



**UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES**

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

- MEDIZINISCHE FAKULTÄT HOMBURG/SAAR -

Aus der Klinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt

**Cross-talk zwischen Aryl-Hydrocarbon (AhR)- und
Vitamin D (VDR)-Rezeptor-Signalwegen in präkanzerösen
und malignen humanen Keratinozyten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

Vorgelegt von: Christoforos Christofi
geb. am: 16.06.1997 in Thessaloniki,
Griechenland

Für Gott und meine Familie.

Tag der Promotion: 13. Juni 2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Reichrath

Prof. Dr. Ulrich Boehm

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	5
2.1.1	Geschichte und Grundlagen	5
2.1.2	Molekulare Eigenschaften	6
2.1.3	Physiologie und Stoffwechsel	7
2.1.4	Vitamin D-Rezeptor	11
2.1.4.1	VDR-Signaltransduktion	12
2.1.4.2	Cytochrom P450 24A1	13
2.1.4.3	VDR-Funktionen	13
2.1.5	Funktionen im menschlichen Körper	14
2.1.6	Wirkungen auf die Haut und Bedeutung in der Dermatologie	16
2.1.7	Rolle in der Karzinogenese der Haut	18
2.2	UV-Strahlung	22
2.2.1	Geschichte und Grundlagen	22
2.2.2	UV-induzierte Zellschaden	24
2.2.3	Reparaturmechanismen UV-induzierter Schaden	27
2.2.4	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor	29
2.2.4.1	AhR-Signaltransduktion	30
2.2.4.2	Cytochrom P450 1A1	32
2.2.4.3	Cyclooxygenase-2	33
2.2.4.4	AhR-Funktionen	34
2.3	Cross-talk der AhR- und VDR-Signalwege	37
2.4	Fragestellung und Ziele der Arbeit	39
3	Material und Methoden	40
3.1	Zellkultur	40
3.1.1	Verwendete eukaryontische Zelllinien	40
3.1.1.1	HaCaT-Keratinozyten	40
3.1.1.2	SCL-1-Zellen	40
3.1.2	Auftauen der Zellen	40

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Kultivierung der Zellen	41
3.1.4	Passagieren der Zellen.....	41
3.1.5	Versuchsvorbereitung.....	41
3.1.6	Behandlung der Zellen.....	42
3.1.7	Ernte der Zellen	46
3.2	RNA-Isolierung	46
3.3	Reverse Transkription	49
3.4	Real-Time Quantitative PCR	51
3.4.1	Funktionsprinzip.....	51
3.4.2	Durchführung	53
3.4.3	Der Ct-Wert.....	59
3.4.4	Relative Quantifizierung.....	60
3.4.5	Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	61
3.4.6	Effizienz	62
3.5	Statistische Analyse	62
3.6	Material	63
3.6.1	Geräte	63
3.6.2	Verbrauchsmaterial.....	64
3.6.3	Substanzen.....	65
3.6.4	Datenbanken und Computerprogramme	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Expression von Genen der AhR- und VDR-Signalwege in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen	68
4.1.1	Die Expression von AhR und CYP1A1 ist in unbehandelten HaCaT-Zellen stärker als in SCL-1-Zellen.....	69
4.1.2	Die Expression von COX-2, VDR und CYP24A1 ist in unbehandelten SCL-1-Zellen stärker als in HaCaT-Zellen	70
4.1.3	Fazit: Genexpression von Elementen des AhR- und VDR-Signalweges in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen	71
4.2	Untersuchungen zum Einfluss der Zugabe von EtOH zum Kulturmedium auf die Genexpression in HaCaT- und SCL-1-Zellen.....	71
4.2.1	EtOH zeigt keine zusätzlichen Effekte in HaCaT-Zellen	72

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	EtOH zeigt keine zusätzlichen Effekte in SCL-1-Zellen	77
4.2.3	Fazit: EtOH hat keine zusätzlichen Effekte in HaCaT- und SCL-1-Zellen	82
4.3	Der Einfluss von 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen	82
4.3.1	Der Einfluss von 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in HaCaT-Zellen	82
4.3.1.1	UV-B-Strahlung induziert die Expression von AhR und CYP1A1 in HaCaT-Zellen stärker als 1,25(OH) ₂ D ₃	82
4.3.1.2	Die 1,25(OH) ₂ D ₃ -vermittelte Induktion der CYP1A1-mRNA-Expression hängt in HaCaT-Zellen vom AhR ab.....	84
4.3.1.3	Die COX-2-Expression in HaCaT-Zellen wird nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ stärker induziert als nach Bestrahlung mit UV-B.....	85
4.3.1.4	Die VDR-Expression bleibt nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und/oder UV-B in HaCaT-Zellen unverändert	86
4.3.1.5	Die Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ , aber nicht mit UV-B, induziert die CYP24A1-mRNA in HaCaT-Zellen.....	87
4.3.2	Der Einfluss von 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in SCL-1-Zellen	88
4.3.2.1	In SCL-1-Zellen wird die AhR-Expression durch UV-B und die CYP1A1-Expression durch 1,25(OH) ₂ D ₃ stärker induziert.....	88
4.3.2.2	Die Induktion der CYP1A1-Expression durch 1,25(OH) ₂ D ₃ ist in SCL-1-Zellen AhR-abhängig..	90
4.3.2.3	Die COX-2-Expression in SCL-1-Zellen wird nach Bestrahlung mit UV-B stärker induziert als nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃	91
4.3.2.4	Die VDR-Expression in SCL-1-Zellen wird nach UV-B-Bestrahlung verstärkt und nach 1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung vermindert	92
4.3.2.5	Die CYP24A1-Expression in SCL-1-Zellen wird durch Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ , aber nicht mit UV-B, induziert	93
4.3.2.6	Fazit: Cross-talk zwischen Signalwegen des AhR und des VDR in HaCaT- und SCL-1-Zellen .	94
5	Diskussion.....	95
5.1	Die Signalwege des AhR und VDR in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen..	95
5.2	Die Wirkung von UV-B und 1,25(OH) ₂ D ₃ auf Mitglieder der kanonischen AhR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen	96
5.3	Die potenzielle Rolle der kanonischen AhR-Signalwege in den Anti-Krebs-Mechanismen von 1,25(OH) ₂ D ₃	100
5.4	Die Wirkung von UV-B und 1,25(OH) ₂ D ₃ auf Mitglieder der nicht-kanonischen AhR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen	102

Inhaltsverzeichnis

5.5	Die Wirkung von UV-B und 1,25(OH) ₂ D ₃ auf Mitglieder der VDR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen.....	104
5.6	Cross-talk zwischen Signalwegen des AhR und VDR.....	106
6	Literaturverzeichnis.....	107
7	Abkürzungsverzeichnis.....	176
8	Abbildungsverzeichnis.....	182
9	Tabellenverzeichnis.....	186
10	Anhang	187
11	Publikationen/Dank	207
12	Lebenslauf.....	209

1 Zusammenfassung

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass die solare Ultraviolett (UV)-B-Strahlung zwar einerseits als toxischer Umweltfaktor und komplettes Karzinogen einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs darstellt, andererseits über die Induktion der kutanen Synthese von bestimmten Photoprodukten aber auch vor Hautkrebs schützen kann. UV-B-Strahlung induziert in der Haut die Bildung von Vitamin D und von zahlreichen seiner Derivate, darunter 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃, Calcitriol), die aktive Vitamin D₃ Form. Neben der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, darunter Proliferation und Differenzierung, hemmt 1,25(OH)₂D₃ in der Haut das Wachstum des Plattenepithelkarzinoms und seiner Vorstufen. Es entfaltet seine biologische Funktion durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR), dem in der Haut folgerichtig eine Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben wird, und wird durch dessen Zielgen Cytochrom P450 24A1 (CYP24A1) metabolisiert und inaktiviert. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass bestimmte Vitamin D Derivate ihre biologische Wirkung nicht ausschließlich über den klassischen VDR, sondern auch über Bindung und Aktivierung von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) und anderen Rezeptormolekülen ausüben. Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse sprechen für eine funktionelle Interaktion zwischen AhR- und VDR-Signalwegen bei zahlreichen Stoffwechselfvorgängen sowie der Photokarzinogenese. Die UV-induzierte Stressreaktion der menschlichen Haut wird zum Teil durch den AhR vermittelt, der im Zellkern sein Prokarzinogen-aktivierendes Zielgen Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) und in der Zellmembran die pro-inflammatorische Cyclooxygenase-2 (COX-2) aktiviert. Ziel dieser Arbeit war es Erkenntnisse über die Interaktion der VDR- und AhR-Signalwege bei der Photokarzinogenese der Haut zu gewinnen. Zunächst analysierten wir in vitro die Effekte der Behandlung mit UV-B-Strahlung und 1,25(OH)₂D₃ auf die mRNA-Expression von Mitgliedern der AhR- und VDR-Signalwege. Als Zellkulturmodell wählten wir humane HaCaT- und SCL-1-Keratinocyten, die phänotypische Merkmale verschiedener Stadien des Mehrschrittmodells der Hautkarzinogenese aufweisen. In unbehandelten HaCaT-Zellen war die Expression von AhR und CYP1A1 stärker und von COX-2, VDR und CYP24A1 schwächer als in unbehandelten SCL-1-Zellen. In HaCaT-Keratinocyten stimulierte UV-B die Expression von CYP1A1 deutlich stärker, und die von COX-2 schwächer als 1,25(OH)₂D₃. In SCL-1-Zellen zeigten sich teilweise entgegengesetzte Ergebnisse. In diesen Zellen stimulierte UV-B die Expression von COX-2 deutlich stärker, und die von CYP1A1 schwächer als 1,25(OH)₂D₃. In SCL-1-Zellen wirkte UV-B additiv auf die 1,25(OH)₂D₃-induzierte CYP1A1-Expression. In HaCaT-Zellen wirkte UV-B auf die 1,25(OH)₂D₃-bedingte COX-2-Stimulation synergistisch. CYP24A1 wurde sowohl in HaCaT- als auch in SCL-1-Zellen ausschließlich durch 1,25(OH)₂D₃, nicht aber durch UV-B-Strahlung, hochreguliert. Diese 1,25(OH)₂D₃-vermittelte Stimulation der CYP24A1 wurde in SCL-1-Zellen, aber nicht in HaCaT-Zellen,

durch eine nachfolgende UV-B-Bestrahlung verstärkt. Kurz zusammengefasst konnten wir in unterschiedlichen Stadien der Photokarzinogenese zwei verschiedene Signalwege für Vitamin D Derivate nachweisen, die durch den klassischen VDR sowie den AhR vermittelt, und Stadium- und Zelltyp-abhängig differentiell reguliert werden. Unsere Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung und funktionelle Interaktion dieser Signalwege bei der Photokarzinogenese der Haut, deren genaue Relevanz in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden muss. Außerdem konnten nicht alle Effekte der UV-Strahlung auf die Signalwege auf die UV-induzierte Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zurückgeführt werden, da UV-B-Strahlung verglichen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusätzliche Effekte zeigte. Ob andere Wirkungen der zahlreichen UV-B-induzierten Vitamin D Derivate auf die menschliche Gesundheit durch orale Aufnahme kompensiert werden können bleibt jedoch noch offen.

Summary

Recent research shows that while solar ultraviolet (UV)-B radiation is a major risk factor for skin cancer development as a toxic environmental factor and complete carcinogen, it may also protect against skin cancer via induction of cutaneous synthesis of certain photoproducts. UV-B radiation induces the formation of vitamin D and numerous of its derivatives in the skin, including 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃, calcitriol), the active vitamin D₃ form. In addition to regulating important cellular processes, including proliferation and differentiation, 1,25(OH)₂D₃ inhibits the growth of squamous cell carcinoma and its precursors in the skin. It exerts its biological function by binding to the vitamin D receptor (VDR), which is logically thought to function as a tumor suppressor in skin, and is metabolized and inactivated by its target gene cytochrome P450 24A1 (CYP24A1). In recent years, it has been shown that certain vitamin D derivatives exert their biological effects not exclusively via the classical VDR, but also via binding and activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and other receptor molecules. Current scientific evidence suggests a functional interaction between AhR and VDR signaling pathways in numerous metabolic processes as well as photocarcinogenesis. The UV-induced stress response of human skin is mediated in part by the AhR, which activates its pro-carcinogen-activating target gene cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in the nucleus and the pro-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) in the cell membrane. The aim of this work was to gain insights into the interaction of the VDR and AhR signaling pathways in skin photocarcinogenesis. First, we analyzed in vitro the effects of treatment with UV-B radiation and 1,25(OH)₂D₃ on mRNA expression of members of the AhR and VDR signaling pathways. We chose human HaCaT and SCL-1 keratinocytes, which exhibit phenotypic features of different stages of the multistep model of skin carcinogenesis, as cell culture models. In untreated HaCaT cells, the expression of AhR and CYP1A1 was stronger and of COX-2, VDR, and CYP24A1 weaker than in untreated SCL-1 cells. In HaCaT keratinocytes, UV-B stimulated the expression of CYP1A1 significantly stronger, and that of COX-2 weaker than 1,25(OH)₂D₃. In SCL-1 cells, partially opposite results were seen. In these cells, UV-B stimulated the expression of COX-2 significantly stronger, and that of CYP1A1 weaker than 1,25(OH)₂D₃. In SCL-1 cells, UV-B had an additive effect on 1,25(OH)₂D₃-induced CYP1A1 expression. In HaCaT cells, UV-B acted synergistically on 1,25(OH)₂D₃-induced COX-2 stimulation. CYP24A1 was upregulated exclusively by 1,25(OH)₂D₃, but not by UV-B, in both HaCaT and SCL-1 cells. This 1,25(OH)₂D₃-mediated stimulation of CYP24A1 was enhanced by subsequent UV-B irradiation in SCL-1 cells but not in HaCaT cells. Briefly, we demonstrated two distinct signaling pathways for vitamin D derivatives at different stages of photocarcinogenesis, mediated by the classical VDR as well as the AhR, and differentially regulated in a stage- and cell type-dependent manner. Our results suggest an involvement and functional interaction of these signaling pathways in skin photocarcinogenesis, the exact

relevance of which needs to be clarified in future studies. Moreover, not all effects of UV radiation on signaling pathways could be attributed to UV-induced formation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, because UV-B radiation showed additional effects compared with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. However, whether other effects of the numerous UV-B-induced vitamin D derivatives on human health can be compensated by oral intake remains to be seen.

2 Einleitung

2.1 1,25-Dihydroxyvitamin D₃

2.1.1 Geschichte und Grundlagen

Schon im 16. Jahrhundert war es bekannt, dass bestimmte Nahrungsmittel damalige Erkrankungen (z.B. Skorbut) heilen konnten [170]. Anfang des 20. Jahrhunderts führten Tierversuche zur Erkenntnis, dass essenzielle Nahrungsbestandteile dabei eine wichtige Rolle spielen. Diese Nahrungselemente wurden im Jahr 1912 vom polnischen Chemiker Casimir Funk als „Vitamine“ bezeichnet [158]. Dabei nahm er fälschlicherweise an, dass alle lebensnotwendigen Substanzen (lat. *vita* für Leben) eine NH₂-Gruppe besitzen (lat. *amin* für stickstoffhaltig). Später bezeichnete der US-amerikanische Biochemiker E.V. McCollum die Vitamine mit den Großbuchstaben des Alphabets und zeigte an Tiermodellen, dass Rachitis durch das in Lebertran (Fischöl) enthaltene Vitamin D geheilt werden kann [361]. Zur gleichen Zeit wurde beobachtet, dass künstlich erzeugtes Ultraviolett (UV)-Licht und natürliches Sonnenlicht ebenfalls zur Heilung der Erkrankung führen [210,226]. Die Vitamin D-Klasse wird heutzutage durch fünf Substanzen vertreten: Vitamin D₁ (eine 1:1 Verbindung aus Ergocalciferol und Lumisterol), Vitamin D₂ (Ergocalciferol), Vitamin D₃ (Cholecalciferol), Vitamin D₄ (22,23-Dihydroergocalciferol) und Vitamin D₅ (Sitocalciferol). Sie gehören gemeinsam mit Vitamin A (Retinol), Vitamin E (Tocopherol) und Vitamin K (Phyllochinon) zu den fettlöslichen Vitaminen. Besonders wichtig sind die Vitamine D₂ und D₃, die UV-bedingt aktiviert werden und wichtige Funktionen im menschlichen Körper erfüllen [40]. Ergocalciferol (Vitamin D₂) entsteht aus dem Provitamin Ergosterol, das ausschließlich in Pilzen und Mykoplasmen zu finden ist. Cholecalciferol (Vitamin D₃) wird aus 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) gebildet, welches ein Vorläufer der Cholesterinbiosynthese ist und in der menschlichen Haut und Leber angereichert wird. Aktivere Vitamin D₃ Formen, wie das Calcidiol (25(OH)D₃) und Calcitriol (1,25(OH)₂D₃), werden in weiteren Schritten mithilfe von UV-Licht und enzymatischen Prozessen in der Leber und der Niere synthetisiert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer oralen Aufnahme über die Nahrung (in Form von fettigem Fisch, Eiern, Pflanzen, Nahrungsergänzungsmitteln). Aufgrund ihrer nahezu autonomen endogenen Synthese, steroidhormon-ähnlicher Funktionsweise und Vermittlung genomischer Effekte über nukleäre Rezeptor (v.a. dem Vitamin D-Rezeptor, VDR) sowie multifaktorieller Wirkungen außerhalb ihres Syntheseortes, zählen die Vitamin D₃ Stoffwechselprodukte zu den Hormonen [201,215].

2.1.2 Molekulare Eigenschaften

Alle Subtypen der Vitamin D-Klasse (auch bekannt unter dem Namen Calciferole) sind lipophile Substanzen und gehören zur Gruppe der Secosteroide. Ihre chemische Formel wurde von Adolf Wolfhaus entdeckt, der im Jahre 1928 dafür den Nobelpreis für Chemie erhielt, und zeichnet sich durch ein tetrazyklisches Grundgerüst und einem Polyensystem aus [632]. Die wichtigste physiologische Form für den Menschen ist Cholecalciferol oder Calcidiol (Vitamin D₃), das biologisch nicht aktiv ist und als Prohormon bezeichnet wird (Abb. 2.1). Sein Steroidgerüst besitzt ein Tetraensystem (Summenformel: C₂₇H₄₄O) und unterscheidet sich von Vitamin D₂ (Summenformel: C₂₈H₄₄O) durch eine Seitenkette. Es wird durch einen festen Aggregatzustand mit einem Schmelzpunkt bei 84 - 85°C und einer molekularen Masse von 384,64 g/mol charakterisiert. Aufgrund seiner Fettlöslichkeit wird es im Blut größtenteils proteingebunden an Vitamin D Bindendes Protein (VDBP) transportiert.

Die zirkulierende Hauptform von Vitamin D₃, das Calcidiol (auch Calcifediol genannt), besitzt eine zusätzliche Hydroxylgruppe (25(OH)D₃ oder 25-Hydroxy-Vitamin-D₃) und dementsprechend die Summenformel C₂₇H₄₄O₂. Bei festem Aggregatzustand und guter Löslichkeit in Ethanol (EtOH) hat es eine molekulare Masse von 400,64 g/mol. Es ist die vorherrschende Speicherform von Vitamin D₃ ist und hat eine schwache biologische Aktivität.

Die biologisch aktive Form ist das Calcitriol, das durch eine weitere OH-Gruppe (1,25(OH)₂D₃) die Summenformel C₂₇H₄₄O₃ besitzt. Es ist mit einem Steroidgerüst, einem Triensystem und einer Eigenschaften-vermittelten Seitenkette ausgestattet. Es weist einen festen Aggregatzustand mit einem Schmelzpunkt bei 113°C und einer Molekülmasse von 416,64 g/mol auf und ist luft-, wärme- und lichtempfindlich.

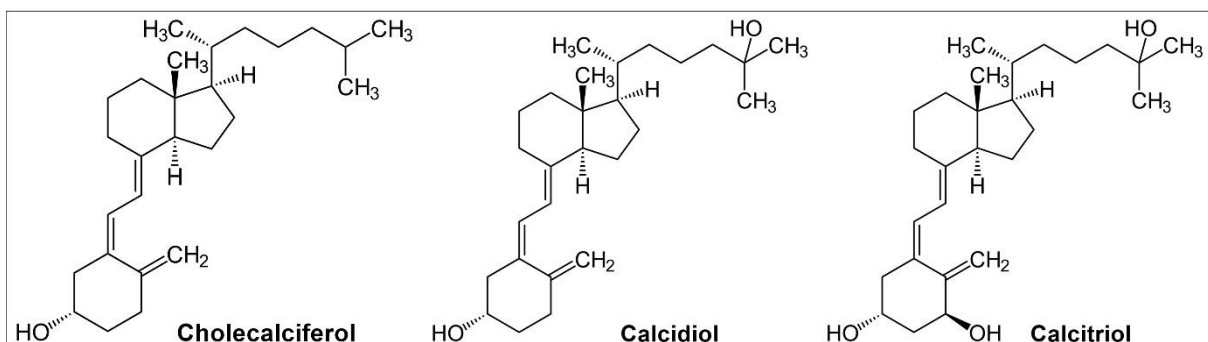


Abb. 2.1: Strukturformel der unterschiedlichen Vitamin D₃ Formen (modifiziert nach JaGa, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons)

2.1.3 Physiologie und Stoffwechsel

Oral aufgenommenes Vitamin D₃ ist v.a. im Winter von Bedeutung, da die Sonneneinstrahlungsenergie nicht ausreicht, um adäquate Vitamin D₃ Spiegel im Blut herzustellen. Empfehlungen rund um den Vitamin D₃ Tagesbedarf sind ein heftig diskutiertes Thema unter Experten und Wissenschaftlern. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt bei fehlender endogener Synthese für Säuglinge im ersten Lebensjahr 10 µg (400 IE) 25(OH)D₃ pro Tag und für Kinder und Erwachsene 20 µg (800 IE) 25(OH)D₃ pro Tag [161]. In Form von Mizellen wird Vitamin D₃ durch passive Diffusion im Darm resorbiert. Dabei können bis zu 80% effektiv aufgenommen werden. Mithilfe von Chylomikronen wird es erst in das Lymphsystem und anschließend proteingebunden in die Pfortader abgegeben, um im Körper bearbeitet zu werden. Das oral zugefügte Vitamin D₃ macht nur ca. 10% der insgesamten Vitamin D₃ Menge im Körper aus [215].

Der menschliche Körper kann 90% der Vitamin D₃ Serum-Konzentration selbstständig in der Haut herstellen [215,217]. Ausgangsmolekül ist der Cholesterin-Vorläufer 7-DHC, der über die Blutbahn aus der Leber in die Keratinozyten transportiert wird. In der Haut wird er vorwiegend im Stratum basale und Stratum spinosum der Epidermis angereichert [216,411]. Durch eine Bestrahlung mit ultraviolettem (UV)-B Licht der Wellenlänge 290 - 315 nm und einer Dosierung von mindestens 18 mJ/cm² kommt es zur photochemischen Spaltung (Aufbruch des B-Ringes zwischen den Atomen C₉ und C₁₀) und Entstehung von Prävitamin D₃. Dieser nicht-enzymatische Prozess wird als 6-Elektronenkonrotatorische electrocyclische Reaktion bezeichnet [230,358]. Die maximale Prävitamin D₃ Produktion erfolgt bei einer Wellenlänge von 297 nm und ist von der 7-DHC Menge in der Haut und der Intensität der Strahlung abhängig [215,411,661]. Aufgrund der thermodynamischen Instabilität von Prävitamin D₃ erfolgt eine spontane thermische Isomerisierung und Überführung in das stabile Vitamin D₃ (Cholecalciferol) [217].

Prävitamin und Vitamin D₃ besitzen photolabile Eigenschaften. Um eine zu starke Kumulation und Intoxikation im Körper zu vermeiden, werden beide Substanzen bei länger anhaltender UV-B-Bestrahlung in unwirksame Nebenprodukte abgebaut. Aus Prävitamin D₃ entsteht somit das inaktive Lumisterol und Tachysterol und aus Vitamin D₃ das unwirksame Suprasterol-1 und -2 und 5,6-Transvitamin D₃ (Abb. 2.2) [219,475]. Bei Bedarf sind diese Reaktionen reversibel [662].

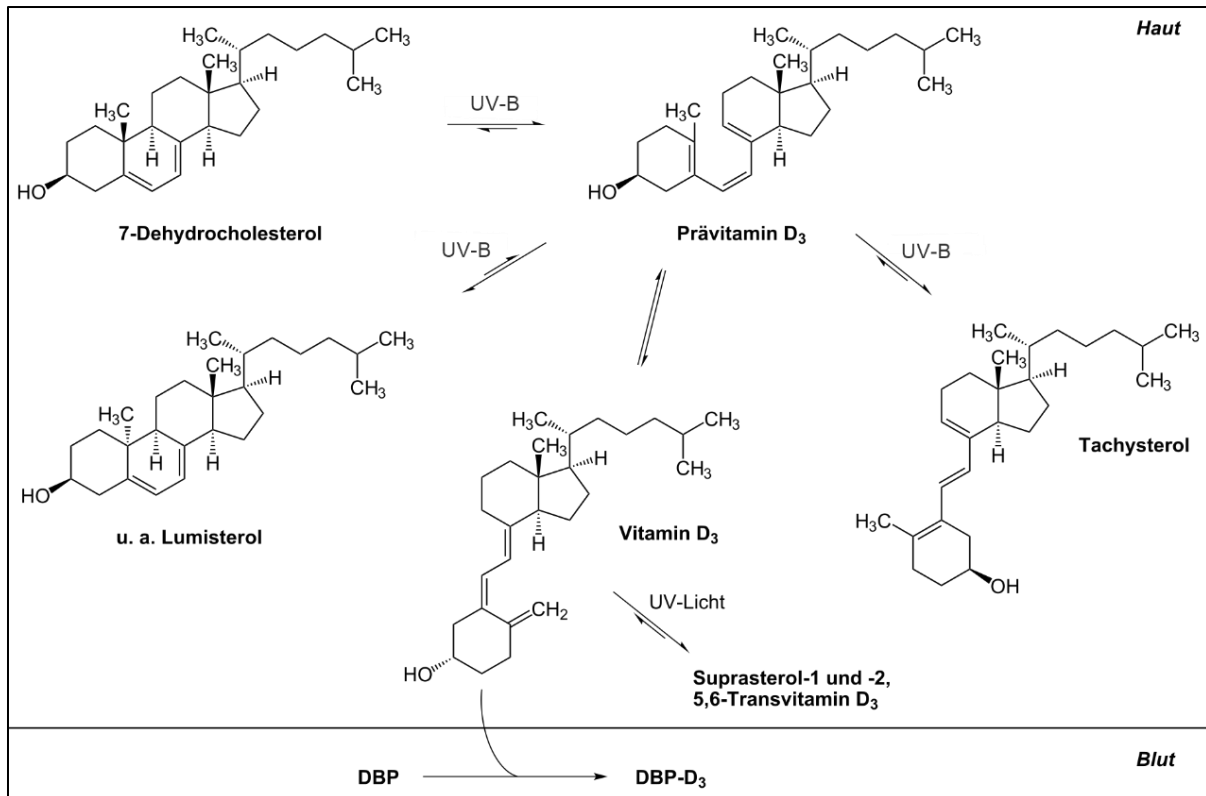


Abb. 2.2: Abbau von Vitamin D₃ in inaktive Nebenprodukte (vereinfacht nach Holick (1995) und Norman (1998), The American Journal of Clinical Nutrition, Oxford University Press)

Nachdem das Vitamin D₃ aus der Zelle ausgeschleust wurde, bildet der Großteil (85-90%) mit VDBP (oder DBP, Gen-Name: GC) im Blut einen Komplex (DBP-D₃). Alternativ kann es auch an Albumin und andere Lipoproteine (10-15%) binden [545]. Weniger als 1% (0,03% von 25(OH)D₃ und 0,4% von 1,25(OH)₂D₃) liegt im Blut frei vor [654]. Anschließend kann es im Muskel- und Fettgewebe gespeichert werden oder in die Leber transportiert werden, wo der erste Schritt der biologischen Aktivierung stattfindet (Abb. 2.3). Durch Cytochrom P450-abhängige Hydroxylasen (CYP27A1 im Mitochondrium und CYP2R1 im Mikrosom) findet in den Hepatozyten eine Hydroxylierung am C₂₅-Atom statt [117,314]. Es entsteht 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃). Als Hauptmetabolit im Blutplasma hat es eine Halbwertszeit (HWZ) von 15 Tagen und dient als Laborparameter zur Beurteilung des Vitamin D-Status [663]. Anschließend kann 25(OH)D₃ in der Leber und in anderen Organen erneut gespeichert oder gebunden an seine Carrierproteine in die Niere überführt werden [664].

Der VDBP/25(OH)D₃-Komplex wird in den Nierenkörperchen gefiltert, im proximalen Tubulussystem abgefangen und in Lysosomen letztendlich gespalten [403]. Gebunden an intrazelluläre Vitamin-D-bindende Proteine (IDBP), wird 25(OH)D₃ in die Mitochondrien der Tubulus Zellen transportiert. Durch die Cytochrom P450-abhängige 1 α -Hydroxylase

(CYP27B1) wird es am C₁-Atom hydroxyliert und in das biologisch aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) umgewandelt. 1,25(OH)₂D₃ zirkuliert im Blut mit einer Konzentration von 75 - 200 pmol/l und einer HWZ von 10 - 24h [319].

Wichtige Regulatoren der 1,25(OH)₂D₃-Produktion sind das Parathormon (PTH), das als Folge eines niedrigen Kalzium-Plasmaspiegels (sCa²⁺) die CYP27B1-Transkription erhöht, und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23), der Phosphat (PO₄) ins Serum freisetzt und die CYP27B1-Transkription hemmt [20,521]. Zirkulierende sCa²⁺- und 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen spielen durch ihren negativen Feedbackmechanismus eine wichtige Rolle (Abb. 2.3) [49,207,354,665]. Zahlreiche Substanzen (z.B. Zytokine, Calcitonin, Glucocorticoide, Östrogene, Somatotropin, Prolaktin und Wachstumsfaktoren), physiologische Faktoren (z.B. das Alter), Umweltfaktoren (z.B. Standort, Tages- und Jahreszeit, Luftverschmutzung, Ozon-Belastung) und genetische Faktoren (z.B. Hauttyp, 7-DHC- und Melanin-Konzentration in der Haut) können ebenfalls regulatorisch involviert sein [117,219,285,314].

Obwohl 1,25(OH)₂D₃ hauptsächlich in der Niere synthetisiert wird, besitzen auch andere Organe (z.B. epidermale Keratinozyten, Prostatazellen, Knochenzellen, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Plazentazellen, T-Lymphozyten, Pankreaaszellen, Nebenschilddrüsenzellen, Kolonzellen, Haarfollikel, Schweißdrüsen und mehrere Karzinomzellarteneine) die enzymatische Ausstattung für CYP27B1, wodurch sie 25(OH)D₃ in 1,25(OH)₂D₃ konvertieren können [35,63,73,211,246,515]. In Keratinozyten wurde zusätzlich CYP27A1 nachgewiesen [156,312]. Dadurch besitzt die Haut optimale enzymatische Voraussetzungen, um 1,25(OH)₂D₃ eigenständig aus 7-DHC herzustellen [313,511].

Erneut an seine Transportproteine gebunden, erreicht 1,25(OH)₂D₃ über den Blutweg mehrere Zielorgane wie die Nebenschilddrüse, den Darm oder das Knochengewebe. Dort bindet es an den VDR, der von den meisten Zielgeweben exprimiert wird und die biologischen Effekte von 1,25(OH)₂D₃ vermittelt [201]. 1,25(OH)₂D₃ hat im Zielgewebe im Vergleich zu den anderen Vitamin D Metaboliten eine 100- bis 1.000-fach höhere biologische Aktivität [38].

Die Inaktivierung von 1,25(OH)₂D₃ und seinem Vorläufer 25(OH)D₃ erfolgt in der Niere und in den Zielzellen durch das mitochondriale Enzym 24-Hydroxylase (CYP24A1), welches eine Hydroxylierung am C₂₄-Atom durchführt [267,455]. Über eine Umwandlung in 1,24,25(OH)₂D₃ bzw. 24,25(OH)₂D₃ kommt es letztendlich zur Entstehung der biologisch inaktiven Calcitroinsäure (Abb. 2.3) [496,666]. Zusätzlich wurde eine C₂₃-Hydroxylierungsaktivität entdeckt, wodurch 1,25(OH)₂D₃-26,23-Lacton bzw. 25(OH)D₃-26,23-Lacton entstehen kann [497]. CYP24A1 kann mehr als 10.000-fach durch 1,25(OH)₂D₃ hochreguliert werden und stellt einen nachweisbaren Marker für seine Wirkung dar [316]. Es kontrolliert seinen eigenen Abbau und kann ihn bei Bedarf schnellstmöglich induzieren [667]. Außerdem wird die Aktivität des

Enzyms durch PTH und den FGF-23 beeinflusst [99,164,522,523,560]. Die inaktivierten Abbauprodukte werden über die Galle aus dem Körper ausgeschieden.

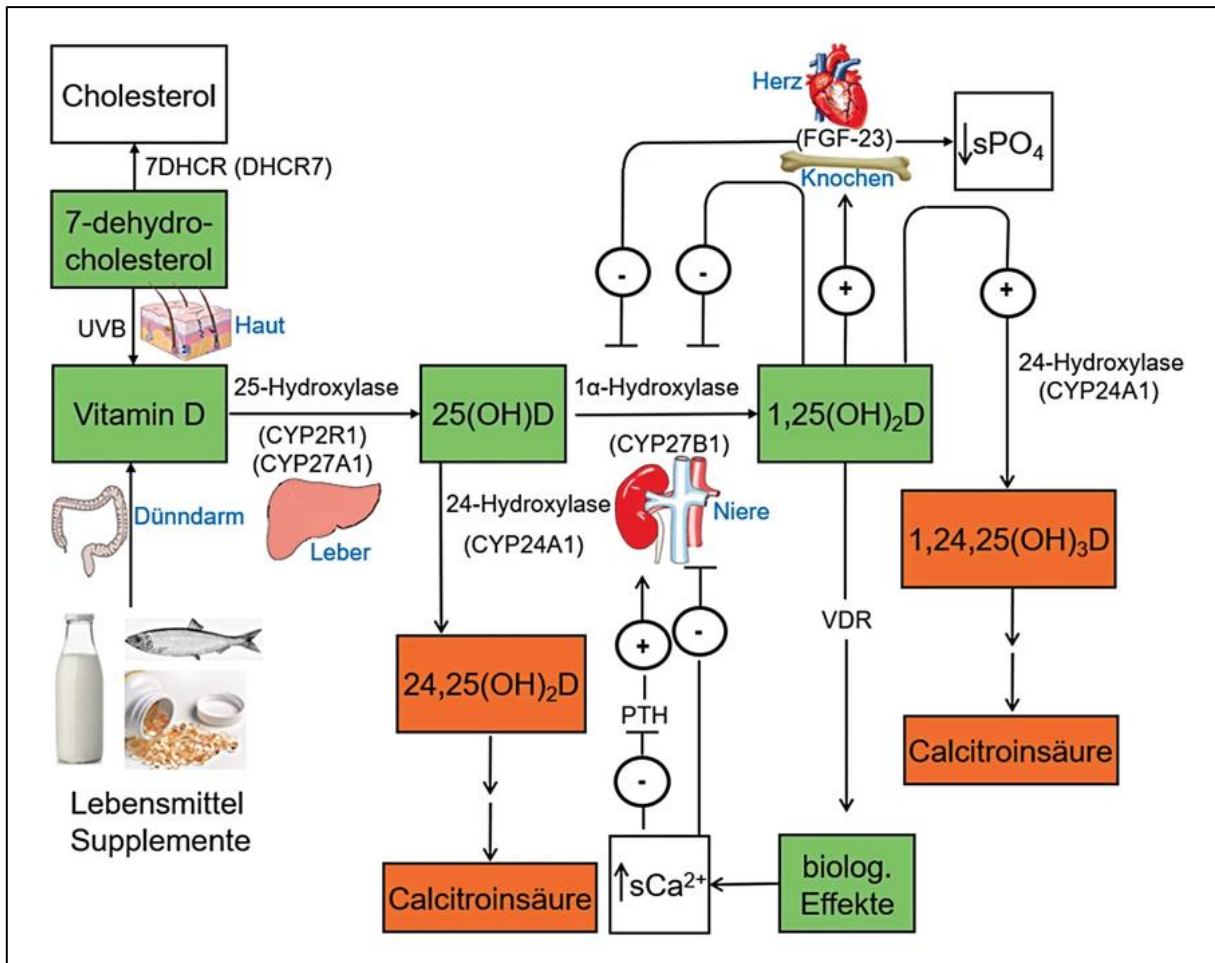


Abb. 2.3: Vitamin D₃ Synthese im menschlichen Körper (modifiziert nach [Zittermann A (2022) Stoffwechsel. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: https://link.springer.com/10.1007/978-3-662-65716-4_4]. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags)

2.1.4 Vitamin D-Rezeptor

Der VDR, der auf dem Chromosom 12 (Genlocus q12 -14) kodiert wird, ist aus 427 Aminosäuren (AS) aufgebaut, hat ein Gewicht von 48 kDa und ist über 100 kDa lang mit 8 kodierenden und 6 nicht-kodierenden Exonen [29,293,554]. Er teilt sich strukturell in eine variable N-terminale Domäne (A/B Region), eine zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD, C Region) mit Domänen für die nukleare Lokalisierung, eine Gelenk-Region (engl. Hinge-Region, D Region) und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD, E/F Region) mit Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomänen (Activation Function 2, kurz AF2) auf (Abb. 2.4) [82,180,347,425]. Er gehört zu den Steroidhormonrezeptoren vom Typ II, die ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren aus der Familie der nukleären Rezeptoren sind, und wird als Nuclear Receptor, Subfamilie 1, Gruppe I, Member 1 (NR111) bezeichnet [377]. Obwohl der VDR vorwiegend als Kernrezeptor agiert, wurde er auch im Zytosol (in unbesetzter Form) und im Zytoplasma (v.a. im Golgi-Apparat, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mikrotubuli) detektiert [519,602,603,668,669]. Außerdem soll er in der zellulären Plasmamembran rapide $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Effekte (v.a. die schnelle Ca^{2+} -Aufnahme im Darm) vermitteln [670]. Seine wichtigsten Liganden sind Vitamin D Metabolite. Die Interaktion mit dem Rezeptor ist unabdingbar für die Entfaltung ihrer „genomischen“ Wirkungen in der Zelle [201]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bindet verglichen mit anderen Vitamin D Metaboliten mit einer 100-mal höheren Affinität an den Rezeptor [56,552,619,671]. Elementare VDR-exprimierende Organe sind der Gastrointestinaltrakt, die Bauchspeicheldrüse, die Nieren, die Lungen, die Haut, die Prostata, die Brustdrüse, endokrine Zellen und Immunzellen [612]. In der Haut wird der VDR auf gesunden und malignen Hautzellen exprimiert [228,248,373,465,672].

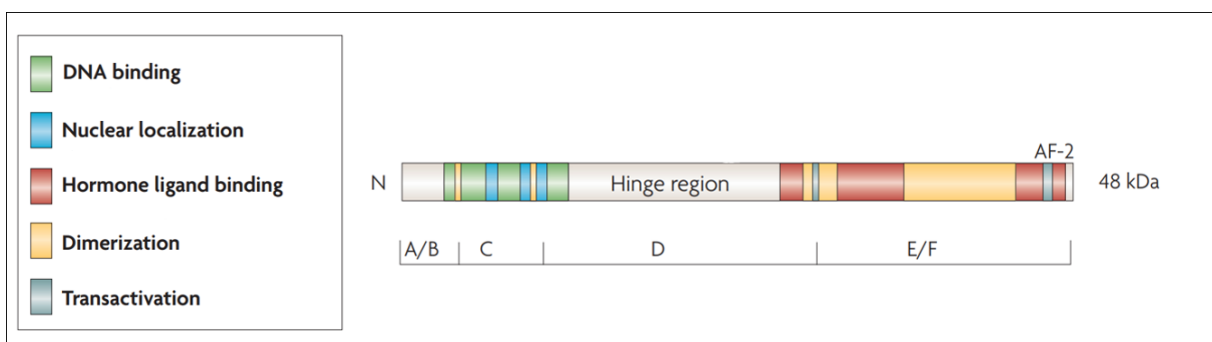


Abb. 2.4: Aufbau des VDR (modifiziert nach [Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer 7:684–700]. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags)

2.1.4.1 VDR-Signaltransduktion

Der VDR ist in ungebundener Form im Zytoplasma lokalisiert [636]. Nachdem seine Liganden in die Zelle eingedrungen sind, binden sie an eine Liganden-spezifische Domäne des Rezeptors. Daraufhin bildet der VDR einen heterodimeren Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor- α , - β und - γ (RXR α , RXR β , RXR γ) und wandert in den Zellkern (Abb. 2.5). Dort interagiert der Komplex mit Vitamin D responsive Elements (VDREs) in der Promotorregion von Zielgenen [118,201,265,315,642]. Als solche wurden CYP24A1, PTH, Osteocalcin und Osteopontin beschrieben [42]. Nach Dissoziation von VDR-Co-Repressoren kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors. Das erlaubt wiederum eine Interaktion mit Co-Aktivatoren über die AF2 Domäne des VDR und eine Induktion der Gentranskription [96,117,673]. Die Veränderungen der Proteinsynthese führen zur Ausführung der entsprechenden genomischen Effekte im Zielgewebe. Zusätzlich ist der VDR in der Lage, die Transkription bestimmter Zielgene herunter zu regulieren, indem er entweder als Heterodimer oder Homodimer an negative Vitamin-D-response Elements (nVDREs) bindet [51,388].

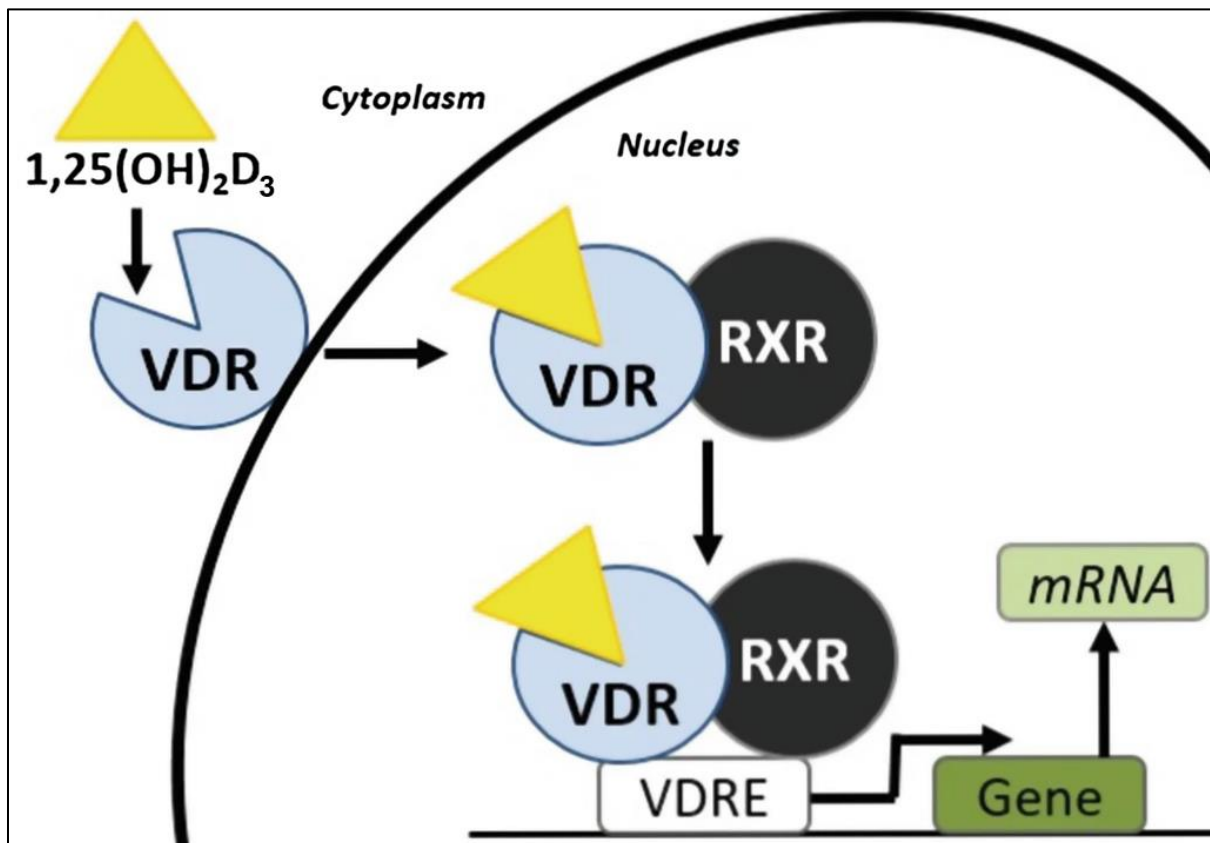


Abb. 2.5: VDR-Signaltransduktion nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung (modifiziert nach [Beckett EL, Veysey M, Yates Z, Lucock M (2019) Modulation of microRNA by Vitamin D in Cancer Studies. Springer International Publishing, Cham. URL: <https://doi.org/10.1007/978-3-3>]. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags)

2.1.4.2 Cytochrom P450 24A1

Das Cytochrom P450, Familie 24, Unterfamilie A, Polypeptid 1 (CYP24A1) besteht aus 514 AS, hat ein Gewicht von 59 kDa und wird durch ein Gen kodiert, welches auf Chromosom 20q13.2-q13.3 liegt. Es ist ein wichtiges Zielgen des VDR nach der Bindung von Vitamin D₃ an den Rezeptor [221]. Die Induktion seiner Expression gilt als Biomarker für die biologische Aktivität von 1,25(OH)₂D₃ [150]. CYP24A1 reguliert neben den zirkulierenden 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen auch den 1,25(OH)₂D₃-Gehalt innerhalb der Zelle und die damit verbundene zelluläre Reaktionen. Dadurch stellt es einen wichtigen Modulator der Vitamin D₃ Wirkung dar. Im Körper spielt CYP24A1 eine bedeutende Rolle für die Regulation des Ca²⁺ Metabolismus [520]. In manchen Tumoren wurde eine Überexpression von CYP24A1 entdeckt, die möglicherweise durch eine Genamplifikation bedingt ist und mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der 1,25(OH)₂D₃ Wirkung assoziiert ist [12,154]. Mehrere Studien kamen zum Schluss, dass CYP24A1 als potenzielles Onkogen angesehen werden kann und einen bedeutenden Stellenwert in der Krebsentwicklung haben könnte [221,577].

2.1.4.3 VDR-Funktionen

Obwohl die primäre Funktion des VDR mit der Ca²⁺-Homöostase verbunden ist, ist der nukleäre Rezeptor auch in der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen involviert [68,377]. Darüber hinaus besitzt er eine zentrale immunmodulatorische Rolle, da er in fast allen Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, CD4⁺T-Lymphozyten, CD8⁺T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten) exprimiert wird und über Interaktion mit den VDREs seiner Zielgene ihre Eigenschaften moduliert [28,595,674]. VDR-ausgehende Immunwirkungen beinhalten die Antiproliferation von T- und B-Zellen, die Hemmung der inflammatorischen Aktivität von CD4⁺-Th1-Zellen und ihrer Zytokinproduktion, die Bildung von B-Gedächtniszellen, die Förderung der Plasmazelldifferenzierung und Antikörper-Produktion sowie Hemmung der Sekretion von Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) und Interferon-gamma (IFNγ) [191,272,675,676]. Er spielt in der Regulation der 1,25(OH)₂D₃-Synthese und der damit verbundenen Cytochrom P450 Enzyme ebenfalls eine Rolle, da er das Gen CYP27B1 in der Niere herunterreguliert, während er das CYP24A1-Gen hochreguliert [584,590].

2.1.5 Funktionen im menschlichen Körper

Die klassische und bekannteste Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist die Regulierung des Ca^{2+} - und PO_4 -Haushaltes im menschlichen Organismus. Die kalzämischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekte sind v.a. im Darm, in der Niere, im Knochen und in der Nebenschilddrüse von Bedeutung. Im Darm findet die Ca^{2+} -Resorption v.a. im Zwölffingerdarm und in distalen Anteilen (Ileum, Caecum, Kolon) statt [138,139,304]. Sie kann transzellulär mittels $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierter Ca^{2+} -Transporter durchgeführt werden: Transient Receptor Potential V5 und V6 (TRPV5 und TRPV6), Calbindin- $\text{D}_{9\text{k}}$, Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase 1b (PMCA1b) und Na/Ca^{2+} -Austauscher (NCX1) [78,677]. Auch parazellulär ist die Ca^{2+} -Aufnahme mithilfe von Proteinen wie Claudin-2 und -12, Cadherin-17 und Aquaporin-8 möglich [157,290]. Die aktive intestinale PO_4 -Aufnahme wird dagegen durch eine gesteigerte Expression des $\text{Na}-\text{P}_i$ -Kotransporters und Veränderungen in der Zusammensetzung der enterozytären Plasmamembran gefördert [288,639]. Eine ähnliche Funktionsweise wurde im distalen Tubulus der Niere beobachtet. Das renale Modell besteht aus TRPV5, Calbindin- $\text{D}_{9\text{k}}$ und - $\text{D}_{28\text{k}}$, NCX1 und PMCA1b [78]. Ein zusätzlicher Regulator hierbei ist PTH. Die PO_4 -Absorption findet im proximalen Nierentubulus statt und wird durch FGF23 und PTH reguliert, die zu einer verstärkten PO_4 -Ausscheidung führen [27,643]. Außerdem ist Ca^{2+} sehr eng mit der Knochenhomöostase verbunden, da Knochengewebe hauptsächlich aus Ca^{2+} besteht und damit der größte Ca^{2+} -Speicher im Körper ist. In diesem Zusammenhang ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für die Förderung der Knochenmineralisierung sowie des Knochenauf- und -umbaus sehr wichtig. Es reguliert die Osteoblasten-Proliferation und Osteoklasten-Differenzierung, die Produktion von Typ I Kollagen, die alkalische Phosphatase und Osteocalcin [469]. Außerdem führt es zu einer vermehrten Bildung der Knochenmatrix [493]. V.a. indirekt spielt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Rolle, indem es die intestinale und renale Ca^{2+} -Resorption ankurbelt und durch Hemmung von PTH auch den Knochenabbau hemmt. In der Modulation der Nebenschilddrüsenfunktion spielt die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -bedingte PTH-Unterdrückung ebenfalls eine wichtige Rolle. Dort wurde ein direkter (durch Hemmung der Transkription des PTH-Gens) und indirekter (durch hohe Serum- Ca^{2+} -Spiegel aufgrund der erhöhten intestinalen und renalen Ca^{2+} -Resorption) Hemmungsmechanismus beschrieben [117].

Sehr lange wurde angenommen, dass die einzige biologische Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Regulierung des Ca^{2+} -Stoffwechsels ist. Im Jahr 1979 hat die Arbeitsgruppe von Stumpf den VDR und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Zellkern zahlreicher Zellgewebe beobachtet, die nicht mit dem Ca^{2+} -Stoffwechsel in Verbindung stehen [678,679]. Somit wurden zum ersten Mal die „nicht-klassischen“ oder „nicht-kalzämischen“ Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ angesprochen.

Im Immunsystem hemmt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die adaptive und fördert die angeborene Immunantwort. Es ist wichtig für die Differenzierung von Monozyten, Makrophagen, Antigen-präsentierenden

Zellen, dendritischen Zellen und Lymphozyten [28,67,79]. Durch die regulierende Wirkung auf mehrere Interleukine (zB. IL-2, -4, -9, -10, -12, -17) und Interferone (zB. IFN- β , IFN- γ) wurde ein protektiver Effekt gegen Autoimmunerkrankungen beschrieben [247,317,439,591].

Im kardiovaskulären System kontrolliert 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die Synthese und Ausschüttung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und übt eine antihypertrophe Wirkung auf die Herzmuskelzellen aus [635,680,681]. Eine spärliche Sonnenlichtexposition und niedrige 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Werte sind mit einem hohen Blutdruck und einer hohen Renin Aktivität im Plasma assoziiert [322,682]. Spätere Studien konnten bestätigen, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die Renin Produktion hemmt und sich damit positiv auf den Bluthochdruck, die Herzhypertrophie und eine erhöhte Wasseraufnahme auswirkt [683]. In der Skelettmuskulatur wurde ein direkter Effekt auf das Wachstum und die Differenzierung von Muskelgewebe beschrieben [47,131].

Im Nervensystem führt 1,25(OH) $_2$ D $_3$ zur erhöhten Leitungsgeschwindigkeit in den Motoneuronen und zur vermehrten Synthese wichtiger neurotropischer Faktoren (Nervenwachstumsfaktoren und Neurotrophine) [64,66]. In der Embryonalzeit ist es wichtig für eine gesunde und adäquate Gehirnentwicklung [362].

Im Lipid- und Glukosestoffwechsel wurde eine positive Korrelation zwischen einem 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Mangel und fast allen Aspekten des metabolischen Syndroms beobachtet [231,353]. Im Fettgewebe hemmt es den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor Gamma (PPAR γ), das zentrale Gen der Adipogenese [346]. Auch in der Hochregulierung von Genen, die an der Fettsäureoxidation und dem mitochondrialen Stoffwechsel beteiligt sind, soll es involviert sein. So kann 1,25(OH) $_2$ D $_3$ einer Diät-bedingten Fettleibigkeit entgegenwirken und gleichzeitig die Glukosehomöostase verbessern [349]. Durch einen direkten stimulatorischen Effekt auf die Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen reguliert es den Blutzucker [245]. Außerdem beeinflusst es die Insulinempfindlichkeit des Körpers durch eine erhöhte Genexpression von Insulin Rezeptoren und Aktivierung des im Fettsäurestoffwechsel-vorkommenden PPAR δ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Delta) [343,684].

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ und seine Analoga antineoplastische Effekte besitzen. Sie verlangsamen das Wachstum von Krebszellen, indem sie die Zellen in der G $_0$ /G $_1$ -Phase des Zellzyklus anhalten und ihre Differenzierung oder Apoptose induzieren. Darüber hinaus beeinflusst 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die Zellangiogenese, -adhäsion, -migration und reduziert die Invasivität des Tumors [446]. Interessant ist, dass die meisten Krebszellen neben dem VDR auch CYP27B1 und CYP24A1 exprimieren, was ihnen eine lokale Regulierung des 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Stoffwechsels verschafft [33,237,335,645].

2.1.6 Wirkungen auf die Haut und Bedeutung in der Dermatologie

Die menschliche Haut ist das einzige Organ, das aufgrund seiner vollständigen Enzymausstattung und ubiquitären VDR-Expression gleichzeitig als Quelle und Zielorgan für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agiert. Der aktive Vitamin D_3 Metabolit fördert die dermale Zelldifferenzierung, indem er die Expression von Involucrin (IN), Transglutaminase (TG), Loricrin und Filaggrin steigert und die Cornified envelope Formation reguliert. Gleichzeitig hemmt er die Proliferation der Hautzellen [37,202]. Diese Wirkungen sind zumindest teilweise auf kalzämische $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekte zurückzuführen [466,582]. Über die Expressionsregulierung von Cathelicidin fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Wundheilung und Gewebereparatur [506,611]. Außerdem besitzt es antimikrobielle Eigenschaften. Es reguliert die Verarbeitung langkettiger Glycosylceramide, die wichtig für die Hautbarriere sind, und induziert den Toll-like-Rezeptor 2 mit seinem Korezeptor CD14, welche die angeborene Immunantwort in der Haut auslösen [413,506]. Die Beteiligung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im angeborenen Immunsystem der Haut wurde zum ersten Mal in der Abwehr gegen den Erreger Mycobacterium tuberculosis beobachtet, wo es die Bakterienproliferation in Makrophagen inhibierte [485,685]. Die direkte Induktion der Genexpression wichtiger antimikrobieller Peptide (z.B. Cathelicidin und Defensin $\beta 2$) ist dabei von Bedeutung [611,686]. Dendritische Zellen, die für die T-Zell-Aktivierung wichtig sind, stellen ein Ziel der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierten Immunsuppression in der Haut dar. So hemmt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Aktivierung, Reifung, Differenzierung sowie das Überleben der antigenpräsentierenden Zellen und fördert die tolerogene T-Zell-Reaktion [5,438]. Im erworbenen Immunsystem scheinen T-Helferzellen das Hauptziel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu sein, da deren Vermehrung unterdrückt und die Zytokin Produktion moduliert wird [317]. Darüber hinaus hat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dosisabhängige Wirkung auf die Apoptose von Keratinozyten. In physiologischen Konzentrationen verhindert es eine durch bestimmte Trigger (Ceramid, UV-Strahlung, $\text{TNF-}\alpha$ usw.) ausgelöste Apoptose, während es in hohen Konzentrationen die Apoptose induziert [348]. In Haarzellen fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den Haarzyklus und schützt vor chemotherapiebedingter Alopezie [14,607]. In Talgdrüsen reguliert es das Wachstum und die Morphologie, hemmt die Zellproliferation, -lipogenese, -autographie und erhöht die Zellzahl in-vitro [382,473,687]. Es ist außerdem bekannt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ schützende Effekte vor UV-Strahlung bietet, indem es die zelluläre DNA Schäden, Apoptose und Rötung verringert und das Zellüberleben erhöht [94,104,105,186,306,633].

