auf eine simultane Bestrahlung gezeigt werden, dass UVA-Strahlung die durch UVB-Strahlung induzierten DNA-Schäden (*in vitro* und *in vivo*) und die Apoptose (*in vitro*) hemmte. Diese Daten liefern somit erste Hinweise, die dazu beitragen könnten, das Konzept der Photoprotektion der menschlichen Haut zu überdenken und damit zu verbessern.

Summary

The skin is the external barrier of our body and is regularly exposed to a variety of environmental stress factors such as ultraviolet (UV) radiation. The UV radiation that affects our body's surface covers the wavelength range of 280-400 nm and is divided into UVA (315-400 nm) and UVB (280-315 nm). The UVA photons penetrate deep into the skin and even reach dermal fibroblasts. By generating oxidative stress, fibroblasts are damaged, which can lead to premature aging of the skin. The shorter-wave UVB radiation is absorbed by macromolecular structures of the epidermal keratinocytes, in particular the deoxyribonucleic acid (DNA), which can damage the genetic material and eventually induce skin cancer.

The arylhydrocarbon receptor (AHR), a ligand-activated transcription factor, has been identified as one of the major mediators of the cutaneous UVB stress response. The AHR is activated by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2b]carbazol (FICZ), which is produced in the cytosol of UVB-exposed keratinocytes. Inhibition of the cutaneous AHR signaling pathway leads to a decrease in UVB-induced expression of pro-inflammatory enzymes, increases UVB-induced apoptosis, reduces UVB-induced immunosuppression and thus inhibits photocarcinogenesis. Therefore, transient inhibition of AHR is widely regarded as an appropriate strategy to protect the skin from the damaging effects of UVB radiation. Interestingly, the tryptophan photoproduct FICZ has been identified as a potent photosensitizer for UVA radiation. UVA irradiation of FICZ-treated keratinocytes resulted in increased formation of reactive oxygen species, oxidative DNA damage and programmed cell death (apoptosis). The fact that UVB irradiation or FICZ induces the expression of cytochrome P450 (CYP) 1A1, which is mainly responsible for the rapid degradation of the tryptophan photoproduct, implies that a modulation of the AHR activity has a direct effect on the UVA-induced phototoxicity of FICZ. In fact, this work confirmed that inhibition of AHR leads to increased UVA-induced apoptosis, whereas exposure to an AHR agonist and consequent increased CYP1A1 expression protects cells from the adverse effects of FICZ/UVA treatment. Thus, the findings show that the phototoxic therapeutics vemurafenib and ketoconazole may possibly develop their photosensitizing properties by inhibition of AHR and a consequent accumulation of FICZ and/or other phototoxic molecules. The results obtained in this study provide for the first time an evidence of the clinical relevance of AHR in the development of drug-induced phototoxic skin reactions.

Surprisingly, with regard to simultaneous irradiation, it was shown that UVA radiation inhibited UVB-induced DNA damage (*in vitro* and *in vivo*) and apoptosis (*in vitro*). These data thus provide first indications that could help to rethink and even improve the concept of photoprotection of human skin.

1. Einleitung

1.1. Die Haut

Die Haut ist das größte menschliche Organ und stellt die äußere Barriere unseres Körpers dar. Aus diesem Grund ist die Haut permanent physikalischen und chemischen Stressfaktoren sowie pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Eine ihrer Hauptfunktionen liegt daher im Schutz der inneren Organe vor äußeren Einflussfaktoren, der Verhinderung des unkontrollierten Wasserverlusts und der Regulation der Körperwärme. Die Haut besteht aus Bindegewebe, hornbildenden Zellen, Adnexen, Nerven, Zellen des Immunsystems und Gefäßen. Dabei wird sie im Wesentlichen in drei Schichten eingeteilt: die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut) (Rassner und Steinert, 2009; Sterry und Czaika, 2011). Die Epidermis ist das äußere Kompartiment, welches ständig mit der Außenwelt in Kontakt steht und besteht aus mehreren Schichten von Keratinozyten (90 %) sowie den Melanozyten (5 %) und den Immunzellen (Schaefer und Redelmeier, 1996; Jain, 2012). Die in dieser Arbeit im Fokus stehenden Keratinozyten werden in der untersten Schicht der Epidermis, der sogenannten Basalzellschicht (*Stratum basale*), aus epidermalen Stammzellen gebildet (Janes *et al.*, 2002). Auf ihrem Weg zur oberen, epidermalen Schicht, der Hornschicht (*Stratum corneum*), differenzieren die Keratinozyten zu toten Korneozyten aus.

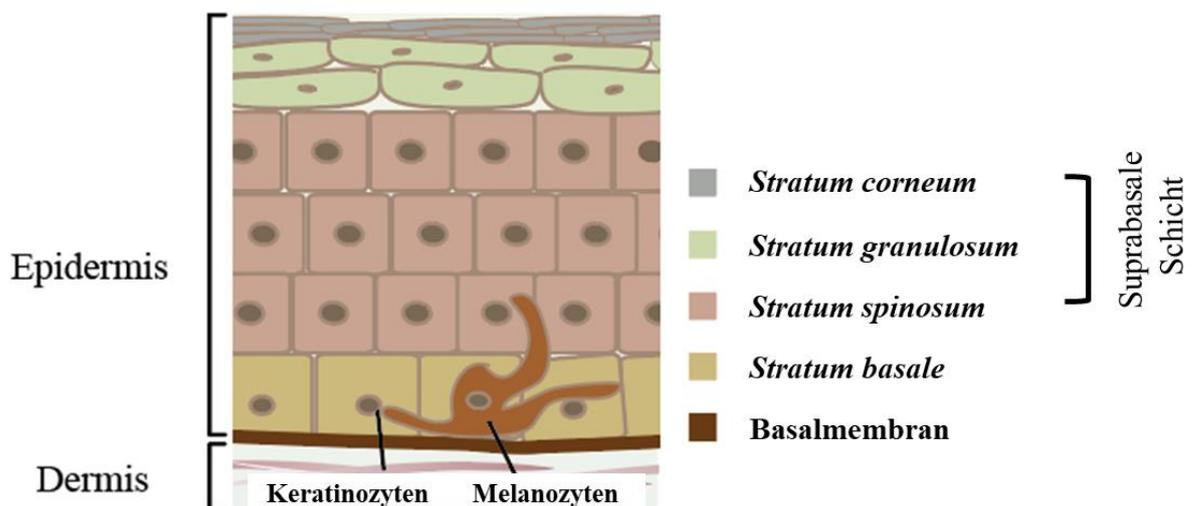


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut

Die Entstehung des Plattenepithels der Epidermis basiert daher auf unterschiedlichen Differenzierungsstadien einer einzigen Zellpopulation, den Keratinozyten. Während dieses Differenzierungsprozesses kommt es zu einer vermehrten Bildung und schlussendlich zu einer Aggregation von Keratinfilamenten (Keratinisierung). Die Keratinisierung bildet zusammen mit der Synthese weiterer Proteine (u.a. Filaggrin, Involucrin und Loricrin) eine nahezu unlöslich verhornte Hülle, den *Cornified Envelope*, welches wiederum in eine intrazelluläre Lipidmatrix eingebettet ist, bestehend aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren (Matoltsy und Balsamo, 1955; Steven und Steinert, 1994; Simon *et al.*, 1996; Proksch *et al.*, 2008). Die Regenerationsfähigkeit der Epidermis stellt somit eine wichtige Funktion der Haut dar, für deren Entstehung und Erneuerung ein komplex reguliertes Differenzierungsprogramm erforderlich ist (Eckert und Rorke, 1989; Fuchs, 1994; Sutter *et al.*, 2011). In der Epidermis, im *Stratum basale*, befinden sich zudem die pigmentbildenden Melanozyten, deren synthetisierter Farbstoff Melanin mitverantwortlich für die Absorption von UV-Strahlung ist (Brenner und Hearing, 2008). Im darüber liegenden *Stratum spinosum* stehen die Langerhans-Zellen mit den umgebenden Keratinozyten in Kontakt und tragen zum immunologischen Schutz bei. Diese Zellen initiieren eine Immunreaktion auf chemische Agentien, physikalische Strahlung, Viren oder Bakterien (Tang *et al.*, 1993; Timares *et al.*, 2008; West und Bennett, 2017). Im darüberliegenden *Stratum granulosum* findet eine vermehrte Synthese von Proteinen und Lipiden statt, um das *Stratum corneum* zu bilden. Über die Basalmembran wird die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Dermis besteht aus Bindegewebe, das zumeist von den Fibroblasten gebildet wird, welche Kollagenfasern und Proteoglykane produzieren und der Haut eine hohe Reißfestigkeit und Elastizität geben. Zusätzlich versorgen Blutgefäße in der Dermis die gefäßlose Epidermis über Diffusion mit Nährstoffen. Darüber hinaus befinden sich die Haarfollikel mit ihren Talg- und Schweißdrüsen sowie die sensorischen Rezeptoren (für Berührung, Druck, Schmerz und Temperatur) in der Dermis. Die unterhalb der Dermis lokalisierte Subkutis besteht überwiegend aus Fettgewebe, welches zur Wärmeisolierung und als Energiespeicher dient. Die Subkutis bildet den Übergang zu den darunterliegenden Muskeln und Sehnen (Smolle, 2003; Rassner und Steinert, 2009; Sterry und Czaika, 2011).

1.2. Ultraviolette Strahlung und die Haut

Die ultraviolette (UV)-Strahlung, das sichtbare Licht sowie die Infrarot-Strahlung sind Teil der elektromagnetischen Strahlung des Sonnenlichtes und werden im Hinblick auf ihre

chemischen und physikalischen Wirkungen unterteilt. Die Infrarot-Strahlung weist dabei ein breites Wellenlängenspektrum zwischen 780 nm und 1 mm auf, wohingegen die kurzwellige UV-Strahlung einen Bereich zwischen 100 nm und 400 nm aufweist. Die UV-Strahlung liegt dabei unterhalb der Wellenlängen für sichtbares Licht und wird weiterhin in UVA- (315-400 nm), UVB- (280-315 nm) und UVC- (100-280 nm) Strahlung eingeteilt. Die UV-Strahlung kann je nach Wellenlänge unterschiedlich tief in die menschliche Haut eindringen. Welcher Anteil des Sonnenlichts die Erdoberfläche und somit unsere Haut erreicht, wird durch die Erdatmosphäre bestimmt. Laut Bundesamt für Strahlenschutz wird der größte Anteil der UV-Strahlung dabei durch das in der Erdatmosphäre enthaltene Ozon, den Sauerstoff und Wasserdampf absorbiert und/oder reflektiert. So erreichen lediglich 5 % der UV-Strahlung die Erdoberfläche. Dabei machen die UVA-Strahlen mit ca. 95 % den größten Anteil aus. Je nach geographischer Lage und Dichte der Ozonschicht können jedoch mindestens 5 % der im Sonnenlicht enthaltenen, energiereicheren UVB-Strahlen in die Haut eindringen, jedoch keine UVC-Strahlen, da diese vollständig von der Erdatmosphäre absorbiert/reflektiert werden. Die UVA-Strahlung kann tief in die Haut eindringen und sogar dermale Fibroblasten erreichen, wohingegen die kurzwelligere und energiereichere UVB-Strahlung beinahe vollständig durch makromolekulare Strukturen epidermaler Zellen, insbesondere der Keratinozyten, absorbiert wird (Abb. 2).

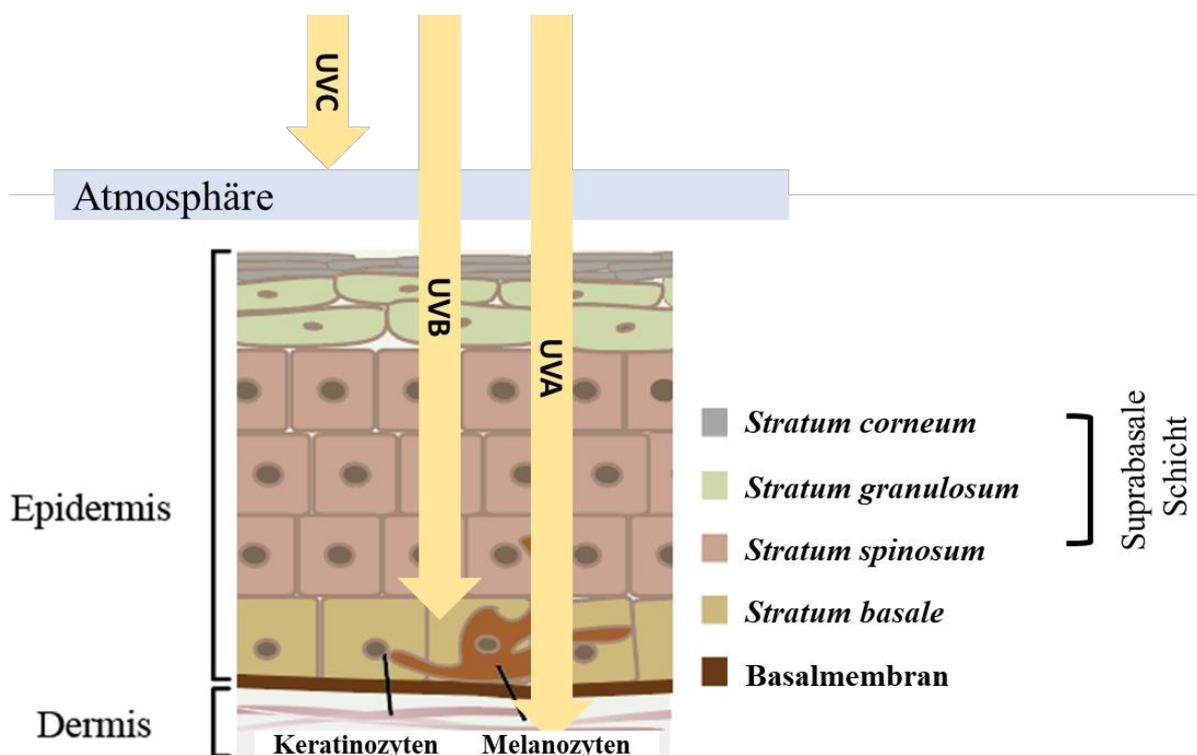


Abbildung 2: Eindringtiefe ultravioletter Strahlung in die menschliche Haut

Eine verstärkte Exposition gegenüber UVB-Strahlung kann DNA-Schäden, entzündliche Reaktionen, Apoptose und immunsuppressive Wirkungen hervorrufen und schließlich zur Entstehung von Hautkrebserkrankungen wie dem kutanen Plattenepithelkarzinom beitragen (Bowden, 2004; Krutmann *et al.*, 2012; Elmetts und Athar, 2013; Schwarz und Beissert, 2013). UVA-Strahlung ruft insbesondere im dermalen Bindegewebe oxidativen Stress hervor, was zur Schädigung von Lipiden, Proteinen und der DNA von Fibroblasten führt und schließlich in vorzeitiger Hautalterung resultieren kann (Gilchrest und Krutmann, 2006; Park *et al.*, 2006; Battie *et al.*, 2014). Bedingt durch die Tatsache, dass sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung tumorinitiierende und tumorpromovierende Eigenschaften aufweisen, stuft die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation Strahlung dieser Wellenlängenbereiche als komplettes Humankarzinogen (Klasse 1) ein (El Ghissassi *et al.*, 2009). Doch obwohl bei einer übermäßigen Exposition mit UV-Strahlung die gesundheitlichen Nachteile überwiegen, wird die Absorption von UVB-Strahlung durch 7-Dehydrocholesterol für die endogene Vitamin D-Synthese und die Bildung von Melanin zum Schutz vor UV-Strahlung als positiv und wichtig für den Organismus angesehen (Brenner und Hearing, 2008; Holick, 2008). Des Weiteren tragen Phototherapien erfolgreich zur Behandlung von verschiedenen Hauterkrankungen, wie zum Beispiel der atopischen Dermatitis (AD) und Psoriasis, bei. Dabei kommt es zu immunmodulierenden und pro-apoptotischen Effekten, die zu einer Eliminierung der geschädigten Zellen in der Haut führen (Parrish und Jaenicke, 1981; van Weelden *et al.*, 1988; George *et al.*, 1993; Tintle *et al.*, 2011).

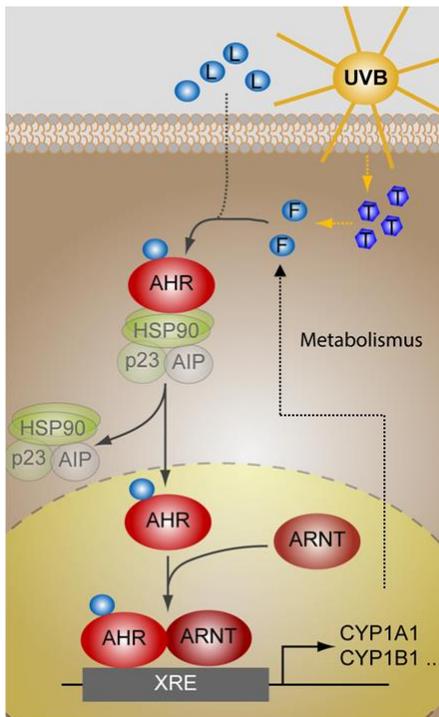
1.3. Adverse Effekte ultravioletter B-Strahlung (UVB)

Um Wirkungen auf zellulärer Ebene hervorrufen zu können, bedarf es Chromophore, die UVB-Strahlung absorbieren und ihre physikalische in chemische Energie umwandeln können. Das wichtigste Chromophor für UVB-Photonen stellt die DNA dar (Setlow und Carrier, 1963; Ulitzur, 1972; Becker und Wang, 1989; Herrlich *et al.*, 2008; Krutmann *et al.*, 2012). Darüber hinaus existieren jedoch weitere molekulare Bausteine der Zelle, beispielsweise aromatische Aminosäuren, die UVB-Photonen absorbieren und so als Mediatoren der zellulären UVB-Antwort fungieren können (Rannug *et al.*, 1987). Der bedeutendste adverse Effekt von UVB-Strahlung ist die Schädigung der genomischen DNA, genauer die Bildung von mutagenen DNA-Photoprodukten, wodurch eine erste zelluläre Stressantwort initiiert wird (Becker und Wang, 1989; Herrlich *et al.*, 2008). Im Rahmen

dieser DNA-Schadensantwort wird ein Arrest des Zellzyklus eingeleitet, der es der Zelle ermöglichen soll, den Schaden durch spezialisierte DNA-Reparatursysteme zu beheben, oder im Falle einer zu starken Schädigung, den programmierten Zelltod (Apoptose) einzuleiten, um den Prozess der Mutagenese zu verhindern (Herrlich *et al.*, 1994; Eller *et al.*, 1997; Pavey *et al.*, 2001; D'Errico *et al.*, 2003; Marteiijn *et al.*, 2014; Roos *et al.*, 2016). Trotz der hohen Präzision zellulärer DNA-Reparatursysteme können, insbesondere nach intensiver UVB-Exposition, Fehler in der DNA-Reparatur auftreten, die nach mitotischer Manifestierung zur Initiation einer malignen Hauterkrankung führen können. Die UVB-induzierte Schädigung der DNA, genauer gesagt die Bildung von DNA-Photoprodukten, stellt darüber hinaus den wichtigsten Auslöser für die immunsuppressive Wirkung von UVB-Strahlung dar (Kripke *et al.*, 1992; Jans *et al.*, 2006). Die Entstehung solcher Photoprodukte erfolgt dabei überwiegend durch eine Vernetzung von zwei im DNA-Strang benachbarter Pyrimidinbasen und es kommt zur Bildung sogenannter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) (Becker und Wang, 1989). Die UVB-induzierte Immunsuppression ist eine antigen-spezifische, durch regulatorische T-Zellen vermittelte Reaktion, welche die Antworten von Effektor-T-Zellen in der Epidermis unterdrückt und somit die Entstehung von UVB-induzierten Tumoren begünstigt (Cruz und Bergstresser, 1993; Poon *et al.*, 2005; Schwarz und Schwarz, 2011; Schwarz und Beissert, 2013). Unabhängig von der Schädigung der DNA, verursacht UVB-Strahlung eine zweite Stressantwort, die eine Aktivierung zentraler Signalmoleküle, wie des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR), von Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), Aktivator Protein-1 und *Nuclear Factor-κB*, umfasst (Devary *et al.*, 1992; Devary *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1994; Rosette und Karin, 1996; Fritsche *et al.*, 2007). Die UVB-vermittelte Aktivierung dieser Signalwege hat eine Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2), NO-Synthase, verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Matrix Metalloproteinasen (MMP) zur Folge, die eine pro-entzündliche Reaktion in Form von Vasodilatation, Rekrutierung zirkulierender Immunzellen und Abbau der extrazellulären Matrix verursachen (Deliconstantinos *et al.*, 1995; Deliconstantinos *et al.*, 1996; Werth *et al.*, 1997; Buckman *et al.*, 1998; Scordi und Vincek, 2000; Fagot *et al.*, 2002). Bedingt durch diese entzündlichen Vorgänge entsteht ein Mikromilieu, welches die Entstehung und das Wachstum von Tumorerkrankungen auf der Basis initiiert epidermaler Zellen begünstigt (Scordi und Vincek, 2000; Fagot *et al.*, 2002; Colotta *et al.*, 2009; Ben-Neriah und Karin, 2011).

1.4. Der AHR als zentraler Mediator der UVB-Stressantwort

Der AHR ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der die toxischen Effekte von Umweltgiften wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und polyzyklisch aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), zu denen das Benzo[*a*]pyren (BaP) gehört, vermittelt (Poland *et al.*, 1976; Bock und Köhle, 2006; Abel und Haarmann-Stemmann, 2010). Die im Folgenden beschriebenen molekularen Abläufe des AHR-Signalweges wurden in zahlreichen Studien aufgeschlüsselt, weshalb dieser Signalweg die wohl am besten charakterisierte Signalkaskade darstellt, die den Einfluss exogener Noxen in nukleäre Signale übersetzt. In Abwesenheit eines Liganden liegt der AHR in Form eines Multiproteinkomplexes, bestehend aus Hitzeschockprotein 90, p23, AIP und der Tyrosinkinase c-Src, im Zytoplasma der Zelle vor (Enan und Matsumura, 1996; Carver und Bradfield, 1997; Ma und Whitlock, 1997; Petrusis und Perdew, 2002). Bindet ein Ligand, zerfällt dieser Komplex, der AHR transloziert in den Zellkern und dimerisiert dort mit seinem Partnermolekül ARNT (*AHR Nuclear Translocator*) (Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992). Das resultierende Heterodimer erkennt und bindet an spezifische DNA-Motive, sogenannte Xenobiotika-responsive Elemente (XRE), in der Promotorsequenz von Zielgenen, um deren Expression zu verstärken. Eines der wohl bekanntesten Zielgen dieser AHR/ARNT-Kaskade kodiert für das fremdstoffmetabolisierende Enzym Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) (Denison *et al.*, 1988, 1989). Darüber hinaus resultiert der Zerfall des zytoplasmatischen Multiproteinkomplexes in einer Freisetzung der Tyrosinkinase c-Src, was eine Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter MAPK-Signaltransduktion zur Folge hat (Köhle *et al.*, 1999; Fritsche *et al.*, 2007; Randi *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012). Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass der AHR auch durch UVB-Exposition epidermaler Keratinozyten aktiviert werden kann und die Expression von CYP1A1 und COX-2 induziert (Fritsche *et al.*, 2007). Das initiale Ereignis hierfür stellt die intrazelluläre Bildung von 6-Formylindol[3,2b]carbazol (FICZ), einem Photoprodukt der Aminosäure Tryptophan, dar (Fritsche *et al.*, 2007). Dieses Photoprodukt kann mit hoher Affinität an den AHR binden und oben beschriebene Signalwege aktivieren (Abb. 3) (Rannug *et al.*, 1987; Fritsche *et al.*, 2007).



Tryptophan (T),
FICZ (F),
AHR Liganden (L),

Abbildung 3: AHR-Aktivierung durch UVB-Bestrahlung sowie exogene Liganden

Durch diese Arbeiten konnte erstmals die UVB-induzierte und DNA-schadensunabhängige Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter MAPK mechanistisch erklärt werden. In einer klinischen Studie mit zehn Probanden wurde außerdem gezeigt, dass der AHR auch in humaner Haut *in vivo* durch UVB-Strahlung aktiviert wird und die Expression von CYP1A1, COX-2 und MMP1 induziert (Tigges *et al.*, 2014). Da gesteigerte CYP1-Enzymlevel oxidativen Stress verursachen können und bekannt ist, dass COX-2 eine kritische Rolle in der Hautkrebsentstehung spielt (Nebert und Dalton, 2006; Elmetts *et al.*, 2014), wurde postuliert, dass der UVB-aktivierte AHR zum Prozess der Photokarzinogenese beiträgt (Agostinis *et al.*, 2007; Lippens *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnten weiterführende Studien zeigen, dass der AHR eine anti-apoptotische Funktion in UVB-bestrahlten humanen Keratinozyten *in vitro* und Maus-Haut *in vivo* besitzt (Frauenstein *et al.*, 2013; Pollet *et al.*, 2018). So führt eine genetische oder chemische Inhibition des AHR zu einer verstärkten Eliminierung UVB-geschädigter Zellen, einem Prozess, welcher der Hautkrebsentstehung entgegenwirkt (Heffernan *et al.*, 2009; Lippens *et al.*, 2009).

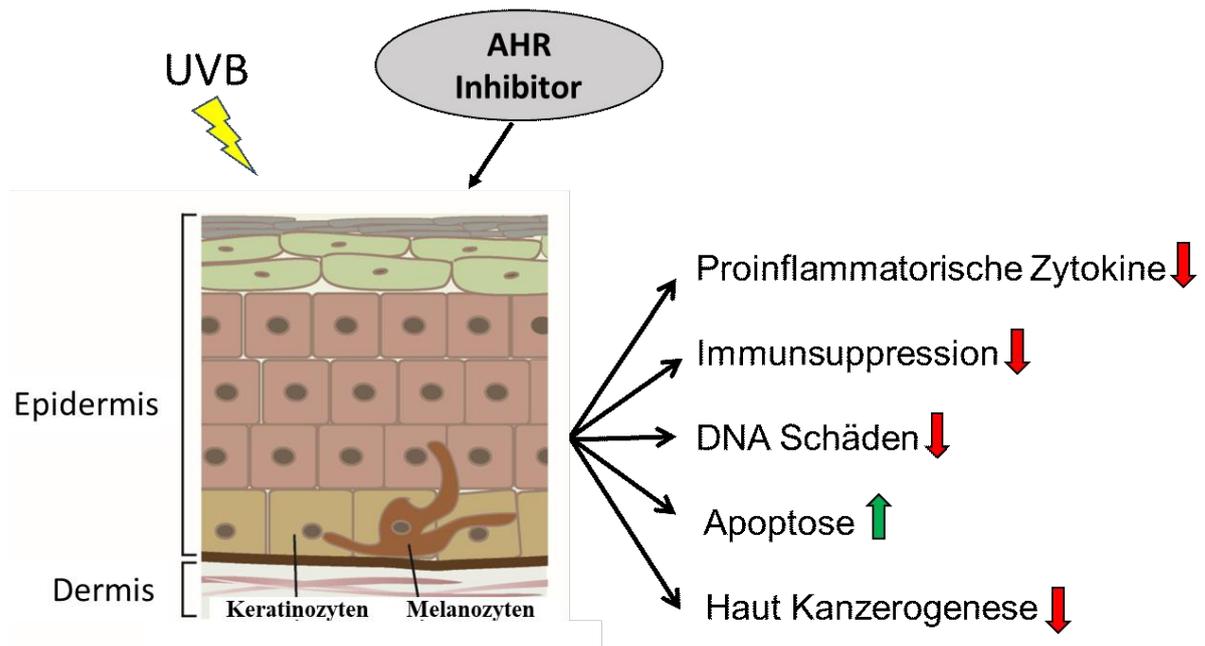


Abbildung 4: Die Wirkung von UVB-Strahlung in der Epidermis nach Inhibierung des AHR

Weiterhin ist der AHR an der Ausbildung der UVB-vermittelten lokalen Immunsuppression, die Abwehrreaktionen von Effektor-T-Zellen unterdrückt und somit maßgeblich zur Entstehung und Promotion von UVB-induzierten Hauttumoren beiträgt, beteiligt (Navid *et al.*, 2013; Bruhs *et al.*, 2015). In Kombination mit der bereits früher beschriebenen wichtigen Funktion des AHR für die chemische Hautkanzerogenese, konnte tatsächlich anhand einer chronischen Photokarzinogenese-Studie aufgezeigt werden, dass AHR-defiziente SKH-1 haarlose Mäuse ca. 50 % weniger UVB-induzierte kutane Plattenepithelkarzinome entwickeln als ihre AHR-profizienten Wurfgeschwister (Shimizu *et al.*, 2000; Nakatsuru *et al.*, 2004; Pollet *et al.*, 2018). Eine transiente Hemmung des AHR könnte demnach eine vielversprechende Strategie darstellen, um die Initiation und Promotion von UVB-induzierten Hauttumoren zu unterbinden (Pollet *et al.*, 2018).

1.5. Photosensibilisatoren, UVA-Strahlung und FICZ

Die Wirkung von UVA-Strahlung auf das Erbgut resultiert in einer nur sehr geringen Photoanregung der DNA. Ihr genotoxisches Potential entfaltet UVA-Strahlung vielmehr durch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie organischer freier Radikale, die mit der DNA und anderen Makromolekülen interagieren und diese schädigen können (Agar *et al.*, 2004; Wondrak *et al.*, 2006; Cadet *et al.*, 2009; Zastrow *et al.*, 2009). Neben der Generierung von oxidativem Stress durch Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen und Schädigung der mitochondrialen Atmungskette, können UVA-Photonen mit endogenen

Chromophoren interagieren, die als Photosensibilisatoren (*Photosensitizer*) dienen und zur Bildung von ROS führen bzw. diese verstärken (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997; Baier *et al.*, 2006; Wondrak *et al.*, 2006; Valencia und Kochevar, 2008). So entstehen beispielsweise Superoxidanionen, die nicht nur am Ort ihrer Bildung Schäden verursachen können, sondern nach spontaner Dismutation zu membran-permeablem Wasserstoffperoxid auch andere Zellorganellen oder Nachbarzellen zu schädigen vermögen (Petersen *et al.*, 2000). Bekannte Beispiele für potente UVA-*Photosensitizer* stellen Riboflavin (Vitamin B2) und Protoporphyrin IX dar (Sato *et al.*, 1995; Buchczyk *et al.*, 2001). Auch exogene Substanzen, wie beispielsweise BaP und andere polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, absorbieren Strahlung im UVA Wellenlängenbereich und entfalten dadurch starke phototoxische Effekte in pro- und eukaryotischen Zellen (Schirmer *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007; Botta *et al.*, 2009). Interessanterweise wurde der durch UVB-Strahlung gebildete endogene Ligand des AHR, das Tryptophan-Photoprodukt FICZ, als potenter *Photosensitizer* für UVA-Photonen in humanen Keratinozyten, 3D-Vollhautäquivalenten und muriner Haut beschrieben. Eine Bestrahlung FICZ-behandelter Zellen mit UVA führte zur Generierung von ROS und zu nachfolgenden oxidativen Schädigungen der DNA (Park *et al.*, 2015). Diese massive Phototoxizität von FICZ wurde bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich beobachtet und führte die Zellen schließlich zur Initiation der Apoptose. Interessanterweise wird das UVB-Photoprodukt FICZ hauptsächlich durch AHR-abhängige Monooxygenasen der CYP1-Familie, insbesondere dem CYP1A1, metabolisiert (Bergander *et al.*, 2004; Wincent *et al.*, 2009). Eine Hemmung des AHR-Signalweges in Keratinozyten führt zu einer Herabregulierung der basalen und induzierbaren CYP1A1-Expression (Fritsche *et al.*, 2007; Tigges *et al.*, 2014) und könnte daher, wie in der Zielsetzung detaillierter beschrieben, das Ausmaß der FICZ-vermittelten Phototoxizität beeinflussen.

1.6. Oxidativer Stress und NRF2

Unter oxidativem Stress wird eine Störung des Redox-Gleichgewichts verstanden, bei dem ein Überschuss an ROS zu Schädigungen der DNA und weiterer Makromoleküle führt. Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde 1985 erstmalig von Helmut Sies als Fachbegriff definiert (Sies, 2015). Die Bildung von ROS kann dabei über aerobe Stoffwechselfvorgänge, körpereigene Abwehrprozesse, exogene Noxen und photobiologische Prozesse initiiert werden (Paz *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Hamanaka *et al.*, 2013).

Lebende Organismen verfügen daher über ein fein reguliertes System zur Aufrechterhaltung sehr niedriger ROS-Werte, d.h. ihre Produktion und Eliminierung sind ausgeglichen, was zu einem definierten, stationären ROS-Niveau führt. Kommt es zu einer unkontrollierten Bildung von ROS und somit zu einem Ungleichgewicht zwischen Oxidantien auf der einen und Antioxidantien auf der anderen Seite, wird ein Netzwerk antioxidativer Verteidigungssysteme aktiviert (Birben *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2013). Antioxidantien dienen dabei als zellulärer Schutzmechanismus. So können diese die Entstehung von ROS verhindern (nicht-enzymatische Antioxidantien) sowie bereits oxidierte Moleküle reduzieren (enzymatische Antioxidantien). Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen unter anderem Vitamin C und Vitamin E, Pflanzeninhaltsstoffe wie Carotinoide und Polyphenole, und Gluthation (GSH), welches einer der wichtigsten endogenen Antioxidantien ist (Maalouf *et al.*, 2002; Telorack *et al.*, 2016; Kawashima *et al.*, 2018). GSH wird dabei aus den Aminosäuren Cystein, Glycin und Glutamat als spezielles Tripeptid synthetisiert und wird als direkter Redoxmetabolit oder als Kofaktor für detoxifizierende Enzyme genutzt. Zu diesen Enzymen gehören unter anderem die Katalase, die Glutathion-Peroxidase, die Superoxiddismutase (SOD) sowie weitere Peroxidasen (Chu *et al.*, 1993; Kirkman *et al.*, 1999; Rezvani *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2008; Lushchak, 2014). Ein wichtiger Regulator der antioxidativen Stressantwort ist der NRF/KEAP-1-Signalweg. Neben den bereits oben genannten detoxifizierenden Enzymen stehen weitere zytoprotektive Proteine, wie die Hämoxigenase-1 (HOX-1) und die NADPH:Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO-1) unter der Kontrolle dieses Signalweges (Schäfer und Werner, 2015). Der *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2* (NRF2) ist ein Mitglied der *Cap'n'collar*-Proteine und ist im Zytosol an das Adapterprotein *Kelch-like ECH-Associated Protein 1* (KEAP1) gebunden (Moi *et al.*, 1994; Zhang, 2006; He *et al.*, 2007). Unter basalen Bedingungen wird der NRF2 durch eine KEAP1 und Cullin 3 (CUL3) vermittelte Ubiquitinierung im Zytoplasma gehalten und proteasomal abgebaut. Die Aktivierung des NRF2 erfolgt vorwiegend durch eine Konformationsänderung von KEAP1. So konnte gezeigt werden, dass die redox-sensitiven Cysteinreste von Keap1 in der Lage sind mit ROS zu reagieren und diese oxidieren (Moi *et al.*, 1994; Zhang und Hannink, 2003; Zhang *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007). Diese Oxidation führt zu einer Konformationsänderung von KEAP-1, sodass die CUL3-vermittelte Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von NRF2 verhindert werden (Itoh *et al.*, 2003; McMahon *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass ROS bestimmte Kinasen aktivieren, die das NRF2-Protein phosphorylieren und somit zu einer Schwächung der NRF2-KEAP1-Interaktion führen und

dadurch ebenfalls den proteasomalen Abbau von NRF2 hemmen (Huang *et al.*, 2000; Zipper und Mulcahy, 2000; Baird und Dinkova-Kostova, 2011). NRF2 verbleibt somit im Zytoplasma und es kommt zu einer Kerntranslokation des Proteins (Nguyen *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Baird *et al.*, 2013). Im Zellkern bildet NRF2 ein Heterodimer mit sogenannten *small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma* (sMaf)-Proteinen (Itoh *et al.*, 1997) und bindet in der Promotorregion an das *Antioxidant Response Element* (ARE), um die Expression von Zielgenen zu induzieren (Lee und Johnson, 2004; Baird und Dinkova-Kostova, 2011) (Abb. 5).

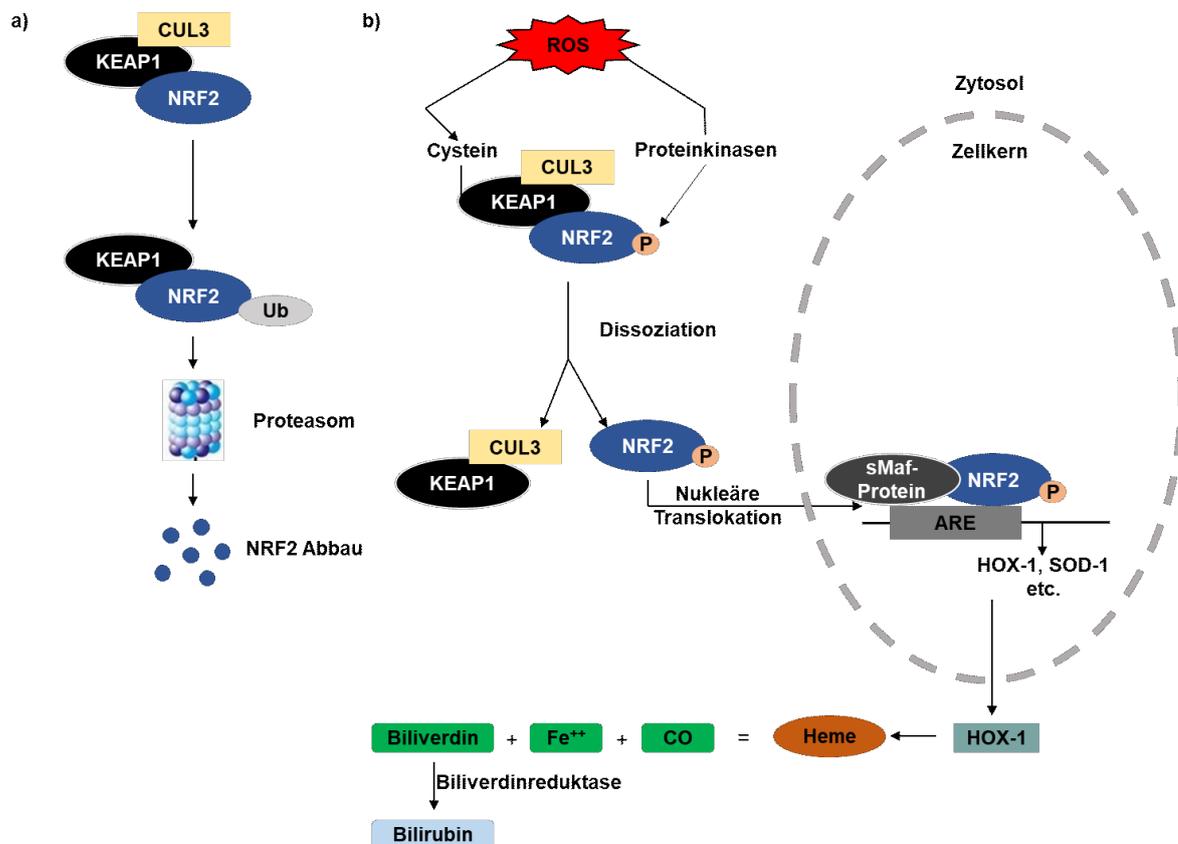


Abbildung 5: Der NRF2-Signalweg

a) Proteasomaler Abbau von NRF2, b) NRF2-Aktivierung und Translokation in den Zellkern

Eines der wohl bekanntesten Zielgene kodiert für das Enzym HOX-1, welches zur Familie der Hämoxxygenasen gehört. Die HOX-1 wird vermehrt durch oxidativen Stress induziert und oxidiert Häm zu Eisen, Kohlenstoffmonoxid und Biliverdin im sogenannten Häm-metabolismus. Das Biliverdin wird anschließend durch das zytosolische Enzym Biliverdinreduktase zu Bilirubin umgesetzt und scheint eine bedeutende Rolle als Antioxidans zu besitzen (Llesuy und Tomaro, 1994; Pachori *et al.*, 2007). Die Rolle der HOX-1 Induktion und des Häm-metabolismus sind allerdings bis heute immer noch

unzureichend verstanden. Es wird aber davon ausgegangen, dass sie in einem Netzwerk von regulatorischen Signalwegen integriert sind, da die verschiedenen Moleküle des Häm-metabolismus auf unterschiedliche Art und Weise einen Zellschutz vermitteln können (Otterbein *et al.*, 2003).