Aufgrund der verflochtenen Bindung zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und der Haut ist es nachvollziehbar, dass ein Vitamin D_3 Mangel einige dermatologische Erkrankungen verursacht. Die Supplementation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Inanspruchnahme seiner zahlreichen Eigenschaften stellt eine wertvolle therapeutische Option in der Dermatologie dar. Im

Folgenden werden Hauterkrankungen aufgelistet, bei denen die Wirkung von Vitamin D₃ Analoga einen besonderen Stellenwert besitzt.

Die therapeutische Wirkung von Vitamin D₃ gegen Psoriasis wurde zum ersten Mal 1985 bei einem Patienten mit Osteoporose entdeckt. Die Gabe von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ führte dabei zur unerwarteten Remission der psoriatischen Läsionen [379]. Die Verabreichung von 1,25(OH)₂D₃ (oral oder topisch) und 1,24(OH)₂D₃ (topisch) führt bei 70-80 % der Psoriasis-Patienten zur signifikanten Verbesserung des Hautzustands und bei 20-25 % zum vollständigen Verschwinden der Hautläsionen [391]. Weitere Vitamin D₃ Analoga (z.B. Calcipotriol, Tacalcitol, Maxacalcitol) können ebenfalls als Monotherapie oder kombiniert mit topischen Steroiden zur Psoriasis-Behandlung eingesetzt werden, da sie ebenso prodifferenzierende, antiproliferative und entzündungshemmende Eigenschaften besitzen [542].

In der atopischen Dermatitis, die in Deutschland ungefähr 10-15% der pädiatrischen und 2-4% der erwachsenen Bevölkerung betrifft, wurde ein inverses Verhältnis zwischen der Schwere der Erkrankung und dem Vitamin D₃ Spiegel gefunden [441,509]. Eine ausreichende Vitamin D₃ Supplementierung ist mit einer Verbesserung des Hautstatus (anhand des SCORAD- und EASI-Scores), einer Linderung der Entzündung und einer geringeren Kolonisierung mit Bakterien assoziiert [200,261,389,441,585].

Ein erniedrigter Spiegel an Vitamin D₃ wurde auch bei Patienten mit Akne vulgaris und inversa beobachtet. Dabei wurde ein umgekehrtes Verhältnis zwischen dem Vitamin D₃ Spiegel und dem Schweregrad als auch der Anzahl der entzündlichen Akneläsionen entdeckt. Auf die Therapie mit Vitamin D₃ sprachen ausschließlich entzündliche Läsionen an, während nicht-entzündliche keine Besserung zeigten [250,327,688]. 1,25(OH)₂D₃ reguliert die Erkrankung über die Hemmung der Propionibacterium acnes-ausgelösten Th17-Differenzierung und die verringerte Synthese von IL-6, IL-8 und Metalloproteinase-9 (MP-9) [7,308]. Sebozyten wurden ebenfalls als Zielzellen von 1,25(OH)₂D₃ identifiziert [687].

Bei Vitiligo gehören topische Vitamin D₃ Analoga ebenfalls zu den therapeutischen Optionen [431,498,637,689]. Ihre Verwendung alleine oder in Kombination mit topischen Kortikosteroiden (Erstlinientherapie) oder Psoralen-UV-A-Therapie (PUVA) erwies sich in Betracht auf die Repigmentierung als vorteilhaft [415,689,690].

Vitamin D₃ Analoga haben außerdem einen wichtigen Stellenwert bei hyperproliferativen Dermatosen (z.B. Morphea, Ichthyosis Congenita), blasenbildenden (z.B. Pemphigus vulgaris und bullöses Pemphigoid) und systemischen (z.B. systemischer Lupus erythematosus) Autoimmunerkrankungen, Photodermatosen (z.B. Polymorphe Lichtdermatose) und Alopezien (z.B. Alopecia areata) [382,397,447].

2.1.7 Rolle in der Karzinogenese der Haut

1,25(OH)₂D₃ wird seit über 40 Jahren auf seine krebshemmende Wirkung untersucht [691]. Vitamin D₃ Analoga schützen vor Krebs, indem sie das Krebsrisiko und die krebisbedingte Sterblichkeit verringern [76,175,404,446,564]. Das Vorhandensein des VDR im Tumorgewebe ist eine Voraussetzung für die antineoplastische Vitamin D₃ Wirkung. Dabei bleibt in den meisten Tumoren die reguläre VDR-Expression erhalten, während in 5% der Krebserkrankungen genetische Veränderungen des Rezeptors auftreten [396]. Ein 25(OH)D₃-Serumspiegel von <50 nmol/L kann das Krebsrisiko um bis zu 50 % erhöhen, während eine tägliche Einnahme von bis zu 1.000 IE Vitamin D₃ dies verhindern kann [9,167,173,174]. So wird ein adäquater Vitamin D₃ Status mit einem geringeren Risiko für die Entstehung von Speiseröhren-, Magen-, Darm-, Rektum-, Gallenblasen-, Kolon-, Pankreas-, Lunge-, Brust-, Gebärmutter-, Ovarial-, Prostata-, Harnblase-, Niere-, Schilddrüsen- und Hautkrebs vergesellschaftet [175]. In dieser Studie ist das Verhältnis zwischen Vitamin D₃ und Hautkrebs von besonderer Bedeutung.

Hautkrebs ist ein Oberbegriff für verschiedene maligne Tumoren der Haut und gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen [141]. Der "weiße Hautkrebs" oder die Nicht-Melanom Hautkrebs-Erkrankung (engl. Non-Melanoma Skin Cancer; kurz NMSC) entwickelt sich aus der Basal- und Plattenepithelschicht der Epidermis. Die bekanntesten Vertreter sind das Basalzellkarzinom (engl. Basal Cell Carcinoma; kurz BCC) und das Plattenepithelkarzinom (engl. Squamous Cell Carcinoma; kurz SCC). Aktinische Keratosen (AK) gehören zu den häufigsten Präkanzerosen des NMSC und stellen kutane Plattenepithelkarzinome in situ dar [474]. Der gefährlichere "schwarze Hautkrebs" oder die Melanom Hautkrebs-Erkrankung (engl. Melanoma Skin Cancer; kurz MSC) geht von den epidermalen Melanozyten aus. Charakteristischer Vertreter ist das kutane maligne Melanom (engl. Cutaneous malignant melanoma; kurz CMM). Epidemiologisch tritt am häufigsten das BCC auf, gefolgt vom SCC und dem malignen Melanom [80]. Während das BCC sich langsam vermehrt und v.a. lokal invasiv wächst, ist das SCC bösartiger und kann Subtyp-abhängig Metastasen bilden. Das maligne Melanom ist stark proliferativ und invasiv [394]. Durch sein aggressiv metastasierendes Wachstum ist es nicht selten mit einem tödlichen Ausgang verbunden [692]. Charakteristische molekulare Mutationen finden sich beim BCC v.a. im Hedgehog (Hh)-Signalweg (im Patched (Ptch)-, Gli1- und Smo-Gen), beim SCC im p53-, NOTCH- und RAS-Gen und beim Melanom im p16-, BRAF-, c-Kit- und Zyklin D1-Gen [83,271,445]. Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung von Hautkrebs sind die natürliche (z.B. Sonnenlicht) und künstliche (z.B. Solarium) UV-Strahlung als auch die Hautfarbe [395]. UV-Strahlung ist dabei für etwa 65% der Melanomfälle und 90% aller Hautkrebsfälle verantwortlich [21]. Für die Entstehung des BCC ist die intermittierende UV-Exposition im

Kindesalter und in der Jugend von Bedeutung, während beim SCC die kumulative Sonnenexposition wichtig ist [65]. Die Entwicklung des kutanen Melanoms ist mit der starken intermittierenden UV-Exposition in der Kindheit und nachfolgendem Sonnenbrand verbunden [693]. Dabei scheint eine erhöhte Anzahl erworbener Nävi ein wichtiger Risikofaktor zu sein. Im Gegensatz zum BCC und SCC, kann sich das maligne Melanom auch an weniger bestrahlten Körperregionen oder in inneren Organen entwickeln [19,30,90,119].

Die Grenze zwischen schützender und schädigender Wirkung auf die Haut scheint bei der UV-B-Strahlung sehr schmal zu sein [694]. Während zelluläre DNA-Schaden und Malignität verursacht werden können, katalysiert dasselbe UV-B-Spektrum die Produktion von antineoplastischem Vitamin D₃ in der Haut. In manchen Krebsarten entstand somit eine kontraintuitive Verbindung zwischen Sonnenexposition und Krebsvorbeugung, die über Vitamin D₃ vermittelt wird [583]. So hemmte die UV-induzierte Vitamin D₃ Produktion in murinen Keratinozyten die BCC-Entstehung. Dabei wurde festgestellt, dass ausschließlich UV-erzeugtes oder topisch appliziertes Vitamin D₃ wirksam ist, nicht aber mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₃ [345]. Außerdem hemmt 1,25(OH)₂D₃ die Zellproliferation und das Tumorwachstum von BCCs als auch den Hh-Signalweg in-vitro und in-vivo [562,695]. Die defekte Hh-Signalübertragung stellt für die SCC-Entwicklung ebenfalls einen prädisponierenden Faktor dar [696]. 1,25(OH)₂D₃ inhibiert dosisabhängig das SCC-Tumorwachstum bis zu 30% [208,472]. Im BCC und SCC hemmt topisch appliziertes 1,25(OH)₂D₃ auch die chemisch induzierte Karzinogenese [208,634]. Zusätzlich wurden in beiden Tumoren erhöhte mRNA-Konzentrationen des VDR, der CYP2R1, CYP27B1 und CYP24A1 identifiziert [373,472]. Auch therapeutisch ist der aktive Vitamin D₃ Metabolit effektiv. Er verstärkt die Antitumorwirkung des Zytostatikums Paclitaxel und beschleunigt die Paclitaxel-induzierte Apoptose in SCC-Zellen [209]. Außerdem verbessert eine Präkonditionierung mit 1,25(OH)₂D₃ vor einer photodynamischen Therapie (PDT) mit Aminolävulinsäure (ALA) das Behandlungsergebnis in BCC und SCC [484]. Das Vitamin D₃ Analogon Calcipotriol konnte in Kombination mit 5-Furouracil (5-FU) synergistisch die T-Zell-Immunität gegen AK induzieren und die Entstehung und das Wachstum von SCC hemmen [486]. Eine Studie am Mausmodell zeigte, dass die Kombinationstherapie mit 1,25(OH)₂D₃ oder Calcipotriol, Diclofenac und Difluormethylornithin (DFMO) der alleinigen Therapie mit 5-FU bei der Behandlung von UV-B-induzierten NMSC überlegen ist [452,453]. Neuartige Vitamin D₃ Analoga (z.B. 20(OH)D₃, 20,22(OH)D₃, 20,23(OH)D₃) wirken ebenfalls prodifferenzierend, antiproliferativ und krebshemmend und könnten in der Zukunft therapeutisch in Betracht gezogen werden [239,240,529,644].

Die Arbeitsgruppe von Vagero hat 1986 gezeigt, dass Menschen die im Freien arbeiten und der Sonne stark ausgesetzt sind, seltener an Melanomen erkranken als Büroangestellte [589].

Später wurde bestätigt, dass der durch die Sonne erhöhte $25(\text{OH})\text{D}_3$ Spiegel zu einer erniedrigten Auftretenswahrscheinlichkeit der Erkrankung und einer besseren Überlebensrate und günstigeren Prognose für die Patienten führt [694,697,698]. Vitamin D_3 Metabolite zeigen nicht nur in Melanom-Zellen ihre proliferationshemmende und differenzierungsfördernde Wirkungen, sondern auch in kultivierten Melanozyten und malignen Melanom-Xenografts [228]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert die Apoptose maligner Melanozyten in-vitro und hemmt die Tumordinvasion, Metastasierung und Angiogenese des Melanoms [91,95,134,423]. Vitamin D_3 Analoga mit niedrigem Ca^{2+} -Gehalt (z.B. $20(\text{OH})\text{D}_3$) oder mit einer pregnenolonähnlichen Seitenkette (z.B. 21-Hydroxypregnacalciferol) können bei der Melanom-Therapie ebenfalls wirksam sein [262,531,616,656].

Die Hautkrebs-Anfälligkeit eines Menschen lässt sich anhand der Bindungsfähigkeit von Vitamin D_3 an seinen Rezeptor untersuchen. Dabei werden kleine Nukleotid-Polymorphismen (engl. Small Nucleotide Polymorphisms; kurz SNPs) zur Bestimmung des Hautkrebsrisikos analysiert. Mehr als 60 VDR-Polymorphismen wurden in den Exons 2-9 und in der 3'UTR-Promotorregion entdeckt, die die Prävalenz und Prognose von Hautkrebserkrankungen beeinflussen [137,228,586]. Die am besten untersuchten VDR-SNPs sind die Melanom-assoziierten Taq1, Bsm1, Apa1 und das NMSC-relevante Fok1 [101].

Vitamin D_3 schützt verschiedene Hautzellen (z.B. Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten) vor intrazellulären UV-Schäden [95,104,106,306,633]. In lebenden Organismen sind promutagene Pyrimidindimere die wichtigste Form von DNA Schäden, die direkt durch UV-Strahlung erzeugt werden [699]. Die in der menschlichen Haut vorherrschende Form ist das Thymin-Dimer [86,108]. Dieses nimmt nach UV-Bestrahlung rasch zu und erreicht seinen Spitzenwert bereits nach 6h [186]. In der Anwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ werden neben Thymin-Dimeren auch Stickoxid-Produkte verringert, während die p53-Expression ansteigt. Es kommt zu einer geringeren Anzahl an zellulären DNA-Schäden und einer erhöhten Überlebensrate der Zelle [186].

Während es zahlreiche Daten zum tumorsuppressiven Effekt von Vitamin D_3 gibt, berichten manche Studien von einem variierenden Verhältnis zwischen Vitamin D_3 und der Hautkrebs-Entwicklungstendenz [468]. So führte bei postmenopausalen Frauen die tägliche Supplementierung mit 1000 mg Ca^{2+} und 400 IE Vitamin D_3 über einen Zeitraum von 7 Jahren zu keiner Verringerung der Gesamtinzidenz von weißem oder schwarzem Hautkrebs [700]. In der "Vitamin D/Calcium Polyp Prevention Study" führte eine über 3 oder 5 Jahre tägliche Einnahme von 1200 mg Ca^{2+} , allein oder zusammen mit 1000 IU Vitamin D_3 , ausschließlich zur Verringerung des SCC-Risikos [434]. Obwohl SCCs auf exogenes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ansprechen und es synthetisieren können, reagieren sie nicht auf seine prodifferenzierende und proliferationshemmende Wirkung [36,701]. Die Forschungsgruppe von Eide fand

außerdem, dass bereits ein $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel von $>37,5$ nmol/L ausreicht, um ein erhöhtes Risiko für BCC und SCC zu durchlaufen [120]. In der "Nurses' Health Study" stellte man fest, dass ein $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel von $>78-85$ nmol/L mit einer erhöhten BCC- und SCC-Inzidenz assoziiert ist im Vergleich zu <50 nmol/L [702]. Die Arbeitsgruppe von van der Pols fand bei Patienten mit einer Hautkrebs Vorgeschichte und einem $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel von >75 nmol/L eine erhöhte BCC- aber geringere SCC-Inzidenz. Bei Patienten ohne Vorgeschichte zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Vitamin D_3 Spiegel und dem Hautkrebsrisiko. Der $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel >75 nmol/L wurde auch als Marker für eine erhöhte Melanom-Inzidenz identifiziert [703]. Eine Studie aus 1998 zeigte, dass die Melanomzelllinie MeWo nicht auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierte Apoptose anspricht, obwohl sie den VDR exprimiert [91]. In einer weiteren Studie von 2007 fand man eine Resistenz der Melanom-Zelllinien SK-Mel-5, Sk-Mel-25, IGR und MelJuso gegenüber der antiproliferativen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [704]. Immer mehr Studien berichten von einem Zusammenhang zwischen höheren Vitamin D_3 Spiegeln und einem erhöhten Hautkrebsrisiko, während andere wiederum keinen Zusammenhang feststellen können [6,564]. Trotz vieler unklarer Faktoren ermutigen all diese Ergebnisse dazu, die zellulären Auswirkungen von Vitamin D_3 auf die Hautkrebsentstehung genauer zu untersuchen.

2.2 UV-Strahlung

2.2.1 Geschichte und Grundlagen

Im Jahr 1886 gelang dem deutschen Physiker H. R. Herz der experimentelle Nachweis der elektromagnetischen Wellen [176]. Alle in der Natur vorkommenden elektromagnetischen Wellen werden im elektromagnetischen Spektrum zusammengefasst. Dieses wird in verschiedene Bereiche anhand der Wellenlänge (m) bzw. der Frequenz (Hz) unterteilt (Abb. 2.6). Sonnenlicht besteht aus einem kontinuierlichem Spektrum elektromagnetischer Strahlung, das zu 6,8% aus ultravioletter (UV), 38,9% aus sichtbarer (Licht) und 54,3% aus infraroter (IR) Strahlung besteht [269,541].

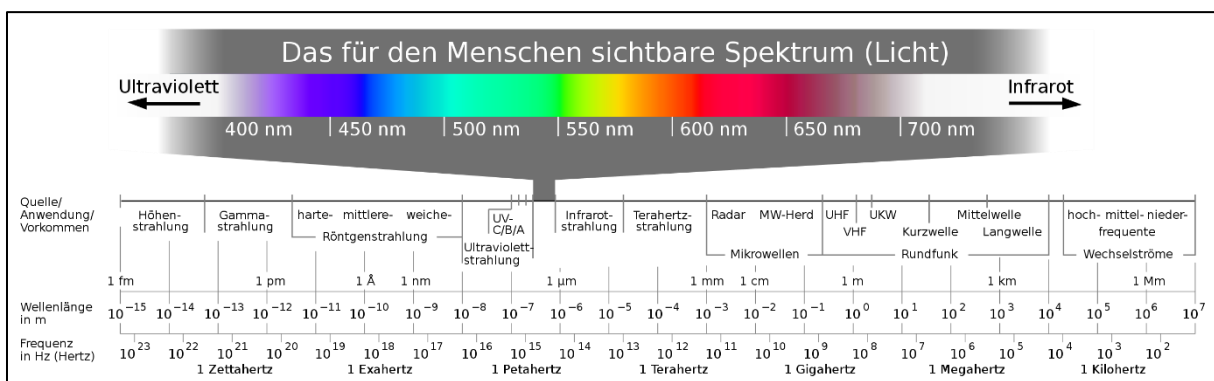


Abb. 2.6: Bereiche des elektromagnetischen Spektrums (nach Horst Frank / Phrood / Anony, CC BY-SA 3.0 <<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons)

Das UV-Spektrum ist für den Menschen wichtig, da es zu Langzeitschäden (z.B. Katarakt im Auge, Lichtalterung, Photokarzinogenese der Haut) führen kann. Andererseits hat es auch gesundheitliche Vorteile, wie die Vitamin D₃ Produktion in der Haut. Es deckt den Wellenlängenbereich zwischen 100 und 400 nm ab und wird in 3 Gruppen unterteilt [705]:

Strahlung	Wellenlänge	Merkmale
Ultraviolett-A (UV-A)	315-400 nm	langwellig, energiearm, große Eindringtiefe, geringe Streuung, schwach erythem aber photosensibilisierend
Ultraviolett-B (UV-B)	280-315 nm	kurzwellig, energiereich, mäßige Eindringtiefe, starke Streuung und stark erythem
Ultraviolett-C (UV-C)	100-280 nm	sehr kurzwellig und energiereich, geringe Eindringtiefe, sehr starke Streuung, bakterizid

Tab. 2.1: Bereiche des UV-Spektrums

Beim Durchgang des Sonnenlichts durch die Atmosphäre wird fast 100% der UVC- und 90% der UV-B-Strahlung von Umweltelementen wie Ozon (O₃), Wasserdampf (H₂O), Sauerstoff (O₂) und Kohlendioxid (CO₂) absorbiert. Die UV-Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht, besteht hauptsächlich aus UV-A (90-99%) und zu einem kleinen Anteil aus UV-B (1-10%) [360]. Die Intensität der UV-Strahlung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Tages- und Jahreszeit, der Breitengrad, die Höhe, der Schatten, die Bewölkung, das Vorhandensein von Nebel, Dunst und Schadstoffen, die Reflexion der Oberfläche durch Schnee, Sand, Metall und Meerwasser können die Strahlung erhöhen oder verringern [227,395].

Die UV-Strahlung spielt in der Dermatologie eine wichtige Rolle, da sie abhängig von ihrer Wellenlänge in unterschiedlichen Hautschichten absorbiert wird. Außerdem werden anhand der verschiedenen UV-Absorptionseigenschaften unterschiedliche Effekte ausgeübt. UV-A dringt bis in die Dermis ein und deponiert bis zu 50% ihrer Energie im dermalen Stratum papillare [474]. Die Wirkung der UV-A-Bestrahlung zeigt sich v.a. in der Induktion freier Radikale, die DNA-schädigend und immunmodulierend wirken [128]. Histologisch kommt es zu einer Zunahme der dermalen Dicke und zur Desorganisation und Apoptose von Kollagenfasern und Fibroblasten. Durch den Verlust der Hautintegrität wird die Hautalterung begünstigt [395,609]. Das genotoxische Potenzial von UV-A ist vorwiegend auf indirekte Mechanismen zurückzuführen. Durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fördert sie oxidative DNA- und Protein-Schäden in der Zelle [242]. Außerdem führt sie zum Zelluntergang und zu Entzündungen, die durch Caspase-3 und Activator Protein 1 (AP-1)/Nuclear factor kappa B (NF-κB) vermittelt werden [609]. Durch die Konformationsänderung des Melanins kommt es zu einer direkten und kurzanhaltenden Pigmentierung (engl. immediate pigment darkening, kurz IPD), die kaum einen Lichtschutz bietet [436,489]. Im Gegensatz zu UV-A, schädigt UV-B-Strahlung die zelluläre DNA in einer direkten Weise. UV-B wird fast vollständig von der Epidermis absorbiert, so dass nur 20% der Strahlung das epidermale Stratum basale oder dermale Stratum papillare erreicht [474]. Obwohl sie das effizienteste Mittel zur Deckung des Vitamin D₃ Bedarfs ist, kann der Vorteil für die Haut durch das erhöhte Krebsrisiko bei übermäßiger Strahlung aufgehoben werden [39]. UV-B moduliert verschiedene Onkogene (z.B. p53/cAMP-response element binding protein (CREB), c-Myc) und verursacht DNA-Umlagerungen, die zur Bildung mutagener Photoprodukte und Mutationen des Tumorsuppressors p53 führen können [706–709]. Die mutationsbedingte p53-Inaktivierung spielt v.a. für die Entstehung und das Fortschreiten von AK und SCC eine Rolle. So werden in 90 % der SCC- und in bis zu 100 % der AK-Fälle p53-Mutationen gefunden [710–712]. UV-B fördert außerdem oxidative Proteinveränderungen und die Proliferation von Keratinozyten. Sie ist erheblich wirksamer bei der Verursachung von Sonnenbränden als UV-A und führt hauptsächlich zu akuten Verletzungen, während UV-A eher chronische Hautschäden verursacht [395,713]. UV-B ist auch für die Entstehung von Bräunung,

Faltenbildung und Lichtalterung verantwortlich. Obwohl UV-B energiereicher als UV-A Strahlung ist, kann sie nicht durch Glas dringen [395].

Die Entwicklung von etwa 90 % der NMSC wird mit der UV-Exposition assoziiert [599]. Da im UV-Spektrum die UV-B-Strahlung die stärkste karzinogene Wirkung auf die Haut ausübt, werden die Mechanismen der UV-B-induzierten Zellschädigung und Photokarzinogenese näher erläutert.

2.2.2 UV-induzierte Zellschaden

Bei den schädlichen Wirkungen der UV-B-Strahlung auf die Haut handelt es sich um sauerstoffunabhängige Reaktionen, die durch direkte Zellschäden und Veränderungen der Immunfunktion verursacht werden. UV-induzierte DNA-Schäden spielen eine Schlüsselrolle in der Initiationsphase von Hautkrebs. Aufgrund ihrer optimalen photochemischen Eigenschaften, wandelt die menschliche DNA mehr als 99,9% der absorbierten Photonen in harmlose Wärme um, während die restlichen <0,1% zur Schädigung der Zelle führen [430,660]. Die emittierten UV-B-Photonen werden direkt durch DNA-Basen absorbiert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Pyrimidin- und Purin-Bestandteile, einschließlich Thymin, Cytosin und dem kleineren 5-Methylcytosin [714]. Pyrimidin- und Purinringe haben ein UV-Absorptionsmaximum von 260 nm, das im nahen UV-B-Wellenlängenbereich ausläuft [421,570]. Die UV-B-Absorption führt zur Bildung von dimeren Photoprodukten, an denen zwei benachbarte Pyrimidinbasen beteiligt sind. Es handelt es sich um prämutagene Läsionen, die die Struktur und Basenpaarung der DNA verändern. Die häufigsten molekularen Läsionen sind die Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPD), gefolgt von den Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukten (64PP) (Abb. 2.7) [329,372]. CPD bestehen aus einer viergliedrigen Ringstruktur nach einer [2 + 2]-Addition einer Pyrimidinbase an die C5-C6 Doppelbindung einer zweiten Pyrimidinbase. Die 64PP entstehen ebenfalls durch eine [2 + 2]-Cycloaddition, an der jedoch die C5-C6-Doppelbindung des Pyrimidins am 5'-Ende und die C4-Carbonylgruppe des Thymin bzw. C4-Iminogruppe des Cytosins am 3'-Ende beteiligt ist. Dies führt zur Bildung eines instabilen Oxetan- bzw. Azetidinzwischenprodukts. Durch eine spontane Umlagerung des Oxetans bzw. Azetidins entstehen anschließend die 64PP-Addukte [714].

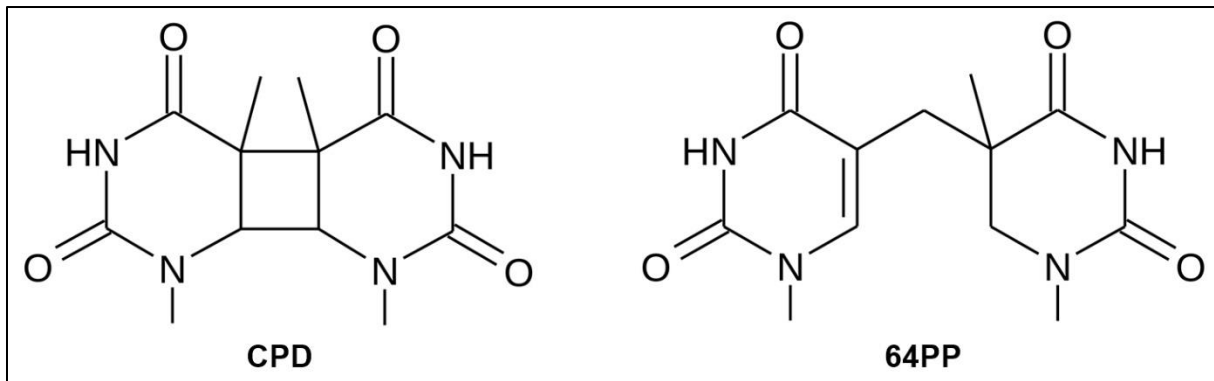


Abb. 2.7: Struktur von dimeren Thymin Photoprodukten (CPD: Cyclobutan Pyrimidin Dimer, 64PP: Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukt)

Genetisch betrachtet kommt es zu einer Punktmutation, also einer Transition von Cytosin (C) zu Thymin (T) (etwa 2/3 aller Mutationen) und CC zu TT (etwa 10% aller Mutationen), die auch die häufigste genetische Veränderung der p53-Mutationen beim Hautkrebs ist [17,115,541]. Das TT-Photoprodukt (sog. "Thymin-Dimer") ist außerdem ein spezifischer Indikator für UV-B-induzierte DNA-Schäden [109]. CPD-Läsionen sind die Hauptquelle für UV-B-induzierte Mutationen, da sie 5- bis 10-mal häufiger auftreten als 64PP [43,363]. Sie sind für die Mehrheit der akuten Reaktionen (d.h. Sonnenbrand, Apoptose, Hyperplasie, Mutationsinduktion) in der Haut verantwortlich, darunter auch die Entstehung von NMSC [241]. UV-C-Strahlung kann durch Spaltung des Cyclobutanrings die Bildung von CPD rückgängig machen [714]. 64PP erzeugen dagegen größere DNA-Verzerrungen als CPD, sind immunogener und werden schneller repariert [83,371]. Eine bemerkenswerte Eigenschaft ist ihre leichte Umwandlung in die verwandten Dewar-Valenzisomere, wenn sie UV-A- oder UV-B-Strahlung ausgesetzt werden (Abb. 2.8) [568,569]. Dabei handelt es sich um photoaktive Isomere, die bei kurzweiliger UV-Strahlung wieder in 64PP-Addukte umgewandelt werden [570]. Obwohl CPD und 64PP strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, zeigen sie unterschiedliche biologische Wirkungen. CPD-Läsionen haben eine stärkere Wirkung auf die Induktion des Zellzyklusstillstands. Während in-vivo- und in-vitro-Behandlungen mit dem CPD-Imitat pTpT zum Stillstand des Zellzyklus führten, nahm jedoch die Apoptose nicht zu. Dagegen erwiesen sich 64PP-Läsionen bei der Induktion von UV-vermittelter Apoptose deutlich wirksamer als CPD, da ihre Reparatur die apoptotische Reaktion doppelt so stark verringerte wie die Reparatur von CPD [334]. Wenn die Reparatur solcher mutagener DNA-Läsionen ausbleibt, kann es zur Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen mit anschließender Karzinogenese kommen [214].

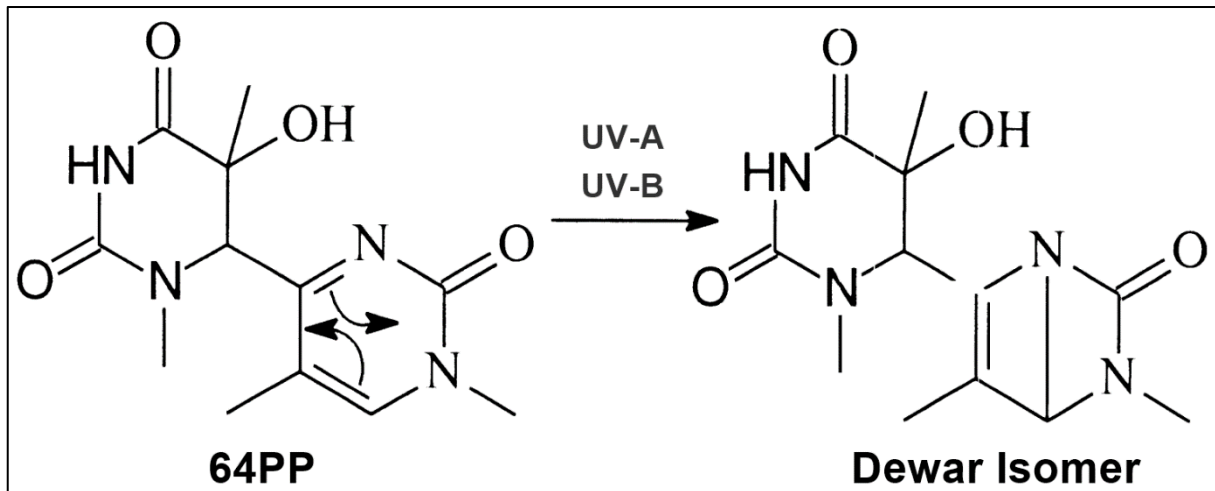


Abb. 2.8: Umwandlung von 64PP in ein Dewar Isomer unter UV-Einfluss (modifiziert nach der veröffentlichten Abbildung in Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, Volume 63, Jean-Luc Ravanat, Thierry Douki, Jean Cade, Fig. 2. Formation and photoisomerization of the thymine (6-4) photoproduct, Seiten 88-102, Copyright Elsevier (2001). Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags)

Obwohl Dipyrimidinsequenzen die bevorzugten Ziele der UV-B-Strahlung sind, sind auch Purinbasen photoreaktiv. Ihre Adenin (A)-haltige Photoprodukte entstehen durch Dimerisierung mit einem A oder Anlagerung an ein T und können mit ihren mutagenen Addukten zu den krebserregenden UV-B-Wirkungen beitragen [273,286,648,649]. Andere Photoprodukte sind Purin-Pyrimidin-Photoaddukte, Photohydratationen und Photooxidationen [512]. Obwohl sie als prämutagene Läsionen wirken, ist ihr Gesamtbeitrag am UV-induzierten Zellschaden sehr klein (ca. 3-4% im Vergleich zu den CPD) und ihre biologische Wirkung in den meisten Fällen unbedeutend [83].

Im Gegensatz zum UV-B-induziertem Zellschaden, erfolgen DNA-Schäden vermittelt durch UV-A und sichtbares Licht überwiegend mittels Photosensibilisierungsreaktionen, die die Beteiligung körpereigener Photosensibilisatoren (Flavine, Porphyrine) zusammen mit Sauerstoff erfordern [62]. UV-A-Photonen werden durch solche Photosensibilisatoren absorbiert und fördern den DNA-Abbau durch kompetitive Mechanismen vom Typ I (Ein-Elektronen-Oxidation oder Wasserstoffabstraktion) und Typ II (Singulett-Sauerstoff-Oxidation) [149].

Eine wichtiges Ereignis bei der Entstehung von Hautkrebs sind UV-B-bedingte Veränderungen des Immunsystems [54]. UV-B führt zur verminderten Antitumor-Immunität, Induktion der immunsuppressiven Zytokinproduktion, Modulation von Kontakt- und Überempfindlichkeitsreaktionen und verminderten Resistenz gegenüber neoplastischen Zellen und Infektionen [31]. Auch Wachstumsfaktoren und stimulatorische Signale werden in der Zelle moduliert. Außerdem werden bestimmte Gene aktiviert, die immunotoxische

Wirkungen hervorrufen. Über die Entstehung von CPD und Freisetzung von IL-10 und TNF α kommt es zur Unterdrückung des lokalen und systemischen Immunsystems [169]. Photorezeptoren wie die cis-Urocaninsäure (UCA), Transkriptionsfaktoren (NF κ B, AP-1, p91) und verschiedene Signaltransduktionswege (Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor-vermittelte Hochregulierung von Phospholipase A2, Lipid-Peroxidations-Signalweg) können ebenfalls eine Rolle spielen [61,102,169,576,587].

2.2.3 Reparaturmechanismen UV-induzierter Schaden

Nach der UV-Exposition aktivieren die Zellen das Tumorsuppressorprotein p53, das ein wichtiger Regulator der DNA-Schadensreaktion ist [715]. Es reguliert die Transkription von Genen, die am Wachstum, der Apoptose und Reparaturmechanismen der Zelle beteiligt sind, und erhöht die Zugänglichkeit der DNA für Reparaturenzyme [15,70,355,384,652,658]. Zusätzlich wird der Zellzyklus für die Reparatur angehalten (sog. Zellzyklusarrest) [307]. Die Reparaturdauer hängt von der Art der Zellschädigung ab, so dass die Korrektur von 64PP schnell durchgeführt wird und von CPD am längsten dauert [372]. Es gibt eine Reihe spezifischer und hochkonservierter Reparaturmechanismen, die effizient DNA-Läsionen beseitigen. Die wichtigsten sind die direkte Reparatur mittels Photoreaktivierung, die Einzelstrangbruch-Reparatur (ESB) mittels Exzisionsreparatur oder Mismatch-Reparatur (MMR) und die Doppelstrangbruch-Reparatur (DSB) [716]. Wenn der Schaden zu groß ist, löst die Zelle die Apoptose oder Nekrose aus, um eine DNA-geschädigte und potenziell mutierte Zellen zu eliminieren [289].

Die einfachste Reparaturart ist die Photoreaktivierung (auch Direkte Reparatur oder Schadenreversion genannt), die durch Photonen-angeregte Enzyme (sog. Photolyasen) katalysiert wird und die Reparatur von Basen sowie die Ligation von Einzelstrangbrüchen durchführt [153]. Photolyasen kommen in Bakterien, Pflanzen und Wirbeltieren vor. Sie nutzen das blaue Licht der Sonne, um mithilfe von FADH₂ den Cyclobutanring zwischen den Pyrimidinbasen zu spalten [501]. Sie sind spezifisch für CPD und 64PP [646].

Die Exzisionsreparatur ist ein mehrstufiger, licht-unabhängiger Reparaturprozess, bei dem der Schaden durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) und die Basen-Exzisionsreparatur (BER) entfernt wird. Der häufigste Reparaturweg für UV-induzierte Pyrimidindimere ist die NER, die aus dem Global Genome Repair (GGR) und dem transkriptionsgekoppelten Reparaturweg (engl. Transcription Coupled Repair; kurz TCR) besteht [110]. Es handelt sich um einen DNA-Synthese-abhängigen Reparaturprozess, der aus vier Schritten besteht: die Erkennung des Schadens, das Abspulen der DNA an der Stelle der Läsion, die Abspaltung des geschädigten Oligonukleotids mithilfe von Endonukleasen und die Synthese und Ligation

der DNA unter Verwendung eines unbeschädigten Stranges [420,502,657]. Dadurch können bis zu 30 Basenpaare lange DNA-Abschnitte ersetzt werden. Während der GGR im gesamten Genom mithilfe des DNA-Schadensbindungsproteins Xeroderma pigmentosum group C (XPC) Läsionen erkennt, wird der TCR erst dann eingeleitet, wenn es zum Stillstand der RNA-Polymerase im aktiv transkribierten Strang kommt [198,550,596]. Defekte der NER führen zu Erkrankungen wie Xeroderma pigmentosum (XP), dem Cockayne-Syndrom (CS) und der lichtempfindliche Form der Trichothiodystrophie (TTD) [84,257]. Die BER wirkt gegen UV-induzierte Basenläsionen, die indirekt über die Erzeugung von ROS entstehen [13,223,517]. Abhängig vom reparaturbedürftigen Schaden wird sie in zwei Varianten unterteilt: die short-patch-Reparatur (Ersatz von einem Nukleotid) und die long-patch-Reparatur (Ersatz von bis zu 20 Nukleotiden) [483]. Die BER-Aktivität wird durch DNA-Glykosylasen eingeleitet, die den Schaden erkennen und entfernen. Durch die Spaltung der Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose bleibt eine abasische Stelle (sog. AP-Stelle) zurück. Dort fügt die AP-Endonuklease einen Einzelstrangbruch ein. Die DNA-Polymerase entfernt den geschädigten Bereich und synthetisiert den neuen Strang, indem sie den komplementären Strang als Vorlage benutzt. Die DNA-Ligase schließt letztendlich die entstandene Lücke [628]. Immer mehr Beweise deuten darauf hin, dass neben der NER auch die MMR an der UV-induzierten Hauttumorentstehung beteiligt ist [464]. Sie korrigiert Basenfehlanspassungen, die durch Replikationsfehler oder Deaminierung von Cytosin verursacht werden [300,364]. Die MMR-Aktivität kann sowohl während der DNA-Replikation in der S-Phase als auch außerhalb der S-Phase und unabhängig von der DNA-Replikation durchgeführt werden [437,655]. Nachdem eine Fehlpaarung in neu synthetisierten DNA-Strängen erkannt wird, wird der Strang hinter der Fehlpaarung durch spezielle Proteine (z.B. PCNA, RFC1-RFC, MLH1/PMAS2, der Exonuklease EXO1) herausgeschnitten und später resynthetisiert [236,287]. Durch die Aktivierung von p53 kann es eine UV-B-induzierte Apoptose auszulösen [442].

DSB können durch Photoläsionen, ROS und Defekte in DNA-Reparaturprozessen entstehen [255]. Es wird die homologe von der nicht-homologen Reparatur unterschieden [325,500]. Die homologe Reparatur verwendet als Vorlage Schwesterchromatid-Sequenzen oder ein homologes Chromosom und ist auf die S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt, in der sich die Schwesterchromatiden nahe der Bruchstelle befinden und als Reparaturtemplate benutzt werden [97,185,488,495,499]. In den meisten Eukaryoten wird die nicht-homologe Reparatur bevorzugt, die keine homologe Vorlage benutzt und während des gesamten Zellzyklus ablaufen kann [185,488]. Sie umfasst die Bildung von DNA-Protein-Komplexen mit gebrochenen Enden und den Einsatz der spezialisierten DNA-Ligase IV, die zwei DNA-Enden direkt miteinander verbindet [255,629]. Da die ligierten DNA-Enden kaum Homologie zueinander aufweisen, kommt es häufig zu Fehlern, Insertionen und Deletionen [325].

Die Bedeutung der DNA-Reparatur ist klar ersichtlich bei der Veranschaulichung des frühen und erhöhten Risikos von UV-Mutationen und Hautkrebs bei XP-Patienten [103]. Eine verminderte DNA-Reparaturkapazität wurde außerdem als unabhängiger Risikofaktor für die BCC- und SCC-Entwicklung identifiziert [608]. Im Körper wird durch UV-B-Strahlung die sogenannte UV-Stressreaktion induziert. Es kommt zur anhaltenden Entzündungsreaktion an der sonnenexponierten Stelle, die bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Hautkrebs von großer Bedeutung ist [166]. Ein wichtiger Mechanismus in der komplexen zellulären Antwort auf die UV-B-Strahlung ist die Aktivierung des zytosolischen, liganden-aktivierten Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors [8,155].

2.2.4 Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor

Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der eine molekulare Masse von 96 kDa hat, aus 848 AS und 11 Exons besteht und auf dem Chromosom 7 (Genlocus 7p21.1) kodiert wird [4,32,107,127,299]. Zusammen mit den verwandten AhR Nuclear Translocator (ARNT) und AhR Repressor (AhRR) gehört es zur Per-ARNT-Sim-Familie (PAS-Familie) der Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Familie [259,507]. Am N-terminalen Ende besitzt er eine bHLH-Domäne, die für die DNA-Bindung (b-Region) und Protein-Dimerisierung (HLH-Region) wesentlich ist (Abb. 2.9) [182]. Es folgt die PAS-Domäne, die für die AhR-Heterodimerisierung mit ARNT und anderen Chaperonen wichtig ist. Sie enthält zwei Subdomänen, PAS-A und PAS-B, die jeweils ca. 50 AS lang sind und eine hohe Sequenzähnlichkeit zum ARNT Protein haben [126]. Die PAS-B-Domäne beherbergt eine Liganden-bindende Tasche, die nach erfolgreicher Bindung des Liganden zur Aktivierung des Rezeptors führt [4,182]. Die Glutamin-reiche Transaktivierungsdomäne Domäne (TAD oder Q-Region) befindet sich am C-Terminus und ermöglicht die Aktivierung der Proteintranskription mittels Rekrutierung und Interaktion mit Transkriptions-Koaktivatoren [491].

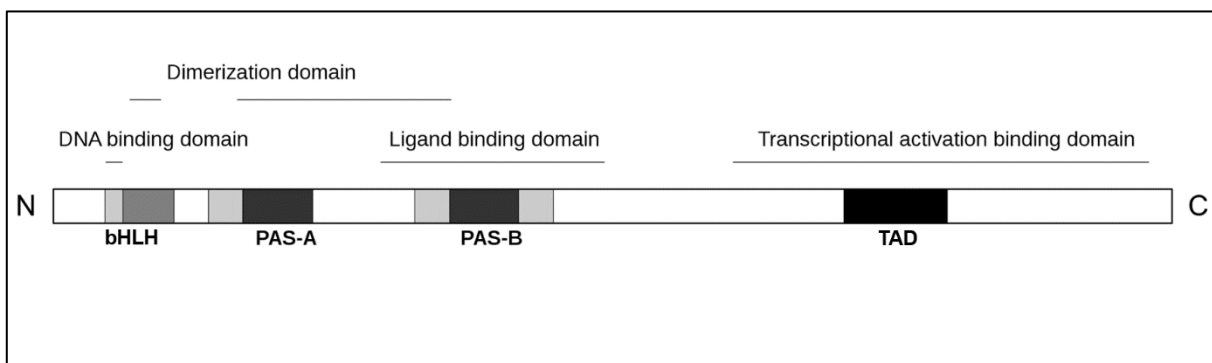


Abb. 2.9: Funktionelle Domänen des AhR (modifiziert nach Jeff Dahl, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons)

Der AhR wurde 1976 entdeckt und anfangs als „Dioxin-Rezeptor“ betitelt [419,449,450]. Er ist wegen seiner Rolle bei der Metabolisierung und Entgiftung von gefährlichen Substanzen bekannt, die als Liganden an den Rezeptor binden und ihn aktivieren. Dabei wird zwischen synthetischen und natürlichen Liganden unterschieden. Die am besten definierten AhR-Liganden sind die synthetischen, die meistens Umweltchemikalien sind und eine hoch-affine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Die bekanntesten Vertreter sind die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAHs) wie das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD, Dioxin) und die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAHs) wie das Benzo(a)pyren (BaP) [100]. Die nicht-klassischen, natürlichen AhR-Liganden entstammen dem eigenen Körper oder sind in diversen Lebensmitteln wie Obst und Gemüse enthalten. Sie sind weniger toxisch und binden schwächer an den Rezeptor. Wichtigsten Vertreter sind Flavonoide, Indolderivate, Stilbene und Karotinoide [58,81,647]. Aufgrund dieser Funktionen wird der AhR in Barriereorganen wie der Haut stark exprimiert [133,717].

2.2.4.1 AhR-Signaltransduktion

In Abwesenheit von Liganden befindet sich der AhR im Zytoplasma, gebunden an einen inaktiven Multikomplex bestehend aus zwei Heat Shock Protein 90 kDa (HSP90) Proteinen, einem Co-Chaperon protein 23 kDa (p23), Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2-Molekül (XAP-2) und dem Protoonkogen pp60^{src} (Tyrosin-Proteinkinase Src) [130,339,443]. Diese Proteine sorgen für die korrekte Rezeptor-Faltung, bieten Schutz vor Proteolyse und ermöglichen eine effiziente Liganden-Erkennung [187].

UV-B-Strahlung erzeugt endogene Verbindungen, die eine hohe Affinität für den AhR aufzeigen [205,460]. Lange Zeit wurde den Tryptophan-abgeleiteten, hochaffinen AhR-Liganden 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) und 6,12-Diformylindolo[3,2-b]carbazol (dFICZ) eine Rolle bei der AhR-vermittelten biologischen Reaktion auf UV-B zugeschrieben [155,460,461]. Folglich wurde von einer AhR/FICZ/Ziegen-Rückkopplungsschleife ausgegangen. Jüngste Studien belegen, dass FICZ als Reaktion auf biologisch relevante UV-B-Dosen und simuliertes Sonnenlicht jedoch nur geringfügig produziert wird, und gehen somit von der Beteiligung anderer AhR-Liganden aus [641]. Endogene Liganden können den AhR über zwei Signalwege aktivieren: einen im Zellkern (kanonische Signalweg) und einen in der Zellmembran (nicht-kanonische Signalweg) (Abb. 2.10) [155].

Sobald ein Ligand in die Zelle gelangt, erkennt er die Nuclear Localization Sequence-Region (NLS-Region) in der DNA-Bindungsdomäne des AhR und bindet an den Rezeptor. Das AhR-Protein durchläuft eine Konformationsänderung, die zur Dissoziation des Proteinkomplexes und Translokation des Rezeptors in den Zellkern führt. Dort dimerisiert der AhR mit seinem

Partnerprotein ARNT (AhR/ARNT-Komplex), bindet an die Xenobiotic Responsive Element-Region (XRE) in der Enhancer-Region von Zielgenen, rekrutiert die RNA-Polymerase II und induziert mit Hilfe von Co-Aktivatoren (SRC-1, CoCoA, CBP/p300, RIP140) die Zielgen-Transkription [268,283,284,400,454,718]. Das am besten charakterisierte AhR-Zielgen ist das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), während auch Gene, die für die Phase-I- (z.B. CYP1A2, CYP1B1) und Phase-II-Enzyme (z.B. Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronosyltransferasen 1A1 und 1A6) kodieren, als Rezeptorziele agieren [44,274,351,592,624,719]. Ein AhR-Zielgen ist auch der AhRR, der einen negativen Rückkopplungsmechanismus auslösen kann [25,275,369]. Er konkurriert mit dem AhR um die ARNT- und XRE-Bindungsstelle und kann nach erfolgreicher Bindung die AhR-abhängige Genexpression blockieren [369]. Der AhR wird anschließend aus dem Zellkern in das Zytoplasma verlagert, wo er durch Proteasome abgebaut wird [92].

Die liganden-bedingte Dissoziation des Multikomplexes führt außerdem zur Aktivierung der löslichen pp60^{src}, die sich vom Zytosol zur Zellmembran begibt [130,270]. Dort führt sie zur Aktivierung und Internalisierung des Zelloberflächenrezeptors epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), der die nachgeschaltete Mitogen-Aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktion (RAS-RAF-MEK-ERK1/2) induziert [148,251,487]. Intrazellulär wird die Transkription der pro-inflammatorischen Cyclooxygenase 2 (COX-2) aktiviert, die das Zielgen des nicht-kanonischen, zytoplasmatischen AhR-Signalweges repräsentiert [57].

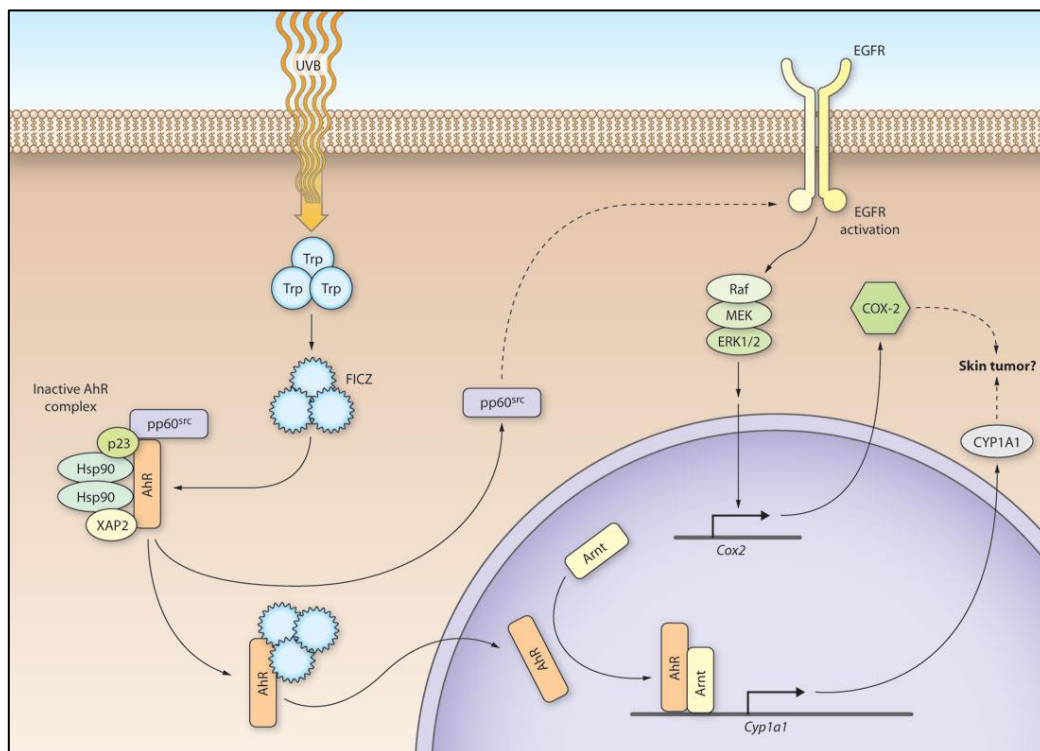


Abb. 2.10: AhR-Signaltransduktion nach UV-B-Bestrahlung (Aus [Agostinis P, Garmyn M, Van Laethem A (2007) The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Illuminating Effector of the UVB Response. Sci STKE 2007:pe49–pe49]. Nachdruck mit Genehmigung von AAAS)

2.2.4.2 Cytochrom P450 1A1

Die Cytochrom-P450-Familie 1 besteht aus hämhaltigen Enzymen, die Phase-I-Stoffwechselreaktionen katalysieren und an der Biotransformation von Xenobiotika und Arzneimitteln beteiligt sind [399,618]. Die mikrosomale Monooxygenase Cytochrom P450 Familie 1 Unterfamilie A Mitglied 1 wird durch das CYP1A1 Gen kodiert, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (Genlocus 15q24.1) befindet, über 6.311 Basenpaare lang ist und sieben Exons und sechs Introns enthält [87,238,254,546]. CYP1A1 (auch als „Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase“ bekannt) kommt hauptsächlich im extrahepatischen Gewebe vor und gehört zur „AhR gene battery“, deren Induktion zu Aktivierung der AhR-Signalkaskade führt [263,534,549,720]. Da seine Expression hauptsächlich durch den AhR reguliert wird, kann CYP1A1 als sensibler Biomarker für die AhR-Aktivierung angesehen werden [85,225,340,592]. CYP1A1 ist für die ROS Produktion und die Bioaktivierung von Prokarzinogenen zur Erzeugung reaktiver Metabolite und ultimativer Karzinogene bekannt [478,721,722].

Potentiell krebserregende, exogene CYP1A1-Substrate sind typischerweise PAHs und HAHs, aber auch industrielle Arylamine, Brennstoffverbrennungs- und Tabakprodukte [88,260,524,723]. Durch die Hydroxylierung an einer freien Position eines aromatischen Rings (das Markenzeichen für die Initiierung der Karzinogenese) entstehen hochreaktive Umwandlungsprodukte (Epoxide und Diol-Epoxide), die durch Bildung von DNA-Addukten zur Mutagenese und Tumorbildung führen [18,60,620,724]. Auch endogene Substrate wie die Arachidonsäure, Eicosapentensäure, Melatonin und Estrogene (z.B. 17 β -Östradiol (E₂), Estrone) wurden beschrieben [303,341,514]. So wird E₂ durch CYP1A1 in Katecholöstrogene wie 2-Hydroxyöstradiol (2OHE₂) und 4-Hydroxyöstradiol (4OHE₂) umgewandelt [160,621]. Durch die Bildung reaktiver Semichinone und Chinine kommt es zur DNA-Modifikation, Bildung von ROS und Mutagenese der Zellen [48,71,195,203,326,412,650]. Manche seiner gefährlichen Liganden kann CYP1A1 auch in polare Derivate entgiften, die über den Urin und die Galle ausgeschieden werden [503]. Murine Experimente haben sogar gezeigt, dass die CYP1A1-vermittelte Entgiftungswirkung nach oraler BaP-Einnahme stärker ausgeprägt ist als die schädlichen, prokarzinogen-aktivierenden Effekte [725]. Aufgrund seines zügigen Ligandenabbau-Mechanismus kann CYP1A1 die Dauer der AhR-Signalisierung regulieren und nachgeschaltete Mechanismen verhindern [630,726]. Durch Hyperoxie, Scherstress und undefinierte Serum Faktoren kann CYP1A1 auch liganden-unabhängig induziert werden [184,383,418].

Die CYP1A1-Aktivität wurde in der menschlichen Haut identifiziert und mit der Entwicklung von Hautkrebs in Verbindung gebracht [536]. So wurde in atypischen Keratinozyten in AK und kutanen SCCs (cSCC) im Gegensatz zu gesunden Zellen eine erhöhte CYP1A1-Expression

dokumentiert [505]. Eine Assoziation von CYP1A1-Polymorphismen mit der Entwicklung von weißem Hautkrebs und verschiedenen Hauterkrankungen (z.B. Neugeborenen- und Chlorakne, Allergien, abnormen Nägeln, Hyperkeratose, Systemischer Sklerose, Lupus erythematosus, Psoriasis vulgaris) wurde ebenfalls beschrieben [10,301,302,330,427,459,580,601,640]. Durch die starke CYP1A1-Expression in epidermalen Talgdrüsen, deren Talg zur Aufrechterhaltung der Hautintegrität beiträgt, moduliert es die Hautbarrierefunktion [490]. In inflammatorischen Hauterkrankungen kann eine erhöhte enzymatische CYP1A1-Aktivität die wohltuende und entzündungshemmende Wirkung des AhR-Signalweges schneller beenden. In Mäusen wurde eine verstärkte Aktivierung von Immunzellen und Hautpathologie durch CYP1A1 ausgelöst [727].

2.2.4.3 Cyclooxygenase-2

Die COX-2 ist ein Enzym, das aus Arachidonsäure das Eicosanoid Prostaglandin H₂ (PGH₂) herstellt, welches eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion spielt [401,480,526]. Das humane Gen (PTGS2) liegt auf dem Chromosom 1 (1q25.2-q25.3), wiegt ungefähr 72kDa und ist 8,3 kB lang mit 10 Exonen, während die mRNA ungefähr 4,500 Basen und das Protein 604 AS besitzt [213,249,538,539,558]. COX-2 fungiert als „Response“- oder "immediate-early"-Gen, da es schnell induziert und streng reguliert wird. Es wird in sehr geringen Mengen im Gewebe exprimiert, wobei manche Organe (z.B. das Gehirn, Rückenmark, die Gebärmutter, Plazenta und Niere) es konstitutiv produzieren können [53,525,728]. Bei Schmerz-, Fieber- und Entzündungsereignissen wird es drastisch hochreguliert [89]. COX-2 wird durch eine Vielzahl von Substanzen induziert, darunter Zytokine, Onkogene, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie UV-B-Strahlung [57,136,151,375]. Dagegen wird es durch Glucocorticoide und Vitamin K₂ und D₃ gehemmt [298,448,610]. Neben der Bedeutung in physiologischen Prozessen wie der Nierenfunktion (Nierenentwicklung und -durchblutung, Natrium (Na⁺)-Ausscheidung), Wundheilung (Angiogenese) und Reproduktion (Ovulation und Geburtseinleitung), begünstigt COX-2 durch den chronischen Entzündungsreiz die Entstehung und Progression von Tumoren [72,199,224,381,622]. So kann es Prokarzinogene aktivieren und das Wachstum, die Invasivität und die Vaskularisation eines Tumors beeinflussen [122,163,212,350,581].

In der Haut wird COX-2 in den stärker differenzierten, suprabasalen Keratinozyten exprimiert [57,318,385]. Sie begünstigt die Differenzierung von Keratinozyten, das Haarwachstum und die Entwicklung von Haarfollikeln [46,405,575,617]. Nach akuter UV-Exposition werden die mRNA und das Protein der COX-2 in der menschlichen Haut rasch hochreguliert und die Produktion von PGE₂ angeregt [57,179,234,318]. PGE₂ bindet an vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (EP₁₋₄) auf der Oberfläche von Keratinozyten, die jeweils unterschiedliche

Signalwege aktivieren. EP₁, EP₂ und EP₄ wurden in Tiermodellen als wichtige Faktoren für die UV-induzierte Hautkarzinogenese identifiziert. Sie führen zur erhöhten Proliferation von Tumorzellen, Hemmung der Apoptose, Förderung der Immunsuppression und Erhöhung der Tumorinvasivität und Entzündungsreaktion [492]. Während eine Überexpression von COX-2 ein Merkmal von Papillomen, AK und SCC ist und innerhalb kürzester Zeit nach Bestrahlung wieder abfällt, führt die Entzündung zum Fortschreiten von AK zu SCC, einer erhöhten Zellreplikation und einer verringerten Apoptose in Melanozyten [11,16,23,34,57,124,178]. Im BCC ist eine COX-2-Expression ausschließlich im Stroma vorzufinden, und nicht in den Tumorinseln [16,23]. Das Melanom weist ebenfalls eine angestiegene COX-2-Expression auf, die mit der Invasion, Tiefe und dem Metastasierungsstatus des Tumors korreliert und als prognostischer Faktor benutzt wird. Noduläre, ulzerierte oder metastasierte Melanome weisen eine stärkere COX-2-Expression als oberflächlich streuende oder primäre, nicht-metastasierte Melanome auf [291,292,370,540]. Mäuse mit COX-1- oder COX-2-Mangel entwickeln verglichen zu Wildtyp-Mäusen 75% weniger Hauttumore [575]. Damit im Einklang steht die Funktion der COX-2 Inhibitoren, die Ödeme und die Gefäßdurchlässigkeit aufheben, die UV-B-induzierte COX-2-Expression und Entzündung abschwächen und das Hautkrebsrisiko um bis zu 90% reduzieren [146,625,626].

2.2.4.4 AhR-Funktionen

Die am besten beschriebene AhR-Funktion ist die Hochregulierung der Cytochrom P450 Familie 1 Enzyme als Reaktion auf Xenobiotika. Seine evolutionäre Erhaltung in unterschiedlichen Spezies, Expressionstendenz in entwickelnden als auch ausgereiften Geweben und phänotypischen Veränderungen in AhR Knockout (KO) Mäusen deuten auf eine wichtige Rolle in verschiedenen Organsystemen hin [1,143,190,368,508]. In der Zelle reguliert der AhR wichtige Adhäsionsprozesse (Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktionen) als auch die Proliferation, Mobilität und Plastizität der Zellen [297]. Liganden-abhängig entwickeln AhR KO-Mäuse vielfältige Fehlbildungen. Betroffen ist die weibliche Fruchtbarkeit (einschließlich dem Eisprung und Follikelwachstum), die Regulation des Wachstums des Herzens, des Pylorus Muskels als auch des perinatalen Wachstums, die Blutdruckregulation und die Produktion peripherer Lymphozyten [2,143,144,369,508,729]. Gefäßmissbildungen mit Persistenz embryonaler Gefäßsysteme (Ductus venosus, porto-fetaler Shunt, Hyaloidarterie), eine Pfortader Hypertrophie und Beeinträchtigung der Augen-Vaskularisation wurden ebenfalls berichtet [294,295,508,572].

Im Immunsystem vermittelt der AhR immunologische Reaktionen mit antiallergischen Wirkungen und moduliert das Th1/Th2-Gleichgewicht in-vivo als auch das Wachstum aktivierter und proliferierender T-Zellen [402,409]. Im Gehirn ist er an neuroendokrinen Bahnen

beteiligt, die die Gehirn-Hypophysen-Nebennieren- und Keimdrüsen-Achsen kontrollieren [297].

In der Haut wird der AhR in allen Zelltypen exprimiert [133]. Er trägt zu physiologischen Prozessen wie der Melanogenese, der Integrität der Hautbarriere und der epidermalen Keratinozytendifferenzierung bei [337,717,730]. Seine Funktion in der Pathogenese dermatologischer Erkrankungen (z.B. atopische Dermatitis, Psoriasis oder Vitiligo) ist Liganden-abhängig. Während manche AhR-Agonisten Krankheiten verursachen oder verschlechtern, können andere heilend wirken [45,189,235,386,731,732]. Somit kann sowohl die Aktivierung als auch die Hemmung der kutanen AhR-Aktivität von Vorteil sein. Viele pathologische Prozesse, die durch chronische UV-B- oder Chemikalien-Exposition und anhaltende AhR-Aktivierung entstehen, verursachen die Alterung und Karzinogenese der Haut (Abb. 2.11).

Die vorzeitige Hautalterung ist multifaktorieller Genese (z.B. abhängig von der Ethnizität, dem Sonnenexpositionsumfang und dem Antioxidantien-Plasmaspiegel) und geht mit der Entwicklung von Falten und Pigmentunregelmäßigkeiten einher [278,279,440,597]. Hautfalten entstehen durch die AhR-vermittelte Aktivitätssteigerung der Matrix-MP 1 und 3, die die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen und die Hautelastizität degradieren [147,387,422,559]. Außerdem modulieren sie mithilfe des AhR den Transforming Growth Factor β (TGF β)-Signalweg und inhibieren somit die Kollagensynthese [188,194,380,456–458]. Die UV-B-Exposition von NCTC 2544-Keratinozyten führte zu einer AhR-bedingten Transkriptionsinduktion von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2 (PAI-2), der die Proteolyse der ECM fördert [152,551]. Die Hautpigmentierung (Melanogenese) erfolgt v.a. durch Umweltgifte. Diese stimulieren über den AhR die Tyrosinase-Aktivität, ein Enzym das den Melanin-Gehalt erhöht, und induzieren den Melanozyten-aktivierenden Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) [337,392]. Die UV-B-vermittelte AhR-Aktivierung erhöht dagegen ausschließlich die Anzahl der Melanozyten [733].

Während die Rolle des AhR-Signalweges bei der BCC-Pathogenese und dem Hh-Signalweg noch unklar ist, wurden seine Komponenten in gesunder Haut, AK und invasivem SCC als die zweitwichtigste Gengruppe identifiziert [342,374]. Zu den AhR-modulierten Schlüsselgenen, die in bestrahlten Keratinozyten hochreguliert werden, gehören die ROS- und DNA-Addukt-generierenden CYP 1 Enzyme (v.a. CYP1A1), das pro-inflammatorische und anti-apoptotische COX-2 und das ebenfalls pro-inflammatorische C-X-C motif chemokine 5 (CXCL5) [88,125,155,429,537]. Der AhR baut zudem das pro-apoptotische Tumorsuppressorprotein p27 ab und unterdrückt die NER, wodurch es zu mutagenen DNA-Schäden in der Hautzelle kommt [152,451]. Außerdem erhöht er die Expression von regulatorischen T-Zellen, IL-2 und der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) [55,243,331,398]. In manchen Melanom Zellen wurde

ebenfalls eine ausgeprägte AhR-Expression festgestellt [414]. Außerdem reguliert der Rezeptor das therapeutische Ansprechen von malignen Erkrankungen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren [600]. Ein wichtiger Checkpoint ist das Oberflächenprotein Programmed cell Death 1 Ligand (PD-L1), dessen Expression in Tumoren durch IFN- γ hochreguliert wird und eine zentrale Rolle in der Krebstherapie spielt [165,196]. Der AhR-Signalweg vermittelt nicht nur Effekte der IFN- γ Behandlung in B16-Melanomzellen, sondern verstärkt auch die PD-L1-Expression in normalen und karzinogenen Zellen [258,332,606]. Durch PD-L1 kommt es zur Induktion und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz im Tumor. Nach Bindung an seinen Partner Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) auf T-Zellen, werden diese entweder in die Apoptose oder in einen regulatorischen Phänotyp getrieben [135,424].

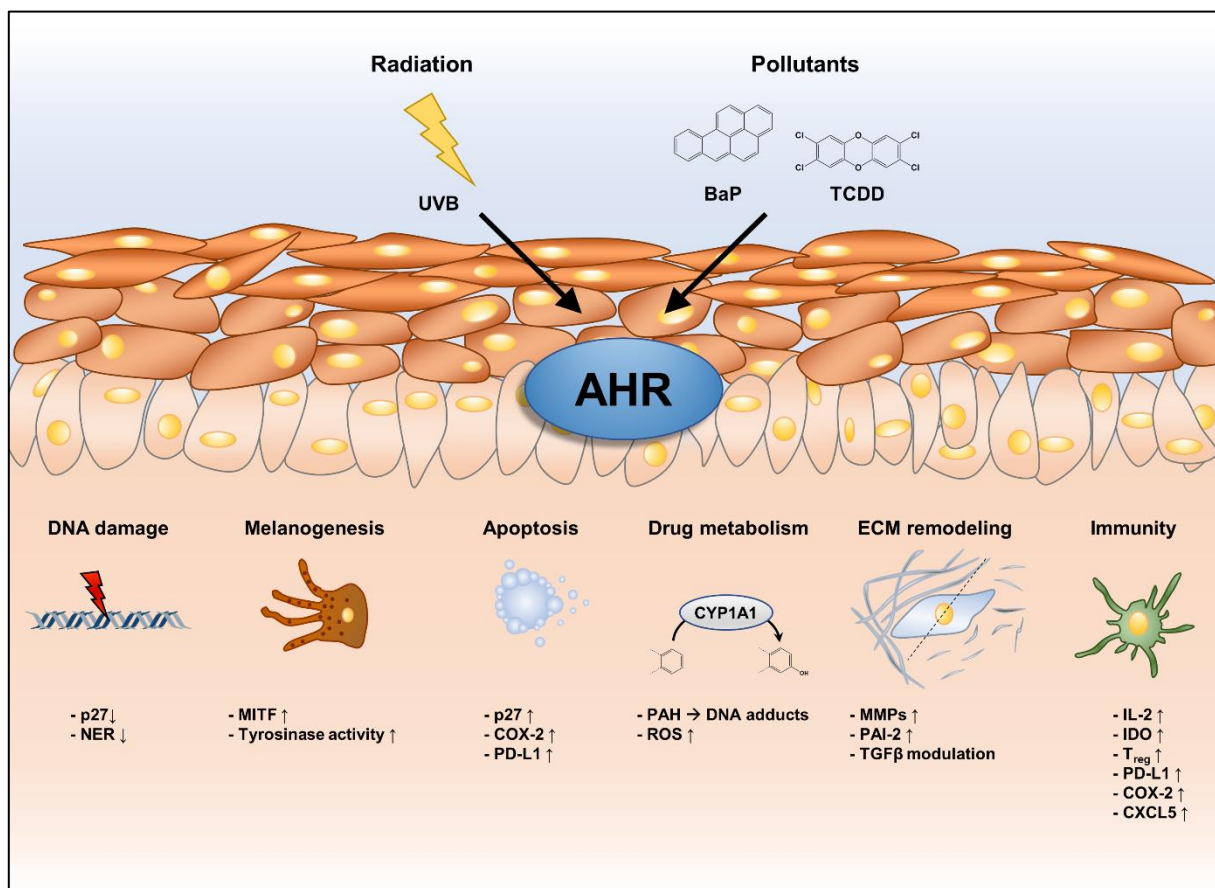


Abb. 2.11: Kutane AhR-Effekte nach Exposition gegenüber UV-B-Bestrahlung oder Umweltschadstoffen (Aus [Vogeley C, Esser C, Tüting T, Krutmann J, Haarmann-Stemmann T (2019) Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Environmentally Induced Skin Aging and Skin Carcinogenesis. Int J Mol Sci 20:6005]. Mit freundlicher Genehmigung von Herr Prof. Dr. Vogeley und International Journal of Molecular Sciences, MDPI-Verlag)

2.3 Cross-talk der AhR- und VDR-Signalwege

Die Kernrezeptoren VDR und AhR sind beides zytosolische, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und die Transkription verschiedener Gene beeinflussen. Trotz ihrer funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten ist nach heutigem Stand der Wissenschaft wenig über die Interaktion der beiden Rezeptoren (einem sog. „Cross-talk“) bekannt. Die Gruppe von Resz-Poszarsz war eine der ersten Forschungsgruppen, die sich 1993 mit dieser Fragestellung auseinandersetzte. Sie untersuchte die Rolle des AhR-Partner Proteins ARNT im VDR-Signalweg, fand aber keine relevante Assoziation oder Bindungsaffinität zwischen ARNT und dem VDR [477]. Jüngere Studienergebnisse weisen dagegen auf eine potenzielle Wechselwirkung zwischen dem AhR- und VDR-Signalweg hin. Die Arbeitsgruppe von Matsunawa belegte, dass die AhR-Aktivierung den VDR-Signalweg stimuliert. So verstärkten die AhR-Liganden BaP und TCDD die 1,25(OH)₂D₃-abhängige VDR-Translokation und CYP24A1-Induktion in Makrophagen-abgeleiteten THP-1 Zellen und Brustkrebszellen der Linie MCF-7 [356]. Im Jahr 2012 identifizierte dieselbe Forschungsgruppe das klassische AhR-Zielgen CYP1A1 als ein neuartiges VDR-Zielgen. Sie fand, dass 1,25(OH)₂D₃ die BaP-induzierte CYP1A1-Gentranskription und -Proteinexpression in monozytären U937-, THP-1-, Brustkrebs- und Nierenepithelienzellen verstärkt [357]. Außerdem wurde von einer gewebeabhängigen Regulation des AhR-Signalsystems durch den potenten VDR-Ligand 1,25(OH)₂D₃ berichtet. Während 1,25(OH)₂D₃ in CD4⁺ T-Zellen die AhR-Expression supprimiert, erhöht es die LPS-induzierte AhR- und CYP1A1-Expression in humanen oralen Keratinozyten (OKF6/TERT-2-Zellen) [321,555]. In den menschlichen Keratinozytenzelllinien NHEK und HaCaT wurden kürzlich neue biologische Funktionen von nicht-klassischen Vitamin D₃ Derivaten identifiziert, die zumindest teilweise über die Bindung an den AhR und den Retinsäure-Rezeptoren ROR und RXR vermittelt werden (Abb. 2.12) [533]. Für 20,23(OH)₂D₃ war der AhR-Signalweg der am stärksten induzierte kanonische Kernrezeptorweg. Durch das Vitamin D₃ Derivat wurde der AhR und die nachgeschalteten Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 signifikant hochreguliert. Der VDR/RXR und sein Zielgen CYP24A1 wurden als zweit stärkster Signalweg aktiviert. Die Vitamin D₃ Metabolite 20(OH)D₃, 1,20(OH)₂D₃ und 17,20,23(OH)₂D₃ konnten die AhR-Expression ebenfalls stimulieren, jedoch schwächer als 20,23(OH)₂D₃. Während 20(OH)D₃ und 17,20,23(OH)₂D₃ beide AhR-Zielgene (CYP1A1, CYP1B1) hochregulierten, stimulierte 1,20(OH)₂D₃ ausschließlich CYP1B1. Der wichtigste kanonische Signalweg für 1,25(OH)₂D₃ war der VDR/RXR, gefolgt vom AhR, PPAR α /RXR α , RAR und LXR/RXR.

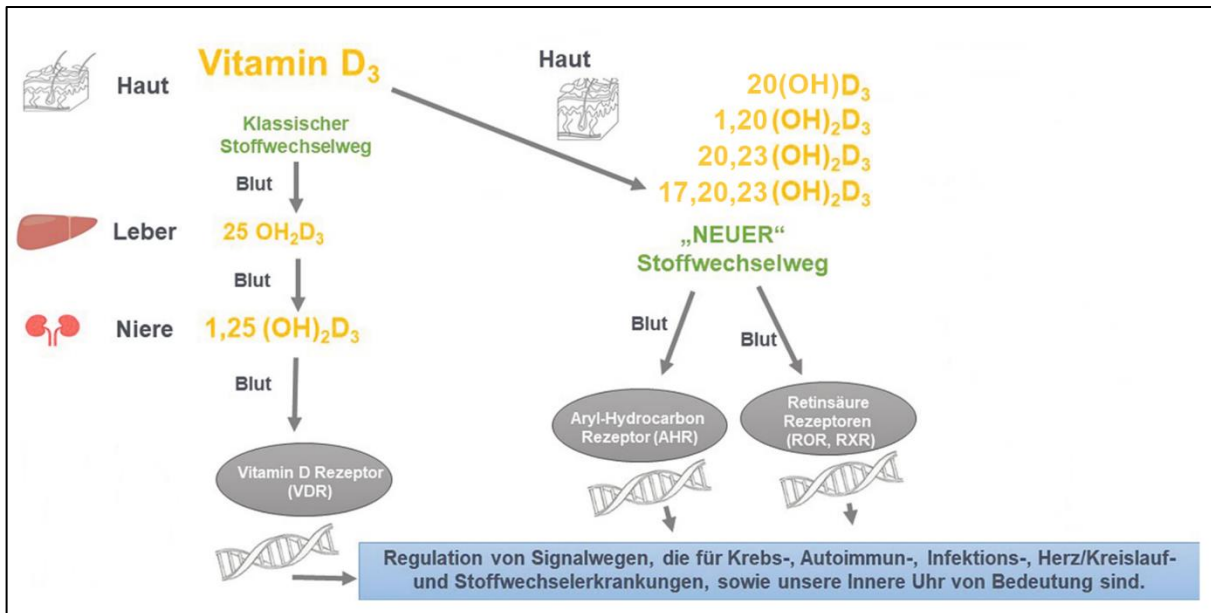


Abb. 2.12: Stoffwechselweg von klassischen und nicht-klassischen Vitamin D₃ Derivaten (modifiziert nach [Reichrath J (2021) Was passiert, wenn Sonnenstrahlen auf unsere Haut treffen? Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-662-62612-2_3]. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags)

2.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Jüngste wissenschaftliche Erkenntnisse haben gezeigt, dass es eine funktionelle Interaktion zwischen AhR- und VDR-Signalen in verschiedenen menschlichen Geweben gibt. Bis heute wurde eine solche Wechselwirkung in präkanzerösen oder kanzerösen Zellen des weißen Hautkrebs noch nicht untersucht. Unser Ziel war es, weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel von VDR- und AhR-Signalen bei der Photokarzinogenese der Haut zu gewinnen. Mittels RTqPCR analysierten wir die in-vitro-Effekte der vollständig karzinogenen UV-B-Strahlung und des Tumorsuppressors 1,25(OH)₂D₃ auf die Expression von Mitgliedern der AhR- und VDR-Signalwege in menschlichen HaCaT- und SCL-1-Keratinocyten, die Merkmale verschiedener Stadien der Hautphotokarzinogenese aufweisen. Mit dieser Arbeit wollten wir folgende Fragen beantworten:

- Wie reguliert UV-B-Strahlung in einer Dosis von 50 J/cm² die mRNA-Transkription von Mitgliedern des VDR-Signalweges?
- Wie reguliert 1,25(OH)₂D₃ oder 25(OH)D₃ in einer Endkonzentration von 10⁻⁷ M die mRNA-Transkription von Mitgliedern des AhR-Signalweges?
- Kann die orale Aufnahme von Vitamin D₃ (in der aktiven Form 1,25(OH)₂D₃ oder seiner Vorstufe 25(OH)D₃) alle Auswirkungen von UV-B auf die menschliche Gesundheit ausgleichen?
- Gibt es eine synergistische Wirkung von UV-B und 1,25(OH)₂D₃/25(OH)D₃ in der Regulation des AhR- oder VDR-Signalweges?
- Gibt es eine unterschiedliche Regulierung von AhR- und VDR-vermittelten Signalen in kultivierten menschlichen Keratinocyten, die phänotypische Merkmale verschiedener Stadien der Hautkarzinogenese aufweisen?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete eukaryontische Zelllinien

3.1.1.1 HaCaT-Keratinocyten

HaCaT-Keratinocyten sind spontan immortalisierte und transformierte Keratinocyten, die aus humaner Haut hervorgehen [659]. Sie enthalten eine p53-Mutation (p53mut) und stellen initiierte Keratinocyten dar, die Elemente der frühen Phase der Nicht-Melanom-Hautkarzinogenese aufweisen [310,734]. In-vivo-Tierstudien haben gezeigt, dass HaCaT-Zellen charakteristische Merkmale präkanzeröser Hautläsionen (AK) aufzeigen, einschließlich der Entwicklung eines geschichteten Epithels mit dysplastischen morphologischen Eigenschaften, jedoch ohne Tendenz zu invasivem oder metastatischem Wachstum [659]. Aufgrund ihrer vollständig erhaltenen epidermalen Differenzierungs- sowie Proliferationsfähigkeit werden sie in der Forschung für in-vitro-Studien verwendet [513,659]. In den hier durchgeführten Experimenten wurden HaCaT-Keratinocyten der Firma CLS Cell Lines Service GmbH® eingesetzt. Für jedes Experiment wurden 3 unterschiedliche Passagen verwendet, die 3 biologischen Replikaten entsprechen.

3.1.1.2 SCL-1-Zellen

Bei der menschlichen Epithelzelllinie SCL-1 (Squamous Cell Carcinoma cell line 1) handelt es sich um Keratinocyten, die aus Biopsie-Material eines kutanen Plattenepithelkarzinom (cSCC) entnommen worden sind [52]. Sie weisen eine fehlende p53-Proteinexpression (p53null) und charakteristische Merkmale des nicht-melanotischen Hautkrebs-Phänotyps, inklusive invasivem und metastasierendem Wachstum, auf [52,77,232,323,445,544]. In den hier durchgeführten Experimenten wurden SCL-1-Zellen des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg benutzt. Für jedes Experiment wurden 3 unterschiedliche Passagen verwendet, die 3 biologischen Replikaten entsprechen.

3.1.2 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstofftank gelagerten HaCaT-Keratinocyten und SCL-1-Zellen wurden in Kryoröhrchen 10 bis 15 min lang bei Raumtemperatur aufgetaut. Währenddessen wurden die Petrischalen beschriftet und mit 5 ml Nährmedium befüllt. Anschließend wurden die Zellen aus dem Kryogefäß unter einer Sterilbank in 5 ml des entsprechenden Nährmediums vorsichtig resuspendiert. Davon wurden je 500µl zu 5 ml Nährmedium gegeben. Das Kryoröhrchen wurde nachgespült, um eventuell zurückgebliebene Zellen aufzunehmen. Nach

anschließender Untersuchung unter dem Lichtmikroskop, wurden die Zellkulturschalen in einem 5%-CO₂-begasten Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

3.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der HaCaT-Keratinocyten und der SCL-1-Zellen wurde unter einer Sterilbank durchgeführt. Die sich in Petrischalen befindlichen Zellen wurden jeweils mit dem entsprechenden Nährmedium versorgt. Für die HaCaT wurde das DMEM-Medium und für die SCL-1-Zellen das RPMI-Medium 1640 verwendet. Beiden Nährmedien wurde vor dem Kultivieren 1% L-Glutamin und 10% fötalem Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Ein Nährmedium Wechsel erfolgte nach Begutachtung der Zellen jeweils montags und freitags.

3.1.4 Passagieren der Zellen

Das Splitten der Zellen wurde nach einer Überprüfung unter dem Lichtmikroskop bei einer Konfluenz von 70-90% unter einer Sterilbank durchgeführt. Hierfür wurde das gegenwärtige Nährmedium abgesaugt und es erfolgte eine Doppelspülung mit jeweils 5ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)-Puffer. Im Anschluss wurde mit 750 µl 0,25% Trypsin-EDTA behandelt. Nach manuellem Schwenken wurden die Zellkulturschalen im 5%-CO₂-begasten Inkubator bei einer Temperatur von 37°C für ca. 15 min inkubiert, um die Zellen abzulösen. Nach einer Kontrolle unter dem Mikroskop, bei der die Zellen sichtbar mobil geworden waren, wurden 5 ml des entsprechenden Nährmediums zu jeder Zellkulturschale hinzugegeben. Mithilfe eines Pipett Controllers und serologischen Pipetten wurden alle Zellen in einem oder mehreren Falcons gesammelt und in neue Zellkulturschalen mit je 5 ml entsprechendem Medium aufgeteilt.

3.1.5 Versuchsvorbereitung

Am Vortag der Behandlungen wurden die Zellen wie unter Kapitel 3.1.4 beschrieben abtrypsiniert und in einem Falcon gesammelt. Daraus wurde nach Durchmischung eine Probe von 100µl mit einer Einkanalpipette entnommen, in ein Reagiergefäß pipettiert und die Anzahl der Zellen pro ml mithilfe eines automatischen Zellzählers in Pipettierformat ermittelt. Schließlich wurden 5×10^5 Zellen pro Petrischale in 5 ml Nährmedium ausplattiert und mit einem 5%-CO₂-begasten Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Als Vorbereitung auf die Behandlungen der Zellen am nächsten Tag wurde ein Gemisch, bestehend aus Nährmedium und 1% bovinem Serum-Albumin (BSA) angefertigt. Dafür wurden 500 ml Nährmedium mit 5g

BSA unter unsterilen Bedingungen vermischt und anschließend unter einer Sterilbank durch einen Sterilfilter in eine Laborflasche abfiltriert. Die Behandlung der Zellen erfolgte in diesem 1% BSA-Nährmedium aufgrund der dadurch erschwerteren Anheftung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Plastik der Schale. Letztlich wurde das angefertigte 1% BSA-Nährmedium in mehrere nach der jeweiligen Behandlung beschrifteten Falcons aufgeteilt und im Kühlschrank bei $4,5^\circ\text{C}$ bis zum Versuchsansatz gelagert.

3.1.6 Behandlung der Zellen

Das Behandlungsprinzip war im ersten und zweiten Experiment identisch. Die Behandlungssubstanzen wurden mit dem 1% BSA-Nährmedium in Falcons angesetzt. Unter einer Sterilbank wurde zunächst allen Zellschalen das vorhandene Nährmedium abgesaugt. Eine anschließende unsteril durchgeführte, niedrig dosierte UV-B-Bestrahlung (50 J/cm^2 und Wellenlänge im mittleren Bereich 302 nm) in einem UV-B-Strahler wurde nur bei den zu bestrahlenden Zellen durchgeführt. Es ging hiernach für alle Zellen wieder unter der Sterilbank weiter. Das Behandlungsmedium wurde den vorgesehenen Schalen mithilfe eines Pipett Controllers zugegeben. Nachdem alle Zellkulturschalen behandelt worden sind, folgte eine Inkubation im $5\%-\text{CO}_2$ -begasteten Wärmeschrank bei 37°C bis zum vorgesehenen Ernte-Zeitpunkt. Allerdings wurde der letzte Schritt bei den Zellen des 0h-Erntewertes im ersten Experiment übersprungen. Diese wurden direkt nach der Behandlung geerntet.

Die Behandlungen innerhalb eines Experimentes wurden alle zum selben Zeitpunkt durchgeführt, die Behandlungssubstanzen der beiden Experimente dagegen wichen zu einem geringen Grad ab (Tab. 3.1, 3.2 und 3.3). In beiden Experimenten war EtOH (1:1000 Verdünnung) gelöst in 1% BSA-Nährmedium Bestandteil jeder Behandlungsbedingung. Nachdem bewiesen werden konnte, dass es im Vergleich zur alleinigen 1% BSA-Nährmediumgabe keinen zusätzlichen Effekt auf die Zellen hat (Kapitel 4.2), wurde es als Kontrolle für alle anderen Behandlungssubstanzen benutzt. Das EtOH-gelöste $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde mit einer Endkonzentration von 10^{-7} M verwendet. Bei der Auswahl dieser Konzentration haben wir auf eine Studie unseres Labors zurückgegriffen, in der nachgewiesen worden ist, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit einer Endkonzentration von 10^{-7} M in beiden verwendeten Zelllinien einen zytoprotektiven Effekt gegenüber der UV-B-Strahlung haben kann [578]. Hier nochmal zur Veranschaulichung der Aufbau des ersten Experimentes:

Behandlung	Substanzen pro Schale
1. BSA	5 ml 1% BSA-Nährmedium
2. BSA + UV-B	5 ml 1% BSA-Nährmedium 50 J/cm ² UV-B-Strahlung
3. EtOH	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10 ⁻⁴)
4. EtOH + UV-B	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10 ⁻⁴) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung
5. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10 ⁻⁴) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10 ⁻⁷)
6. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + UV-B	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10 ⁻⁴) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10 ⁻⁷) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung

Tab. 3.1: Behandlungsbedingungen im ersten Experiment

Im zweiten Experiment wurden ergänzend der AhR-Antagonist CH223191 und der VDR-Inhibitor 25(OH)D₃ verwendet, beide in EtOH gelöst mit einer Endkonzentration von 10⁻⁷ M. Grund für die Anwendung dieser Konzentration waren Studien, die von einer bestätigten Wirkung der benutzten Substanzen bei der genannten Endkonzentration berichteten [24,365,651]. Das zweite Experiment bestand demnach aus folgenden Behandlungsgruppen:

Behandlungsgruppe	Substanzen pro Schale
1. EtOH	
A. EtOH	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4})
B. EtOH + CH223191	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 nl CH223191 (10^{-7})
C. EtOH + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
D. EtOH + CH223191 + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 nl CH223191 (10^{-7}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
2. EtOH + 1,25(OH)₂D₃	
A. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7})
B. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + CH223191	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 5 nl CH223191 (10^{-7})
C. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
D. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + CH223191 + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 5 nl CH223191 (10^{-7}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})

Tab. 3.2: Behandlungsbedingungen im zweiten Experiment (A)

Behandlungsgruppe	Substanzen pro Schale
3. EtOH + UV-B	
A. EtOH + UV-B	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung
B. EtOH + UV-B + CH223191	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl CH223191 (10^{-7})
C. EtOH + UV-B + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
D. EtOH + UV-B + CH223191 + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl CH223191 (10^{-7}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
4. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + UV-B	
A. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + UV-B	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung
B. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + UV-B + CH223191	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl CH223191 (10^{-7})
C. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + UV-B + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})
D. EtOH + 1,25(OH) ₂ D ₃ + UV-B + CH223191 + 25(OH)D ₃	5 ml 1% BSA-Nährmedium 5 µl EtOH (10^{-4}) 5 µl 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-7}) 50 J/cm ² UV-B-Strahlung 5 nl CH223191 (10^{-7}) 5 nl 25(OH)D ₃ (10^{-7})

Tab. 3.3: Behandlungsbedingungen im zweiten Experiment (B)

3.1.7 Ernte der Zellen

Die Ernte der Zellen wurde manuell und unsteril durchgeführt. Sie erfolgte im ersten Experiment für jede Behandlungsbedingung in einem Zeitabstand von 6h innerhalb der ersten 24h nach Behandlung. Daraus ergaben sich die 6 folgenden Ernte Zeitpunkte: 0h, 6h, 12h, 18h, 24h. Dadurch wollten wir untersuchen, wie sich die Genexpression in einem Zeitraum von 24h entwickelt. Im zweiten Experiment wurden die Zellen 6 und 24h nach Behandlung geerntet, um bei der Genexpression den Unterschied im Tagesrhythmus zu untersuchen. Zunächst wurde das Behandlungsmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Schale mit 2 ml PBS-Puffer durchgespült. Nach erneuter Zugabe von 2 ml PBS-Puffer wurden die Zellen vom Schalenboden mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und nach Zugabe von 1 ml PBS-Puffer in einem Falcon (15 ml) pipettiert. Anschließend wurde bei 1.200 Umdrehungen pro min für 3 min bei 24°C zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das im Falcon verbliebene Zellpellet bei -70°C weggefroren.

3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) wurde in beiden Experimenten mithilfe von Isolierung Kits (RNeasy Mini Kit und QIAshredder) gemäß dem Herstellerprotokoll (Qiagen®, Deutschland) durchgeführt (Abb. 3.1). Ziel war es, aus der geernteten Probe die Gesamt-RNA (mRNA, tRNA, rRNA) zu erhalten. Aufgrund der Tatsache, dass die RNA äußerst instabil ist und RNasen (die RNA-abbauend wirken) überall vorkommend sind, musste die RNA-Isolierung schnell, stetig und auf Eis durchgeführt werden [132]. Um mögliche Kontaminationen vorzubeugen, wurde immer unter Anwendung von Einmal-Handschuhen, autoklavierten Reagiergefäßen und RNase-freien Pipettenspitzen mit Filter gearbeitet. Jede Probe wurde zweimal isoliert, so dass es technische RNA Extraktion Duplikate gab [3]. Es wurden immer gleichzeitig 12 Proben pro Durchgang isoliert. Als Vorbereitung mussten vier Lösungen angefertigt werden. Für die erste Lösung (70% EtOH) wurde absolutes EtOH mit destilliertem Wasser verdünnt. Für die zweite Lösung (RLT-Mercaptoethanol Gemisch) wurde 10 µl Mercaptoethanol zu 1 ml RLT Puffer pro Probe hinzugegeben, bei der dritten Lösung (RPE Buffer) wurden 4 Volumen absolutes EtOH dem RPE Puffer addiert. Außerdem wurde in einem Reagiergefäß ein DNase-Gemisch angefertigt, in dem für jede Probe 10 µl RQ1 RNase-Free DNase zu 70 µl RQ1 RNase-Free DNase Reaction Buffer gegeben worden sind.

Die Mengenangaben in der folgenden Ausführungsbeschreibung beziehen sich auf eine Probe. Um die Lyse der Zellen zu ermöglichen, wurden 600 µl RLT-Mercaptoethanol Gemisch zugegeben und mit einer Pipette mehrmals resuspendiert. Zur Homogenisierung der Zellen wurde alles in ein QIAshredder Mini Spin Column pipettiert und 2 min lang bei 13.000

Umdrehungen pro min zentrifugiert, wobei der Einsatz danach verworfen wurde. Dem übrig gebliebenen Auffanggefäß inklusive Zellmaterial wurden 600 µl 70% EtOH zugegeben und resuspendiert. Davon wurden zur Einstellung optimaler Bedingungen 600 µl in ein RNeasy Mini Spin Column pipettiert, 15 s lang bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert und darauffolgend wurde das Auffanggefäß geleert. Die letzten drei Schritte wurden anschließend noch einmal wiederholt. Nach der RNA-Bindung der Zellen folgten mehrere Waschgänge sowie ein DNA-Verdau, um eine Entfernung von Proteinen, DNA und anderen Substanzen zu ermöglichen. Dadurch war es wesentlich leichter die großen (200 Nukleotide langen) mRNA-Anteile der Proben zu isolieren und die kleinen RNA-Anteile (tRNA, rRNA) auszuschließen. Die Zellen wurden erstmals mit 350 µl RW 1 Puffer gewaschen, 15 s lang bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert und das Auffanggefäß wurde geleert. Als Nächstes wurde das DNase-Gemisch gründlich gevortext, 80 µl des DNase-Gemisches wurden in die Mitte der Membran des RNeasy Mini Spin Column pipettiert und 15 min lang zur DNA-Verdau bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 350 µl RW 1 Puffer gewaschen, 15 s lang bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert und das Auffanggefäß wurde am Ende entleert. Es folgte ein weiterer Waschgang mit 500 µl RPE Puffer und eine Zentrifugation für 15 s bei 10.000 Umdrehungen pro min. Das Auffanggefäß des RNeasy Mini Spin Column wurde verworfen und gegen ein Neues ausgetauscht. Der Waschgang mit 500 µl RPE Puffer wurde wiederholt, gefolgt von einer Zentrifugation für 2 min bei 10.000 Umdrehungen pro min. Nach Ausleeren des Auffanggefäßes wurde 1 min lang bei 13.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Es wurde nur die Säule in ein beschriftetes 1,5 ml Collection Tube gestellt. Zur Eluisierung der Zellen wurden 32 µl RNase-freies Wasser in die Mitte der Säule pipettiert und 1 min lang bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss auf die Säule gegeben, wieder 1 min lang bei 10.000 Umdrehungen pro min zentrifugiert und die Säule wurde letztendlich verworfen.

Nach jeder RNA-Isolierung erfolgte eine Konzentrationsmessung der gewonnenen RNA-Probe mithilfe eines Spektrophotometers. Dafür mussten erstmal 2 µl RNase-freies Wasser gemessen und als Referenzwert herangezogen werden. Danach wurde die Probe 3-mal vermessen und daraus letztendlich ein Mittelwert gezogen.

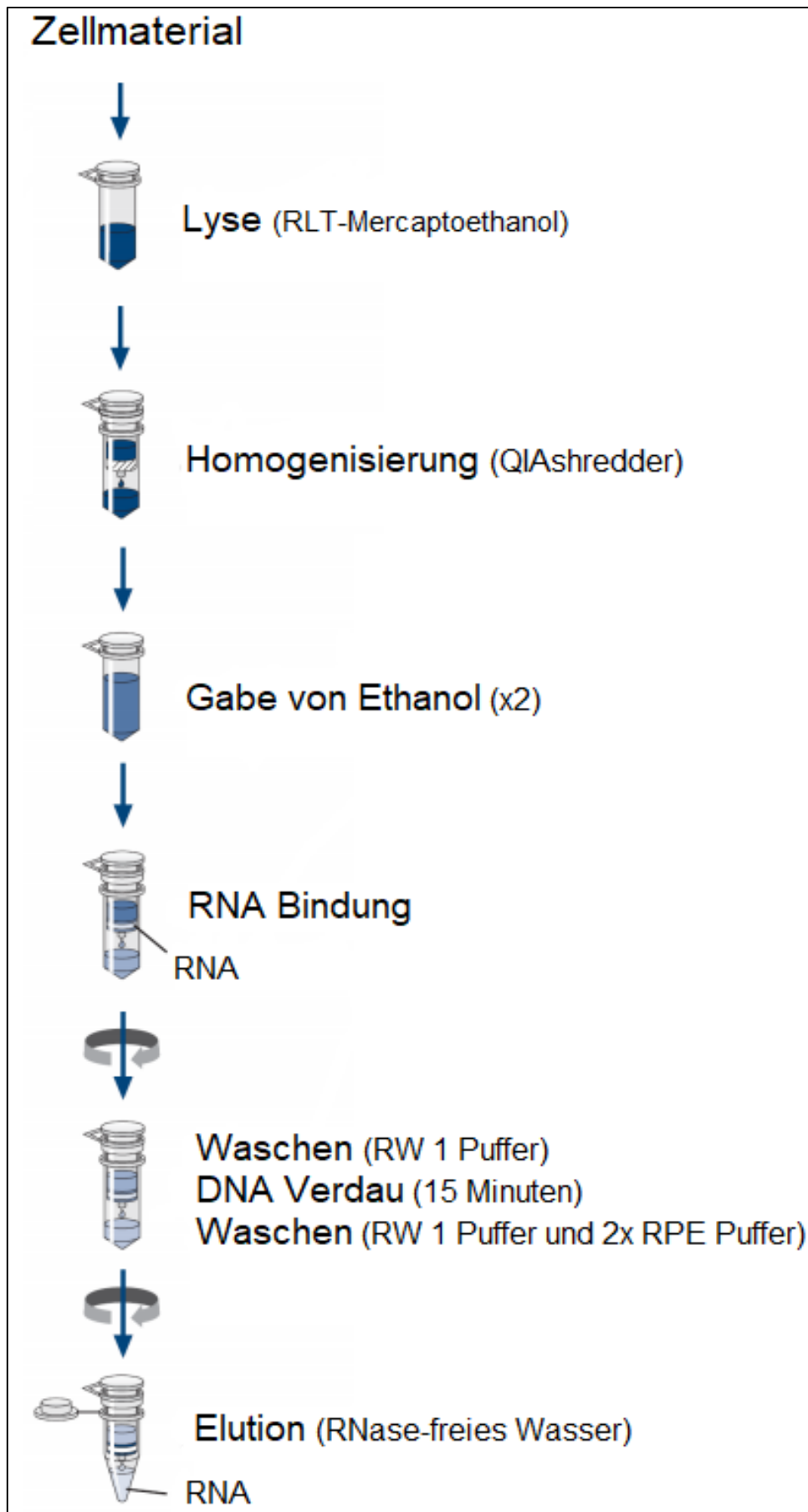


Abb. 3.1: Ablauf der RNA-Isolierung (modifiziert nach RNeasy Mini Handbook, Qiagen, 2019. Mit freundlicher Genehmigung von Qiagen GmbH)

3.3 Reverse Transkription

Für die Quantifizierung von RNA-Transkripten ist die quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR; kurz RTqPCR) die sensitivste und zuverlässigste Methode. Sie beginnt mit der reversen Transkription von mRNA in einzelsträngige cDNA, gefolgt von der PCR-Amplifikation der cDNA (siehe 3.4). Die reverse Transkriptase ist ein multifunktionales Enzym mit zwei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und eine hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H) (Abb. 3.2). Die DNA-Polymerase transkribiert cDNA aus einer mRNA-Vorlage. Die Exoribonuklease (RNase H) degradiert dagegen die RNA im neu gebildeten RNA-DNA-Hybriden. Sie betrifft nur RNA, die mit cDNA hybridisiert ist. Außerdem verbessert sie die Sensitivität der anschließenden PCR. Die hier benutzte Omniscript Reverse Transkriptase (RT) wird mit dNTPs (Vorstufen-Bausteine der Nukleinsäuren) und mit einem optimierten RT Puffer eingesetzt, um das Durchlesen der Template mit hohem Guanin- und Cytosin-Gehalt (Merkmal zur Charakterisierung von einzelsträngiger DNA oder RNA) zu ermöglichen und zu optimieren. Der RNase-Inhibitor hemmt RNA-abbauende RNasen und minimiert das Risiko des RNA-Abbaus. Der Random Primer lagert sich selektiv an die mRNA an und ermöglicht eine Umschreibung in cDNA. Durch das freie 3'-Ende des Primers kann die RT die Synthese der komplementären DNA durchführen. Die Reverse Transkription erfolgte in beiden Experimenten mithilfe eines Transkriptionskits (Omniscript RT Kit) gemäß dem Herstellerprotokoll (Qiagen®, Deutschland) (Abb. 3.3). Um die Reliabilität der Experimente nachzuweisen, wurde jede Probe doppelt umgeschrieben. Es wurden immer gleichzeitig 48 Proben pro Durchgang umgeschrieben. Für die cDNA-Umschreibung einer einzelnen Probe wurde ein Gesamtvolumen von insgesamt 20 µl benötigt. Dieses Gesamtvolumen bestand aus dem mRNA-Anteil (der 1 µg mRNA enthielt), aus 7,8 µl Master Mix und aus RNase-freiem Wasser, das das restliche Volumen ergänzte. Als Vorbereitung wurde für jede Probe die passende mRNA-Menge (in µl) berechnet. Anschließend wurden 468 µl Master-Mix für 48 Proben (374,4 µl für 48 Proben + 93,6 µl als Stütze) in einem Reagiergefäß angesetzt und gevortext. Die pro Probe gedachten 7,8 µl Master-Mix bestanden aus 2 µl RT-Puffer (10-fach mit destilliertem Wasser konzentriert), 2 µl dNTP's, 1,8 µl Random Primer (1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser), 1 µl RNase Inhibitor (1:4 verdünnt mit 1 x RT-Puffer) und 1 µl Omniscript RT. In das für jede Probe gedachte Reagiergefäß wurde erstmal die passende Menge RNase-freies Wasser pipettiert, dann die passende mRNA-Menge und als letztes die 7,8 µl Master-Mix. Anschließend wurde 90 bis 120 min lang bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Direkt danach wurden die Proben 5 min lang bei 93°C in einem Heizblock inaktiviert. Die entstandene cDNA-Proben wurden in zuvor beschriftete, weiße Papierboxen bei -18°C gelagert.

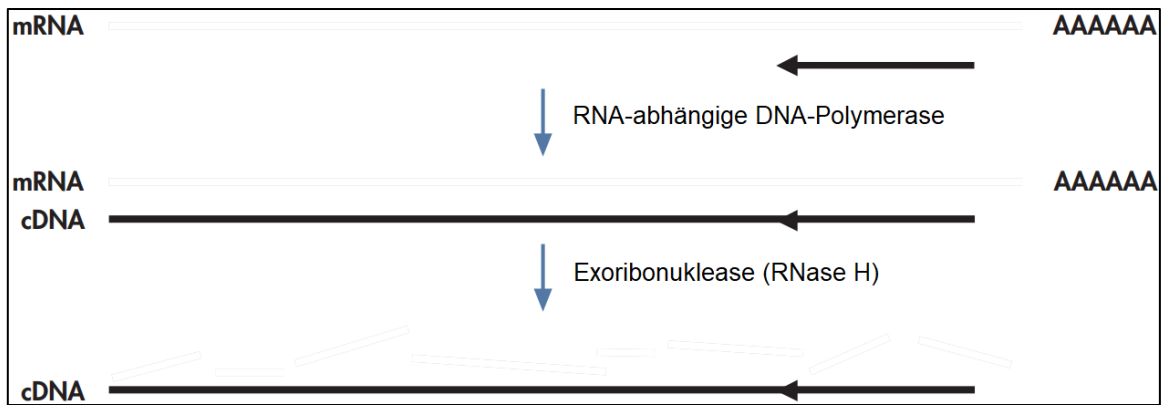


Abb. 3.3: Funktionsweise der reversen Transkriptase (modifiziert nach Figure 1, p.9, Omniscript Reverse Transcription Handbook, Qiagen, 2010. Mit freundlicher Genehmigung von Qiagen GmbH)

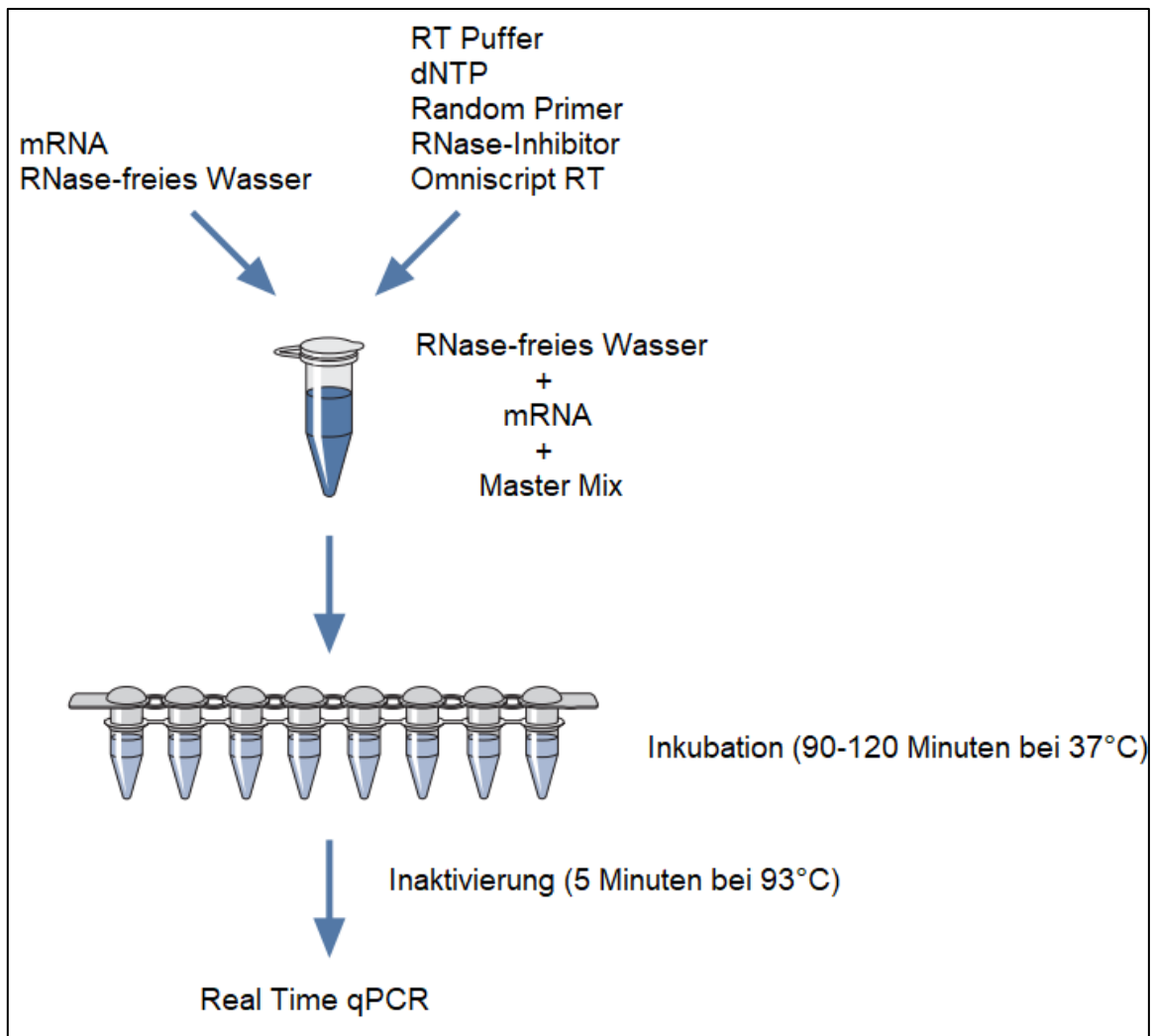


Abb. 3.2: Durchführung der reversen Transkription (modifiziert nach Omniscript Reverse Transcription Handbook, Qiagen, 2010. Mit freundlicher Genehmigung von Qiagen GmbH)

3.4 Real-Time Quantitative PCR

3.4.1 Funktionsprinzip

Die RTqPCR ist eine in-vitro-Methode zum Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren [494]. Ihre Wirkungsweise beruht auf dem Funktionsprinzip der „klassischen“ Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR). Dieses basiert auf der Anwesenheit von speziellen Enzymen, den DNA-Polymerasen, die mithilfe von Nukleotiden (wie dNTP) kurze Oligonukleotidsequenzen (sog. Primer) mit einem freien 3'-OH-Ende verlängern und dadurch DNA-Abschnitte vervielfältigen können. Ein PCR-Lauf besteht meistens aus 20 bis 50 aufeinanderfolgende PCR-Zyklen. Grundsätzlich wird in jedem PCR-Zyklus eine Abfolge von drei Phasen der DNA-Amplifikation durchgeführt (Abb. 3.4). Die erste Phase ist die Denaturierung (engl. Melting), in der durch Erhitzen auf 93°C bis 96°C die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen wird. Die zweite Phase ist die Primerhybridisierung (engl. Primer Annealing), in der bei einer Temperatur von 40°C bis 60°C ein Primer an jeden DNA-Einzelstrang angelagert wird. Die dritte Phase besteht aus der Elongation (oder Extension), bei der eine enzymatische Verlängerung der Primer durch eine DNA-Polymerase zur Synthese von DNA-Kopien führt [276]. Im Gegensatz zur „klassischen PCR“, bei der immer eine Endpunktbestimmung der DNA-Menge erfolgt, wird bei der RTqPCR die Amplifikation der DNA-Menge „in Echtzeit“ gemessen, also nach jedem einzelnen PCR-Zyklus [204]. Dadurch können leichter Aussagen über die Kinetik der Amplifikationsreaktion gemacht werden.

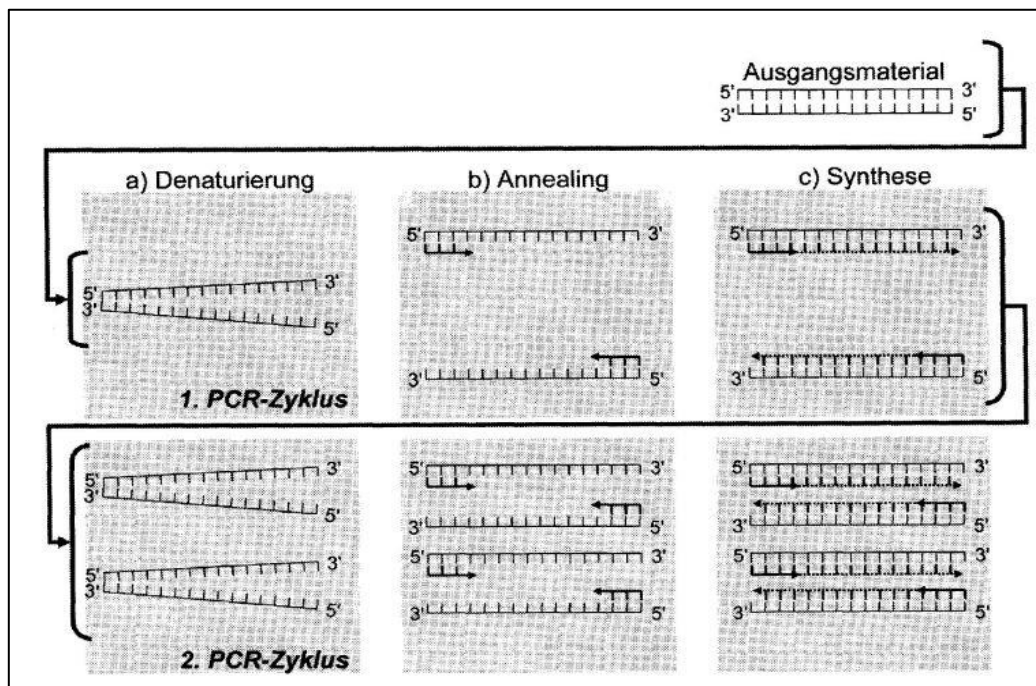


Abb. 3.4: Phasen der PCR (aus [Krause G, Scherer G, Müller M, Weiß T (2012) Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004]]. Mit freundlicher Genehmigung des John Wiley & Sons Verlags)

Mittel zur Quantifizierungsdetektion der PCR-Produkte am Ende eines Laufes waren Fluoreszenzsignale, die mithilfe des DNA-Farbstoffes SYBR® Green I zustande kamen. Hierbei handelt es sich um einen mutagenen Cyanin-Farbstoff, der zum Nachweis von doppelsträngiger DNA benutzt wird [527]. Eine sequenzunabhängige Einlagerung des DNA-Farbstoffes in die kleine Furche doppelsträngiger DNA (engl. minor groove binder) führt zum drastischen Anstieg seiner Fluoreszenz innerhalb bestimmter Wellenlängen (494 nm und 521 nm). Nach jedem PCR-Zyklus korreliert daher die Zunahme der gemessenen Fluoreszenz mit der Zunahme der amplifizierten DNA-Menge. Es folgt die Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation und Polymerisation der DNA (Abb. 3.5). Letztendlich bekommt das Fluoreszenzsignal von jeder Probe einen bestimmten Ct-Wert (engl. Cycle Threshold) zugeteilt, der sich aus der Anzahl der PCR-Zyklen pro PCR-Reaktion ergibt. Als passiver Referenzfarbstoff wurde dem DNA-Farbstoff ROX zugesetzt [111,653].