1.7. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Der Prozess des programmierten Zelltods, auch Apoptose genannt, ist im Allgemeinen durch ausgeprägte morphologische Merkmale und energieabhängige biochemische Mechanismen gekennzeichnet (Jacobson *et al.*, 1994; Clarke und Clarke, 1996; Jänicke *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2012). Die Apoptose ist in verschiedene natürliche Vorgänge, wie der Embryogenese, Metamorphose oder der Regeneration von Geweben involviert. Dabei handelt es sich um einen essentiellen Prozess in multizellulären Organismen, indem nicht mehr benötigte Zellen eliminiert sowie geschädigte Zellen neutralisiert werden, um beispielsweise der Kanzerogenese vorzubeugen (Brill *et al.*, 1999; Grossman *et al.*, 1999; Di-Poi *et al.*, 2003; Park und Jang, 2014). Die Regulierung der Apoptose ist daher entscheidend für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Ein Ungleichgewicht ist mit zahlreichen Krankheiten wie chronischen Entzündungen, Arteriosklerose, Krebs, Atemwegserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Kovalenko *et al.*, 2009; Redza-Dutordoir und Averill-Bates, 2016). Die morphologischen Merkmale der Apoptose sind durch das Schrumpfen der Zelle und des Zellkerns, der Chromatinkondensation und DNA- sowie Zellfragmentierung gekennzeichnet. Anschließend werden die entstandenen Apoptosekörperchen durch Makrophagen erkannt und mittels Phagozytose entsorgt (Doonan und Cotter, 2008). Die meisten dieser morphologischen Veränderungen werden durch eine Reihe von Cysteinproteasen verursacht, die spezifisch in apoptotischen Zellen aktiviert werden. Diese hoch konservierten Proteasen sind homolog zueinander und gehören zur Proteinfamilie der Caspasen (*Cysteine-Aspartate Proteases*). Im inaktiven Zustand liegen sie als sogenannte Zymogen oder auch Pro-Caspasen vor, bestehend aus einer regulatorischen Pro-Domäne, die zwischen den Mitgliedern variiert sowie einer langen und kurzen Untereinheit. Eine Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung, bei der es zur Abspaltung der Pro-Domäne kommt und die beiden Untereinheiten voneinander getrennt werden. Im Anschluss lagern sich je zwei kurze und zwei lange Untereinheiten zu einem Heterotetramer zusammen, bestehend aus zwei katalytischen Zentren. Diese enthalten ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten ihre

Zielproteine an bestimmten Asparaginsäureresten (Hengartner, 2000; Elmore, 2007). So spaltet die Caspase-3 beispielsweise die DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) Sequenz aus der Poly(Adenosindiphosphat(ADP)-ribose)-Polymerase (PARP). Dieses Wissen wird häufig zur Aktivitätsbestimmung einer Caspase verwendet. Wird ein Fluorophor an ein für die jeweilige Caspase spezifisches, synthetisiertes Tetrapeptid gekoppelt, kann nach enzymatischer Abspaltung die Fluoreszenzintensität gemessen werden, welche Aufschluss über die Aktivität einer Caspase gibt. Die Caspasen werden weiterhin in verschiedene Gruppen eingeteilt: Die Initiator-Caspasen (z. B. Caspase-8 und -9), die Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6 und -7) und die Cytokin-Aktivatoren (z.B. Caspase-1 und -4) (Denault und Salvesen, 2002). Die Cytokin-Aktivatoren sind an Entzündungsprozessen beteiligt, wohingegen die Initiator-Caspasen maßgeblich an der Einleitung des Zelltodes beteiligt sind und durch extrazelluläre Signale und Stress aktiviert werden (Zhuang *et al.*, 1999; Sitailo *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2012). Die Effektor-Caspasen hingegen werden durch Initiator- und andere Effektor-Caspasen kaskadenartig aktiviert und vermitteln durch gezielte Spaltung von Zielproteinen die morphologischen Charakteristika der Apoptose (Shi, 2004). Bei der Apoptose wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Apoptose unterschieden. Beim extrinsischen Weg reagiert die Zelle auf Signale von außen und Liganden binden an die sogenannten Todesrezeptoren in der Zellemembran (z.B. FAS-Rezeptor, Tumornekrosefaktor-Rezeptor) (Zhang *et al.*, 2000; Wajant *et al.*, 2003). Auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors bildet sich ein trimere Komplex, der als Bindungsstelle für intrazelluläre Proteine dient. So bindet an den durch FASL (Fas Ligand) aktivierten Fas-Rezeptor intrazellulär die FADD (*FAS-Associated Protein with Death Domain*). Diese besteht aus Adapterproteinen und bildet zusammen mit der Pro-Caspase-8 den *Death-inducing Signaling Complex* (DISC). Dieser sorgt dafür, dass die Initiator-Caspase-8 in räumliche Nähe gebracht wird, es somit zu dessen proteolytischer Aktivierung und anschließender Freisetzung kommt. Diese Freisetzung resultiert in einer Aktivierung von Effektor-Caspasen (Heinrich *et al.*, 2014) (Abb. 7). Bei der intrinsischen Apoptose hingegen spielen die Mitochondrien eine bedeutende Rolle. Oxidativer Stress, DNA-Schäden oder virale Infektionen resultieren in einem Anstieg der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und führen somit zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Proteine (z.B. Cytochrom C) (Karpinich *et al.*, 2002; Lee und Kleiboeker, 2007; Baek *et al.*, 2017).

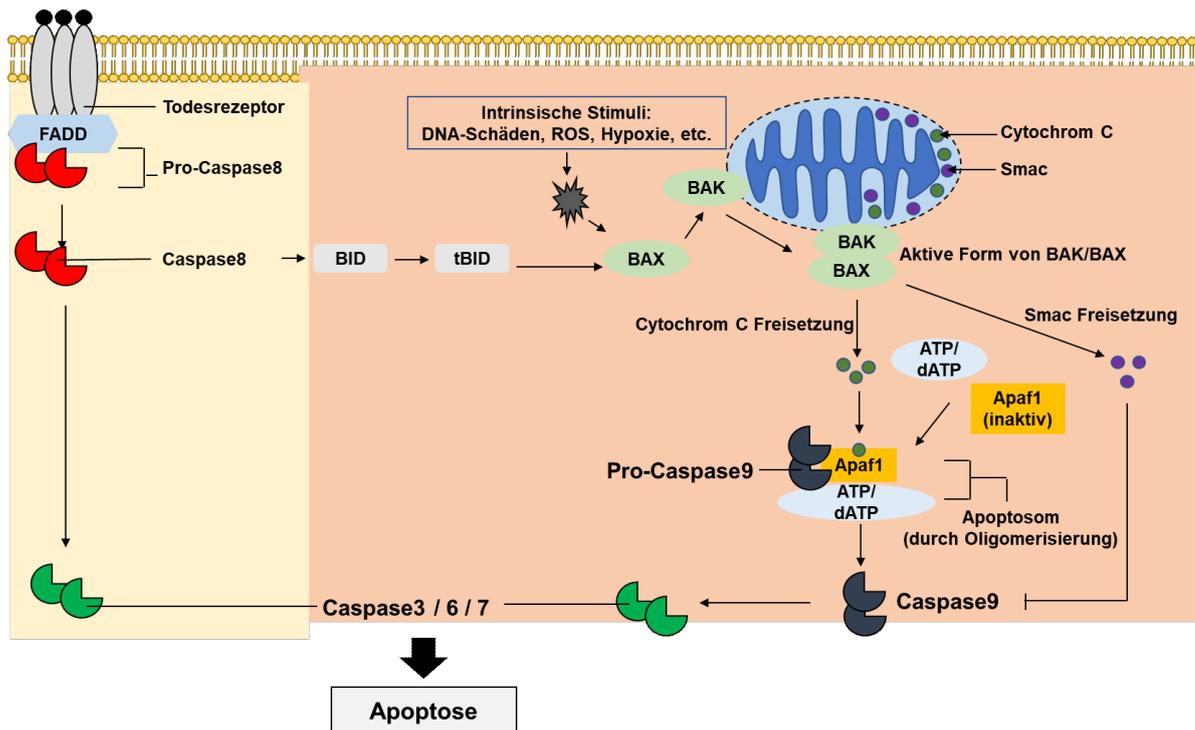


Abbildung 6: Der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalwegs

Insbesondere die Proteine der Bcl-2 Familie sind maßgeblich an diesem Prozess beteiligt. Sie werden in anti- und pro-apoptische Proteine unterteilt (Cheng *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2001; Loo *et al.*, 2020). Zwei bekannte Vertreter des pro-apoptischen Zweigs sind die Proteine BAX (*Bcl-2-associated X Protein*) und BAK (*Bcl-2 Antagonist Killer*). Eine Aktivierung dieser Proteine resultiert in einer Konformationsänderung, wodurch es zur Porenbildung in den Mitochondrien kommt und Cytochrom C aus dem periplasmatischen Raum in das Zytoplasma gelangen kann (Desagher *et al.*, 1999; Lindsten *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2014). Im Zytoplasma bindet Cytochrom C an das APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) Protein im Beisein von ATP/dATP und induziert somit eine Konformationsänderung in APAF-1. Diese Konformationsänderung führt zu einer Oligomerisierung. Dieser Komplex wird dann als Apoptosom bezeichnet und rekrutiert Pro-Caspasen-9. Im Apoptosom kommt es über Caspase-9 Dimere zur Bildung von enzymatisch aktiven Caspasen-9, die wiederum die Effektor-Caspasen-3,-6 und -7 aktivieren und somit lebenswichtige Zielproteine zerstören und damit für den Zelltod verantwortlich sind (Abb. 6) (Li *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015).

1.8. Ziel der Arbeit

Der durch UVB-Strahlung gebildete endogene Ligand des AHR, das Tryptophan Photoprodukt FICZ, wurde als potenter UVA-Photosensitizer beschrieben. Da FICZ durch AHR-regulierte Monooxygenasen der CYP1-Familie, insbesondere dem CYP1A1, metabolisiert wird, soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob durch Modulation der AHR-Aktivität die photosensibilisierenden Eigenschaften von FICZ sowie assoziierte toxische Effekte beeinflusst werden können. Daher besteht die Möglichkeit, dass bei simultaner UVA/UVB-Exposition die protektive Wirkung einer AHR-Inhibition vor UVB-induzierten Schädigungen von verstärkter, durch UVA-Strahlung hervorgerufener Phototoxizität begleitet wird.

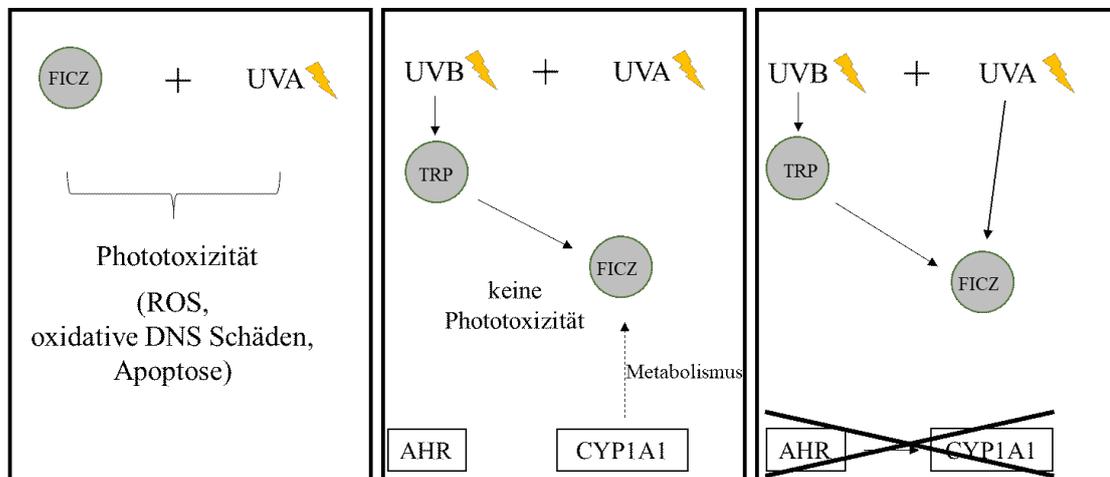


Abbildung 7: Arbeitshypothese: Der AHR besitzt eine protektive Wirkung gegenüber einer simultanen Exposition mit UVA- und UVB-Strahlung

Im Speziellen sollten dazu folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Modulation der AHR-Aktivität auf die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Apoptose und oxidative Stressantwort in Keratinozyten?
2. Führt eine AHR-Hemmung durch phototoxische Therapeutika zur FICZ-Akkumulation und assoziierten UVA-photosensibilisierenden Effekten?
3. Welchen Effekt hat UVA-Strahlung auf die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden?

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Funktion des AHR-Signalweges bei der Photoprotektion der menschlichen Haut zu optimieren.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeines

Bei der Herstellung der verwendeten Lösungen wurde Reinstwasser verwendet. Die Herstellung der Puffer erfolgte mit vollentsalztem Wasser. Alle Geräte entsprachen den Laborstandards und die verwendeten Chemikalien entsprachen p.a. Qualität.

2.2. Zellkulturtechnik

Kultivierung humaner Keratinozyten

In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende Keratinozyten verwendet, die in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Die HaCaT (*Human, Adult, low Calcium, high Temperature*)-Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) -1 g/L Glukose der Firma Pan Biotech, mit 10 % *Fetal Calf Serum* (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B als Antibiotika/Antimykotika (A/A) der Firma Pan Biotech kultiviert. Den stabil mit einer gegen den AHR-gerichteten *short hairpin* Ribonukleinsäure (shRNA) lentiviral transduzierten und Geneticin resistenten HaCaT-Zellen (Fritsche *et al.*, 2007), wurden zusätzlich 30.000 Units Geneticin (G418) der Firma Merck Millipore hinzugegeben. Die primären Keratinozyten wurden im *Keratinocyte growth medium 2* der Firma PromoCell kultiviert. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) und Trypsin/EDTA wurden zum Waschen bzw. zur Trypsinierung verwendet. Die Keratinozyten wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert und mindestens alle 72 Stunden wurde das Medium gewechselt. Ab einer Konfluenz von 90 % wurden jeweils $5 \cdot 10^5$ der immortalisierten HaCaT-Zellen und $8,75 \cdot 10^5$ der normalen humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) in eine neue T175 Flasche passagiert. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Die Zellsuspension wurde anschließend verdünnt und in eine neue T175 Zellkulturflasche ausgesät. Für die NHEK wurde ein Trypsin-Inhibitor (2 ml) der Firma PromoCell verwendet. Anschließend wurden die NHEK bei 250 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in neuem Medium resuspendiert und ebenfalls in eine neue T175 Zellkulturflasche ausgesät.

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Nährmedium
HaCaT	Immortalisierte, humane Keratinozyten	DMEM-1 g/L Glukose + 10 % (v/v) FCS, + 1 % A/A (v/v)
HaCaT-EV	Stabil mit pCL1.THPC (Leervektor) lentiviral transduzierte HaCaT-Zellen, geneticinresistent (Fritsche <i>et al.</i> , 2007)	DMEM-1 g/L Glukose + 10 % (v/v) FCS, + 1 % A/A (v/v) + 30.000 U G418
HaCaT-shAHR	Stabil mit pCL1P.THPC lentiviral transduzierte HaCaT-Zellen mit AHR-gerichteter shRNA-Sequenz, geneticinresistent (Fritsche <i>et al.</i> , 2007)	DMEM-1 g/L Glukose + 10 % (v/v) FCS, + 1 % A/A (v/v) + 30.000 U G418
HaCaT-NRF2-KO	Stabiler CRISPR/Cas-9 vermittelter NRF2- <i>knockout</i> ¹	DMEM-1 g/L Glukose + 10 % (v/v) FCS, + 1 % A/A (v/v)
NHEK	Primäre Keratinozyten isoliert aus abdominaler Haut (PromoCell, Lot Number: 433Z038.1)	Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell) + Supplement Mix + 0,06 mM CaCl ₂

1. Generiert durch die von Dr. Andrea Rossi geleitete IUF Core Unit „Modellentwicklung“
Zielsequenz für die gRNA: CCTGTTGATTAGACGGTATG
PAM (*protospacer adjacent motif*) -Sequenz
Mutation: CCTGT- GATTAGACGGTATG (Sequenz Deletion: T)
Verwendete gRNA: CATACCGTCTAAATCAACAGG
PAM-Sequenz

Für die Durchführung von Experimenten wurde die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in jedem Quadranten gezählt und die Konzentration der Zellen pro ml berechnet (Formel: Zellzahl * 10.000 / 4). Nach der Aussaat wurden die Zellen über Nacht inkubiert. Die Anzahl der Zellen in einem Plattenformat und dem jeweiligen Versuch sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Zellzahl und Plattenformate für die verschiedenen Experimente

Experiment	Plattenformat	Zelllinie	Zellzahl
Caspase-Aktivitäts-Assay	6-Well	HaCaT HaCaT-EV HaCaT-shAHR HaCaT-NRF2-KO NHEK	3×10^5
7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase (EROD)-Assay	48-Well	HaCaT HaCaT-EV HaCaT-shAHR NHEK	1×10^5
Durchflusszytometrie	6-Well	HaCaT HaCaT-EV HaCaT-shAHR NHEK	3×10^5
FICZ-Analytik	6-Well	HaCaT HaCaT-EV HaCaT-shAHR	3×10^5
Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR)	6-Well	HaCaT HaCaT-EV HaCaT-shAHR HaCaT-NRF2-KO NHEK	3×10^5
Western Blot	6-Well	HaCaT	3×10^5
Southwestern Slot-Blot	6 cm Platte	HaCaT	2×10^6

Für die Langzeitlagerung wurden die HaCaT-Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dafür wurden die Zellen, wie oben erwähnt, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden dann bei $250 \times g$ in 15 ml Zellkulturmedium zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in Gefriermedium (DMEM + 10 % DMSO + 10 % FCS) resuspendiert und jeweils 1×10^6 Zellen in ein Kryovial überführt. Beim Einfrieren wurde eine Einfrierhilfe verwendet. Diese wurde anschließend in einen $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ Gefrierschrank gestellt. Am nächsten Tag (24 h später) wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen (HaCaT-Zellen und NHEK) wurden die Kryovials aus dem flüssigen Stickstoff genommen und anschließend im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen direkt in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit warmem Kulturmedium aufgefüllt, um den durch Dimethylsulfoxid (DMSO) im Gefriermedium vermittelten Zelltod zu verhindern. Die Zellen wurden für 5 min bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in neuem Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und in eine geeignete Zellkulturflasche transferiert.

Aushungern primärer Keratinozyten

Um eine mögliche Inhibierung des AHR-Signalweges durch EGF zu verhindern (Sutter *et al.*, 2009), wurden die NHEK über Nacht ausgehungert, bevor diese in die Versuche genommen wurden. Dafür wurde auf die Zugabe des *Supplement Mix* im *Keratinocyte Growth Medium 2* der Firma PromoCell verzichtet und lediglich Calciumchlorid (CaCl₂) in einer Endkonzentration von 0,06 mM hinzugegeben.

Belastung humaner Keratinozyten

Die Zellen wurden in 6 Well-Platten / 6 cm Platten ab einer Konfluenz von 80 % mit denen in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen belastet. Eine Ausnahme bildetet der 7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD) Assay. Für diesen Assay mussten die Zellen nahezu konfluent in einer 48 Well-Platte gewachsen sein.

Tabelle 3: Belastung der Zellen mit Substanzen und deren Endkonzentration

Substanz	Endkonzentration	Lösungsmittel
FICZ	50 nM, 100 nM	DMSO
7-Hydroxyflavon	10 µM	DMSO
Ketoconazol	50 µM	DMSO
3'Methoxy-4'Nitroflavon (MNF)	10 µM	DMSO
Tapinarof	0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM	DMSO
Vemurafenib	25 µM, 40 µM	DMSO

2.3. *In vivo* Untersuchungen (Mausmodell)

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden $Ahr^{+/+}$ SKH-1 haarlose Mäuse verwendet. Die Ahr -Exon-2-Deletion der B6. Ahr^{tm1bra} Maus wurde ursprünglich von C. Bradfield erzeugt (Schmidt *et al.*, 1996) und durch die IUF Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charlotte Esser über mehr als neun Generationen hinweg in den Hintergrund der SKH-1 haarlosen Mäuse gekreuzt. Alle Tiere wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen (12 h Tag-Nacht-Zyklus, Raumtemperatur: 20-24 °C, Luftfeuchtigkeit: 70 %) in unserer pathogenfreien Tieranlage untergebracht. Die Tierversuche wurden dabei unter Beachtung des geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden Schwanzbiopsien genommen und die DNA mit dem peqGold Tissue DNA Mini Kit, der Firma VWR nach Herstellerangaben isoliert. Die Genotypisierung erfolgte mit sequenzspezifischen Primern, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Die Primer für die $Ahr^{+/+}$ SKH-1 haarlosen Mäuse (Ahr -1 WT und Ahr -2 WT) sind an der Synthese eines Produkts mit 669 bp beteiligt, wohingegen die amplifizierten Fragmente der Primer für die $Ahr^{-/-}$ SKH-1 haarlosen Mäuse (Ahr -3 KO und Ahr -4 KO) eine Größe von 172 bp aufweisen.

Tabelle 4: Verwendete Primer für die Genotypisierung

Primersequenzen	
Ahr-1 WT	5'-GGATTTGACTTAATTCCTTCAGCGGG-3'
Ahr-2 WT	5'-TCTTGGGCTCGATCTTGTGTGTCAGGAACAGG-3'
Ahr-3 KO	5'-CTGAATGAACTGCAGGACGA-3'
Ahr-4 KO	5'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-3

Der Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in Tabelle 5 dargestellt und fand unter folgenden Bedingungen statt:

Denaturierung	94 °C; 3 min	
Denaturierung	94 °C; 30 Sekunden	} 36 Zyklen
Annealing	62 °C; 1 min	
Elongation	72 °C; 1 min	
Denaturierung	72 °C; 1 min	
	4 °C; ∞	

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die PCR

Reaktionsansatz	Menge
5x PCR-Mastermix <i>Ready-to-Load</i> (Fa. BioBudget)	4 µl
Ahr-1 WT (20 µM)	1 µl
Ahr-2 WT (20 µM)	1 µl
Ahr-3 KO (20 µM)	1 µl
Ahr-4 KO (20 µM)	1 µl
H ₂ O	10 µl
DNA	2 µl

Die DNA wurde anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese bei 125 V aufgetrennt. Dem 1,5 %-igen Agarosegel wurden 1,5 µl / 100ml *Midori Green Advance* von der Firma Biozym zugesetzt. Zum Schluss wurden die DNA-Banden unter UV-Licht detektiert und die Größe der DNA-Fragmente den Genotypen zugeordnet.

2.4. UV-Bestrahlung von humanen Keratinozyten und Mäusen

Für die UV-Bestrahlung der Keratinozyten wurde die Bestrahlungskammer BS-02 der Firma Opsytec Dr. Gröbel verwendet. Die UVA-Bestrahlung wurde mit jeweils vier Philips Leuchtstofflampen Actinic BL 15 Watt durchgeführt. Zur Bestrahlung der Keratinozyten

mit UVB-Strahlung wurden vier Leuchtstofflampen der Firma Sankyo Denki G15T8E verwendet. Diese wurden in abwechselnder Reihenfolge in der BS-02 angebracht. Für eine Bestrahlung mit UVA-Strahlung, UVB-Strahlung oder simultan mit UVA- und UVB-Strahlung wurde zunächst die Dosis am Prozess-Spektralradiometer iSR900 (Firma: Opsytec Dr. Göbel) eingestellt. Die Radiometersensoren (Firma: Opsytec Dr. Göbel) messen die UV-Bestrahlungsstärke und das iSR900 zeigt in Echtzeit die UVA- und /oder UVB-Intensität sowie die Dosis an. Für eine Bestrahlung der Zellen mit UVA, UVB oder simultan mit UVA und UVB wurden die 6 Well-Platten / 6 cm Platten (ohne Deckel) in einen genau definierten Bereich in der Kammer gestellt. Dieser Bereich wurde auf die Sensoren kalibriert, die sich seitlich in der Kammer befanden. Nach der Bestrahlung schalteten sich die UV-Lampen automatisch ab. Für die unterschiedlichen UV-Bestrahlungen wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und nachfolgend in 1 ml (6 Well-Platten) oder 3 ml (6 cm Petrischale) PBS bestrahlt. Anschließend wurde das PBS abgenommen und die Keratinozyten in Zellkulturmedium im Inkubator inkubiert. Die genauen UVA-, UVB- und/oder simultanen UVA- und UVB- Bestrahlungsdosen sind im Ergebnisteil beschrieben. Für die Bestrahlungsstudie an Mäusen wurden $Ahr^{+/+}$ SKH-1 haarlose Mäuse verwendet, welche mit der BS-02 bestrahlt wurden. Die UV-Sensoren wurden dafür zunächst auf die Bestrahlungsintensität im Plexiglas Käfig der Mäuse kalibriert. Anschließend wurden jeweils 5 $Ahr^{+/+}$ SKH-1 haarlose Mäuse mit $6,3 \text{ J/cm}^2$ UVA-Strahlung, 900 J/m^2 UVB-Strahlung oder simultan mit $6,3 \text{ J/cm}^2$ UVA-Strahlung und 900 J/m^2 UVB-Strahlung exponiert und anschließend für 24 h zurück in ihren Käfig gesetzt.

2.5. Aufbereitung der Hautproben von SKH-1 haarlosen Mäusen

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere schmerzfrei getötet und Hautproben vom Rücken entnommen, direkt im flüssigen Stickstoff eingefroren und später bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zur Aufbereitung der Proben für DNA-Schäden wurde die Haut zunächst mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde, der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD)-Gehalt mit Hilfe der Southwestern Slot-Blot Methode durchgeführt (siehe 3.13.).

2.6. Caspase-3, -8 und -9 Aktivitäts-Assay

Für die Messung der Caspase-3, -8 und -9 Aktivität wurde das Kit der Firma PromoCell verwendet. Die Aktivierung dieser Caspasen leitet die Apoptose in Säugetierzellen ein. Der Assay basiert auf dem Nachweis der Spaltung von spezifischen Substraten für die jeweilige Caspase. Für die Caspase-3 basiert der Assay auf dem Nachweis der Spaltung des Substrats Ac-DEVD-AFC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-Trifluoromethylcoumarin), für die Caspase-8 auf der Spaltung des Substrats Ac-IETD-AFC (N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4) und für die Caspase-9 auf dem Nachweis der Spaltung des Substrats Ac-LEDH-AFC (N-Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-Trifluoromethylcoumarin). Ac-DEVD-AFC, Ac-IETD-AFC sowie Ac-LEDH-AFC emittieren blaues Licht ($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$). Nach Abspaltung des Substrats durch die jeweilige Caspase emittiert AFC eine gelb-grüne Fluoreszenz ($\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$), die mit dem TECAN Infinite 200 (Infinite® 200 PRO, Grödig, Austria) fluorimetrisch quantifiziert werden kann.

Nach Aussaat der Keratinozyten in 6 Well-Platten und nach Belastung der Zellen wurde das Medium (1,5 ml) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und zu jedem Well wurden 300 μl Trypsin gegeben. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen abgelöst hatten. Um die Reaktion des Trypsins abzustoppen wurde das zuvor abgenommene Medium wieder in das dazugehörige Well gegeben. Nachdem die Zellsuspension in das 2 ml Reaktionsgefäß zurück pipettiert wurde, wurden diese 5 min bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert, bevor der Überstand erneut abgenommen wurde. Das resultierende Zellpellet wurde nachfolgend in 100-120 μl Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und entweder bei -80 °C eingefroren oder es wurde direkt die Aktivität der Caspase-3, -8 und/oder Caspase-9 mithilfe des Caspase-Assays der Firma PromoCell bestimmt. Für die Bestimmung der Caspase-Aktivität wurden, anders als nach Herstellerangaben, 25 μl der Probe mit 25 μl des 2xReaktionspuffers zusammen pipettiert. Dem 2xReaktionspuffer wurden zuvor 10 mM DTT zugesetzt. Danach wurden die Zellen, wie im Protokoll angegeben, mit 50 μM des jeweiligen Substrats (Ac-DEVD-AFC / Ac-IETD-AFC / Ac-LEDH-AFC) behandelt und für 1-2 h bei 37 °C in einer 96 Well-Platte inkubiert. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Extinktion von 400 nm und einer Emission von 505 nm gemessen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Quantifizierungs-Kit „DC-Protein-Assay“ der Firma Bio-Rad verwendet. Die

Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Standardreihe. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Anschließend wurde die Caspase-3, -8 und Caspase-9 Aktivität jeweils auf die Proteinmenge normalisiert. Für die graphische Darstellung wurden alle Behandlungen auf das n-fache der Kontrollen normiert und als Caspase-3, -8 oder -9 Aktivität beschriftet.

2.7. 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Assay

Der EROD-Assay ist ein kinetisches Verfahren, bei dem das fluoreszierende Endprodukt Resorufin gemessen wird. Die Enzym-Aktivität wird als EROD-Aktivität bezeichnet. Das Substrat 7-Ethoxyresorufin wird normalerweise durch das Enzym 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) in Gegenwart des Reduktionsmittels Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADPH) zum fluoreszierenden Endprodukt Resorufin umgesetzt. Beim EROD-Assay wird das Substrat 7-Ethoxyresorufin durch die Monooxygenasen CYP1A1 und CYP1A2 zum Resorufin umgewandelt, weshalb auf die Enzymaktivität der beiden Isoenzyme geschlossen werden kann. Das Resorufin ist bei einer Anregung von 535 nm und einer Emission von 590 nm fluorimetrisch messbar. Für diesen Assay wurde nach Behandlung der Zellen das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2,5 μ M 7-Ethoxyresorufin und 10 μ M Dicumarol in 250 μ l serumfreiem Medium inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Enzymaktivität alle 3 min über einen Zeitraum von 21 min, bei einer Anregung von 535 nm und einer Emission von 590 nm, mit dem Infinite 200 PRO 200 (Infinite® 200 PRO, Grödig, Austria) gemessen. Da Resorufin in der Zelle durch NQO1 zu nicht fluoreszierenden Stoffen abgebaut werden kann, wird dem Medium Dicumarol zugegeben.

Kalibriergerade Resorufin

Anhand einer Resorufin Eichreihe kann auf die Menge an gebildetem Resorufin in pmol/Well geschlossen werden. Der Faktor Resorufin gibt dabei den Substratumsatz in pmol/min/Well an. Die Menge an gebildetem Resorufin im EROD-Assay wurde also zunächst auf den Faktor Resorufin normiert. Dafür wurde eine Standardgerade mit verschiedenen Resorufin-Konzentrationen (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250 pmol/Well) hergestellt. Für jede Konzentration wurden 250 μ l pro Well verwendet und die Fluoreszenzintensität wurde direkt im Anschluss bei einer Anregung von 535 nm und einer Emission von 590 nm gemessen.

Proteinbestimmung mit dem CBQCA-Kit

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem 3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-Carboxaldehyde (CBQCA)-Kit der Firma Life Technology. Für die Lyse der Zellen, in einer 48 Well-Platte, wurden je Well 40 μ l einer 20 %-igen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung verwendet und die Zellen für 5-10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nachfolgend mit dem von der Firma bereitgestellten Protokoll fortgefahren. Zum Schluss wurde der jeweilige Wert des Substratumsatzes auf die Proteinmenge in einem Well normiert, sodass auf die spezifische Enzymaktivität (pmol/min/mg) geschlossen werden konnte. Da Keratinozyten nahezu kein CYP1A2 exprimieren, wird in dieser Arbeit nur die CYP1A1-Enzymaktivität erwähnt (Baron *et al.*, 2001).

2.8. Nicoletti Färbung zur Bestimmung apoptotischer Zellen

Mit der Nicoletti Färbung wurde der internukleosomale DNA-Gehalt bestimmt (Nicoletti *et al.*, 1991). Bei der Apoptose kommt es zur Freisetzung von DNA aus dem Kern. Der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen in den Zellkernen ist somit niedriger als in den intakten Zellen. Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus weisen einen doppelt so hohen DNA-Gehalt auf, wie Zellen in der G₁-Phase. Dazwischen befinden sich die Zellen in der S-Phase. Dementsprechend kann anhand der Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Apoptotische Zellen werden daher in der sogenannten subG₁-Phase visualisiert. Nach Belastung der Zellen wurde der Überstand abgenommen und in einem Falkontube gesammelt. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls im Falkontube gesammelt wurde. Nachfolgend wurden die Zellen trypsinisiert und die Reaktion mit Medium abgestoppt. Die Zellen wurden in die gleichen Falkontubes überführt wie die Überstände und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, mit PBS gewaschen, erneut bei 250 x g für 5 min zentrifugiert und nachfolgend in 300 μ l Nicoletti Puffer (0,1 % w/v Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100 v/v und 50 μ g/ml Propidiumiodid) resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer BD FACS Canto II mithilfe der BD FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Auswertung wurde anschließend mit der Software *FlowJo* (Treestar, San Carlos, USA) durchgeführt.

2.9. Nicoletti Färbung zur Bestimmung apoptotischer und γ H2AX-positiver Zellen

Zur Bestimmung apoptotischer und γ H2AX-positiver Zellen wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.8. beschrieben trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Dem Nicoletti-Puffer (300 μ l) wurde 1 μ l des Allophycocyanin (APC) gekoppelten Antikörpers gegen das phosphorylierte H2AX-Protein (Ser139; γ H2A.X) der Firma BioLegend zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit dem im Nicoletti-Puffer enthaltenem γ H2AX-Antikörper inkubiert. Die Messung erfolgte erneut am Durchflusszytometer BD FACS Canto II mithilfe der BD FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Auswertung wurde anschließend mit der Software *FlowJo* (Treestar, San Carlos, USA) durchgeführt.

2.10. ROS Messung mit dem fluorogenen Farbstoff MitoSox

Die Oxidation des fluorogenen Farbstoffs MitoSox (*Red Mitochondrial Superoxid Indicator*; Thermo Fisher, Waltham, MA USA) durch Superoxid erzeugt ein rotes Fluoreszenzsignal und gibt somit einen Hinweis auf oxidativen Stress in einer Zelle. Nach Belastung der Zellen wurden diese wie in Abschnitt 3.8 trypsinisiert, gewaschen und anschließend in 400 μ l 2,5 μ M MitoSox/PBS resuspendiert und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer BD FACS Canto II mithilfe der BD FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Auswertung wurde anschließend mit der Software *FlowJo* (Treestar, San Carlos, USA) durchgeführt.

2.11. Bestimmung der FICZ-Konzentration im Medium von HaCaT-Zellen

Zur Bestimmung der FICZ-Konzentration im Medium wurden die Zellen, wie in Tabelle 2 beschrieben, ausgesät und für 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h mit 100 nM FICZ belastet. Anschließend wurden 600 μ l des Mediums abgenommen und für 5 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert (14.000 rpm). Nachfolgend wurden 500 μ l des Überstandes abgenommen, mit 500 μ l Acetonitril versetzt und bei -80 °C gelagert, bevor die Proben für *Reverse Phase - HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)* Analysen zu Julien Dairou (Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, UMR 8601, 75270 Paris, France) versendet wurden. FICZ wurde dort mittels dem Shimadzu HPLC-System, ausgestattet mit der

LabSolution-Software, durch Fluoreszenzemission ($\lambda = 525 \text{ nm}$) nach Anregung bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ analysiert. Durch Integration der Peak-Fluoreszenzfläche wurde FICZ quantifiziert, wobei eine Kalibrierungskurve verwendet wurde, die mit verschiedenen bekannten Konzentrationen von FICZ erstellt wurde.

2.12. mRNA-Analytik

Isolation und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das Zellkulturmedium aus der 6-Well-Platte abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mit Hilfe des pegGold Total RNA Kit (Peqlab, Erlangen) isoliert. Die RNA-Konzentration wurde nach der Isolation photometrisch mit dem Tecan Infinite 200 PRO (Infinite® 200 PRO, Grödig, Austria) bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm gemessen. Für die Reinheit wurde der Quotient aus der Absorption bei λ 260 nm und λ 280 nm gezogen. Lag der Quotient unterhalb von 1,7 war von einer Verunreinigung durch Proteine auszugehen.

Complementary Desoxyribonukleinsäure (cDNA) -Synthese

Die mRNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Es wurden jeweils 500 ng RNA pro Ansatz eingesetzt. Mit Hilfe der Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV) Transkriptase wurde ein DNA Strang an die einzelsträngige RNA synthetisiert. Der Vorgang unterteilte sich in zwei Schritte, dem *Annealing* der Oligo-dT-Nukleotide (Tabelle 6) an die mRNA und der Synthese der cDNA Stränge mittels reverser Transkriptase (Tabelle 7). Im ersten Schritt werden die Proben für 10 min bei 60 °C erhitzt. Beim zweiten Schritt wird die mRNA für 52 min bei 37 °C in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgt ein Erhitzen auf 70 °C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Tabelle 6: cDNA-Synthese Schritt 1 (Annealing)

Schritt 1	
Oligo (dT)15 Primer (Roche, Mannheim)	1,25 μ l
dNTP (Desoxy-Nukleotidtriphosphat) Mix 10 μ M (Peqlab, Erlangen)	1 μ l

Tabelle 7: cDNA-Synthese Schritt 2 (Reverse Transkription)

Schritt 2	
H ₂ O (DEPC)	5 µl
5 x RT-Puffer (Promega, Mannheim)	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Quantitative *Real-Time* PCR

Bei der quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) wurde das SYBR Green FAST Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei werden Bereiche der cDNA durch Zugabe von Oligonukleotiden (Primern) spezifisch amplifiziert. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert mit der doppelsträngigen DNA. Die Zunahme der DNA verursacht eine lineare Zunahme des Fluoreszenzsignals und ist damit ein Maß für die Menge vorhandener Matrizen cDNA. Die doppelsträngige DNA wird dabei zunächst durch Hitzedenaturierung bei 94 °C zu Einzelsträngen aufgetrennt. Anschließend hybridisieren die komplementären Regionen des DNA-Strangs mit den Primern (*Annealing*) und ausgehend vom 3'OH-Ende der Primer repliziert nun eine hitzestabile DNA-Polymerase den einzelsträngigen DNA-Strang (Elongation). Mit steigender Anzahl der Zyklen steigt nun die Konzentration des DNA-Abschnitts, in den der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green interkaliert. Für die qRT-PCR wurde die cDNA 1:3 in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser verdünnt und dem folgenden Reaktionsansatz in Tabelle 8 zugefügt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz qRT-PCR

Reaktionsansatz	Menge
cDNA	3 µl
SYBR Green	7,5 µl
Primer <i>forward</i> / <i>reverse</i> (4 µM)	2,5 µl

Die Auswertung der qRT-PCR wurde mit dem Programm Rotor-Gene Q Series 2.0.2 der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die qRT-PCR durchlief dabei folgende Zyklen:

Denaturierung	94 °C; 15 Sekunden	} 40 Zyklen
Annealing	56 °C 30 Sekunden	
Elongation	72 °C 30 Sekunden	

Die Tabelle 9 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten Primer

Zielgen	Sequenz
GAPDH	<i>forward: 5'-AGG TGA AGG TCG GAG TCA-3'</i> <i>reverse: 5'-GGT CAT TGA TGG CAA CAA-3'</i>
CYP1A1	<i>forward: 5'TAG ACA CTG ATC TGGC TGC AG-3'</i> <i>reverse: 5'GGG AAG GCT CCA TCA GCA TC-3'</i>
HOX-1	<i>forward: 5'-GCC ATG AAC TTT GTC CGG TG-3'</i> <i>reverse: 5'-GGA TGT GCT TTT CGT TGG GG-3'</i>

Für die Bestimmung der mRNA-Transkript-Menge und damit der relativen Expression des Zielgens wurde der sogenannte Ct (*Cycle threshold*) – Wert verwendet. Dieser Wert spiegelt den Beginn eines exponentiellen Anstiegs des Fluoreszenzsignals innerhalb der einzelnen Proben wieder. Die Delta-Delta-Ct-Methode, auch bekannt als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, ist eine einfache Formel, die zur Berechnung der relativen Genexpression der Proben einer qRT-PCR verwendet wird. Die Methode wurde von Kenneth Livak und Thomas Schmittgen im Jahr 2001 entwickelt (Livak und Schmittgen, 2001).

2.13. Western Blot-Analyse

Proteinisolation und Quantifizierung

Die Zellen wurden zunächst mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Die adhärenz gewachsenen Zellen wurden durch Hinzugabe von 75 μ l/Well eiskaltem *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA)-Lyse-Puffer (Tabelle 10), 4 μ l/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 10 μ l/ml Protease Inhibitor Cocktail (PIC) bei 4 °C, lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorf Reagenzgefäße überführt und zur Entfernung der Zelltrümmer bei 21.910 x g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration und die Auftragung der Proteine auf das Gel wurde nur der Überstand verwendet.