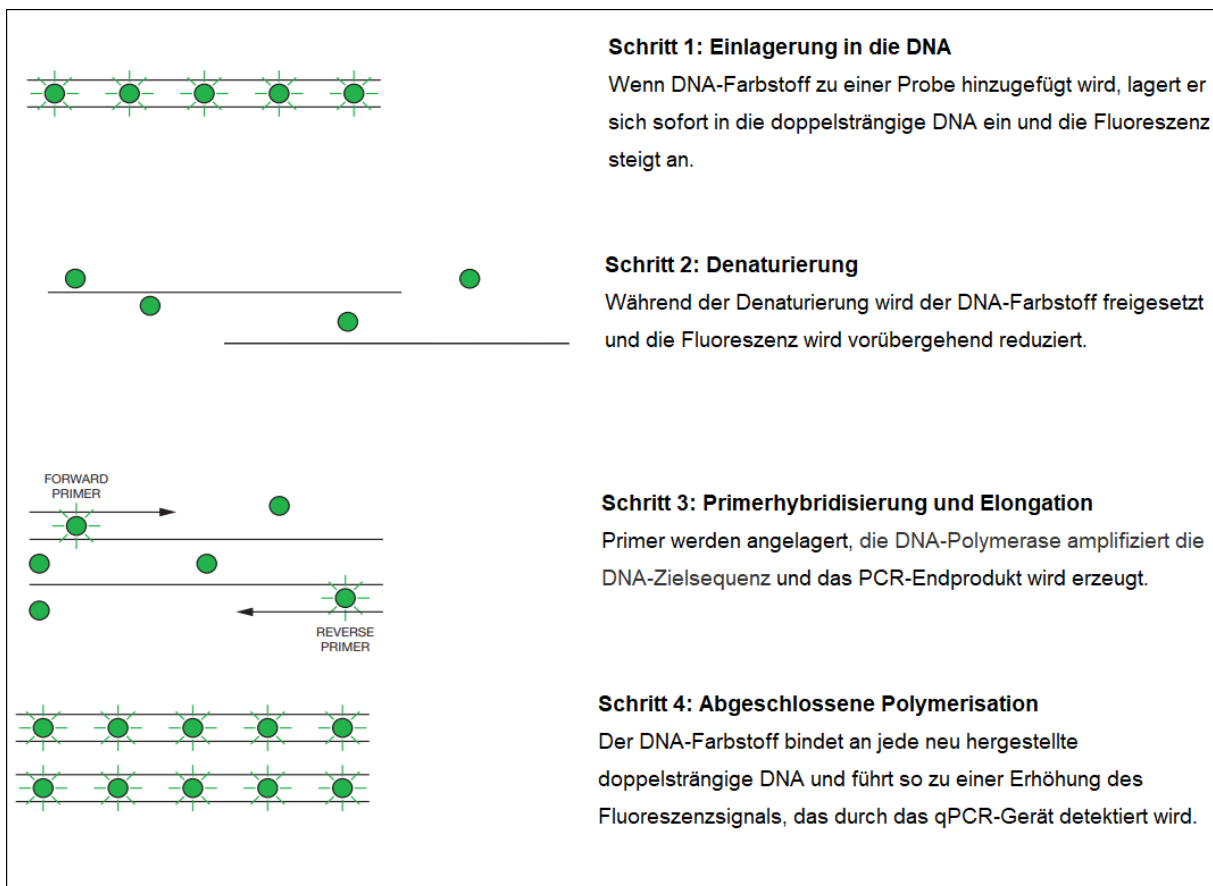


Abb. 3.5: Funktionsprinzip des DNA-Farbstoffes SYBR® Green I (modifiziert nach Figure 2-2, p.2-5, Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide, Thermo Fischer Scientific, 2010. Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific GmbH)

3.4.2 Durchführung

In beiden Experimenten wurde die DNA-Zielsequenz der gemessenen Proben nachgewiesen und quantifiziert. Zuerst wurden die HaCaT- und dann die SCL-1-Zellen bearbeitet. Die Proben wurden in einem RTqPCR-Gerät vervielfältigt, das einen Thermocycler (wie bei der „klassischen“ PCR) mit einem Fluoreszenz-Analysator kombiniert (Abb. 3.7). Ein PCR-Lauf bestand aus 40 PCR-Zyklen und hat ungefähr 90 min gedauert. Bei jedem Lauf wurde eine 96-Well-Platte eingesetzt, die zum Pipettieren durch eine Stützbasis stabilisiert worden ist (Abb. 3.6). Die Proben wurden als Doppelbestimmung auf die PCR-Platte pipettiert, so dass es technische Quadruplikate in jedem PCR-Lauf gab. Als Vorbereitung wurde für jede Probe die passende cDNA-Menge (in μl) berechnet, die 1 μg cDNA enthielt. Für die Verwendung der Primer, mussten diese zunächst mit 1,1 ml Tris-EDTA (TE)-Puffer (10 mM Tris pH 8,0 und 1 nM EDTA) rekonstituiert werden. Nach Zwischenlagerung bei -18°C , wurden die vorab aliquotierten Primer, die cDNA, SYBR® Green I und ROX bei Raumtemperatur aufgetaut. Pro Well wurde ein Gesamtvolumen von 20 μl pipettiert. Dieses bestand aus 10 μl SYBR® Green I, 2 μl ROX, 5 μl Primer und 3 μl cDNA-Wasser-Gemisch, bestehend aus dem cDNA-Anteil der Probe und RNase-freiem Wasser. Abschließend wurde die 96-Well-Platte durch eine spezielle Klebefolie versiegelt und für 6 s bei 24°C zentrifugiert.

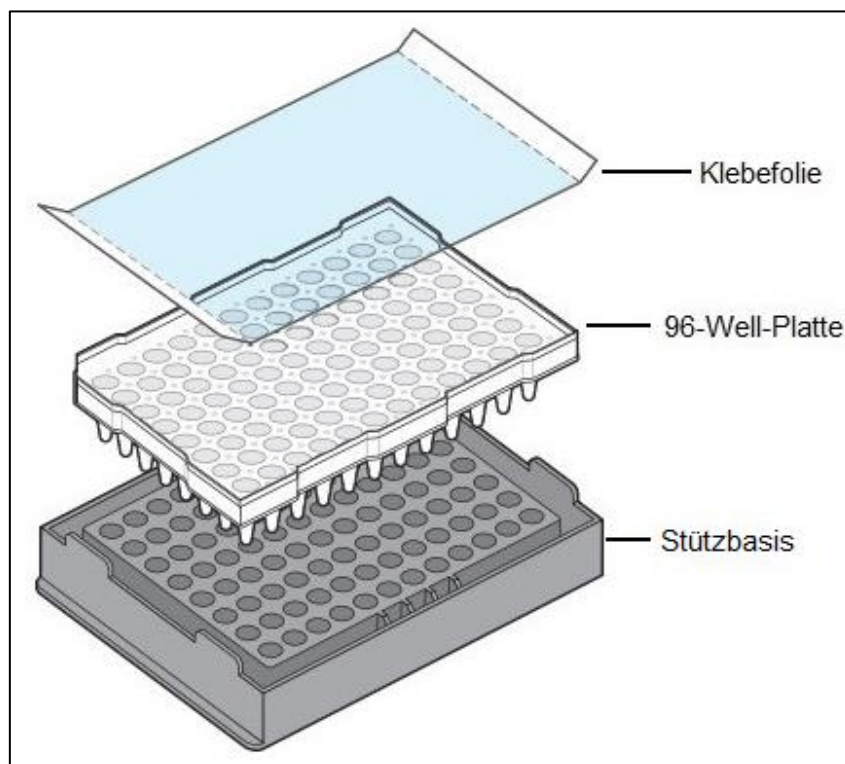


Abb. 3.6: Bestandteile einer 96-Well-Platte (modifiziert nach Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Standard 5 Curve Experiments, Chapter 1, p.5, Thermo Fisher Scientific, 2010. Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific GmbH)

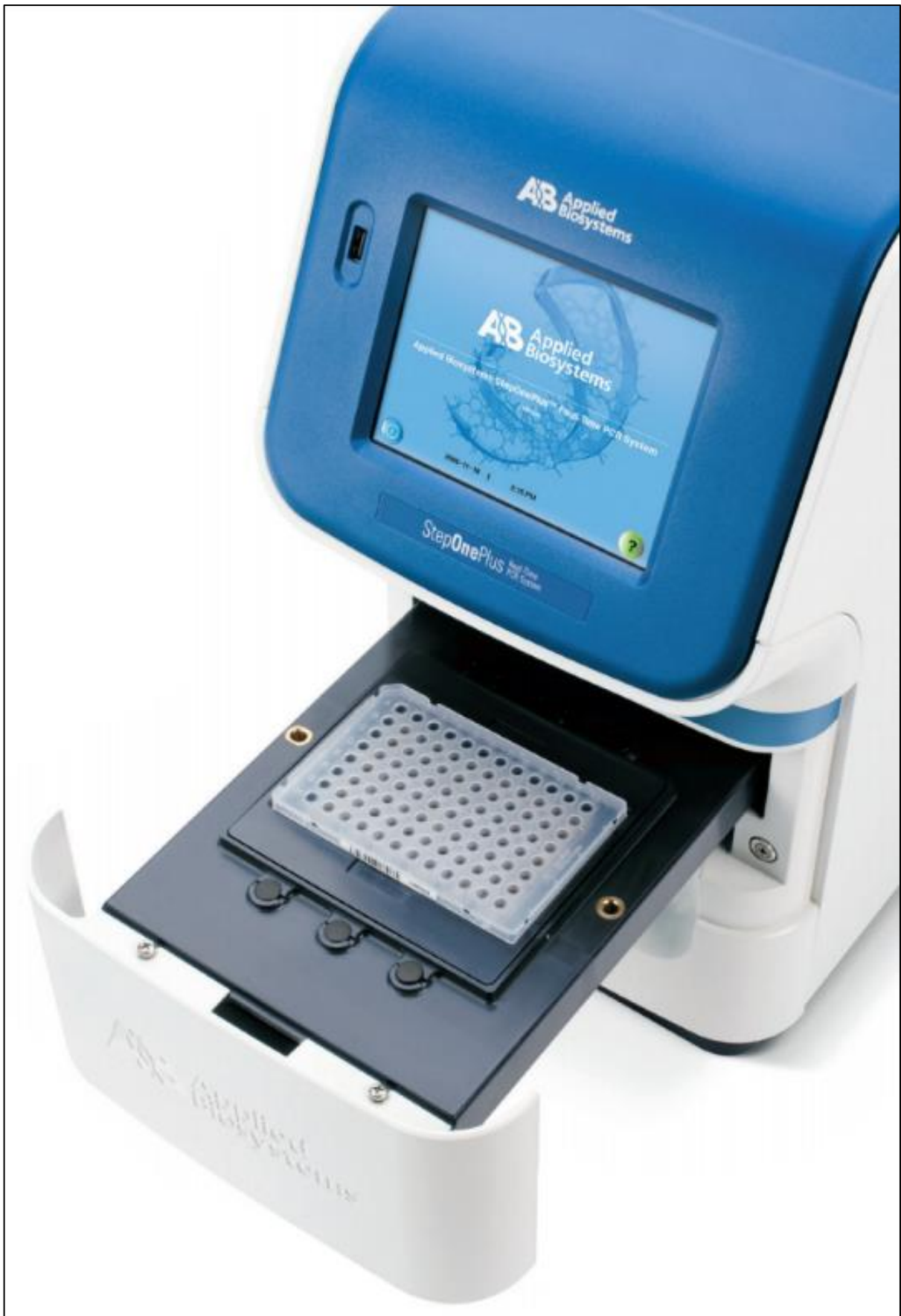


Abb. 3.7: StepOnePlus™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems™ (nach StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Product Brochure, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, 2016. Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific GmbH)

Im ersten Experiment wurden mithilfe von Primern die Gene von AhR, CYP1A1, COX-2, VDR, CYP24A1 untersucht (Abb. 3.8). GAPDH und β -Actin wurden als Housekeeping-Gene benutzt. Pro PCR-Lauf wurden in die 96-Well-Platte nur Proben derselben Bedingung mit allen sechs Ernte-Zeitpunkten pipettiert (z.B. BSA 0h HaCaT, BSA 6h HaCaT, BSA 12h HaCaT, BSA 18h HaCaT, BSA 24h HaCaT). In den ersten 7 Wells wurde zusätzlich für jedes Gen eine Negativkontrolle pipettiert, die 3 μ l RNA freies Wasser anstelle des cDNA-Wasser-Gemisches beinhaltetete.



Abb. 3.8: Pipettierschema im ersten Experiment. Die Wells A1 bis A7 beinhalteten die Negativkontrollen (1 Negativkontrolle pro gemessenem Gen). Jeder Ernte-Zeitpunkt (0h, 6h, 12h, 18h, 24h) wurde in Doppelbestimmung in 14 nebeneinanderliegenden Wells mit den jeweils doppelt gemessenen Genen analysiert.

Im zweiten Experiment wurden mithilfe von Primern die Gene von CYP1A1, COX-2 und CYP24A1 untersucht (Abb. 3.9 und 3.10). Als Housekeeping-Gene wurden auch hier GAPDH und β -Actin eingesetzt. Identisch zum ersten Experiment wurde in den ersten 5 Wells für jedes Gen eine Negativkontrolle pipettiert, die 3 μ l RNA freies Wasser anstelle des cDNA-Wasser-Gemisches beinhaltetete. Das Pipettierschema wurde aufgrund der limitierten Anzahl an Wells pro PCR-Platte in zwei Varianten angelegt (A und B). In der ersten Variante wurden unbestrahlte und in der zweiten bestrahlte Proben pipettiert. Außerdem wurden nur Proben desselben Ernte-Zeitpunktes (entweder 6 oder 24h) auf eine 96-Well-Platte pipettiert:

Pipettierschema A

1. EtOH („BSA+Ethanol“)

A. EtOH + CH223191 („+ AhR-A“)

B. EtOH + 25(OH)D₃ („+ VDR-I“)

C. EtOH + CH223191 und 25(OH)D₃ („+ AhR-A + VDR-I“)

2. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ („D3“)

A. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + CH223191 („+ AhR-A“)

B. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + 25(OH)D₃ („+ VDR-I“)

C. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + CH223191 und 25(OH)D₃ („+ AhR-A + VDR-I“)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N CYP1A1	N COX-2	N CYP24A1	N GAPDH	N ACTIN	1. BSA+Ethanol U CYP1A1	1. BSA+Ethanol U CYP1A1	1. BSA+Ethanol U COX-2	1. BSA+Ethanol U COX-2	1. BSA+Ethanol U CYP24A1	1. BSA+Ethanol U CYP24A1	1. BSA+Ethanol U GAPDH
B	1. BSA+Ethanol U GAPDH	1. BSA+Ethanol U ACTIN	1. BSA+Ethanol U ACTIN	A+ AhR-A U CYP1A1	A+ AhR-A U CYP1A1	A+ AhR-A U COX-2	A+ AhR-A U COX-2	A+ AhR-A U CYP24A1	A+ AhR-A U CYP24A1	A+ AhR-A U GAPDH	A+ AhR-A U GAPDH	A+ AhR-A U ACTIN
C	A+ AhR-A U ACTIN	B+ VDR-I U CYP1A1	B+ VDR-I U CYP1A1	B+ VDR-I U COX-2	B+ VDR-I U COX-2	B+ VDR-I U CYP24A1	B+ VDR-I U CYP24A1	B+ VDR-I U GAPDH	B+ VDR-I U GAPDH	B+ VDR-I U ACTIN	B+ VDR-I U ACTIN	C+ AhR-A + VDR-I U CYP1A1
D	C+ AhR-A + VDR-I U CYP1A1	C+ AhR-A + VDR-I U COX-2	C+ AhR-A + VDR-I U COX-2	C+ AhR-A + VDR-I U CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I U CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I U GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I U GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I U ACTIN	C+ AhR-A + VDR-I U ACTIN	2. D3 U CYP1A1	2. D3 U CYP1A1	2. D3 U COX-2
E	2. D3 U COX-2	2. D3 U CYP24A1	2. D3 U CYP24A1	2. D3 U GAPDH	2. D3 U GAPDH	2. D3 U ACTIN	2. D3 U ACTIN	A+AhR-A U CYP1A1	A+AhR-A U CYP1A1	A+AhR-A U COX-2	A+AhR-A U COX-2	A+AhR-A U CYP24A1
F	A+AhR-A U CYP24A1	A+AhR-A U GAPDH	A+AhR-A U GAPDH	A+AhR-A U ACTIN	A+AhR-A U ACTIN	B+VDR-I U CYP1A1	B+VDR-I U CYP1A1	B+VDR-I U COX-2	B+VDR-I U COX-2	B+VDR-I U CYP24A1	B+VDR-I U CYP24A1	B+VDR-I U GAPDH
G	B+VDR-I U GAPDH	B+VDR-I U ACTIN	B+VDR-I U ACTIN	C+AhR-A + VDR-I U CYP1A1	C+AhR-A + VDR-I U CYP1A1	C+AhR-A + VDR-I U COX-2	C+AhR-A + VDR-I U COX-2	C+AhR-A + VDR-I U CYP24A1	C+AhR-A + VDR-I U CYP24A1	C+AhR-A + VDR-I U GAPDH	C+AhR-A + VDR-I U GAPDH	C+AhR-A + VDR-I U ACTIN
H	C+AhR-A + VDR-I U ACTIN											

Abb. 3.9: Pipettierschema A im zweiten Experiment. Die Wells A1 bis A5 beinhalteten die Negativkontrollen (1 Negativkontrolle pro gemessenem Gen). Jede Bedingung wurde in Doppelbestimmung in 10 nebeneinanderliegenden Wells mit den jeweils doppelt gemessenen Genen analysiert.

Pipettierschema B

3. EtOH + UV-B („UV-B“)

A. EtOH + UV-B + CH223191 („+ AhR-A“)

B. EtOH + UV-B + 25(OH)D₃ („+ VDR-I“)

C. EtOH + UV-B + CH223191 und 25(OH)D₃ („+ AhR-A + VDR-I“)

4. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ („D3 + UV-B“)

A. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + CH223191 („+ AhR-A“)

B. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + 25(OH)D₃ („+ VDR-I“)

C. EtOH + 1,25(OH)₂D₃ + CH223191 und 25(OH)D₃ („+ AhR-A + VDR-I“)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N CYP1A1	N COX-2	N CYP24A1	N GAPDH	N ACTIN	3. UV-B CYP1A1	3. UV-B CYP1A1	3. UV-B COX-2	3. UV-B COX-2	3. UV-B CYP24A1	3. UV-B CYP24A1	3. UV-B GAPDH
B	3. UV-B GAPDH	3. UV-B ACTIN	3. UV-B ACTIN	A+ AhR-A CYP1A1	A+ AhR-A CYP1A1	A+ AhR-A COX-2	A+ AhR-A COX-2	A+ AhR-A CYP24A1	A+ AhR-A CYP24A1	A+ AhR-A GAPDH	A+ AhR-A GAPDH	A+ AhR-A ACTIN
C	A+ AhR-A ACTIN	B+ VDR-I CYP1A1	B+ VDR-I CYP1A1	B+ VDR-I COX-2	B+ VDR-I COX-2	B+ VDR-I CYP24A1	B+ VDR-I CYP24A1	B+ VDR-I GAPDH	B+ VDR-I GAPDH	B+ VDR-I ACTIN	B+ VDR-I ACTIN	C+ AhR-A + VDR-I CYP1A1
D	C+ AhR-A + VDR-I CYP1A1	C+ AhR-A + VDR-I COX-2	C+ AhR-A + VDR-I COX-2	C+ AhR-A + VDR-I CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I ACTIN	C+ AhR-A + VDR-I ACTIN	4. D3 + UV-B CYP1A1	4. D3 + UV-B CYP1A1	4. D3 + UV-B COX-2
E	4. D3 + UV-B COX-2	4. D3 + UV-B CYP24A1	4. D3 + UV-B CYP24A1	4. D3 + UV-B GAPDH	4. D3 + UV-B GAPDH	4. D3 + UV-B ACTIN	4. D3 + UV-B ACTIN	A+ AhR-A CYP1A1	A+ AhR-A CYP1A1	A+ AhR-A COX-2	A+ AhR-A COX-2	A+ AhR-A CYP24A1
F	A+ AhR-A CYP24A1	A+ AhR-A GAPDH	A+ AhR-A GAPDH	A+ AhR-A ACTIN	A+ AhR-A ACTIN	B+ VDR-I CYP1A1	B+ VDR-I CYP1A1	B+ VDR-I COX-2	B+ VDR-I COX-2	B+ VDR-I CYP24A1	B+ VDR-I CYP24A1	B+ VDR-I GAPDH
G	B+ VDR-I GAPDH	B+ VDR-I ACTIN	B+ VDR-I ACTIN	C+ AhR-A + VDR-I CYP1A1	C+ AhR-A + VDR-I CYP1A1	C+ AhR-A + VDR-I COX-2	C+ AhR-A + VDR-I COX-2	C+ AhR-A + VDR-I CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I CYP24A1	C+ AhR-A + VDR-I GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I GAPDH	C+ AhR-A + VDR-I ACTIN
H	C+ AhR-A + VDR-I ACTIN											

Abb. 3.10: Pipettierschema B im zweiten Experiment. Die Wells A1 bis A5 beinhalteten die Negativkontrollen (1 Negativkontrolle pro gemessenem Gen). Jede Bedingung wurde in Doppelbestimmung in 10 nebeneinanderliegenden Wells mit den jeweils doppelt gemessenen Genen analysiert.

Für alle PCR-Läufe beider Experimente wurde genau dasselbe Reaktionsvolumen und thermische Profil (die sog. Run Method) 40-mal zyklisch wiederholt (Abb. 3.11):

1. „Holding Stage“:

- Step 1: 95°C für 2 min

2. „Cycling Stage“:

- Step 1: 95°C für 5 s
- Step 2: 60°C für 10 s

3. „Melt Curve Stage“:

- Step 1: 95°C für 15 s
- Step 2: 60°C für 1 min
- Step 3: 95°C für 15 s
- Step 4: 25°C für 15 s

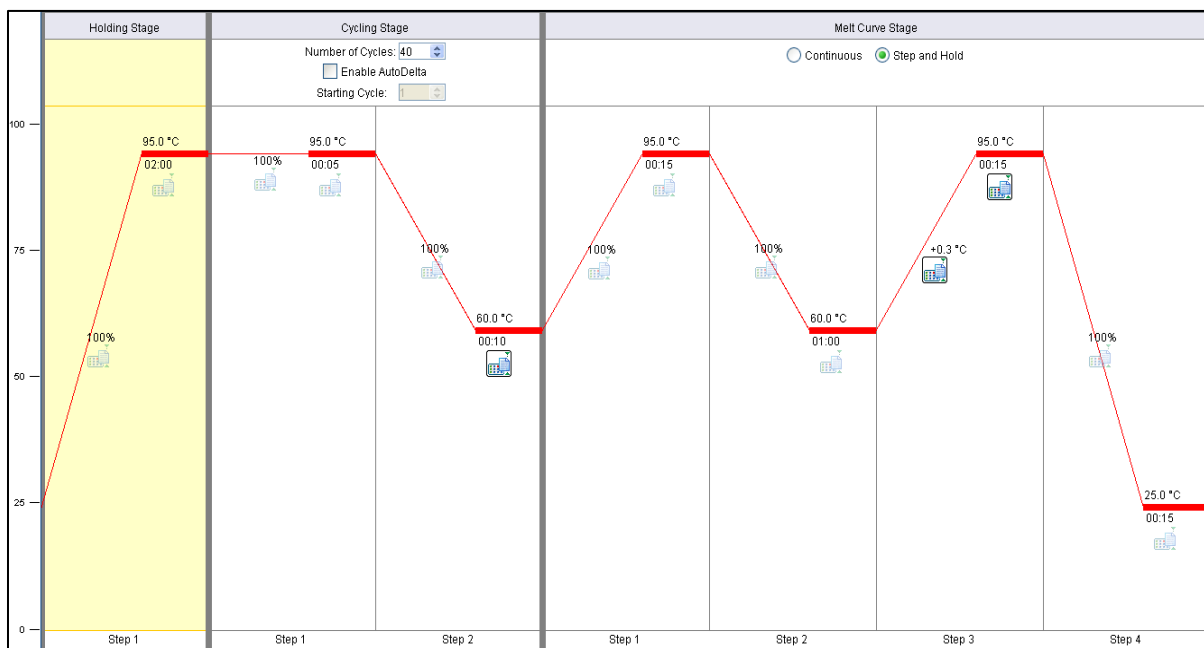


Abb. 3.11: Run Method: Das thermische Profil für den RTqPCR-Gerätelauf. Die „Holding stage“ bestand aus dem pre-PCR read und post-PCR read. Die „Cycling Stage“ wurde 40-mal wiederholt und bestand aus drei PCR-Phasen: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. In der „Melt Curve Stage“ konnten Höhepunkte in der Schmelzkurve die Schmelztemperatur des Targets anzeigen oder eine unspezifische PCR-Amplifikation identifizieren.

3.4.3 Der Ct-Wert

Der Ct-Wert (oder Crossing Point (CP-Wert)) ist eine theoretische Größe, die als Maß für die Quantifizierung der DNA-Startmenge herangezogen wird. Er ist definiert als die Anzahl der PCR-Zyklen, nach denen die Fluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Dadurch kann die Menge der amplifizierten Probe als Kurve in einem Diagramm dargestellt werden, in dem die Abszissenachse (x-Achse) die PCR-Zyklen und die Ordinatenachse (y-Achse) die Fluoreszenz repräsentiert (Abb. 3.12). Der Wert, bei dem sich die Fluoreszenz erstmalig vom Hintergrund abhebt und eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produkts zu sehen ist, wird als Schwellenwert (engl. threshold) bezeichnet. Folglich kann man den PCR-Zyklus, bei dem diese Schwelle zum ersten Mal überschritten wird, als Ct-Wert ablesen.

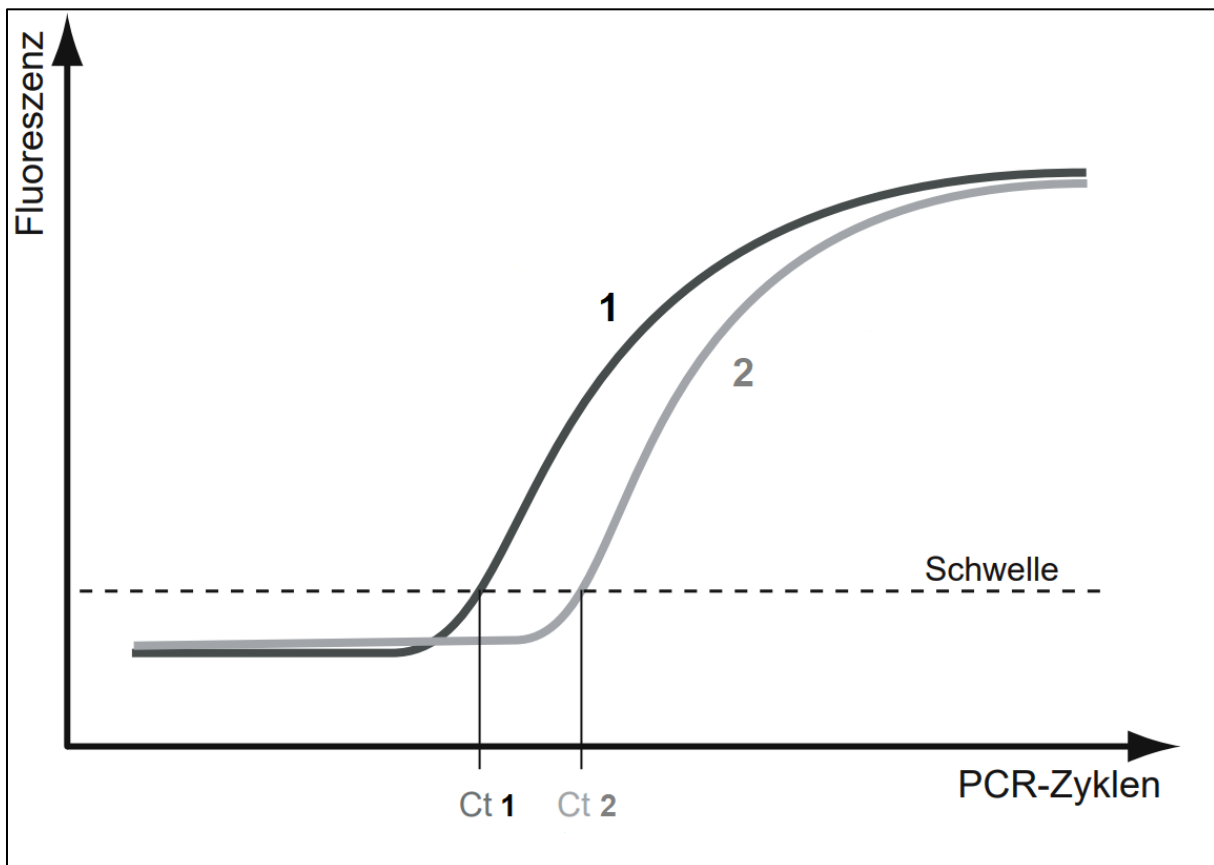


Abb. 3.12: Ct-Werte im Kurvenverlauf (modifiziert nach [Kück U, Bunse A, Herausgeber (2005) Praktikum der Molekulargenetik: mit 40 Tabellen, PCR-Analytik. Chapter 4, Abb. 4.4.1. Prinzip der Real-Time-PCR. Springer, Berlin]. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags)

An diesem Punkt ist die Menge der neusynthetisierten Amplifikationsprodukte aller gemessenen Proben gleich. Je höher die DNA-Konzentration einer Probe am Anfang einer PCR ist, desto schneller wird ein Fluoreszenzsignal detektiert (also nach einer geringeren Anzahl an PCR-Zyklen). Je höher folglich die DNA-Konzentration einer Probe ist, desto niedriger ist auch der Ct-Wert dieser Probe. Dadurch kann man Proben mit derselben DNA-Zielsequenz gut miteinander vergleichen und Schlüsse darüber ziehen, welche Probe anfangs mehr DNA beinhaltet hat.

Wichtig anzumerken ist die Tatsache, dass eine Quantifizierung einer Probe nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich ist, deren Anfangspunkt vom Ct-Wert gemessen wird. In der Phase davor ist die Anfangsmenge an DNA zu gering und demnach eine Interaktion zwischen Polymerase und Primer unwahrscheinlich. In der Phase danach ist die DNA-Menge dagegen zu hoch, so dass es zu einer Hemmung und Zerstörung der Polymerase und der Nukleotide kommt. Aus dem Kurvenverlauf kann demnach direkt abgelesen werden, in welchem Bereich eine Quantifizierung der DNA überhaupt möglich ist [281].

3.4.4 Relative Quantifizierung

Prinzip der relativen Quantifizierung in der RTqPCR ist die Genexpressionsanalyse der gemessenen Probe im Verhältnis zu einer oder mehreren Referenzproben. Bei diesen Referenzproben handelt es sich um sogenannte Housekeeping Gene (HKG) oder Referenzgene (RG), die homogen und konstant exprimiert werden. Die nicht regulierten HKG und deren RNA-Mengen werden in keiner Art und Weise von der Behandlung beeinflusst. Aus dem Vergleich zwischen gemessener Probe und Referenzprobe entsteht dadurch eine Normierung der Expressionsergebnisse [463]. Diese Normalisierung verringert die Wahrscheinlichkeit, dass Verfälschungen in Expressionsergebnissen der gemessenen Gene auftreten. Würden nämlich Störungsvariablen wie Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Enzymfehler vorkommen, würden sie das Zielgen und das HKG gleichermaßen betreffen [444]. In den Experimenten wurden GAPDH und β -Actin als Referenzgene eingesetzt [59].

3.4.5 Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Zur Ermittlung und endgültigen Auswertung der relativen Expressionsunterschiede der gemessenen Gene aus den unterschiedlich behandelten Zellen wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode benutzt [333]. Um die relative Expression zu berechnen, wurde die Expression von jedem Zielgen mit der Expression des Mittelwertes der beiden Referenzgene relativiert [482]. Zunächst wurde für jedes gemessene Gen (Ziel- und Referenzgen) der Mittelwert aus den Ct-Wert-Doppelbestimmungen berechnet. Anschließend wurde die Differenz zwischen dem errechneten Ct-Wert des Zielgens minus dem Ct-Wert des Referenzgens kalkuliert, was dem sogenannten ΔCt -Wert entspricht.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

Im zweiten Schritt wurde die relative Expression des Zielgens (ΔCt Behandlung) auf die relative Expression einer Kontrollprobe (ΔCt Kontrolle) bezogen. Die verwendete Kontrollprobe variierte zwischen den beiden Experimenten. Im ersten Experiment entsprach die Kontrolle bei jedem gemessenem Gen dem 0h-Erntezeitpunkt. Im zweiten Experiment wurde die EtOH-Behandlung als Kontrolle benutzt. Letztlich resultierte daraus der sogenannte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Das Endergebnis dieser Methode wird als n-fache Änderung (Ratio) der Zielgenexpression normalisiert auf ein Referenzgen (ΔCt) und relativ zu einer Kontrollprobe ($\Delta\Delta\text{Ct}$) dargestellt. Da für die Kontrollprobe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ gleich Null ist ($\Delta\text{Ct Kontrolle} - \Delta\text{Ct Kontrolle} = 0$) und 2^0 gleich 1, wird die n-fache Änderung (Ratio) der Genexpression der Kontrollprobe ($\Delta\Delta\text{Ct}$) per Definition gleich 1 sein. Für die Zielproben wird mit der Ratio des $\Delta\Delta\text{Ct}$ die n-fache Änderung der Genexpression relativ zur Kontrollprobe (=1) angegeben. Aus der Ratio des $\Delta\Delta\text{Ct}$ resultiert der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Wert.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.4.6 Effizienz

Die oben beschriebene $\Delta\Delta Ct$ - Methode setzt als Voraussetzung eine Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus voraus. Es handelt sich um die sogenannte real-time PCR-Effizienz, die optimalerweise zwei DNA-Verdopplungen pro PCR-Zyklus beträgt. Da im Alltag aber so etwas unrealistisch ist, schwankt die PCR-Effizienz von 1,5 bis 2,0. Durch geringste Effizienzschwankungen von Zielgenen zu Referenzgenen kann es schon zu großen Unterschieden in der Expression kommen. Daher wurden spezielle Berechnungsmodelle entwickelt, die die unterschiedlichen Effizienzen der Zielgene und Referenzgene berücksichtigen.

In unseren Experimenten wurden nur relative mRNA-Amplifikationen zwischen den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen in zwei Zelllinien durchgeführt. Bei jeder Zelllinie und Bedingung wurden immer die gleichen Primer-Paare untersucht und verglichen. Letztlich war das der Grund, weswegen in dieser Dissertation auf die Berechnung der PCR-Effizienz verzichtet worden ist.

3.5 Statistische Analyse

Die Standardabweichung wurde für die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte berechnet. Als Signifikanztest wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Dabei wurden die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte verglichen [510,594]. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde nach folgenden Werten angegeben:

n.s.	$p > 0.05$	nicht signifikant
*	$p \leq 0.05$	signifikant
**	$p \leq 0.005$	stark signifikant
***	$p \leq 0.0005$	hoch signifikant

Tab. 3.4: Irrtumswahrscheinlichkeit p

3.6 Material

3.6.1 Geräte

Gerät	Produktname, Hersteller
Stickstofftank	Apollo® von Cryotherm®
Sterilbank	HA 2448 GS von Heraeus LaminAir®
Lichtmikroskop	DM IL LED-Leica®
Wärmeschrank/Inkubator (5%-CO ₂ -begast)	Binder APT.line™ C150 (E2)
Pipett Controller	RF3000™ Li-Ion Battery Pipet Controller von Heathrow Scientific®
Einkanalpipette	VWR® Signature Ergonomic High-Performance Micro Starter Kit
Automatischer Zellzähler in Pipettierformat	The Scepter™ Handheld Automated Cell Counter
UV-B-Strahler	Crosslinker CL-1000M von Analytik Jena® (Ultra-violet products Ltd)
Kühlschrank (4,5°C)	Gorenje®
Gefrierfach (-70°C)	Platinum 550 von Angelantoni®
Zentrifuge 1	Megafuge® 1.0R von Heraeus®
Zentrifuge 2	Z 216 MK von Hermle®
Spektrophotometer	Nano Vue von GE®
Wasserbad 1	U3 von Julabo®
Wasserbad 2	118A-E von Huber®
Heizblock	QBD2 von Grant®
Gefrierschrank (-18°C)	GS 3002 von Liebherr®
Realtime-qPCR-Gerät	StepOnePlus™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems™
96-Well-Platte	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) von Applied Biosystems™

Tab. 3.5: Verwendete Geräte

3.6.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Produktname, Hersteller
Kryoröhrchen	Cryotube von Sarstedt®
Petrischalen	100 x 20 mm von Greiner Bio-One®
Serologische Pipette	Corning® Costar® Stripette®
Falcon	15 ml und 50 ml von Greiner Bio-One®
Spitzen mit Filter (Einkanalpipette)	Biosphere® Filter Tips von Sarstedt®
Reagiergefäß	1,5ml von Sarstedt®
Spitzen (automatischer Zellzähler in Pipettierformat)	60 µm von Scepter™ Sensors
Sterilfilter	Steritop® 45mm Neck Size von Millipore Express®
Laborflasche	500ml von Schott Duran®
Pasteurpipette	Hirschmann®
Schaber	disposable Cell Scraper von Greiner Bio-One®
RNeasy Mini Kit (mRNA - Isolierungskit 1)	RNeasy Mini Kit (250) von Qiagen®
RNeasy Mini Spin Column	Qiagen®
Sammelröhrchen	Collection Tubes (1.5 ml) von Qiagen®
QIAshredder (mRNA - Isolierungskit 2)	QIAshredder (250) von Qiagen®
QIAshredder Mini Spin Column	Qiagen®
Einkanalpipette	VWR® Signature Ergonomic High-Performance Micro Starter Kit
Klebefolie	MicroAmp™ Optical Adhesive Film von Applied Biosystems™
Stützbasis	MicroAmp™ 96-Well Support Base von Applied Biosystems™
Reagiergefäß (cDNA)	1,5 ml von Sarstedt®

Tab. 3.6: Verwendetes Verbrauchsmaterial

3.6.3 Substanzen

Verwendete Substanzen	Hersteller (CAS-Nummer)
DMEM-Medium	500 ml von Gibco®
RPMI-Medium 1640	500 ml von Gibco®
1% L-Glutamin	200 mM von Thermo Scientific™
10% FCS	Fötales Kälberserum von Gibco™
PBS-Puffer (pH 7,2-7,4)	Apotheke der Universitätskliniken des Saarlandes
0,25% Trypsin-EDTA	100 ml von Gibco®
BSA	Sigma Aldrich® (9048-46-8)
Ethanol absolute for analysis	Merck® (64-17-5)
1,25(OH) ₂ D ₃ (Calcitriol)	Sigma Aldrich® (32222-06-3)
CH223191 (AhR-Antagonist)	5 mg von Sigma Aldrich® (301326-22-7)
25(OH)D ₃ (VDR-Inhibitor)	1 mg von Sigma Aldrich® (19356-17-3)
DMSO-Lösung	Merck® (67-68-5)
RLT-Buffer	Buffer RLT von Qiagen®
RW1-Buffer	Buffer RW1 von Qiagen®
RPE-Buffer	Buffer RPE (concentrate) von Qiagen®
RNase-freies Wasser	RNase-Free Water von Qiagen®
RQ1 RNase-Free DNase	(DNase) von Promega®
RQ1 RNase-Free DNase Reaction Buffer	(400mM Tris-HCl, 100mM MgSO ₄ , 10mM CaCl ₂) von Promega®
Mercaptoethanol	100ml von Sigma Aldrich® (60-24-2)
destilliertes Wasser	Sigma Aldrich® (7732-18-5)
cDNA-Umschreibungskit	Omniscript® RT Kit (200) von Qiagen®
Omniscript RT	Omniscript® Reverse Transcriptase von Qiagen®
RT-Puffer	Buffer RT von Qiagen®
dNTP	dNTP Mix (5 mM) von Qiagen®
Random Primer	Random Primers (500 µg/ml) von Promega®

RNase Inhibitor	RNasin® Ribonuclease Inhibitor (40 units/μl) von Promega®
PCR-Kit	QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit von Qiagen®
SYBR® Green I (DNA-Farbstoff)	1.7 ml 2x QuantiNova® SYBR® Green PCR Master Mix von Qiagen® (enthält: QuantiNova® DNA Polymerase, QuantiNova® SYBR® Green PCR Buffer, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)) (163795-75-3)
ROX (Passiver Referenzfarbstoff)	1 ml QN ROX™ Reference Dye von Qiagen®
RNase-freies Wasser	1,9 ml RNase-Free Water von Qiagen®
Primer AhR	QuantiTect® Primer Assay (QT00031437) von Qiagen®
Primer CYP1A1	QuantiTect® Primer Assay (QT00012341) von Qiagen®
Primer PTGS2 (COX-2)	QuantiTect® Primer Assay (QT00040586) von Qiagen®
Primer VDR	QuantiTect® Primer Assay (QT01010170) von Qiagen®
Primer CYP24A1	QuantiTect® Primer Assay (QT00015428) von Qiagen®
Primer GAPDH	QuantiTect® Primer Assay (QT00079247) von Qiagen®
Primer ACTIN-β	QuantiTect® Primer Assay (QT00095431) von Qiagen®
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 und 1 nM EDTA

Tab. 3.7: Verwendete Substanzen

3.6.4 Datenbanken und Computerprogramme

Bearbeitungsart	Programm/Website
Rechner	Microsoft® Windows® XP
Real Time qPCR	StepOnePlus™ Software v2.3
Statistische Auswertung	Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (64-Bit)
Graphische Darstellung	Microsoft® Excel® für Microsoft 365 MSO (64-Bit)
Textverarbeitung	Microsoft® Word für Microsoft 365 MSO (64-Bit)
Präsentation	Microsoft® PowerPoint® für Microsoft 365 MSO (64-Bit)
Literaturrecherche	PubMed® (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/)
Suchmaschine	Google® (www.google.de)

Tab. 3.8: Verwendete Datenbanken und Computerprogramme

4 Ergebnisse

In den letzten Jahren konnten sowohl für klassische als auch für nicht-klassische Vitamin D₃ Derivate neue biologische Wirkungen identifiziert werden, die nicht über Bindung und Aktivierung des VDR, sondern des AhR und anderer alternativen Rezeptoren vermittelt werden [533]. Diese neuen wissenschaftliche Erkenntnisse sprechen für eine funktionelle Interaktion zwischen AhR- und VDR-Signalwegen in verschiedenen menschlichen Geweben, darunter CD4⁺ T-Zellen, oralen (OKF6/TERT-2-Zellen) und epidermalen (NHEK- und HaCaT-Zellen) Keratinozyten, Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) und Makrophagen (THP-1-Zellen) [321,356,357,556]. Bestimmte Zielgene dieser Signalwege, darunter CYP1A1 (klassisches AhR-Zielgen), COX-2 (nicht-klassisches AhR-Zielgen) und CYP24A1 (VDR-Zielgen), begünstigen die Entstehung von Hautkrebs und können deswegen als potentielle Onkogene angesehen werden [12,18,183,301,330]. Von besonderem Interesse ist die funktionelle Interaktion für die Photokarzinogenese von hellem Hautkrebs, bei der die UV-Strahlung neben der Hautkrebs-induzierenden Wirkung über die Stimulation der Vitamin D Synthese auch vor Hautkrebs schützende Mechanismen ausübt.

Allerdings fehlen bislang Studien, die die Interaktionen im komplexen Netzwerk der AhR- und VDR-Signalwege gezielt während der Photokarzinogenese von hellem Hautkrebs untersuchen. Um hier erste Einblicke zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Stimulation von zwei Keratinozyten-Zelllinien, die unterschiedliche Stadien der Photokarzinogenese repräsentieren (spontan immortalisierte präkanzeröse HaCaT-Keratinozyten und maligne cSCC-Zellen der Zelllinie SCL-1) mit UV-B oder 1,25(OH)₂D₃ auf die Expression von Komponenten der AhR- und VDR-Signalwege verglichen. Dadurch sollte u.a. auch die Frage untersucht werden, inwieweit die Effekte der UV-Strahlung auf die UV-B-induzierte Bildung von 1,25(OH)₂D₃ zurückgeführt werden können.

4.1 Expression von Genen der AhR- und VDR-Signalwege in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen

Die Expression von Kernelementen des AhR- und VDR-Signalweges wurde in unbehandelten präkanzerösen (HaCaT) und malignen (SCL-1) Keratinozyten gemessen. In Balkendiagrammen wurden die Stunden-Ergebnisse und die insgesamt Genexpression aufgeführt, um Schwankungen durch die Zellkultur-Bedingungen und Unterschiede zwischen den Zelllinien erfassen zu können.

4.1.1 Die Expression von AhR und CYP1A1 ist in unbehandelten HaCaT-Zellen stärker als in SCL-1-Zellen

In präkanzerösen HaCaT-Keratinozyten wurde die Expression von klassischen Komponenten des AhR-Signalweges (AhR und CYP1A1) insgesamt 13,15-fach ($p \leq 0,005$; für AhR) und 34,43-mal ($p = 0,07$; für CYP1A1) stärker exprimiert als in malignen SCL-1-Zellen (Abb. 4.1 und 4.2). Somit ist die Aktivität des klassischen AhR-Signalweges in SCC-Vorstufen stärker als im SCC selbst.

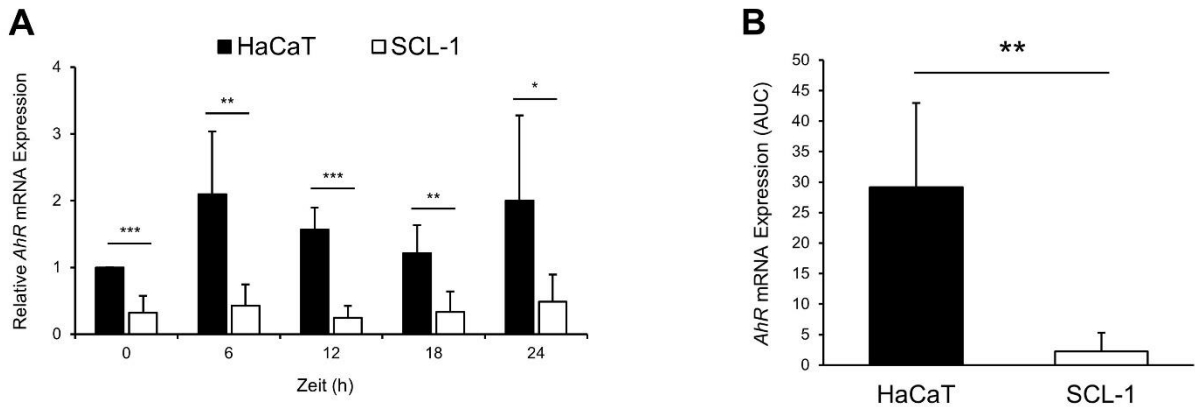


Abb. 4.1: AhR-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA-Nährmedium behandelt und in 6h Intervallen über 24h geerntet (A). Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die AUC von HaCaT- und SCL-1-Zellen wurde aus den jeweiligen Zeitkurven berechnet (B). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu HaCaT 0 h. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

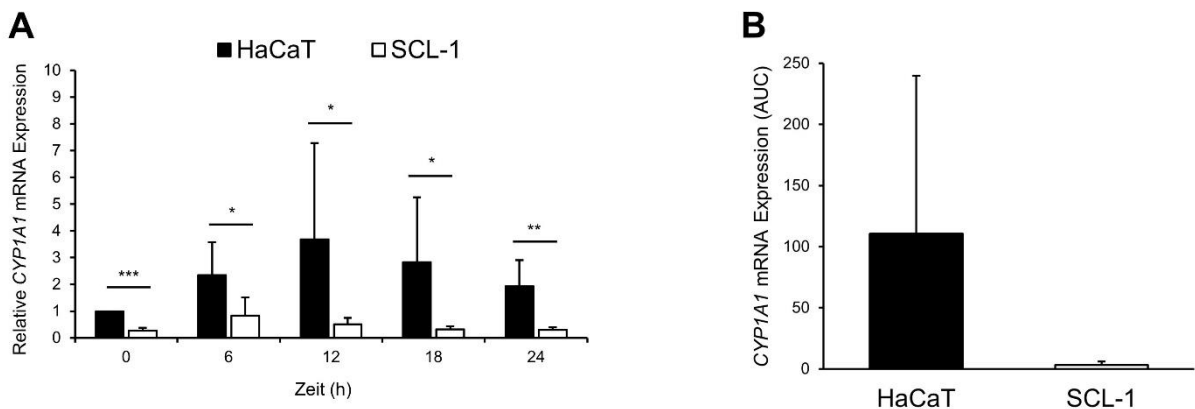


Abb. 4.2: CYP1A1-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA-Nährmedium behandelt und in 6h Intervallen über 24h geerntet (A). Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die AUC von HaCaT- und SCL-1-Zellen wurde aus den jeweiligen Zeitkurven berechnet (B). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu HaCaT 0 h. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.1.2 Die Expression von COX-2, VDR und CYP24A1 ist in unbehandelten SCL-1-Zellen stärker als in HaCaT-Zellen

Im Gegensatz zu den HaCaT-Keratinozyten wurde in malignen SCL-1-Zellen ein nicht-klassisches Element des AhR-Signalweges (COX-2) insgesamt 2,92-mal ($p = 0,26$) und Komponenten des VDR-Signalweges (VDR und CYP24A1) 5,62-mal ($p = 0,09$; für VDR) bzw. 68,29-mal ($p = 0,5$; für CYP24A1) stärker hochreguliert als in HaCaT-Zellen (Abb. 4.3, 4.4 und 4.5). Der VDR-Signalweg ist somit im SCC stärker exprimiert als in seinen Vorstufen.

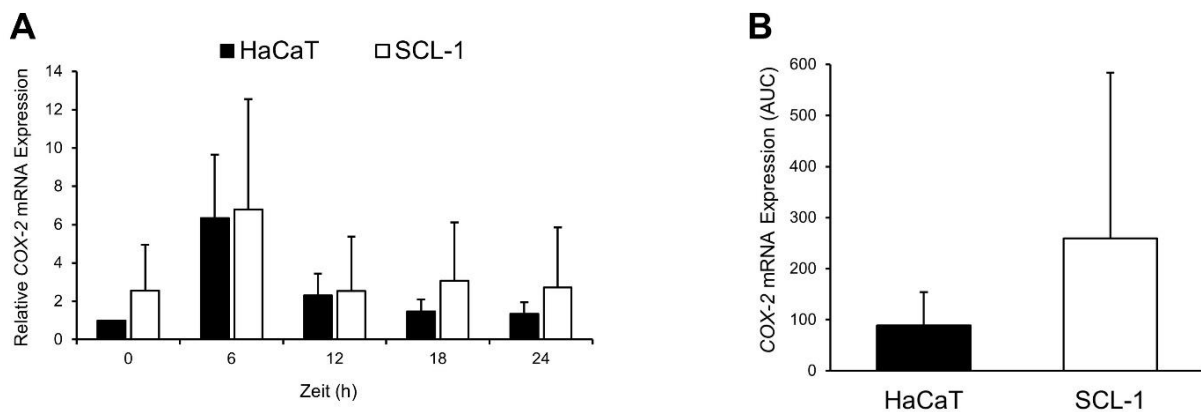


Abb. 4.3: COX-2-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA-Nährmedium behandelt und in 6h Intervallen über 24h geerntet (A). Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die AUC von HaCaT- und SCL-1-Zellen wurde aus den jeweiligen Zeitkurven berechnet (B). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu HaCaT 0 h. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

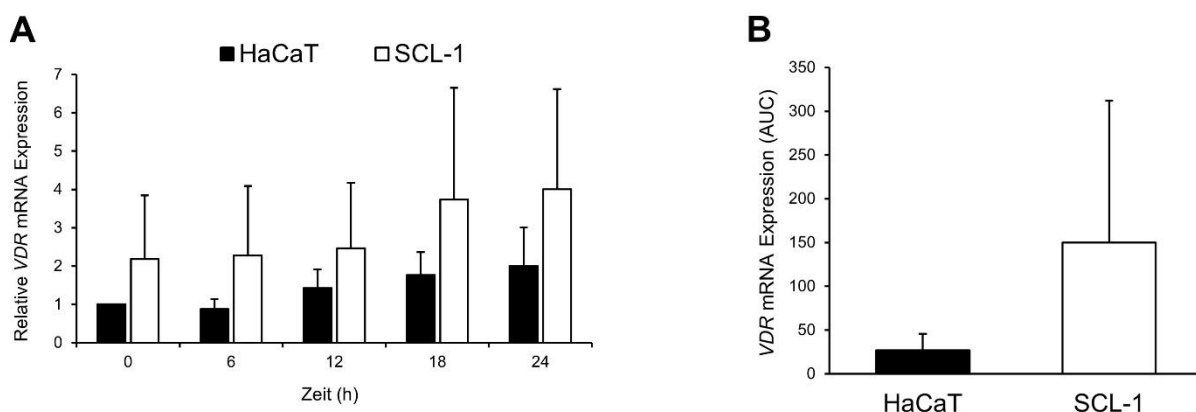


Abb. 4.4: VDR-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA-Nährmedium behandelt und in 6h Intervallen über 24h geerntet (A). Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die AUC von HaCaT- und SCL-1-Zellen wurde aus den jeweiligen Zeitkurven berechnet (B). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu HaCaT 0 h. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

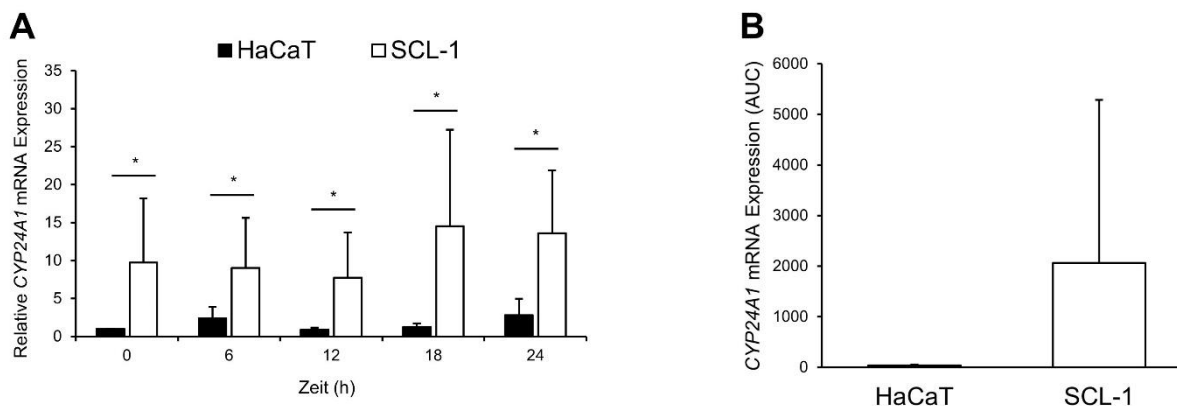


Abb. 4.5: CYP24A1-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA-Nährmedium behandelt und in 6h Intervallen über 24h geerntet (A). Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die AUC von HaCaT- und SCL-1-Zellen wurde aus den jeweiligen Zeitkurven berechnet (B). Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu HaCaT 0 h. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.1.3 Fazit: Genexpression von Elementen des AhR- und VDR-Signalweges in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen

Gene, die für wichtige Elemente Vitamin D₃-abhängiger Signalwege kodieren, wurden in Keratinozyten verschiedener Stadien der Hautkarzinogenese unterschiedlich reguliert. Klassische Komponenten des AhR-Signalweges (AhR und CYP1A1) wurden in prämaligen HaCaT-Keratinozyten und nicht-klassische AhR- (COX-2) als auch elementare VDR-Komponenten (VDR und CYP24A1) in malignen SCL-1-Keratinozyten stärker exprimiert.

4.2 Untersuchungen zum Einfluss der Zugabe von EtOH zum Kulturmedium auf die Genexpression in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Bei allen unseren Zellkulturexperimenten wurde 1% BSA-Nährmedium eingesetzt. Da EtOH (1:1000 Verdünnung) als Lösungsmittel für 1,25(OH)₂D₃ benötigt wurde, haben wir, um mögliche EtOH-vermittelte Störeffekte auszuschließen, zunächst in einem Vorversuch Ergebnisse der Behandlung mit 1% BSA-Nährmedium und 1% BSA+EtOH-Nährmedium verglichen. Um den EtOH-Einfluss auch unter UV-B-Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Versuche einmal unter Abwesenheit und einmal unter Anwesenheit von UV-B durchgeführt. Wir zeigen dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Genexpressionstendenzen der Behandlungsbedingungen gibt. Daraus resultiert, dass EtOH in bestrahlten und unbestrahlten Zellen keine zusätzlichen Effekte herbeiführt.

4.2.1 EtOH zeigt keine zusätzlichen Effekte in HaCaT-Zellen

Die AhR-Expression war beim Zeitverlauf von 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Zellen vergleichbar (Abb. 4.6). Es fand sich zu Beginn der Kultivierung ein Anstieg (1% BSA: 6h: 2,09-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 6h: 1,64-fach, $p \leq 0,05$), im Verlauf ein Abfall (1% BSA: 12h: 1,57-fach, $p \leq 0,005$, 18h: 1,21-fach, $p = 0,24$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,36-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 1,08-fach, $p = 0,72$) und wieder ein Anstieg (1% BSA: 24h: 2-fach; $p = 0,08$; 1% BSA+EtOH: 24h: 1,27-fach; $p = 0,28$) der Expression. Auch nach UV-B-Bestrahlung war die Expression in beiden Behandlungsgruppen ähnlich, aber wurde kaum reguliert (Daten im Anhang, Kapitel 10) (Ausnahme: 1% BSA+UV-B: 12h: 4-fache Induktion, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 1,78-fache Induktion, $p \leq 0,005$) (Abb. 4.7).