Tabelle 10: Zusammensetzung RIPA-Lyse Puffer

RIPA-Lyse-Puffer	
Tris-HCl	25 mM
NaCl	150 mM
EDTA, pH 8,0	0,1 % (v/v)
Nonidet P-40	1 % (v/v)
Desoxycholsäure	1 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)
NaN ₃	0,025 % (w/v)
Protease Inhibitor Cocktail, frisch zugesetzt	10 μ l/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid	4 μ l/ml

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Quantifizierungs-Kit „DC-Protein-Assay“ der Firma Bio-Rad verwendet, wie bereits beim Caspase-Aktivitäts-Assay.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE trennt Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße in einer Gelmatrix auf. Von jeder Probe wurden 15 μ g Protein mit Wasser und 4x Laemmli-Probenpuffer in einem Probenvolumen von 20 μ l verdünnt und diese bei 94 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde die Probe mit einer Spritze auf das Gel aufgetragen. Das in dem Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol dient dazu, die Disulfidbrücken zwischen den

Molekülen zu spalten. Durch das Überdecken der Eigenladung der Proteine durch das SDS, welches sich vor allem im Ladepuffer, aber auch in dem Sammelgel, wie auch dem Trenngel befindet, kommt es zu einer gegenseitigen Abstoßung der gleichmäßig negativ geladenen Proteine, was mit der Denaturierung und der Spaltung der Disulfidbrücken zu einer Linearisierung der Proteine führt. Dies erlaubt eine Auftrennung nach Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, denn die längeren Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine, die somit schneller zur Kathode wandern können. Zur Abschätzung der Proteingröße wurden 10 µl eines Proteinstandards mit bekannten Größen in einem freien Slot aufgetragen (ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa) von der Firma *New England BioLabs*). Für eine bessere Auftrennung und schärfere Banden wurde ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Durch eine angelegte elektrische Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zunächst durch das großporige Sammelgel und konzentrieren sich an der Grenze zum Trenngel. Im engporigen Trenngel erfolgt die eigentliche Separierung nach Molekülgröße. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE unterscheiden sich die Gele durch unterschiedliche pH-Werte, Ionenstärken und die Porengröße. Die vertikal elektrophoretische Trennung wurde in einer Kammer der Firma Roth bei 90 V für eine halbe Stunde und anschließend bei 125 V für nochmals zweieinhalb Stunden durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die SDS-PAGE

4xLaemmli-Probenpuffer	
Tris-HCl, pH 8,0	250 mM
Glycerol	20 % (w/v)
SDS	5 % (w/v)
Bromphenol blau	0,001 %(w/v)
DTT (Dithiothreitol)	100 mM
β-Mercaptoethanol	16 %
SDS-PAGE-Laufpuffer	
Tris	50 mM
Glycin	384 mM
SDS	0,1 %

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)
H ₂ O	2,9 ml	4,2 ml
Acrylamid (40 % v/v)	0,5 ml	3,0 ml
1 M Tris, pH 6,8	0,5 ml	/
1,5 M Tris, pH 8,8	/	2,6 ml
SDS (20 % w/v)	20 µl	50 µl
APS (20 % v/v)	20 µl	50 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	4 µl	4 µl

Western Blot

Beim Western Blot werden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld, welches senkrecht zu dem Gel steht, auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- oder Nitrocellulose Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde 30 Sekunden in Methanol aktiviert. Die Schwämme, das Whatman-Papier und das Gel wurden in Transferpuffer (siehe Tabelle 12) eingelegt. Beim Aufbau der Apparatur wurde darauf geachtet, dass zwischen Papier, Gel und Membran keine Luftblasen entstehen. Die Kammer wurde bis zur Markierung mit Transferpuffer gefüllt und das elektrische Feld bei 100 Volt für eine Stunde aufrecht gehalten.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Transferpuffers

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

Immunodetektion von Proteinen

Für die Blockierung freier unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für 1 h mit 5 % BSA in TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20) oder 5 % Milch in TBS-T geschüttelt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit einem verdünnten IgG-Erstantikörper gegen das zu detektierende Protein. Verdünnungsreagenz und Verdünnungsfaktor wurden

nach Herstellerangaben gewählt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, um schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Danach wurde der zweite Antikörper für zwei Stunden auf die Membran gegeben. Dieser war mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt und spezifisch gegen den primären Antikörper gerichtet. Daran schlossen erneut drei Waschschritte an. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das WesternBright ECL-Substrat (Advansta, Menlo Park, CA, USA) nach Herstellerangaben auf die Membran gegeben. Die Chemilumineszenz wurde mittels Röntgenfilm (Fa. Fujifilm, Tokyo) detektiert und anschließend mit der Software Image Studio Lite ausgewertet. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Tabelle 14 zeigt die Liste der verwendeten Antikörper.

Tabelle 13: Reagenzien für die Proteindetektion

TBS-T-Puffer	
Tris-HCl (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,1 % (v/v)
5 % BSA-Blockierungsreagenz	
BSA in TBS-T-Puffer	5 % (w/v)

Tabelle 14: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Endkonzentration
A-Tubulin	ExBio #11-250-C025	1:5.000 in 5 % BSA/TBS-T
GAPDH	Cell Signaling #2118	1:10.000 in 5 % BSA/TBS-T
HOX-1	Santa Cruz #sc136960	1:500 in 5 % BSA/TBS-T
NRF2	Biozol #GTX-GTX103322	1:1.000 in 5 % Milch/TBS-T
γ H2AX	Cell Signaling #2577	1:1.000 in 5 % BSA/TBS-T
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling #7074	1:5.000 in 5 % BSA/TBS-T oder Milch/TBS-T
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling #7076	1:5.000 in 5 % BSA/TBS-T

2.14. Southwestern Slot-Blot-Analyse

Zur Quantifizierung UVB-induzierter CPD wurden Southwestern Slot-Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurde zunächst die DNA mit dem peqGold Tissue DNA Mini Kit der Firma VWR nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde die DNA mit dem Tecan Infinite 200 Pro (Infinite® 200 PRO, Grödig, Austria) quantifiziert und es wurden jeweils 250 ng isolierte DNA für 5 min bei 100 °C inkubiert und nachfolgend für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben auf eine positiv geladene Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) unter Verwendung einer Slot-Lot-Kammer, welche an einen Vakuumverteiler angeschlossen war, aufgetragen. Die membrangebundene DNA wurde danach für 30 min bei 80 °C inkubiert, für 1 h in 5 % Magermilch in TBS-T blockiert und nachfolgend über Nacht bei 4 °C mit einem CPD-Antikörper (Cosmo Bio [Clone TDM-2], USA) in 5 % Magermilch/TBS-T inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x gewaschen und der zweite Antikörper für 1 h auf die Membran gegeben. Dieser war mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt und spezifisch gegen den CPD-Antikörper gerichtet. Danach wurde die Membran erneut 3 x gewaschen und die Signale wurden mit dem WesternBright ECL-Substrat (Advansta, Menlo Park, CA, USA) am Odyssey® Fc (LI-COR Biosciences – GmbH, Deutschland) detektiert und anschließend mit der Software Image Studio Lite ausgewertet. Die verwendeten Puffer für die Southwestern Slot-Blot-Analyse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Reagenzien für den Southwestern Slot-Blot

TBS-T-Puffer	
Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,5 % (v/v)
5 % Magermilch-Blockierungsreagenz	
Magermilch in TBS-T-Puffer	5 % (w/v)

2.15. Statistische Auswertung

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit Graph Pad Prism 8.4.2 (GraphPad Prism Software, Kalifornien, USA) durchgeführt. Bei mehr als zwei Datensätzen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) vorgenommen. Bei einer Abhängigkeit von mehreren Faktoren wurde eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Die Aktivität des AHR beeinflusst die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Apoptose in Keratinozyten

Der AHR reguliert die Expression von CYP1A1 und weiteren fremdstoffabbauenden Enzymen (Uridine 5'-Diphospho- Glucuronosyltransferase (UDP-GT), Glutathion S-Transferasen, etc.) und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf den FICZ-Metabolismus. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass sowohl die basale als auch die induzierbare CYP1A1-Enzymaktivität einen Effekt auf die UVA-induzierte Phototoxizität von FICZ hat.

3.1.1. FICZ induziert die Genexpression von CYP1A1 und sensibilisiert HaCaT-Zellen für die UVA-induzierte Apoptose

In einem initialen Experiment sollte zunächst überprüft werden, in welchem Konzentrationsbereich FICZ die Genexpression von CYP1A1 induziert und welche FICZ-Konzentration im Zusammenwirken mit UVA-Strahlung phototoxische Effekte induziert. Die Aktivität der Caspase-3 wurde als Marker für die Phototoxizität gemessen. Wie in Abbildung 8.A dargestellt, steigerte eine Behandlung mit FICZ die Genexpression von CYP1A1 dosisabhängig. Dabei lag die FICZ-Konzentration, die zur Aktivierung des AHR bzw. zur Induktion von CYP1A1 führte, zwischen 1 nM und 10 nM (Abb. 8.A).

Eine 30-minütige Behandlung der Zellen mit FICZ sowie eine nachfolgende Bestrahlung mit 5 J/cm² UVA resultierte nach vierstündiger Inkubation nur bei der höchsten getesteten Konzentration (100 nM) in einer signifikanten Induktion der Caspase-3 Aktivität (Abb. 8.B). Eine Exposition der HaCaT-Zellen mit FICZ oder UVA-Strahlung alleine hatte keine messbaren Auswirkungen auf die Caspase-3 Aktivität. Eine Behandlung der Zellen mit 50 nM FICZ und eine anschließende UVA-Bestrahlung führte jedoch ebenfalls zu einem leichten Anstieg der Caspase-3 Aktivität. Der pro-apoptotische bzw. UVA-sensibilisierende Konzentrationsbereich von FICZ liegt demnach zwischen 25 nM und 50 nM nach 30 min.

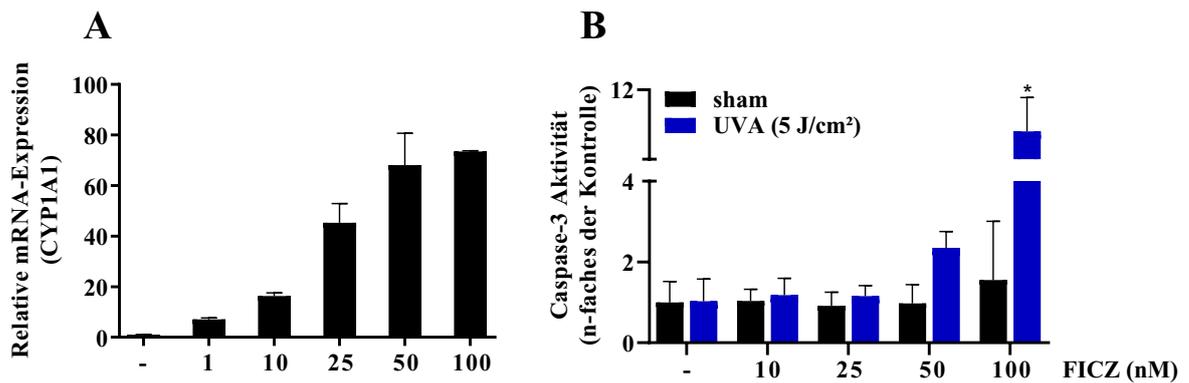


Abbildung 8: FICZ induziert die Genexpression von CYP1A1 und sensibilisiert HaCaT-Zellen für die UVA-induzierte Apoptose.

A: HaCaT-Keratinozyten wurden für 6 h mit steigenden FICZ-Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) sowie Lösemittel belastet. Im Anschluss wurde die mRNA-Menge von CYP1A1 mittels qRT-PCR bestimmt und auf die GAPDH Transkriptmenge normiert. $n = 2$. Mittelwert \pm SEM **B:** HaCaT-Keratinozyten wurden für 30 min mit 10 nM, 25 nM, 50 nM, und 100 nM FICZ oder 0,1 % DMSO vorbelastet und anschließend mit 5 J/cm² UVA oder *sham* (unbestrahlt) bestrahlt. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspase-3 bestimmt sowie eine Proteinbestimmung mit dem Bradford Assay durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf DMSO *sham*).

Interessanterweise zeigten Untersuchungen an immortalisierten HaCaT-Keratinozyten sowie NHEK, dass im Vergleich zu einer zweistündigen Vorbehandlung eine vierstündige Belastung mit 100 nM FICZ vor UVA-Exposition die Caspase-3 Aktivität signifikant reduzierte (Abb. 9).

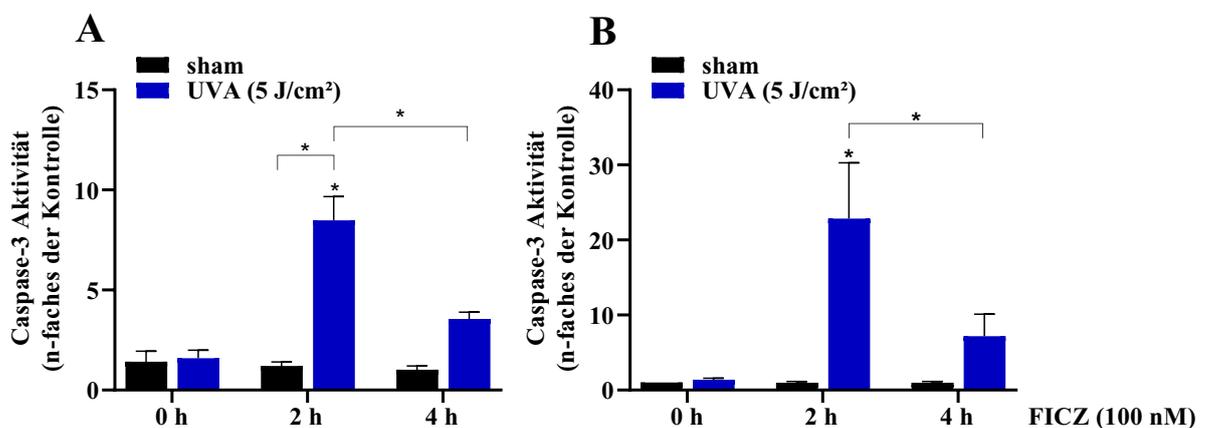


Abbildung 9: Längere Inkubationszeiten mit FICZ reduzieren die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Caspase-3 Aktivität.

HaCaT-Keratinozyten (**A**) und NHEK (**B**) wurden für 2 h und 4 h mit 100 nM FICZ oder 0,1 % DMSO vorbelastet und anschließend mit einer UVA-Dosis von 5 J/cm² bestrahlt. Nach 4 h wurden die Keratinozyten lysiert und die Aktivität der Caspase-3 bestimmt sowie eine Proteinbestimmung mit dem Bradford Assay durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf DMSO *sham*).

Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil von spät-apoptotischen Zellen in der subG₁-Phase mit dem Nicoletti-Assay bestimmt. Die NHEK wurden dazu mit 50 nM und 100 nM FICZ vorbehandelt (2 h und 4 h), anschließend mit UVA (5 J/cm²) bestrahlt und für 24 h inkubiert. Eine Behandlung der NHEK mit 50 nM und 100 nM FICZ für 2 h und 4 h und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung mit 5 J/cm² resultierte in einer vermehrten Anzahl von Zellen in der subG₁-Phase (Abb.10).

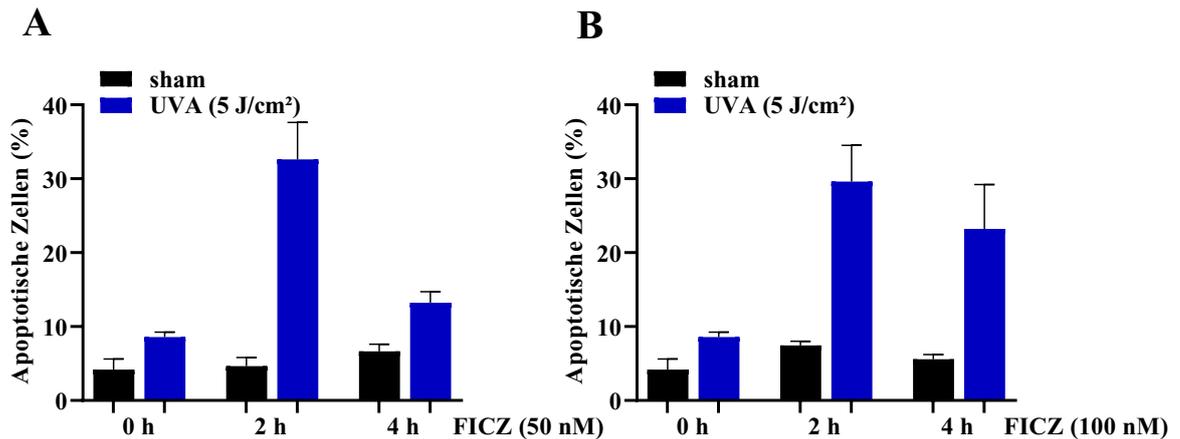


Abbildung 10: Längere Inkubationszeiten mit FICZ reduzieren die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Apoptose.

A: NHEK wurden für 2 h und 4 h mit 50 nM FICZ (**A**) und 100 nM FICZ (**B**) vorbelastet und anschließend mit 0 oder 5 J/cm² UVA-Strahlung belastet. Nach 24 h wurden die Zellen im Nicoletti-Puffer lysiert und mittels Propidium-Iodid wurde der Zellzyklus analysiert. Die Anzahl an apoptotischen (subG₁) Zellen ist graphisch dargestellt. n = 2. Mittelwert ± SEM.

Eine vierstündige Vorbelastung mit 50 nM FICZ, verglichen mit einer zweistündigen Vorbelastung, reduzierte die Anzahl der FICZ und UVA-Strahlung (FICZ/UVA-) induzierten apoptotischen Zellen um mehr als 50 % (Abb. 10.A, B). Dieselbe Behandlung der NHEK mit 100 nM FICZ und einer anschließenden UVA-Bestrahlung hemmte die Apoptose um ca. 10 % (Abb. 10.B).

Diese Ergebnisse gaben einen ersten Hinweis auf einen zeitabhängigen Abbau des Tryptophan-Photoprodukts FICZ.

3.1.2. Ein AHR-knockdown führt zu einer Steigerung der durch FICZ/UVA- induzierten Apoptose in Keratinozyten

Um zu überprüfen, ob die Aktivität des AHR maßgeblich einen Einfluss auf die UVA-induzierte Phototoxizität von FICZ besitzt, wurden im Folgenden HaCaT-Keratinozyten verwendet, die stabil mit einer AHR-gerichteten shRNA bzw. einem

entsprechenden Leervektor transduziert wurden (HaCaT-shAHR, HaCaT-EV; (Fritsche *et al.*, 2007)). Die Leervektor-Kontrollzellen (HaCaT-EV-) und die HaCaT-shAHR-Keratinocyten wurden für jeweils 1 h, 2 h und 4 h mit FICZ (50 nM oder 100 nM) vorbelastet und anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 4 h wurde die Caspase-3 Aktivität gemessen und nach 24 h Inkubation die Anzahl apoptotischer Zellen mittels Nicoletti-Färbung bestimmt (Abb. 11). Nach Behandlung der AHR-profizienten Keratinocyten mit 50 nM bzw. 100 nM FICZ und anschließender UVA-Exposition, wurde eine zeitabhängige Abnahme der Caspase-3 Aktivität beobachtet (Abb. 11.B, C).

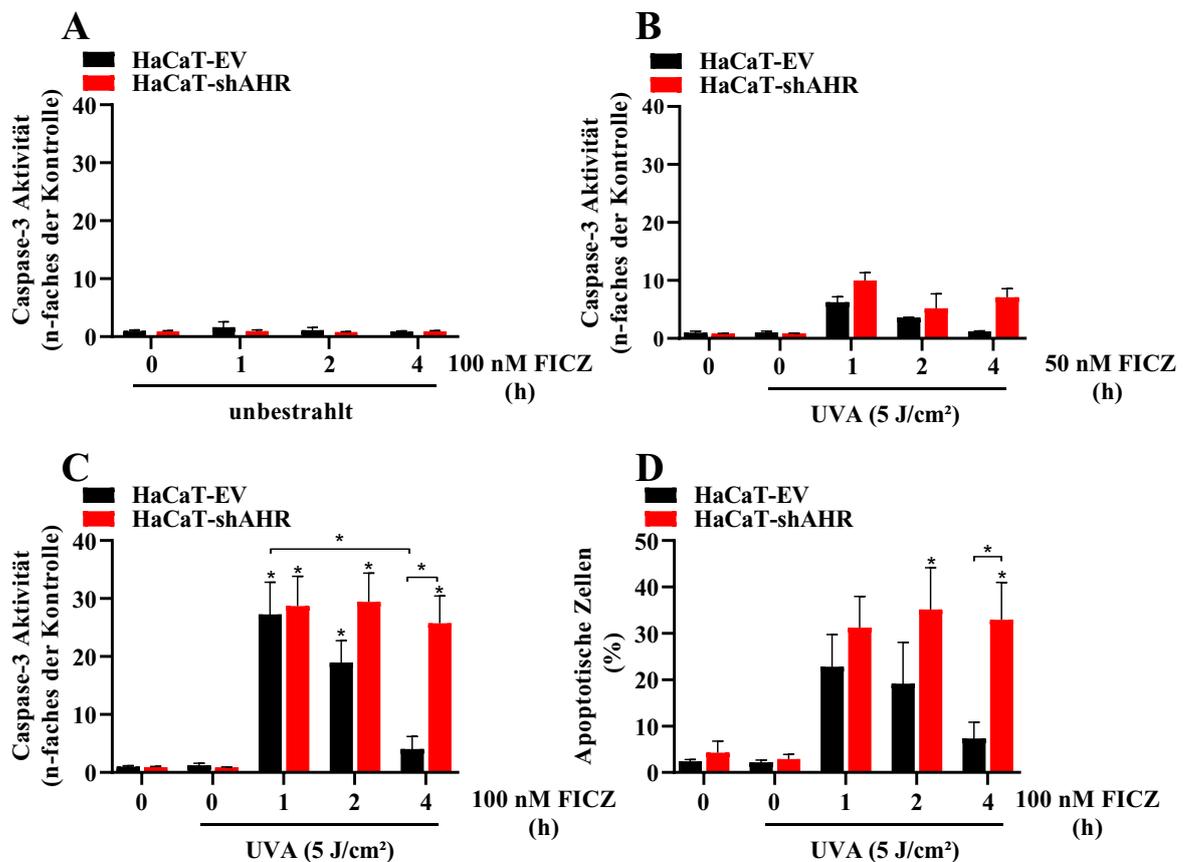


Abbildung 11: Eine gentechnische Hemmung der AHR Expression führt zu einer Steigerung der durch FICZ/UVA-induzierten Apoptose in Keratinocyten.

A-C: HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 50 nM FICZ (n = 2) oder 100 nM FICZ (n = 6) behandelt und im Anschluss mit 0 oder 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und mit dem Caspase-3-Assay untersucht sowie eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 6. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham). **D:** HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit FICZ behandelt, bevor diese mit 5 J/cm² UVA-Strahlung belastet wurden. Nach 24 h wurden die Zellen im Nicoletti-Puffer lysiert und mittels Propidium-Iodid wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

Im Gegensatz dazu wiesen die AHR-defizienten Keratinocyten keine zeitabhängige Abnahme der Caspase-3 Aktivität auf. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten AHR-

knockdown-Zellen nach vierstündiger FICZ Exposition und UVA-Bestrahlung eine signifikant gesteigerte Caspase-3 Aktivität (Abb. 11.B, C). Wie erwartet, führte eine Behandlung der Zellen mit 100 nM FICZ im Vergleich zur Testreihe mit 50 nM FICZ nach UVA-Bestrahlung zu einer deutlich höheren Aktivität der Caspase-3 (Abb. 11.B, C). Eine Behandlung mit FICZ sowie UVA-Strahlung alleine zeigte erneut keine vermehrte Aktivität der Caspase-3 (Abb. 11A). Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der Caspase-3 zu einem Anstieg apoptotischer Zellen führte, wurde zusätzlich die prozentuale Anzahl von Zellen in der subG₁-Phase mittels Nicoletti-Färbung bestimmt (Abb. 11.D).

Die Behandlung der AHR-defizienten Zellen mit 100 nM FICZ für 1 h, 2 h und 4 h und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung führten zu einem Anstieg apoptotischer Zellen von 3 % auf 30 %. Die Belastung der AHR-profizienten-Keratinocyten mit FICZ und UVA-Strahlung zeigte einen zeitabhängigen Abfall apoptotischer Zellen von ca. 20 % nach einstündiger FICZ Inkubation, auf ca. 6 % nach einer vierstündigen Exposition mit FICZ. Im Vergleich zu den HaCaT-EV-Keratinocyten zeigten HaCaT-shAHR-Keratinocyten nach vierstündiger FICZ Exposition und UVA-Bestrahlung einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen. Die Ergebnisse des Nicoletti-Assays reflektieren somit die Ergebnisse der Caspase-3 Aktivitätsmessung. Zusammenfassend deuten die bisherigen Daten daraufhin, dass die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose maßgeblich über die Aktivität des AHR reguliert wird. Im Folgenden wurde daher der Einfluss eines exogen zugesetzten AHR-Agonisten auf die FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität analysiert.

3.1.3. Eine Aktivierung des AHR durch Tapinarof stimuliert die Enzymaktivität von CYP1A1 in Keratinocyten

Tapinarof ist eine natürlich vorkommende Arzneimittelsubstanz, die topisch appliziert, zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen, wie der AD und der Schuppenflechte (Psoriasis) eingesetzt werden kann. In weiteren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Tapinarof an das AHR-Protein bindet und nachgeschaltete Signalwege aktivieren kann (Smith *et al.*, 2017). In der Tat induzierte eine 24-stündige Behandlung der HaCaT-Zellen mit 1 μ M Tapinarof die mRNA Expression von CYP1A1 um das ca. 150-fache (Mittelwert: 148,08 \pm SEM: 61,966). Zusätzlich wurde die Genexpression von HOX-1 bestimmt. Diese zeigte einen Anstieg um das 1,6-fache (Mittelwert: 1,587 \pm SEM:0,366). Im Folgenden wurde mittels EROD-Assay überprüft, ob Tapinarof die Enzymaktivität von CYP1A1 in HaCaT-Keratinocyten induziert. Der EROD-Assay

detektiert spezifisch die Aktivität der Isoenzyme CYP1A1 und CYP1A2. Da CYP1A2 jedoch hauptsächlich in der Leber, nicht aber in humanen Keratinozyten exprimiert wird (Baron *et al.*, 2001), sind die nachfolgend gezeigten EROD-Aktivitäten mit der Enzymaktivität von CYP1A1 gleichzusetzen. Eine Behandlung der HaCaT-Zellen mit 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM Tapinarof steigerte den CYP1A1-katalysierten Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin signifikant auf ca. 70 pmol/min/mg Protein (Abb. 12A).

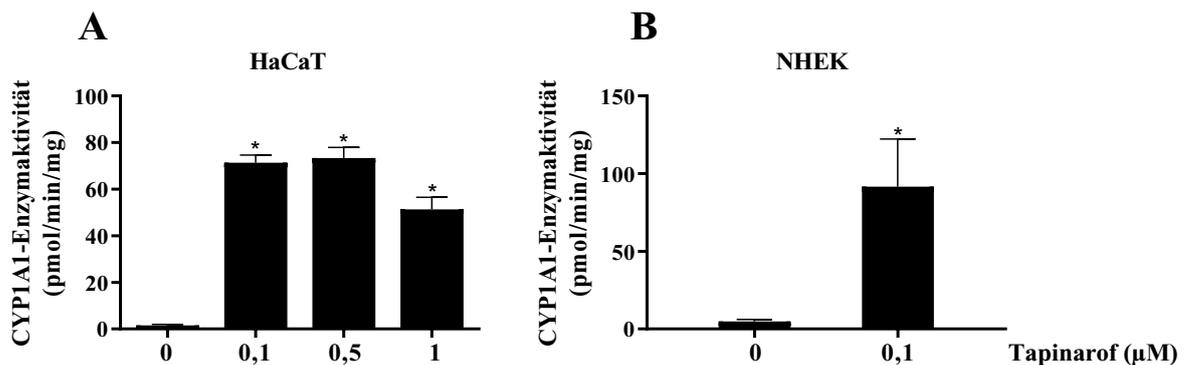


Abbildung 12: Tapinarof stimuliert die Enzymaktivität von CYP1A1 in Keratinozyten.

A: HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM Tapinarof behandelt und nachfolgend wurde die CYP1A1-Enzymaktivität mit dem EROD-Assay analysiert. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$) **B:** NHEK wurden für 24 h mit 0,1 μM Tapinarof behandelt. Anschließend wurde die CYP1A1-Enzymaktivität mit dem EROD-Assay bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde ein ungepaarter T-Test verwendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$).

Dabei zeigte sich, dass bereits die niedrigste getestete Konzentration zu einer maximalen EROD Aktivität führte. Eine Belastung der NHEK mit 0,1 μM Tapinarof stimulierte den CYP1A1-vermittelten Substratumsatz auf 100 pmol/min/mg Protein (Abb. 12B). Aus diesem Grund sollte nun getestet werden, ob Tapinarof durch eine verstärkte Expression von CYP1A1 zu einem vermehrten Abbau von FICZ führt und demnach die FICZ/UVA-induzierte Caspase-Aktivität hemmt.

3.1.4. Tapinarof reduziert AHR-abhängig die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in Keratinozyten

HaCaT- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten wurden mit 1 μM Tapinarof oder 0,1 % DMSO vorbelastet. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen für 1 h mit 100 nM FICZ oder 0,1 % DMSO behandelt und anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 4 h wurde die Caspase-3 Aktivität in den Zellen bestimmt (Abb. 13).

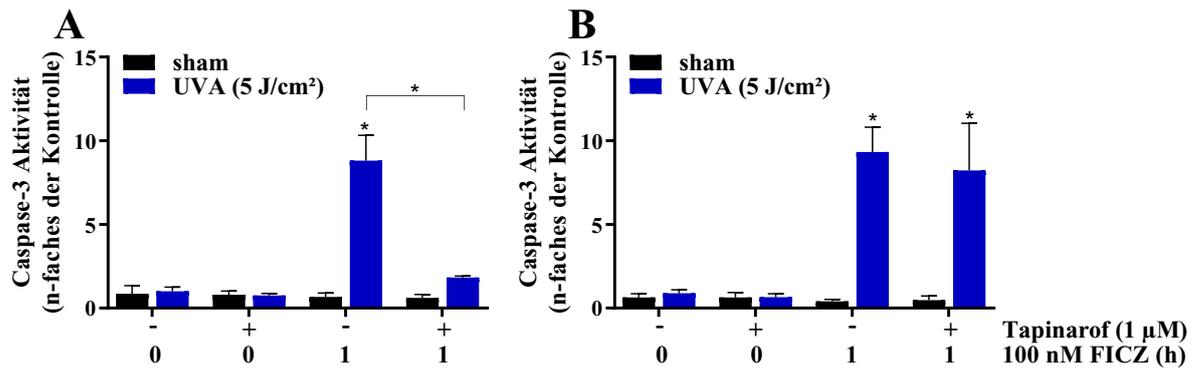


Abbildung 13: Tapinarof vermindert AHR-abhängig die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in HaCaT-Keratinocyten.

HaCaT- (A) und HaCaT-shAHR-Zellen (B) wurden für 24 h mit 1 µM Tapinarof oder 0,1 % DMSO belastet. Im Anschluss wurde für 1 h 100 nM FICZ hinzugegeben, die Zellen mit 5 J/cm² UVA bestrahlt und für weitere 4 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Caspase-3 Aktivität bestimmt sowie eine Proteinbestimmung mit dem Bradford Assay durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf DMSO sham).

Eine Exposition der Zellen mit Tapinarof, DMSO und UVA-Strahlung hatte keinen Einfluss auf die basale Caspase-3 Aktivität. Es wurde daher davon ausgegangen, dass Tapinarof in der eingesetzten Testkonzentration keine nennenswerten UVA-phototoxischen Wirkungen entfacht. Die Abbildung 13.A zeigt, dass eine Behandlung mit Tapinarof die durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 Aktivität in AHR-profizienten-Zellen signifikant hemmte. Eine entsprechende Behandlung der HaCaT-shAHR-Keratinocyten hatte keinerlei Auswirkungen auf die durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 Aktivität (Abb. 13.B). Diese Befunde implizieren, dass eine gesteigerte Expression und Enzymaktivität AHR-abhängiger Zielgene die durch FICZ-Behandlung und UVA-Strahlung induzierte Apoptose hemmen. Nachfolgend sollten diese Beobachtungen in NHEK verifiziert werden. Hierfür wurden NHEK mit 0,1 µM Tapinarof oder 0,1 % DMSO für 24 h vorbelastet. Anschließend wurden 100 nM FICZ oder 0,1 % DMSO für 1 h hinzugegeben und die Zellen mit 5 J/cm² UVA bestrahlt. Eine Co-Behandlung der Tapinarof exponierten Zellen mit 100 nM FICZ für 1 h zeigte keine Veränderung der durch FICZ-Behandlung und UVA-Bestrahlung induzierten Caspase-3 und -9 Aktivitäten (Abb. 14.A, B). Die Caspase-9 Aktivität ist ein Marker für den intrinsischen Weg der Apoptose. Eine vermehrte Aktivität dieser Caspase gibt somit einen Hinweis darauf, dass die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose über den intrinsischen Weg verläuft.

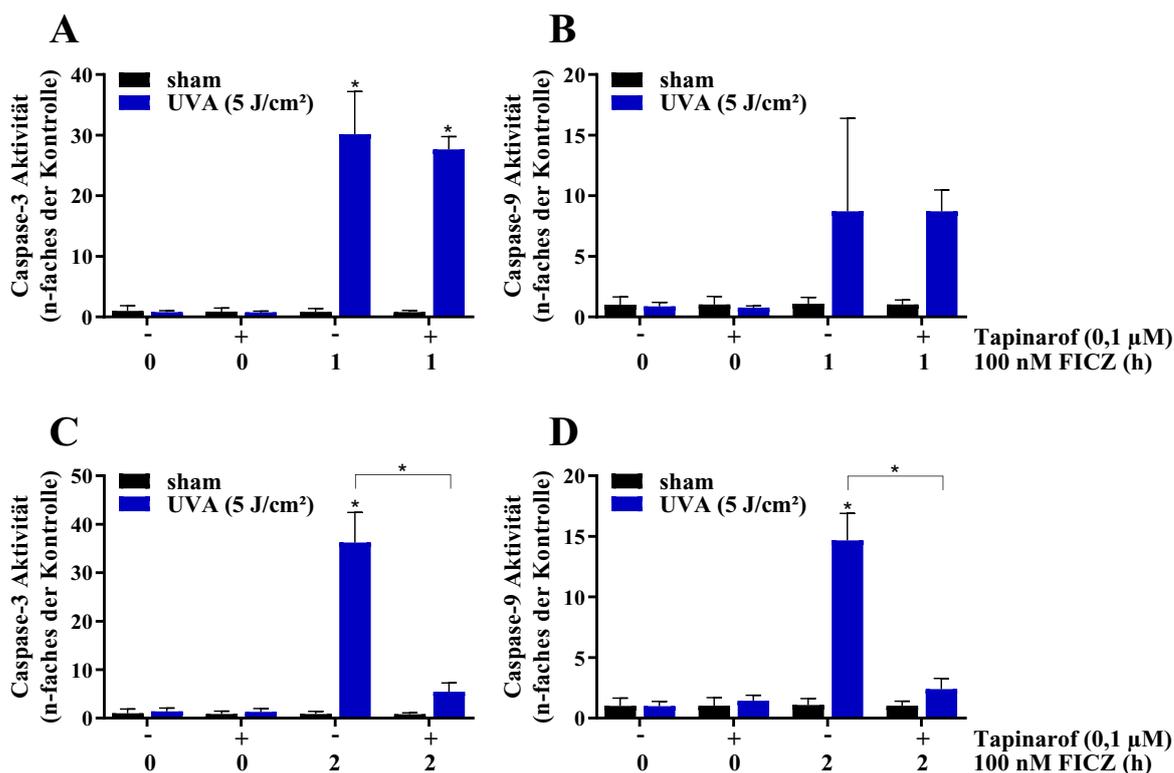


Abbildung 14: Tapinarof reduziert die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NHEK.

A-B: NHEK wurden für 24 h mit 0,1 µM Tapinarof oder 0,1 % DMSO belastet. Im Anschluss wurden für 1 h 100 nM FICZ hinzugegeben, die Zellen mit 5 J/cm² UVA bestrahlt und die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Nachfolgend wurde die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt sowie eine Proteinbestimmung mit dem Bradford Assay durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf DMSO sham). **C-D:** NHEK wurden für 24 h mit 0,1 µM Tapinarof oder 0,1 % DMSO belastet. Anschließend wurden für 2 h 100 nM FICZ hinzugegeben, die Zellen mit 5 J/cm² UVA bestrahlt, für weitere 4 h inkubiert und nachfolgend die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf DMSO sham).

Um zu überprüfen, ob FICZ in NHEK möglicherweise verzögert abgebaut wird, wurden die NHEK für 2 h mit 100 nM FICZ oder 0,1 % DMSO belastet und nachfolgend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt. Wie in Abbildung 14.C und 14.D ersichtlich, deuteten die Ergebnisse daraufhin, dass Tapinarof die FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 und -9 Aktivität vermindert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des AHR die durch UVA-Strahlung induzierte Apoptose von FICZ verstärkte, wohingegen eine Aktivierung des AHR die Caspase-3 und -9 Aktivität verringerte.

3.1.5. Eine simultane UVA- und UVB-Bestrahlung stimuliert die Caspase-3 Aktivität in AHR-knockdown-Keratinocyten

Im Folgenden wurde der Einfluss einer simultanen UVA- und UVB-Strahlung auf die Caspase-3 Aktivität in AHR-profizienten und AHR-knockdown Keratinocyten analysiert. Untersuchungen von Fritsche *et al.* konnten zeigen, dass in Antwort auf eine UVB-Bestrahlung mit 600 J/m^2 , ca. 80 pM FICZ in HaCaT-Zellen gebildet wird (Fritsche *et al.*, 2007). Daher sollte die exogene FICZ-Zugabe durch eine simultane Bestrahlung mit UVA und UVB simuliert werden. Eine Hemmung des AHR vor einer UVB-Exposition sollte demnach zu einer Akkumulierung von FICZ in epidermalen Zellen führen und somit die UVA-induzierten phototoxischen Effekte von FICZ induzieren. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten einzeln mit $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA und 400 J/m^2 UVB sowie simultan mit $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA und 400 J/m^2 UVB bestrahlt (Abb. 15). Als Positivkontrolle wurde zudem erneut die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose detektiert. Hierzu wurden die HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten mit 100 nM FICZ vorbelastet und anschließend mit $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA bestrahlt.

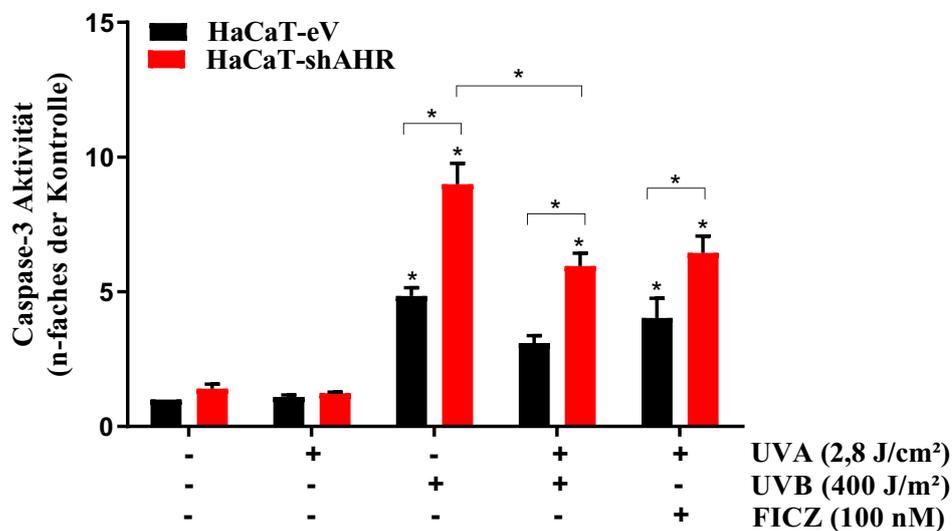


Abbildung 15: Eine simultane UVA- und UVB-Bestrahlung stimuliert die Caspase-3 Aktivität in AHR-knockdown-Keratinocyten.

AHR-profiziente und -defiziente Keratinocyten wurden einzeln mit 400 J/m^2 UVB-Strahlung und $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA-Strahlung und simultan mit 400 J/m^2 UVB- und $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA-Strahlung exponiert. Ein Teil der Zellen wurde zudem mit 100 nM FICZ vorbelastet und nachfolgend mit $2,8 \text{ J/cm}^2$ UVA bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen für 4 h in Zellkulturmedium inkubiert und nachfolgend die Caspase-3 Aktivität bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bradford Assay. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

Eine alleinige Bestrahlung mit 2,8 J/cm² UVA zeigte keine vermehrte Induktion der Caspase-3 Aktivität, wie in den vorangegangenen Experimenten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits publizierten Daten. Demnach kommt es erst bei steigenden UVA-Dosen ab 10 J/cm² zu apoptotischen Effekten in Keratinozyten (He *et al.*, 2004; Boyer *et al.*, 2012). Eine Hemmung des AHR hingegen steigerte die UVB-induzierte Apoptose, womit bereits publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden konnten (Frauenstein *et al.*, 2013; Pollet *et al.*, 2018). Eine simultane Bestrahlung mit UVA und UVB resultierte ebenfalls in einer gesteigerten Caspase-3 Aktivität in den HaCaT-shAHR-Keratinozyten. Wie erwartet, reflektierte die Behandlung der Zellen mit FICZ und UVA-Strahlung die Befunde der simultanen UVA- und UVB-Bestrahlung. Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine Hemmung des AHR bei simultaner UVA-/UVB-Exposition zu einer verstärkten Phototoxizität von FICZ führt. Interessanterweise zeigte das simultane Bestrahlungsexperiment jedoch, dass UVA-Strahlung die durch UVB-Exposition induzierte Caspase-3 Aktivität signifikant hemmte. Diese Ergebnisse wurden nicht erwartet. Der Arbeitshypothese zufolge sollte das durch UVB-Strahlung generierte Photoprodukt FICZ in HaCaT-shAHR-Keratinozyten UVA-phototoxische Effekte aufzeigen und somit die UVB-Strahlung induzierte Stressantwort verstärken. Diese gesteigerte Stressantwort sollte demnach zu einer vermehrten Induktion der Apoptose führen. Aus diesem Grund wurden im letzten Teil dieser Arbeit (siehe Abschnitt 4.5.) weitere Versuche in HaCaT-Keratinozyten und NHEK sowie Bestrahlungsstudien an Mäusen durchgeführt, um zu verifizieren, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß eine simultane Bestrahlung mit UVA Einfluss auf die UVB-induzierte Stressantwort ausübt.

3.2. Die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte oxidative Stressantwort wird durch den metabolischen Abbau von FICZ beeinflusst

Die Phototoxizität einer Substanz beschreibt einen Prozess, bei dem es über die Bildung von ROS zur Induktion antioxidativ-wirkender Enzyme, oxidativen DNA-Schäden und letzten Endes bei einem zu großen Schaden zur Einleitung der Apoptose kommt (Redza-Dutordoir und Averill-Bates, 2016). Im Folgenden sollte daher überprüft werden, ob die in den HaCaT-shAHR-Keratinozyten beobachtete gesteigerte Apoptose, nach kombinierter FICZ/UVA-Behandlung, eine vermehrte Bildung von oxidativem Stress vorausging. Eine Hemmung des AHR sollte die Enzymaktivität von CYP1A1 und somit auch den metabolischen Abbau von FICZ vermindern. Gesteigerte FICZ-Level in Antwort auf eine

UVA-Bestrahlung müssten somit zu einer vermehrten Bildung von ROS und einer gesteigerten antioxidativen Stressantwort führen.

3.2.1. Der metabolische Abbau von FICZ wird durch die Aktivität des AHR bestimmt

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der katalytischen Aktivität von CYP1A1 in HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Zellen untersucht (Abb. 16.A). Zu diesem Zweck wurden die Keratinozyten für 6 h, 8 h, 12 h und 24 h mit FICZ belastet und anschließend ein EROD-Assay durchgeführt (Abb. 16.A).

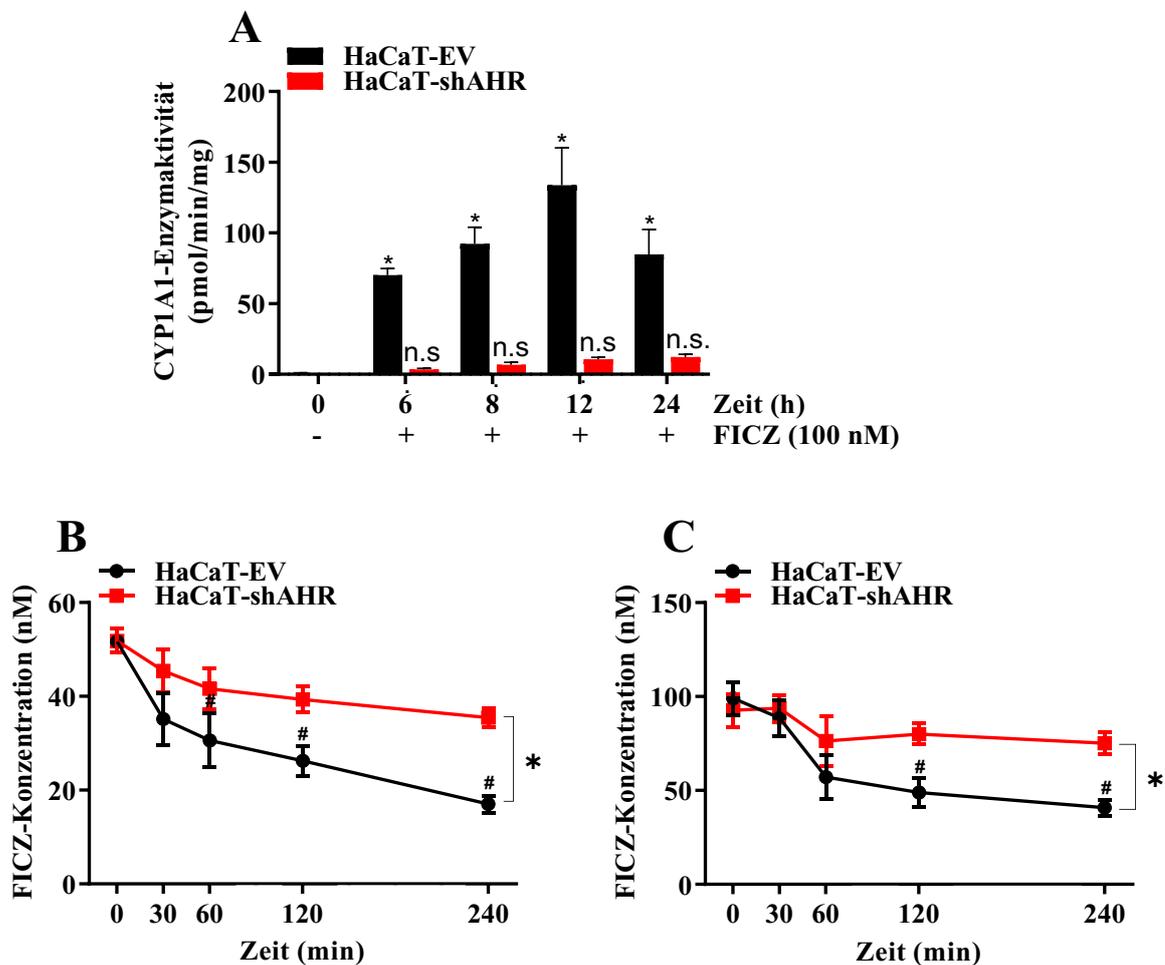


Abbildung 16: Der metabolische Abbau von FICZ wird durch die Aktivität des AHR bestimmt.

A: HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten wurden für 6 h, 8 h, 12 h und 24 h mit 100 nM FICZ behandelt. Anschließend erfolgte die Enzymaktivitätsmessung mit dem EROD-Assay. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf HaCaT-EV DMSO *sham*). **B+C:** HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten wurden für 30 min, 60 min, 120 min und 240 min mit 50 nM FICZ (**B**) oder 100 nM FICZ (**C**) belastet. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen, mit Acetonitril versetzt und mittels HPLC wurde die FICZ-Konzentration bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ signifikanter Unterschied der FICZ-Konzentration im Medium zwischen HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten; #, $p < 0,05$ signifikant verringert bezogen auf die 0 h Belastung mit 50 nM oder 100 nM FICZ der HaCaT-EV-Keratinozyten).

Die HaCaT-EV-Zellen zeigten einen zeitabhängigen Anstieg der CYP1A1-Enzymaktivität, der nach 24 h wieder abnahm. Diese Abnahme ist vermutlich darin begründet, dass FICZ metabolisiert wurde und die Induktion der CYP1A1-Genexpression folglich abschwächte. Die HaCaT-shAHR-Zellen hingegen zeigten nahezu keine CYP1A1-Enzymaktivität auf. Es wurde daher davon ausgegangen, dass diese Zellen das CYP1A1-Substrat nur vermindert metabolisieren können. In Kooperation mit Julien Dairou von der Universität in Paris wurde daher das FICZ-Level anhand von HPLC-Messungen im Medium von AHR-profizienten und AHR-knockdown Keratinozyten analysiert. HaCaT-shAHR-Keratinozyten und die entsprechenden Kontrollzellen wurden dafür mit 50 nM und 100 nM FICZ belastet. Nach 30 min, 60 min, 120 min und 240 min Inkubationszeit wurden 500 µl des Mediums mit 500 µl Acetonitril versetzt und für die analytischen Messungen nach Paris versendet.

Die in Abbildung 16.B, C dargestellten Ergebnisse der HPLC-Messung zeigten, dass die FICZ-Konzentration im Medium der AHR-profizienten-Keratinozyten zeitabhängig gesunken war. Diese signifikante Abnahme in den Kontrollzellen um mehr als 50 % wurde bei Verwendung beider Ausgangskonzentrationen, 50 nM FICZ und 100 nM FICZ, beobachtet. Die Behandlung der HaCaT-shAHR-Keratinozyten mit 50 nM und 100 nM FICZ hingegen resultierte in einem Abfall von ca. 15% nach 240 min. Der Vergleich der HaCaT-EV- mit den HaCaT-shAHR-Keratinozyten zeigte, dass nach 240 min Inkubationszeit die FICZ-Konzentration im Medium AHR-profizienter-Zellen signifikant verringert war. Diese Beobachtungen implizieren, dass durch eine Hemmung des AHR der metabolische Abbau von FICZ inhibiert wird.

3.2.2. FICZ und UVA-Strahlung führen zu einem Anstieg von ROS in AHR-knockdown-Zellen

Als nächstes wurde überprüft, welchen Einfluss eine Exposition der AHR-profizienten und AHR-knockdown Keratinozyten mit FICZ und UVA-Strahlung auf die Generierung von ROS hat. Dafür wurden diese für 4 h mit 100 nM FICZ vorbehandelt und anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 1 h wurden die Zellen für die Färbung mit dem fluorogenen Farbstoff MitoSox vorbereitet und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 17). Die Oxidation von MitoSox durch Superoxid erzeugt ein rotes Fluoreszenzsignal und ist ein Hinweis für oxidativen Stress in einer Zelle.

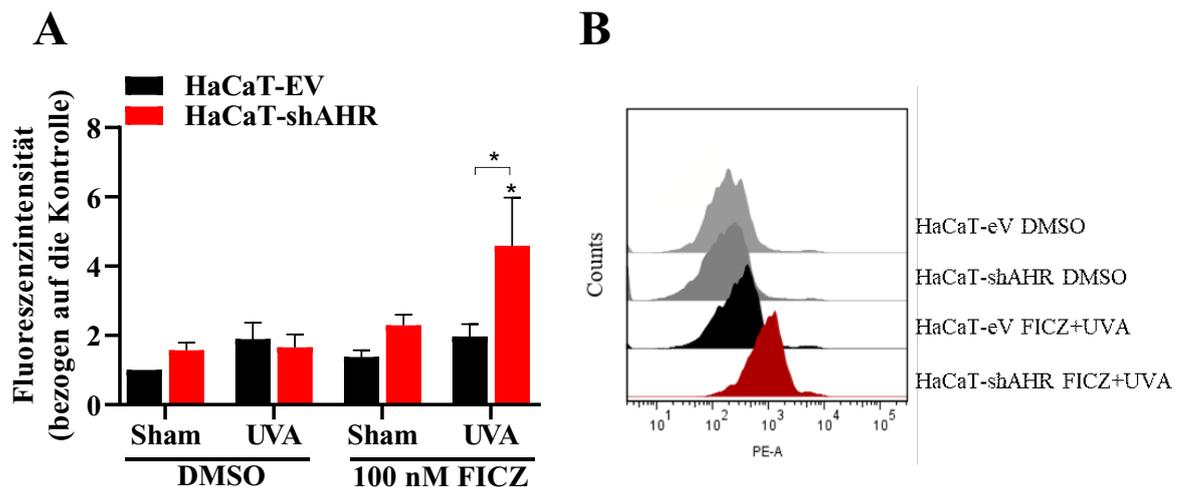


Abbildung 17: FICZ und UVA-Strahlung induzieren ROS in AHR-knockdown-Keratinocyten.

HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten wurden für 4 h mit 100 nM FICZ behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0 und 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 1 h wurden die Zellen trypsinisiert und mit dem fluorogenen Farbstoff MitoSox gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind eine quantitative Auswertung (**A**) sowie eine repräsentative Darstellung des Histogramms (**B**). Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

In der Tat zeigten die mit FICZ und UVA-Strahlung exponierten HaCaT-shAHR-Zellen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des MitoSox. Die Kontrollbehandlungen sowie eine UVA-Bestrahlung FICZ-vorbehandelter HaCaT-EV-Zellen führte zu keiner Steigerung der Fluoreszenzintensität. In einem weiteren Versuch wurde anschließend überprüft, ob die in HaCaT-shAHR-Zellen beobachtete vermehrte ROS-Bildung mit einer verstärkten Induktion des antioxidativ wirkenden Enzyms HOX-1 einherging.

3.2.3. Eine Behandlung mit FICZ und UVA-Strahlung stimuliert die Genexpression des antioxidativ wirkenden Enzyms HOX-1 in Keratinocyten

Die HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten wurden für 4 h mit 100 nM FICZ vorbehandelt, anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt und nach weiteren 6 h wurden die Zellen für qRT-PCR-basierte Expressionsanalysen aufbereitet (Abb. 18). Die unbestrahlten HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten zeigten keine gesteigerte Genexpression der HOX-1. Des Weiteren konnte weder nach einer Behandlung mit 100 nM FICZ noch nach einer Bestrahlung mit UVA ein Anstieg der HOX-1 Kopienzahl beobachtet werden.

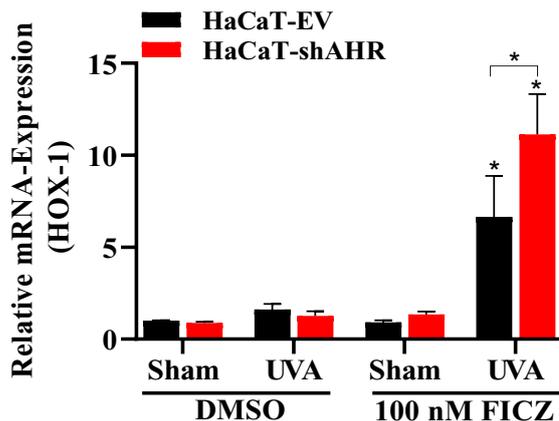


Abbildung 18: FICZ und UVA-Strahlung steigert die Genexpression von HOX-1 in Keratinozyten.

HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten wurden für 4 h mit 100 nM FICZ behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0 und 5 J/cm² UVA-Strahlung bestrahlt. Nach 6 h wurden die Zellen geerntet und die Genexpression von HOX-1 mittels qRT-PCR-Analyse untersucht. Die HOX-1 Transkriptmenge wurde auf die GAPDH Kopienzahl normiert und ist als n-faches der DMSO-behandelten Kontrollzellen dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

Eine Behandlung der HaCaT-Keratinozyten mit FICZ und eine anschließende UVA-Bestrahlung hingegen zeigten eine signifikant stärkere Induktion der HOX-1 Genexpression in den AHR-profizienten und AHR-*knockdown* Keratinozyten. Im Vergleich zu den HaCaT-EV-Zellen kam es jedoch zu einer signifikant stärkeren durch FICZ und UVA-Strahlung induzierten HOX-1 Genexpression in den HaCaT-shAHR-Keratinozyten. Die HOX-1 ist ein Zielgen des NRF2, weshalb die Daten implizieren, dass der NRF2-Signalweg möglicherweise an der durch UVA-Strahlung induzierten Phototoxizität von FICZ beteiligt zu sein scheint. Daher wurde in einem weiteren Versuch überprüft, ob eine Hemmung des NRF2-Signalweges ebenfalls die FICZ/UVA-induzierte Apoptose stimuliert.

3.2.4. NRF2-defiziente Keratinozyten zeigen eine gesteigerte durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität

Für die Annahme, dass das NRF2-Protein maßgeblich an der UVA-Strahlung induzierten Phototoxizität von FICZ beteiligt ist, wurde mittels CRISPR/Cas9 das NRF2-Gen ausgeschaltet, sodass es zu einer deutlich verminderten oder gar ausbleibenden Induktion antioxidativ-wirkender Enzyme kommen sollte. Die Generierung der HaCaT-NRF2-*knockout* (NRF2-KO)-Zellen erfolgte durch die von Dr. Andrea Rossi geleitete IUF Core Unit „Modellentwicklung“. Die Charakterisierung der HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurde mittels Western Blot und qRT-PCR basierter Analysen bestätigt (Abb. 19). Für die

Charakterisierung wurden die Kontrollzellen sowie die HaCaT-NRF2-KO-Zellen für 16 h mit 70 μ M 3H-1, 2-dithiole-3-thione (D3T), einem NRF2-Stabilisator, behandelt. Der repräsentative Western Blot zeigte, dass eine Behandlung mit D3T zu einem gesteigerten Proteinlevel in den HaCaT-Zellen führte. Die NRF2-defizienten Zellen hingegen zeigten kein Signal für das NRF2-Protein, weder nach DMSO-Behandlung noch nach D3T-Exposition (Abb. 19.A).

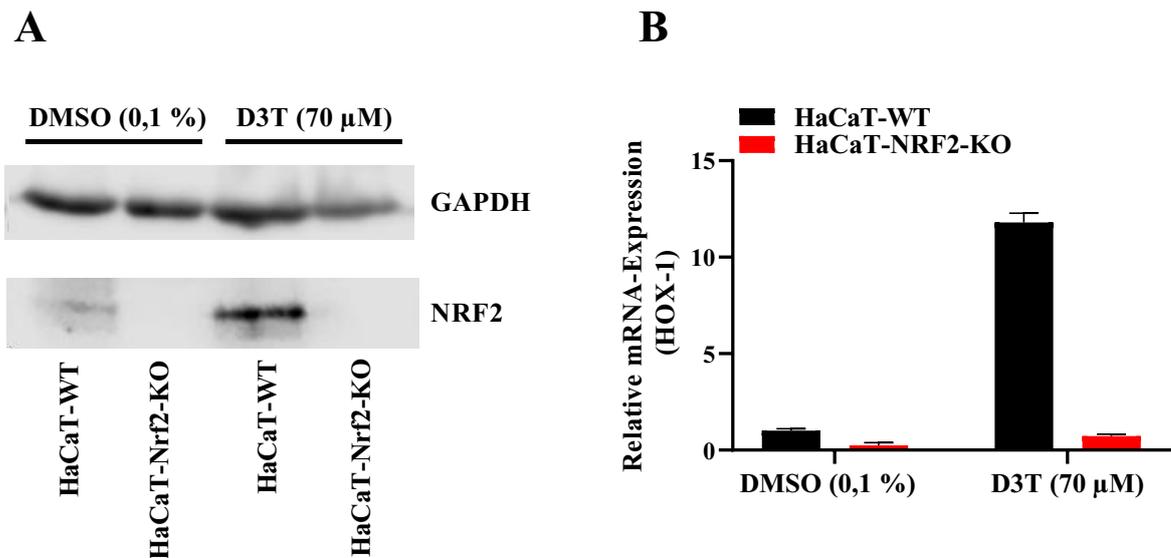


Abbildung 19: Charakterisierung der NRF2-knockout Keratinozyten.

HaCaT- und HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurden für 16 h mit 70 μ M D3T belastet. **A:** Die Zellen wurden lysiert und der Proteingehalt von NRF2 und GAPDH mittels Western Blot-Analyse detektiert. Repräsentativer Western Blot für die Proteine NRF2 und GAPDH. **B:** qRT-PCR-basierte Analyse der HOX-1 Kopienzahl, normiert auf die GAPDH Transkriptmenge. n = 2. Mittelwert \pm SEM.

Die qRT-PCR-basierte Analyse ergab, dass eine Behandlung mit D3T nur in den Kontrollzellen, nicht aber in den HaCaT-NRF2-KO-Zellen, zu einer mehr als 10-fachen Induktion des NRF2-Zielgens HOX-1 führte. Im Vergleich mit den HaCaT-Zellen, zeigten die HaCaT-NRF2-KO-Zellen zudem eine verminderte basale Expression des HOX 1-Gens auf (Abb. 19.B). Als nächstes wurde überprüft, ob in den NRF2-defizienten Keratinozyten die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte HOX-1 Genexpression ebenfalls verringert ist. Die HaCaT-NRF2-KO-Zellen sowie die Kontrollzellen wurden daher für 1 h, 2 h und 4 h mit 100 nM FICZ vorbelastet, anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt, für weitere 6 h inkubiert und nachfolgend für qRT-PCR-basierte Analysen aufbereitet (Abb. 20). In der Tat resultierte das Ausschalten des NRF2-Gens erneut in einer verminderten Genexpression der HOX-1. Die unbestrahlten und nur mit FICZ (100 nM) vorbelasteten Kontrollzellen zeigten keinen Unterschied in der Induktion des NRF2-Zielgens HOX-1 auf. Die gleiche Belastung

der HaCaT-NRF2-KO-Zellen führte ebenfalls zu keiner Induktion der HOX-1, das basale Expressionslevel war jedoch verglichen mit den Kontrollzellen um mehr als die Hälfte niedriger (Abb. 20A).

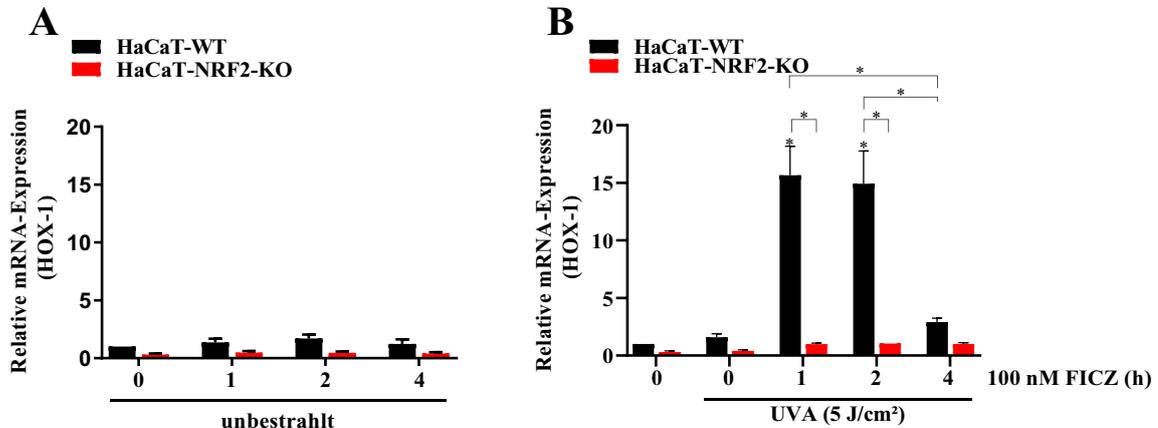


Abbildung 20: Die Genexpression der HOX-1 ist in NRF2-defizienten Keratinozyten reduziert.

A: HaCaT- und HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit FICZ belastet und nach weiteren 6 h wurden die Zellen geerntet. **B:** HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit FICZ belastet und anschließend mit 5 J/cm² UVA in PBS bestrahlt. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. **A-B.** Im Anschluss wurde die mRNA-Menge von HOX-1 mittels qRT-PCR bestimmt und auf die GAPDH Transkriptmenge normiert. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

Eine Bestrahlung der HaCaT-Zellen mit UVA alleine führte zu keiner Induktion der HOX-1. Jedoch resultierte eine Vorbehandlung der HaCaT-Zellen für 1 h und 2 h mit FICZ und einer anschließenden UVA-Bestrahlung in einem signifikanten Anstieg der HOX-1 Genexpression (Abb. 20.B). Eine Vorbehandlung für 4 h mit FICZ und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung hingegen führten zu einer signifikant geringeren Genexpression der HOX-1 im Vergleich zu den Zellen, die für 1 h und 2 h mit FICZ exponiert und anschließend mit UVA bestrahlt wurden. Die HaCaT-NRF2-KO-Zellen zeigten keine gesteigerte Expression der HOX-1, weder nach einer UVA-Exposition alleine noch nach einer vorangegangenen FICZ Belastung. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die NRF2-defizienten Zellen nach einer Exposition mit FICZ und UVA-Strahlung eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3, -8 und -9 aufweisen. Die HaCaT- und HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurden erneut für 1 h, 2 h und 4 h mit FICZ vorbehandelt, anschließend mit 5 J/cm² UVA bestrahlt und nach 4 h wurde die Caspase-3, -8 und -9 Aktivität bestimmt (Abb. 21). Die unbestrahlten sowie die mit FICZ belasteten HaCaT- und HaCaT-NRF2-KO-Keratinozyten zeigten keine Erhöhung der Caspase-3, -8 und -9 Aktivität (Abb. 21.A, C, E). Die Proben, welche nur mit UVA bestrahlt wurden, zeigten ebenfalls keine vermehrte Aktivität der Caspase-3, -8 und -9 (Abb. 21.B, D, F).

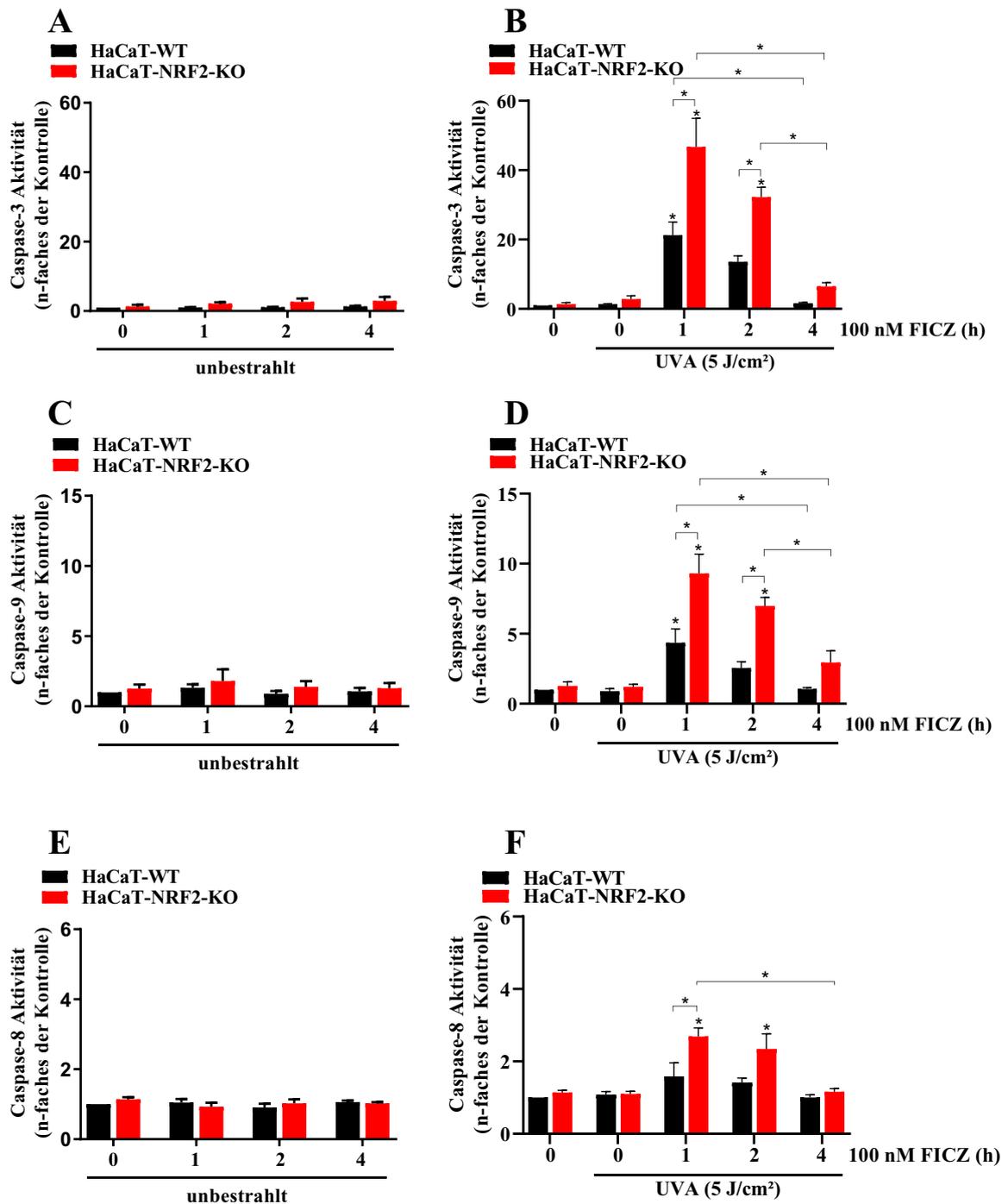


Abbildung 21: NRF2-defiziente Keratinozyten zeigen eine gesteigerte durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität.

A-B: HaCaT- und HaCaT-NRF2-KO-Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 100 nM FICZ belastet und anschließend mit 0 und 5 J/cm² UVA bestrahlt. Nach weiteren 4 h wurde die Aktivität von Caspase-3 (**A, B**), Caspase-9 (**C, D**) und Caspase-8 (**E, F**) untersucht. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bradford Assay. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf HaCaT-EV DMSO sham).

Eine Vorbehandlung der HaCaT-Zellen für 1 h und 2 h mit FICZ und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung steigerte die Aktivität der Caspase-3 (Abb. 21.B) um das ca. 20-fache, die der Caspase-9 (Abb. 21.D) um das ca. Fünffache. Dieselbe Behandlung der

NRF2-defizienten Zellen führte zu einer ca. 40-fachen Induktion der Caspase-3 Aktivität und einer ca. 10-fachen Steigerung der Caspase-9 Aktivität. Eine vierstündige Behandlung mit FICZ hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Caspase-3 und -9 Aktivität um mehr als 50 % in den HaCaT-Keratinocyten und HaCaT-NRF2-defizienten Zellen (Abb. 21.B, D). Im Vergleich zu den Kontrollzellen resultierte eine Behandlung mit FICZ und UVA-Strahlung in den NRF2-defizienten Keratinocyten in einer Steigerung der Caspase-3 und Caspase-9 Aktivität. Diese verstärkte Induktion der Apoptose konnte nach 1 h, 2 h und 4 h beobachtet werden (Abb. 21.B, D). Für die Aktivität der Caspase-8 wurde in den HaCaT-Zellen nahezu keine Aktivierung gemessen. Lediglich eine einstündige und zweistündige Vorbehandlung mit FICZ und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung der HaCaT-NRF2-KO-Zellen führte zu einem leichten, ca. dreifachen Anstieg der Caspase-8 Aktivität (Abb. 21.F). Die Ergebnisse implizieren, dass die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose überwiegend durch den intrinsischen Weg der Apoptose initiiert wird und dass NRF2 einen entscheidenden Einfluss auf den durch FICZ/UVA-induzierten Zelltod und die antioxidative-Stressantwort besitzt. Jedoch scheint der FICZ-Metabolismus in den NRF2-defizienten Zellen nicht beeinflusst zu werden, denn obwohl eine vermehrte Caspase-Aktivität in den HaCaT-NRF2-KO-Zellen gemessen wurde, konnte trotzdem gezeigt werden, dass längere Inkubationszeiten mit FICZ die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose reduzierten.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass eine Modulation der AHR-Aktivität von direkter Relevanz für die phototoxischen Wirkungen von exogen zugegebenem FICZ in Antwort auf eine UVA-Exposition ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Enzymaktivität von CYP1A1, in den AHR-*knockdown* Keratinocyten, den metabolischen Abbau von FICZ verringerte und die FICZ/UVA-induzierte Generierung von ROS und die Genexpression der HOX-1 stimulierte. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung des AHR die FICZ/UVA-induzierte Apoptose steigerte, wohingegen eine Behandlung mit AHR-Agonisten zu einer Hemmung der durch FICZ/UVA-induzierten Apoptose führte. Die Apoptose wird dabei wahrscheinlich hauptsächlich über den intrinsischen Weg reguliert. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass das NRF2-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die FICZ/UVA-induzierte Apoptose besitzt, jedoch keinen Einfluss auf den FICZ Metabolismus zu haben scheint. Obwohl eine vermehrte Caspase-Aktivität in den NRF2-defizienten Zellen gemessen wurde, konnte gezeigt werden, dass längere Inkubationszeiten mit FICZ, die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose abschwächte.

Eine simultane Bestrahlung der HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten mit UVA- und UVB-Strahlung zeigte identische Ergebnisse wie die Exposition mit FICZ und UVA-Strahlung. Anders als erwartet resultierte eine simultane Bestrahlung in einer Hemmung der UVB-induzierten Caspase-3 Aktivität in den HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten. Der zugrundeliegenden Hypothese sollte eine simultane UVB-Bestrahlung jedoch zu einer Akkumulierung von FICZ in AHR-*knockdown* Keratinocyten führen und somit in einer vermehrten UVA-induzierten Apoptose resultieren. Aus diesem Grund wurde im letzten Teil dieser Arbeit die Wirkung einer simultanen UVA-/UVB-Exposition auf die UVB-induzierte Schadensantwort untersucht.

3.3. Die Therapeutika Vemurafenib und Ketoconazol verstärken die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität

Es gibt eine Vielzahl von Medikamenten, die zu phototoxischen Wirkungen in der Haut führen. Dabei kann es sich um topisch aufgetragene sowie oral eingenommene Arzneimittel handeln. Bei einigen Arzneimitteln ist unklar, wie diese ihre photosensibilisierenden Wirkungen entfalten. In dieser Arbeit wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei einigen dieser Substanzen möglicherweise um AHR bzw. CYP1A1-Inhibitoren handeln könnte, die zu einer Akkumulierung von FICZ oder auch anderen endogenen, UVA-phototoxischen Molekülen führen könnten. Interessanterweise wurde Vemurafenib erst kürzlich von der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe als AHR-Antagonist beschrieben (Hawerkamp *et al.*, 2019). Vemurafenib ist ein BRAF Inhibitor der zur Therapie des malignen Melanoms eingesetzt wird. Zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Vemurafenib-Therapie gehören phototoxische Reaktionen der Haut in Antwort auf eine UVA-Exposition (Chapman *et al.*, 2011; Gelot *et al.*, 2013; Boudon *et al.*, 2014). Ähnliche Befunde wurden bei einer Behandlung mit dem Antimykotikum Ketoconazol beobachtet (Paine *et al.*, 1999; Korashy *et al.*, 2007; Wincent *et al.*, 2012; Zuba *et al.*, 2016). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob eine mögliche Inhibierung des AHR, durch Vemurafenib und Ketoconazol zu einer Steigerung der FICZ/UVA-induzierten Phototoxizität führt. Zusätzlich wurde je ein etablierter AHR-Antagonist und ein CYP1A1-Inhibitor verwendet, welche keine photosensibilisierenden Eigenschaften besitzen. 3'Methoxy-4'Nitroflavon (MNF) stellt dabei einen der wohl bekanntesten kompetitiven Antagonisten des AHR dar (Lu *et al.*,

1996), wohingegen 7-Hydroxyflavon (7-HF) ein selektiver CYP1A-Inhibitor ist (Zhai *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2013).

3.3.1. Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1

Mit Hilfe des EROD-Assays wurde zunächst getestet, ob MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol die induzierbare CYP1A1-Enzymaktivität hemmen. Dafür wurden HaCaT-Zellen (Abb. 22.A) und NHEK (Abb. 23.A) für 24 h mit 100 nM FICZ alleine oder in Kombination mit 10 μ M MNF, 10 μ M 7-HF, 25 μ M Vemurafenib, 40 μ M Vemurafenib und 50 μ M Ketoconazol belastet. Um zu differenzieren, ob die Testsubstanzen die EROD-Aktivität indirekt, also über Inhibition der AHR-abhängigen Expression des Enzyms, oder direkt, durch Hemmung der Enzymaktivität, beeinflussen, wurden HaCaT-Zellen (Abb. 22.B) sowie NHEK (Abb. 23.B) für 24 h mit 100 nM FICZ vorbelastet und anschließend für 30 min mit 10 μ M MNF, 10 μ M 7-HF, 25 μ M Vemurafenib, 40 μ M Vemurafenib und 50 μ M Ketoconazol behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die CYP1A1-Enzymaktivität wurde mit dem EROD-Assay bestimmt. Eine Behandlung der HaCaT-Zellen mit FICZ (100 nM) führte zu einem signifikanten Anstieg der CYP1A1-Enzymaktivität (Abb. 22.A). Nach 24 h stieg die Bildung von Resorufin auf ca. 60 pmol/min/mg Protein an. Eine kombinierte Behandlung dieser Zellen mit FICZ und den verschiedenen Inhibitoren führte zu einer signifikanten Hemmung der Enzymaktivität um mindestens 50 % bei allen getesteten Substanzen (Abb. 22.A). Die Co-Belastung der Zellen mit 100 nM FICZ und 40 μ M Vemurafenib bzw. 10 μ M 7-HF führte zu einer Reduzierung des Substratumsatzes um ca. 80 %. Eine Zugabe der Substanzen 30 min vor der EROD-Messung (Abb. 22.B) resultierte ebenfalls in einer verringerten CYP1A1-Enzymaktivität. Eine signifikante Abnahme um mehr als 50 % konnte bei einer Zugabe von Vemurafenib, 7-HF und Ketoconazol beobachtet werden. Eine Zugabe von MNF resultierte in einem marginalen Abfall der Enzymaktivität.

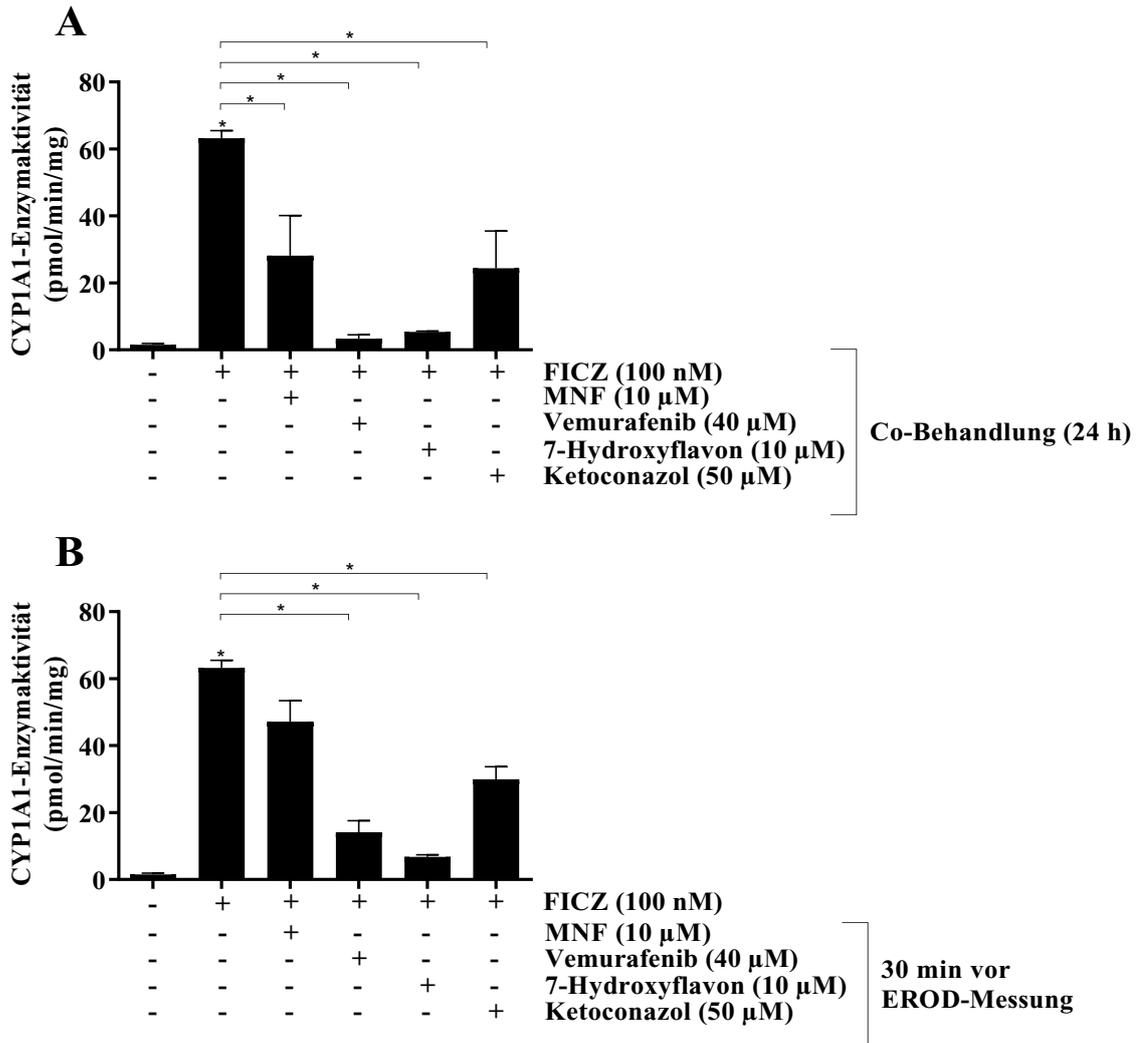


Abbildung 22: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1 in HaCaT-Zellen.

A. HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM FICZ oder 100 nM FICZ in Kombination mit 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol belastet. Nach 24 h wurde der Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zum Resorufin in pmol/min/mg Protein mit dem EROD-Assay bestimmt. **B.** HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM FICZ belastet und 30 min vor der EROD-Messung wurden 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol hinzugegeben. Anschließend wurde die Enzymaktivität von CYP1A1 mit dem EROD-Assay in pmol/min/mg Protein gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05).

Die Enzymaktivitätsmessung in den primären Keratinozyten führte zu identischen Ergebnissen. Die Werte für den Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zum Resorufin, durch CYP1A1 waren jedoch niedriger.

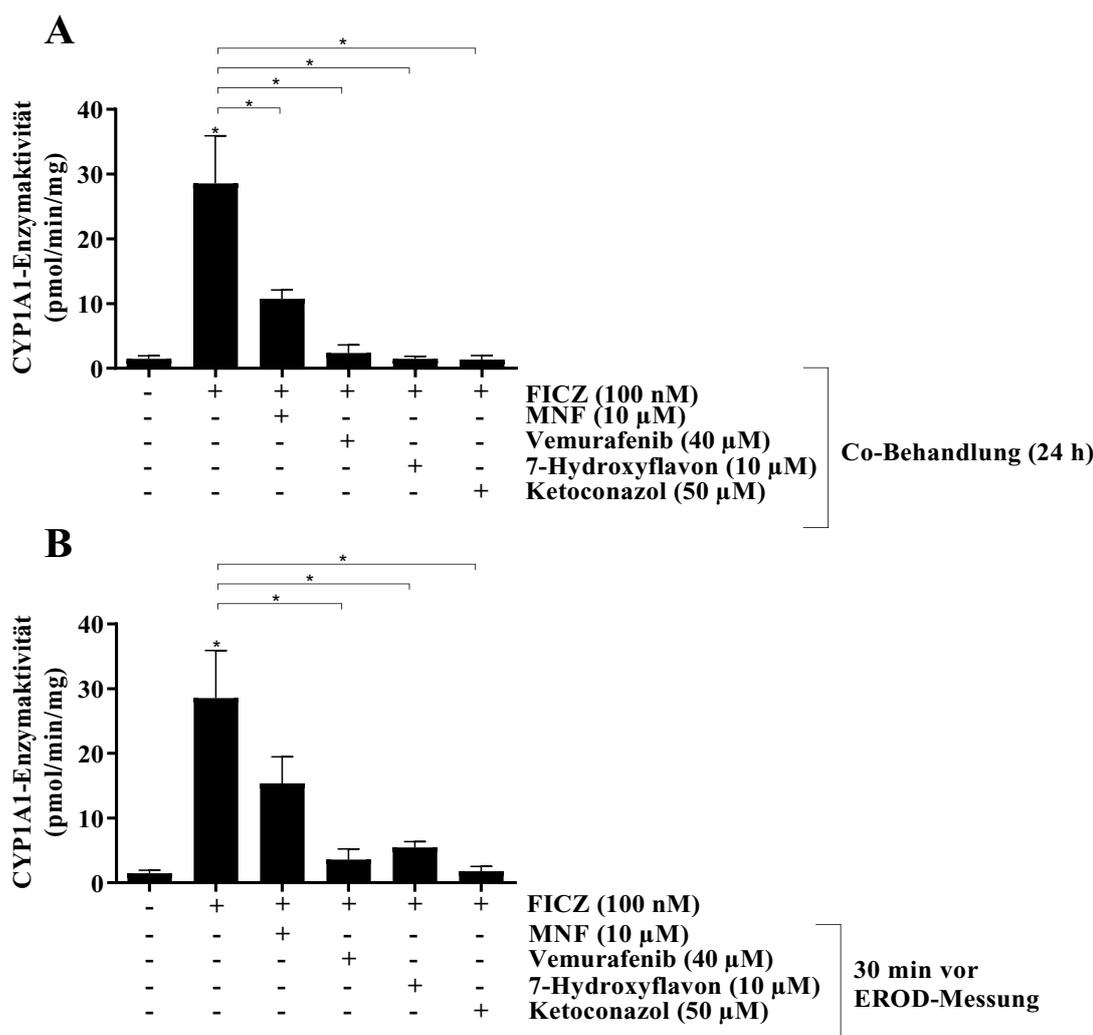


Abbildung 23: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen die Enzymaktivität von CYP1A1 in NHEK.

A. NHEK wurden für 24 h mit 100 nM FICZ alleine oder in Kombination mit 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol belastet. Nach 24 h wurde der Umsatz in pmol/min/mg Protein von 7-Ethoxyresorufin zum Resorufin mit dem EROD-Assay bestimmt. **B.** NHEK wurden für 24 h mit 100 nM FICZ belastet und 30 min vor der EROD-Messung wurden 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol hinzugegeben. Anschließend wurde die Enzymaktivität von CYP1A1 mit dem EROD-Assay in pmol/min/mg Protein gemessen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA angewendet. $n = 3$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$).

Eine 24-stündige Belastung der Zellen mit FICZ (100 nM) führte zu einem signifikant gesteigerten Substratumsatz von ca. 30 pmol/min/mg Protein, welcher durch eine kombinierte Behandlung mit 10 µM MNF signifikant um ca. 65 % reduziert wurde (Abb. 23A). Eine Behandlung mit Vemurafenib, 7-HF und Ketoconazol inhibierte die FICZ-induzierte CYP1A1-Enzymaktivität signifikant um ca. 90 % (Abb. 23A).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der 30-minütigen Zugabe der verschiedenen Substanzen vor dem EROD-Assay gewonnen (Abb. 23B). Vemurafenib, 7-HF und Ketoconazol

inhibierten signifikant die FICZ-induzierte CYP1A1-Enzymaktivität, wohingegen eine Behandlung der Zellen mit MNF die Enzymaktivität nur um 50 % hemmte.

3.3.2. Vemurafenib und Ketoconazol hemmen den metabolischen Abbau von FICZ

Nachfolgend wurde überprüft, ob MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol den metabolischen Abbau von FICZ hemmen. Dafür wurden HaCaT-Zellen für 4 h mit den entsprechenden Inhibitoren vorbehandelt. Im Anschluss wurden 100 nM FICZ für 1 h, 2 h und 4 h hinzugegeben, anschließend das Medium abgenommen, mit Acetonitril versetzt und mittels HPLC wurde die FICZ-Konzentration im Medium bestimmt. Die HPLC-Analyse wurde erneut durch Julien Dairou an der Universität von Paris durchgeführt.

Wie in Abbildung 24 zu sehen resultierte eine Vorbehandlung mit DMSO (0,1 %) und eine Zugabe von 100 nM FICZ für 1 h, 2 h und 4 h in einem zeitabhängigen Abfall der FICZ-Konzentration um ca. 75 %. Eine vierstündige Vorbehandlung mit 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib oder 50 µM Ketoconazol führte zu einer deutlich verminderten Abnahme der FICZ-Konzentration über die Zeit. Widererwartend hatte eine Vorbehandlung der Zellen mit dem CYP1A-Inhibitor 7-HF einen deutlich schwächeren Effekt auf den zeitabhängigen Metabolismus von CYP1A1. Nach einer Behandlungszeit von 4 h sank die FICZ-Konzentration um ca. 50 %. Die getesteten Substanzen scheinen somit den metabolischen Abbau von FICZ zu inhibieren. In einem weiteren Versuch sollte daher getestet werden, ob eine Behandlung der Zellen mit MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol zu einer gesteigerten durch FICZ und UVA-Strahlung induzierten Phototoxizität führt.

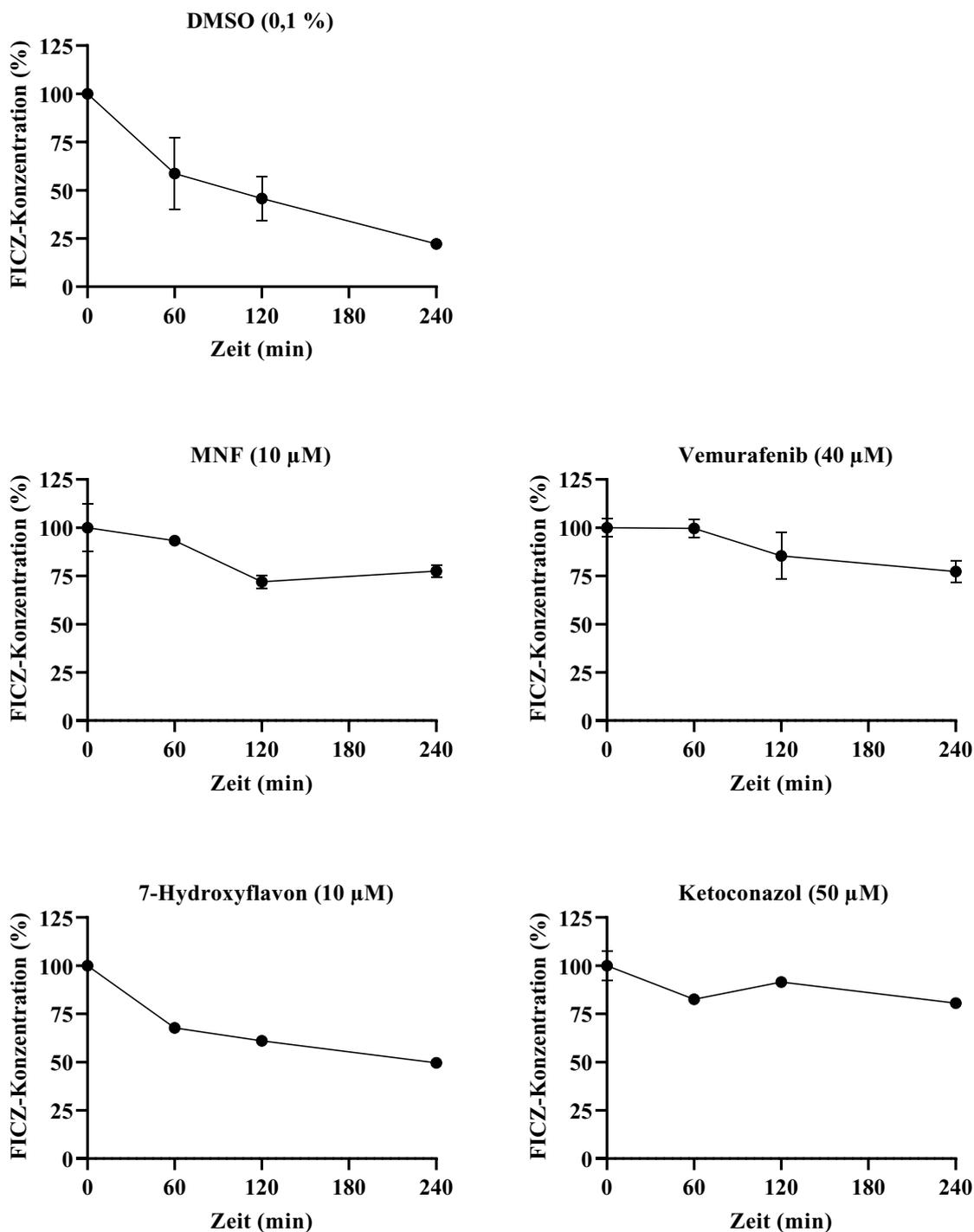


Abbildung 24: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol hemmen den metabolischen Abbau von FICZ.

HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit 0,1 % DMSO, 10 µM MNF, 40 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol vorbelastet. Anschließend wurden jeweils 100 nM FICZ für 1 h, 2 h und 4 h hinzugegeben und nachfolgend das Medium abgenommen, mit Acetonitril versetzt und mittels HPLC wurde die FICZ-Konzentration im Medium bestimmt. n = 2. Mittelwert ± SEM.

3.3.3. Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose

Zur Bestimmung der Apoptose wurde die Aktivität der Caspase-3 und -9 bestimmt. Die HaCaT-Keratinocyten wurden dafür 4 h mit 10 μM MNF, 40 μM Vemurafenib, 10 μM 7-HF, 50 μM Ketoconazol und 0,1 % DMSO vorbelastet. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 h mit 100 nM FICZ behandelt und nachfolgend mit 5 J/cm^2 UVA bestrahlt. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen zwecks Messung der Caspase-3 und Caspase-9 Aktivität geerntet.

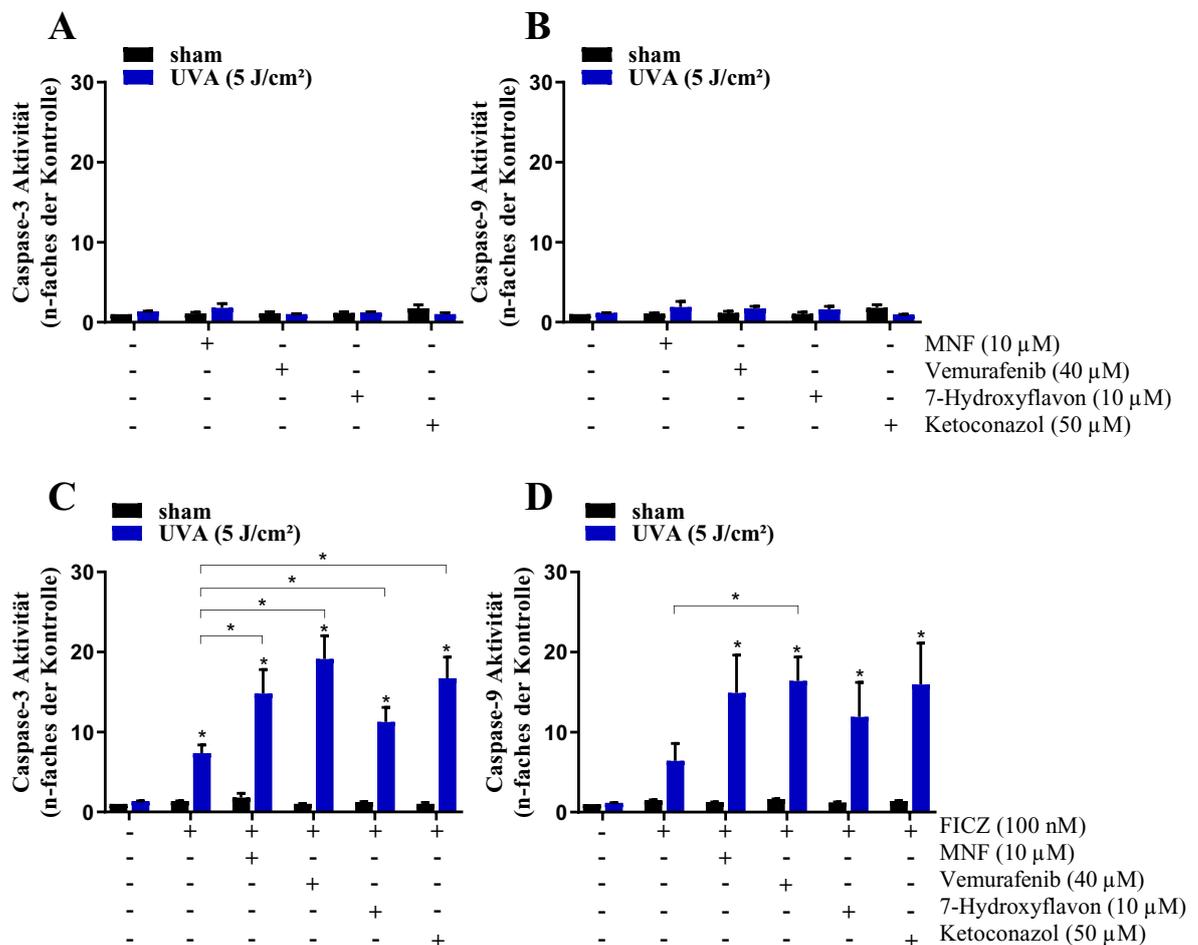


Abbildung 25 MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in HaCaT-Zellen.

A-B. HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit 10 μM MNF, 40 μM Vemurafenib, 10 μM 7-HF oder 50 μM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 2 h 0,1 % DMSO zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS mit 0 und 5 J/cm^2 UVA bestrahlt wurden. Nach 4 h wurde die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt. **C-D.** HaCaT-Zellen wurden für 4 h mit 10 μM MNF, 40 μM Vemurafenib, 10 μM 7-HF oder 50 μM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 2 h 100 nM FICZ zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS mit 0 und 5 J/cm^2 UVA bestrahlt wurden. Nach 4 h wurde die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt. **A+C.** $n = 6$. **B+D.** $n = 3$. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf DMSO *sham*).

Weder die alleinige Behandlung der Zellen mit MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol noch deren alleinige Exposition gegenüber UVA-Strahlung beeinflusste die Apoptoserate (Abb. 25.A, B). Diesen Befunden zufolge, lösen die getesteten Substanzen unter den gewählten Testbedingungen keine pro-apoptotischen bzw. phototoxischen Effekte aus. Der AHR-Antagonist MNF, der BRAF-Inhibitor Vemurafenib sowie das Antimykotikum Ketoconazol steigerten jedoch die durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 Aktivität um etwa das Zweifache, wohingegen eine Vorbehandlung mit dem CYP1A1-Inhibitor 7-HF die Caspase-3 Aktivität um ein Drittel steigerte (Abb. 25.C). Eine vierstündige Vorbelastung mit 40 μM Vemurafenib steigerte signifikant die durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-9 Aktivität (Abb. 25.D). Eine Vorbehandlung der Zellen mit MNF, 7-HF oder Ketoconazol resultierte ebenfalls in einer Steigerung der durch FICZ/UVA-induzierten Caspase-9 Aktivität um 50 %. In Abbildung 26 sind die Ergebnisse einer Wiederholung dieses Experiments in primären Keratinozyten dargestellt.

Die NHEK wurden für 4 h mit den Inhibitoren (10 μM MNF, 25 μM Vemurafenib, 10 μM 7-HF, 50 μM Ketoconazol) vorbelastet. Anschließend wurden 100 nM FICZ für 2 h hinzugegeben, die Zellen mit 5 J/cm^2 UVA bestrahlt und nach weiteren 4 h wurde die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt. Eine alleinige Behandlung mit den Inhibitoren führte zu keiner Induktion der Apoptose. Eine Bestrahlung der NHEK, welche nur mit den Inhibitoren exponiert wurden, resultierte ebenfalls in keiner Erhöhung der Caspase-Aktivitäten (Abb. 26.A, B). Eine Exposition der Keratinozyten mit FICZ und UVA-Strahlung führte zu einer fast 25-fachen Induktion der Caspase-3 Aktivität (Abb. 26.C) und einer etwa 15-fachen Induktion der Caspase-9 Aktivität (Abb. 26.D). Eine Vorbehandlung mit den verschiedenen Inhibitoren und eine anschließende Exposition mit FICZ und UVA-Strahlung führte lediglich in den mit MNF vorbehandelten NHEK zu einer signifikant gesteigerten Caspase-3 Aktivität (Abb. 26.C). Wie in Abbildung 26.D dargestellt, konnte nach Vorbehandlung mit MNF ein ähnlicher Trend hinsichtlich der Aktivität der Caspase-9 beobachtet werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen resultierte eine Vorbehandlung mit 7-HF und Ketoconazol und eine anschließende Exposition mit FICZ und UVA-Strahlung in einer signifikant gesteigerten Caspase-3 Aktivität (Abb. 26.C) und steigerte die Caspase-9 Aktivität (Abb. 26.D). Eine Exposition der NHEK mit 25 μM Vemurafenib, 100 nM FICZ und 5 J/cm^2 UVA-Strahlung stimulierte die Caspase-3 und Caspase-9 Aktivität (Abb. 26.C, D).

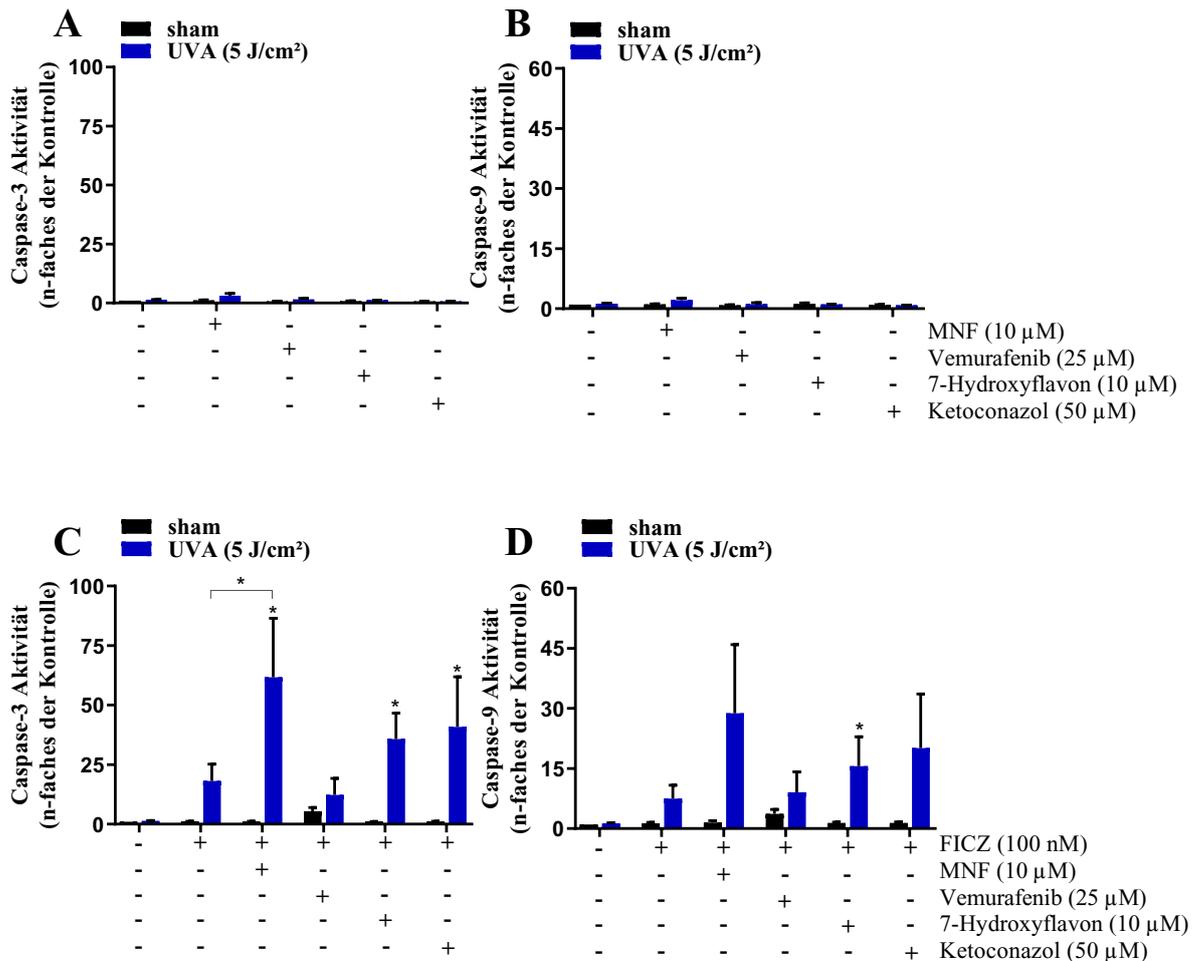


Abbildung 26: MNF, 7-HF und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA- induzierte Apoptose in NHEK.

A-B. NHEK wurden für 4 h mit 10 µM MNF, 25 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 2 h 0,1 % DMSO zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS bestrahlt oder *sham* behandelt wurden. Nach 4 h wurde die Caspase-3 und Caspase-9 Aktivität bestimmt. **C-D.** NHEK wurden für 4 h mit 10 µM MNF, 25 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 2 h 100 nM FICZ zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS bestrahlt oder *sham* behandelt wurden. Nach 4 h wurde die Caspase-3 und -9 Aktivität bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf DMSO sham).

Eine Vorbehandlung der NHEK, mit den verschiedenen Inhibitoren hatte weniger starke Effekte auf die FICZ/UVA-induzierte Apoptose, verglichen mit den HaCaT-Zellen. Dies könnte, wie bereits erwähnt, auf eine möglicherweise verringerte metabolische Kapazität der NHEK zurückzuführen sein. Um dies zu verifizieren, wurden nachfolgend NHEK für 4 h mit den Inhibitoren belastet, dann für weitere 4 h mit 100 nM FICZ behandelt und anschließend mit 0 und 5 J/cm² UVA bestrahlt (Abb. 27).

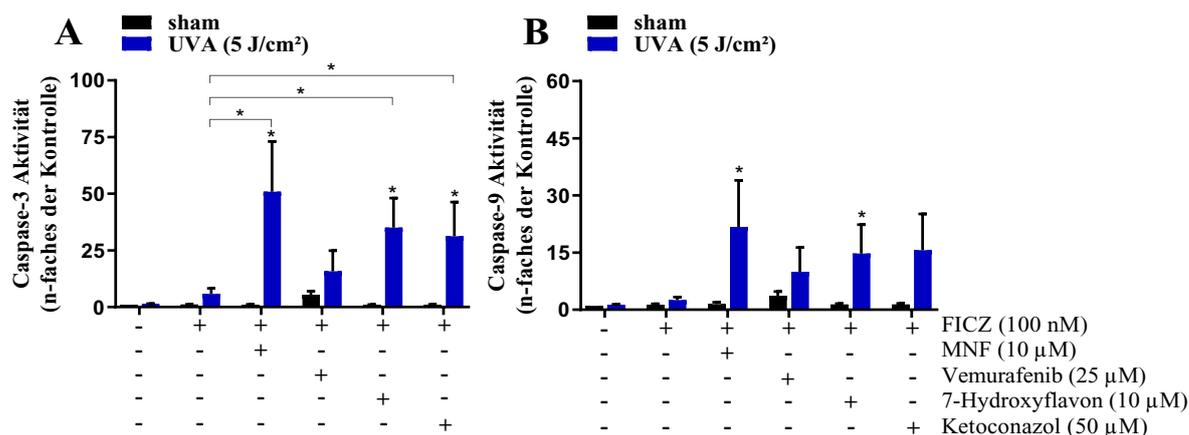


Abbildung 27: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NHEK nach einer vierstündigen Inkubation mit FICZ/DMSO.

A-B. NHEK wurden für 4 h mit 10 µM MNF, 25 µM Vemurafenib, 10 µM 7-HF oder 50 µM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 4 h 0,1 % DMSO (**A**) oder 100 nM FICZ (**B**) zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS bestrahlt wurden oder *sham* behandelt wurden. Nach 4 h wurde die Caspase-3 und Caspase-9 Aktivität bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$ bezogen auf DMSO *sham*).

Die Abbildung 27 zeigt, dass eine Vorbehandlung mit den Substanzen MNF, 7-HF und Ketoconazol die FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 Aktivität signifikant erhöhte. Die Vorbehandlung mit Vemurafenib steigerte die FICZ/UVA-induzierten Aktivitäten von Caspase-3 und Caspase-9 um das Zweifache (Abb. 27.A, B). Eine Vorbehandlung mit MNF und 7-HF und eine anschließende Exposition mit FICZ und UVA-Strahlung steigerte signifikant die Caspase-9 Aktivität (Abb. 27.B). Eine vierstündige Belastung mit FICZ und eine nachfolgende UVA-Bestrahlung steigerten die Caspase-3 Aktivität um das 5-fache (Abb. 27.A) und die Caspase-9 Aktivität um das Dreifache (Abb. 27.B).

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit FICZ und UVA-Strahlung in *AHR-knockdown* Keratinozyten zu einer gesteigerten HOX-1 Genexpression führte. Aus diesem Grund sollte in einem nächsten Experiment nun die Induktion der HOX-1 in NHEK überprüft werden, nachdem diese mit den verschiedenen Inhibitoren vorbelastet und mit FICZ und UVA-Strahlung exponiert wurden.

3.3.4. AHR und CYP1A1-Inhibitoren steigern die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Genexpression der HOX-1

Eine vierstündige Behandlung der NHEK mit den Inhibitoren MNF (10 µM), 7-HF (10 µM), Vemurafenib (25 µM) und Ketoconazol (50 µM) führte unabhängig von der UVA-Bestrahlung zu keiner Modulation der HOX-1 Genexpression (Abb. 28).

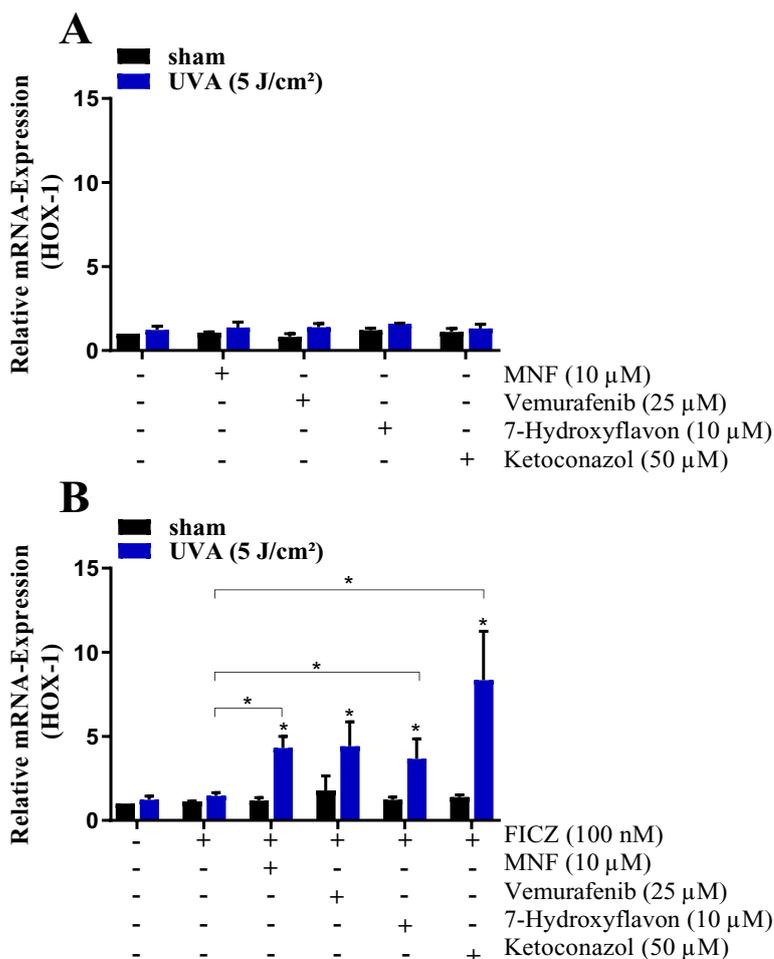


Abbildung 28: MNF, 7-HF, Vemurafenib und Ketoconazol stimulieren die durch FICZ/UVA-induzierte Genexpression der HOX-1 in NHEK.

A-B: NHEK wurden für 4 h mit 10 μM MNF, 25 μM Vemurafenib, 10 μM 7-HF oder 50 μM Ketoconazol belastet. Anschließend wurde für 4 h 0,1 % DMSO (A) oder 100 nM FICZ (B) zu den Zellen gegeben, bevor diese in PBS bestrahlt wurden oder *sham* behandelt wurden. Nach 6 h wurde die mRNA-Menge von HOX-1 mittels qRT-PCR bestimmt und auf die GAPDH Transkriptmenge normiert. Für die statistische Auswertung wurde eine zweifaktorielle ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05 bezogen auf DMSO *sham*).

Die Belastung der Zellen für 4 h mit 100 nM FICZ und eine anschließende UVA-Bestrahlung (5 J/cm²) resultierte ebenfalls in keiner Induktion der HOX-1 (Abb. 28B). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass es zu einem Abbau von FICZ kam. Die vierstündige Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren und eine Exposition der Zellen für 4 h mit FICZ und anschließender UVA-Bestrahlung hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg der Genexpression der HOX-1. Darüber hinaus steigerten MNF, 7-HF, und Ketoconazol die FICZ/UVA-induzierte Expression von HOX-1 um das ca. Fünffache. Im Trend war dieser Effekt auch nach Behandlung mit dem BRAF-inhibitor Vemurafenib zu verzeichnen (Abb. 28.B).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Vemurafenib, Ketoconazol, MNF und 7-HF die Enzymaktivität von CYP1A1 inhibierten und somit den metabolischen Abbau von FICZ hemmten. Gesteigerte FICZ-Level in Antwort auf eine UVA-Exposition führten somit zu einer gesteigerten Caspase-3 -und -9 Aktivität. Des Weiteren stimulierte eine Vorbehandlung mit diesen Substanzen die durch FICZ/UVA-induzierte Genexpression der HOX-1. Es wäre daher möglich, dass die in der Literatur beschriebenen photosensibilisierenden Eigenschaften einer Vemurafenib- bzw. Ketoconazol-Behandlung, auf eine Akkumulierung von FICZ oder anderen endogenen, UVA-phototoxischen Molekülen zurückzuführen sein könnten, die durch eine Hemmung der Enzymaktivität von CYP1A1 initiiert werden.

3.4. Eine simultane Bestrahlung mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkung einer simultanen Bestrahlung mit UVA auf die UVB-induzierten Schäden untersucht werden. Ein Großteil der Studien, die sich mit der kutanen Antwort auf UV-Strahlung beschäftigen, wurden mit UVB- oder UVA-emittierenden Strahlungsquellen sowie sequentiellen UVA/UVB und UVB/UVA Bestrahlungen durchgeführt. Das daraus resultierende Bild ist vermutlich unvollständig oder gar falsch. Interessanterweise zeigte eine simultane Exposition mit UVA- und UVB-Strahlung in einem initialen Experiment (Abb. 15), dass eine gleichzeitige UVA-Bestrahlung die UVB-induzierte Apoptose hemmte.

Überschreitet das Ausmaß der UVB-induzierten DNA-Schäden die Kapazität der DNA-Reparatursysteme, leitet die geschädigte Zelle die Apoptose ein, um mögliche Mutagenese-Ereignisse zu verhindern. Diese apoptotischen Zellen werden auch als sogenannte *sunburn cells* bezeichnet. Insbesondere UVB-Strahlung führt zu einer Vielzahl von mutagenen und zytotoxischen DNA-Läsionen, wie CPD, 6-4 Photoprodukte (6-4PP) und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). Zellen haben ein Arsenal hochkonservierter Reparaturmechanismen entwickelt, um diese DNA-Läsionen zu entfernen. Es wäre daher möglich, dass eine simultane Bestrahlung mit UVA und UVB zu einer verbesserten DNA-Reparatur führt und dementsprechend weniger Zellen apoptotisch werden. Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten überprüft, welchen Einfluss eine simultane UVA- und UVB-Bestrahlung auf die Apoptose sowie die Anzahl CPD-positiver und DSB-positiver Zellen hat. Für eine Bestrahlung möglichst nahe der physiologischen

Situation wurden die Keratinozyten nachfolgend mit einer UVB:UVA Ratio von 1:70 exponiert (Kollias *et al.*, 2011).

3.4.1. Eine simultane Exposition mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-Aktivität in Keratinozyten

Der Befund, dass eine gleichzeitige Bestrahlung mit UVA die UVB-induzierte Apoptose hemmt, sollte zunächst in NHEK bestätigt werden. Die NHEK wurden daher einzeln sowie simultan mit 0,7 J/cm² UVA und 100 J/m² UVB bestrahlt (Abb. 29). Nach 4 h wurde die Caspase-3 Aktivität gemessen.

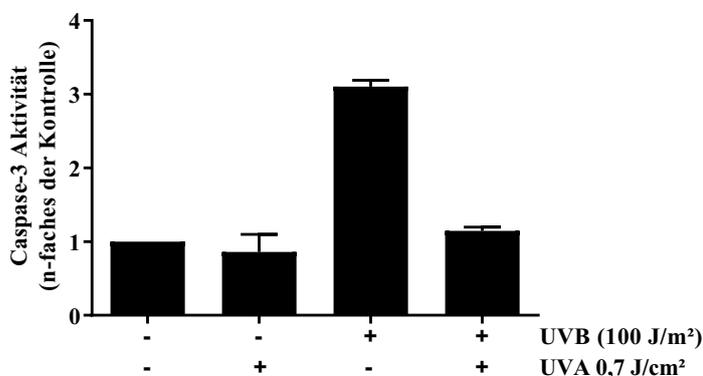


Abbildung 29: Eine simultane Exposition mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-3 Aktivität in NHEK.

NHEK wurden einzeln sowie simultan mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt. Die Kontrollzellen wurden nicht bestrahlt. Nach 4 h wurden die Zellen zwecks Caspase-3 Aktivitätsbestimmung geerntet. n = 2. Mittelwert ± SEM.

In der Tat konnten die initial in HaCaT-Keratinozyten erhobenen Befunde in NHEK bestätigt werden. Eine simultane Bestrahlung reduzierte die UVB-induzierte Caspase-3 Aktivität. Eine Bestrahlung mit UVA alleine resultierte in keiner Steigerung der Caspase-3 Aktivität. In weiteren Versuchen wurden die HaCaT-Zellen einzeln sowie simultan mit 0,7 J/cm² UVA und 100 J/m² UVB bestrahlt. Nach 24 h wurden die Aktivitäten der Caspase-3, -8 und -9, die Anzahl apoptotischer und γ -H2AX-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie sowie γ -H2AX-positiver Zellen mittels Western Blot quantifiziert. Der Nachweis des reparaturassoziierten Histon γ H2AX stellt dabei einen etablierten Marker für DSB dar. Rogakou *et al.* konnten 1998 erstmals zeigen, dass es spezifisch in Antwort auf einen DSB zur Phosphorylierung des Histon 2AX (H2AX) zu γ H2AX am Serin-Rest, Ser139 kam (Rogakou *et al.*, 1998).

Die Abbildung 30.A zeigt, dass UVB-Strahlung (100 J/m^2) die Caspase-3 Aktivität signifikant erhöhte, UVA-Strahlung ($0,7 \text{ J/cm}^2$) alleine keinen Einfluss auf die Caspase-3 Aktivität hatte und eine simultane Bestrahlung mit UVA ($0,7 \text{ J/cm}^2$) und UVB (100 J/m^2) die UVB-induzierte Caspase-3 Aktivität verringerte. Die Ergebnisse der Caspase-8 (Abb. 30.C) und -9 (Abb. 30.B) Aktivitätsmessungen bestätigen diese Befunde im Trend.

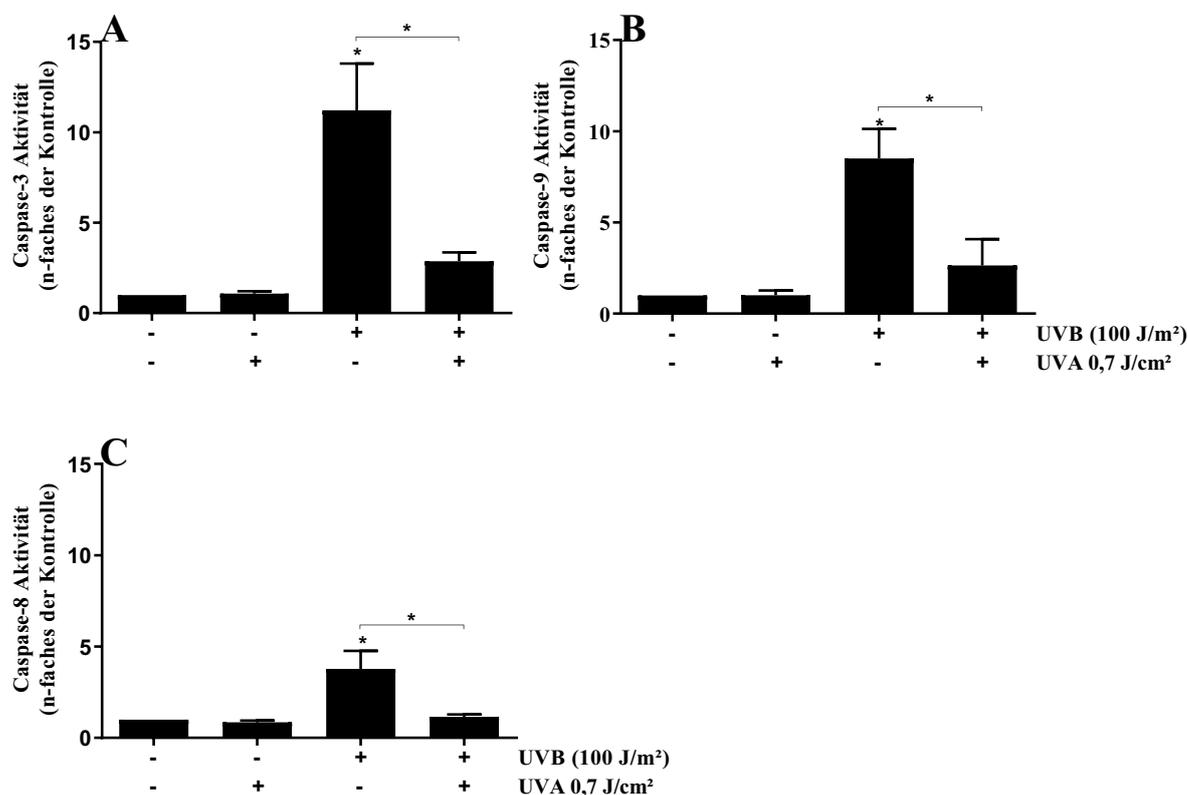


Abbildung 30: Eine simultane Exposition mit UVA- hemmt die durch UVB-Strahlung induzierte Caspase-3, -8 und -9 Aktivität in HaCaT-Keratinocyten.