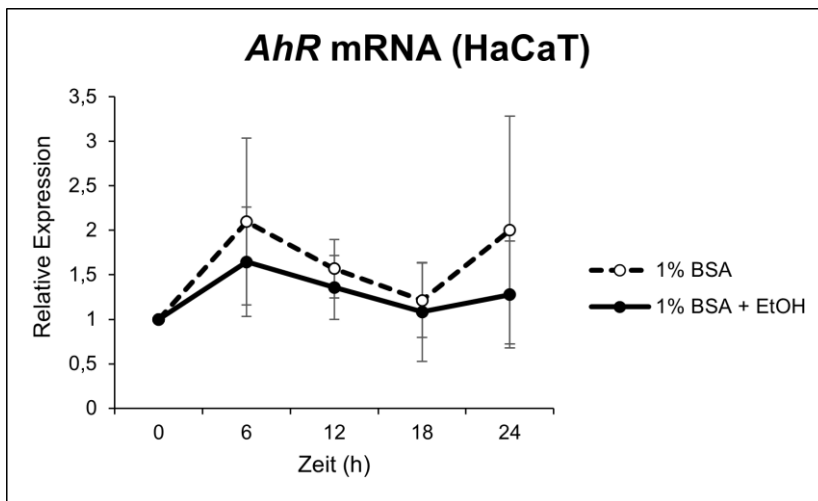


Abb. 4.6: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

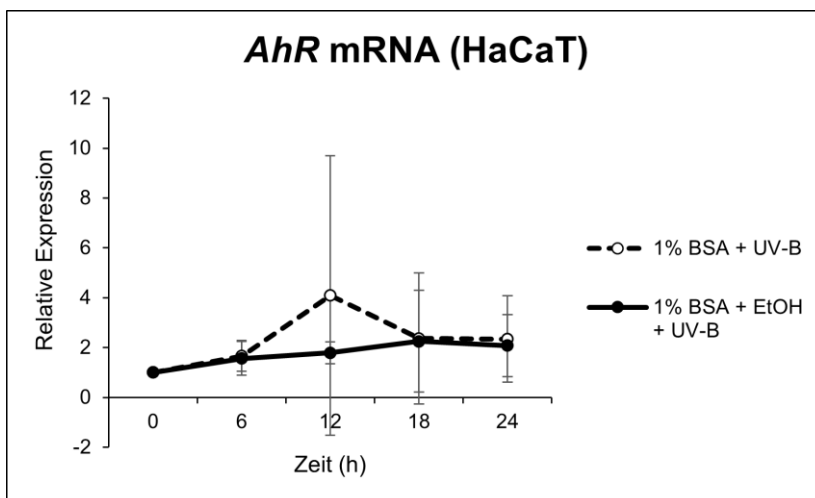


Abb. 4.7: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Der Zeitverlauf der CYP1A1-Expression in 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Zellen war identisch (Abb. 4.8). Zunächst kam es zum Anstieg (1% BSA: 6h: 2,34-fach, $p \leq 0,05$, 12h: 3,68-fach, $p = 0,09$; 1% BSA+EtOH: 6h: 1,88-fach, $p \leq 0,0005$) (Ausnahme: 1% BSA+EtOH: 12h: 1,79-fach, $p = 0,07$) und dann zum Abfall (1% BSA: 18h: 2,83-fach, $p = 0,09$, 24h: 1,93-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 18h: 1,82-fach, $p = 0,11$, 24h: 1,52-fach, $p \leq 0,05$) der Expression. Die Bestrahlung der Zellen mit UV-B führte zu ähnlichen Ergebnissen (1% BSA+UV-B: 6h: 2,47-fach, $p \leq 0,05$, 12h: 3,03-fach, $p = 0,12$, 18h: 2,51-fach, $p = 0,06$, 24h: 1,71-fach, $p = 0,11$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: 4,60-fach, $p \leq 0,05$, 12h: 3,56-fach, $p = 0,056$, 18h: 4,53-fach, $p = 0,06$, 24h: 3,11-fach, $p \leq 0,0005$) (Abb. 4.9).

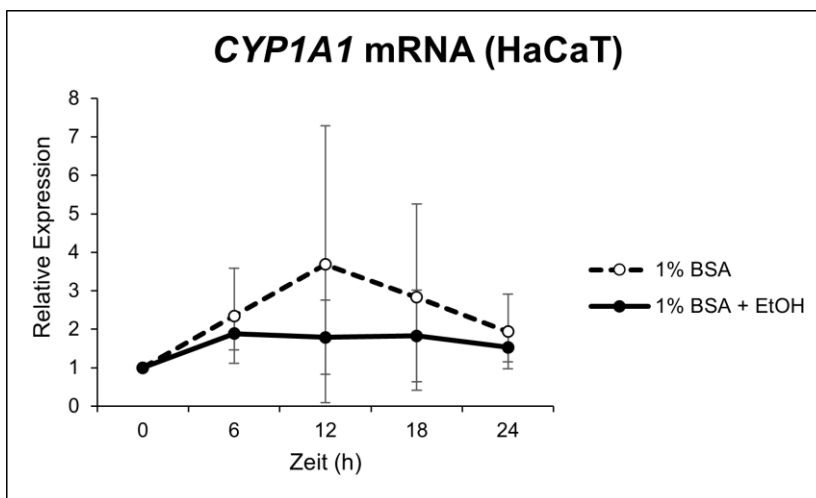


Abb. 4.8: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

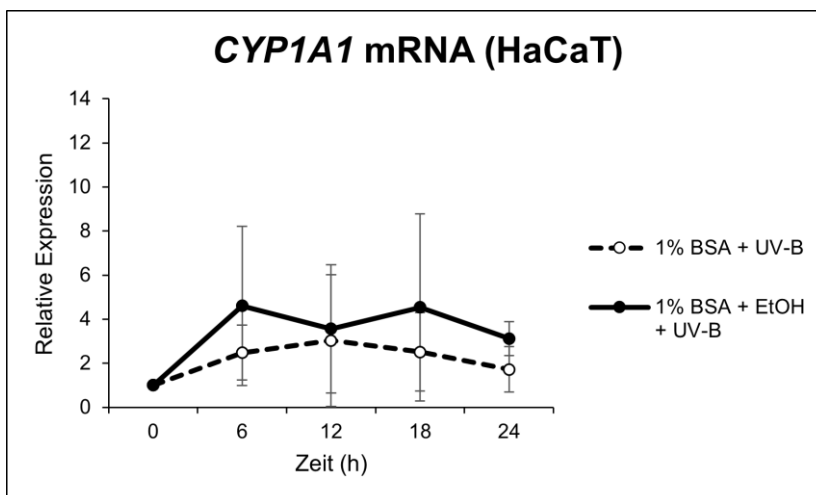


Abb. 4.9: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die mRNA-Expression von COX-2 zeigte einen vergleichbaren Zeitverlauf in unbestrahlten und bestrahlten Keratinozyten (Abb. 4.10 und 4.11). Es fand sich anfangs ein Anstieg (1% BSA: 6h: 6,33-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 6h: 2,62-fach, $p \leq 0,005$) (1% BSA+UV-B: 6h: 5,08-fach, $p \leq 0,005$; 1% BSA+EtOH: 6h: 5,42-fach, $p \leq 0,05$), gefolgt von einem Abfall (1% BSA: 12h: 2,30-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 1,45-fach, $p = 0,1$, 24h: 1,34-fach, $p = 0,17$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,59-fach, $p = 0,14$, 18h: 1,11-fach, $p = 0,61$, 24h: 0,91-fach, $p = 0,37$) (1% BSA+UV-B: 12h: 5,01-fach, $p = 0,06$, 18h: 2,09-fach, $p \leq 0,05$, 24h: 1,18-fach, $p = 0,46$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 3,02-fach, $p = 0,06$, 18h: 2,83-fach, $p \leq 0,05$, 24h -Wert: 1,40-fach, $p \leq 0,0005$) der Expression. Damit konnten wir keine EtOH-bedingte Verfälschung in unseren Ergebnissen feststellen.

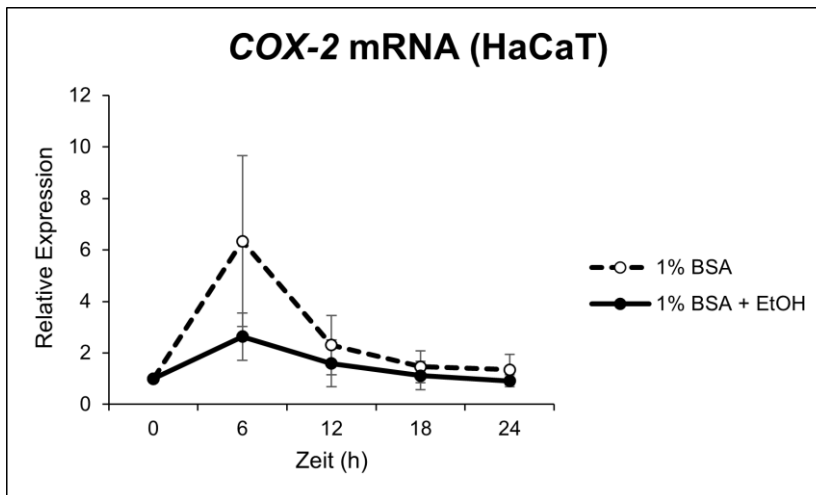


Abb. 4.10: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

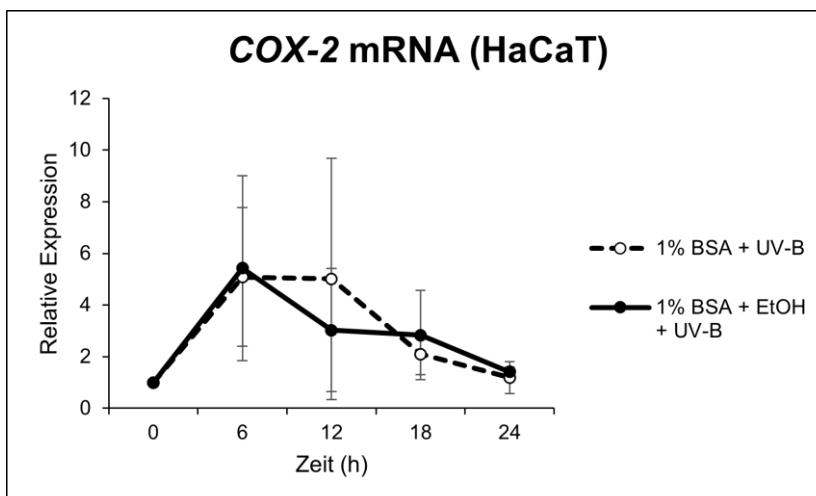


Abb. 4.11: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Der Zeitverlauf der VDR-mRNA-Expression war in unbestrahlten (Behandlung mit 1% BSA- und 1% BSA+EtOH) und bestrahlten (Behandlung mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B) Zellen gleichartig (Abb. 4.12 und 4.13). So kam es anfangs zum Abfall (1% BSA 6h: auf 88,4%, $p = 0,29$; 1% BSA+EtOH 6h: auf 92,3%, $p = 0,49$) (1% BSA+UV-B 6h: 64,7%, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH+UV-B 6h: 70,9%, $p \leq 0,05$) und später zum Anstieg (1% BSA: 12h: 1,42-fach, $p = 0,06$, 18h: 1,76-fach, $p \leq 0,05$, 24h: 1,99-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,49-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 2,03-fach, $p \leq 0,05$) (1% BSA+UV-B: 12h: 1,69-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 1,85-fach, $p = 0,08$, 24h: 1,85-fach, $p = 0,2$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 1,88-fach, $p \leq 0,005$, 18h: 2,03-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 2,06-fach, $p \leq 0,05$) (Ausnahme: 1% BSA+EtOH: 24h: 1,98-fach, $p \leq 0,005$) der VDR-Expression. Es gab keine Hinweise auf einen verfälschenden Effekt durch EtOH.

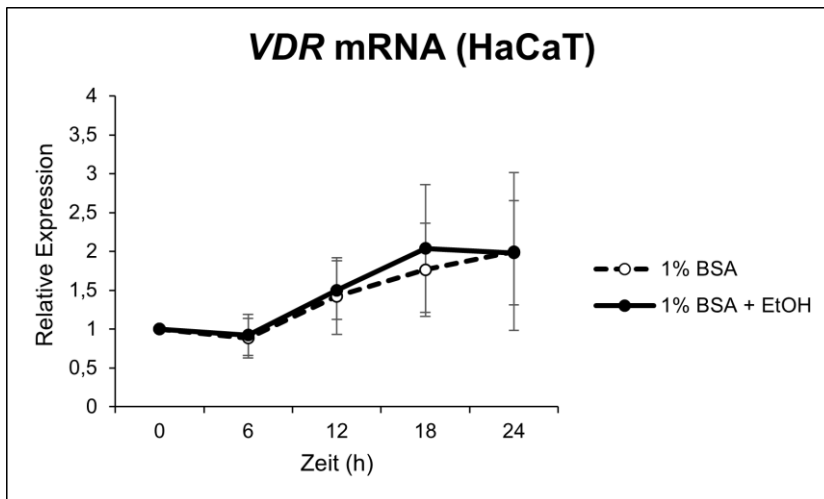


Abb. 4.12: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

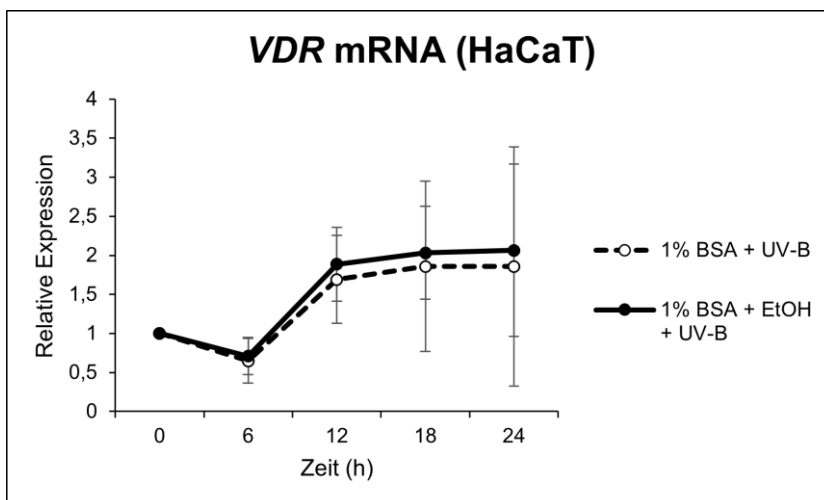


Abb. 4.13: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die CYP24A1-mRNA-Expression war beim Zeitverlauf von 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Zellen vergleichbar (Abb. 4.14). Zu Beginn fand sich ein Anstieg (1% BSA: 6h: 2,37-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 6h: 1,95-fach, $p = 0,09$), im Verlauf ein Abfall (1% BSA 12h: auf 87,8%, $p = 0,27$; 1% BSA+EtOH: 12h: auf 92,2%, $p = 0,4$) und dann ein weiterer Anstieg (1% BSA: 18h: 1,23-fach, $p = 0,27$, 24h: 2,79-fach, $p = 0,07$; 1% BSA+EtOH: 18h: 2,19-fach, $p \leq 0,0005$) (Ausnahme: 1% BSA+EtOH: 24h: 1,53-fach, $p \leq 0,005$) der Expression. Nach UV-B-Bestrahlung zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (1% BSA+UV-B: 6h: 1,29-fach, $p = 0,11$, 12h: 1,48-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 1,09-fach, $p = 0,6$, 24h: 1,08-fach, $p = 0,79$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: 1,45-fach, $p = 0,24$, 12h: 1,33-fach, $p = 0,09$, 18h: 1,42-fach, $p \leq 0,05$, 24h: 0,99-fach, $p = 0,96$) (Abb. 4.15). Hinweise auf EtOH-vermittelte Effekte konnten hier nicht beobachtet werden.

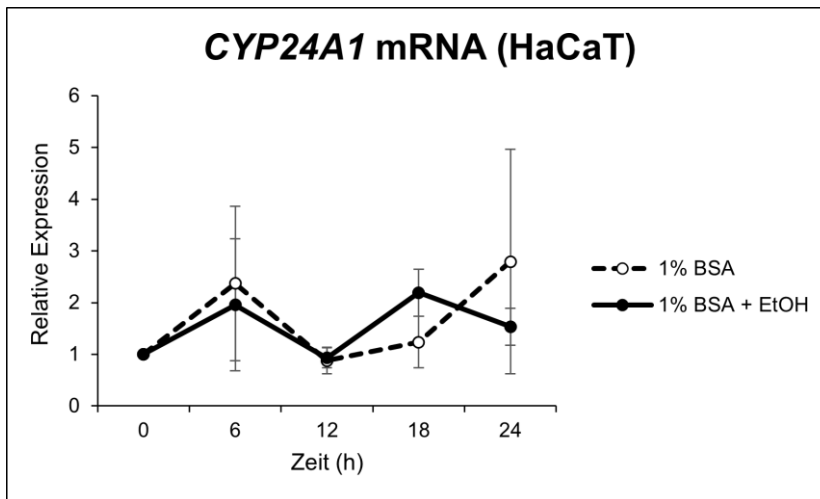


Abb. 4.14: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

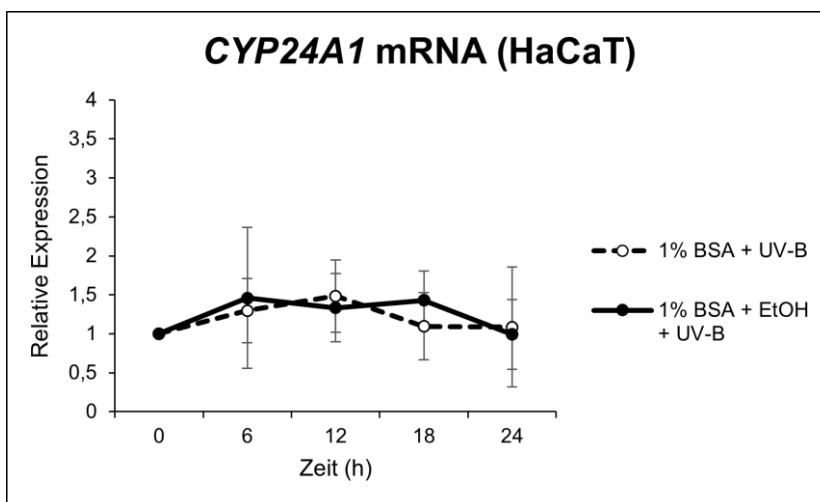


Abb. 4.15: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

4.2.2 EtOH zeigt keine zusätzlichen Effekte in SCL-1-Zellen

In SCL-1-Zellen ähnelte die AhR-Expression vom Zeitverlauf her zwischen den unterschiedlich behandelten Keratinozyten (1% BSA und 1% BSA+EtOH; 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B) (Abb. 4.16 und 4.17). Zuerst kam es zum Anstieg (1% BSA: 6h: 1,42-fach, $p \leq 0,005$; 1% BSA+EtOH: 6h: 1,63-fach, $p \leq 0,05$) (1% BSA+UV-B: 6h: 2,62-fach, $p = 0,07$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: 1,71-fach, $p \leq 0,05$), danach zum Abfall (1% BSA: 12h: auf 83%, $p = 0,79$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,24-fach, $p = 0,07$) (1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 1,47-fach, $p \leq 0,005$) (Ausnahme: 1% BSA+UV-B: 12h: 2,68-fach, $p = 0,19$) und letztendlich wieder zum Anstieg (1% BSA: 18h: 1,09-fach, $p = 0,41$, 24h: 1,53-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 18h: 1,51-fach, $p = 0,09$, 24h: 1,99-fach, $p \leq 0,05$) (1% BSA+UV-B: 18h: 3,48-fach, $p = 0,13$, 24h: 3,84-fach, $p = 0,07$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 18h: 1,79-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 2,39-fach, $p \leq 0,0005$) der Expression. Es gab keine Hinweise auf zusätzliche, EtOH-bedingte Effekte.

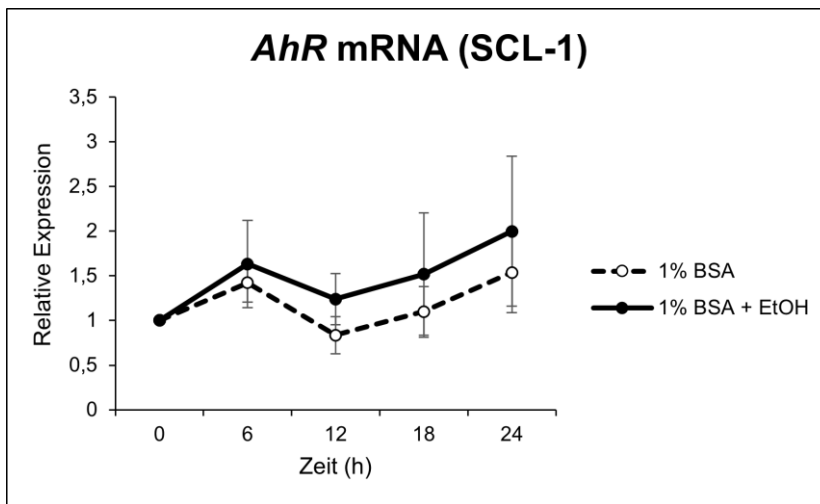


Abb. 4.16: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

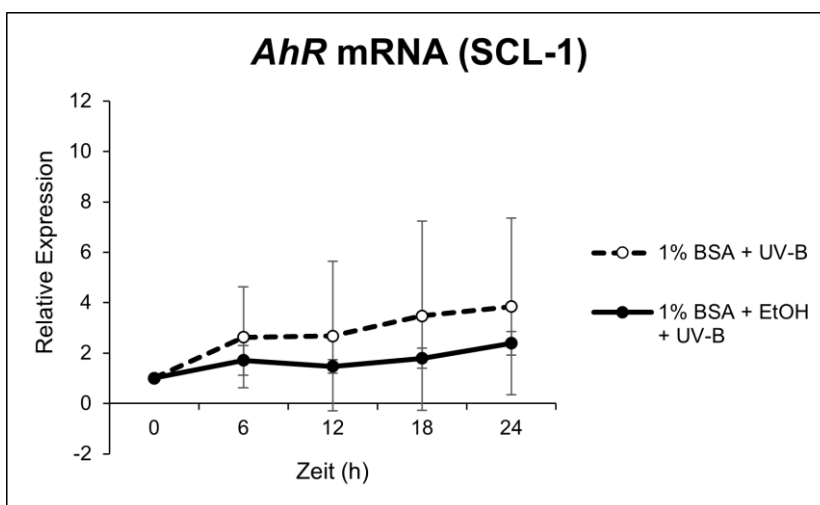


Abb. 4.17: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Der Zeitverlauf der CYP1A1-Expression war in 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Zellen vergleichbar (Abb. 4.18). Auf einen Anstieg (1% BSA: 6h: 2,78-fach, $p = 0,02$; 1% BSA+EtOH: 6h: 3,02-fach, $p = 0,03$) folgte ein Abfall (1% BSA: 12h: 1,81-fach, $p \leq 0,0005$, 18h: 1,21-fach, $p = 0,15$, 24h: 1,18-fach, $p = 0,08$; 1% BSA+EtOH: 12h: 2,51-fach, $p \leq 0,0005$, 18h: 1,49-fach, $p = 0,07$, 24h: 1,32-fach, $p = 0,17$) der mRNA-Expression. Nach Bestrahlung fand sich ein ähnlicher Zeitverlauf in 1% BSA+UV-B- und 1% BSA+EtOH+UV-B-behandelten Zellen, mit einem späteren Anstieg der Expression (1% BSA+UV-B: 6h: 2,07-fach, $p \leq 0,005$, 12h: 3-fach, $p \leq 0,005$, 18h: 5,87-fach, $p = 0,08$, 24h: 2,38-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: 1,96-fach, $p \leq 0,05$, 12h: 3,37-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 4,10-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 2,91-fach, $p \leq 0,005$) (Abb. 4.19). Es wurden keine Hinweise auf EtOH-assoziierte Störeffekte beobachtet.

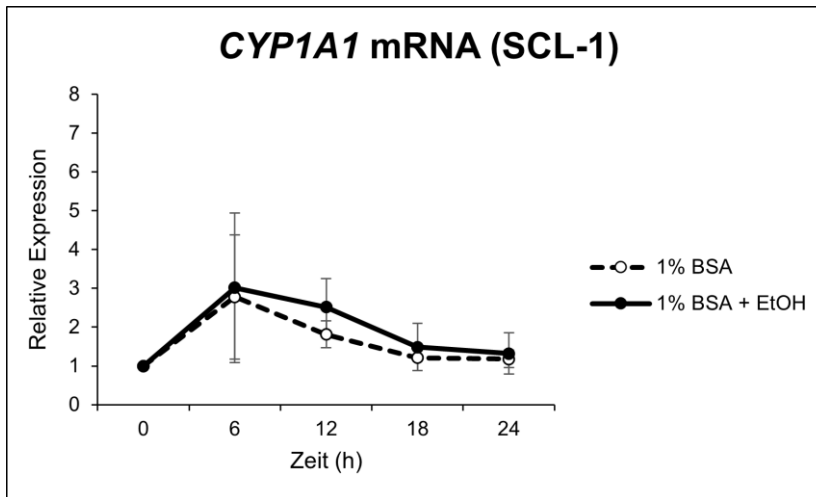


Abb. 4.18: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

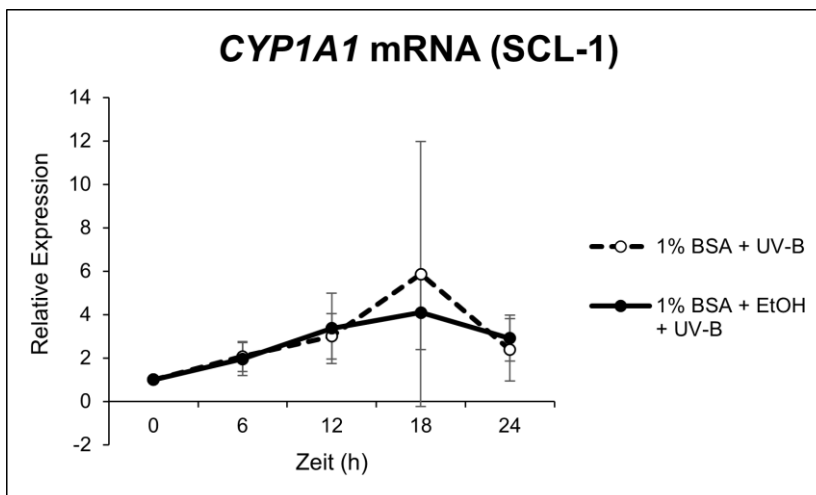


Abb. 4.19: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die mRNA-Expression der COX-2 zeigte einen gleichartigen Zeitverlauf in Zellen behandelt mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH (Abb. 4.20). Es kam zum Anstieg (1% BSA: 6h: 2,76-fach, $p \leq 0,0005$; 1% BSA+EtOH: 6h: 2,90-fach, $p \leq 0,0005$), im Verlauf zum Abfall (1% BSA: 12h: 1, $p \leq 0,0005$, $p = 0,98$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,65-fach, $p \leq 0,05$) und wieder zum Anstieg (1% BSA: 18h: 1,20-fach, $p = 0,66$; 1% BSA+EtOH: 18h: 1,23-fach, $p = 0,59$, 24h: 1,37-fach, $p = 0,56$) (Ausnahme: 1% BSA: 24h: 1,15-fach, $p = 0,79$) der Expression. Auch die bestrahlten Zellen ähnelten sich im Zeitverlauf und zeigten zuerst einen Anstieg (1% BSA+UV-B: 6h: 8,85-fach, $p \leq 0,0005$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: 6,90-fach, $p \leq 0,005$) und dann einen Abfall (1% BSA+UV-B: 12h: 4,18-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 3,15-fach, $p \leq 0,05$, 24h: 1,93-fach, $p = 0,13$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 2,85-fach, $p \leq 0,0005$, 18h: 1,99-fach, $p = 0,12$, 24h: 1,67-fach, $p = 0,22$) der Expression (Abb. 4.21). Wir fanden keine Hinweise auf EtOH-vermittelte Effekte.

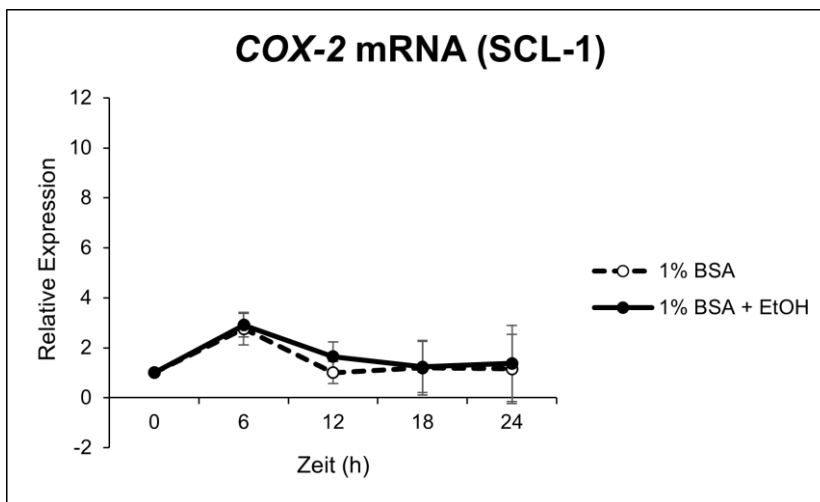


Abb. 4.20: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

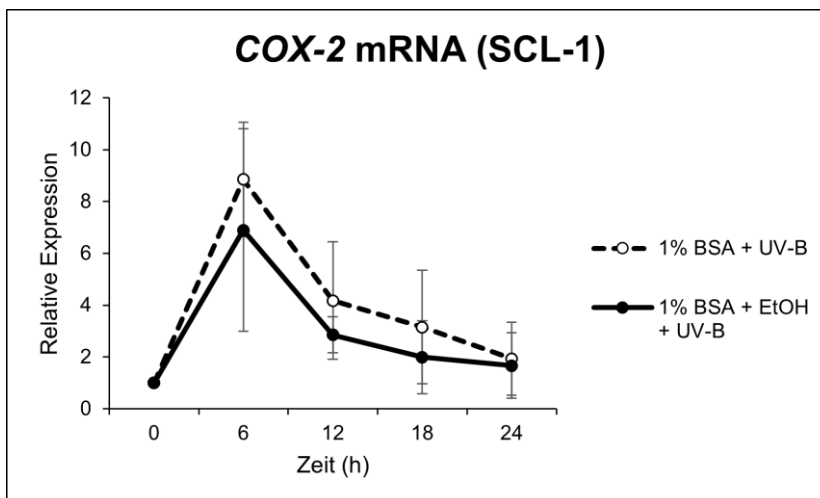


Abb. 4.21: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Der Zeitverlauf der VDR-Expression war in 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Keratinozyten komparabel (Abb. 4.22). Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg (1% BSA: 6h: 1,09-fach, $p = 0,2$, 12h: 1,29-fach, $p \leq 0,05$, 18h: 1,94-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 2,29-fach, $p \leq 0,005$; 1% BSA+EtOH: 6h: 1,36-fach, $p \leq 0,05$, 12h: 1,83-fach, $p \leq 0,005$, 18h: 2,71-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 2,99-fach, $p \leq 0,005$) der Expression. Die Expression zeigte in 1% BSA+UV-B- und 1% BSA+EtOH+UV-B-behandelten Zellen ebenso einen vergleichbaren Zeitverlauf (Abb. 4.23). Am Anfang fand sich ein Abfall (1% BSA+UV-B: 6h: auf 90%, $p = 0,37$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 6h: auf 88%, $p = 0,23$), gefolgt von einem Anstieg (1% BSA+UV-B: 12h: 2,50-fach, $p \leq 0,0005$, 18h: 3,09-fach, $p \leq 0,0005$, 24h: 3,20-fach, $p \leq 0,0005$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 2,56-fach, $p \leq 0,0005$, 18h: 3,02-fach, $p = 0,12$, 24h: 3,40-fach, $p = 0,22$) der Expression. Somit gab es keine Hinweise auf EtOH-assoziierte Effekte.

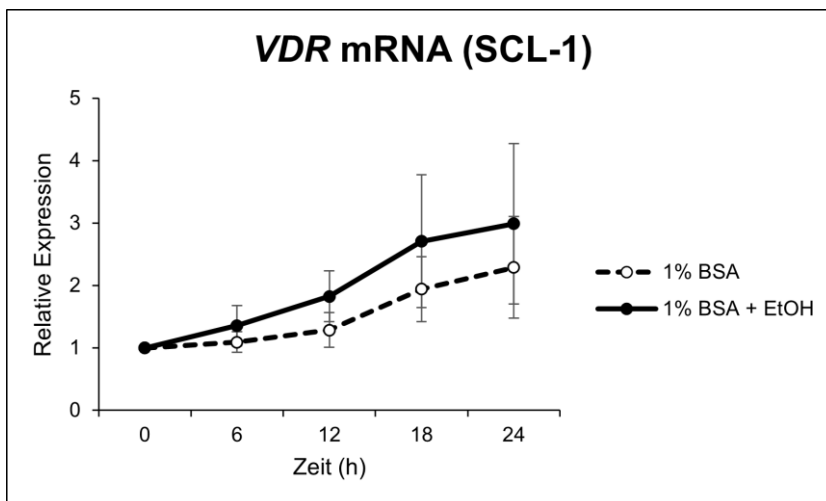


Abb. 4.22: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

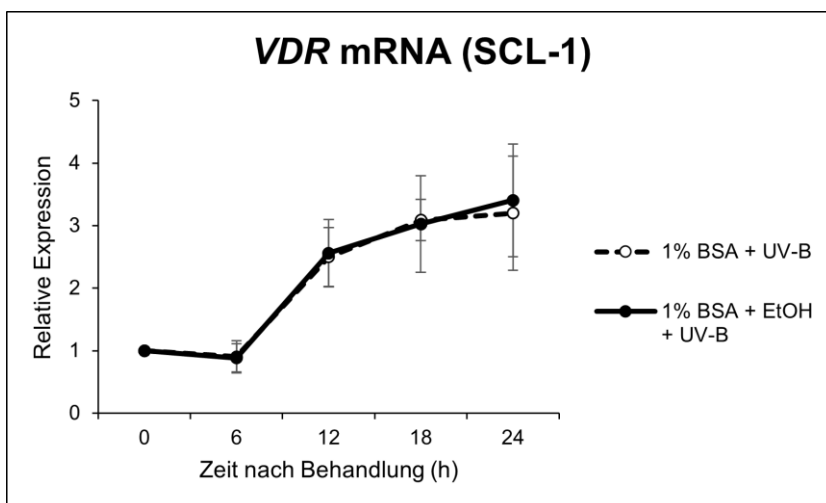


Abb. 4.23: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Die CYP24A1-mRNA-Expression zeigte Ähnlichkeiten beim Zeitverlauf in 1% BSA- und 1% BSA+EtOH-behandelten Zellen (Abb. 4.24). So zeigte sich anfangs ein Abfall (1% BSA: 6h: auf 98%, $p = 0,84$, 12h: auf 83%, $p = 0,15$) bzw. Anstieg (1% BSA+EtOH: 6h: 1,54-fach, $p \leq 0,05$), im Verlauf ein Anstieg (1% BSA: 18h: 1,54-fach, $p \leq 0,05$, 24h: 1,59-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH: 12h: 1,43-fach, $p = 0,19$, 18h: 1,82-fach, $p \leq 0,05$) und teilweise wieder ein Abfall (1% BSA+EtOH: 24h: 1,62-fach, $p \leq 0,005$) der Expression. Auch nach Bestrahlung der Zellen gab es Similaritäten zwischen den unterschiedlich behandelten Zellen (Abb. 4.25). So folgte auf den Abfall am Anfang (1% BSA+UV-B: auf 68%, $p \leq 0,0005$; 1% BSA+EtOH+UV-B: auf 78%, $p \leq 0,005$) ein Anstieg (1% BSA+UV-B: 12h: 1,04-fach, $p = 0,85$, 18h: 2,03-fach, $p \leq 0,05$; 1% BSA+EtOH+UV-B: 12h: 1,06-fach, $p = 0,61$, 18h: 2,28-fach, $p \leq 0,005$) und dann wieder ein Abfall (1% BSA+EtOH+UV-B: 24h: 2,07-fach, $p \leq 0,0005$) bzw. Anstieg (1% BSA+UV-B: 24h: 2,24-fach, $p = 0,02$) der Expression. Es gab keine Hinweise auf ungewollte Effekte durch EtOH.

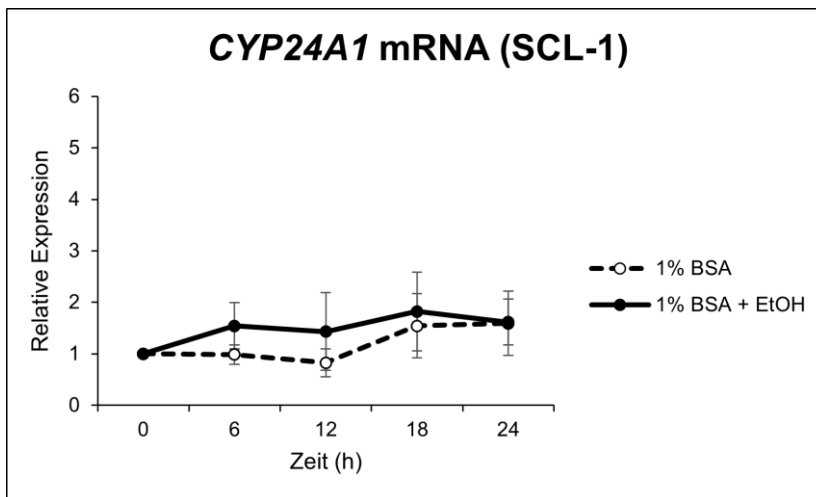


Abb. 4.24: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA und 1% BSA+EtOH behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

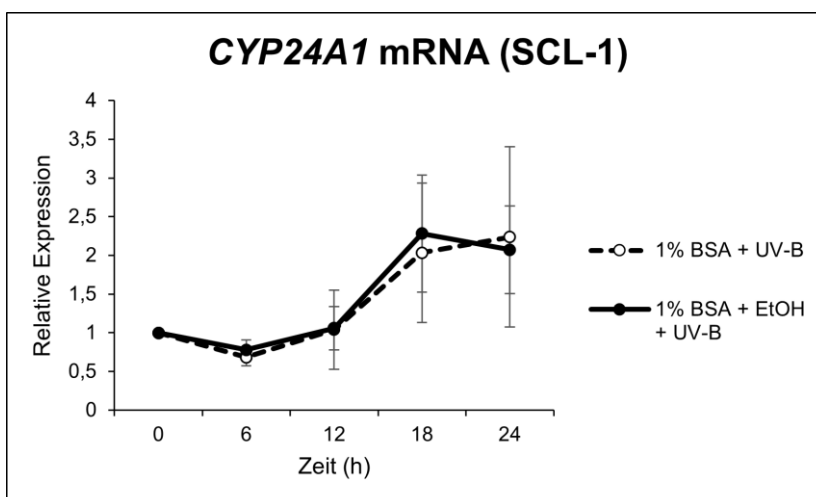


Abb. 4.25: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit 1% BSA+UV-B und 1% BSA+EtOH+UV-B behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode dargestellt. Die 1% BSA+UV-B-behandelten Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

4.2.3 Fazit: EtOH hat keine zusätzlichen Effekte in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Basierend auf den oben präsentierten Ergebnissen kann man als Fazit ziehen, dass in HaCaT- und SCL-1-Keratinocyten im Großen und Ganzen die Genexpressionstendenz zwischen den Zellen, die mit 1% BSA behandelt worden sind, und solcher, die mit 1% BSA+EtOH behandelt worden sind, sehr ähnlich war. Dieses Ergebnis bestätigte sich in Anwesenheit sowie Abwesenheit von UV-B-Strahlung. Dadurch konnten jegliche EtOH-assoziierte Störfaktoren mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Anzumerken ist, dass zwischen den zwei Behandlungsgruppen bezüglich der genauen Genexpressionwerten Schwankungen von geringem Ausmaß jedoch noch bestehen bleiben können. Da solche Schwankungen im Rahmen unserer Arbeit selten anzutreffen waren, erwiesen sie sich als vernachlässigbar.

4.3 Der Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Der Effekt von 1,25(OH)₂D₃, UV-B-Strahlung und spezifischer Rezeptor-Inhibitoren (AhR-Inhibitor: CH223191, VDR-Inhibitor: 25(OH)D₃) wurde auf die Genexpression von Elementen des AhR- und VDR-Signalweges untersucht. Ziel war es, Kreuzreaktionen zwischen den Signalwegen in Keratinocyten unterschiedlichen Krebsstadien festzustellen.

4.3.1 Der Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in HaCaT-Zellen

4.3.1.1 UV-B-Strahlung induziert die Expression von AhR und CYP1A1 in HaCaT-Zellen stärker als 1,25(OH)₂D₃

In HaCaT-Zellen führte UV-B-Bestrahlung zu einer Hochregulierung der AhR-mRNA (2,16-facher Anstieg, $p = 0,16$). Im Gegensatz dazu wurde nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung eine geringere AhR-Expression beobachtet (Abnahme um 17%, $p = 0,2$). Die kombinierte Behandlung zeigte keine regulatorische Wirkung (Abfall um 1%, $p = 0,97$) (Abb. 4.26). UV-B-Strahlung induzierte außerdem die CYP1A1-Expression (7,71-fach, $p = 0,18$), die im Vergleich zu 1,25(OH)₂D₃ (2,78-facher Anstieg, $p = 0,28$) deutlich stärker erhöht wurde. Die kombinierte Behandlung erhöhte die CYP1A1-mRNA stärker (3,71-facher Anstieg, $p \leq 0,05$) als die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ allein (Abb. 4.27).

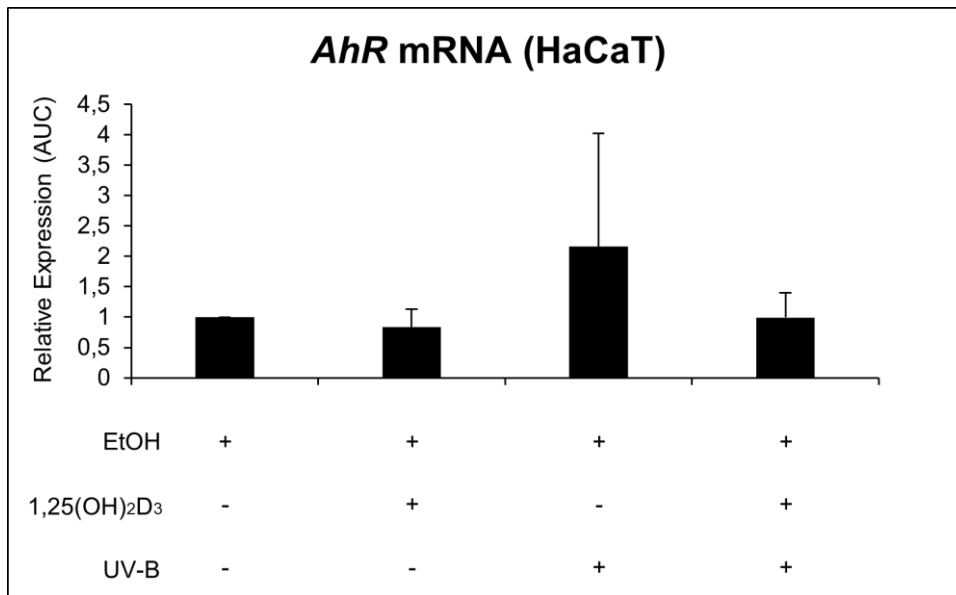


Abb. 4.26: AhR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β-Actin gemessen und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,005, *** = p ≤ 0,0005)

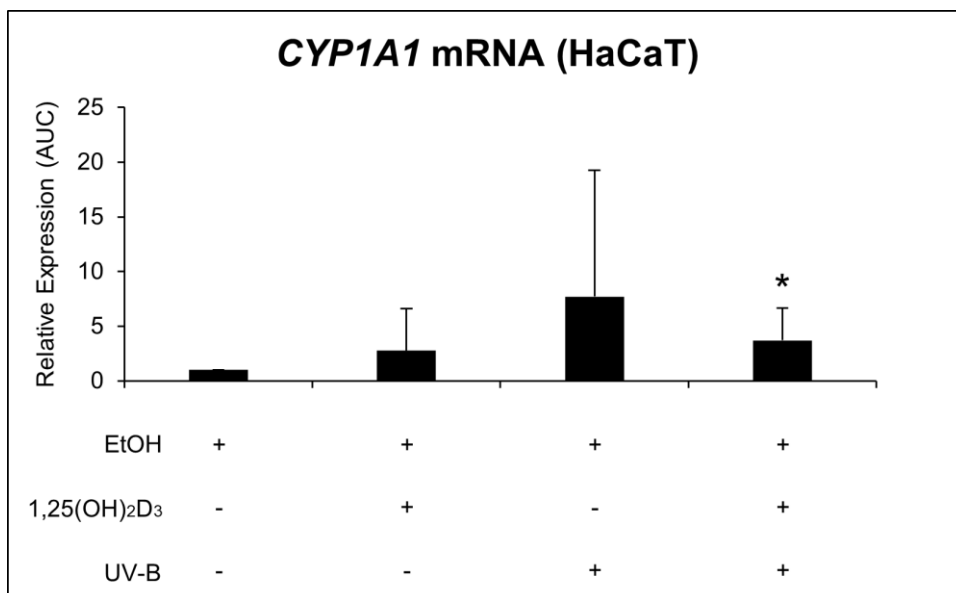


Abb. 4.27: CYP1A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β-Actin gemessen und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,005, *** = p ≤ 0,0005)

4.3.1.2 Die 1,25(OH)₂D₃-vermittelte Induktion der CYP1A1-mRNA-Expression hängt in HaCaT-Zellen vom AhR ab

Die Behandlung mit dem AhR-Antagonisten CH223191, allein oder in Kombination mit jeder weiterer Versuchsbedingung, unterdrückte die Expression der CYP1A1-mRNA sehr stark (CH223191: 6h: auf 6%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 5%, $p \leq 0,0005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃: 6h: auf 16%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 15%, $p \leq 0,0005$; CH223191+UV-B: 6h: auf 6%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 4%, $p \leq 0,0005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃+UV-B: 6h: auf 16%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 19%, $p \leq 0,0005$; CH223191+25(OH)D₃: 6h: auf 5%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 6%, $p \leq 0,0005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 6h: auf 8%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 11%, $p \leq 0,0005$; CH223191+UV-B+25(OH)D₃: 6h: auf 6%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 5%, $p \leq 0,0005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃+UV-B+25(OH)D₃: 6h: auf 9%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 12%, $p \leq 0,0005$). In 25(OH)D₃-behandelten Zellen war die CYP1A1-Expression ebenfalls reduziert (nach 6 h: auf 44% $p \leq 0,0005$; nach 24 h: auf 81%, $p = 0,08$). Die kombinierte Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ führte jedoch zu einer stärkeren Induktion der CYP1A1-mRNA als die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ allein (1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 6h: 2,63-fach, $p \leq 0,005$, 24h: 1,23-fach, $p = 0,77$) (Abb. 4.28).

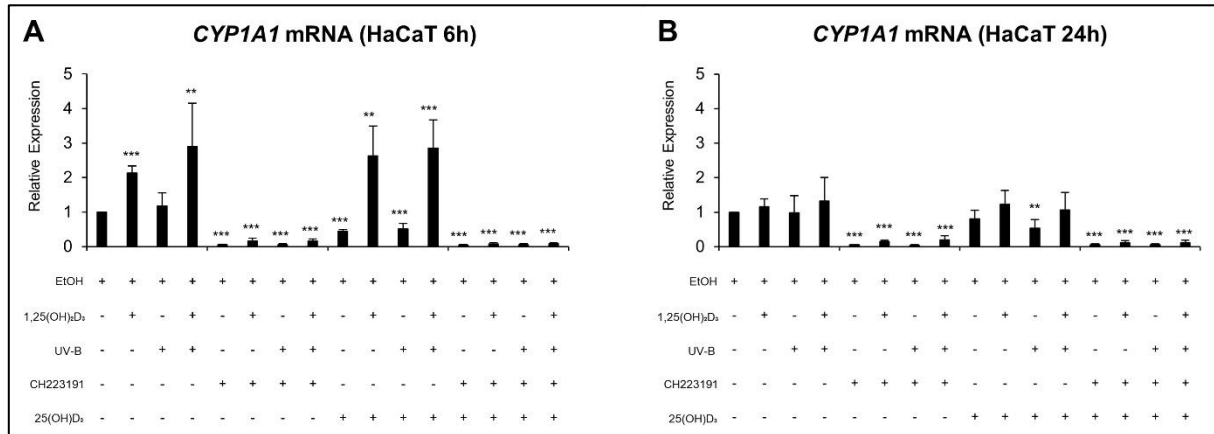


Abb. 4.28: CYP1A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10⁻⁷ M) und dem VDR-Inhibitor 25(OH)D₃ (10⁻⁷ M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.1.3 Die COX-2-Expression in HaCaT-Zellen wird nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ stärker induziert als nach Bestrahlung mit UV-B

Die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ erhöhte die COX-2-mRNA-Expression (16,2-fach, $p \leq 0,05$) stärker als die Bestrahlung mit UV-B (5,4-facher Anstieg, $p \leq 0,05$) (Abb. 4.29). Die Hochregulierung der Expression nach der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ (nach 6 h: 4,2-facher Anstieg, $p < 0,0005$, nach 24 h: 2,4-facher Anstieg, $p < 0,0005$) war noch stärker als nach der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ allein (nach 6 h: 2,8-facher Anstieg, $p < 0,0005$; nach 24 h: 2,3-facher Anstieg, $p < 0,005$). Die Behandlung mit den Rezeptor-Antagonisten verminderte die COX-2-Expression (CH223191: 6h: auf 63%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 85%, $p \leq 0,05$; 25(OH)D₃: 6h: auf 61%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 87%, $p \leq 0,05$; CH223191+25(OH)D₃: 6h: auf 48%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 81%, $p \leq 0,005$) (Abb. 4. 30). Die kombinierte Behandlung mit UV-B und 1,25(OH)₂D₃ hatte einen synergistischen Effekt und erhöhte demnach die Genexpression am stärksten (38,3-facher Anstieg, $p < 0,05$) (Abb. 4.29).

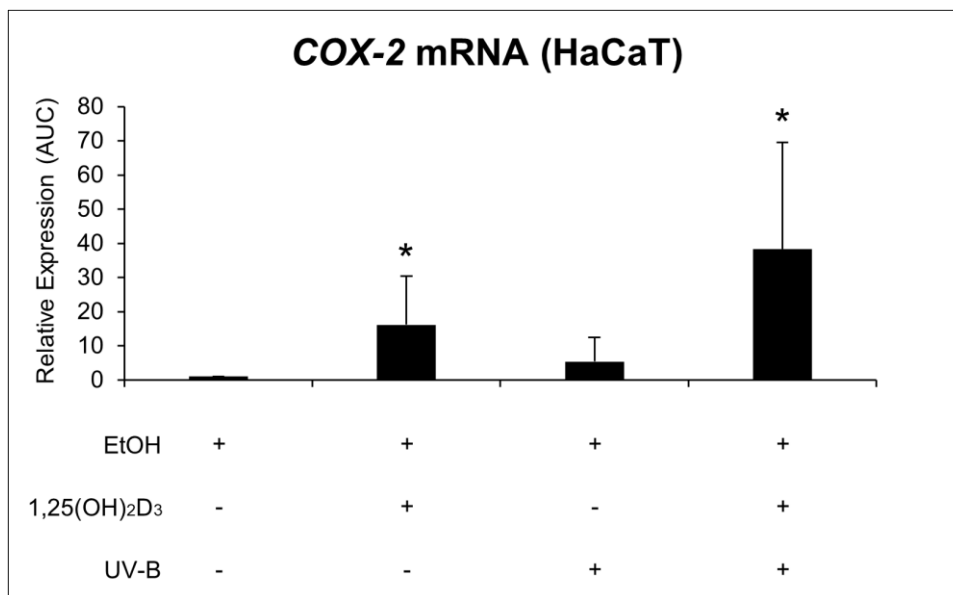


Abb. 4.29: COX-2-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

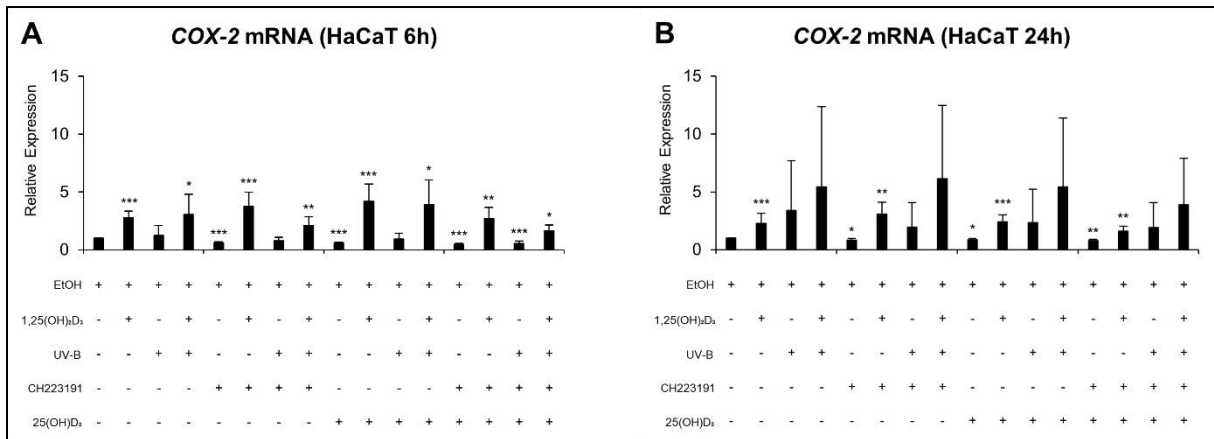


Abb. 4.30: COX-2-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10^{-7} M) und dem VDR-Inhibitor $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^{-7} M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.1.4 Die VDR-Expression bleibt nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und/oder UV-B in HaCaT-Zellen unverändert

Die Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und/oder UV-B hatte nur marginale Effekte auf die VDR-Expression in HaCaT-Zellen (Daten im Anhang, Kapitel 10) (Abb. 4.31). Es gab es keinen Hinweis auf eine synergistischen oder additiven Effekt.

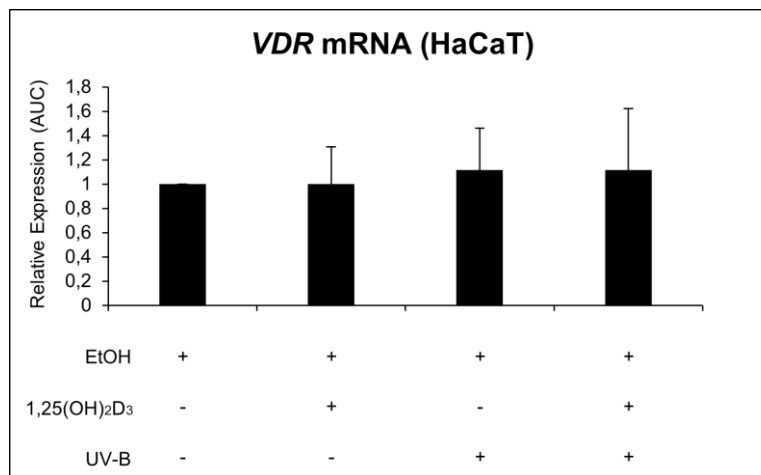


Abb. 4.31: VDR-Expression nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), UV-B-Strahlung (50 J/cm^2) oder der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm^2) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. Die relative Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.1.5 Die Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃, aber nicht mit UV-B, induziert die CYP24A1-mRNA in HaCaT-Zellen

Die CYP24A1-mRNA-Expression war nach der Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ sehr stark erhöht (6.233.471-fach, $p \leq 0,05$), nicht aber nach der Behandlung mit UV-B (Abnahme um 15%, $p = 0,1$) (Abb. 4.32). Die kombinierte Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ induzierte die CYP24A1-mRNA stärker (nach 6h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 1317,81-fach, $p \leq 0,005$; 1,25(OH)₂D₃: 713,43-fach, $p \leq 0,05$) bzw. schwächer (nach 24 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 723,77-fach, $p \leq 0,05$; 1,25(OH)₂D₃: 739,54-fach, $p \leq 0,05$) als 1,25(OH)₂D₃ allein (Abb. 4.33). Die kombinierte Behandlung mit UV-B verstärkte nicht den 1,25(OH)₂D₃-induzierten Anstieg der CYP24A1-mRNA nach 24h (1,25(OH)₂D₃: 6.233.471-facher Anstieg, $p < 0,05$, 1,25(OH)₂D₃+UV-B: 5.127.778,3-facher Anstieg, $p < 0,005$) (Abb. 4.32). Somit gab es keinen Hinweis auf eine synergistische Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ und UV-B.

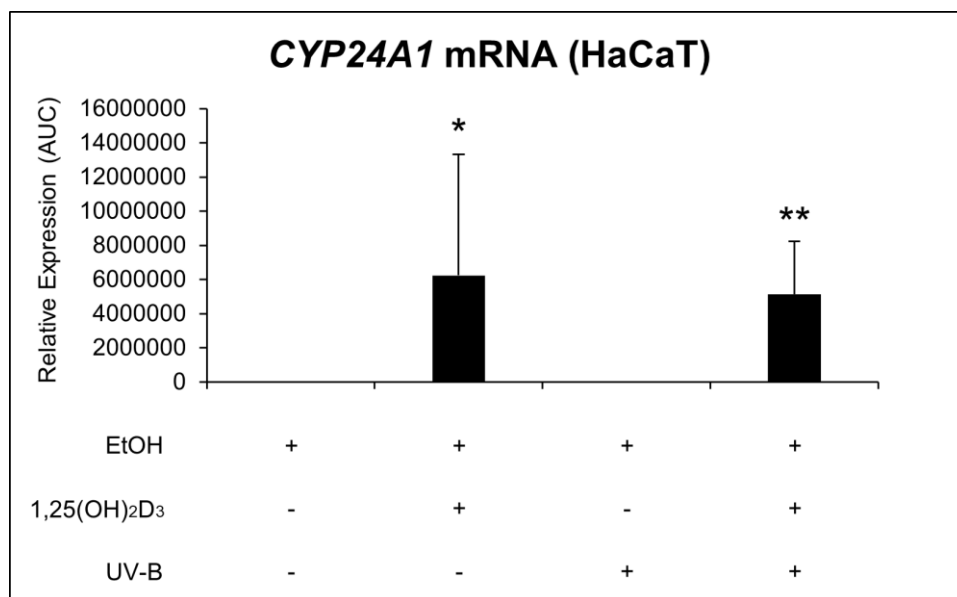


Abb. 4.32: CYP24A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

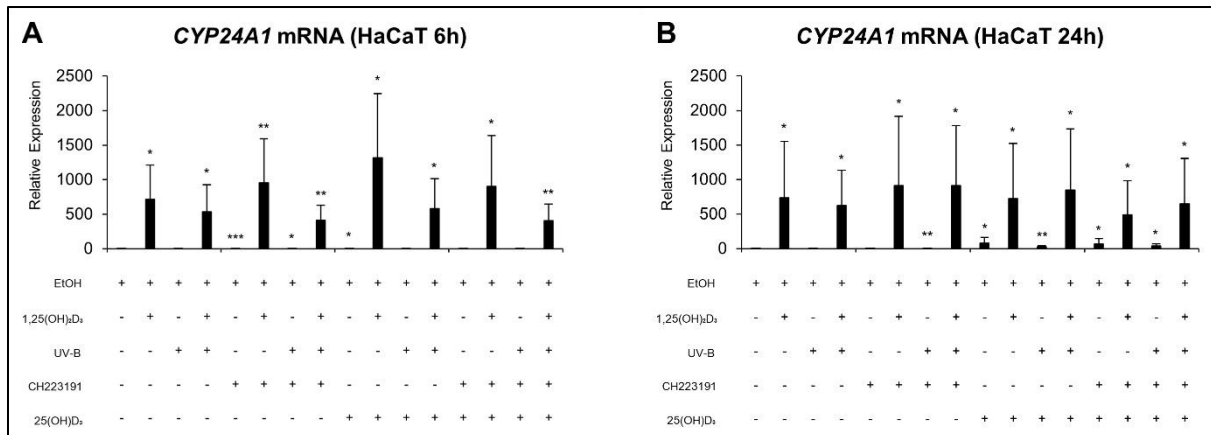


Abb. 4.33: CYP24A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10^{-7} M) und dem VDR-Inhibitor $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^{-7} M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.2 Der Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B-Strahlung auf AhR- und VDR-Signalwege in SCL-1-Zellen

4.3.2.1 In SCL-1-Zellen wird die AhR-Expression durch UV-B und die CYP1A1-Expression durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stärker induziert

Die AhR-Expression wurde nach Bestrahlung mit UV-B in SCL-1-Zellen hochreguliert (1,59-facher Anstieg, $p = 0,12$). Im Gegensatz dazu wurde sie nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung herunterreguliert (Abfall auf 74%, $p = 0,3$). Die kombinierte Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B zeigte keinen regulatorischen Effekt auf die Expression (Abfall auf 91%, $p = 0,7$) (Abb. 4.34). Die Expression der CYP1A1-mRNA wurde durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dagegen deutlich höher (6,9-fache Erhöhung, $p \leq 0,005$) als durch UV-B (2,43-facher Anstieg, $p \leq 0,05$) induziert. Die kombinierte Behandlung zeigte einen synergistischen Effekt auf die CYP1A1-Expression und erhöhte sie am stärksten (9,77-facher Anstieg, $p \leq 0,005$) (Abb. 4.35).

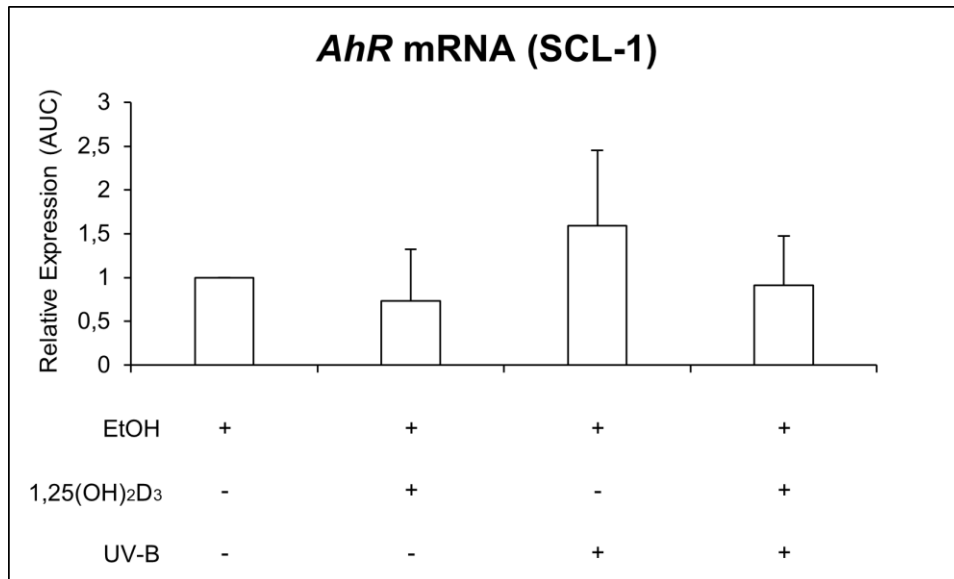


Abb. 4.34: AhR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β-Actin gemessen und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,005, *** = p ≤ 0,0005)

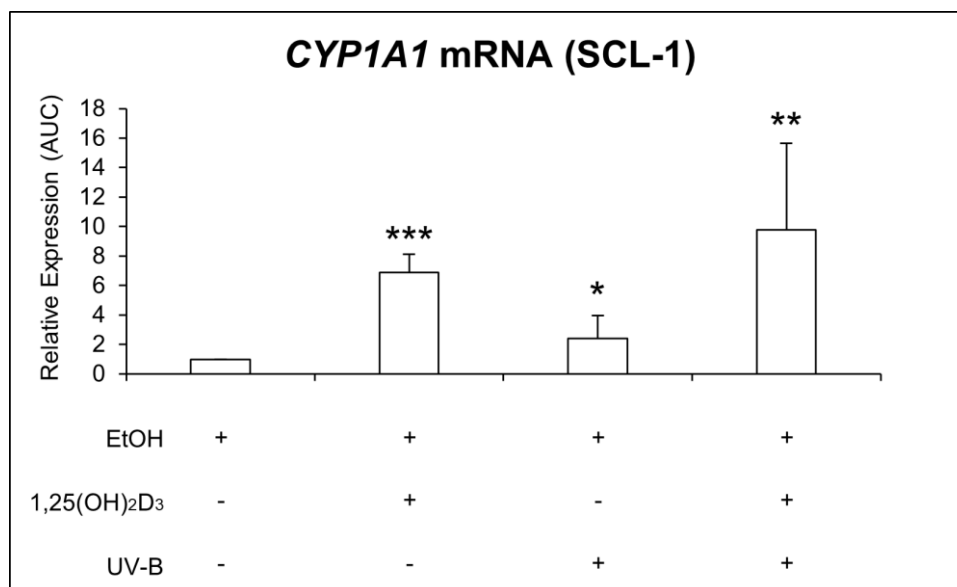


Abb. 4.35: CYP1A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β-Actin gemessen und mit der 2^{-ΔΔCt} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte ± SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,005, *** = p ≤ 0,0005)

4.3.2.2 Die Induktion der CYP1A1-Expression durch 1,25(OH)₂D₃ ist in SCL-1-Zellen AhR-abhängig

Nach Behandlung mit CH223191, allein oder in Kombination mit jeder anderer Behandlung, wurde die Expression der CYP1A1-mRNA unterdrückt (CH223191: 6h: auf 18%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 12%, $p \leq 0,0005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃: 6h: auf 38%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 26%, $p \leq 0,0005$; CH223191+UV-B: 6h: auf 22%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 33%, $p \leq 0,005$; CH223191+1,25(OH)₂D₃+UV-B: 6h: auf 44%, $p \leq 0,05$, 24h: auf 65%, $p = 0,25$; CH223191+25(OH)D₃: 6h: auf 17%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 11%, $p \leq 0,0005$; CH223191+25(OH)D₃+1,25(OH)₂D₃: 6h: auf 34%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 14%, $p \leq 0,0005$; CH223191+25(OH)D₃+UV-B: 6h: auf 23%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 31%, $p \leq 0,005$; CH223191+25(OH)D₃+1,25(OH)₂D₃+UV-B: 6h: auf 30%, $p \leq 0,0005$, 24h: auf 48%, $p \leq 0,05$). Die Expression war in 25(OH)D₃-behandelten Zellen ebenfalls vermindert (nach 6 h: 65% Rückgang, $p < 0,0005$; nach 24 h: 36% Abnahme, $p < 0,05$). Die Kombination aus 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ induzierte die CYP1A1-mRNA stärker als 1,25(OH)₂D₃ allein (6 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 2,5-facher Anstieg, $p < 0,0005$; 1,25(OH)₂D₃: 2,4-facher Anstieg, $p < 0,0005$) (Ausnahme: nach 24 h) (Abb. 4.36).

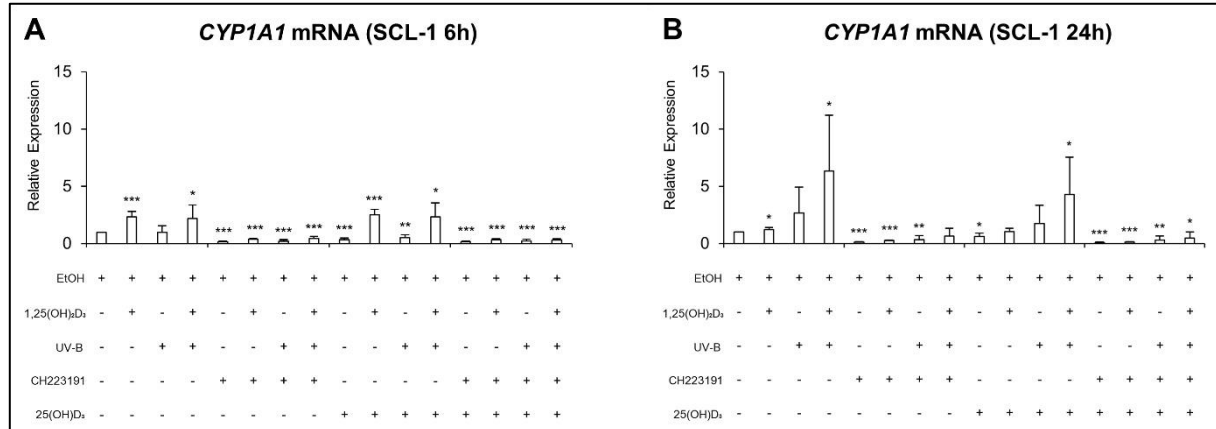


Abb. 4.36: CYP1A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10⁻⁷ M) und dem VDR-Inhibitor 25(OH)D₃ (10⁻⁷ M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.2.3 Die COX-2-Expression in SCL-1-Zellen wird nach Bestrahlung mit UV-B stärker induziert als nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃

Die UV-B-Behandlung erhöhte die COX-2-Genexpression stärker (3,92-facher Anstieg, $p \leq 0,05$) als die 1,25(OH)₂D₃-Behandlung (1,83-facher Anstieg, $p \leq 0,05$) (Abb. 4.37). Nach gleichzeitiger Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ wurde die Expression noch stärker hochreguliert als nach alleiniger Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ (nach 6 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 1,36-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$, 1,25(OH)₂D₃: 1,06-facher Anstieg, $p = 0,51$; nach 24 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 2,07-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$, 1,25(OH)₂D₃: 1,39-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$). Nach alleiniger Behandlung mit den Rezeptor-Antagonisten zeigte sich eine verminderte COX-2-Expression (CH223191: 6h: 49%, $p \leq 0,0005$, 24h: 37%, $p \leq 0,0005$; EtOH+25(OH)D₃: 6h: 65%, $p \leq 0,0005$, 24h: 77%, $p = 0,75$; CH223191+25(OH)D₃: 6h: 40%, $p \leq 0,0005$, 24h: 33%, $p \leq 0,0005$) (Abb. 4.38). Es gab keine Hinweise eines synergistischen Effekts durch die kombinierte Behandlung mit UV-B und 1,25(OH)₂D₃ (4,18-fache Erhöhung, $p \leq 0,05$) (Abb. 4.37).

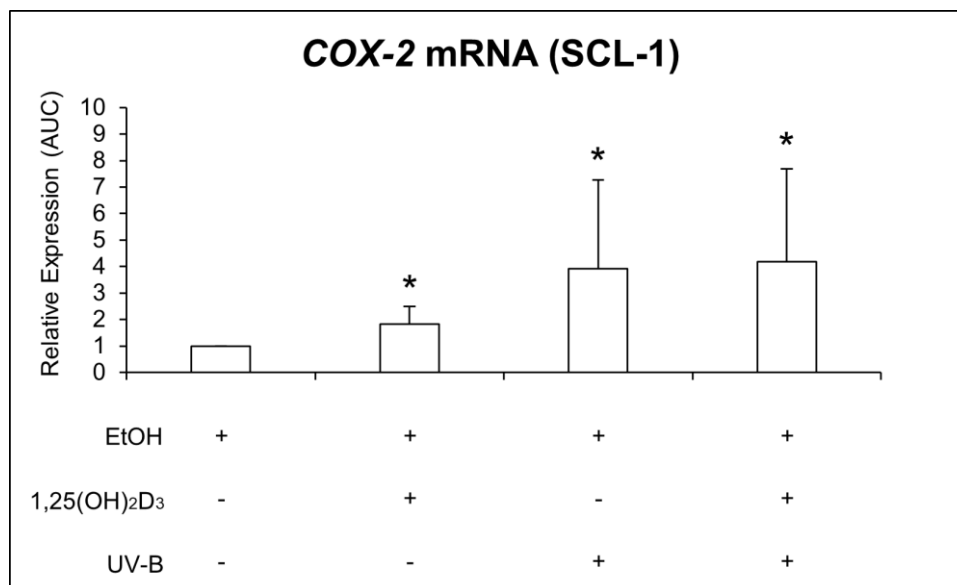


Abb. 4.37: COX-2-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

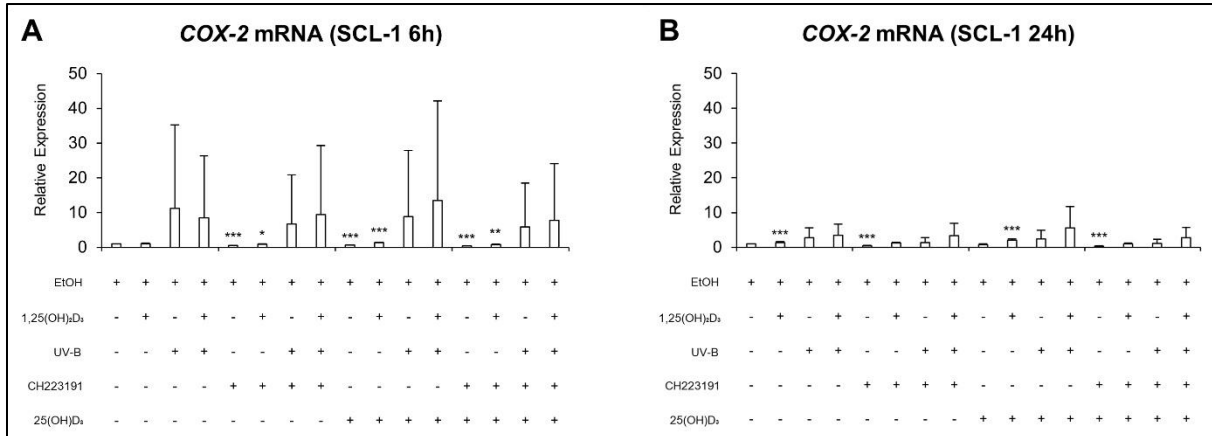


Abb. 4.38: COX-2-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10^{-7} M) und dem VDR-Inhibitor $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^{-7} M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.2.4 Die VDR-Expression in SCL-1-Zellen wird nach UV-B-Bestrahlung verstärkt und nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung vermindert

Die VDR-Expression wurde durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermindert (auf 62%, $p \leq 0,005$) und durch UV-B-Strahlung erhöht (1,36-fach, $p = 0,11$). Die kombinierte Behandlung zeigte keinen regulatorischen Effekt auf die Expression (Daten im Anhang, Kapitel 10) (Abb. 4.39).

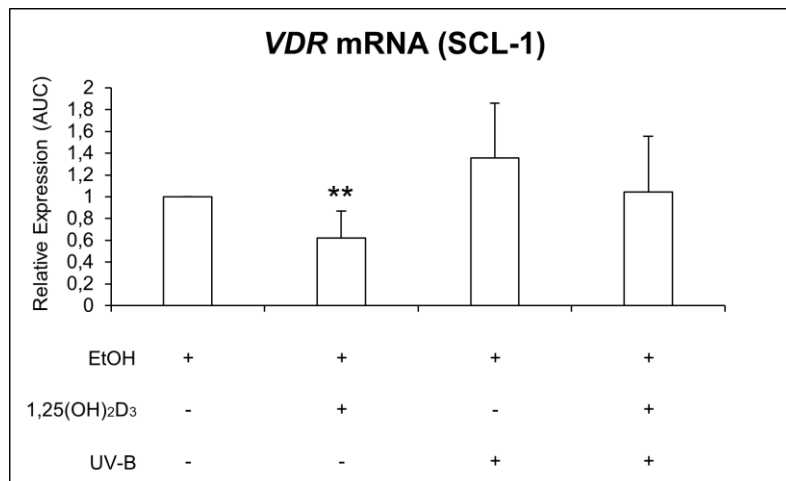


Abb. 4.39: VDR-Expression nach Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), UV-B-Strahlung (50 J/cm^2) oder der Kombination $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm^2) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. Die relative Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.2.5 Die CYP24A1-Expression in SCL-1-Zellen wird durch Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃, aber nicht mit UV-B, induziert

Die CYP24A1-mRNA-Expression war nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ sehr stark erhöht (44.703,49-fach, $p \leq 0,0005$). Die Bestrahlung mit UV-B zeigte keinen Effekt (Daten im Anhang, Kapitel 10) (Abb. 4.40). Die gleichzeitige Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und 25(OH)D₃ induzierte die Genexpression stärker als 1,25(OH)₂D₃ allein (nach 6 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 133,11-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$, 1,25(OH)₂D₃: 82,72-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$; nach 24 h: 1,25(OH)₂D₃+25(OH)D₃: 123,52-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$, 1,25(OH)₂D₃: 94,91-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$) (Abb. 4.41). Da UV-B den 1,25(OH)₂D₃-induzierten Anstieg der CYP24A1-mRNA verstärkte (1,25(OH)₂D₃: 44.703,5-facher Anstieg, $p < 0,0005$, 1,25(OH)₂D₃+UV-B: 119.233,42-facher Anstieg, $p \leq 0,0005$) lag einen Hinweis auf einen synergistischer Effekt von 1,25(OH)₂D₃ und UV-B vor (Abb. 4.40).

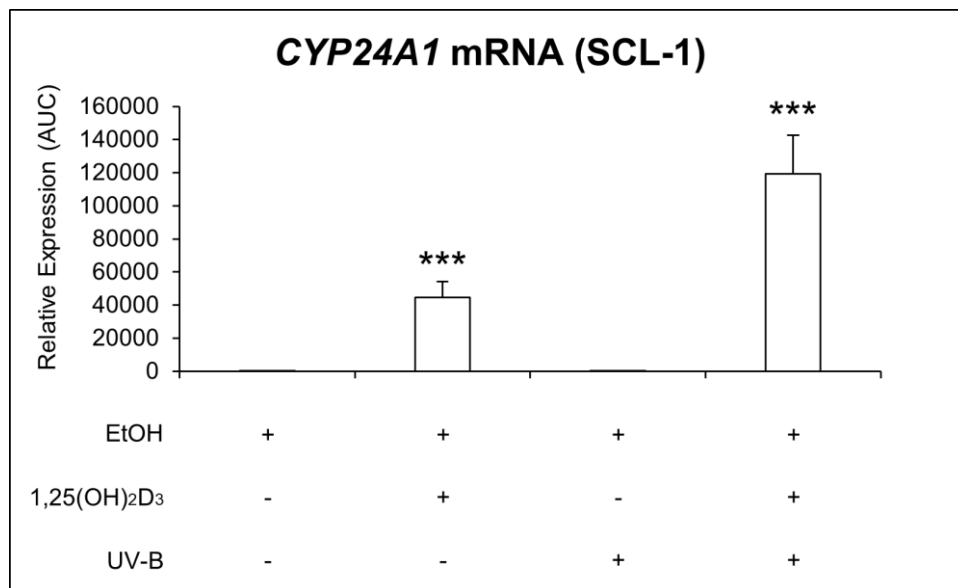


Abb. 4.40: CYP24A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10⁻⁴ M), 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M), UV-B-Strahlung (50 J/cm²) oder der Kombination 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) und UV-B-Strahlung (50 J/cm²) behandelt und in 6h-Intervallen über 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Methode dargestellt. Die relativen Expressionen wurde als AUC im Verhältnis zur AUC von EtOH berechnet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

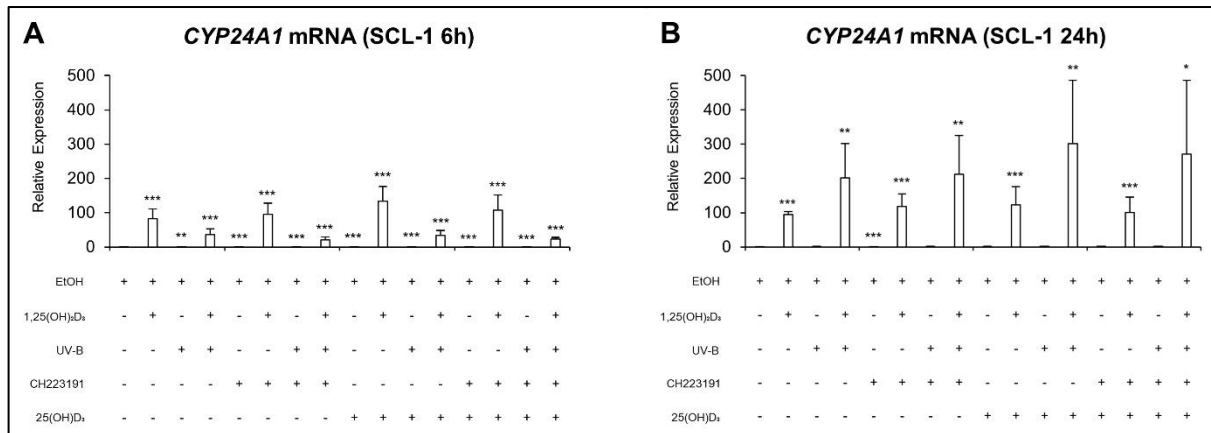


Abb. 4.41: CYP24A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR). Die Zellen wurden mit EtOH (10^{-4} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M), dem AhR-Antagonisten CH223191 (10^{-7} M) und dem VDR-Inhibitor $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10^{-7} M) behandelt und nach 24h geerntet. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RTqPCR relativ zum Mittelwert von GAPDH und β -Actin gemessen und mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode dargestellt. EtOH wurde als Kontrolle verwendet. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SD von doppelten Versuchen dar. Die Experimente wurden dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt. Alle p-Werte sind relativ zu EtOH. (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,0005$)

4.3.2.6 Fazit: Cross-talk zwischen Signalwegen des AhR und des VDR in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Die Expression von Kernelementen des AhR- und VDR-Signalweges wurde in Zellen unterschiedlicher Hautkrebsstadien durch die Behandlung mit UV-B und/oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ differentiell reguliert. UV-B stimulierte in HaCaT-Keratinocyten die Expression klassischer AhR-Komponenten (AhR und CYP1A1) stärker und nicht-klassischer (COX-2) schwächer als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. In SCL-1-Zellen dagegen induzierte UV-B die Expression von AhR und COX-2 stärker und die von CYP1A1 schwächer als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. In beiden Zellarten war die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierte CYP1A1-Expression AhR-abhängig. Außerdem wirkte UV-B additiv auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierte CYP1A1-Expression in SCL-1-Zellen und synergistisch auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -bedingte COX-2-Stimulation in HaCaT-Keratinocyten. Auch in der Regulation von Elementen des klassischen VDR-Signalweges zeigten sich Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Zelllinien. Der Rezeptor (VDR) wurde entweder gar nicht (HaCaT) oder mäßig (SCL-1) reguliert. Das Zielgen (CYP24A1) dagegen wurde in beiden Zellarten ausschließlich durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert. Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte CYP24A1-Stimulation wurde sogar in SCL-1-Zellen durch UV-B verstärkt.

Neben der Interaktion der untersuchten Signalwege bei der Krebsentstehung der Haut wird somit in unseren Ergebnissen darauf hingewiesen, dass UV-B zusätzliche Effekte im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hat und seine Wirkungen nicht durch das Vitamin D₃ Derivat kompensiert werden können.

5 Diskussion

In den letzten Jahren hat eine steigende Studienzahl überzeugend gezeigt, dass Vitamin D₃ eine essenzielle Rolle für die Entstehung und das Fortschreiten von malignen Erkrankungen spielt [140,168,218]. Schon länger ist bekannt, dass die Vitamin D₃ Signalkaskade mit verschiedenen, potenziell karzinogenen Kernrezeptorkaskaden interagiert [93,296,408]. Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse auf dem Vitamin D₃ Forschungsgebiet berichten von einer Identifizierung des AhR und anderer Rezeptoren (z.B. ROR, RXR und LXR) als alternative Zielrezeptoren für nicht-klassische Vitamin D₃ Metabolite [530,532,533]. Es kann spekuliert werden, dass in den kommenden Jahren diese neuen Forschungsergebnisse einen großen Einfluss auf die Krebsprävention und -therapie haben werden. Im Rahmen unserer Studie galt es festzustellen, welche Funktion das endokrine Vitamin D₃ System im mehrstufigen, durch typische frühe (z.B. initiierte oder präkanzeröse Zellen wie AK-Keratinocyten) und späte (z.B. vollständig maligne Zellen wie SCC-Zellen) Stadien charakterisierten Prozess der Photokarzinogenese der Haut hat [77,232,310,323,445,476,544,659,734]. Wir untersuchten in-vitro die molekulare Interaktion von zwei strukturell und funktionell ähnlichen nukleären Rezeptorkaskaden von Vitamin D₃, die entweder durch die Bindung des klassischen biologisch aktiven Vitamin D₃ Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ an den VDR („VDR-Signalkaskade“) oder durch die Bindung nicht-klassischer Vitamin D₃ Derivate und photoreaktiver UV-B-Metabolite an den AhR („AhR-Signalkaskade“) aktiviert werden.

5.1 Die Signalwege des AhR und VDR in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen

Durch die RTqPCR-Analyse der mRNA-Expression von AhR, CYP1A1, COX2 („AhR-Signalweg“) und von VDR und CYP24A1 („VDR-Signalweg“) konnten wir belegen, dass die Expression elementarer Schlüsselgene des VDR- oder AhR-Signalweges in verschiedenen Karzinogenesestufen von NMSC unterschiedlich exprimiert und reguliert wird. So war die AhR- und CYP1A1-Expression in unbehandelten, präkanzerösen HaCaT-Zellen viel stärker als in unbehandelten, malignen SCL-1-Zellen. Im Gegensatz dazu war die VDR-, CYP24A1- und COX-2-Expression in unbehandelten SCL-1-Zellen höher im Vergleich zu den HaCaT-Zellen. In künftigen Studien muss genauer ermittelt werden, inwieweit die stadienabhängige Expressionsunterschiede von Schlüsselkomponenten dieser nukleärer Signalkaskaden für die Hautkrebs-Karzinogenese relevant sind. Es kann gemutmaßt werden, dass der unterschiedliche Status des Tumorsuppressorproteins p53 in beiden Keratinocytenzelllinien

zu funktionellen Modifikationen beiträgt. So wurde in bisherigen Studien nicht nur festgestellt, dass in HaCaT eine Mutation (p53mut) und in SCL-1 eine komplette Abwesenheit des p53-Proteins (p53null) vorliegt, sondern auch dass die AhR- und VDR-Signalkaskade einem gewebeabhängigen, p53-vermittelten Regulationsmechanismus unterliegen [310,324,352,426,528,544,631]. Außerdem wurde in mehreren Hautzelllinien eine Vielzahl veränderter oder defekter molekularer Signalkaskaden entdeckt, worunter manche charakteristische Karzinogenesemuster auslösen können [83,271,445]. So wurde in HaCaT-Zellen von einer Insuffizienz des krebserregenden, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induzierten MEK/ERK-Signalweges und von konstitutiv aberranten Veränderungen in der NF- κ B-Signalgebung berichtet [320,481,735]. In SCC-Zellen konnten neben dem ebenfalls defekten NF- κ B-Signalweg mehrere veränderte Signalwege identifiziert werden, darunter der NOTCH-, TGF- β -, WNT-, PI3K-AKT- und Neurotrophin-Signalweg [232,588]. Eine weitere Überlegung würde daher die Existenz einer funktionellen Deregulation der AhR- und VDR-Signalkaskade in SCL-1- und HaCaT-Zellen betreffen, die anhand der niedrigen AhR- und CYP1A1-Basalwerte in SCL-1- und VDR-, CYP24A1- und COX2-Werte in HaCaT-Zellen in unseren Ergebnissen bekräftigt wird.

5.2 Die Wirkung von UV-B und 1,25(OH)₂D₃ auf Mitglieder der kanonischen AhR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Um die Interaktion zwischen der AhR- und VDR-Signalübertragung näher zu untersuchen, behandelten wir beide Keratinozytenarten mit AhR-Liganden-generierender UV-B-Strahlung und/oder dem klassischen VDR-Liganden 1,25(OH)₂D₃, seinem Vorläufer und partialen Antagonisten 25(OH)D₃ und einem effektiven AhR-Antagonisten, CH223191 [24,365,651]. Wichtig ist anzumerken, dass es uns nicht gelungen ist, die kürzlich als AhR-Liganden identifizierten, nicht-klassischen Vitamin D₃ Hydroxyderivate 20(OH)D₃, 1,20(OH)₂D₃, 20,23(OH)₂D₃ und 17,20,23(OH)₂D₃ im Rahmen dieser Forschungsarbeit zu erhalten und anzuwenden. Es wurde außerdem untersucht, ob die UV-B-Auswirkungen auf die Expression der nukleären und zytoplasmatischen AhR-Zielgene über die UV-B-angeregte kutane Vitamin D₃ Synthese von Metaboliten wie 1,25(OH)₂D₃ oder 25(OH)D₃ vermittelt wird. Ein derartiger Befund könnte darauf hinweisen, dass die externe Vitamin D₃ Supplementierung (in Form von Tabletten oder Tropfen) die Auswirkungen der solaren UV-B-Strahlung auf die AhR- und VDR-Signalkaskade kompensieren könnte. Bislang gibt es wenige Studien, die die Auswirkungen von 1,25(OH)₂D₃ auf die Expression des AhR und seiner Zielgene untersucht haben. Dabei wurden verschiedene Organsysteme analysiert, darunter humane epidermale und orale Keratinozytenlinien als auch Makrophagen, Monozyten und Zellen aus Brustkrebs- und

Nierenepithelgewebe [356,357,556]. Bis jetzt gab es jedoch keine Berichte zu Untersuchungen in kutanen Plattenepithelkarzinom (SCC)-Zellen [321,533]. In dieser Arbeit belegen wir, dass die vollkommen karzinogene UV-B-Strahlung und das tumorsuppressive $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression von essenziellen Kernelementen des VDR- und AhR-Signalweges haben. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen, die keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulassen, kann die Annahme, dass die beobachteten UV-B-Auswirkungen auf den AhR-Signalweg über die UV-B-induzierte kutane $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion vermittelt werden, nicht unterstützt werden.

Aus unseren mRNA-Analysen geht hervor, dass UV-B-Strahlung die Expression von Genen, die für wichtige Proteine der AhR-Signalgebung kodieren, in Keratinozyten mit phänotypischen Merkmalen früher (HaCaT) und später (SCL-1) Stadien der Hautkarzinogenese unterschiedlich reguliert. Die genetische Transkription von CYP1A1 wurde in HaCaT- und SCL-1-Zellen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B differentiell reguliert. Die CYP1A1-mRNA-Induktion war in malignen SCL-1-Zellen nach der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stärker (6,9-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle) als nach der UV-B-Bestrahlung (2,4-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle). In präkanzerösen HaCaT-Zellen wurden entgegengesetzte Ergebnisse beobachtet, so dass die CYP1A1-mRNA-Induktion nach der Bestrahlung mit UV-B potenter (7,7-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle) als nach der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung (2,8-fache Induktion im Vergleich zur Kontrolle) war.

In der Vergangenheit wurde nachgewiesen, dass eine Vermehrung des intrazellulären Ca^{2+} und die dadurch angeregte Zelldifferenzierung zur Regulation der CYP1A1-Expression beiträgt [145,177,615]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist von immenser Bedeutung für den Ca^{2+} -Stoffwechsel, so dass die Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase als eine der ersten und wichtigsten Funktionen des aktiven Vitamin D_3 Metaboliten entdeckt worden ist [117]. Durch vielfältige Regulationsmechanismen fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom und begünstigt die Zelldifferenzierung in humanen Hautzellen, Krebszellen im Dickdarm, Stammzellen und Fibroblasten [78,142,162,516,535]. Somit kann spekuliert werden, dass die CYP1A1-mRNA-Aktivität durch die differenzierungsfördernde Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert wird.

Durch die Kombinationsbehandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B wurde die CYP1A1-mRNA-Aktivität noch weiter verstärkt. Experimentelle Berichte haben gezeigt, dass schon minimale UV-B-Strahlungsstärken im Dosisbereich von 18 mJ/cm^2 ausreichend sind, um die kutane $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese in-vivo zu stimulieren [358]. Es kann angenommen werden, dass die durch UV-B-angeregte, endogene $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion zur zusätzlichen Verstärkung der bereits vorhandenen, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierten CYP1A1-mRNA-Expression führt. Während die meisten Studien die Regulation der CYP1A1-Expression ausschließlich auf den AhR

zurückführen, berichten manche von einer AhR-unabhängigen CYP1A1-Induktion [98,340]. Eine kumulative Studie fand heraus, dass die Induktion von CYP1A1 durch Pharmazeutika und Giftstoffe in-vivo und in-vitro zwar ein höchst empfindlicher, aber nicht spezifischer Indikator für die Bindung und Aktivierung des AhR ist [225]. Durch unsere Ergebnisse kann die Aktivierung und Beteiligung anderer Kernrezeptoren, die ebenfalls regulative Auswirkungen auf die CYP1A1-Aktivität vermitteln können, nicht ausgeschlossen werden. So konnte der Östrogenrezeptor (ER), der in verschiedenen Krebsarten einer konzentrations-abhängigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Regulation unterliegt, als ein unabdingbarer Faktor für die AhR-Aktivierung und nachgeschaltete Hochregulierung seines klassischen Zielgens CYP1A1 nachgewiesen werden [121,416,417,573]. Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR), der wie der AhR zur nukleären Rezeptorfamilie gehört, besitzt funktionelle Voraussetzungen um den Stoffwechsel von xenobiotischen Substanzen im menschlichen Körper zu modulieren [172,266,347]. Er ist an der SCC-Karzinogenese involviert, weist strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zum AhR und VDR auf und reguliert die molekulare Aktivität der AhR-Zielgene CYP1A1 und CYP1A2 [344,432,479,548,553,561,725]. Im Jahr 2015 hat die Forschungsgruppe von Wilkens eine Verbindung des PXR zum Vitamin D_3 Signalsystem nachgewiesen, da die systemische Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die mRNA-Aktivität des PXR in tierischen Nierenzellen hochregulierte [627]. In der Leber und im extrahepatischen Gewebe wurde ein weiterer nukleärer Rezeptor, der Constitutive-Androstane-Rezeptor (CAR), als AhR-Zielgen identifiziert und durch die AhR-Aktivierung mit einem ähnlichen Zeitmuster wie die klassischen AhR-Zielgene hochreguliert [435]. Ähnlich zum PXR führte die CAR-Aktivierung zur verstärkten Induktion der CYP1A1- und CYP1A2-Expression [344]. Interessanterweise wurden für den PXR und CAR auch Wechselwirkungen mit dem VDR beschrieben, und durch konkurrierende Interaktion der drei Transkriptionsfaktoren eine Rolle in der Regulation der basalen Genexpression von Cytochromen wie CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9 vorgeschlagen [112,378,433]. Einen weiteren Hinweis auf eine unmittelbare AhR- und VDR-Korrelation liefert die Wechselwirkung des VDR-Dimerisierungspartners RXR mit dem AhR. So wurde belegt, dass die TCDD-induzierte AhR-Aktivierung die Funktion des RXR und Transkription der von ihm regulierten Gene regelrecht beeinflusst [22,336,376,407,574,623]. Auch andere CYP1A1-regulierende Kernrezeptoren wie der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) oder der Retinoid-Säure-Rezeptor (RAR) konnten molekulare Wechselwirkungen mit dem VDR-Liganden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufweisen [206,220,533,543].

In Einklang mit bereits veröffentlichten Literaturberichten, induzierte die Bestrahlung mit einer einmaligen UV-B-Dosis von 50 J/cm^2 die Expression der AhR- und CYP1A1-mRNA in HaCaT-Zellen [365]. Dadurch wird in diesen Zellen angedeutet, dass die funktionelle Integrität in der UV-B-induzierten Regulation der AhR-Signalgebung erhalten bleibt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einer Dosierung von 10^{-7} M konnte dagegen keinen bemerkbaren Effekt auf die Regulation der AhR-

Expression in HaCaT- und SCL-1-Zellen vorweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden von der Forschungsgruppe von Slominski berichtet, die mithilfe von Lumineszenz-Assays die Interaktion von Hydroxyvitamin D₃ Derivaten und dem AhR in Keratinozyten untersuchte und eine dosisabhängige, 1,25(OH)₂D₃-induzierte AhR-Stimulation entdeckte [533]. Während bei einer 1,25(OH)₂D₃-Dosis von 10⁻⁷ M keine AhR-Aktivität detektiert wurde, führten Dosierungen ab 10⁻⁶ M zu einer steigenden AhR-Expression.

Die UV-B-Bestrahlung (50 J/cm²) induzierte auch in SCL-1-Zellen die Expression der beiden Kernelemente des AhR-Signalweges, AhR und CYP1A1. Die CYP1A1-mRNA wurde nach 1,25(OH)₂D₃-Behandlung unerwartet stark hochreguliert, so dass sie 7-mal stärker als nach der Behandlung der Kontrollgruppe und 2,5-mal potenter als nach der UV-B-Bestrahlung war. Eine Wechselwirkung zwischen dem AhR und dem zentralen Inflammationsmediator NF-κB wurde bei der Inhibition der CYP1A1-Genexpression durch proinflammatorische Zytokine berichtet [256,574,736]. In menschlichen HaCaT- und Hepatom-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Unterdrückungsphase unmittelbar nach einer Bestrahlung mit physiologisch relevanten UV-B-Dosen auftritt und nachweislich durch eine erhöhte NF-κB Aktivität vermittelt wird. Während der CYP1A1-mRNA-Spiegel innerhalb der ersten 3h nach UV-B-Bestrahlung NF-κB-vermittelt unter die Kontrollwerte sinkt, kommt es nach 9h AhR-abhängig zur zweifachen Geninduktion [338]. Eine konstante Aktivierung von NF-κB ist auf exzessive chronische Entzündungen und Aktivierung onkogener Elemente zurückzuführen und kann durch Bildung einer entzündlichen Mikroumgebung das Fortschreiten von Malignomen begünstigen [233,252]. Es ist nicht verwunderlich, dass mehrere Studien eine hohe NF-κB-Aktivität in SCCs verschiedener Lokalisation festgestellt haben, darunter im Kopf-Halsbereich und im oralen Subtyp [114,159,605]. Eine plausible Erklärung könnte dafür sein, dass die konstitutiv erhöhte, inflammations-assoziierte NF-κB-Aktivität in karzinogenen SCL-1-Zellen zu einer länger anhaltenden CYP1A1-Unterdrückung als in präkarzinogenen HaCaT-Zellen führt, so dass die UV-B-induzierte, AhR-vermittelte CYP1A1-Hochregulierung erst später eintritt. Bis dato haben wenige Studien über eine Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ auf das AhR-Zielgen CYP1A1 Berichte erstattet, wobei keine davon in SCC der Haut durchgeführt worden ist [321,533]. Um den Mechanismus hinter diesem Ergebnis weiter zu analysieren, verwendeten wir den AhR-Antagonist CH223191 und untersuchten, ob die mRNA-Induktion von CYP1A1 in HaCaT- und SCL-1-Zellen AhR-abhängig ist. Die CH223191-Behandlung führte zur Unterdrückung der CYP1A1-mRNA-Expression in beiden Zelllinien unter allen Versuchsbedingungen.

5.3 Die potenzielle Rolle der kanonischen AhR-Signalwege in den Anti-Krebs-Mechanismen von 1,25(OH)₂D₃

In zahlreichen Gewebearten wurde nachgewiesen, dass der aktive Vitamin D₃ Metabolit 1,25(OH)₂D₃ über direkte (z.B. Regulierung des Zellzyklus, Induktion der Apoptose, Hemmung der Angiogenese und der Tumorinvasivität, -metastasierung und -proliferation) und indirekte (z.B. Regulierung der Immunmodulation, Wirkung auf die Mikroumgebung des Tumors) Mechanismen zur Entfaltung krebshemmender Wirkungen befähigt ist [41,528]. Das klassische AhR-Zielgen CYP1A1 wurde bis jetzt aufgrund seiner prokarzinogen-aktivierenden Eigenschaften mit dem Karzinogenese-Metabolismus in Verbindung gebracht. Manche Studien dokumentierten jedoch einen krebspräventiven Beitrag [18]. In Anbetracht unserer Ergebnisse wäre es möglich zu folgern, dass Bestandteile der AhR-Signalkaskade zumindest teilweise zur 1,25(OH)₂D₃-vermittelten Anti-Tumor-Wirkung beitragen.

1,25(OH)₂D₃ kann durch die Regulierung von verschiedenen Checkpoints den Zellzyklus direkt und effektiv modulieren [41]. Durch die Bindung von 1,25(OH)₂D₃ an die Promotorregion von p21- und p27-kodierenden Genen wird die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) gehemmt. Die dadurch erniedrigte Cyclin D1-Expression führt in der G1-Phase des Zellzyklus zum Stillstand [41,528]. Es ist bewiesen, dass es durch eine liganden-bedingte AhR-Stimulation ebenfalls zum Zellzyklusstillstand in der G1-Phase kommen kann, da durch den AhR nicht nur CYP1A1 verstärkt exprimiert wird, sondern auch p21 und p27 [197,737]. Ein weiterer 1,25(OH)₂D₃-Mechanismus, der für die Zellzyklusregulierung von Bedeutung ist, wird durch die Stimulation verschiedener molekularer Signalwege vermittelt. Es wurde dokumentiert, dass intrazelluläre Kinasewege (z.B. ERK, PI3K), Wege des TGF-β und Signalwege von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-bindenden Proteinen (IGF-BP) mit der AhR-Signalkaskade auf molekularer Ebene interagieren [75,305,309,393,579,738,739]. Über die 1,25(OH)₂D₃-bedingte Aktivierung der PKC, die für die Genexpressionsregulation, Zelldifferenzierung, Mobilität und Metastasierung wichtig ist, werden MAPK1 und MAPK2 hochreguliert [528]. Bei den MAPK handelt es sich um Proteinkinasen, die neben dem Zellwachstum auch Transkriptionsfaktoren und Chromatinproteine im Melanom modulieren [229]. Diesbezüglich wurde nicht nur gezeigt, dass die PKC-Aktivität für die AhR-Signalgebung in manchen Zellen unabdingbar ist, sondern auch dass TCDD-aktivierte MAPKs für die Gentranskription des AhR und CYP1A1-Expression von großer Bedeutung sind [98,557].

1,25(OH)₂D₃ kann durch Hemmung der Angiogenese die Nährstoffversorgung von bösartigen Geschwüsten unterbrechen [528]. Neben der Inhibition von IL-8, die erst durch die Interaktion des Vitamin D₃ Metabolits mit NF-κB ermöglicht wird, scheint auch die Unterdrückung von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, PDGF) und des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer

Faktor 1α (HIF1 α) Teil dieser Funktion zu sein [390]. Potenzielle Wechselwirkungen zwischen dem NF- κ B- und AhR-Signalweg sind in zahlreichen Immunzellen, die im Xenobiotika-Stoffwechsel und bei der Karzinogenese beteiligt sind, eingehend untersucht worden. Neben der bereits erwähnten Rolle von NF- κ B bei der UV-B-abhängigen AhR-Signalgebung wurde auch bei der Peptidoglykan-induzierten IL-8-Expression in menschlichen Sebozyten eine Interaktion der beiden Signalwege festgestellt [222,338].

Ein weiteres Ziel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist der Hh-Signalweg, dessen deregulierte Funktion durch Genmutationen oder unkontrollierte Hh-Ligandenproduktion verursacht wird und zur Entstehung von Hautkrebs führt [181,244,410]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ greift in die Regulation des Hh-Zielgens GLI1 ein und hemmt die unkontrollierte Zellproliferation und weitere Hh-Signalübertragung [563]. Desgleichen konnten in-vivo-Berichte feststellen, dass die AhR-Signalisierung im Medulloblastom den Hh-Signalweg hemmt. Im Gegensatz zu seinen bisher beschriebenen, krebsfördernden Eigenschaften wurde in diesen Zellen der AhR als potenter Tumorsuppressor identifiziert [504]. Die genaue Rolle von CYP1A1 in der Regulation der Hh-Signalübertragung und der Ausführung von tumorsuppressiven Funktionen bleibt jedoch noch ungeklärt.

Die indirekten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekte zur Krebsbekämpfung werden vorwiegend im Tumormikromilieu ausgeführt. Durch vielfältige Mechanismen moduliert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verschiedene Immunmediatoren (z.B. DNA-Methylierung von CpG-Regionen, Produktion von IL-1 β und TNF- α), potenziell mutagene Stoffwechsellaskaden (z.B. Hemmung der ER-Signalübertragung durch Inhibition von CYP19A1, Herabregulierung von 27-Hydroxycholesterin und CYP27A1) und homöostatische Prozesse (z.B. Inhibition der Pyruvat Carboxylase, Induktion der CYP3A4-Expression, Verringerung der AMP-Hydrolyse und Adenosin Produktion) im umliegenden Gewebe [41]. Diverse Studien zeigen, dass Kernelemente der AhR-Signalkaskade mit manchen dieser komplexen molekularen Abläufe assoziiert sind. So ist TNF- α ein potenter Stimulator der AhR- und CYP1A1-Expression in menschlichen Speichelzellen [113]. Zudem hemmt der AhR die ER-Expression in Zellen der Gebärmutter und Brustkrebszellen, während typische AhR-Liganden (z.B. TCDD) die Expression der CYP3A4-mRNA in Leberzellkarzinom-Zellen stimulieren [282,359]. Interessanterweise wird die Xenobiotika-aktivierte CYP3A4-Induktion weitgehend durch den PXR reguliert, der in zahlreichen Studien für seine Interaktion mit dem AhR bekannt ist [171,280,462,740]. Somit wäre es denkbar, dass Elemente der AhR-Signalkaskade die Aktivität des CYP3A4-Gens regulieren.

Um zu überprüfen, ob die Hochregulierung der CYP1A1-mRNA ein VDR-abhängiger Prozess ist, wurden beide Zelllinien mit dem partiellen VDR-Hemmer $25(\text{OH})\text{D}_3$ inkubiert. Die gleichzeitige Behandlung mit $25(\text{OH})\text{D}_3$ induzierte bzw. unterdrückte die mRNA-Expression

von CYP1A1 in 1,25(OH)₂D₃- bzw. in EtOH-behandelten Zellen. Daraus konnten wir die Schlussfolgerung ziehen, dass 25(OH)D₃ zumindest in HaCaT-Zellen nicht als partieller VDR-Inhibitor wirkt. Es ist bekannt, dass sich 25(OH)D₃ und manche Cytochrom-Enzym-Isoformen gegenseitig regulieren, darunter auch Mitglieder der AhR-relevanten CYP1 Familie. So verstoffwechseln CYP3A4 und CYP27A1 den Vitamin D₃ Metabolit mittels einer Hydroxylierungsreaktion während wasserlösliche 25(OH)D₃-Metabolite CYP3A4 regulieren, um den Dickdarm vor einer toxischen Akkumulation von Lithocholsäure zu schützen [140,613,614,741]. In einer klinischen Studie wurde eine Interaktion zwischen den AhR-Zielgenen CYP1A1 und CYP1B1 und 25(OH)D₃-Serumspiegeln beobachtet, da sie synergistisch auf den Blutdruck von Patienten wirkten, die an einer arterieller Hypertonie erkrankt waren [428]. Obwohl eine experimentelle Studie die Effekte von 1,25(OH)₂D₃ und nicht-klassischer Vitamin D₃ Hydroxymetabolite auf die Regulation von AhR-Zielgenen in Keratinozyten schon untersucht hat, wurde die potenzielle Wirkung von 25(OH)D₃ nicht geprüft [533]. In unserer Arbeit wird zum ersten Mal ein 25(OH)D₃-vermittelter Effekt auf die CYP1A1-mRNA erfasst. Außerdem ist 25(OH)D₃ ein Vorläufer der aktiven Vitamin D₃ Form und kann in Keratinozyten zu 1,25(OH)₂D₃ umgewandelt werden [35,40,311]. Dadurch könnte 25(OH)D₃ eine agonistische Aktivität auf den VDR ausüben, die die 1,25(OH)₂D₃-Wirkung auf die CYP1A1-Expression noch weiter verstärken würde und somit die 25(OH)D₃-vermittelte CYP1A1-Hochregulierung erklären würde. Die Mechanismen allerdings, durch die 25(OH)D₃ die CYP1A1-Expression hemmt, werden in unserer Studie nicht weiter analysiert und müssten in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

5.4 Die Wirkung von UV-B und 1,25(OH)₂D₃ auf Mitglieder der nicht-kanonischen AhR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Wir untersuchten die mRNA-Aktivität von COX-2, eines nicht-klassischen Schlüsselements des AhR-Signalweges, in HaCaT- und SCL-1-Zellen. In unbehandelten SCL-1-Zellen, die den malignen Phänotyp des cSCC repräsentieren, konnten wir eine stärkere COX-2-mRNA-Expression detektieren als in den präkanzerösen, AK-homologen HaCaT-Zellen. Eine der ersten Studien zur Erforschung von COX-2 in der menschlichen Haut zeigte anhand von COX-1- und COX-2-Immunfärbungen, dass beide Isoenzyme vorzugsweise in den differenzierteren Hautschichten des SCC exprimiert werden. Außerdem führte die Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, eines Stimulus für die Keratinozytendifferenzierung, zu einer erhöhten Expression von COX-2-Protein und -mRNA [318]. In weiteren Projekten wurde berichtet, dass die normale menschliche Haut eine minimale COX-2-Färbung in Regionen mit differenzierterer Epidermis aufzeigt. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, wiesen AK eine deutliche

COX-2-Färbung auf, die die gesamte Dicke der Epidermis durchdrang, allerdings mit geringerer Intensität verglichen zum SCC [57,406]. Interessanterweise wurde COX-2 nicht nur in der oberflächlich liegenden, sonnenexponierten Epidermis, sondern auch in den SCC-Tumornestern detektiert [57]. Aus unseren Ergebnissen ergeben sich Hinweise, dass eine steigende COX-2-Expression, mit potenziell nachfolgend erhöhten PGE₂ Spiegeln, mit einer erhöhten Neigung zu invasivem Verhalten und Malignität in Hautzellen korreliert [264,581,593].

In malignen SCL-1-Zellen wurde nach UV-B-Bestrahlung die COX-2-Expression ca. 4-mal stärker als in der Kontrollgruppe und 2-mal stärker als nach der 1,25(OH)₂D₃-Behandlung stimuliert. In einigen Studien wurde nachgewiesen, dass eine wiederholte UV-B-Exposition mit einer chronischen Aktivierung von COX-2 und entzündungsfördernden Zytokinen in der Haut und in Plattenepithelkarzinomen assoziiert ist [57,125]. In diesem Prozess beobachtete die Arbeitsgruppe von Fritsche eine regulatorische Beteiligung des AhR, der die UV-B-induzierte EGFR-Aktivierung und Stimulation der COX-2-mRNA- and Proteinexpression vermittelte. Somit wurde COX-2 als Zielgen des UV-B-aktivierten AhR im Zytoplasma beschrieben [155]. Weitere molekulare Mechanismen, die die UV-B-induzierte COX-2 Stimulation vermitteln, können basierend auf unseren Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden. So schalten nach UV-Absorption die gebildeten ROS die Rezeptor-Typ Protein-Tyrosin-Phosphatase-j (RTPTPj) aus, wodurch EGFR aktiviert wird [742]. Dadurch werden verschiedene Signalwege stimuliert (PI3K/Akt und Ras/Rac1/p38 MAPK) und über die zusätzliche NADPH-Aktivierung weitere ROS erzeugt [26,604,638]. Die anschließende Inaktivierung der Glykogensynthase-Kinase-3b (GSK3b) und Aktivierung von p38 fördert die Bindung des CRE-Bindungsproteins an den COX-2-Promotor und aktiviert die COX-2 Transkription [26,565,566]. In präkanzerösen HaCaT-Keratinocyten zeigten sich entgegengesetzte Ergebnisse. Nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ wurde die COX-2-mRNA ungefähr 16-mal stärker im Vergleich zur Behandlung der Kontrollgruppe und 3-mal stärker als nach UV-B-Behandlung hochreguliert. Außerdem wurde ein synergistischer Effekt des VDR-Liganden 1,25(OH)₂D₃ und der AhR-induzierenden UV-B-Strahlung auf die COX-2-Genexpression beobachtet. Obwohl es viele Berichte gibt, die die entzündungshemmende Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ durch die Hemmung der COX-2-Expression belegen, haben einige Daten gezeigt, dass 1,25(OH)₂D₃ die COX-2-Expression in Epithelzellen verstärkt [277,328,571,610]. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, berichtete die Forschungsgruppe von Ravid eine zeitabhängige, 1,25(OH)₂D₃-induzierte Hochregulierung der COX-2-mRNA- und -Proteinexpression und nachgeschaltete Zunahme der PGE₂-Synthese in NHEK- und HaCaT-Zellen [467]. Jüngste Studien haben in Kaposi-Sarkom-assoziierten Endothelzellen festgestellt, dass die 1,25(OH)₂D₃-vermittelte COX-2-Stimulation VDR-abhängig ist [567]. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen, anti-entzündlichen Funktionen des aktiven Vitamin D₃ Derivates wird zusammen mit unseren

Ergebnissen eine mögliche pro-inflammatorische und krebsfördernde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung unterstrichen, womit eine weitere Bestätigung des „Janus-Gesichts“ von Calcitriol als Förderer und Dämpfer von Hautentzündungen geboten wird.

5.5 Die Wirkung von UV-B und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Mitglieder der VDR-Signalwege in HaCaT- und SCL-1-Zellen

Die mRNA-Expression von VDR und CYP24A1 war in unbehandelten, karzinogenen SCL-1-Zellen stärker als in präkarzinogenen HaCaT-Zellen. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wurde gezeigt, dass die Expression von Schlüsselkomponenten des endokrinen Vitamin D_3 Systems (VDR, CYP24A1, CYP27B1) in BCC und SCC im Vergleich zu nicht-krebsartigen Hautzellen höher ist [471,598]. Nach UV-B-Bestrahlung von VDR KO-Mäusen wurde auf gesunder Haut die Entwicklung von SCC-Tumoren beobachtet [123,598]. Dadurch wurde neben der Existenz des VDR und Vitamin D_3 metabolisierender Enzyme in der Haut auch auf eine schützende Rolle des VDR-Signalweges hingewiesen. Außerdem wurden verschiedene VDR-Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von AK und SCC in Verbindung gebracht [69,192]. Dies deutet darauf hin, dass der endogene Metabolismus von Vitamin D_3 und VDR-regulierten Transkripten das Wachstum von weißem Hautkrebs und damit verbundene molekulare Mechanismen potenziell reguliert. HaCaT-Zellen exprimieren auch den VDR, im Gegensatz zu SCL-1-Zellen aber können sie nur geringe Mengen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produzieren und somit den Vitamin D_3 Metabolismus und dessen transkriptionelle Aktivität womöglich nur schwach ankurbeln [470,743]. Dadurch könnte es in diesen Zellen zu einer schwächeren VDR- und CYP24A1-Stimulation als in SCL-1-Zellen kommen.