HaCaT-Zellen wurden einzeln sowie simultan mit 100 J/m^2 UVB und $0,7 \text{ J/cm}^2$ UVA bestrahlt. Die Kontrollzellen wurden nicht bestrahlt. Nach 24 h wurde die Caspase-3 (A), -8 (C) und -9 (B) Aktivität bestimmt. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA angewendet. $n = 4$. Mittelwert \pm SEM, (*, $p < 0,05$).

Der extrinsische und intrinsische Signalweg der Apoptose führen zu einer Aktivierung der Caspase-3. Da die Aktivität der Caspase-8 nur marginal beeinflusst war, scheint daher der Caspase-9-vermittelte intrinsische Weg der Apoptose eine Rolle zu spielen.

3.4.2. Die Anzahl der durch UVB-Strahlung induzierten apoptotischen und γH2AX -positiven Zellen wird bei gleichzeitiger UVA-Bestrahlung reduziert

DSB sind die schädlichsten DNA-Läsionen, die, wenn sie nicht repariert werden, schwerwiegende Folgen für das Überleben der Zelle haben können. Sie entstehen unter

anderem, wenn UVB-induzierte CPD nicht repariert werden und CPD-positive Zellen in die Mitose übergehen. Im Zuge der Replikation des genetischen Materials kommt es zu einem Block der Replikationsgabel. Um diese aufzulösen werden Nukleasen aktiv, die den DNA-Strang zerschneiden, woraus dann die DSB resultieren. In Antwort auf einen DSB werden schadensabhängige Signalwege eingeleitet, die die Phosphorylierung von H2AX durch mehrere Phosphoinositid-3-Kinase-verwandter Proteinkinasen, wie ATM (Ataxie-Teleangiektasie mutiert), ATR (ATM und Rad3-verwandt) oder DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) induzieren (Batista *et al.*, 2009; Podhorecka *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung des H2AX zu γ H2AX kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Im Folgenden wurden daher FACS und Western Blot-Analysen mit einem spezifischen Antikörper für γ H2AX durchgeführt. Die HaCaT-Zellen wurden hierfür einzeln und simultan mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt. Zusätzlich wurde überprüft, welchen Einfluss eine sequentielle Bestrahlung hat. Die HaCaT-Zellen wurden hierfür zunächst mit 0,7 J/cm² UVA und anschließend mit 100 J/m² UVB bestrahlt oder *vice versa*. Nach 24 h wurden die Zellen trypsiniert und mit dem Nicoletti-Puffer permeabilisiert. Dem Nicoletti-Puffer wurde zusätzlich ein Antikörper für das phosphorylierte Histon γ H2AX zugesetzt. Dieser Antikörper war mit dem Fluorophor Allophycocyanin (APC) gekoppelt. Neben einer Zellzyklus-Analyse konnten daher zusätzlich DSB quantifiziert werden. In Abbildung 31.A ist der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der subG₁ Phase befanden, dargestellt. Eine Bestrahlung mit 100 J/m² UVB führte zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen auf ca. 30%. Die sequentiellen Bestrahlungen mit UVA/UVB und UVB/UVA resultierten ebenfalls in einem Anstieg der apoptotischen Zellen in gleichem Ausmaß. Nach *sham*- und UVA-Bestrahlung befanden sich ca. 5 % der Zellen in der subG₁-Phase. Eine simultane UVA-/UVB-Bestrahlung resultierte, verglichen mit den UVB- bzw. sequentiell exponierten Proben, in einer signifikant verringerten Anzahl apoptotischer Zellen.

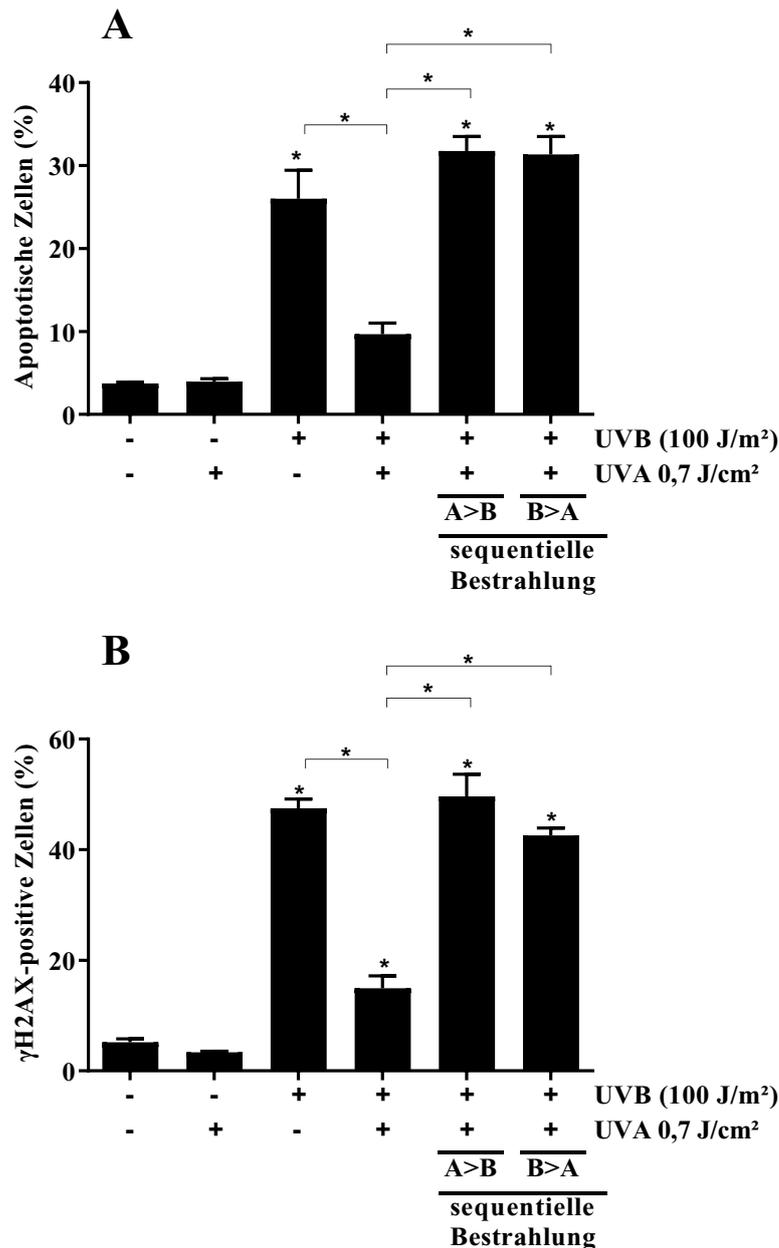


Abbildung 31: Die gleichzeitige Bestrahlung mit UVA reduziert die Anzahl der durch UVB-Strahlung induzierten apoptotischen und γ H2AX-positiven HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden einzeln, simultan und sequentiell mit 0,7 J/cm² UVA und 100 J/m² UVB bestrahlt. Nach 24 h wurden die Zellen trypsiniert, mit dem Nicoletti-Puffer permeabilisiert und mit einem APC-gekoppelten γ H2AX-Antikörper gefärbt. **A.** Zeigt die quantitative Auswertung der HaCaT-Zellen, welche sich in der subG₁-Phase der Zellzyklus-Analyse befanden. **B.** Zeigt die quantitative Auswertung der γ H2AX-positiven Zellen. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert \pm SEM, (*, p < 0,05).

In Abbildung 31.B ist der prozentuale Anteil γ H2AX-positiver Zellen dargestellt. Eine Exposition mit 100 J/m² UVB-Strahlung zeigte einen signifikanten Anstieg der γ H2AX-positiven Zellen um ca. 45 % des Kontrollwertes. Eine Bestrahlung mit 0,7 J/cm² UVA hatte keinen Einfluss auf die Zahl γ H2AX-positiver Zellen. Die sequentiellen Expositionen mit UVA/UVB bzw. UVB/UVA resultierten ebenfalls in einem signifikanten Anstieg der γ H2AX-positiven Zellen um fast 50 %. Der Vergleich der UVB-

bestrahlten mit den simultan bestrahlten HaCaT-Zellen zeigte, dass eine simultane Exposition die Zahl γ H2AX-positiver Zellen auf ca. 20 % verringerte. Zur Verifizierung der durchflusszytometrischen Analysen wurde zusätzlich die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen mit Hilfe des Western Blots analysiert. HaCaT-Zellen wurden einzeln, simultan und sequentiell mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt (Abb. 32).

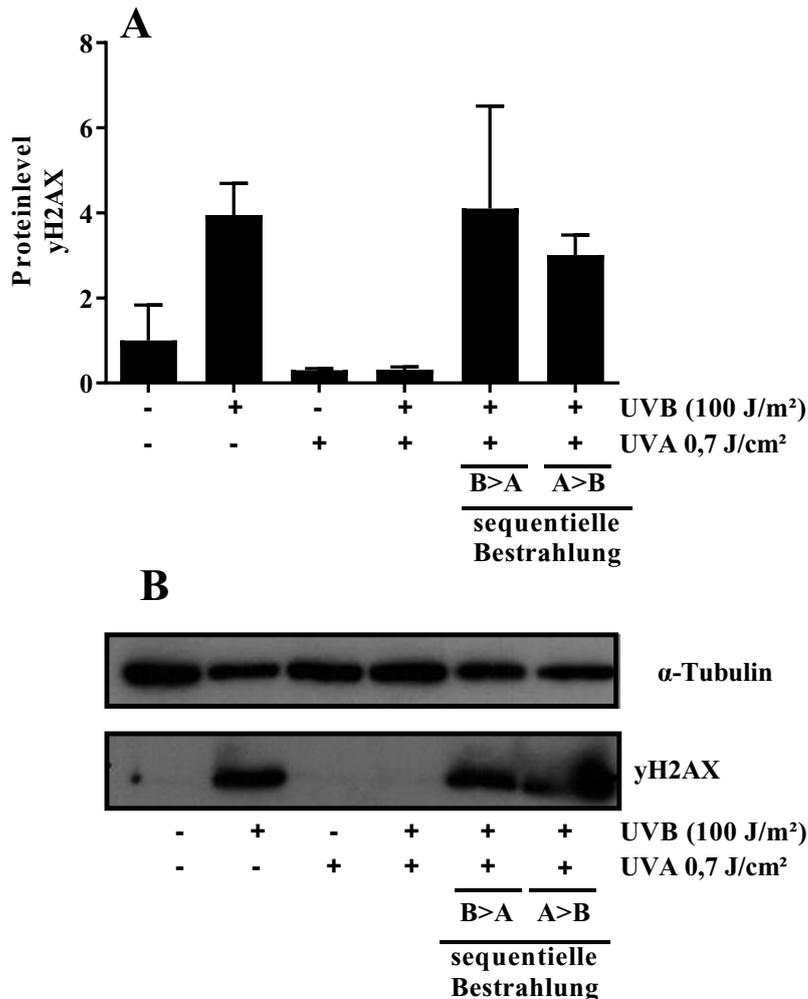


Abbildung 32: Eine simultane UVA-Bestrahlung reduziert die Zahl der durch UVB-Strahlung induzierten γ H2AX-positiven HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden einzeln, simultan sowie sequentiell mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 24 h erfolgte die Detektion von γ H2AX und α -Tubulin mittels SDS-PAGE/Western Blot-Analysen. **A.** Quantitative Auswertung des Proteingehalts von γ H2AX normiert auf α -Tubulin. n = 2. Mittelwert \pm SEM. **B.** Repräsentativer Western Blot für die Proteine γ H2AX und α -Tubulin.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zeigten ähnliche Resultate wie die zuvor durchgeführten FACS-Analysen mit dem APC-gekoppelten γ H2AX-Antikörper. Die unbestrahlten und mit UVA-Strahlung exponierten HaCaT-Keratinocyten zeigten keine vermehrte Phosphorylierung für das H2AX-Protein. Eine Bestrahlung mit UVB alleine sowie die sequentiellen Bestrahlungen verstärkten die Phosphorylierung von H2AX. Im

Vergleich zu einer UVB-Bestrahlung führte eine simultane Bestrahlung zu einer verringerten Phosphorylierung von H2AX und reflektierte die zuvor erhobenen Befunde.

3.4.3. Die durch UVB-Strahlung induzierten CPD werden durch simultane UVA-Bestrahlung reduziert

Im Anschluss sollte gezeigt werden, welchen Einfluss eine simultane UVA-/UVB-Bestrahlung im Vergleich zur UVB-Bestrahlung auf den CPD-Gehalt der Keratinozyten hat (Abb. 33).

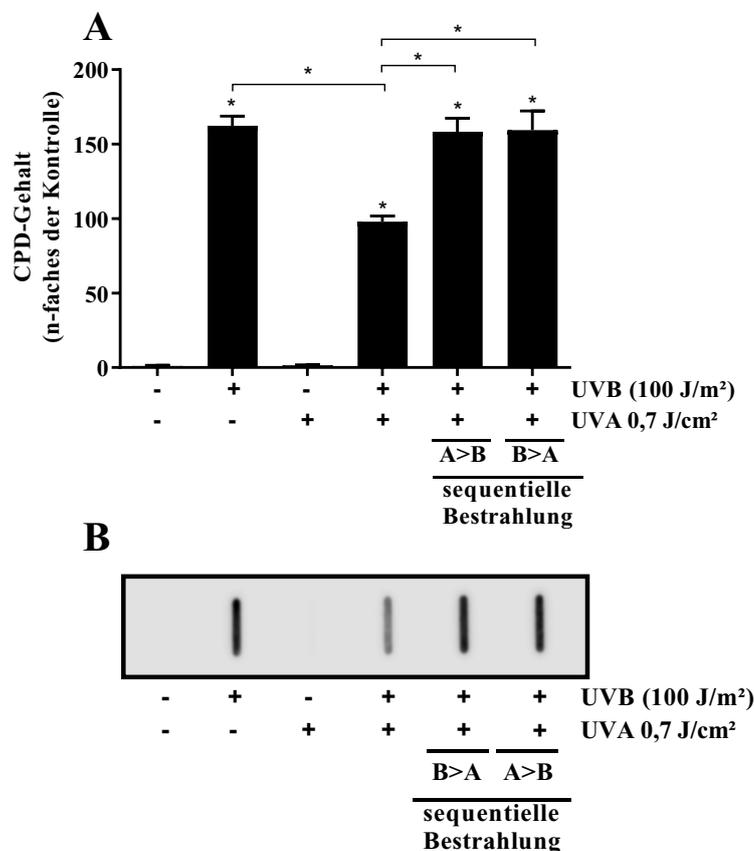


Abbildung 33: Die durch UVB-Strahlung induzierten CPD werden durch simultane UVA-Bestrahlung reduziert.

HaCaT-Zellen wurden einzeln, simultan und sequentiell mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 6 h wurde der CPD-Gehalt mittels Southwestern Slot-Blot Methode bestimmt. **A.** Quantitative Auswertung des CPD-Gehalts pro 250 ng aufgetragener DNA. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA angewendet. n = 3. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05). **B.** Southwestern Slot-Blot für die Menge an gebildeten CPD.

Eine Exposition mit UVB-Strahlung führt zu photochemischen Reaktionen zwischen zwei Pyrimidinbasen, bei denen es zur Entstehung von CPD kommt. HaCaT-Zellen wurden daher einzeln, simultan und sequentiell mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt. Nach 6 h

wurden die Zellen geerntet, die DNA isoliert und der CPD-Gehalt mittels Southwestern Slot-Blot Methode analysiert (Abb. 33) Wie erwartet, konnten weder in den unbestrahlten noch den UVA-exponierten Kontrollzellen nennenswerte CPD-Gehalte nachgewiesen werden. Eine Exposition mit UVB-Strahlung sowie die sequentiellen Bestrahlungen resultierten jedoch in einem deutlichen Anstieg um mehr als das 150-fache. Im Vergleich dazu, verursachte die simultane UVA-/UVB-Bestrahlung etwa 50% weniger CPD (Abb. 33).

Dies wirft die Frage auf, inwiefern UVA-Strahlung Einfluss auf die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden hat. Einer der wohl bekanntesten Transkriptionsfaktoren, welcher durch UVA-Strahlung aktiviert wird, ist NRF2. Möglicherweise gibt es daher eine Korrelation zwischen einer Aktivierung des NRF2-Signalwegs und einer verbesserten DNA-Reparatur. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss von UVA-Strahlung auf die Expression des NRF2-Zielgens HOX-1 untersucht.

3.4.4. UVB-Strahlung hemmt die Expression der HOX-1

Die HaCaT-Keratinocyten wurden einzeln, simultan sowie sequentiell mit 0,7 J/cm² UVA und 100 J/m² UVB bestrahlt. Nach 6 h wurde die Kopienzahl der HOX-1 mittels qRT-PCR, nach 24 h das HOX-1 Proteinlevel mittels SDS-PAGE/Western Blot-Analyse untersucht. Wie in Abbildung 34 ersichtlich, resultierte sowohl die UVB-Bestrahlung als auch die sequentiellen Bestrahlungen der Keratinocyten in einer verminderten Expression der HOX-1. Eine UVA-Bestrahlung sowie eine simultane Bestrahlung mit UVA und UVB hingegen führten zu einer Induktion der HOX-1. Darüber hinaus steigerte eine simultane Bestrahlung mit UVA und UVB signifikant die durch UVB-Strahlung induzierte Hemmung der Genexpression von HOX-1 (Abb. 34.A). Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse (Abb. 34.B) bestätigten diese Befunde im Trend.

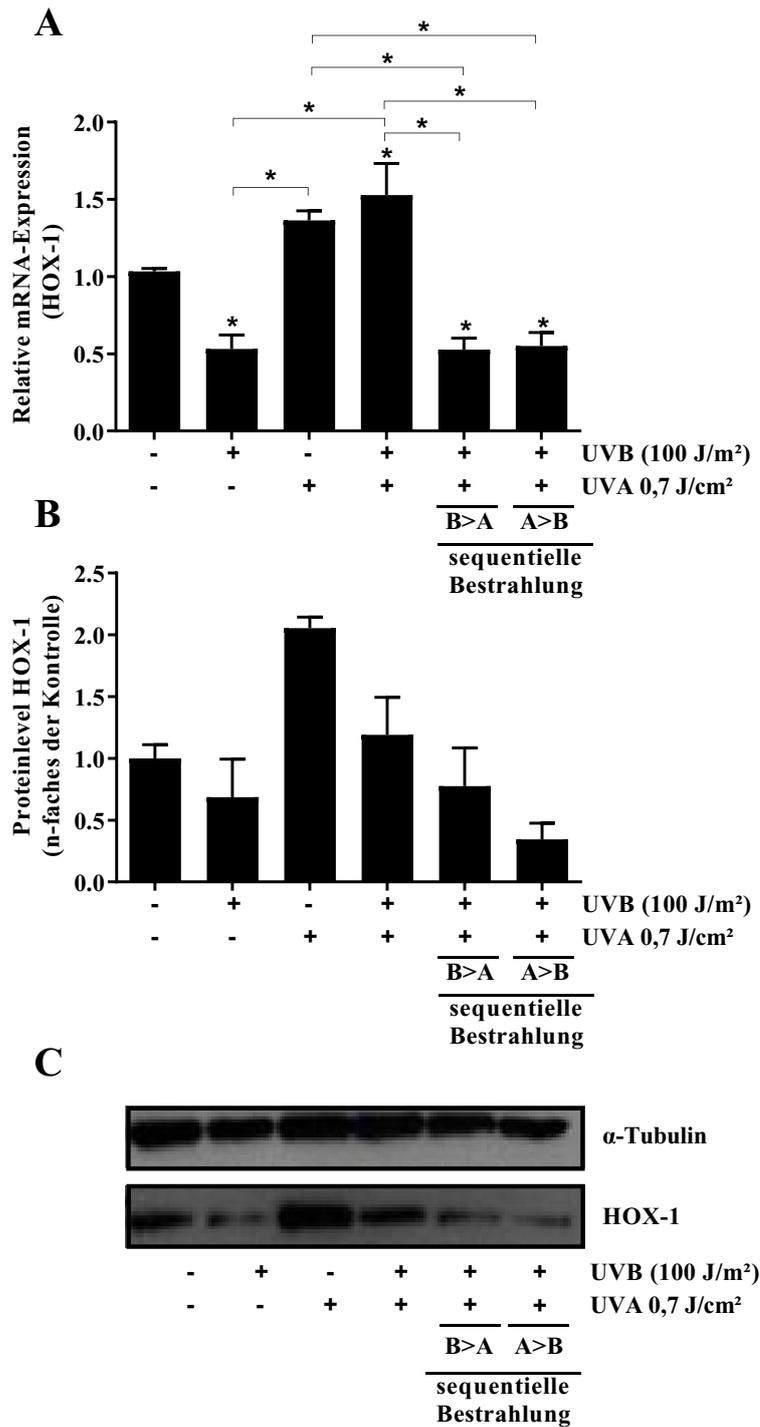


Abbildung 34: Eine Bestrahlung von HaCaT-Keratinocyten mit UVB resultiert in einem verminderten mRNA- und Proteinlevel von HOX-1.

A-C: HaCaT-Zellen wurden einzeln, simultan sowie sequentiell mit 100 J/m² UVB und 0,7 J/cm² UVA bestrahlt **A:** Nach 6 h wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Im Anschluss wurde die HOX-1 Kopienzahl mittels qRT-PCR bestimmt und auf die GAPDH Transkriptmenge normiert. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorische ANOVA angewendet. n = 4. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05). **B:** Nach 24 h wurde das Proteinlevel von HOX-1 und α-Tubulin mittels SDS-PAGE/Western Blot-Analyse bestimmt. Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung des HOX-1 Proteinlevels normiert auf α-Tubulin. n = 2. Mittelwert ± SEM. **C.** Repräsentativer Western Blot für die Proteine HOX-1 und α-Tubulin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine simultane Bestrahlung mit UVA die UVB-induzierte Apoptose sowie die UVB-induzierten DNA-Schäden (CPD und γ H2AX-positive Zellen) in Keratinozyten reduzierte. Zudem konnten erste Hinweise dahingehend generiert werden, dass die besagten Effekte einer simultanen UVA-/UVB-Bestrahlung auf DNA-Schädigung und Apoptose mit einer Modulation des NRF2-Signlaweges bzw. der HOX-1 Expression einhergehen. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um ein *in vitro* Artefakt handelt, wurde in einem letzten Experiment der Einfluss einer simultanen UVA-/UVB-Exposition auf die durch UVB-Strahlung induzierten CPD in Maushaut untersucht.

3.4.5. Die Menge UVB-induzierter CPD (*in vivo*) wird durch simultane UVA-Exposition verringert

SKH-1 haarlose Mäuse wurden einzeln mit 6,3 J/cm² UVA und 900 J/m² UVB bestrahlt sowie simultan mit 6,3 J/cm² UVA-Strahlung und 900 J/m² UVB-Strahlung exponiert. Nach 24 h wurden die Tiere schmerzfrei getötet, die DNA aus Proben der Rückenhaut isoliert und mittels Southwestern Slot-Blot-Analyse analysiert.

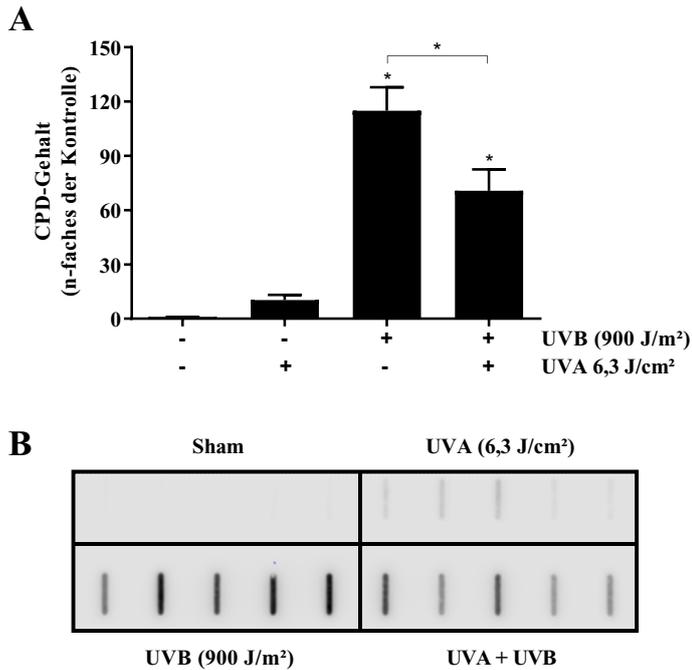


Abbildung 35: Die Menge UVB-induzierter CPD (*in vivo*) wird durch simultane UVA-Exposition verringert.

SKH-1 haarlose Mäuse wurden einzeln sowie simultan mit 900 J/m² UVB und 6,3 J/cm² UVA bestrahlt. Die Kontrolltiere wurden nicht bestrahlt. Nach 24 h wurde der CPD-Gehalt in der aus Rückenhaut-isolierten DNA mit Hilfe der Southwestern Slot-Blot Methode untersucht. **A.** Quantitative Auswertung des CPD-Gehalts pro 250 ng DNA. Für die statistische Auswertung wurde eine einfaktorielle ANOVA angewendet. n = 5. Mittelwert ± SEM, (*, p < 0,05). **B.** Southwestern Slot-Blot für die Menge an gebildeten CPD.

Bei den unbestrahlten Tieren konnten nahezu keine CPD detektiert werden, wohingegen ein leichter Anstieg in den Proben UVA-bestrahlter Tiere festgestellt werden konnte. Verglichen mit den Kontrolltieren stieg der CPD-Gehalt in den Proben UVB-bestrahlter Tiere um das 120-fache und in den Proben simultan exponierter Tiere, mit UVA/UVB um das 80-fache an. Im Vergleich zu den UVB-bestrahlten Tieren konnten signifikant weniger CPD in den mit simultaner UVA- und UVB-Bestrahlung exponierten Tieren detektiert werden. Die gezeigten Befunde verdeutlichen, dass eine simultane UVA-Bestrahlung die UVB-induzierten CPD nicht nur *in vitro*, sondern ebenfalls in *in vivo* reduzieren.

4. Diskussion

Die Forschung der letzten Jahre hat aufgezeigt, dass der AHR ein wichtiger Mediator der UVB-induzierten Stressantwort ist und maßgeblich zur UVB-induzierten Schädigung der Haut bzw. kutaner Zellen beiträgt. Diese Befunde haben zu der weit verbreiteten Ansicht geführt, dass eine transiente topische Hemmung des AHR unsere Haut vor UVB-induzierten Schäden und nachfolgender Kanzerogenese schützt (Frauenstein *et al.*, 2013; Pollet *et al.*, 2018). Interessanterweise ist das durch UVB-Strahlung generierte Photoprodukt FICZ ein potenter *Photosensitizer* für UVA-Strahlung, der die Bildung von oxidativem Stress und assoziierter oxidativer Schädigung bestrahlter Zellen begünstigt (Park *et al.*, 2015). FICZ wird primär durch die AHR-abhängige Monooxygenase CYP1A1 metabolisiert (Bergander *et al.*, 2004; Wincent *et al.*, 2009). Die Klärung, ob eine Modulierung des AHR-Signalweges und nachgeschalteter CYP1A1-Enzymaktivitäten einen Einfluss auf die UVA-sensibilisierenden Eigenschaften des Tryptophan-Photoprodukts FICZ hat und somit möglicherweise von klinischer Relevanz ist, war Gegenstand des vorliegenden Promotionsprojekts.

4.1. Eine Modulierung der AHR-Aktivität beeinflusst die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität

Es ist bekannt, dass FICZ eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen in der Haut, wie beispielsweise der Keratinozyten-Differenzierung, der epidermalen Barrierefunktion und der Pigmentierung, spielt (Luecke *et al.*, 2010; Haarmann-Stemmann *et al.*, 2015; van den Bogaard *et al.*, 2015). FICZ wurde Ende der 1980iger Jahre erstmalig als ein Photooxidationsprodukt der aromatischen Aminosäure Tryptophan beschrieben (Rannug *et al.*, 1987; Rannug *et al.*, 1995). Bei der sogenannten Tryptophan-Photolyse entstehen neben FICZ weitere AHR-affine Photoprodukte, die zu einer transkriptionellen Aktivierung von AHR-Zielgenen in der Haut beitragen können. Diese Tryptophan-Photoprodukte, beispielsweise Indol[3,2-b]carbazol (ICZ), 6,12-Di-Formylindol[3,2-b]carbazol (dFICZ), FICZ und dessen Oxidationsprodukt Indol[3,2-b]carbazol-6-Carbonsäure (CICZ), besitzen einen Indolcarbazol-Kern (Rannug *et al.*, 1987; Rannug *et al.*, 1995; Fritsche *et al.*, 2007). Viele Vertreter dieser Substanzklasse, so auch eine Reihe neu synthetisierter und von unserer Arbeitsgruppe charakterisierter Indolcarbazol-Derivate (Lavilla *et al.*, 2020) stellen potente Liganden des AHR dar (Lavilla *et al.*, 2020).

Die Affinität von FICZ zum AHR-Protein ist dabei in etwa genauso hoch wie die des AHR-Liganden TCDD, einer der potentesten bekannten AHR-Agonisten (Giani Tagliabue *et al.*, 2019). Wie zahlreiche andere AHR-Liganden, beispielsweise BaP, besitzt auch FICZ eine ausgeprägte photosensibilisierende Eigenschaft und hat zudem eine Reihe anderer einzigartiger Merkmale. So kommt es als Folge der FICZ-induzierten und AHR-regulierten Expression von CYP1A1 zu einem zügigen metabolischen Abbau des Tryptophan-Photoproduktes, der eine negative Rückkopplungsschleife darstellt und die Hautverweildauer dieses *Photosensitizers* minimiert (Wincent *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015). Zudem wurde gezeigt, dass eine AHR-Aktivierung durch FICZ die Expression des Differenzierungsmarkers Filaggrin (FLG) in Keratinozyten induziert und dadurch die epidermale Barrierefunktion verbessert (Furue *et al.*, 2015; Kiyomatsu-Oda *et al.*, 2018). Insbesondere die AD, eine entzündliche Hauterkrankung, die sowohl durch genetische als auch durch Umweltfaktoren in ihrer Entstehung beeinflusst wird, zeichnet sich durch eine Dysfunktion der Hautbarriere, eine Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen und der Aktivierung von T-Helfer-2 (Th2) -Zell-getriebenen Immunantworten aus (Stefanovic *et al.*, 2020). Es konnte beobachtet werden, dass bei einigen Patienten eine Funktionsverlustmutation im FLG-Gen mit der AD assoziiert ist (Palmer *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das in entzündlichen Hauterkrankungen häufig vorkommende Zytokin Interleukin (IL)-17 die Expression von FLG verringert und die Zytokine IL-4 und IL-13 die Expression von Involucrin und Loricrin über eine Aktivierung von STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription-6) herunterregulieren (Gutowska-Owsiak *et al.*, 2012; van den Bogaard *et al.*, 2013). Daher könnte eine Hochregulation von FLG bei AD-Patienten und zur Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen von klinischer Relevanz sein (van den Bogaard *et al.*, 2013; Furue *et al.*, 2019). So konnte gezeigt werden, dass die in Steinkohlenteer enthaltenen PAK über eine Aktivierung des AHR-Signalweges die Hautbarrierefunktion verbessern, indem es zu einer vermehrten Expression von FLG und einer Inhibierung des IL-4/STAT6-Signalweges kommt (van den Bogaard *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte eine erst kürzlich durchgeführte Studie aufzeigen, dass die entzündungshemmende Wirkung von Steinkohlenteer weitgehend auf der AHR-abhängigen Induktion antimikrobieller Peptide (AMP) beruht (Smits *et al.*, 2020). Die beobachtete Diskrepanz, dass eine Aktivierung des AHR (durch z.B. PAK) auf der einen Seite an der Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen beteiligt sein kann und andererseits zu einer Verbesserung dieser Erkrankungen beiträgt, ist bisher nur unzureichend verstanden (van den Bogaard *et al.*, 2013;

van den Bogaard *et al.*, 2015; Hidaka *et al.*, 2017; Vogel *et al.*, 2020). Eine mögliche Erklärung könnte jedoch auf eine Veränderung des Mikromilieus der gesunden und entzündeten Haut und entsprechender Unterschiede von Immunzellpopulationen oder der epidermalen Barrierefunktion zum Zeitpunkt der Exposition zurückzuführen sein (Vogel *et al.*, 2020). In NC/Nga-Mäusen, einem für die AD im Menschen etablierten Tiermodell, konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Kontrollbehandlung FICZ die AD-ähnliche Hautentzündung sowie den transepidermalen Wasserverlust verbessert. Die Autoren schlussfolgerten demnach, dass die AHR-vermittelte Expression von FLG durch FICZ ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen sein könnte (Kiyomatsu-Oda *et al.*, 2018). Die beschriebenen UVA-induzierten phototoxischen Eigenschaften von FICZ, die bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich auftreten, stellen den therapeutischen Nutzen jedoch stark in Frage. Ähnlich sieht es bei der therapeutischen Behandlung mit Steinkohlenteer aus. Früher häufig bei Ekzemerkrankungen eingesetzt, wird Steinkohlenteer aufgrund der phototoxischen und möglichen kanzerogenen Eigenschaften heute nur noch in sehr seltenen Fällen zur Therapie verwendet (Diette *et al.*, 1983; Santella *et al.*, 1994; Roelofzen *et al.*, 2012; Roelofzen *et al.*, 2015).

Interessanterweise wurde eine FICZ-Applikation jedoch zur Therapie von Hauttumoren vorgeschlagen. Dabei kommt es durch die Erzeugung von oxidativem Stress mittels Photoanregung von FICZ zu einer verstärkten Apoptose maligner Zellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Justiniano *et al.*, 2020).

Obwohl es eine Vielzahl von Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet gibt, ist bisher nicht bekannt, welche Wirkung das Expressionslevel und die Aktivität des AHR auf die photosensibilisierenden Eigenschaften von FICZ hat. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen erstmalig, dass die Aktivität des AHR maßgeblich die durch FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität in humanen Keratinozyten beeinflusst. Bereits frühere Studien konnten zeigen, dass FICZ nach Inkubation mit einem S9 Leberenzym-Mix von Arocolor-vorbehandelten Ratten innerhalb weniger Minuten metabolisiert wird (Wei *et al.*, 1998). Insgesamt wurden fünf Hauptmetabolite identifiziert, deren Bildung zeit- sowie CYP1A1- und NADPH-abhängig erfolgten. Dabei kam es zur Mono- und Dihydroxylierung, bei der eine oder zwei Hydroxyl-(OH)-Gruppen eingefügt wurden. So entstanden durch Monohydroxylierung die Metabolite 2-OH-FICZ und 8-OH-FICZ sowie die dihydroxylierten Metabolite 2,8-dOH-FICZ, 4,8-dOH-FICZ und 2,10-dOH-FICZ. Darüber hinaus wurden weitere Metabolite nach Inkubation von FICZ mit humanem S9 Mix

identifiziert, die bisher jedoch strukturell nicht weiter charakterisiert worden sind. Die genannten Metabolite wurden nachfolgend durch Konjugationsreaktionen, wie etwas Sulfonierung oder Glucuronidierung, durch Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus (Sulfotransferasen, UDP- Glucuronosyltransferasen) weiter abgebaut (Bergander *et al.*, 2003; Bergander *et al.*, 2004). Es ist jedoch nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß einige dieser Metabolite ebenfalls photosensibilisierende Eigenschaften aufweisen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es im Vergleich zu AHR-profizienten Keratinozyten zu einer verstärkten durch FICZ/UVA-induzierten Phototoxizität in AHR-*knockdown* Keratinozyten kam. Diese verstärkte Phototoxizität korrelierte mit einer gehemmten CYP1A1-Enzymaktivität sowie einem verringerten FICZ-Abbau. Interessanterweise wurde eine verstärkte Apoptose, als Marker für Phototoxizität, erst nach einer vierstündigen Behandlungszeit mit 100 nM FICZ beobachtet. Es ist daher möglich, dass in AHR-profizienten-Keratinozyten weitere phototoxische Metabolite entstehen.

Mittels HPLC-Messungen konnte gezeigt werden, dass die FICZ Konzentration im Medium von AHR-profizienten-HaCaT-Zellen zeitabhängig sank. Zudem wurde gezeigt, dass der UVA-sensibilisierende und Apoptose-induzierende Konzentrationsbereich von FICZ zwischen 25 nM und 50 nM lag. Das intrazelluläre FICZ-Level wurde jedoch nicht analysiert, sodass keine sicheren Rückschlüsse darauf gezogen werden konnten, welche Konzentration intrazellulär nötig ist, um die FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität auszulösen. Sank die FICZ-Konzentration im Medium von HaCaT-Zellen unter einen Wert von ca. 20-25 nM, wurde eine verringerte Induktion des antioxidativ-wirkenden Enzyms HOX-1 sowie eine reduzierte Bildung von Superoxid-Anionen als Marker für ROS beobachtet. Die Anzahl apoptotischer Zellen sowie die Aktivität der Caspase-3 verringerten sich ebenfalls deutlich. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine FICZ-Konzentration unter 20 nM keine UVA-photosensibilisierende Wirkung entfacht. Gerade in Bezug auf eine UVB-Bestrahlung ist diese Erkenntnis von großer Bedeutung, da unsere Haut stets dem gesamten Spektrum des Sonnenlichts und nicht nur dessen UVB-Anteil ausgesetzt ist. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass gesunde menschliche Haut Hefen der Gattung *Malassezia* und weitere Mikroorganismen beherbergt, die ebenfalls FICZ sowie weitere potenziell phototoxische Tryptophan Metabolite bilden und in das sie umgebende Mikromilieu absondern können (Magiatis *et al.*, 2013). Somit könnte nicht nur eine UVB-Bestrahlung potenziell relevant für die FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität sein, sondern auch das Mikrobiom der Haut eine Rolle spielen.

In einer aktuellen Studie haben Smith *et al.* den bakteriellen Metaboliten Tapinarof als AHR-Agonisten identifiziert. Nach topischer Applikation verbessert Tapinarof die Symptome von AD und Psoriasis, was möglicherweise auf eine Aktivierung des AHR/NRF2-Signalweges zurückzuführen ist (Smith *et al.*, 2017). So konnten sie zeigen, dass Tapinarof Hautentzündungen in einem Imiquimod-induzierten Modell der Psoriasis reduzierte und schlussfolgerten, dass diese anti-inflammatorischen Effekte auf eine vermehrte Aktivierung des AHR- und NRF2-Signalweges zurückzuführen waren. Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich zeigen, dass der *Toll-like Receptor 7*-Agonist Imiquimod in humanen Keratinozyten durch das AHR-abhängige Enzym CYP1A1 abgebaut wird. Nach unseren Daten scheint daher eine Hochregulation der CYP1A1-Aktivität in der Haut (beispielsweise durch topische Applikation von Tapinarof) den metabolischen Abbau von Imiquimod zu beschleunigen, wodurch die Entzündungsreaktion in der Haut abgeschwächt werden sollte (Mescher *et al.*, 2019). Trotz alledem zeigen klinische Studien die Wirksamkeit von Tapinarof, insbesondere bei der Behandlung von AD-Patienten (Bissonnette *et al.*, 2012a; Bissonnette *et al.*, 2012b; Peppers *et al.*, 2019). Der therapeutische Effekt von Tapinarof könnte auf eine transiente Aktivierung des AHR und assoziierte Verbesserung der Hautbarriere zurückzuführen sein oder auf AHR-unabhängigen Mechanismen beruhen. Beispielsweise besitzt Tapinarof eine antibakterielle Wirkung, die unter Umständen durch Veränderung der Zusammensetzung des Hautmikrobioms anti-entzündliche Effekte hervorruft (Li *et al.*, 1995). In der Tat zeigen Untersuchungen des Hautmikrobioms von gesunden Probanden und Patienten mit AD bzw. Psoriasis Unterschiede sowohl hinsichtlich der bakteriellen Diversität als auch der quantitativ dominierenden Bakterienspezies auf (Fyhrquist *et al.*, 2019; Paller *et al.*, 2019).

Die AHR-agonistische Wirkung von Tapinarof konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. So konnte aufgezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von NHEK mit Tapinarof die Genexpression und Enzymaktivität von CYP1A1 stimuliert und somit die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose verringert. Dieser Effekt wurde zudem in AHR-profizienten-, nicht aber in AHR-*knockdown*-HaCaT-Keratinozyten bestätigt. Des Weiteren kam es zu einer leichten Induktion (1,6-fach) der HOX-1 nach einer alleinigen Tapinarof-Behandlung, weshalb eine Beteiligung des NRF2-Signalweges zunächst nicht ausgeschlossen werden konnte. Da eine Tapinarof-Vorbehandlung jedoch keine Wirkung auf die FICZ/UVA-induzierte Apoptose in HaCaT-shAHR-Keratinozyten zeigt, erscheint eine Beteiligung der NRF2-induzierten antioxidativen Stressantwort unwahrscheinlich. Um

diese Annahme zu bestätigen, müssten jedoch weitere Versuche durchgeführt werden. Das NRF2-Gen ist zudem aufgrund seines Vorhandenseins mehrerer XRE in seiner Promotorregion ein direktes Ziel des kanonischen AHR-Signalweges (Miao *et al.*, 2005). Ein *knockdown* des AHR könnte folglich in einer verringerten Expression des NRF2 resultieren und somit die Induktion der antioxidativen Stressantwort abschwächen.

Eine Vorbehandlung der NHEK mit Tapinarof zeigte, dass eine einstündige Vorbehandlung mit FICZ und eine anschließende UVA-Bestrahlung keine Wirkung auf die FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 und -9 Aktivität hat. Eine zweistündige Vorbehandlung hingegen reflektierte die in HaCaT-Keratinocyten gewonnen Befunde. Somit scheint der metabolische Abbau von FICZ in NHEK verzögert abzulaufen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass NHEK sensitiver gegenüber der durch FICZ/UVA-induzierten Phototoxizität sind. Im Vergleich zu HaCaT-Keratinocyten zeigte eine Behandlung mit 100 nM FICZ (2 h und 4 h) und 5 J/cm² UVA-Strahlung, dass NHEK eine fast zweifach so hohe Aktivität der Caspase-3 aufweisen und die Anzahl apoptotischer Zellen um fast 10 % ansteigt. Dies müsste jedoch in weiteren Experimenten und mittels HPLC-Messungen der intrazellulären FICZ-Konzentration überprüft werden. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit NHEK von nur einem Spender verwendet, mögliche interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf den Fremdstoffwechsel sowie die Suszeptibilität gegenüber oxidativem Stress wurden folglich nicht berücksichtigt.

4.2. NRF2-defiziente Keratinocyten sind sensitiver gegenüber der durch FICZ und UVA-Strahlung induzierten Phototoxizität

Die Expression von Genen, die für antioxidative und/oder konjugierende Enzyme der Phase II kodieren, wird in Antwort auf verschiedene Umweltfaktoren induziert, um der schädigenden Wirkung potentiell reaktiver Intermediate entgegenzuwirken. Der Transkriptionsfaktor NRF2 wird in Antwort auf oxidativen Stress sowie elektrophilen Stress induziert und orchestriert die adaptive Genexpression. Dabei scheint es eine gewisse Überschneidung mit Zielgenen des AHR zu geben. Zu diesen Genen gehören u.a. die NQO1 (Tijet *et al.*, 2006), Gluthation-S-Transferasen (Rushmore und Pickett, 1990) und UGT1A1 (Yueh und Tukey, 2007). Eines der wohl bekanntesten Zielgene, dessen erhöhte Expression häufig als Marker für eine Aktivierung des NRF2-Signalweges angesehen wird, ist die HOX-1 (Alam *et al.*, 1999).

Um zu überprüfen, welche Rolle der NRF2-Signalweg in der durch FICZ/UVA-induzierten Apoptose besitzt, wurden NRF2-defiziente Keratinozyten verwendet. Anhand von Western Blot-Analysen konnte der *knockout* des NRF2-Gens in HaCaT-Keratinozyten bestätigt werden. Zusätzlich zeigte die Auswertung der qRT-PCR, dass NRF2-defiziente Keratinozyten eine verringerte Genexpression der HOX-1 aufweisen. Diese Befunde führen zu der Annahme, dass das NRF2-Protein einen entscheidenden Einfluss auf die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose hat, indem es die Expression wichtiger antioxidativer Enzyme induziert. In der Tat resultiert ein Ausschalten des NRF2-Gens in einer vermehrten durch FICZ/UVA-induzierten Apoptose. Diese vermehrte Eliminierung ist möglicherweise auf eine vermehrte Bildung von ROS und assoziierte oxidative DNA-Schäden zurückzuführen. Eine verringerte Expression zytoprotektiver Enzyme scheint daher für eine vermehrte durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose in NRF2-defizienten Keratinozyten verantwortlich zu sein. Darüber hinaus legen die Ergebnisse nahe, dass eine Inaktivierung des NRF2-Gens keinen Einfluss auf den FICZ-Metabolismus nimmt, da es zu einer zeitabhängigen Abnahme der durch FICZ/UVA-induzierten Apoptose kommt. Im Vergleich zu einer zweistündigen Exposition mit FICZ und anschließender UVA-Bestrahlung, resultierte eine vierstündige Behandlung mit FICZ und eine nachfolgende UVA-Exposition in einer verringerten Caspase-3, -8 und -9 Aktivität. Trotz alledem kann nicht ausgeschlossen werden, dass NRF2-regulierte Enzyme des Phase II Fremdstoffmetabolismus am Abbau von FICZ beteiligt sind. Des Weiteren führte eine Behandlung der NRF2-*knockout* Keratinozyten mit FICZ und UVA-Strahlung zu einer vermehrten Induktion der Caspase-8 Aktivität. Diese Caspase-8 Aktivität war in den NRF2-profizienten Zellen nahezu nicht messbar. Die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose wurde demnach hauptsächlich über den intrinsischen Weg reguliert. Exogen oder endogen erzeugte ROS führen dabei zu einer Aktivierung des Tumorsuppressor p53, welcher als Transkriptionsfaktor nach einer DNA-Schädigung die Expression von Genen des Zellzyklus, der Apoptose und/oder der DNA-Reparatur kontrolliert. Es konnte bereits sehr früh bewiesen werden, dass p53 eine entscheidende Rolle insbesondere bei der bestrahlungsinduzierten Apoptose spielt (Lowe *et al.*, 1993; Lu, 1993; Ziegler *et al.*, 1994). Eine von Henseleit *et al.* durchgeführte Studie zeigte, dass in HaCaT-Zellen eine konstitutive p53-Expression vorliegt, die nach UVB-Bestrahlung zunahm (Henseleit *et al.*, 1997). Die basale p53-Expression in unbehandelten HaCaT-Zellen ist dabei auf die Tatsache zurückzuführen, dass HaCaT-Keratinozyten zwei Mutationen im p53-Gen tragen, die eine längere Protein-Halbwertszeit als Wildtyp (WT) p53 hat (Lehman *et al.*, 1993). Darüber

hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion von p53 in der UV-induzierten Apoptose unabhängig von der Neusynthese von p53 ist. Vielmehr scheint eine posttranslationale Stabilisierung von p53 für eine Hochregulation verantwortlich zu sein (Maltzman und Czyzyk, 1984; Healy *et al.*, 1994; Henseleit *et al.*, 1997). Der genaue Mechanismus der p53-induzierten Apoptose in HaCaT-Keratinocyten ist jedoch bisher unklar. Eine Beteiligung von p21 als Mediator der p53-Antwort scheint in diesem Fall unwahrscheinlich, da das mutierte p53 in HaCaT-Zellen den p21-Promotor nicht transkriptionell aktivieren kann, wie dies bei WT p53 der Fall ist (Datto *et al.*, 1995; Henseleit *et al.*, 1997). Anhand von *in vitro* und *in vivo* Studien konnte zudem eine reduzierte Anzahl UV-Strahlung induzierter apoptotischer Zellen nach Inaktivierung des p53-Gens gezeigt werden. Diese Daten deuten demnach daraufhin, dass p53 in HaCaT-Keratinocyten, trotz besagter Punktmutationen, zumindest teilweise funktionsfähig ist (Ziegler *et al.*, 1994; Henseleit *et al.*, 1997). Des Weiteren könnten zusätzliche apoptotische Signalwege in HaCaT-Zellen aktiviert werden, die z.B. den Tumorsuppressor p73 beinhalten. So konnten Stiewe und Pützer zeigen, dass p53-defiziente Zellen zu einer Aktivierung p53-induzierter Zielgene und zur Apoptose führen. Diese unabhängig von p53-induzierte Apoptose soll dabei über eine vermehrte Aktivität von p73 induziert werden (Stiewe und Pützer, 2000).

Bei der Einleitung der intrinsischen Apoptose durch p53 kommt es zu einer Freisetzung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine, die die Funktion anti-apoptotischer Proteine hemmen können. Darüber hinaus verursachen ROS einerseits eine Oxidation von Cardiolipin, was zu einer Freisetzung des Cytochrom C ins Zytosol führt und andererseits in einer Depolarisation der mitochondrialen Membran resultiert. Dies hat zur Folge, dass die Öffnung von BAX/BAK-Kanälen auf der äußeren Mitochondrienmembran induziert wird, was die Freisetzung weiterer pro-apoptotischer Proteine ins Zytosol ermöglicht (Redza-Dutordoir und Averill-Bates, 2016). In Antwort auf DNA-Schäden kann p53 jedoch auch den extrinsischen Weg der Apoptose fördern, indem es neben der Expression pro-apoptotischer Proteine zur Expression Apoptose-induzierender Liganden für die sogenannten Todesrezeptoren kommt (Haupt *et al.*, 2003). Die Aktivierung der Caspase-8 kann dann nachgeschaltete Effektor-Caspasen sowie BID (*BH3 Interacting-Domain Death Agonist*) aktivieren. BID wiederum kann die Freisetzung von Cytochrom C initiieren und somit ebenfalls zu einer Aktivierung des intrinsischen Signalwegs führen (Li *et al.*, 1998). Aus diesem Grund ist es möglich, dass die beobachtete gesteigerte Caspase-9 Aktivität in den NRF2-defizienten Zellen durch eine zusätzliche Aktivierung der Caspase-8 initiiert wird.

4.3. Die photosensibilisierenden Therapeutika Vemurafenib und Ketoconazol verstärken die FICZ und UVA-Strahlung induzierte Phototoxizität

Die arzneimittelinduzierte Lichtempfindlichkeit ist eine Reaktion der Haut auf topisch sowie systemisch eingenommene Medikamente, die durch die Exposition der Haut gegenüber UV-Strahlung ausgelöst werden kann. Diese Lichtempfindlichkeitsreaktionen der Haut sind ein immer häufiger auftretendes Problem in der Dermatologie und bereits bis zum Jahre 1995 wurden hunderte chemische Verbindungen und Medikamente beschrieben, die diese unerwünschten Nebenwirkungen auslösen (Gould *et al.*, 1995). Die Entwicklung experimenteller Testverfahren, um diese potentiell schädliche Wirkung neuer Substanzen zu identifizieren, brachten wenig Erfolge. Viele dieser Testverfahren sind nicht in der Lage das breite Spektrum photosensibilisierender Agentien anzuzeigen. Daten, die *in vitro* oder in Tiermodellen gewonnen wurden, sind häufig nicht eins-zu-eins auf den Menschen übertragbar. Selbst durch Photoprovokationstests an Probanden können nicht alle Photosensibilisatoren identifiziert werden (Loprieno, 1992; Selvaag, 1997). Obwohl sich die Forschung in den letzten Jahren enorm weiterentwickelt hat und es mittlerweile eine Reihe von Testsystemen gibt (Peters und Holzhütter, 2002; Thude *et al.*, 2015; Reinen *et al.*, 2018; Seto *et al.*, 2020), ist immer noch unklar, wie einige Substanzen und Medikamente ihre phototoxischen Eigenschaften entfalten. Bei vielen reichern sich die Arzneimittel und ihre Metabolite in der Haut an und es kommt zu phototoxischen Reaktionen. Die zugrundeliegenden Mechanismen, über die der in der Krebstherapie eingesetzte Proteinkinase-Inhibitor Vemurafenib sowie das Antimykotikum Ketoconazol phototoxische Wirkungen entfalten, sind bisher nur unzureichend verstanden.

Der Serin/Threonin-Kinase-Hemmstoff Vemurafenib ist für die Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom sowie Erdheim-Chester-Erkrankung mit einer BRAF-V600E-Mutation zugelassen. Mutationen im Codon 600 treten bei ca. 40 – 60 % der kutanen Melanome auf und führen häufig zu einem Aminosäureaustausch, der eine dauerhafte Aktivierung der Kinase und des nachgeschalteten proliferationsfördernden MAPK-Signalweges induziert. Bei etwa 90 % dieser Mutationen kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Valin durch Glutaminsäure (Curtin *et al.*, 2005; Bollag *et al.*, 2010; Chapman *et al.*, 2011). In einer klinischen Studie von 2013 wurde 520 Patienten Vemurafenib verabreicht. Die häufigsten Nebenwirkungen, die bei 92 -95 % der Patienten auftraten, waren unerwünschte Nebenwirkungen der Haut, darunter Ausschläge (64 – 75 % der Patienten), aber auch phototoxische Reaktionen (35 – 63 % der Patienten) (Lacouture *et al.*, 2013). Die

Vemurafenib induzierten kutanen Plattenepithelkarzinome, die ebenfalls im Verlauf der Therapie auftreten können, scheinen jedoch nicht mit der durch Vemurafenib-induzierten Phototoxizität in Zusammenhang zu stehen (Wu *et al.*, 2017). Bei der Vemurafenib-vermittelten Phototoxizität kann es, wie bei den meisten photosensibilisierenden Medikamenten, zu einer erhöhten (verzögerten) Sonnenbrandreaktion kommen. Zudem kann Vemurafenib während und direkt nach einer UVA-Exposition zusätzlich eine Sofortreaktion auslösen, die durch Erytheme, Ödeme sowie ein Gefühl von Jucken, Brennen und Hitze gekennzeichnet ist. Diese Symptome ähneln den Symptomen einer erythropoetischen Protoporphyrinurie nach einer Exposition mit Sonnenlicht. Bei der erythropoetischen Protoporphyrinurie besteht ein Mangel des Enzyms Ferrochelatase. Es konnte gezeigt werden, dass Vemurafenib mit einer Ferrochelatase-Hemmung durch die Bindung an die Protoporphyrin-Stelle dieses Enzyms assoziiert ist, was zu einer Akkumulierung von Protoporphyrin führt und somit eine Erklärung für die Sofortreaktion sein könnte. Das Wirkspektrum für eine Protoporphyrin induzierte Phototoxizität liegt jedoch an der Grenze des UVA-Spektrums zum sichtbaren Lichtspektrum (400 nm – 415 nm) und unterscheidet sich daher vom Wirkspektrum der Vemurafenib assoziierten Phototoxizität (Wellenlänge \leq 400 nm) (Gelot *et al.*, 2013). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Vemurafenib seine photosensibilisierenden Eigenschaften nur nach einer Bestrahlung mit Wellenlängen im UVA-Bereich induziert. Eine UVB-Bestrahlung führte zu keinen phototoxischen Reaktionen der Haut (Dummer *et al.*, 2012). Spektralfluorometrische Analysen konnten zudem zeigen, dass möglicherweise ein bisher nicht näher beschriebener Metabolit des Vemurafenibs und nicht das parentale Molekül an der UVA-induzierten Phototoxizität beteiligt sein könnte (Brugière *et al.*, 2014). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Vemurafenib alleine unter den gewählten Testbedingungen zu keinen phototoxischen Reaktionen (Apoptose) in HaCaT-Keratinocyten und NHEK führt. Vielmehr scheint es, dass eine Vemurafenib-induzierte Hemmung des AHR zu einem verlangsamten metabolischen Abbau und somit zu einer Akkumulation von FICZ und möglicherweise weiterer AHR-affiner Tryptophan-Photoprodukte führt. Eine Vorbehandlung mit dem nicht-phototoxischen AHR-Antagonisten MNF und eine anschließende Exposition der HaCaT-Zellen und NHEK mit FICZ und UVA-Strahlung, reflektieren die in der Literatur beschriebenen phototoxischen Effekte von Vemurafenib. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen jedoch im Kontrast zu Daten von Woods *et al.*, die zeigen, dass eine Behandlung von HaCaT-Keratinocyten nur mit Vemurafenib und einer UVA-Dosis von 5 J/cm² zu einer verringerten Zellviabilität führen (Woods *et al.*, 2015). In einer weiteren Arbeit zeigen Hepp

et al., dass eine UVA-Bestrahlung von Vemurafenib *in chemico* zu keiner Generierung von ROS führt und somit die Hypothese untermauert, dass möglicherweise weitere exogene oder endogene Moleküle und/oder Vemurafenib-Metabolite die UVA-induzierte Phototoxizität induzieren (Heppt *et al.*, 2020). Nachfolgende Experimente der Arbeit von Hepp *et al.* zeigen zwar, dass die Zellviabilität in Vemurafenib und UVA-Strahlung exponierter 3T3-Mausfibroblasten negativ beeinflusst wird, allerdings treten phototoxische Reaktionen überwiegend im epidermalen Kompartiment der Patientenhaut auf, sodass sich die Frage stellt, inwiefern Fibroblasten ein geeignetes Modell für mechanistische Untersuchungen zur Vemurafenib-induzierten Phototoxizität darstellen (Gonçalo, 2019).

Interessanterweise konnten wir in Kooperation mit der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf erst kürzlich zeigen, dass Vemurafenib den kanonischen AHR-Signalweg inhibieren kann (Hawerkamp *et al.*, 2019). Da eine Behandlung mit Vemurafenib des Weiteren zu einer gesteigerten Expression von COX-2 führt und diese Beobachtung auf eine Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges hindeutet, scheint Vemurafenib selektiv den kanonischen AHR-Signalweg zu inhibieren. Es wurde postuliert, dass ein Ungleichgewicht in der Aktivität der kanonischen und nicht-kanonischen AHR-Signalwege die Homöostase der Haut beeinflusst (Haarmann-Stemmann *et al.*, 2015). Eine vorübergehende Aktivierung des AHR hat, wie bereits beschrieben, einen positiven Einfluss auf die Hautbarriere, insbesondere bei der Therapie von AD- und Psoriasis-Patienten.

Die Ergebnisse implizieren, dass die Vemurafenib-induzierten Hautausschläge nicht auf eine allergische Reaktion zurückzuführen sind, sondern vielmehr durch eine Inhibierung des AHR verursacht werden, die mit einer gestörten Homöostase der Haut einhergeht (Hawerkamp *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurde von uns der von Smith *et al.* identifizierte AHR-Agonist Tapinarof zur Behandlung Vemurafenib-induzierter Hautausschläge vorgeschlagen (Smith *et al.*, 2017). Durch eine topische Applikation könnte es möglicherweise zu einer Aktivierung des kanonischen AHR-Signalweges kommen und somit zu einer Verbesserung Vemurafenib-induzierter Hautausschläge. Diese Tatsache wäre darüber hinaus nicht nur interessant zur Therapie Vemurafenib-induzierter Hautausschläge, sondern zusätzlich auch für die Behandlung bzw. der Prävention UVA-induzierter phototoxischer Effekte von Vemurafenib. Eine topische Aktivierung des AHR, während einer Vemurafenib Therapie könnte möglicherweise verhindern, dass es zu einer Akkumulierung von FICZ oder auch anderen photosensibilisierenden Substanzen kommt.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Vemurafenib nicht nur die Aktivität des AHR in HaCaT-Keratinocyten und NHEK beeinflusst, sondern zusätzlich eine inhibierende Wirkung auf die Enzymaktivität von CYP1A1 hat. Im EROD-Assay führte eine 30-minütige Zugabe von Vemurafenib, Ketoconazol und dem etablierten CYP1A-Inhibitor 7-HF zu einem signifikant gehemmten Umsatz von 7-Ethoxyresorufin zum Resorufin in FICZ-behandelten HaCaT-Zellen und NHEK. Diese Daten deuten darauf hin, dass Vemurafenib und Ketoconazol die katalytische Aktivität von CYP1A1 hemmen. Möglicherweise könnte es sich jedoch auch um eine Substratinhibierung handeln, bei der Vemurafenib und Ketoconazol um die Bindung an das katalytische Zentrum des freien Enzyms konkurrieren. Eine Behandlung mit MNF, Vemurafenib, Ketoconazol und 7-HF führte zudem zu einer Inhibierung des FICZ-Abbaus und verstärkte die durch FICZ/UVA-induzierte Caspase-3 und -9 Aktivität sowie die Induktion der HOX-1. Eine chemische Inhibierung von AHR und/oder CYP1A1 reflektiert daher die Ergebnisse der durch FICZ/UVA-induzierten phototoxischen Effekte in HaCaT-shAHR-Keratinocyten und impliziert, dass eine Akkumulierung von FICZ und/oder FICZ-Metaboliten zu UVA-induzierten phototoxischen Effekten in Keratinocyten führen kann.

Ketoconazol war eines der ersten synthetischen und zur oralen Einnahme verfügbaren Azol-Antimykotika, welche zur Therapie von Pilzkrankungen eingesetzt wurden. Neben einer Vielzahl von Nebenwirkungen, wie Hepatotoxizität, kam es ebenfalls zu Berichten über phototoxische Reaktionen der Haut, deren Ursache nicht geklärt werden konnte (Mohamed, 1988; Zuba *et al.*, 2016). Darüber hinaus konnten Korashy *et al.* zeigen, dass Ketoconazol zu einer Aktivierung des AHR *in vitro* führt, jedoch ebenfalls ein Substrat für CYP1A1 darstellt und somit durch Substratinhibierung die TCDD-induzierte Enzymaktivität von CYP1A1 hemmt (Paine *et al.*, 1999; Korashy *et al.*, 2007). Tsuji *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass eine Behandlung mit Ketoconazol die nukleäre Translokation des AHR induziert und zu einer Hochregulierung der CYP1A1-mRNA und Proteinexpression führt. Des Weiteren kam es zu einer vermehrten Induktion von NRF2 auf Gen- und Proteinebene und einer verstärkten Expression der NQO-1. Die Autoren schlussfolgerten auf Grundlage von siRNA-Experimenten, dass Ketoconazol AHR-abhängig zu einer Aktivierung des NRF2 führt und somit Zytokin-induzierten (AHR-unabhängig) oder durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe-induzierten (AHR-abhängig) oxidativen Stress herunterreguliert (Tsuji *et al.*, 2012). Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten nicht auf eine parallele Aktivierung von AHR und NRF2 nach einer Behandlung der Keratinocyten mit

Ketoconazol hin. Anzumerken ist allerdings, dass Tsuji *et al.* die Keratinozyten für mindestens 12 h mit Ketoconazol belasteten, wohingegen die Keratinozyten in dieser Arbeit nur für 6 h (HaCaT-Zellen) oder 8 h (NHEK) mit Ketoconazol belastet und anschließend weitere 4 h in Zellkulturmedium inkubiert wurden. Die Ergebnisse besagen weiterhin, dass Ketoconazol zu keiner verbesserten antioxidativen Stressantwort nach einer Exposition der Keratinozyten mit FICZ und UVA-Strahlung führt. Vielmehr scheint Ketoconazol die durch FICZ/UVA-induzierte Apoptose bzw. Phototoxizität zu verstärken. Es gibt zudem einen Hinweis darauf, dass Ketoconazol, vergleichbar zu Vemurafenib, seine photosensibilisierenden Eigenschaften erst durch eine Akkumulierung von FICZ oder anderen potentiell photosensibilisierenden endogenen Molekülen induziert. Interessanterweise gibt es in der Literatur keine Hinweise auf phototoxische Nebenwirkungen einer topischen Ketoconazol-Therapie. Dies könnte darin begründet sein, dass Pilzinfektionen zum Großteil an nicht UV-exponierten Stellen, beispielsweise den Zehenzwischenräumen, auftreten.

4.4. Eine simultane Bestrahlung mit UVA hemmt die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden

Die Stressantwort UVB-exponierter Keratinozyten lässt sich in einen DNA-schadensabhängigen und einen DNA-schadensunabhängigen Mechanismus unterteilen (Herrlich *et al.*, 1994; Shaulian *et al.*, 2000; Schwarz, 2005a; Schwarz *et al.*, 2005; Schwarz, 2005b; Herrlich *et al.*, 2008). Letzterer beinhaltet eine Charakterisierung zahlreicher zellulärer Signalmoleküle, u.a. auch den AHR. Fritsche *et al.* konnten erstmals zeigen, dass Tryptophan in Keratinozyten ein Chromophor für UVB-Strahlung ist und zur Generierung von FICZ führt (Fritsche *et al.*, 2007). Neben FICZ entstehen bei der Tryptophan-Photolyse weitere Photoprodukte mit AHR-gerichteter Liganden-Aktivität (ICZ, dFICZ, CICI) (Rannug *et al.*, 1987; Rannug *et al.*, 1995). Die Untersuchungen von Fritsche *et al.* konnten aufzeigen, dass in Antwort auf eine UVB-Exposition mit 600 J/m² UVB in etwa 80 pM FICZ in HaCaT-Zellen gebildet werden. Eine weitere Studie von Douki *et al.* konnte aufzeigen, dass es zur Bildung von FICZ in UVB-bestrahlten Tryptophan-PBS-Lösungen gekommen war. Eine UVB-Bestrahlung von NHEK resultierte jedoch in keiner Bildung von FICZ. Dafür konnten sie zwei weitere direkte Tryptophan-Photoprodukte aufzeigen (N-Formylkynurenine und Tryptamin) (Youssef *et al.*, 2019). Der Arbeit von Douki *et al.* konnte jedoch nicht entnommen werden, ob es sich dabei um NHEK von unterschiedlichen

Spendern handelte und in welcher Hautregion die isolierten NHEK lokalisiert waren. So ist nicht auszuschließen, dass die interindividuellen Unterschiede im Hinblick auf eine UVB-Bestrahlung nicht berücksichtigt wurden.

Bisher ist jedoch unbekannt, ob und in welcher Konzentration es zur Entstehung von weiteren durch UVB-Strahlung generierten Tryptophan-Photoprodukten in Keratinozyten kommt. Des Weiteren wäre es möglich, dass aufgrund eines sehr schnellen intrazellulären FICZ-Abbaus, die intrazellulären FICZ-Messungen verfälscht niedrig sein könnten. Neben der Entstehung von FICZ könnte es schon während einer UVB-Bestrahlung zu einem metabolischen Abbau von FICZ kommen. Darüber hinaus wäre es interessant zu wissen, welche UV-Dosis für die Bildung von FICZ in der menschlichen Haut benötigt wird und welche Rolle das Mikrobiom dabei spielen könnte. Weiterhin gibt es keine Informationen über potenzielle durch UVA-Strahlung induzierte phototoxische Eigenschaften dieser Photoprodukte. Lediglich für das Struktur analogon ICZ konnte gezeigt werden, dass es sich um einen potenten AHR-Agonisten mit keinerlei UVA-phototoxischer Wirkung handelt (Park *et al.*, 2015).

Der zugrundeliegenden Arbeitshypothese zufolge sollte eine simultane Bestrahlung mit UVA die UVB-induzierte Apoptose in HaCaT-shAHR-Keratinozyten steigern, da es zu keinem bzw. einem stark verminderten metabolischen Abbau von FICZ oder weiterer potenziell UVA-phototoxischer Substanzen kommen sollte. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden, da die Ergebnisse eindeutig zeigen, dass eine UVA-Exposition die UVB-induzierte Apoptose sowohl in HaCaT-EV- als auch in HaCaT-shAHR-Keratinozyten reduziert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die durch UVB-Strahlung gebildete intrazelluläre FICZ-Konzentration zu niedrig ist, um in Gegenwart von UVA-Strahlung proapoptische bzw. phototoxische Effekte zu entfachen. Um dieses Szenario zu bestätigen, müsste, wie bereits erwähnt, die intrazelluläre FICZ Konzentration nach UVB-Bestrahlung in HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinozyten determiniert werden.

Bei der UVB-induzierten Apoptose in Keratinozyten kommt es zur Entstehung von mutagenen DNA-Photoprodukten, insbesondere CPD. Um Mutationen zu verhindern, die gegebenenfalls eine Tumorerkrankung induzieren können, werden diese DNA-Photoprodukte entweder durch ein spezialisiertes DNA-Reparatursystem, die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), entfernt oder die geschädigte Zelle mittels programmiertem Zelltod eliminiert (D'Errico *et al.*, 2003; Shah und He, 2015). Die NER ist

ein streng kontrollierter vierstufiger Prozess, bei dem nach Erkennung des Schadens die DNA-Doppelhelix entwunden, das geschädigte DNA-Fragment entfernt und die entstandene Lücke anhand des komplementären Stranges aufgefüllt wird (Greinert *et al.*, 1999; Schärer, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der AHR die Eliminierung von UVB-induzierten CPD in humanen Keratinozyten und der Haut von haarlosen SKH-1-Mäusen abschwächt und es zusätzlich zu einer verringerten Anzahl apoptotischer Zellen kommt (Frauenstein *et al.*, 2013; Pollet *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass HaCaT-shAHR-Keratinozyten sowie Ahr-defiziente Mäuse eine beschleunigte Reparatur UVB-induzierter CPD aufweisen. Diese beschleunigte Reparatur von CPD in HaCaT-shAHR-Keratinozyten sowie Ahr-defizienten Mäusen korrelierte mit einem erhöhten Proteinlevel des p27-Tumorsuppressorproteins. In weiteren Experimenten konnte bewiesen werden, dass ein Anstieg des p27-Proteinlevels, durch Inhibierung des AHR in Keratinozyten, zu einer erhöhten Aktivität der NER führte (Pollet *et al.*, 2018). Auch konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg des p27-Proteinlevels in einer verminderten Expression der Checkpoint Kinase-1 (CHK1) resultierte, welche in Antwort auf DNA-Schäden zu einem Zellzyklus-Arrest führt (Sanchez *et al.*, 1997). Eine gehemmte Expression von CHK1 wird zudem in Verbindung mit einer verschlechterten Homologen Rekombinationsreparatur (HRR) gebracht (Sørensen *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde postuliert, dass verbleibende CPD in UVB-bestrahlten AHR-defizienten Keratinozyten und Maushaut vermehrt zu einem Kollaps der Replikationsgabel führen, somit die Bildung von DSB verursachen und die Apoptose einleiten.

In dieser Arbeit führte eine UVB-Bestrahlung zu einer vermehrten Induktion der Apoptose in HaCaT-shAHR-Zellen. Diese Ergebnisse untermauern die von Pollet *et al.* erhobenen Befunde, implizieren jedoch, dass es bereits nach 4 h zu einer verstärkten Eliminierung geschädigter AHR-*knockdown* Keratinozyten kommt. Diese zeitlichen Unterschiede könnten dadurch begründet werden, dass die Keratinozyten nicht synchronisiert wurden. Auch scheint eine Hemmung des AHR nicht nur einen positiven Einfluss auf die UVB-induzierten Schäden zu haben, sondern möglicherweise auch nach einer simultanen Bestrahlung. Dies müsste jedoch anhand von weiteren Versuchen und Kanzerogenese-Studien überprüft werden. Es wäre darüber hinaus möglich, dass die photosensibilisierenden Eigenschaften von FICZ erst nach repetitiven, simultanen Bestrahlungen mit UVA und UVB auftreten, da es zunächst zu einer Akkumulierung von FICZ und/oder anderen phototoxischen Molekülen kommen müsste.

Die Entstehung UVB-induzierter DSB resultiert in der Regel aus einem Block der Replikationsgabel. Dieser wird eingeleitet, wenn UVB-induzierte CPD nicht repariert werden und die CPD-positiven Zellen in die Mitose übergehen. Daraufhin werden Nukleasen aktiv, die den DNA-Strang zerschneiden, woraus die DSB resultieren (Batista *et al.*, 2009; Podhorecka *et al.*, 2010). Die kovalente Basenpaarung ist somit unterbrochen und essentielle Gene können nur fehlerhaft oder gar nicht mehr abgelesen werden. Wenn diese Schäden nicht oder fehlerhaft repariert werden, führt dies in der Regel zur Einleitung der Apoptose. Unter Umständen können aber auch mutagene und klastogene Effekte auftreten, die den Beginn einer malignen Erkrankung darstellen können (Rolfsmeier *et al.*, 2010; Svobodová *et al.*, 2012). DSB können durch die HRR oder das Nicht-homologe *Endjoining* (NHEJ) repariert werden. Bei der HRR werden homologe Sequenzen des Schwesterchromatids verwendet um den DSB zu reparieren. Die HRR läuft hauptsächlich in der Synthese- sowie G₂-Phase des Zellzyklus ab, weshalb bei einem Block der Replikationsgabel, die durch UVB-induzierten CPD in der Regel durch die HRR behoben werden. Bei der NHEJ hingegen werden die freien DNA-Enden, unabhängig von ihrer Sequenz, überwiegend in der G₀- und G₁-Phase des Zellzyklus, miteinander ligiert (Johnson und Jasin, 2001; Jackson, 2002; Rothkamm *et al.*, 2003).

Eine zeitgleiche Bestrahlung der Zellen mit UVA reduzierte sowohl die UVB-induzierte Apoptose als auch die Zahl UVB-induzierter DNA-Schäden (CPD und γ H2AX-positive Zellen). Dies wirft die interessante Frage auf, inwiefern UVA-Strahlung Einfluss auf die durch UVB-Strahlung induzierten Schäden hat. Die Resultate von Western Blot- und qRT-PCR-Analysen zeigen, dass eine UVB-Bestrahlung die Expression der HOX-1 negativ beeinflusst. Dieser Effekt konnte nicht nach simultaner Bestrahlung mit UVA und UVB beobachtet werden. Möglicherweise könnte es eine Korrelation zwischen einer Aktivierung des NRF2-Signalweges und einer verbesserten DNA-Reparatur geben. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit UVA die apoptotischen Effekte einer UVB-Exposition in haarlosen Mäusen abschwächte (Ibuki *et al.*, 2007). Weiterhin ist bekannt, dass, unabhängig von oxidativem Stress, eine UVA-Bestrahlung von Krebszellen die Aktivität der HRR verbessert (Jayakumar *et al.*, 2015). In beiden Arbeiten wird eine ursächliche Beteiligung des NRF2-Signalweges vorgeschlagen. Tatsächlich führt die Behandlung von Keratinozyten mit FICZ und UVA-Strahlung zu einer vermehrten Induktion NRF2-abhängiger Zielgene. Obwohl diese Aktivierung ROS-abhängig ist (Park *et al.*, 2015), wäre es möglich, dass es nach simultaner UVA/UVB-Exposition zu einer

verstärkten Reparatur UVB-induzierter DSB (durch eine vermehrte Aktivität der HRR) käme. Diese vermehrte Aktivität könnte folglich durch das durch UVB-Strahlung generierte Photoprodukt FICZ und eine gleichzeitige Bestrahlung mit UVA zurückzuführen sein. FICZ und UVA-Strahlung würden zu einer Aktivierung des NRF2-Signalweges führen, dadurch zu einer verstärkten Aktivität der HRR beitragen und somit die Anzahl UVB-induzierter apoptotischer Zellen verringern. Des Weiteren scheint lediglich eine simultane Bestrahlung einen positiven Einfluss auf die UVB-induzierten Schäden zu haben. Die sequentiellen Bestrahlungen der HaCaT-Zellen mit UVA und UVB reflektieren die Ergebnisse der UVB-Einzelbestrahlung. Die Daten zeigen somit, dass es einen großen Unterschied macht, ob *in vitro* und *in vivo* Bestrahlungsstudien mit Einzelspektren oder simultanen Spektren (z.B. UVA und UVB) durchgeführt werden. Auf Grund der potentiellen Relevanz dieser Erkenntnis für die Photoprotektion der Haut, bedarf es weiterer Validierung, beispielsweise im Rahmen akuter und chronischer Bestrahlungsstudien am Nagermode.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der AHR eine wichtige Funktion in der UV-induzierten Stressantwort spielt. So konnte bewiesen werden, dass die durch FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität maßgeblich durch die Aktivität des AHR beeinflusst werden kann (Abb. 34).

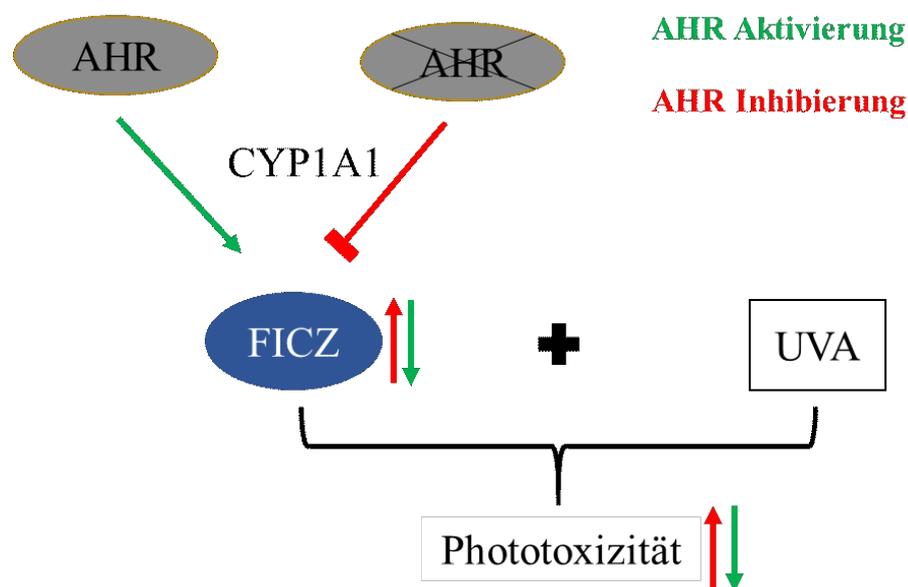


Abbildung 34: Die durch FICZ/UVA-induzierte Phototoxizität wird durch die Aktivität des AHR beeinflusst

Erste Hinweise geben zudem einen Anhaltspunkt, dass der AHR eine bedeutende Rolle bei Arzneimittel-induzierten phototoxischen Reaktionen der Haut haben könnte. Simultane Bestrahlungsstudien zeigen hinzukommend auf, dass UVA-Strahlung die UVB-induzierten

Schäden (*in vitro* und *in vivo*) und die Apoptose (in HaCaT-Zellen, HaCaT-EV- und HaCaT-shAHR-Keratinocyten) hemmt. Die Befunde dieser Arbeit sind daher für den Schutz der Haut vor UV-induzierten Schäden sowie der Behandlung von adversen Effekten bei der Einnahme photosensibilisierender Arzneimittel von bedeutender Relevanz.

5. Literaturverzeichnis

Abel J, Haarmann-Stemmann T (2010): An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological chemistry* 391: 1235–1248.

Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004): The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4954–4959.

Agostinis P, Garmyn M, van Laethem (2007): The Aryl hydrocarbon receptor: an illuminating effector of the UVB response. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007: pe49.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999): Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. biol. chem.* 274: 26071–26078.

Baek JY, Park S, Park J, Jang JY, Wang SB, Kim SR, Woo HA, Lim KM, Chang T-S (2017): Protective Role of Mitochondrial Peroxiredoxin III against UVB-Induced Apoptosis of Epidermal Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 137: 1333–1342.

Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W (2006): Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophysical journal* 91: 1452–1459.

Baird L, Dinkova-Kostova AT (2011): The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of toxicology* 85: 241–272.

Baird L, Llères D, Swift S, Dinkova-Kostova AT (2013): Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 15259–15264.

Baron JM, Höller D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK (2001): Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 116: 541–548.

Batista LFZ, Kaina B, Meneghini R, Menck CFM (2009): How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutation research* 681: 197–208.

- Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C, Verschoore M (2014):** New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Experimental dermatology* 23 Suppl 1: 7–12.
- Becker MM, Wang Z (1989):** Origin of ultraviolet damage in DNA. *Journal of Molecular Biology* 210: 429–438.
- Ben-Neriah Y, Karin M (2011):** Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature immunology* 12: 715–723.
- Bergander L, Wahlström N, Alsberg T, Bergman J, Rannug A, Rannug U (2003):** Characterization of in vitro metabolites of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole by liquid chromatography-mass spectrometry and NMR. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31: 233–241.
- Bergander L, Wincent E, Rannug A, Foroozesh M, Alworth W, Rannug U (2004):** Metabolic fate of the Ah receptor ligand 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chemico-biological interactions* 149: 151–164.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012):** Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal* 5: 9–19.
- Bissonnette R, Bolduc C, Maari C, Nigen S, Webster JM, Tang L, Lyle M (2012a):** Efficacy and safety of topical WBI-1001 in patients with mild to moderate psoriasis: results from a randomized double-blind placebo-controlled, phase II trial. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 26: 1516–1521.
- Bissonnette R, Poulin Y, Zhou Y, Tan J, Hong HC, Webster J, Ip W, Tang L, Lyle M (2012b):** Efficacy and safety of topical WBI-1001 in patients with mild to severe atopic dermatitis: results from a 12-week, multicentre, randomized, placebo-controlled double-blind trial. *The British journal of dermatology* 166: 853–860.
- Black AT, Gray JP, Shakarjian MP, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD (2008):** Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231: 384–392.
- Bock KW, Köhle C (2006):** Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical pharmacology* 72: 393–404.
- Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KYJ, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm**

- M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K (2010):** Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596–599.
- Botta C, Di Giorgio C, Sabatier A-S, Méo M de (2009):** Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzoapyrene and pyrene. *Environmental toxicology* 24: 492–505.
- Boudon SM, Plappert-Helbig U, Odermatt A, Bauer D (2014):** Characterization of vemurafenib phototoxicity in a mouse model. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 137: 259–267.
- Bowden GT (2004):** Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature reviews. Cancer* 4: 23–35.
- Boyer JZ, Jandova J, Janda J, Vleugels FR, Elliott DA, Sligh JE (2012):** Resveratrol-sensitized UVA induced apoptosis in human keratinocytes through mitochondrial oxidative stress and pore opening. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 113: 42–50.
- Brenner M, Hearing VJ (2008):** The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology* 84: 539–549.
- Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V (1999):** The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of assisted reproduction and genetics* 16: 512–519.
- Brugière C, Stefan A, Morice C, Cornet E, Moreau A, Allouche S, Verneuil L (2014):** Vemurafenib skin phototoxicity is indirectly linked to ultraviolet A minimal erythema dose decrease. *The British journal of dermatology* 171: 1529–1532.
- Bruhs A, Haarmann-Stemann T, Frauenstein K, Krutmann J, Schwarz T, Schwarz A (2015):** Activation of the arylhydrocarbon receptor causes immunosuppression primarily by modulating dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology* 135: 435–444.
- Buchczyk DP, Klotz LO, Lang K, Fritsch C, Sies H (2001):** High efficiency of 5-aminolevulinate-photodynamic treatment using UVA irradiation. *Carcinogenesis* 22: 879–883.
- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP (1998):** COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19: 723–729.
- Burbach KM, Poland A, Bradfield CA (1992):** Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8185–8189.

- Cadet J, Douki T, Ravanat J-L, Di Mascio P (2009):** Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 8: 903–911.
- Carver LA, Bradfield CA (1997):** Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J. biol. chem.* 272: 11452–11456.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA (2011):** Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* 364: 2507–2516.
- Cheng EH-Y, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ (2001):** BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Molecular cell* 8: 705–711.
- Cho K-A, Suh JW, Lee KH, Kang JL, Woo S-Y (2012):** IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int Immunol* 24: 147–158.
- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS (1993):** Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. biol. chem.* 268: 2571–2576.
- Clarke PG, Clarke S (1996):** Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and embryology* 193: 81–99.
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2009):** Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30: 1073–1081.
- Cruz PD, Bergstresser PR (1993):** Photoimmunology: Effects of Ultraviolet B Radiation on Cutaneous Photocarcinogenesis and Allergic Contact Sensitivity. In: Lim HW (Hrsg.), *Clinical Photomedicine*. Routledge First edition, Boca Raton, FL, 137–151.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho K-H, Aiba S, Bröcker E-B, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC (2005):** Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine* 353: 2135–2147.

- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF (1995):** Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5545–5549.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC (1996):** Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *The Biochemical journal* 320 (Pt 3): 997–1003.
- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stravrides JC (1995):** Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *British journal of pharmacology* 114: 1257–1265.
- Denault J-B, Salvesen GS (2002):** Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical reviews* 102: 4489–4500.
- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP (1988):** The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J. biol. chem.* 263: 17221–17224.
- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP (1989):** Protein-DNA interactions at recognition sites for the dioxin-Ah receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 264: 16478–16482.
- D'Errico M, Teson M, Calcagnile A, Proietti De Santis L, Nikaido O, Botta E, Zambruno G, Stefanini M, Dogliotti E (2003):** Apoptosis and efficient repair of DNA damage protect human keratinocytes against UVB. *Cell death and differentiation* 10: 754–756.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC (1999):** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of cell biology* 144: 891–901.
- Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M (1992):** The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases. *Cell* 71: 1081–1091.
- Devary Y, Rosette C, DiDonato JA, Karin M (1993):** NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science (New York, N.Y.)* 261: 1442–1445.
- Diette KM, Gange RW, Stern RS, Arndt KA, Parrish JA (1983):** Coal tar phototoxicity: kinetics and exposure parameters. *Journal of Investigative Dermatology* 81: 347–350.
- Di-Poi N, Michalik L, Tan NS, Desvergne B, Wahli W (2003):** The anti-apoptotic role of PPAR β contributes to efficient skin wound healing. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85: 257–265.

- Dong B, Cheng W, Li W, Zheng J, Wu D, Matsumura F, Vogel CFA (2011):** FRET analysis of protein tyrosine kinase c-Src activation mediated via aryl hydrocarbon receptor. *Biochimica et biophysica acta* 1810: 427–431.
- Doonan F, Cotter TG (2008):** Morphological assessment of apoptosis. *Methods (San Diego, Calif.)* 44: 200–204.
- Dummer R, Rinderknecht J, Goldinger SM (2012):** Ultraviolet A and Photosensitivity during Vemurafenib Therapy. *The New England journal of medicine* 366: 480–481.
- Eckert RL, Rorke EA (1989):** Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environmental Health Perspectives* 80: 109–116.
- El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V (2009):** A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology* 10: 751–752.
- Eller MS, Maeda T, Magnoni C, Atwal D, Gilchrest BA (1997):** Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12627–12632.
- Elmets CA, Athar M (2013):** Milestones in photocarcinogenesis. *The Journal of investigative dermatology* 133: E13-7.
- Elmets CA, Ledet JJ, Athar M (2014):** Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *The Journal of investigative dermatology* 134: 2497–2502.
- Elmore S (2007):** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35: 495–516.
- Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O, Funae Y, Fujii-Kuriyama Y (1992):** cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 184: 246–253.
- Enan E, Matsumura F (1996):** Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochemical pharmacology* 52: 1599–1612.
- Fagot D, Asselineau D, Bernerd F (2002):** Direct role of human dermal fibroblasts and indirect participation of epidermal keratinocytes in MMP-1 production after UV-B irradiation. *Archives of dermatological research* 293: 576–583.

- Frauenstein K, Sydlik U, Tigges J, Majora M, Wiek C, Hanenberg H, Abel J, Esser C, Fritsche E, Krutmann J, Haarmann-Stemmann T (2013):** Evidence for a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes involving the aryl hydrocarbon receptor, E2F1, and checkpoint kinase 1. *Cell death and differentiation* 20: 1425–1434.
- Fritsche E, Schäfer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, Hübenthal U, Cline JE, Hajimiragha H, Schroeder P, Klotz L-O, Rannug A, Fürst P, Hanenberg H, Abel J, Krutmann J (2007):** Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8851–8856.
- Fuchs E (1994):** Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu symposia* 24: 290–302.
- Furue M, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G (2019):** Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *International journal of molecular sciences* 20.
- Furue M, Tsuji G, Mitoma C, Nakahara T, Chiba T, Morino-Koga S, Uchi H (2015):** Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor. *Journal of dermatological science* 80: 83–88.
- Fyhrquist N, Muirhead G, Prast-Nielsen S, Jeanmougin M, Olah P, Skoog T, Jules-Clement G, Feld M, Barrientos-Somarrivas M, Sinkko H, van den Bogaard EH, Zeeuwen PLJM, Rikken G, Schalkwijk J, Niehues H, Däubener W, Eller SK, Alexander H, Pennino D, Suomela S, Tessa I, Lybeck E, Baran AM, Darban H, Gangwar RS, Gerstel U, Jahn K, Karisola P, Yan L, Hansmann B, Katayama S, Meller S, Bylesjö M, Hupé P, Levi-Schaffer F, Greco D, Ranki A, Schröder JM, Barker J, Kere J, Tsoka S, Lauerma A, Soumelis V, Nestle FO, Homey B, Andersson B, Alenius H (2019):** Microbe-host interplay in atopic dermatitis and psoriasis. *Nature communications* 10: 4703.
- Gelot P, Dutartre H, Khammari A, Boisrobert A, Schmitt C, Deybach J-C, Nguyen J-M, Seité S, Dréno B (2013):** Vemurafenib: an unusual UVA-induced photosensitivity. *Experimental dermatology* 22: 297–298.
- George SA, Bilsland DJ, Johnson BE, Ferguson J (1993):** Narrow-band (TL-01) UVB air-conditioned phototherapy for chronic severe adult atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 128: 49–56.
- Giani Tagliabue S, Faber SC, Motta S, Denison MS, Bonati L (2019):** Modeling the binding of diverse ligands within the Ah receptor ligand binding domain. *Scientific reports* 9: 10693.

Gilchrest BA, Krutmann J (2006): Skin aging. Springer, Berlin.

Gonçalo M (2019): Phototoxic Dermatitis. In: John SM, Johansen JD, Rustemeyer T, Elsner P, Maibach HI (Hrsg.), *Kanerva's Occupational Dermatology*. Springer International Publishing; Imprint; Springer, Cham, 1–20.

Gould J, Mercurio M, Elmetts C (1995): Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. | wizdom.ai - intelligence for everyone. wizdom.ai.

Greinert R, Boguhn O, Volkmer B, Harder D, Breitbart EW (1999): Repair of UV-B-Induced Damage in Human Keratinocytes. In: Baumstark-Khan C, Horneck G, Kozubek S (Hrsg.), *Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation*. [proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation, Brno, Czech Republic, 6-10 October 1997]. Published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division [by] Kluwer Academic, Dordrecht, 149–154.

Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC (1999): Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79: 1121–1126.

Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS (2012): IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Experimental dermatology* 21: 104–110.

Haarmann-Stemmann T, Esser C, Krutmann J (2015): The Janus-Faced Role of Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling in the Skin: Consequences for Prevention and Treatment of Skin Disorders. *The Journal of investigative dermatology* 135: 2572–2576.

Hamanaka RB, Glasauer A, Hoover P, Yang S, Blatt H, Mullen AR, Getsios S, Gottardi CJ, DeBerardinis RJ, Lavker RM, Chandel NS (2013): Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Science signaling* 6: ra8.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003): Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science* 116: 4077–4085.

Hawerkamp HC, Kislak A, Gerber PA, Pollet M, Rolfes KM, Soshilov AA, Denison MS, Momin AA, Arold ST, Datsi A, Braun SA, Oláh P, Lacouture ME, Krutmann J, Haarmann-Stemmann T, Homey B, Meller S (2019): Vemurafenib acts as an aryl hydrocarbon receptor antagonist: Implications for inflammatory cutaneous adverse events. *Allergy* 74: 2437–2448.

- He X, Lin GX, Chen MG, Zhang JX, Ma Q (2007):** Protection against chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis by Nrf2. Recruiting Nrf2 into the nucleus and disrupting the nuclear Nrf2/Keap1 association. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 98: 298–309.
- He Y-Y, Huang J-L, Sik RH, Liu J, Waalkes MP, Chignell CF (2004):** Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* 122: 533–543.
- Healy E, Reynolds NJ, Smith MD, Campbell C, Farr PM, Rees JL (1994):** Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UVB irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. *Journal of Investigative Dermatology* 103: 493–499.
- Heffernan TP, Kawasumi M, Blasina A, Anderes K, Conney AH, Nghiem P (2009):** ATR-Chk1 pathway inhibition promotes apoptosis after UV treatment in primary human keratinocytes: potential basis for the UV protective effects of caffeine. *The Journal of investigative dermatology* 129: 1805–1815.
- Heinrich PC, Koch H-G, Brix J (2014):** Apoptose – Der programmierte Zelltod. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer 9., vollst. überarb. Aufl., Berlin, 633–637.
- Hengartner MO (2000):** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776.
- Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T (1997):** Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 109: 722–727.
- Heppt MV, Clanner-Engelshofen BM, Marsela E, Wessely A, Kammerbauer C, Przybilla B, French LE, Berking C, Reinholz M (2020):** Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 36: 126–134.
- Herrlich P, Karin M, Weiss C (2008):** Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response. *Molecular cell* 29: 279–290.
- Herrlich P, Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Gebel S, Blattner C, Rahmsdorf HJ (1994):** The mammalian UV response: Mechanism of DNA damage induced gene expression. *Advances in Enzyme Regulation* 34: 381–395.

- Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Fujimura T, Aiba S, Nakayama K, Okuyama R, Yamamoto M (2017):** The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nature immunology* 18: 64–73.
- Holick MF (2008):** Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? *Advances in experimental medicine and biology* 624: 1–15.
- Huang HC, Nguyen T, Pickett CB (2000):** Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 12475–12480.
- Ibuki Y, Allanson M, Dixon KM, Reeve VE (2007):** Radiation sources providing increased UVA/UVB ratios attenuate the apoptotic effects of the UVB waveband UVA-dose-dependently in hairless mouse skin. *The Journal of investigative dermatology* 127: 2236–2244.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y (1997):** An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* 236: 313–322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M (2003):** Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 8: 379–391.
- Jackson SP (2002):** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), 687-696. *Carcinogenesis* 23: 687–696.
- Jacobson MD, Burne JF, Raff MC (1994):** Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 13: 1899–1910.
- Jain S (2012):** *Dermatology - illustrated study guide and comprehensive board review. Illustrated study guide and comprehensive board review.* Springer-verlag New York Inc, New York.
- Janes SM, Lowell S, Hutter C (2002):** Epidermal stem cells. *J. Pathol.* 197: 479–491.
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998):** Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. biol. chem.* 273: 9357–9360.
- Jans J, Garinis GA, Schul W, van Oudenaren A, Moorhouse M, Smid M, Sert Y-G, van der Velde A, Rijksen Y, Gruijl FR de, van der Spek PJ, Yasui A, Hoeijmakers JHJ, Leenen PJM,**

- van der Horst GTJ (2006):** Differential role of basal keratinocytes in UV-induced immunosuppression and skin cancer. *MCB* 26: 8515–8526.
- Jayakumar S, Pal D, Sandur SK (2015):** Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutation research* 779: 33–45.
- Johnson RD, Jasin M (2001):** Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society transactions* 29: 196–201.
- Justiniano R, Faria Lopes L de, Perer J, Hua A, Park SL, Jandova J, Baptista MS, Wondrak GT (2020):** The Endogenous Tryptophan-derived Photoproduct 6-formylindolo3,2-bcarbazole (FICZ) Is a Nanomolar Photosensitizer That Can Be Harnessed for the Photodynamic Elimination of Skin Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Photochemistry and photobiology*.
- Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL (2002):** The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J. biol. chem.* 277: 16547–16552.
- Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, Nagata K, Yoshida M, Ishigami A (2018):** Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Scientific reports* 8: 16199.
- Kim DH, Byamba D, Wu WH, Kim T-G, Lee M-G (2012):** Different characteristics of reactive oxygen species production by human keratinocyte cell line cells in response to allergens and irritants. *Experimental dermatology* 21: 99–103.
- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF (1999):** Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. biol. chem.* 274: 13908–13914.
- Kiyomatsu-Oda M, Uchi H, Morino-Koga S, Furue M (2018):** Protective role of 6-formylindolo3,2-bcarbazole (FICZ), an endogenous ligand for arylhydrocarbon receptor, in chronic mite-induced dermatitis. *Journal of dermatological science* 90: 284–294.
- Köhle C, Gschaidmeier H, Lauth D, Topell S, Zitzer H, Bock KW (1999):** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells. *Archives of toxicology* 73: 152–158.
- Kollias N, Ruvolo E, Sayre RM (2011):** The value of the ratio of UVA to UVB in sunlight. *Photochemistry and photobiology* 87: 1474–1475.

- Korashy HM, Shayeganpour A, Brocks DR, El-Kadi AOS (2007):** Induction of cytochrome P450 1A1 by ketoconazole and itraconazole but not fluconazole in murine and human hepatoma cell lines. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 97: 32–43.
- Kovacs D, Raffa S, Flori E, Aspite N, Briganti S, Cardinali G, Torrisi MR, Picardo M (2009):** Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *Journal of dermatological science* 54: 106–113.
- Kovalenko A, Kim J-C, Kang T-B, Rajput A, Bogdanov K, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Brenner O, Wallach D (2009):** Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *The Journal of experimental medicine* 206: 2161–2177.
- Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB (1992):** Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 7516–7520.
- Krutmann J, Morita A, Chung JH (2012):** Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *The Journal of investigative dermatology* 132: 976–984.
- Lacouture ME, Duvic M, Hauschild A, Prieto VG, Robert C, Schadendorf D, Kim CC, McCormack CJ, Myskowski PL, Spleiss O, Trunzer K, Su F, Nelson B, Nolop KB, Grippo JF, Lee RJ, Klimek MJ, Troy JL, Joe AK (2013):** Analysis of dermatologic events in vemurafenib-treated patients with melanoma. *The oncologist* 18: 314–322.
- Lavilla R, Ghashghaei O, Pedrola M, Seghetti F, Martin VV, Zavarce R, Babiak M, Novacek J, Hartung F, Rolfes K, Haarmann-Stemmann T (2020):** Extended Multicomponent Reactions with Indole Aldehydes. Access to Unprecedented Polyheterocyclic Scaffolds, Ligands of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Angew. Chem.*
- Lee J-M, Johnson JA (2004):** An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37: 139–143.
- Lee S-M, Kleiboeker SB (2007):** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365: 419–434.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM (1993):** p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14: 833–839.
- Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J (1998):** Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94: 491–501.

- Li J, Chen G, Wu H, Webster JM (1995):** Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photobacterium luminescens*. *Applied and environmental microbiology* 61: 4329–4333.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997):** Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91: 479–489.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W-X, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon M, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000):** The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues. *Molecular cell* 6: 1389–1399.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W (2009):** Cell death in the skin. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 14: 549–569.
- Liu J, Sridhar J, Foroozesh M (2013):** Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships. *Molecules (Basel, Switzerland)* 18: 14470–14495.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001):** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25: 402–408.
- Llesuy SF, Tomaro ML (1994):** Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1223: 9–14.
- Loo LSW, Soetedjo AAP, Lau HH, Ng NHJ, Ghosh S, Nguyen L, Krishnan VG, Choi H, Roca X, Hoon S, Teo AKK (2020):** BCL-xL/BCL2L1 is a critical anti-apoptotic protein that promotes the survival of differentiating pancreatic cells from human pluripotent stem cells. *Cell death & disease* 11: 378.
- Loprieno N (1992):** Guidelines for safety evaluation of cosmetics ingredients in the EC countries. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 30: 809–815.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993):** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847–849.
- Lu X (1993):** Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: Defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75: 765–778.

- Lu Y-F, Santostefano M, Cunningham BD, Threadgill MD, Safe S (1996):** Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists. *Biochemical pharmacology* 51: 1077–1087.
- Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A (2010):** The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment cell & melanoma research* 23: 828–833.
- Lushchak VI (2014):** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions* 224: 164–175.
- Ma Q, Whitlock JP (1997):** A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. biol. chem.* 272: 8878–8884.
- Maalouf S, El-Sabban M, Darwiche N, Gali-Muhtasib H (2002):** Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. *Molecular carcinogenesis* 34: 121–130.
- Magiatis P, Pappas P, Gaitanis G, Mexia N, Melliou E, Galanou M, Vlachos C, Stathopoulou K, Skaltsounis AL, Marselos M, Velegraki A, Denison MS, Bassukas ID (2013):** Malassezia yeasts produce a collection of exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin. *The Journal of investigative dermatology* 133: 2023–2030.
- Maltzman W, Czyzyk L (1984):** UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *MCB* 4: 1689–1694.
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ (2014):** Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15: 465–481.
- Matoltsy AG, Balsamo CA (1955):** A study of the components of the cornified epithelium of human skin. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1: 339–360.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD (2003):** Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. biol. chem.* 278: 21592–21600.
- Mescher M, Tigges J, Rolfes KM, Shen AL, Yee JS, Vogeley C, Krutmann J, Bradfield CA, Lang D, Haarmann-Stemmann T (2019):** The Toll-like receptor agonist imiquimod is metabolized by aryl hydrocarbon receptor-regulated cytochrome P450 enzymes in human keratinocytes and mouse liver. *Archives of toxicology* 93: 1917–1926.

- Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G (2005):** Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. biol. chem.* 280: 20340–20348.
- Mohamed KN (1988):** Severe photodermatitis during ketoconazole therapy. *Clinical and experimental dermatology* 13: 54.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW (1994):** Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 9926–9930.
- Nakatsuru Y, Wakabayashi K, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T, Kusama K, Ide F (2004):** DibenzoA,Lpyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *International journal of cancer* 112: 179–183.
- Navid F, Bruhs A, Schuller W, Fritsche E, Krutmann J, Schwarz T, Schwarz A (2013):** The Aryl hydrocarbon receptor is involved in UVR-induced immunosuppression. *The Journal of investigative dermatology* 133: 2763–2770.
- Nebert DW, Dalton TP (2006):** The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer* 6: 947–960.
- Nguyen CN, Kim H-E, Lee S-G (2013):** Caffeoylserotonin protects human keratinocyte HaCaT cells against H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis through upregulation of HO-1 expression via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Phytotherapy research : PTR* 27: 1810–1818.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Huang H-C, Yang CS, Pickett CB (2003):** Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. biol. chem.* 278: 4536–4541.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991):** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139: 271–279.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH (2003):** Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology* 24: 449–455.

- Pachori AS, Smith A, McDonald P, Zhang L, Dzau VJ, Melo LG (2007):** Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43: 580–592.
- Paine MF, Schmiedlin-Ren P, Watkins PB (1999):** Cytochrome P-450 1A1 expression in human small bowel: interindividual variation and inhibition by ketoconazole. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27: 360–364.
- Paller AS, Kong HH, Seed P, Naik S, Scharschmidt TC, Gallo RL, Luger T, Irvine AD (2019):** The microbiome in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 143: 26–35.
- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WHI (2006):** Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics* 38: 441–446.
- Park C-H, Lee MJ, Kim J-P, Yoo ID, Chung JH (2006):** Prevention of UV radiation-induced premature skin aging in hairless mice by the novel compound Melanocin A. *Photochemistry and photobiology* 82: 574–578.
- Park SL, Justiniano R, Williams JD, Cabello CM, Qiao S, Wondrak GT (2015):** The Tryptophan-Derived Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazole Is a Nanomolar UVA Photosensitizer in Epidermal Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 135: 1649–1658.
- Park Y-K, Jang B-C (2014):** UVB-induced anti-survival and pro-apoptotic effects on HaCaT human keratinocytes via caspase- and PKC-dependent downregulation of PKB, HIAP-1, Mcl-1, XIAP and ER stress. *International Journal of Molecular Medicine* 33: 695–702.
- Parrish JA, Jaenicke KF (1981):** Action spectrum for phototherapy of psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 76: 359–362.
- Pavey S, Russell T, Gabrielli B (2001):** G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene* 20: 6103–6110.
- Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J (2008):** Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 24: 115–122.

- Peppers J, Paller AS, Maeda-Chubachi T, Wu S, Robbins K, Gallagher K, Kraus JE (2019):** A phase 2, randomized dose-finding study of tapinarof (GSK2894512 cream) for the treatment of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 80: 89-98.e3.
- Peters B, Holzhütter H-G (2002):** In vitro phototoxicity testing: development and validation of a new concentration response analysis software and biostatistical analyses related to the use of various prediction models. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 30: 415–432.
- Petersen AB, Gniadecki R, Vicanova J, Thorn T, Wulf HC (2000):** Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 59: 123–131.
- Petrulis JR, Perdew GH (2002):** The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chemico-biological interactions* 141: 25–40.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010):** H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids* 2010.
- Poland A, Glover E, Kende AS (1976):** Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. biol. chem.* 251: 4936–4946.
- Pollet M, Shaik S, Mescher M, Frauenstein K, Tigges J, Braun SA, Sondenheimer K, Kaveh M, Bruhs A, Meller S, Homey B, Schwarz A, Esser C, Douki T, Vogel CFA, Krutmann J, Haarmann-Stemann T (2018):** The AHR represses nucleotide excision repair and apoptosis and contributes to UV-induced skin carcinogenesis. *Cell death and differentiation* 25: 1823–1836.
- Poon TSC, Barnetson RSC, Halliday GM (2005):** Sunlight-induced immunosuppression in humans is initially because of UVB, then UVA, followed by interactive effects. *Journal of Investigative Dermatology* 125: 840–846.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M (2008):** The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology* 17: 1063–1072.
- Randi AS, Sanchez MS, Alvarez L, Cardozo J, Pontillo C, Kleiman de Pisarev DL (2008):** Hexachlorobenzene triggers AhR translocation to the nucleus, c-Src activation and EGFR transactivation in rat liver. *Toxicology letters* 177: 116–122.
- Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafström AK (1987):** Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah

receptor and are likely to be endogenous signal substances. *The Journal of biological chemistry* 262: 15422–15427.

Rannug U, Rannug A, Sjöberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J (1995): Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chemistry & biology* 2: 841–845.

Rassner G, Steinert U (2009): *Dermatologie. Lehrbuch und Atlas.* Elsevier Urban & Fischer, 9., durchges. und aktualisierte Aufl., München.

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA (2016): Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta* 1863: 2977–2992.

Reinen J, van Sas P, van Huygevoort T, Rubio L, Scase K, Wenker M (2018): Development of a Phototoxicity Testing Strategy for Accurate Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals Based on the Assessment of Possible Melanin-Binding Effects. *International journal of toxicology* 37: 296–307.

Rezvani HR, Mazurier F, Cario-André M, Pain C, Ged C, Taïeb A, Verneuil H de (2006): Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J. biol. chem.* 281: 17999–18007.

Roelofzen JHJ, Aben KKH, van de Kerkhof PCM, van der Valk PGM, Kiemeneij LALM (2015): Dermatological exposure to coal tar and bladder cancer risk: a case-control study. *Urologic oncology* 33: 20.e19-20.e22.

Roelofzen JHJ, van der Valk PGM, Godschalk R, Dettbarn G, Seidel A, Golsteijn L, Anzion R, Aben KKH, van Schooten FJ, Kiemeneij LALM, Scheepers PTJ (2012): DNA adducts in skin biopsies and 1-hydroxypyrene in urine of psoriasis patients and healthy volunteers following treatment with coal tar. *Toxicology letters* 213: 39–44.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. biol. chem.* 273: 5858–5868.

Rolfsmeier ML, Laughery MF, Haseltine CA (2010): Repair of DNA double-strand breaks following UV damage in three *Sulfolobus solfataricus* strains. *Journal of bacteriology* 192: 4954–4962.

Roos WP, Thomas AD, Kaina B (2016): DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature reviews. Cancer* 16: 20–33.

Rosette C, Karin M (1996): Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science (New York, N.Y.)* 274: 1194–1197.

- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003):** Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *MCB* 23: 5706–5715.
- Rushmore TH, Pickett CB (1990):** Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. biol. chem.* 265: 14648–14653.
- Ryu W-I, Park Y-H, Bae HC, Kim JH, Jeong SH, Lee H, Son SW (2014):** ZnO nanoparticle induces apoptosis by ROS triggered mitochondrial pathway in human keratinocytes. *Mol. Cell. Toxicol.* 10: 387–391.
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ (1997):** Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science (New York, N.Y.)* 277: 1497–1501.
- Santella RM, Nunes MG, Blaskovic R, Perera FP, Tang D, Beachman A, Lin JH, DeLeo VA (1994):** Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-hydroxypyrene, and mutagenicity in urine of coal tar-treated psoriasis patients and untreated volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 137–140.
- Sato K, Taguchi H, Maeda T, Minami H, Asada Y, Watanabe Y, Yoshikawa K (1995):** The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *The Journal of investigative dermatology* 105: 608–612.
- Schaefer H, Redelmeier TE (1996):** Skin barrier. Principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- Schäfer M, Werner S (2015):** Nrf2--A regulator of keratinocyte redox signaling. *Free radical biology & medicine* 88: 243–252.
- Schärer OD (2013):** Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a012609.
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J (1997):** UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biological chemistry* 378: 1247–1257.
- Schirmer K, Chan A, Greenberg B, Dixon D, Bols N (1998):** Ability of 16 priority PAHs to be photocytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* 127: 143–155.

- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA (1996):** Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6731–6736.
- Schwarz A, Maeda A, Kernebeck K, van Steeg H, Beissert S, Schwarz T (2005):** Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *Journal of Experimental Medicine* 201: 173–179.
- Schwarz T (2005a):** Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *The Keio journal of medicine* 54: 165–171.
- Schwarz T (2005b):** Regulatory T cells induced by ultraviolet radiation. *International Archives of Allergy and Immunology* 137: 187–193.
- Schwarz T, Beissert S (2013):** Milestones in photoimmunology. *The Journal of investigative dermatology* 133: E7-E10.
- Schwarz T, Schwarz A (2011):** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *European journal of cell biology* 90: 560–564.
- Scordi IA, Vincek V (2000):** Timecourse study of UVB-induced cytokine induction in whole mouse skin. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 16: 67–73.
- Selvaag E (1997):** Clinical drug photosensitivity. A retrospective analysis of reports to the Norwegian Adverse Drug Reactions Committee from the years 1970-1994. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 13: 21–23.
- Setlow RB, Carrier WL (1963):** IDENTIFICATION OF ULTRAVIOLET-INDUCED THYMINE DIMERS IN DNA BY ABSORBANCE MEASUREMENTS. *Photochemistry and photobiology* 2: 49–57.
- Seto Y, Ohtake H, Sato H, Onoue S (2020):** Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP 113: 104619.
- Shah P, He Y-Y (2015):** Molecular regulation of UV-induced DNA repair. *Photochemistry and photobiology* 91: 254–264.
- Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M (2000):** The Mammalian UV Response. *Cell* 103: 897–908.

- Shi H, Kwok RTK, Liu J, Xing B, Tang BZ, Liu B (2012):** Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics. *Journal of the American Chemical Society* 134: 17972–17981.
- Shi Y (2004):** Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13: 1979–1987.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T (2000):** Benzo(a)pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 779–782.
- Sies H (2015):** Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology* 4: 180–183.
- Simon M, Haftek M, Sebbag M, Montézin M, Girbal-Neuhausser E, Schmitt D, Serre G (1996):** Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. *The Biochemical journal* 317 (Pt 1): 173–177.
- Simon MM, Aragane Y, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T (1994):** UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *The Journal of investigative dermatology* 102: 422–427.
- Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF (2002):** Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J. biol. chem.* 277: 19346–19352.
- Smith SH, Jayawickreme C, Rickard DJ, Nicodeme E, Bui T, Simmons C, Coquery CM, Neil J, Pryor WM, Mayhew D, Rajpal DK, Creech K, Furst S, Lee J, Wu D, Rastinejad F, Willson TM, Viviani F, Morris DC, Moore JT, Cote-Sierra J (2017):** Tapinarof Is a Natural AhR Agonist that Resolves Skin Inflammation in Mice and Humans. *The Journal of investigative dermatology* 137: 2110–2119.
- Smits JPH, Ederveen THA, Rikken G, van den Brink NJM, van Vlijmen-Willems IMJJ, Boekhorst J, Kamsteeg M, Schalkwijk J, van Hijum SAFT, Zeeuwen PLJM, van den Bogaard EH (2020):** Targeting the Cutaneous Microbiota in Atopic Dermatitis by Coal Tar via AHR-Dependent Induction of Antimicrobial Peptides. *The Journal of investigative dermatology* 140: 415-424.e10.
- Smolle J (2003):** Histologische Strukturen der normalen Haut. In: Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH (Hrsg.), *Histopathologie der Haut*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., 73–84.

- Sørensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuåsen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005):** The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology* 7: 195–201.
- Stefanovic N, Flohr C, Irvine AD (2020):** The exposome in atopic dermatitis. *Allergy* 75: 63–74.
- Sterry W, Czaika VA (2011):** Kurzlehrbuch Dermatologie. Thieme, Stuttgart.
- Steven AC, Steinert PM (1994):** Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *Journal of cell science* 107 (Pt 2): 693–700.
- Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J (2003):** Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J. biol. chem.* 278: 2396–2402.
- Stiewe T, Pützer BM (2000):** Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nature genetics* 26: 464–469.
- Sutter CH, Bodreddigari S, Campion C, Wible RS, Sutter TR (2011):** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the expression of genes in the human epidermal differentiation complex and accelerates epidermal barrier formation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124: 128–137.
- Sutter CH, Yin H, Li Y, Mammen JS, Bodreddigari S, Stevens G, Cole JA, Sutter TR (2009):** EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 4266–4271.
- Svobodová AR, Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Lichnovská R, Ulrichová J, Vostálová J (2012):** DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. *Archives of dermatological research* 304: 407–412.
- Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR, Udey MC (1993):** Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361: 82–85.
- Telorack M, Abplanalp J, Werner S (2016):** Low levels of glutathione are sufficient for survival of keratinocytes after UV irradiation and for healing of mouse skin wounds. *Archives of dermatological research* 308: 443–448.
- Thude S, Kluger PJ, Schenke-Layland K (2015):** In vitro-Hauttestsysteme zur Untersuchung lichtassoziierter Hautschädigung. *Biospektrum* 21: 172–174.

- Tigges J, Haarmann-Stemann T, Vogel CFA, Grindel A, Hübenthal U, Brenden H, Grether-Beck S, Vielhaber G, Johncock W, Krutmann J, Fritsche E (2014):** The new aryl hydrocarbon receptor antagonist E/Z-2-benzylindene-5,6-dimethoxy-3,3-dimethylindan-1-one protects against UVB-induced signal transduction. *The Journal of investigative dermatology* 134: 556–559.
- Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, Pohjanvirta R (2006):** Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Molecular pharmacology* 69: 140–153.
- Timares L, Katiyar SK, Elmets CA (2008):** DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochemistry and photobiology* 84: 422–436.
- Tintle S, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fujita H, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Johnson-Huang L, Chiricozzi A, Cardinale I, Duan S, Bowcock A, Krueger JG, Guttman-Yassky E (2011):** Reversal of atopic dermatitis with narrow-band UVB phototherapy and biomarkers for therapeutic response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128: 583-93.e1-4.
- Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Matsuda T, Chiba T, Takeuchi S, Yasukawa F, Moroi Y, Furue M (2012):** Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *The Journal of investigative dermatology* 132: 59–68.
- Ulitzur S (1972):** Rapid determination of DNA base composition by ultraviolet spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 272: 1–11.
- Valencia A, Kochevar IE (2008):** Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 128: 214–222.
- van den Bogaard EH, Bergboer JGM, Vonk-Bergers M, van Vlijmen-Willems IMJJ, Hato SV, van der Valk PGM, Schröder JM, Joosten I, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J (2013):** Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation* 123: 917–927.
- van den Bogaard EH, Podolsky MA, Smits JP, Cui X, John C, Gowda K, Desai D, Amin SG, Schalkwijk J, Perdew GH, Glick AB (2015):** Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the AHR in epidermal differentiation. *The Journal of investigative dermatology* 135: 1320–1328.
- van Weelden H, La Faille HB de, Young E, van der Leun JC (1988):** A new development in UVB phototherapy of psoriasis. *The British journal of dermatology* 119: 11–19.

- Vogel CFA, van Winkle LS, Esser C, Haarmann-Stemmann T (2020):** The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors - Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox biology* 34: 101530.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003):** Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* 10: 45–65.
- Wang S, Sheng Y, Feng M, Leszczynski J, Wang L, Tachikawa H, Yu H (2007):** Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environmental toxicology* 22: 318–327.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001):** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* 292: 727–730.
- Wei Y-D, Helleberg H, Rannug U, Rannug A (1998):** Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chemico-biological interactions* 110: 39–55.
- Werth VP, Williams KJ, Fisher EA, Bashir M, Rosenbloom J, Shi X (1997):** UVB irradiation alters cellular responses to cytokines: role in extracellular matrix gene expression. *Journal of Investigative Dermatology* 108: 290–294.
- West HC, Bennett CL (2017):** Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Frontiers in Immunology* 8: 1941.
- Wincent E, Amini N, Luecke S, Glatt H, Bergman J, Crescenzi C, Rannug A, Rannug U (2009):** The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo3,2-bcarbazole is present in humans. *J. biol. chem.* 284: 2690–2696.
- Wincent E, Bengtsson J, Mohammadi Bardbori A, Alsberg T, Luecke S, Rannug U, Rannug A (2012):** Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 4479–4484.
- Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL (2006):** Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 5: 215–237.

- Woods JA, Ferguson JS, Kalra S, Degabriele A, Gardner J, Logan P, Ferguson J (2015):** The phototoxicity of vemurafenib: An investigation of clinical monochromator phototesting and in vitro phototoxicity testing. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 151: 233–238.
- Wu JH, Cohen DN, Rady PL, Tyring SK (2017):** BRAF inhibitor-associated cutaneous squamous cell carcinoma: new mechanistic insight, emerging evidence for viral involvement and perspectives on clinical management. *The British journal of dermatology* 177: 914–923.
- Xie G, Peng Z, Raufman J-P (2012):** Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 302: G1006-15.
- Yan J, Wang L, Fu PP, Yu H (2004):** Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation research* 557: 99–108.
- Youssef A, Koschimbahr A von, Caillat S, Corre S, Galibert M-D, Douki T (2019):** 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) is a Very Minor Photoproduct of Tryptophan at Biologically Relevant Doses of UVB and Simulated Sunlight. *Photochemistry and photobiology* 95: 237–243.
- Yueh M-F, Tukey RH (2007):** Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J. Biol. Chem.* 282: 8749–8758.
- Zastrow L, Groth N, Klein F, Kockott D, Lademann J, Renneberg R, Ferrero L (2009):** The missing link--light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin. *Skin pharmacology and physiology* 22: 31–44.
- Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE (1998):** Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26: 989–992.
- Zhang DD (2006):** Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug metabolism reviews* 38: 769–789.
- Zhang DD, Hannink M (2003):** Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *MCB* 23: 8137–8151.
- Zhang DD, Lo S-C, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M (2004):** Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *MCB* 24: 10941–10953.
- Zhang J, Gao JX, Salojin K, Shao Q, Grattan M, Meagher C, Laird DW, Delovitch TL (2000):** Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-

activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *Journal of Experimental Medicine* 191: 1017–1030.

Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai X-C, Huang W, Yan C, Scheres SHW, Shi Y (2015): Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & development* 29: 2349–2361.

Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE (1999): Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Experimental Cell Research* 250: 203–212.

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994): Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372: 773–776.

Zipper LM, Mulcahy RT (2000): Inhibition of ERK and p38 MAP kinases inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochemical and biophysical research communications* 278: 484–492.

Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB (2001): BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development* 15: 1481–1486.

Zuba EB, Koronowska S, Osmola-Mańkowska A, Jenerowicz D (2016): Drug-induced Photosensitivity. *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC* 24: 55–64.

6. Danksagung

Zum Ende meiner Promotion möchte ich mich bei vielen Menschen ganz herzlich bedanken. In dieser Zeit ist mir bewusst geworden, wie wichtig für mich nicht nur die professionelle und fachliche Unterstützung, sondern auch das persönliche, warme und damit sehr motivierende Umfeld war. Die tolle Unterstützung der Menschen am IUF und der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf sowie meine Freunde und Familie gaben mir großen Rückhalt und den nötigen Freiraum diese Dissertation fertigzustellen.

Ein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jean Krutmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit am IUF in Düsseldorf durchzuführen und seine fortwährend wohlwollende und hilfreiche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Henrike Heise, für die freundliche Übernahme der Aufgabe als Mentorin meiner Dissertation.

Mir ist sehr bewusst, dass dies nicht selbstverständlich und immer auch mit großem persönlichem Engagement und viel Arbeit verbunden ist. Dafür an beide nochmals meinen herzlichsten Dank.

Meinem Arbeitsgruppenleiter Priv.-Doz. Dr. Thomas Haarmann-Stemmann, der mich mit hoher fachlicher Kompetenz über die letzten Jahre meiner Promotion intensiv begleitet hat. Die vielen guten Gespräche mit ihm, aber besonders auch seine freundliche und motivierende Art haben mich während dieser Zeit menschlich und fachlich sehr geprägt.

Der Jürgen Manchot-Stiftung für die Finanzierung meiner Doktorarbeit sowie der guten Betreuung der Stipendiaten.

Julien Dairou von der Universität in Paris, der für mich die FICZ-Analytik mittels HPLC-Messungen durchgeführt hat. Darüber hinaus durfte ich Julien persönlich für ein paar Tage in seinem Labor in Paris besuchen, um einen kleinen Einblick in seine Arbeit zu bekommen.

Prof. Dr. Thomas Robert Sutter für die tolle Zeit in seinem Labor in Memphis, Tennessee (USA) und seiner Frau Dr. Carrie Hayes Sutter sowie Hossain Shadmann, Jyoti Bhuju und Prabin Shrestha, die diese Auslandserfahrung für mich einzigartig gemacht haben und mir jederzeit (nicht nur im Labor) mit Rat und Tat zur Seite standen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Core Unit Modellentwicklung des IUF in Düsseldorf bedanken, insbesondere bei Dr. Andrea Rossi, der für mich die HaCaT-NRF2-defizienten Zellen generiert hat.

Des Weiteren danke ich Dr. Christian Vogeley und Dr. Melina Mescher, die mir stets mit guten und hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen.

Meinen lieben aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen/innen gilt natürlich auch ein besonderer Dank. Vielen Dank insbesondere an Ragnhild Wirth, die mir eine unendlich große Hilfe im Labor gewesen ist und mir jederzeit tatkräftig zur Seite stand. Vielen Dank an Mana Kaveh, Sabine Schneider, Selina Woeste, Dr. Philipp Worst, Dr. Marius Pollet, Natalie Sondermann, Siraz Shaik und Motoki Nakamura, die ich als ganz besondere Arbeitskollegen/innen und Menschen kennenlernen durfte, ob bei der Laborarbeit, in den Kaffeepausen, oder bei den vielen persönlichen und interessanten Gesprächen.

Meinen Eltern, meinen beiden Brüdern und meinem Freund gilt mein abschließender Dank. Dieser Dank kommt von ganzem Herzen, da ich mich stets auf die notwendige Unterstützung und den so wichtigen familiären Rückhalt verlassen konnte.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Katharina Maria Rolfes, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 19. November 2020

Katharina Maria Rolfes