Während $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die CYP24A1-mRNA-Expression in HaCaT- und SCL-1-Zellen signifikant hochregulierte, hat es die transkriptionelle Aktivität des VDR im Vergleich zur Kontrollgruppe entweder nur geringfügig verändert (HaCaT) oder sogar herunterreguliert (SCL-1). Obwohl CYP24A1 im endogenen Vitamin D_3 System das wichtigste metabolisierende Enzym von $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ darstellt, wurden dem VDR-Zielgen potenziell onkogene Eigenschaften zugeschrieben [12,221,577]. So stellte man nicht nur erhöhte CYP24A1-mRNA-Spiegel in verschiedenen Krebsarten einschließlich NMSC fest, sondern offenbarte in diesen Tumoren auch eine positive Korrelation zwischen der CYP24A1-Expression und einer schlechteren Krankheitsprognose [50,253,367,518]. Im Einklang mit diesen Erkenntnissen war in unserer Studie die CYP24A1-mRNA-Stimulation in unbehandelten, vollkommen malignen SCL-1-Zellen viel stärker als in präkanzerösen HaCaT-Zellen. Erhöhte CYP24A1-mRNA-Werte könnten zu einer erhöhten Metabolisierung und

raschen Inaktivierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führen, wodurch seine tumorprotektive Wirkung teilweise oder komplett entfallen würde. Eine mögliche Spekulation wäre, dass die hohen CYP24A1-mRNA-Spiegel durch eine genetische Fehlregulation und unkontrollierte Überexpression des CYP24A1-Gens selbst zustande kommen, und nicht durch eine Hochregulierung über den physiologischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ -Signalweg. Ähnlich wie bei CYP1A1 im klassischen AhR-Signalweg, erhöhte die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und UV-B die mRNA-Aktivität von CYP24A1 in SCL-1-Zellen sogar noch stärker.

Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierte CYP24A1-Expression in HaCaT-Zellen war 100-mal stärker als in SCL-1-Zellen. Der Status des Tumorsuppressors p53 der präkanzerösen HaCaT- (p53mut) und malignen SCL-1-Keratinocyten (p53null) als auch die molekulare Interaktion von p53 und VDR scheinen zu unserem Ergebnis beizutragen. In gesunden Zellen schützt das p53-Protein vor fatalen DNA-Schäden durch die Induktion der Apoptose, den Zellzyklus-Arrest oder die Zellalterung [366]. In manchen Tumoren wurden neue p53-vermittelte Funktionsweisen festgestellt. Das mutierte und krebsassoziierte p53 (p53mut) kann neue Eigenschaften entwickeln (sog. Funktionsgewinn, engl. gain-of-function, GOF), die es ihm ermöglichen die molekulare Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu imitieren [528]. So kann p53mut, unabhängig von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mit dem VDR interagieren und die Expression von VDR-regulierten Genen als auch die VDR-Translokation und nukleäre Akkumulation fördern [547]. Da diese Effekte nach einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Supplementierung noch weiter verstärkt werden, wäre in p53-mutierten Zellen (wie den HaCaT-Keratinocyten) auch eine stärkere Expression von VDR-Zielgenen zu erwarten [547]. Außerdem kehrte das mutierte p53-Protein die pro-apoptotische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ um und verwandelte es in ein anti-apoptotisches Agens [547]. Somit moduliert der p53-Status die biologische Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Krebsvorstufen und Tumoren der Haut und dereguliert die tumorsuppressive Wirkung des VDR-Signalweges. Da auch klassische und nicht-klassische Kernelemente der AhR-Signalkaskade (CYP1A1 und COX-2) nachweislich durch das p53 reguliert werden, könnte der AhR-Signalweg ähnliche Effekte in Zusammenarbeit mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erfahren [74,129,193,631]. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Annahme nur für COX-2, da seine genetische Transkription nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung in HaCaT- fast 10-mal stärker war als in SCL-1-Zellen.

Neben der apoptosehemmenden Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die auch durch $\text{TNF}\alpha$, den TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) und den Fas-Liganden (FasL) ausgelöst wird, schützt der aktive Vitamin D_3 Metabolit vor UV-bedingten Zellschäden und zytotoxischen Substanzen [116,547]. Jüngste Forschungserkenntnisse zweifeln jedoch an der Exklusivität der krebshemmenden Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und spekulieren über schädliche und krebsfördernde Effekte, so dass die molekularen Mechanismen, die die Beziehung von

1,25(OH)₂D₃ und der Hauttumorentstehung definieren, unbedingt weiterer Klärung bedürfen [41,528].

5.6 Cross-talk zwischen Signalwegen des AhR und VDR

Zusammenfassend zeigen wir eine differentielle Regulierung des AhR- und VDR-Signalweges in HaCaT-Zellen im Vergleich zu SCL-1-Zellen als auch nach Behandlung mit AhR-stimulierender UV-B-Strahlung im Vergleich zur Behandlung mit VDR-aktivierendem 1,25(OH)₂D₃. Die unerwartete Interaktion des potenten VDR-Ligandes 1,25(OH)₂D₃ mit klassischen und nicht-klassischen, krebsfördernden AhR-Signalelementen als auch mit seinem eigenen, potenziell onkogenen Zielgen deutet darauf hin, dass das hochgradig orchestrierte und komplexe molekulare Netzwerk der AhR- und VDR-Signalkaskade zur Photokarzinogenese von weißem Hautkrebs beitragen kann. Die Behandlung von präkarzinogenen und malignen Keratinozyten mit UV-B-Strahlung hat in der menschlichen Haut zusätzliche biologische Wirkungen im Vergleich zur Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ hervorgerufen. Durch unsere Ergebnisse wird die Annahme verstärkt, dass die orale Aufnahme von Vitamin D₃ (z.B. durch Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel) nicht alle Auswirkungen von solarer UV-B-Strahlung auf den menschlichen Organismus und die Gesundheit ausgleichen kann, wozu auch die Auswirkungen nicht-klassischer, AhR-aktivierender Vitamin D₃ Derivate gehören. Unsere Arbeit bietet eine optimale Vorlage für zukünftliche und ausführlichere Untersuchungen, um die genauen Mechanismen hinter unseren Ergebnissen ans Licht zu bringen. Eine gründliche Abklärung der zugrundeliegenden pathophysiologischen und klinischen Relevanz unserer Daten ist mithilfe von vielfältigen medizinischen Studientypen möglicherweise erforderlich. Fortgeschrittene Nachweis- und Testmethoden, andere gesunde, prä-maligne und bösartige Hautzelllinien und -typen, weitere CYP1A1- und CYP24A1-assoziierte Signalwege, erweiterte Untersuchungszeitpunkte sowie verschiedene 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen, UV-B-Dosen und Strahlungsarten sollten in Betracht gezogen werden, um neue Perspektiven für die Prävention und Behandlung von hellem Hautkrebs zu eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbott BD, Birnbaum LS, Perdew GH (1995) Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* 204:133–143
2. Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, Buckalew AR, Wood CR, Held GA, Diliberto JJ (1999) Adverse Reproductive Outcomes in the Transgenic Ah Receptor-Deficient Mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:62–70
3. Abdel Nour AM, Pfaffl MW (2015) MIQE & qPCR ibook how to apply the MIQE guidelines - a visual, interactive and practical qPCR guide! bioMCC, Freising
4. Abel J, Haarmann-Stemann T (2010) An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol Chem* 391:1235–1248
5. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M (2003) Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* 88:227–233
6. Afzal S, Nordestgaard BG, Bojesen SE (2013) Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Non-Melanoma and Melanoma Skin Cancer: A Prospective Cohort Study. *J Invest Dermatol* 133:629–636
7. Agak GW, Qin M, Nobe J, Kim M-H, Krutzik SR, Tristan GR, Elashoff D, Garbán HJ, Kim J (2014) Propionibacterium acnes Induces an IL-17 Response in Acne Vulgaris that Is Regulated by Vitamin A and Vitamin D. *J Invest Dermatol* 134:366–373
8. Agostinis P, Garmyn M, Van Laethem A (2007) The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Illuminating Effector of the UVB Response. *Sci STKE* 2007:pe49–pe49
9. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P (2000) Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control CCC* 11:847–852
10. Akbulak O, Karadag AS, Akdeniz N, Ozkanli S, Ozlu E, Zemheri E, Oguztuzun S (2018) Evaluation of oxidative stress via protein expression of glutathione S-transferase and cytochrome p450 (CYP450) isoenzymes in psoriasis vulgaris patients treated with methotrexate. *Cutan Ocul Toxicol* 37:180–185

11. Alam M, Ratner D (2001) Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 344:975–983
12. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25:144–146
13. Almeida KH, Sobol RW (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* 6:695–711
14. Amor KT, Rashid RM, Mirmirani P (2010) Does D matter? The role of vitamin D in hair disorders and hair follicle cycling. *Dermatol Online J* 16:3
15. Amundson SA, Patterson A, Do KT, Fornace AJ (2002) A nucleotide excision repair master-switch: p53 regulated coordinate induction of global genomic repair genes. *Cancer Biol Ther* 1:145–149
16. An KP, Athar M, Tang X, Katiyar SK, Russo J, Beech J, Aszterbaum M, Kopelovich L, Epstein EH, Mukhtar H, Bickers DR (2002) Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol* 76:73–80
17. Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Cox P, Evans RL, Ullrich SE, Kripke ML (1997) Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat Med* 3:510–514
18. Androutopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA (2009) Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* 9:187
19. Anna B, Blazej Z, Jacqueline G, Andrew CJ, Jeffrey R, Andrzej S (2007) Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol* 2:451–469
20. Armbrecht HJ, Boltz MA, Hodam TL (2003) PTH increases renal 25(OH)D₃-1α-hydroxylase (CYP1α) mRNA but not renal 1,25(OH)₂D₃ production in adult rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F1032-1036
21. Armstrong BK, Kricger A (1993) How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 3:395–401

22. Ashida H, Nishiumi S, Fukuda I (2008) An update on the dietary ligands of the AhR. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4:1429–1447
23. Athar M, An KP, Morel KD, Kim AL, Aszterbaum M, Longley J, Epstein EH, Bickers DR (2001) Ultraviolet B (UVB)-Induced COX-2 Expression in Murine Skin: An Immunohistochemical Study. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1042–1047
24. Attignon EA, Distel E, Le-Grand B, Leblanc AF, Barouki R, de Oliveira E, Aggerbeck M, Blanc EB (2017) Down-regulation of the expression of alcohol dehydrogenase 4 and CYP2E1 by the combination of α -endosulfan and dioxin in HepaRG human cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 45:309–317
25. Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (2001) Structure and Expression of the Ah Receptor Repressor Gene *. *J Biol Chem* 276:33101–33110
26. Bachelor MA, Cooper SJ, Sikorski ET, Bowden GT (2005) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase decreases UVB-induced activator protein-1 and cyclooxygenase-2 in a SKH-1 hairless mouse model. *Mol Cancer Res MCR* 3:90–99
27. Bacic D, Lahir M, Biber J, Kaissling B, Murer H, Wagner CA (2006) The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone. *Kidney Int* 69:495–503
28. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C (2010) Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol* 10:482–496
29. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3294–3298
30. Bataille V, de Vries E (2008) Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ* 337:a2249
31. Beissert S, Schwarz T (1999) Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4:61–64
32. Bennett P, Ramsden DB, Williams AC (1996) Complete structural characterisation of the human aryl hydrocarbon receptor gene. *Clin Mol Pathol* 49:M12-16

33. Bennett RG, Wakeley SE, Hamel FG, High RR, Korch C, Goldner WS (2012) Gene Expression of Vitamin D Metabolic Enzymes at Baseline and in Response to Vitamin D Treatment in Thyroid Cancer Cell Lines. *Oncology* 83:264–272
34. Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RSC (2002) Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. *Br J Dermatol* 146:810–815
35. Bikle DD, Nemanic MK, Gee E, Elias P (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. *J Clin Invest* 78:557–566
36. Bikle DD, Pillai S, Gee E (1991) Squamous carcinoma cell lines produce 1,25 dihydroxyvitamin D, but fail to respond to its prodifferentiating effect. *J Invest Dermatol* 97:435–441
37. Bikle DD, Pillai S (1993) Vitamin D, Calcium, and Epidermal Differentiation. *Vitam D* 14:17
38. Bikle DD, Halloran BP, Riviere JE (1994) Production of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ by perfused pig skin. *J Invest Dermatol* 102:796–798
39. Bikle DD (2012) Protective actions of vitamin D in UVB induced skin cancer. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 11:10.1039/c2pp25251a
40. Bikle DD (2014) Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 21:319–329
41. Bilani N, Elson L, Szuchan C, Elimimian E, Saleh M, Nahleh Z (2021) Newly-identified Pathways Relating Vitamin D to Carcinogenesis: A Review. *Vivo Athens Greece* 35:1345–1354
42. Bischoff-Ferrari H, Borchers M, Gudat F, Dürmüller U, Stähelin H, Dick W (2004) Vitamin D Receptor Expression in Human Muscle Tissue Decreases With Age. *J Bone Miner Res* 19:265–269
43. Bissonauth V, Drouin R, Mitchell DL, Rhainds M, Claveau J, Rouabhia M (2000) The efficacy of a broad-spectrum sunscreen to protect engineered human skin from tissue and DNA damage induced by solar ultraviolet exposure. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 6:4128–4135
44. Bock KW, Köhle C (2006) Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 72:393–404

45. Bogaard EH van den, Bergboer JGM, Vonk-Bergers M, Vlijmen-Willems IMJJ van, Hato SV, Valk PGM van der, Schröder JM, Joosten I, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J (2013) Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest* 123:917–927
46. Bol DK, Rowley RB, Ho C-P, Pilz B, Dell J, Swerdel M, Kiguchi K, Muga S, Klein R, Fischer SM (2002) Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. *Cancer Res* 62:2516–2521
47. Boland R (1986) Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 7:434–448
48. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13:135–160
49. Booth BE, Tsai HC, Morris RC (1985) Vitamin D status regulates 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and its responsiveness to parathyroid hormone in the chick. *J Clin Invest* 75:155–161
50. Bortman P, Folgueira M a. a. K, Katayama MLH, Snitcovsky IML, Brentani MM (2002) Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on breast cells: a mini review. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 35:1–9
51. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M (2008) Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29:726–776
52. Boukamp P, Tilgen W, Dzarlieva RT, Breitkreutz D, Haag D, Riehl RK, Bohnert A, Fusenig NE (1982) Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J Natl Cancer Inst* 68:415–427
53. Breder CD, Dewitt D, Kraig RP (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355:296–315
54. Brenner M, Hearing VJ (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84:539–549
55. Bruhs A, Haarmann-Stemmann T, Frauenstein K, Krutmann J, Schwarz T, Schwarz A (2015) Activation of the Arylhydrocarbon Receptor Causes Immunosuppression Primarily by Modulating Dendritic Cells. *J Invest Dermatol* 135:435–444

56. Brumbaugh PF, Haussler MR (1974) 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem* 249:1251–1257
57. 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
58. Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS (2013) Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutr Rev* 71:353–369
59. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55:611–622
60. Buterin T, Hess MT, Luneva N, Geacintov NE, Amin S, Kroth H, Seidel A, Naegeli H (2000) Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Res* 60:1849–1856
61. Caceres-Dittmar G, Ariizumi K, Xu S, Tapia FJ, Bergstresser PR, Takashima A (1995) Hydrogen peroxide mediates UV-induced impairment of antigen presentation in a murine epidermal-derived dendritic cell line. *Photochem Photobiol* 62:176–183
62. Cadet J, Berger M, Douki T, Morin B, Raoul S, Ravanat JL, Spinelli S (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol Chem* 378:1275–1286
63. Cadranel J, Garabedian M, Milleron B, Guillozo H, Akoun G, Hance AJ (1990) 1,25(OH)2D2 production by T lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcemic patients with tuberculosis. *J Clin Invest* 85:1588–1593
64. Cai Q, Tapper DN, Gilmour RF, deTalamoni N, Aloia RC, Wasserman RH (1994) Modulation of the excitability of avian peripheral nerves by vitamin D: relation to calbindin-D28k, calcium status and lipid composition. *Cell Calcium* 15:401–410
65. Calzavara-Pinton P, Ortel B, Venturini M (2015) Non-melanoma skin cancer, sun exposure and sun protection. *G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr* 150:369–378

66. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7861–7864
67. Cantorna MT (2010) Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc Nutr Soc* 69:286–289
68. Carlberg C, Polly P (1998) Gene regulation by vitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8:19–42
69. Carless MA, Kraska T, Lintell N, Neale RE, Green AC, Griffiths LR (2008) Polymorphisms of the VDR gene are associated with presence of solar keratoses on the skin. *Br J Dermatol* 159:804–810
70. Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, Gariboldi M, Myers TG, Weinstein JN, Pommier Y, Fornace AJ (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19:1673–1685
71. Cavalieri EL, Li K-M, Balu N, Saeed M, Devanesan P, Higginbotham S, Zhao J, Gross ML, Rogan EG (2002) Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis* 23:1071–1077
72. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK (1996) Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 16:107–122
73. Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE, Meunier PJ (1985) Parathyroid function and vitamin D status in patients with bone metastases of prostatic origin. *Miner Electrolyte Metab* 11:117–122
74. CHEN J, WU F, PEI H-L, GU W-D, NING Z-H, SHAO Y-J, HUANG J (2015) Analysis of the correlation between P53 and Cox-2 expression and prognosis in esophageal cancer. *Oncol Lett* 10:2197–2203
75. Chen S, Operaña T, Bonzo J, Nguyen N, Tukey RH (2005) ERK kinase inhibition stabilizes the aryl hydrocarbon receptor: implications for transcriptional activation and protein degradation. *J Biol Chem* 280:4350–4359

76. Chiang K-C, C. Chen T (2013) The Anti-cancer Actions of Vitamin D. *Anti-Cancer Agents Med Chem- Anti-Cancer Agents* 13:126–139
77. Cho RJ, Alexandrov LB, den Breems NY, Atanasova VS, Farshchian M, Purdom E, Nguyen TN, Coarfa C, Rajapakshe K, Prisco M, Sahu J, Tassone P, Greenawalt EJ, Collisson EA, Wu W, Yao H, Su X, Guttmann-Gruber C, Hofbauer JP, Hashmi R, Fuentes I, Benz SC, Golovato J, Ehli EA, Davis CM, Davies GE, Covington KR, Murrell DF, Salas-Alanis JC, Palisson F, Bruckner AL, Robinson W, Has C, Bruckner-Tuderman L, Titeux M, Jonkman MF, Rashidghamat E, Lwin SM, Mellerio JE, McGrath JA, Bauer JW, Hovnanian A, Tsai KY, South AP (2018) APOBEC mutation drives early-onset squamous cell carcinomas in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* 10:eaas9668
78. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 96:365–408
79. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M (2014) Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 5:151
80. Ciążyńska M, Kamińska-Winciorek G, Lange D, Lewandowski B, Reich A, Sławińska M, Pabianek M, Szczepaniak K, Hankiewicz A, Ułańska M, Morawiec J, Błasińska-Morawiec M, Morawiec Z, Piekarski J, Nejc D, Brodowski R, Zaryczańska A, Sobjanek M, Nowicki RJ, Owczarek W, Słowińska M, Wróbel K, Bieniek A, Woźniacka A, Skibińska M, Narbutt J, Niemczyk W, Ciążyński K, Lesiak A (2021) The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. *Sci Rep* 11:4337
81. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem J* 340 (Pt 3):715–722
82. Claessens F, Gewirth DT (2004) DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 40:59–72
83. Cleaver JE, Crowley E (2002) UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci J Virtual Libr* 7:d1024-1043
84. Cleaver JE, Lam ET, Revet I (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet* 10:756–768

85. Coelho NR, Pimpão AB, Correia MJ, Rodrigues TC, Monteiro EC, Morello J, Pereira SA (2022) Pharmacological blockage of the AHR-CYP1A1 axis: a call for in vivo evidence. *J Mol Med Berl Ger* 100:215–243
86. Cooke MS, Podmore ID, Mistry N, Evans MD, Herbert KE, Griffiths HR, Lunec J (2003) Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *J Immunol Methods* 280:125–133
87. Corchero J, Pimprale S, Kimura S, Gonzalez FJ (2001) Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* 11:1–6
88. Costa C, Catania S, De Pasquale R, Stancanelli R, Scribano GM, Melchini A (2010) Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology* 271:83–86
89. Crofford LJ (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 49:15–19
90. Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A (2006) Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 81:500–507
91. Danielsson C, Fehsel K, Polly P, Carlberg C (1998) Differential apoptotic response of human melanoma cells to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues. *Cell Death Differ* 5:946–952
92. Davarinos NA, Pollenz RS (1999) Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome following Nuclear Export*. *J Biol Chem* 274:28708–28715
93. Dave VP, Kaul D, Sharma M (2012) Crosstalk between RXR, LXR and VDR within blood mononuclear cellular model. *Indian J Exp Biol* 50:35–40
94. De Haes P, Garmyn M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2003) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* 89:663–673
95. De Haes P, Garmyn M, Verstuyf A, De Clercq P, Vandewalle M, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2005) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage. *J Photochem Photobiol B* 78:141–148

96. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7:684–700
97. Delacôte F, Lopez BS (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle Georget Tex* 7:33–38
98. Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 153:73–82
99. DeLuca HF (1972) Parathyroid hormone as a trophic hormone for 1,25-dihydroxyvitamin D₃, the metabolically active form of vitamin D. *N Engl J Med* 287:250–251
100. Denison MS, Nagy SR (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309–334
101. Denzer N, Vogt T, Reichrath J (2011) Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and skin cancer: A systematic review. *Dermatoendocrinol* 3:205–210
102. 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
103. DiGiovanna JJ, Kraemer KH (2012) Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol* 132:785–796
104. Dixon KM, Deo SS, Wong G, Slater M, Norman AW, Bishop JE, Posner GH, Ishizuka S, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS (2005) Skin cancer prevention: A possible role of 1,25dihydroxyvitamin D₃ and its analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:137–143
105. Dixon KM, Deo SS, Norman AW, Bishop JE, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS (2007) In vivo relevance for photoprotection by the vitamin D rapid response pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:451–456
106. Dixon KM, Norman AW, Sequeira VB, Mohan R, Rybchyn MS, Reeve VE, Halliday GM, Mason RS (2011) 1 α ,25(OH)₂-vitamin D and a nongenomic vitamin D analogue inhibit ultraviolet radiation-induced skin carcinogenesis. *Cancer Prev Res Phila Pa* 4:1485–1494
107. Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA (1993) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 44:911–917

108. Douki T, Court M, Sauvaigo S, Odin F, Cadet J (2000) Formation of the main UV-induced thymine dimeric lesions within isolated and cellular DNA as measured by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Biol Chem* 275:11678–11685
109. Douki T, Cadet J (2001) Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry* 40:2495–2501
110. Douki T, von Koschimbahr A, Cadet J (2017) Insight in DNA Repair of UV-induced Pyrimidine Dimers by Chromatographic Methods. *Photochem Photobiol* 93:207–215
111. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD (2012) SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc* 22:1189–1199
112. Drocourt L, Ourlin J-C, Pascussi J-M, Maurel P, Vilarem M-J (2002) Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 277:25125–25132
113. Drozdziak A, Dziedziczko V, Kurzawski M (2014) IL-1 and TNF- α regulation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression in HSY human salivary cells. *Arch Oral Biol* 59:434–439
114. Duffey DC, Chen Z, Dong G, Ondrey FG, Wolf JS, Brown K, Siebenlist U, Van Waes C (1999) Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaB α of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res* 59:3468–3474
115. Dumaz N, van Kranen HJ, de Vries A, Berg RJ, Wester PW, van Kreijl CF, Sarasin A, Daya-Grosjean L, de Gruij FR (1997) The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice. *Carcinogenesis* 18:897–904
116. Duque G, El Abdaimi K, Henderson JE, Lomri A, Kremer R (2004) Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone* 35:57–64
117. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8-28

118. Ebihara K, Masuhiro Y, Kitamoto T, Suzawa M, Uematsu Y, Yoshizawa T, Ono T, Harada H, Matsuda K, Hasegawa T, Masushige S, Kato S (1996) Intron retention generates a novel isoform of the murine vitamin D receptor that acts in a dominant negative way on the vitamin D signaling pathway. *Mol Cell Biol* 16:3393–3400
119. Egan KM (2009) Vitamin D and melanoma. *Ann Epidemiol* 19:455–461
120. Eide MJ, Johnson DA, Jacobsen GR, Krajenta RJ, Rao DS, Lim HW, Johnson CC (2011) Vitamin D and nonmelanoma skin cancer in a health maintenance organization cohort. *Arch Dermatol* 147:1379–1384
121. Eisman JA, Macintyre I, Martin TJ, Frampton RJ, King RJ (1980) Normal and malignant breast tissue is a target organ for 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Clin Endocrinol (Oxf)* 13:267–272
122. Eling TE, Thompson DC, Foureman GL, Curtis JF, Hughes MF (1990) Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:1–45
123. Ellison TI, Smith MK, Gilliam AC, MacDonald PN (2008) Inactivation of the vitamin D receptor enhances susceptibility of murine skin to UV-induced tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 128:2508–2517
124. Elmets CA, Viner JL, Pentland AP, Cantrell W, Lin H-Y, Bailey H, Kang S, Linden KG, Heffernan M, Duvic M, Richmond E, Elewski BE, Umar A, Bell W, Gordon GB (2010) Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer with celecoxib: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 102:1835–1844
125. Elmets CA, Ledet JJ, Athar M (2014) Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *J Invest Dermatol* 134:2497–2502
126. 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. *Biochem Biophys Res Commun* 184:246–253
127. Ema M, Matsushita N, Sogawa K, Ariyama T, Inazawa J, Nemoto T, Ota M, Oshimura M, Fujii-Kuriyama Y (1994) Human arylhydrocarbon receptor: functional expression and chromosomal assignment to 7p21. *J Biochem (Tokyo)* 116:845–851
128. Emri G, Horkay I, Remenyik E (2006) [The role of free radicals in the UV-induced skin damage. Photo-aging]. *Orv Hetil* 147:731–735

129. Enache AO, Stepan AE, Mărgăritescu C, Pătrașcu V, Ciurea RN, Simionescu CE, Camen A (2018) Immunoexpression of p53 and COX-2 in basal cell carcinoma. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol* 59:1115–1120
130. Enan E, Matsumura F (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* 52:1599–1612
131. Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T (2003) Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology* 144:5138–5144
132. Eschbach S, Hofmann C, Maerz M, Maier U-G, Sitte P (1990) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Auflage. Hrsg. von J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour 1989, \$ 115. ISBN 0-87969-309-6. *Biol Unserer Zeit* 20:285–285
133. Esser C, Bargaen I, Weighardt H, Haarmann-Stemmann T, Krutmann J (2013) Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin Immunopathol* 35:677–691
134. Evans SR, Houghton AM, Schumaker L, Brenner RV, Buras RR, Davoodi F, Nauta RJ, Shabahang M (1996) Vitamin D receptor and growth inhibition by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human malignant melanoma cell lines. *J Surg Res* 61:127–133
135. Fanelli G, Romano M, Nova-Lamperti E, Sunderland MW, Nerviani A, Scottà C, Bombardieri M, Quezada SA, Sacks SH, Noelle RJ, Pitzalis C, Lechler RI, Lombardi G, Becker PD (2021) PD-L1 signaling on human memory CD4+ T cells induces a regulatory phenotype. *PLOS Biol* 19:e3001199
136. Fang L, Cheng J-C, Chang H-M, Sun Y-P, Leung PCK (2013) EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 98:4932–4941
137. Fang Y, van Meurs JBJ, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JPT, Jehan F, Pols HAP, Uitterlinden AG (2005) Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 77:807–823

138. Favus MJ (1985) Factors that influence absorption and secretion of calcium in the small intestine and colon. *Am J Physiol* 248:G147-157
139. Favus MJ, Angeid-Backman E (1985) Effects of 1,25(OH)₂D₃ and calcium channel blockers on cecal calcium transport in the rat. *Am J Physiol* 248:G676-681
140. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ (2014) The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 14:342–357
141. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386
142. Fernández-Barral A, Bustamante-Madrid P, Ferrer-Mayorga G, Barbáchano A, Larriba MJ, Muñoz A (2020) Vitamin D Effects on Cell Differentiation and Stemness in Cancer. *Cancers* 12:E2413
143. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SST, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ (1995) Immune System Impairment and Hepatic Fibrosis in Mice Lacking the Dioxin-Binding Ah Receptor. *Science* 268:722–726
144. Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ (1997) Lesions of Aryl-hydrocarbon Receptor-deficient Mice. *Vet Pathol* 34:605–614
145. Filvaroff E, Calautti E, Reiss M, Dotto GP (1994) Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 269:21735–21740
146. Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti CJ (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25:231–240
147. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337:1419–1428
148. Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, Li X, Wan Y, Kang S, Voorhees JJ (1998) Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 101:1432–1440

149. Foote CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54:659
150. Forghani N, Lum C, Krishnan S, Wang J, Wilson DM, Blackett PR, Malloy PJ, Feldman D (2010) Two New Unrelated Cases of Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-resistant Rickets with Alopecia resulting from the same Novel Nonsense Mutation in the Vitamin D Receptor Gene. *23:843–850*
151. Fosslie E (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30:3–21
152. 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 Differ* 20:1425–1434
153. Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C
154. Friedrich M, Rafi L, Mitschele T, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J (2003) Analysis of the vitamin D system in cervical carcinomas, breast cancer and ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer* 164:239–246
155. 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) Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8851–8856
156. Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA (1997) Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol Baltim Md* 11:1961–1970
157. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N, Chiba H (2008) Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 19:1912–1921
158. Funk Casmir null (1975) *The journal of State Medicine*. Volume XX: 341-368, 1912. The etiology of the deficiency diseases, Beri-beri, polyneuritis in birds, epidemic dropsy,

- scurvy, experimental scurvy in animals, infantile scurvy, ship beri-beri, pellagra. *Nutr Rev* 33:176–177
159. Furuta H, Osawa K, Shin M, Ishikawa A, Matsuo K, Khan M, Aoki K, Ohya K, Okamoto M, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O, Jimi E (2012) Selective inhibition of NF- κ B suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma in vivo. *Int J Cancer* 131:E625–E635
160. Fussell KC, Udasin RG, Smith PJS, Gallo MA, Laskin JD (2011) Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis* 32:1285–1293
161. Gahl A Neue Referenzwerte für Vitamin D. 3
162. Gallieni M, Cozzolino M, Fallabrino G, Pasho S, Olivi L, Brancaccio D (2009) Vitamin D: physiology and pathophysiology. *Int J Artif Organs* 32:87–94
163. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E (2001) Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia N Y N* 3:53–61
164. Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT (1972) Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1673–1676
165. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X, Parisi G, Saus CP, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A (2017) Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep* 19:1189–1201
166. Garibyan L, Fisher DE (2010) How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* 12:319–326
167. Garland C, Shekelle RB, Barrett-Connor E, Criqui MH, Rossof AH, Paul O (1985) Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet Lond Engl* 1:307–309
168. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF (2006) The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 96:252–261

169. Garssen J, Vandebriel RJ, van Loveren H (1997) Molecular aspects of UVB-induced immunosuppression. *Arch Toxicol Suppl Arch Toxikol Suppl* 19:97–109
170. Gerabek WE (2005) *Enzyklopädie Medizingeschichte*. Walter de Gruyter, Berlin New York
171. Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Fabre J-M, Sa-Cunha A, Poellinger L, Maurel P, Daujat-Chavanieu M (2006) Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide. *Cell Signal* 18:740–750
172. Giguère V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20:689–725
173. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC (2006) Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 98:451–459
174. Giovannucci E, Liu Y, Willett WC (2006) Cancer incidence and mortality and vitamin D in black and white male health professionals. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 15:2467–2472
175. Glade MJ (2013) Vitamin D: health panacea or false prophet? *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 29:37–41
176. Görnitz T, Görnitz B (2016) *Von der Quantenphysik zum Bewusstsein: Kosmos, Geist und Materie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
177. Gradin K, Whitelaw ML, Toftgård R, Poellinger L, Berghard A (1994) A tyrosine kinase-dependent pathway regulates ligand-dependent activation of the dioxin receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem* 269:23800–23807
178. Gravit L (2011) Chemoprevention: First line of defence. *Nature* 471:S5–S7
179. Gresham A, Masferrer J, Chen X, Leal-Khoury S, Pentland AP (1996) Increased synthesis of high-molecular-weight cPLA2 mediates early UV-induced PGE2 in human skin. *Am J Physiol* 270:C1037-1050
180. Gronemeyer H, Gustafsson J-Å, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3:950–964
181. Gu D, Xie J (2015) Non-Canonical Hh Signaling in Cancer-Current Understanding and Future Directions. *Cancers* 7:1684–1698

182. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:519–561
183. Guengerich FP, Shimada T (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4:391–407
184. Guigal N, Seree E, Bourgarel-Rey V, Barra Y (2000) Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 267:572–576
185. Guirouilh-Barbat J, Huck S, Lopez BS (2008) S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. *Oncogene* 27:1726–1736
186. Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Holliday CJ, Slater M, Halliday GM, Reeve VE, Mason RS (2007) Photoprotection by 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Is Associated with an Increase in p53 and a Decrease in Nitric Oxide Products. *J Invest Dermatol* 127:707–715
187. Guyot E, Chevallier A, Barouki R, Coumoul X (2013) The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today* 18:479–486
188. Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Abel J (2009) Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 77:508–520
189. 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. *J Invest Dermatol* 135:2572–2576
190. Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution¹¹Invited review for Chemico-Biological Interactions. *Chem Biol Interact* 141:131–160
191. Hakim I, Bar-Shavit Z (2003) Modulation of TNF-alpha expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element. *J Cell Biochem* 88:986–998
192. Han J, Colditz GA, Hunter DJ (2006) Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study. *Int J Epidemiol* 35:1514–1521
193. Han JA, Kim J-I, Ongusaha PP, Hwang DH, Ballou LR, Mahale A, Aaronson SA, Lee SW (2002) p53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *EMBO J* 21:5635–5644

194. Han K-H, Choi H-R, Won C-H, Chung J-H, Cho K-H, Eun H-C, Kim K-H (2005) Alteration of the TGF- β /SMAD pathway in intrinsically and UV-induced skin aging. *Mech Ageing Dev* 126:560–567
195. Han X, Liehr JG (1995) Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis* 16:2571–2574
196. Han Y, Liu D, Li L (2020) PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* 10:727–742
197. Han Z, Miwa Y, Obikane H, Mitsumata M, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Sasaguri T (2008) Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 77:809–818
198. Hanawalt PC, Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:958–970
199. Hao C-M, Breyer MD (2008) Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 70:357–377
200. Hata TR, Kotol P, Jackson M, Nguyen M, Paik A, Udall D, Kanada K, Yamasaki K, Alexandrescu D, Gallo RL (2008) Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 122:829–831
201. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh J-C, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW (1998) The Nuclear Vitamin D Receptor: Biological and Molecular Regulatory Properties Revealed. *J Bone Miner Res* 13:325–349
202. Hawker NP, Pennypacker SD, Chang SM, Bikle DD (2007) Regulation of Human Epidermal Keratinocyte Differentiation by the Vitamin D Receptor and its Coactivators DRIP205, SRC2, and SRC3. *J Invest Dermatol* 127:874–880
203. He X, Feng S Role of Metabolic Enzymes P450 (CYP) on Activating Procarcinogen and their Polymorphisms on the Risk of Cancers. *Curr Drug Metab* 16:850–863
204. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986–994
205. Helferich WG, Denison MS (1991) Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol* 40:674–678

206. Hemida MA, AbdElmoneim NA, Hewala TI, Rashad MM, Abdaallah S (2019) Vitamin D Receptor in Breast Cancer Tissues and Its Relation to Estrogen Receptor Alpha (ER- α) Gene Expression and Serum 25-hydroxyvitamin D Levels in Egyptian Breast Cancer Patients: A Case-control Study. *Clin Breast Cancer* 19:e407–e414
207. Henry HL (1979) Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells. *J Biol Chem* 254:2722–2729
208. Hershberger PA, Modzelewski RA, Shurin ZR, Rueger RM, Trump DL, Johnson CS (1999) 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-D₃) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21(Waf1/Cip1) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 59:2644–2649
209. Hershberger PA, Yu WD, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL (2001) Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 7:1043–1051
210. Hess AF, Unger LJ (1921) The cure of infantile rickets by artificial light and by sunlight. *Proc Soc Exp Biol Med* 18:298–298
211. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM (2000) 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* 25:141–148
212. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T (2000) Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* 86:667–671
213. Hla T, Neilson K (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7384–7388
214. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366–374
215. Holick MF, Uskokovic M, Henley JW, MacLaughlin J, Holick SA, Potts JT (1980) The photoproduction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in skin: an approach to the therapy of vitamin-D-resistant syndromes. *N Engl J Med* 303:349–354
216. Holick MF (1981) The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 77:51–58

217. Holick MF (1995) Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61:638S-645S
218. Holick MF (2006) Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 92:49–59
219. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266–281
220. Honkakoski P, Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347:321–337
221. Horváth HC, Lakatos P, Kósa JP, Bácsi K, Borka K, Bises G, Nittke T, Hershberger PA, Speer G, Kállay E (2010) The Candidate Oncogene CYP24A1: A Potential Biomarker for Colorectal Tumorigenesis. *J Histochem Cytochem* 58:277–285
222. Hou X-X, Chen G, Hossini AM, Hu T, Wang L, Pan Z, Lu L, Cao K, Ma Y, Zouboulis CC, Xia L, Ju Q (2018) Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates the Expression of TNF- α and IL-8 in Human Sebocytes via the MyD88-p65NF- κ B/p38MAPK Signaling Pathways. *J Innate Immun* 11:41–51
223. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ (2006) A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv* 7:165–172
224. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ (2001) Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8:97–114
225. Hu W, Sorrentino C, Denison MS, Kolaja K, Fielden MR (2007) Induction of cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: results of large scale screening of pharmaceuticals and toxicants in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* 71:1475–1486
226. Huldshinsky K (1919) Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 45:712–713
227. Humans IWG on the E of CR to (2012) SOLAR AND ULTRAVIOLET RADIATION. International Agency for Research on Cancer
228. Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA (2000) Vitamin D receptor polymorphisms are associated with

- altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 6:498–504
229. Hutchinson PE, Halsall JA, Popovici S, Papadogeorgakis E, Osborne JE, Powley IR, Dasari D, Saldanha G, Pringle JH (2018) Compromised vitamin D receptor signalling in malignant melanoma is associated with tumour progression and mitogen-activated protein kinase activity. *Melanoma Res* 28:410–422
230. Hutterer R (2010) *Fit in Biochemie: das Pr??fungstraining f??r Mediziner, Chemiker und Biologen : Studium*. Vieweg + Teubner in GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden
231. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C (2008) 25-Hydroxyvitamin D, IGF-1, and Metabolic Syndrome at 45 Years of Age: A Cross-Sectional Study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes* 57:298–305
232. Inman GJ, Wang J, Nagano A, Alexandrov LB, Purdie KJ, Taylor RG, Sherwood V, Thomson J, Hogan S, Spender LC, South AP, Stratton M, Chelala C, Harwood CA, Proby CM, Leigh IM (2018) The genomic landscape of cutaneous SCC reveals drivers and a novel azathioprine associated mutational signature. *Nat Commun* 9:3667
233. Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K (2007) NF- κ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 98:268–274
234. Isoherranen K, Punnonen K, Jansen C, Uotila P (1999) Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140:1017–1022
235. Ito T, Inouye K, Nohara K, Tohyama C, Fujimaki H (2008) TCDD exposure exacerbates atopic dermatitis-related inflammation in NC/Nga mice. *Toxicol Lett* 177:31–37
236. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106:302–323
237. Jacobs ET, Van Pelt C, Forster RE, Zaidi W, Hibler EA, Galligan MA, Haussler MR, Jurutka PW (2013) CYP24A1 and CYP27B1 polymorphisms modulate vitamin D metabolism in colon cancer cells. *Cancer Res* 73:2563–2573
238. Jaiswal AK, Gonzalez FJ, Nebert DW (1985) Human P1-450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res* 13:4503–4520

239. Janjetovic Z, Zmijewski MA, Tuckey RC, DeLeon DA, Nguyen MN, Pfeffer LM, Slominski AT (2009) 20-Hydroxycholecalciferol, product of vitamin D3 hydroxylation by P450scc, decreases NF-kappaB activity by increasing IkappaB alpha levels in human keratinocytes. *PloS One* 4:e5988
240. Janjetovic Z, Tuckey RC, Nguyen MN, Thorpe EM, Slominski AT (2010) 20,23-dihydroxyvitamin D3, novel P450scc product, stimulates differentiation and inhibits proliferation and NF-kappaB activity in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 223:36–48
241. Jans J, Schul W, Sert Y-G, Rijksen Y, Rebel H, Eker APM, Nakajima S, Steeg H van, Gruijl FR de, Yasui A, Hoeijmakers JHJ, Horst GTJ van der (2005) Powerful Skin Cancer Protection by a CPD-Photolyase Transgene. *Curr Biol* 15:105–115
242. Jaszewska E, Soin M, Filipek A, Naruszewicz M (2013) UVA-induced ROS generation inhibition by *Oenothera paradoxa* defatted seeds extract and subsequent cell death in human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 126:42–46
243. Jeon MS, Esser C (2000) The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J Immunol Baltim Md* 1950 165:6975–6983
244. Jiang J, Hui C-C (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 15:801–812
245. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R (1994) Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 267:E356-360
246. Jones G, Ramshaw H, Zhang A, Cook R, Byford V, White J, Petkovich M (1999) Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1alpha and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinomas. *Endocrinology* 140:3303–3310
247. Joshi S, Pantalena L-C, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S (2011) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 31:3653–3669
248. Kamradt J, Rafi L, Mitschele T, Meineke V, Gärtner BC, Wolfgang T, Holick MF, Reichrath J (2003) Analysis of the vitamin D system in cutaneous malignancies. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer* 164:259–269

249. Kang Y-J, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL (2007) Regulation of Intracellular Cyclooxygenase Levels by Gene Transcription and Protein Degradation. *Prog Lipid Res* 46:108–125
250. Karagiannidis I, Nikolakis G, Sabat R, Zouboulis CC (2016) Hidradenitis suppurativa/Acne inversa: an endocrine skin disorder? *Rev Endocr Metab Disord* 17:335–341
251. Karin M, Hunter T (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol CB* 5:747–757
252. Karin M (2009) NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a000141
253. Kaukinen A, Siiskonen H, Pelkonen J, Harvima IT (2017) Immunoreactivity to CYP24A1, but not vitamin D receptor, is increased in mast cells of keratinocyte skin cancers. *Eur J Dermatol EJD* 27:590–598
254. Kawajiri K, Watanabe J, Gotoh O, Tagashira Y, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1986) Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur J Biochem* 159:219–225
255. Kciuk M, Marciniak B, Mojzych M, Kontek R (2020) Focus on UV-Induced DNA Damage and Repair—Disease Relevance and Protective Strategies. *Int J Mol Sci* 21:7264
256. Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y (2001) Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276:39638–39644
257. Keijzers G, Bakula D, Scheibye-Knudsen M (2017) Monogenic Diseases of DNA Repair. *N Engl J Med* 377:1868–1876
258. Kenison JE, Wang Z, Yang K, Snyder M, Quintana FJ, Sherr DH (2021) The aryl hydrocarbon receptor suppresses immunity to oral squamous cell carcinoma through immune checkpoint regulation. *Proc Natl Acad Sci* 118:e2012692118
259. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004) The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36:189–204
260. Kim D, Guengerich FP (2005) Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:27–49

261. Kim MJ, Kim S-N, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ (2016) Vitamin D Status and Efficacy of Vitamin D Supplementation in Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 8:789
262. Kim T-K, Wang J, Janjetovic Z, Chen J, Tuckey RC, Nguyen MN, Tang EKY, Miller D, Li W, Slominski AT (2012) Correlation between secosteroid-induced vitamin D receptor activity in melanoma cells and computer-modeled receptor binding strength. *Mol Cell Endocrinol* 361:143–152
263. Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, Takayama K, Hara N, Motohiro A, Tanaka K, Kono S, Hirohata T (1998) The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 8:315–323
264. Klapan I, Katić V, Culo F, Cuk V (1992) Prognostic significance of plasma prostaglandin E concentration in patients with head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 118:308–313
265. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355:446–449
266. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23:687–702
267. Knutson JC, DeLuca HF (1974) 25-Hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular location and properties. *Biochemistry* 13:1543–1548
268. Kobayashi A, Numayama-Tsuruta K, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1997) CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem (Tokyo)* 122:703–710
269. Kochevar IE (1987) Photophysics, photochemistry and photobiology. *Dermatol Gen Med*
270. 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. *Arch Toxicol* 73:152–158
271. Kong Y, Kumar SM, Xu X (2010) Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Arch Pathol Lab Med* 134:1740–1749

272. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR (2013) The vitamin d receptor and T cell function. *Front Immunol* 4:148
273. Koning TMG, Davies RJH, Kaptein R (1990) The solution structure of the intramolecular photoproduct of d(TpA) derived with the use of NMR and a combination of distance geometry and molecular dynamics. *Nucleic Acids Res* 18:277–284
274. Korashy HM, El-Kadi AOS (2006) The role of aryl hydrocarbon receptor and the reactive oxygen species in the modulation of glutathione transferase by heavy metals in murine hepatoma cell lines. *Chem Biol Interact* 162:237–248
275. Korkalainen M, Lindén J, Tuomisto J, Pohjanvirta R (2005) Effect of TCDD on mRNA expression of genes encoding bHLH/PAS proteins in rat hypothalamus. *Toxicology* 208:1–11
276. Krause G, Scherer G, Müller M, Weiß T (2012) Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004]. American Cancer Society URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527600418.bipcrbasicd0016>
277. Krishnan AV, Swami S, Feldman D (2010) Vitamin D and breast cancer: Inhibition of estrogen synthesis and signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:343–348
278. Krutmann J, Gilchrist BA (2006) Photoaging of Skin. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/3-540-32953-6_4
279. Krutmann J, Liu W, Li L, Pan X, Crawford M, Sore G, Seite S (2014) Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications. *J Dermatol Sci* 76:163–168
280. Kubota A, Goldstone JV, Lemaire B, Takata M, Woodin BR, Stegeman JJ (2015) Role of Pregnane X Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor in Transcriptional Regulation of pxr, CYP2, and CYP3 Genes in Developing Zebrafish. *Toxicol Sci* 143:398–407
281. Kück U, Bunse A, Herausgeber (2005) Praktikum der Molekulargenetik: mit 40 Tabellen. Springer, Berlin
282. Kumagai T, Suzuki H, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Yamazoe Y, Nagata K (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. *Drug Metab Pharmacokinet* 27:200–206

283. Kumar MB, Tarpey RW, Perdew GH (1999) Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274:22155–22164
284. Kumar MB, Perdew GH (2018) Nuclear Receptor Coactivator SRC-1 Interacts With the Q-Rich Subdomain of the AhR and Modulates its Transactivation Potential. *Gene Expr* 8:273–286
285. Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH (1979) Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D plasma levels in normal human pregnancy and lactation. *J Clin Invest* 63:342–344
286. Kumar S, Sharma ND, Davies RJH, Phillipson DW, McCloskey JA (1987) The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV-irradiated deoxyadenylates. *Nucleic Acids Res* 15:1199–1216
287. Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74:681–710
288. Kurnik BR, Hruska KA (1985) Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochim Biophys Acta* 817:42–50
289. Kurz B, Berneburg M, Singer S (2022) Sonnenschutz der menschlichen Haut: Grundlagen. *Hautarzt* 73:251–256
290. Kutuzova GD, Deluca HF (2004) Gene expression profiles in rat intestine identify pathways for 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulated calcium absorption and clarify its immunomodulatory properties. *Arch Biochem Biophys* 432:152–166
291. Kuźbicki L, Sarnecka A, Chwirot BW (2006) Expression of cyclooxygenase-2 in benign naevi and during human cutaneous melanoma progression. *Melanoma Res* 16:29–36
292. Kuźbicki Ł, Lange D, Strączyńska-Niemiec A, Chwirot BW (2012) The value of cyclooxygenase-2 expression in differentiating between early melanomas and histopathologically difficult types of benign human skin lesions. *Melanoma Res* 22:70–76
293. Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH (1992) Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 7:1447–1453
294. Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, Bentz M, Southard J, Bradfield CA (2000) Portosystemic shunting and persistent fetal vascular

- structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 97:10442–10447
295. Lahvis GP, Pyzalski RW, Glover E, Pitot HC, McElwee MK, Bradfield CA (2005) The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Required for Developmental Closure of the Ductus Venosus in the Neonatal Mouse. *Mol Pharmacol* 67:714–720
296. Lange CM, Gouttenoire J, Duong FHT, Morikawa K, Heim MH, Moradpour D (2014) Vitamin D Receptor and Jak–STAT Signaling Crosstalk Results in Calcitriol-Mediated Increase of Hepatocellular Response to IFN- α . *J Immunol* 192:6037–6044
297. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* 7:1–9
298. Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR (2001) Dexamethasone Destabilizes Cyclooxygenase 2 mRNA by Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase p38. *Mol Cell Biol* 21:771–780
299. Le Beau MM, Carver LA, Espinosa R, Schmidt JV, Bradfield CA (1994) Chromosomal localization of the human AHR locus encoding the structural gene for the Ah receptor to 7p21-->p15. *Cytogenet Cell Genet* 66:172–176
300. Leadon SA, Avrutskaya AV (2003) Differential involvement of the human mismatch repair proteins, hMLH1 and hMSH2, in transcription-coupled repair. *Cancer Res* 63:3846
301. Lear JT, Heagerty AH, Smith A, Bowers B, Payne CR, Smith CA, Jones PW, Gilford J, Yengi L, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC (1996) Multiple cutaneous basal cell carcinomas: glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) and cytochrome P450 (CYP2D6, CYP1A1) polymorphisms influence tumour numbers and accrual. *Carcinogenesis* 17:1891–1896
302. Lear JT, Smith AG, Bowers B, Heagearty AH, Jones PW, Gilford J, Aldersea J, Strange RC, Fryer AA (1997) Truncal tumor site is associated with high risk of multiple basal cell carcinoma and is influenced by glutathione S-transferase, GSTT1, and cytochrome P450, CYP1A1 genotypes, and their interaction. *J Invest Dermatol* 108:519–522
303. Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT (2003) Characterization of the oxidative metabolites of 17 β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 144:3382–3398

304. Lee DB, Walling MM, Levine BS, Gafter U, Silis V, Hodsman A, Coburn JW (1981) Intestinal and metabolic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal adult rat. *Am J Physiol* 240:G90-96
305. Lee H, Kim SR, Oh Y, Cho SH, Schleimer RP, Lee YC (2014) Targeting Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein-3 Signaling Pathways. A Novel Therapeutic Approach for Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50:667–677
306. Lee J, Youn JI (1998) The photoprotective effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on ultraviolet light B-induced damage in keratinocyte and its mechanism of action. *J Dermatol Sci* 18:11–18
307. Lee JW, Ratnakumar K, Hung K-F, Rokunohe D, Kawasumi M (2020) Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochem Photobiol* 96:478–499
308. Lee W-C, Chung Y-H (2013) Permutation flowshop scheduling to minimize the total tardiness with learning effects. *Int J Prod Econ* 141:327–334
309. Lee Y-C, Jogie-Brahim S, Lee D-Y, Han J, Harada A, Murphy LJ, Oh Y (2011) Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 (IGFBP-3) Blocks the Effects of Asthma by Negatively Regulating NF-κB Signaling through IGFBP-3R-mediated Activation of Caspases♦. *J Biol Chem* 286:17898–17909
310. 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
311. Lehmann B, Pietzsch J, Kämpf A, Meurer M (1998) Human keratinocyte line HaCaT metabolizes 1α-hydroxyvitamin D₃ and vitamin D₃ to 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Dermatol Sci* 18:118–127
312. Lehmann B, Tiebel O, Meurer M (1999) Expression of vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D₃ or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents--a preliminary study. *Arch Dermatol Res* 291:507–510
313. Lehmann B, Meurer M (2003) Extrarenal sites of calcitriol synthesis: the particular role of the skin. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progres Dans Rech Sur Cancer* 164:135–145
314. Lehmann B, Meurer M (2010) Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther* 23:2–12

315. Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S (1992) Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68:377–395
316. Lemay J, Demers C, Hendy GN, Delvin EE, Gascon-Barré M (1995) Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration in vivo. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 10:1148–1157
317. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC (1985) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol Baltim Md* 1950 134:3032–3035
318. Leong J, Hughes-Fulford M, Rakhlin N, Habib A, Maclouf J, Goldyne ME (1996) Cyclooxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res* 224:79–87
319. Levine BS, Singer FR, Bryce GF, Mallon JP, Miller ON, Coburn JW (1985) Pharmacokinetics and biologic effects of calcitriol in normal humans. *J Lab Clin Med* 105:239–246
320. Lewis DA, Hengeltraub SF, Gao FC, Leivant MA, Spandau DF (2006) Aberrant NF- κ B Activity in HaCaT Cells Alters their Response to UVB Signaling. *J Invest Dermatol* 126:1885–1892
321. Li H, Li W, Wang Q (2019) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production through aryl hydrocarbon receptor/nuclear factor- κ B signaling in oral epithelial cells. *BMC Oral Health* 19:236
322. Li YC (2003) Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 88:327–331
323. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS (2015) Genomic Analysis of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 21:1447–1456
324. Li Z-D, Wang K, Yang X-W, Zhuang Z-G, Wang J-J, Tong X-W (2014) Expression of aryl hydrocarbon receptor in relation to p53 status and clinicopathological parameters in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7:7931–7937

-
325. Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283:1–5
326. Liehr JG, Roy D (1990) Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med* 8:415–423
327. Lim S-K, Ha J-M, Lee Y-H, Lee Y, Seo Y-J, Kim C-D, Lee J-H, Im M (2016) Comparison of Vitamin D Levels in Patients with and without Acne: A Case-Control Study Combined with a Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE* 11:e0161162
328. Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH (2002) Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol Baltim Md* 16:1243–1256
329. Lippke JA, Gordon LK, Brash DE, Haseltine WA (1981) Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3388–3392
330. Lira MG, Provezza L, Malerba G, Naldi L, Remuzzi G, Boschiero L, Forni A, Rugiu C, Piaserico S, Alaibac M, Turco A, Girolomoni G, Tessari G (2006) Glutathione S-transferase and CYP1A1 gene polymorphisms and non-melanoma skin cancer risk in Italian transplanted patients. *Exp Dermatol* 15:958–965
331. Liu M, Wang X, Wang L, Ma X, Gong Z, Zhang S, Li Y (2018) Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. *J Hematol Oncol* 11:100
332. Liu Y, Liang X, Yin X, Lv J, Tang K, Ma J, Ji T, Zhang H, Dong W, Jin X, Chen D, Li Y, Zhang S, Xie HQ, Zhao B, Zhao T, Lu J, Hu Z-W, Cao X, Qin FX-F, Huang B (2017) Blockade of IDO-kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. *Nat Commun* 8:15207
333. 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
334. Lo H-L, Nakajima S, Ma L, Walter B, Yasui A, Ethell DW, Owen LB (2005) Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* 5:135

335. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, Milanezi F, Paredes J, Costa JL, Schmitt F (2010) Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer* 10:483
336. Lorick KL, Toscano DL, Toscano WA (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 243:749–752
337. 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 Res* 23:828–833
338. Luecke S, Wincent E, Backlund M, Rannug U, Rannug A (2010) Cytochrome P450 1A1 gene regulation by UVB involves crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and nuclear factor κ B. *Chem Biol Interact* 184:466–473
339. 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
340. Ma Q, Lu AYH (2007) CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metab Dispos* 35:1009–1016
341. Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ (2005) Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 33:489–494
342. Madan V, Lear JT, Szeimies R-M (2010) Non-melanoma skin cancer. *The Lancet* 375:673–685
343. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C (2003) Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:223–230
344. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA (2002) Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 62:638–646

345. Makarova A, Wang G, Dolorito JA, Kc S, Libove E, Epstein EH (2017) Vitamin D3 Produced by Skin Exposure to UVR Inhibits Murine Basal Cell Carcinoma Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 137:2613–2619
346. Mammi C, Calanchini M, Antelmi A, Feraco A, Gnessi L, Falcone S, Quintarelli F, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M (2013) Bisphosphonates and adipogenesis: Evidence for alendronate inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes through a vitamin D receptor mediated effect. *Nat Sci* 05:955–962
347. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839
348. Manggau M, Kim DS, Ruwisch L, Vogler R, Korting HC, Schäfer-Korting M, Kleuser B (2001) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J Invest Dermatol* 117:1241–1249
349. Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M, Amiot M-J, Bendahan D, Bernard M, Martin J-C, Giannesini B, Landrier J-F (2014) Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem* 25:1077–1083
350. Marnett LJ, Reed GA, Dennison DJ (1978) Prostaglandin synthetase dependent activation of 7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-geno (a) pyrene to mutagenic derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 82:210–216
351. Martínez-Guzmán C, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, Murillo-González FE, Elizondo G (2020) Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) induces human glutathione S transferase alpha 1 (hGSTA1) expression. *Chem Biol Interact* 331:109284
352. Maruyama R, Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Aoki F, Shinomura Y, Imai K, Tokino T (2006) The functional relation of vitamin D receptor and p53 in cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:B133
353. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R (2005) Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 48:1247–1257
354. Matsumoto T, Ikeda K, Morita K, Fukumoto S, Takahashi H, Ogata E (1987) Blood Ca²⁺ modulates responsiveness of renal 25(OH)D₃-1 alpha-hydroxylase to PTH in rats. *Am J Physiol* 253:E503-507

355. Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:298–308
356. Matsunawa M, Amano Y, Endo K, Uno S, Sakaki T, Yamada S, Makishima M (2009) The Aryl Hydrocarbon Receptor Activator Benzo[a]pyrene Enhances Vitamin D3 Catabolism in Macrophages. *Toxicol Sci* 109:50–58
357. Matsunawa M, Akagi D, Uno S, Endo-Umeda K, Yamada S, Ikeda K, Makishima M (2012) Vitamin D Receptor Activation Enhances Benzo[a]pyrene Metabolism via CYP1A1 Expression in Macrophages. *Drug Metab Dispos* 40:2059–2066
358. Matsuoka LY, Wortsman J, Haddad JG, Hollis BW (1989) In vivo threshold for cutaneous synthesis of vitamin D3. *J Lab Clin Med* 114:301–305
359. Matthews J, Gustafsson J-Å (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4:e016
360. Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H (2010) Light, Including Ultraviolet. *J Autoimmun* 34:J247–J257
361. McCollum EV, Pitz W, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG, Bunting RW (2002) The effect of additions of fluorine to the diet of the rat on the quality of the teeth. 1925. Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. 1922. The effect of additions of fluorine to the diet of the rat on the quality of the teeth. 1925. *J Biol Chem* 277:E8
362. McGrath JJ, Féron FP, Burne THJ, Mackay-Sim A, Eyles DW (2004) Vitamin D3-implications for brain development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90:557–560
363. Meador JA, Walter RB, Mitchell DL (2000) Induction, distribution and repair of UV photodamage in the platyfish, *Xiphophorus signum*. *Photochem Photobiol* 72:260–266
364. Mellon I, Bohr VA, Smith CA, Hanawalt PC (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8878–8882
365. Memari B, Nguyen-Yamamoto L, Salehi-Tabar R, Zago M, Fritz JH, Baglolle CJ, Goltzman D, White JH (2019) Endocrine aryl hydrocarbon receptor signaling is induced by moderate cutaneous exposure to ultraviolet light. *Sci Rep* 9:
366. Meulmeester E, Jochemsen AG (2008) p53: a guide to apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 8:87–97

367. Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M (2004) Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 15:236–241
368. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 2:645–654
369. Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13:20–25
370. Minami S, Lum CA, Kitagawa KM, Namiki TS (2011) Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in melanocytic skin lesions. *Int J Dermatol* 50:24–29
371. Mitchell DL (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem Photobiol* 48:51–57
372. Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805–819
373. Mitschele T, Diesel B, Friedrich M, Meineke V, Maas RM, Gärtner BC, Kamradt J, Meese E, Tilgen W, Reichrath J (2004) Analysis of the vitamin D system in basal cell carcinomas (BCCs). *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 84:693–702
374. Mitsui H, Suárez-Fariñas M, Gulati N, Shah KR, Cannizzaro MV, Coats I, Felsen D, Krueger JG, Carucci JA (2014) Gene expression profiling of the leading edge of cutaneous squamous cell carcinoma: IL-24-driven MMP-7. *J Invest Dermatol* 134:1418–1427
375. Miyamoto H, Saura R, Harada T, Doita M, Mizuno K (2000) The role of cyclooxygenase-2 and inflammatory cytokines in pain induction of herniated lumbar intervertebral disc. *Kobe J Med Sci* 46:13–28
376. Monostory K, Pascussi J-M, Kóbori L, Dvorak Z (2009) Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab Rev* 41:547–572
377. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, Kliewer SA (2006) International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X

- receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev* 58:742–759
378. Moreau A, Maurel P, Vilarem M-J, Pascussi J-M (2007) Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: consequence on CYP24 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 360:76–82
379. Morimoto S, Kumahara Y (1985) A patient with psoriasis cured by 1 alpha-hydroxyvitamin D₃. *Med J Osaka Univ* 35:51–54
380. Morita A, Torii K, Maeda A, Yamaguchi Y (2009) Molecular Basis of Tobacco Smoke-Induced Premature Skin Aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14:53–55
381. Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O, Sartor RB (2000) Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 105:469–478
382. Mostafa WZ, Hegazy RA (2015) Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J Adv Res* 6:793–804
383. Mufti NA, Shuler ML (1996) Possible role of arachidonic acid in stress-induced cytochrome P450IA1 activity. *Biotechnol Prog* 12:847–854
384. Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A (2001) Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 488:211–231
385. Müller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmermann R, Heise H, Bayerl C, Marks F, Fürstenberger G (1999) Prostaglandin-H-synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int J Cancer* 82:648–656
386. Munkvad M (1989) A comparative trial of Clinitar* versus hydrocortisone cream in the treatment of atopic eczema. *Br J Dermatol* 121:763–766
387. Murai M, Yamamura K, Hashimoto-Hachiya A, Tsuji G, Furue M, Mitoma C (2018) Tryptophan photo-product FICZ upregulates AHR/MEK/ERK-mediated MMP1 expression: Implications in anti-fibrotic phototherapy. *J Dermatol Sci* 91:97–103
388. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S (1998) The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)₂D₃. *Biochem Biophys Res Commun* 249:11–16

389. Mutgi K, Koo J (2013) Update on the role of systemic vitamin D in atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 30:303–307
390. Nabeshima Y, Imura H (2008) alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 28:455–464
391. Nagpal S, Lu J, Boehm MF (2001) Vitamin D analogs: mechanism of action and therapeutic applications. *Curr Med Chem* 8:1661–1679
392. Nakamura M, Ueda Y, Hayashi M, Kato H, Furuhashi T, Morita A (2013) Tobacco smoke-induced skin pigmentation is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Exp Dermatol* 22:556–558
393. Nakano N, Sakata N, Katsu Y, Nochise D, Sato E, Takahashi Y, Yamaguchi S, Haga Y, Ikeno S, Motizuki M, Sano K, Yamasaki K, Miyazawa K, Itoh S (2020) Dissociation of the AhR/ARNT complex by TGF- β /Smad signaling represses CYP1A1 gene expression and inhibits benze[a]pyrene-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem* 295:9033–9051
394. Nakayama K (2010) Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:338–351
395. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL (2010) Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49:978–986
396. Narvaez CJ, Matthews D, LaPorta E, Simmons KM, Beaudin S, Welsh J (2014) The impact of vitamin D in breast cancer: genomics, pathways, metabolism. *Front Physiol* 5:213
397. Navarro-Triviño FJ, Arias-Santiago S, Gilaberte-Calzada Y (2019) Vitamin D and the Skin: A Review for Dermatologists. *Actas Dermosifiliogr* 110:262–272
398. 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. *J Invest Dermatol* 133:2763–2770
399. Nebert DW, Dalton TP (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6:947–960
400. Nebert DW (2017) Aryl hydrocarbon receptor (AHR): „pioneer member“ of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of „sensors“ of foreign and endogenous signals. *Prog Lipid Res* 67:38–57

401. Needleman P, Isakson PC (1997) The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* 49:6–8
402. Negishi T, Kato Y, Ooneda O, Mimura J, Takada T, Mochizuki H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Furusako S (2005) Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J Immunol Baltim Md* 1950 175:7348–7356
403. Negri AL (2006) Proximal tubule endocytic apparatus as the specific renal uptake mechanism for vitamin D-binding protein/25-(OH)D₃ complex. *Nephrol Carlton Vic* 11:510–515
404. Nemazannikova N, Antonas K, Dass CR (2013) Role of vitamin D metabolism in cutaneous tumour formation and progression. *J Pharm Pharmacol* 65:2–10
405. Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Müller-Decker K (2001) Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7629–7634
406. Nijsten T, Colpaert C g., Vermeulen P b., Harris A I., Van Marck E, Lambert J (2004) Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 151:837–845
407. Nilsson CB, Håkansson H (2002) The retinoid signaling system--a target in dioxin toxicity. *Crit Rev Toxicol* 32:211–232
408. Noh K, Chow ECY, Quach HP, Groothuis GMM, Tirona RG, Pang KS (2022) Significance of the Vitamin D Receptor on Crosstalk with Nuclear Receptors and Regulation of Enzymes and Transporters. *AAPS J* 24:71
409. Nohara K, Pan X, Tsukumo S-I, Hida A, Ito T, Nagai H, Inouye K, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C (2005) Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. *J Immunol Baltim Md* 1950 174:2770–2777
410. Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernández-Zapico ME, Hanahan D (2009) GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev* 23:24–36

411. Norman AW (1998) Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 67:1108–1110
412. Nutter LM, Wu YY, Ngo EO, Sierra EE, Gutierrez PL, Abul-Hajj YJ (1994) An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol* 7:23–28
413. Oda Y, Uchida Y, Moradian S, Crumrine D, Elias PM, Bikle DD (2009) Vitamin D receptor and coactivators SRC2 and 3 regulate epidermis-specific sphingolipid production and permeability barrier formation. *J Invest Dermatol* 129:1367–1378
414. O'Donnell EF, Kopparapu PR, Koch DC, Jang HS, Phillips JL, Tanguay RL, Kerkvliet NI, Kolluri SK (2012) The aryl hydrocarbon receptor mediates leflunomide-induced growth inhibition of melanoma cells. *PLoS One* 7:e40926
415. Oh SH, Kim T, Jee H, Do JE, Lee JH (2011) Combination treatment of non-segmental vitiligo with a 308-nm xenon chloride excimer laser and topical high-concentration tacalcitol: A prospective, single-blinded, paired, comparative study. *J Am Acad Dermatol* 65:428–430
416. Ohsawa M, Mizunuma H, Kagami I, Miyamoto S, Kanuma T, Ibuki Y (2000) Effect of 1,25(OH)₂D₃ on expression of estrogen receptor- α mRNA on rat osteosarcoma cell line (ROS 17/2.8). *Life Sci* 66:2465–2472
417. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423:545–550
418. Okamoto T, Mitsuhashi M, Fujita I, Sindhu RK, Kikkawa Y (1993) Induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 by hyperoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 197:878–885
419. Okey AB, Bondy GP, Mason ME, Kahl GF, Eisen HJ, Guenther TM, Nebert DW (1979) Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J Biol Chem* 254:11636–11648
420. Oksenyich V, Coin F (2010) The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle Georget Tex* 9:90–96

421. Oliveros E, Braun AM (1994) Excited states and free radicals in biology and medicine. Contributions from flash photolysis and pulse radiolysis, by R.V. Bensasson, E.J. Land and T.G. Truscott, Oxford University Press, Oxford, 1993.
422. Ono Y, Torii K, Fritsche E, Shintani Y, Nishida E, Nakamura M, Shirakata Y, Haarmann-Stemmann T, Abel J, Krutmann J, Morita A (2013) Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp Dermatol* 22:349–353
423. Osborne JE, Hutchinson PE (2002) Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br J Dermatol* 147:197–213
424. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST (2014) The Programmed Death-1 Immune Suppressive Pathway: Barrier to Anti-Tumor Immunity. *J Immunol Baltim Md* 1950 193:3835–3841
425. Owen GI, Zelent * A (2000) Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci CMLS* 57:809–827
426. Panchanathan R, Liu H, Choubey D (2015) Activation of p53 in Human and Murine Cells by DNA-Damaging Agents Differentially Regulates Aryl Hydrocarbon Receptor Levels. *Int J Toxicol* 34:242–249
427. Paraskevidis A, Drakoulis N, Roots I, Orfanos CE, Zouboulis CC (1998) Polymorphisms in the human cytochrome P-450 1A1 gene (CYP1A1) as a factor for developing acne. *Dermatol Basel Switz* 196:171–175
428. Park HY, Kim JH, Bae S, Choi YY, Park JY, Hong Y-C (2015) Interaction effect of serum 25-hydroxyvitamin D levels and CYP1A1, CYP1B1 polymorphisms on blood pressure in an elderly population. *J Hypertens* 33:69–76
429. Park JY, Shigenaga MK, Ames BN (1996) Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2322–2327
430. Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR (1982) Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol* 36:187–191
431. Parsad D, Saini R, Verma N (1998) Combination of PUVAol and topical calcipotriol in vitiligo. *Dermatol Basel Switz* 197:167–170

432. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, Pineau T, Saric J, Navarro F, Maurel P, Vilarem MJ (2005) Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 115:177–186
433. Pascussi J-M, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem M-J, Maurel P (2008) The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:1–32
434. Passarelli MN, Karagas MR, Mott LA, Rees JR, Barry EL, Baron JA (2020) Risk of keratinocyte carcinomas with vitamin D and calcium supplementation: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 112:1532–1539
435. Patel RD, Hollingshead BD, Omiecinski CJ, Perdew GH (2007) Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology* 46:209–218
436. Pathak MA, Riley FJ, Fitzpatrick TB, Curwen WL (1962) Melanin formation in human skin induced by long-wave ultra-violet and visible light. *Nature* 193:148–150
437. Peña-Díaz J, Bregenhorn S, Ghodgaonkar M, Follonier C, Artola-Borán M, Castor D, Lopes M, Sartori AA, Jiricny J (2012) Noncanonical mismatch repair as a source of genomic instability in human cells. *Mol Cell* 47:669–680
438. Penna G, Adorini L (2000) $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *J Immunol* 164:2405–2411
439. Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L (2006) Treatment of experimental autoimmune prostatitis in nonobese diabetic mice by the vitamin D receptor agonist elocalcitol. *J Immunol Baltim Md 1950* 177:8504–8511
440. Perner D, Vierkötter A, Sugiri D, Matsui M, Ranft U, Esser C, Ethève S, Goralczyk R, Kaneko N, Yamamoto A, Morita A, Krutmann J, Krämer U (2011) Association between sun-exposure, smoking behaviour and plasma antioxidant levels with the different manifestation of skin ageing signs between Japanese and German women—A pilot study. *J Dermatol Sci* 62:138–140

441. Peroni D g., Piacentini G I., Cametti E, Chinellato I, Boner A I. (2011) Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol* 164:1078–1082
442. Peters AC, Young LC, Maeda T, Tron VA, Andrew SE (2003) Mammalian DNA mismatch repair protects cells from UVB-induced DNA damage by facilitating apoptosis and p53 activation. *DNA Repair* 2:427–435
443. Petrusis JR, Perdew GH (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 141:25–40
444. Pfaffl MW Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 4
445. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, Drummond JA, Peng SA, Saade RE, Tsai KY, Curry JL, Tetzlaff MT, Lai SY, Yu J, Muzny DM, Doddapaneni H, Shinbrot E, Covington KR, Zhang J, Seth S, Caulin C, Clayman GL, El-Naggar AK, Gibbs RA, Weber RS, Myers JN, Wheeler DA, Frederick MJ (2014) Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 20:6582–6592
446. Picotto G, Liaudat AC, Bohl L, Talamoni NT de (2012) Molecular Aspects of Vitamin D Anticancer Activity. *Cancer Invest* 30:604–614
447. Piotrowska A, Wierzbicka J, Żmijewski MA (2016) Vitamin D in the skin physiology and pathology. *Acta Biochim Pol* 63:17–29
448. Plaza SM, Lamson DW (2005) Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev J Clin Ther* 10:24–35
449. 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
450. Poland A, Knutson JC (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:517–554
451. 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-Stemmann T (2018) The AHR represses nucleotide excision repair and apoptosis and contributes to UV-induced skin carcinogenesis. *Cell Death Differ* 25:1823–1836

452. Pommergaard H-C, Burcharth J, Rosenberg J, Raskov H (2013) Combination chemoprevention with diclofenac, calcipotriol and difluoromethylornithine inhibits development of non-melanoma skin cancer in mice. *Anticancer Res* 33:3033–3039
453. Pommergaard H-C, Burcharth J, Rosenberg J, Raskov H (2014) Topical combination of diclofenac, calcipotriol, and difluoromethylornithine has beneficial effects comparable to 5-fluorouracil for the treatment of non-melanoma skin cancer in mice. *J Chemother Florence Italy* 26:105–110
454. Probst MR, Reisz-Porszasz S, Agbunag RV, Ong MS, Hankinson O (1993) Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action. *Mol Pharmacol* 44:511–518
455. Prosser DE, Jones G (2004) Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 29:664–673
456. Qin H, Powell-Coffman JA (2004) The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev Biol* 270:64–75
457. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2001) Ultraviolet Irradiation Blocks Cellular Responses to Transforming Growth Factor- β by Down-regulating Its Type-II Receptor and Inducing Smad7*. *J Biol Chem* 276:26349–26356
458. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2005) Ultraviolet Irradiation Induces Smad7 via Induction of Transcription Factor AP-1 in Human Skin Fibroblasts*. *J Biol Chem* 280:8079–8085
459. Ramachandran S, Lear JT, Ramsay H, Smith AG, Bowers B, Hutchinson PE, Jones PW, Fryer AA, Strange RC (1999) Presentation with multiple cutaneous basal cell carcinomas: association of glutathione S-transferase and cytochrome P450 genotypes with clinical phenotype. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 8:61–67
460. 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. *J Biol Chem* 262:15422–15427
461. Rannug U, Rannug A, Sjöberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J (1995) Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2:841–845

462. Rasmussen MK, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S (2017) Activation of the aryl hydrocarbon receptor decreases rifampicin-induced CYP3A4 expression in primary human hepatocytes and HepaRG. *Toxicol Lett* 277:1–8
463. Rasmussen R (2001) *Quantification on the LightCycler*. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3
464. Rass K, Reichrath J (2008) *UV Damage and DNA Repair in Malignant Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer*. Springer, New York, NY. URL: https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_13
465. Ratnam AV, Bikle DD, Su MJ, Pillai S (1996) Squamous carcinoma cell lines fail to respond to 1,25-Dihydroxyvitamin D despite normal levels of the vitamin D receptor. *J Invest Dermatol* 106:522–525
466. Ratnam AV, Bikle DD, Cho JK (1999) 1,25 dihydroxyvitamin D3 enhances the calcium response of keratinocytes. *J Cell Physiol* 178:188–196
467. Ravid A, Shenker O, Buchner-Maman E, Rotem C, Koren R (2016) Vitamin D Induces Cyclooxygenase 2 Dependent Prostaglandin E2 Synthesis in HaCaT Keratinocytes. *J Cell Physiol* 231:837–843
468. Reddy KK (2013) Vitamin D level and basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J Invest Dermatol* 133:589–592
469. Reichel H, Norman AW (1989) Systemic effects of vitamin D. *Annu Rev Med* 40:71–78
470. Reichrath J, Hugel U, Klaus G, Fusenig NE, Rauterberg EW (1993) *Modulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Receptor Expression in HaCaT Keratinocytes*. Springer, Berlin, Heidelberg
471. Reichrath J, Kamradt J, Zhu XH, Kong XF, Tilgen W, Holick MF (1999) Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptors (VDR) in basal cell carcinomas. *Am J Pathol* 155:583–589
472. Reichrath J, Rafi L, Rech M, Mitschele T, Meineke V, Gartner BC, Tilgen W, Holick MF (2004) Analysis of the vitamin D system in cutaneous squamous cell carcinomas. *J Cutan Pathol* 31:224–231
473. Reichrath J, Schuler Ch, Seifert M, Zouboulis Ch, Tilgen W (2006) The vitamin D endocrine system of human sebocytes. *Exp Dermatol* 15:643–648

474. Reichrath J, Herausgeber (2006) Molecular mechanisms of basal cell and squamous cell carcinomas. Landes Bioscience/Eurekah.com ; Springer Science+Business Media, Georgetown, Tex. : New York, N.Y
475. Reichrath J (2007) Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Exp Dermatol* 16:618–625
476. Reichrath J, Saturnus R, Vogt T (2017) Endocrine actions of vitamin D in skin: Relevance for photocarcinogenesis of non-melanoma skin cancer, and beyond. *Mol Cell Endocrinol* 453:96–102
477. Reisz-Porszasz S, Reyes H, DeLuca HF, Prah JM, Hankinson O (1993) Investigation on the potential role of the Ah receptor nuclear translocator protein in vitamin D receptor action. *J Recept Res* 13:1147–1159
478. Rendic S, Guengerich FP (2012) Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol* 25:1316–1383
479. Reschly EJ, Krasowski MD (2006) Evolution and Function of the NR11 Nuclear Hormone Receptor Subfamily (VDR, PXR, and CAR) with Respect to Metabolism of Xenobiotics and Endogenous Compounds. *Curr Drug Metab* 7:349–365
480. Ricciotti E, FitzGerald GA (2011) Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:986–1000
481. Ridd K, Dhir S, Smith AG, Gant TW (2010) Defective TPA signalling compromises HaCat cells as a human in vitro skin carcinogenesis model. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 24:910–915
482. Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M (2014) An Extended Δ CT-Method Facilitating Normalisation with Multiple Reference Genes Suited for Quantitative RT-PCR Analyses of Human Hepatocyte-Like Cells. *PLoS ONE* 9:e93031
483. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci CMLS* 66:981–993
484. Rollakanti K, Anand S, Maytin EV (2015) Topical calcitriol prior to photodynamic therapy enhances treatment efficacy in non-melanoma skin cancer mouse models. *Proc SPIE-- Int Soc Opt Eng* 9308:93080Q

485. Rook GA, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O’Riordan J, Stanford J (1986) Vitamin D₃, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology* 57:159–163
486. Rosenberg AR, Tabacchi M, Ngo KH, Wallendorf M, Rosman IS, Cornelius LA, Demehri S (2019) Skin cancer precursor immunotherapy for squamous cell carcinoma prevention. *JCI Insight* 4:125476
487. Rosette C, Karin M (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274:1194–1197
488. Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706–5715
489. Routaboul C, Denis A, Vinche A (1999) Immediate pigment darkening: description, kinetic and biological function. *Eur J Dermatol EJD* 9:95–99
490. Rowe JM, Welsh C, Pena RN, Wolf CR, Brown K, Whitelaw CBA (2008) Illuminating Role of CYP1A1 in Skin Function. *J Invest Dermatol* 128:1866–1868
491. Rowlands JC, McEwan IJ, Gustafsson JA (1996) Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Mol Pharmacol* 50:538–548
492. Rundhaug JE, Simper MS, Surh I, Fischer SM (2011) The role of the EP receptors for prostaglandin E₂ in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:465–480
493. Rø B, Se W, O K (1985) Ultrastructural development of hyperosteoridosis in 1,25(OH)₂D₃-treated rats fed high levels of dietary calcium. *Bone* 6:
494. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491
495. Saintigny Y, Delacôte F, Boucher D, Averbek D, Lopez BS (2007) XRCC4 in G₁ suppresses homologous recombination in S/G₂, in G₁ checkpoint-defective cells. *Oncogene* 26:2769–2780
496. Sakaki T, Sawada N, Nonaka Y, Ohyama Y, Inouye K (1999) Metabolic studies using recombinant *escherichia coli* cells producing rat mitochondrial CYP24 CYP24 can convert 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ to calcitric acid. *Eur J Biochem* 262:43–48

497. Sakaki T, Sawada N, Komai K, Shiozawa S, Yamada S, Yamamoto K, Ohyama Y, Inouye K (2000) Dual metabolic pathway of 25-hydroxyvitamin D3 catalyzed by human CYP24. *Eur J Biochem* 267:6158–6165
498. Saleh HMA, Abdel Fattah NSA, Hamza H-TMM (2013) Evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D levels in vitiligo patients with and without autoimmune diseases. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 29:34–40
499. Saleh-Gohari N, Helleday T (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32:3683–3688
500. San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77:229–257
501. Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103:2203–2237
502. Sancar A, Reardon JT (2004) Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* 69:43–71
503. Santes-Palacios R, Ornelas-Ayala D, Cabañas N, Marroquín-Pérez A, Hernández-Magaña A, Del Rosario Olguín-Reyes S, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ (2016) Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention? *BioMed Res Int* 2016:5341081
504. Sarić N, Selby M, Ramaswamy V, Kool M, Stockinger B, Hogstrand C, Williamson D, Marino S, Taylor MD, Clifford SC, Basson MA (2020) The AHR pathway represses TGF β -SMAD3 signalling and has a potent tumour suppressive role in SHH medulloblastoma. *Sci Rep* 10:148
505. Sato Y, Fujimura T, Hidaka T, Lyu C, Tanita K, Matsushita S, Yamamoto M, Aiba S (2020) Possible Roles of Proinflammatory Signaling in Keratinocytes Through Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands for the Development of Squamous Cell Carcinoma. *Front Immunol* 11:534323
506. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, Büchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich YR, Kang S, Elalieh HZ, Steinmeyer A, Zügel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL (2007) Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 117:803–811

507. Schmidt JV, Bradfield CA (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:55–89
508. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6731–6736
509. Schmitt J, Schmitt NM, Kirch W, Meurer M (2009) [Significance of atopic dermatitis in outpatient medical care. Analysis of health care data from Saxony]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb* 60:320–327
510. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101–1108
511. Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I (2001) Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids* 66:399–408
512. Schulman SG (1992) *Bioorganic photochemistry, volume 1: Photochemistry and the nucleic acids*. Edited by H. Morrison, Wiley-Interscience: New York, 1990. ix + 437 pp. 25 x 17 cm. ISBN 0-471-62987-1. \$59.95. *J Pharm Sci* 81:112–112
513. Schürer N, Köhne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G (1993) Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* 2:179–185
514. Schwarz D, Kisselev P, Ericksen SS, Szklarz GD, Chernogolov A, Honeck H, Schunck W-H, Roots I (2004) Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem Pharmacol* 67:1445–1457
515. Schwarz U, Amann K, Orth SR, Simonaviciene A, Wessels S, Ritz E (1998) Effect of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ on glomerulosclerosis in subtotally nephrectomized rats. *Kidney Int* 53:1696–1705
516. Schwetz V, Trummer C, Pandis M, Grüber MR, Verheyen N, Gaksch M, Zittermann A, März W, Aberer F, Lang A, Treiber G, Friedl C, Obermayer-Pietsch B, Pieber TR, Tomaschitz A, Pilz S (2017) Effects of Vitamin D Supplementation on Bone Turnover Markers: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 9:E432

517. Seeberg E, Eide L, Bjørås M (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20:391–397
518. Shabahang M, Buras RR, Davoodi F, Schumaker LM, Nauta RJ, Evans SR (1993) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res* 53:3712–3718
519. Sher E, Eisman JA, Moseley JM, Martin TJ (1981) Whole-cell uptake and nuclear localization of 1,25-dihydroxycholecalciferol by breast cancer cells (T47 D) in culture. *Biochem J* 200:315–320
520. Shi M, Grabner A, Wolf M (2021) Importance of Extra-Renal CYP24A1 Expression for Maintaining Mineral Homeostasis. *J Endocr Soc* 5:A234
521. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T (2004) FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 19:429–435
522. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561–568
523. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2004) FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 314:409–414
524. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 95:1–6
525. Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56:387–437
526. Simon LS (1999) Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 106:37S–42S
527. Singer VL, Lawlor TE, Yue S (1999) Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian

- microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 439:37–47
528. Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B (2019) Potential Molecular Mechanisms of the Anti-cancer Activity of Vitamin D. *Anticancer Res* 39:3353–3363
529. Slominski AT, Zmijewski MA, Semak I, Zbytek B, Pisarchik A, Li W, Zjawiony J, Tuckey RC (2014) Cytochromes p450 and skin cancer: role of local endocrine pathways. *Anticancer Agents Med Chem* 14:77–96
530. Slominski AT, Kim T-K, Takeda Y, Janjetovic Z, Brożyna AA, Skobowiat C, Wang J, Postlethwaite A, Li W, Tuckey RC, Jetten AM (2014) ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 28:2775–2789
531. Slominski AT, Brożyna A, Jozwicki W, Tuckey RC (2015) Vitamin D as an adjuvant in melanoma therapy. *Melanoma Manag* 2:1–4
532. Slominski AT, Kim T-K, Hobrath JV, Oak ASW, Tang EKY, Tieu EW, Li W, Tuckey RC, Jetten AM (2017) Endogenously produced nonclassical vitamin D hydroxy-metabolites act as „biased“ agonists on VDR and inverse agonists on ROR α and ROR γ . *J Steroid Biochem Mol Biol* 173:42–56
533. Slominski AT, Kim T-K, Janjetovic Z, Brożyna AA, Żmijewski MA, Xu H, Sutter TR, Tuckey RC, Jetten AM, Crossman DK (2018) Differential and Overlapping Effects of 20,23(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂D₃ on Gene Expression in Human Epidermal Keratinocytes: Identification of AhR as an Alternative Receptor for 20,23(OH)₂D₃. *Int J Mol Sci* 19:
534. Smith CAD, Smith G, Wolf CR (1994) Genetic polymorphisms in xenobiotic metabolism. *Eur J Cancer* 30:1921–1935
535. Smith EL, Walworth NC, Holick MF (1986) Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J Invest Dermatol* 86:709–714
536. Smith G, Ibbotson SH, Comrie MM, Dawe RS, Bryden A, Ferguson J, Wolf CR (2006) Regulation of cutaneous drug-metabolizing enzymes and cytoprotective gene expression by topical drugs in human skin in vivo. *Br J Dermatol* 155:275–281

537. Smith KJ, Murray IA, Boyer JA, Perdew GH (2018) Allelic variants of the aryl hydrocarbon receptor differentially influence UVB-mediated skin inflammatory responses in SKH1 mice. *Toxicology* 394:27–34
538. Smith WL, Dewitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 62:167–215
539. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145–182
540. Soares CD, Borges CF, Sena-Filho M, Almeida OP de, Stelini RF, Cintra ML, Graner E, Zecchin KG, Jorge J (2017) Prognostic significance of cyclooxygenase 2 and phosphorylated Akt1 overexpression in primary nonmetastatic and metastatic cutaneous melanomas. *Melanoma Res* 27:448–456
541. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy ON (1997) Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci J Virtual Libr* 2:d538-551
542. Soleymani T, Hung T, Soung J (2015) The role of vitamin D in psoriasis: a review. *Int J Dermatol* 54:383–392
543. Somjen D, Grafi-Cohen M, Posner GH, Sharon O, Kraiem Z, Stern N (2013) Vitamin D less-calcemic analog modulates the expression of estrogen receptors, vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase 25-hydroxy vitamin D in human thyroid cancer cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:80–82
544. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems NY, Dimon M, Arron ST, Kluk MJ, Aster JC, McHugh A, Xue DJ, Dayal JHS, Robinson KS, Hasan Rizvi SM, Proby CM, Harwood CA, Leigh IM (2014) NOTCH1 Mutations Occur Early during Cutaneous Squamous Cell Carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 134:2630–2638
545. Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC (2006) Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 372:33–42
546. Sridhar J, Goyal N, Liu J, Foroozesh M (2017) Review of Ligand Specificity Factors for CYP1A Subfamily Enzymes from Molecular Modeling Studies Reported to-Date. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* 22:1143

547. Stambolsky P, Tabach Y, Fontemaggi G, Weisz L, Maor-Aloni R, Siegfried Z, Sigfried Z, Shiff I, Kogan I, Shay M, Kalo E, Blandino G, Simon I, Oren M, Rotter V (2010) Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* 17:273–285
548. Stepankova M, Pastorkova B, Bachleda P, Dvorak Z (2017) Itraconazole cis-diastereoisomers activate aryl hydrocarbon receptor AhR and pregnane X receptor PXR and induce CYP1A1 in human cell lines and human hepatocytes. *Toxicology* 383:40–49
549. Stiborová M, Martínek V, Rýdlová H, Koblas T, Hodek P (2005) Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers. *Cancer Lett* 220:145–154
550. Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2:223–232
551. Sutter TR, Guzman K, Dold KM, Greenlee WF (1991) Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 254:415–418
552. Sutton ALM, MacDonald PN (2003) Vitamin D: more than a „bone-a-fide“ hormone. *Mol Endocrinol Baltim Md* 17:777–791
553. Swanson HI (2004) Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem Biol Interact* 149:69–79
554. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, Wiese R, DeLuca HF (1991) The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 11:168–173
555. Takami M, Fujimaki K, Nishimura MI, Iwashima M (2015) Cutting Edge: AhR Is a Molecular Target of Calcitriol in Human T Cells. *J Immunol Baltim Md* 195:2520–2523
556. Takami M, Fujimaki K, Nishimura M, Iwashima M (2015) AhR is a molecular target of Calcitriol in human T cells. *J Immunol Baltim Md* 195:2520–2523
557. Tan Z, Chang X, Puga A, Xia Y (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem Pharmacol* 64:771–780

558. Tanabe T, Tohnai N (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68–69:95–114
559. Tanaka H, Ono Y, Nakata S, Shintani Y, Sakakibara N, Morita A (2007) Tobacco smoke extract induces premature skin aging in mouse. *J Dermatol Sci* 46:69–71
560. Tanaka Y, DeLuca HF (1984) Rat renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1- and 24-hydroxylases: their in vivo regulation. *Am J Physiol* 246:E168-173
561. Tanaka Y, Uchi H, Ito T, Furue M (2019) Indirubin-pregnane X receptor-JNK axis accelerates skin wound healing. *Sci Rep* 9:18174
562. Tang JY, So P-L, Epstein EH (2007) Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:257–264
563. Tang JY, Xiao TZ, Oda Y, Chang KS, Shpall E, Wu A, So P-L, Hebert J, Bikle D, Epstein EH (2011) Vitamin D₃ inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res Phila Pa* 4:744–751
564. Tang JY, Fu T, Lau C, Oh DH, Bikle DD, Asgari MM (2012) Vitamin D in cutaneous carcinogenesis: part II. *J Am Acad Dermatol* 67:817.e1–11; quiz 827–828
565. Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Inoue H, Bowden GT (2001) Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene* 20:5164–5172
566. Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden GT (2001) Roles of Akt and glycogen synthase kinase 3 β in the ultraviolet B induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Cancer Res* 61:4329–4332
567. Tapia C, Zamarreño F, Salvador GA, Casali CI, Viso J, Fernandez M del C, White JH, González-Pardo V (2020) Down-regulation of COX-2 activity by 1 α ,25(OH)₂D₃ is VDR dependent in endothelial cells transformed by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Heliyon* 6:
568. Taylor JS, Cohrs MP (1987) DNA, light, and Dewar pyrimidinones: the structure and biological significance to TpT₃. *J Am Chem Soc* 109:2834–2835
569. Taylor JS, Lu HF, Kotyk JJ (1990) Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol* 51:161–167

570. Taylor JS (1994) Unraveling the Molecular Pathway from Sunlight to Skin Cancer. *Acc Chem Res* 27:76–82
571. Thill M, Woeste A, Reichert K, Fischer D, Rody A, Friedrich M, Köster F (2015) Vitamin D inhibits ovarian cancer cell line proliferation in combination with celecoxib and suppresses cyclooxygenase-2 expression. *Anticancer Res* 35:1197–1203
572. Thomae TL, Glover E, Bradfield CA (2004) A Maternal Ahr Null Genotype Sensitizes Embryos to Chemical Teratogenesis*. *J Biol Chem* 279:30189–30194
573. Thomsen JS, Wang X, Hines RN, Safe S (1994) Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis* 15:933–937
574. Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson AB, Gallo MA (1999) Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274:510–515
575. Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, Lee CA, Spalding J, Sessoms A, Dunson DB, Rogan EG, Morham SG, Smart RC, Langenbach R (2002) Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Res* 62:3395–3401
576. Tobin D, van Hogerlinden M, Toftgård R (1998) UVB-induced association of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF receptor-associated factor-2 mediates activation of Rel proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:565–569
577. Townsend K, Banwell CM, Guy M, Colston KW, Mansi JL, Stewart PM, Campbell MJ, Hewison M (2005) Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11:3579–3586
578. Trémezaygues LL (2009) In vitro Untersuchungen in humanen Keratinozyten über mögliche protektive Eigenschaften von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 gegen UVB- und niedrigdosierte ionisierende Strahlung.
579. Tsai C-F, Hsieh T-H, Lee J-N, Hsu C-Y, Wang Y-C, Lai F-J, Kuo K-K, Wu H-L, Tsai E-M, Kuo P-L (2014) Benzyl butyl phthalate induces migration, invasion, and angiogenesis of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through nongenomic AhR/G-protein signaling. *BMC Cancer* 14:556

580. Tsai PC, Huang W, Lee Y-C, Chan SH, Guo YL (2006) Genetic polymorphisms in CYP1A1 and GSTM1 predispose humans to PCBs/PCDFs-induced skin lesions. *Chemosphere* 63:1410–1418
581. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3336–3340
582. Tu C-L, Chang W, Bikle DD (2001) The Extracellular Calcium-sensing Receptor Is Required for Calcium-induced Differentiation in Human Keratinocytes*. *J Biol Chem* 276:41079–41085
583. Tuohimaa P, Pukkala E, Scélo G, Olsen JH, Brewster DH, Hemminki K, Tracey E, Weiderpass E, Kliewer EV, Pompe-Kirn V, McBride ML, Martos C, Chia K-S, Tonita JM, Jonasson JG, Boffetta P, Brennan P (2007) Does solar exposure, as indicated by the non-melanoma skin cancers, protect from solid cancers: Vitamin D as a possible explanation. *Eur J Cancer* 43:1701–1712
584. Turunen MM, Dunlop TW, Carlberg C, Väisänen S (2007) Selective use of multiple vitamin D response elements underlies the 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated negative regulation of the human CYP27B1 gene. *Nucleic Acids Res* 35:2734–2747
585. Udompataikul M, Huajai S, Chalermchai T, Taweechotipatr M, Kamanamool N (2015) The Effects of Oral Vitamin D Supplement on Atopic Dermatitis: A Clinical Trial with *Staphylococcus aureus* Colonization Determination. *J Med Assoc Thai Chotmaihet Thangphaet* 98 Suppl 9:S23-30
586. Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, Hofman A, Birkenhäger JC, Van Leeuwen JP (1996) A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 11:1241–1248
587. Ullrich SE (2005) Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutat Res* 571:185–205
588. Umemura N, Zhu J, Mburu YK, Forero A, Hsieh PN, Muthuswamy R, Kalinski P, Ferris RL, Sarkar SN (2012) Defective NF- κ B signaling in metastatic head and neck cancer cells leads to enhanced apoptosis by dsRNA. *Cancer Res* 72:45–55
589. Vågero D, Ringbäck G, Kiviranta H (1986) Melanoma and other tumors of the skin among office, other indoor and outdoor workers in Sweden 1961-1979. *Br J Cancer* 53:507–512

590. Väisänen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, Frank C, Carlberg C (2005) Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃. *J Mol Biol* 350:65–77
591. Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C (2011) Vitamin D in autoimmune, infectious and allergic diseases: a vital player? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:617–632
592. Vanden Heuvel JP, Clark GC, Thompson CL, McCoy Z, Miller CR, Lucier GW, Bell DA (1993) CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14:2003–2006
593. Vanderveen EE, Grekin RC, Swanson NA, Kragballe K (1986) Arachidonic acid metabolites in cutaneous carcinomas. Evidence suggesting that elevated levels of prostaglandins in basal cell carcinomas are associated with an aggressive growth pattern. *Arch Dermatol* 122:407–412
594. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44:619–626
595. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF (2000) Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374:334–338
596. Vermeulen W, Fousteri M (2013) Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012625
597. Vierkötter A, Krutmann J (2012) Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. *Dermatoendocrinol* 4:227–231
598. Vishlaghi N, Lisse TS (2020) Exploring vitamin D signalling within skin cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 92:273–281
599. Vitaliano PP, Urbach F (1980) The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. *Arch Dermatol* 116:454–456
600. Vogeley C, Esser C, Tüting T, Krutmann J, Haarmann-Stemmann T (2019) Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Environmentally Induced Skin Aging and Skin Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 20:
601. von Schmiedeberg S, Fritsche E, Rönnau AC, Specker C, Golka K, Richter-Hintz D, Schuppe H-C, Lehmann P, Ruzicka T, Esser C, Abel J, Gleichmann E (1999)

- Polymorphisms of the Xenobiotic-Metabolizing Enzymes CYP1A1 and NAT-2 in Systemic Sclerosis and Lupus Erythematosus. Springer US, Boston, MA. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4857-7_21
602. Walters MR, Hunziker W, Konami D, Norman AW (1981) Factors affecting the distribution and stability of unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. *J Recept Res* 2:331–346
603. Walters SN, Reinhardt TA, Dominick MA, Horst RL, Littledike ET (1986) Intracellular location of unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D receptors: a nuclear-cytoplasmic equilibrium. *Arch Biochem Biophys* 246:366–373
604. Wan YS, Wang ZQ, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ (2001) Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *Int J Oncol* 18:461–466
605. Wang C, Chen Q, Hamajima Y, Sun W, Zheng Y-Q, Hu X-H, Ondrey FG, Lin J-Z (2012) Id2 regulates the proliferation of squamous cell carcinoma in vitro via the NF- κ B/Cyclin D1 pathway. *Chin J Cancer* 31:430–439
606. Wang G-Z, Zhang L, Zhao X-C, Gao S-H, Qu L-W, Yu H, Fang W-F, Zhou Y-C, Liang F, Zhang C, Huang Y-C, Liu Z, Fu Y-X, Zhou G-B (2019) The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy. *Nat Commun* 10:1125
607. Wang J, Lu Z, Au JL-S (2006) Protection Against Chemotherapy-Induced Alopecia. *Pharm Res* 23:2505–2514
608. Wang L-E, Li C, Strom SS, Goldberg LH, Brewster A, Guo Z, Qiao Y, Clayman GL, Lee JJ, El-Naggar AK, Prieto VG, Duvic M, Lippman SM, Weber RS, Kripke ML, Wei Q (2007) Repair Capacity for UV Light-Induced DNA Damage Associated with Risk of Nonmelanoma Skin Cancer and Tumor Progression. *Clin Cancer Res* 13:6532–6539
609. Wang P-W, Hung Y-C, Lin T-Y, Fang J-Y, Yang P-M, Chen M-H, Pan T-L (2019) Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry. *Antioxidants* 8:
610. Wang Q, He Y, Shen Y, Zhang Q, Chen D, Zuo C, Qin J, Wang H, Wang J, Yu Y (2014) Vitamin D Inhibits COX-2 Expression and Inflammatory Response by Targeting Thioesterase Superfamily Member 4. *J Biol Chem* 289:11681–11694

611. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH (2004) Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J Immunol* 173:2909–2912
612. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF (2012) Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 523:123–133
613. Wang Z, Lin YS, Zheng XE, Senn T, Hashizume T, Scian M, Dickmann LJ, Nelson SD, Baillie TA, Hebert MF, Blough D, Davis CL, Thummel KE (2012) An inducible cytochrome P450 3A4-dependent vitamin D catabolic pathway. *Mol Pharmacol* 81:498–509
614. Wang Z, Lin YS, Dickmann LJ, Poulton E-J, Eaton DL, Lampe JW, Shen DD, Davis CL, Shuhart MC, Thummel KE (2013) Enhancement of hepatic 4-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 through CYP3A4 induction in vitro and in vivo: Implications for drug-induced osteomalacia. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 28:1101–1116
615. Wanner R, Brömmer S, Czarnetzki BM, Rosenbach T (1995) The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 209:706–711
616. Wasiewicz T, Szyszka P, Cichorek M, Janjetovic Z, Tuckey RC, Slominski AT, Zmijewski MA (2015) Antitumor effects of vitamin D analogs on hamster and mouse melanoma cell lines in relation to melanin pigmentation. *Int J Mol Sci* 16:6645–6667
617. Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 268:20175–20178
618. Waxman DJ (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 369:11–23
619. Wecksler WR, Okamura WH, Norman AW (1978) Studies on the mode of action of vitamin D--XIV. Quantitative assessment of the structural requirements for the interaction of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 with its chick intestinal mucosa receptor system. *J Steroid Biochem* 9:929–937
620. Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR (1996) Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res* 56:3975–3979

621. Weisz J, Bui QD, Roy D, Liehr JG (1992) Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens. *Endocrinology* 131:655–661
622. Weitzman SA, Gordon LI (1990) Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76:655–663
623. Weston WM, Nugent P, Greene RM (1995) Inhibition of retinoic-acid-induced gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 207:690–694
624. Whitlock JP (1999) Induction of Cytochrome P4501a1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103–125
625. Wilgus TA, Ross MS, Parrett ML, Oberyszyn TM (2000) Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62:367–384
626. Wilgus TA, Parrett ML, Ross MS, Tober KL, Robertson FM, Oberyszyn TM (2002) Inhibition of ultraviolet light B-induced cutaneous inflammation by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Adv Exp Med Biol* 507:85–92
627. Wilkens MR, Maté LM, Schnepel N, Klinger S, Muscher-Banse AS, Ballent M, Virkel G, Lifschitz AL (2016) Influence of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol* 164:271–276
628. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ (2014) Prescott's microbiology. Ninth edition edition. McGraw-Hill, New York, NY
629. Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR (1997) Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388:495–498
630. 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-Formylindolo[3,2-b]carbazole Is Present in Humans*. *J Biol Chem* 284:2690–2696
631. Wohak LE, Krais AM, Kucab JE, Stertmann J, Øvrebø S, Seidel A, Phillips DH, Arlt VM (2016) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism. *Arch Toxicol* 90:291–304

-
632. Wolf G (2004) The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *J Nutr* 134:1299–1302
633. Wong G, Gupta R, Dixon KM, Deo SS, Choong SM, Halliday GM, Bishop JE, Ishizuka S, Norman AW, Posner GH, Mason RS (2004) 1,25-Dihydroxyvitamin D and three low-calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90:567–570
634. Wood AW, Chang RL, Huang MT, Uskokovic M, Conney AH (1983) 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits phorbol ester-dependent chemical carcinogenesis in mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun* 116:605–611
635. Wu J, Garami M, Cao L, Li Q, Gardner DG (1995) 1,25(OH)₂D₃ suppresses expression and secretion of atrial natriuretic peptide from cardiac myocytes. *Am J Physiol* 268:E1108-1113
636. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Dixon D, Gagne G (2006) Vitamin D receptor (VDR) localization in human promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 47:727–732
637. Xu X, Fu W-W, Wu W-Y (2012) Serum 25-Hydroxyvitamin D Deficiency in Chinese Patients with Vitiligo: A Case-Control Study. *PLOS ONE* 7:e52778
638. Xu Y, Voorhees JJ, Fisher GJ (2006) Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am J Pathol* 169:823–830
639. Yagci A, Werner A, Murer H, Biber J (1992) Effect of rabbit duodenal mRNA on phosphate transport in *Xenopus laevis* oocytes: dependence on 1,25-dihydroxy-vitamin-D₃. *Pflugers Arch* 422:211–216
640. Yengi L, Inskip A, Gilford J, Aldersea J, Bailey L, Smith A, Lear JT, Heagerty AH, Bowers B, Hand P, Hayes JD, Jones PW, Strange RC, Fryer AA (1996) Polymorphism at the glutathione S-transferase locus GSTM3: interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res* 56:1974–1977
641. Youssef A, Koschembahr 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. *Photochem Photobiol* 95:237–243

642. Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Näär AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG (1991) RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67:1251–1266
643. Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, Zhang F, Davis SI, Garringer HJ, Linhardt RJ, Ornitz DM, Mohammadi M, White KE (2005) Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 146:4647–4656
644. Zbytek B, Janjetovic Z, Tuckey RC, Zmijewski MA, Sweatman TW, Jones E, Nguyen MN, Slominski AT (2008) 20-Hydroxyvitamin D₃, a product of vitamin D₃ hydroxylation by cytochrome P450_{11β}, stimulates keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 128:2271–2280
645. Zhalehjoo N, Shakiba Y, Panjehpour M (2017) Gene expression profiles of CYP24A1 and CYP27B1 in malignant and normal breast tissues. *Mol Med Rep* 15:467–473
646. Zhang M, Wang L, Zhong D (2017) Photolyase: Dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair. *Arch Biochem Biophys* 632:158–174
647. Zhang S, Qin C, Safe SH (2003) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ Health Perspect* 111:1877–1882
648. Zhao X, Nadji S, Kao JL, Taylor JS (1996) The structure of d(TpA), the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res* 24:1554–1560
649. Zhao X, Taylor JS (1996) Mutation spectra of TA*, the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions. *Nucleic Acids Res* 24:1561–1565
650. Zhao Z, Kosinska W, Khmel'nitsky M, Cavalieri EL, Rogan EG, Chakravarti D, Sacks PG, Guttenplan JB (2006) Mutagenic activity of 4-hydroxyestradiol, but not 2-hydroxyestradiol, in BB rat2 embryonic cells, and the mutational spectrum of 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol* 19:475–479
651. Zheng W, Duan B, Zhang Q, Ouyang L, Peng W, Qian F, Wang Y, Huang S (2018) Vitamin D-induced vitamin D receptor expression induces tamoxifen sensitivity in MCF-7 stem cells via suppression of Wnt/β-catenin signaling. *Biosci Rep* 38:

652. Zhu Q, Wani MA, El-Mahdy M, Wani AA (2000) Decreased DNA repair efficiency by loss or disruption of p53 function preferentially affects removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and slow repair sites in transcribed strand. *J Biol Chem* 275:11492–11497
653. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103
654. Zittermann A (2022) *Stoffwechsel*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. URL: https://link.springer.com/10.1007/978-3-662-65716-4_4
655. Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, Nakajima S, Yasui A, Ishchenko AA, Kannouche PL (2011) The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell* 43:649–662
656. Zmijewski MA, Li W, Chen J, Kim T-K, Zjawiony JK, Sweatman TW, Miller DD, Slominski AT (2011) Synthesis and photochemical transformation of 3 β ,21-dihydroxypregna-5,7-dien-20-one to novel secosteroids that show anti-melanoma activity. *Steroids* 76:193–203
657. Zou Y, Van Houten B (1999) Strand opening by the UvrA(2)B complex allows dynamic recognition of DNA damage. *EMBO J* 18:4889–4901
658. Zurer I, Hofseth LJ, Cohen Y, Xu-Welliver M, Hussain SP, Harris CC, Rotter V (2004) The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. *Carcinogenesis* 25:11–19
659. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761–771
660. (2008) Kohler Research Group. URL: <https://web.archive.org/web/20080605132806/http://www.chemistry.ohio-state.edu/~kohler/dna.html>
661. Lack of effect of exogenous calcitriol on the cutaneous production of vitamin D3 - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2828412/>
662. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2541158/>

663. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18689406/>
664. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10966885/>
665. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18689389/>
666. Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3. URL: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physrev.1984.64.2.478>
667. Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D3) 24-hydroxylase gene - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8302863/>
668. Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9038191/>
669. Association of 1,25-dihydroxyvitamin D3 with cultured 3T6 mouse fibroblasts. Cellular uptake and receptor-mediated migration to the nucleus - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6305993/>
670. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ induces translocation of the vitamin D receptor (VDR) to the plasma membrane in skeletal muscle cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12112023/>
671. PII: 0003-9861(79)90223-6 | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/0003986179902236?token=AF85E68B196FFF88656112EDD08383EA4B6C26DED9C276959311FB3B9223AFABA242720C2D59DE9E2589D1F1FFAEFD25&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220626160132>
672. Vitamin D3 and skin diseases - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1337425/>
673. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737544/>
674. Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation | The Journal of Immunology. URL: <https://www.jimmunol.org/content/179/3/1634>

675. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9808170/>
676. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17572686/>
677. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12520535/>
678. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/505004/>
679. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and clinical applications - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8579891/>
680. Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21947295/>
681. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 treatment reduces cardiac hypertrophy and left ventricular diameter in spontaneously hypertensive heart failure-prone (cp/+) rats independent of changes in serum leptin - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18496147/>
682. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12122115/>
683. Vitamin D | American Journal of Physiology-Renal Physiology. URL: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajprenal.00336.2004>
684. The Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Gene is a Primary Target of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and its Nuclear Receptor - ScienceDirect. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283605003463?via%3Dihub>
685. Cod and the consumptive: a brief history of cod-liver oil in the treatment of pulmonary tuberculosis - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15712453/>
686. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3.
687. Effects of Extracellular Calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on Sebaceous Gland Cells In vitro and In vivo. URL: <http://www.medicaljournals.se/acta/content/html/10.2340/00015555-2525>

688. Vitamin D status in hidradenitis suppurativa - Kelly - 2014 - British Journal of Dermatology - Wiley Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bjd.12900>
689. A pilot study assessing the role of 25 hydroxy vitamin D levels in patients with vitiligo vulgaris - ScienceDirect. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962209014911>
690. Topical vitamin D analogues in the treatment of vitiligo - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19422605/>
691. 1,25-dihydroxyvitamin-D-receptor in breast cancer cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/92676/>
692. Cancer statistics, 1991 - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1984806/>
693. Melanoma and sunburn - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7827244/>
694. Sun exposure and mortality from melanoma - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15687362/>
695. Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21878656/>
696. PTCH mutations in squamous cell carcinoma of the skin - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11286632/>
697. Sun exposure prior to diagnosis is associated with improved survival in melanoma patients: results from a long-term follow-up study of Italian patients - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18406602/>
698. Variation in incidence and fatality of melanoma by season of diagnosis in new South Wales, Australia - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16537711/>
699. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10537000/>
700. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of nonmelanoma and melanoma skin cancer: post hoc analyses of the women's health initiative randomized controlled trial - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21709199/>

701. Relative resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a keratinocyte model of tumor progression - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1318311/>
702. Pre-diagnostic plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of non-melanoma skin cancer in women - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22493740/>
703. Vitamin D status and skin cancer risk independent of time outdoors: 11-year prospective study in an Australian community - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23076499/>
704. In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)₂D₃-responsive and -resistant melanoma cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17172823/>
705. Ultraviolet radiation. URL: <https://www.who.int/health-topics/ultraviolet-radiation>
706. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26783703/>
707. Gene expression in skin tumors induced in hairless mice by chronic exposure to ultraviolet B irradiation - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9155265/>
708. Cutaneous vitamin D synthesis versus skin cancer development: The Janus faces of solar UV-radiation - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20808512/>
709. Early events in UV carcinogenesis--DNA damage, target cells and mutant p53 foci - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18221455/>
710. The scientific basis of skin cancer - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10607352/>
711. Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1467284/>
712. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8483937/>
713. Oxidative stress mediated Ca(2+) release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24794973/>

714. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11684456/>
715. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10435637/>
716. UV-induced DNA damage and repair: a review - Photochemical & Photobiological Sciences (RSC Publishing). URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2002/pp/b201230h>
717. Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Is Essential for Murine Skin Barrier Integrity | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022202X16321078?token=7EEC3790B06B20E7DCA58343C0D38AF76557FAB82721186984195647EB3497E1DEA82E5ED07BC2099041E54F36436116&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210702120304>
718. Role of the Coiled-coil Coactivator (CoCoA) in Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Transcription* | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0021925820677705?token=BB50B76E4585FDEC4636D28141CDFEA489F97A6321ED69A9A418A9AE0D8866CF0AC6DBEAE17421F55CE05E63AC427BCF&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220730200957>
719. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11469723/>
720. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10605936/>
721. Oxidative Inactivation of Cytochrome P-450 1A (CYP1A) Stimulated by 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl: Production of Reactive Oxygen by Vertebrate CYP1As | Molecular Pharmacology. URL: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/56/3/588>
722. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10490621/>
723. Comparison of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats, and humans: most potent induction in humans - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839655/>

724. Environmental and chemical carcinogenesis - ScienceDirect. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044579X04000537?via%3Dihub>
725. Oral Benzo[a]pyrene: Understanding Pharmacokinetics, Detoxication, and Consequences—Cyp1 Knockout Mouse Lines as a Paradigm | Molecular Pharmacology. URL: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/84/3/304>
726. Cytochrome P450s in human immune cells regulate IL-22 and c-Kit via an AHR feedback loop - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28276465/>
727. CYP1A1 Enzymatic Activity Influences Skin Inflammation Via Regulation of the AHR Pathway - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33385398/>
728. Cyclooxygenase in biology and disease - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9737710/>
729. Daily treatment with α -naphthoflavone enhances follicular growth and ovulation rate in the rat - ScienceDirect. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11000160?via%3Dihub>
730. Genetic and Pharmacological Analysis Identifies a Physiological Role for the AHR in Epidermal Differentiation - Journal of Investigative Dermatology. URL: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)37229-8/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)37229-8/fulltext)
731. The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin | Nature Immunology. URL: <https://www.nature.com/articles/ni.3614>
732. Constitutive Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Keratinocytes Causes Inflammatory Skin Lesions | Molecular and Cellular Biology. URL: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.25.21.9360-9368.2005>
733. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation–Induced Skin Tanning - Journal of Investigative Dermatology. URL: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(15\)35011-9/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(15)35011-9/fulltext)
734. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. | PNAS. URL: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.91.1.360>

735. Malignant Transformation of Immortalized HaCaT Keratinocytes through Deregulated Nuclear Factor κ B Signaling | Cancer Research | American Association for Cancer Research. URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/66/10/5209/525594/Malignant-Transformation-of-Immortalized-HaCaT>
736. NF- κ B signaling in inflammation | Signal Transduction and Targeted Therapy. URL: <https://www.nature.com/articles/sigtrans201723>
737. Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14742689/>
738. Benzo[a]pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29545172/>
739. TGF- β 1 signaling plays a dominant role in the crosstalk between TGF- β 1 and the aryl hydrocarbon receptor ligand in prostate epithelial cells - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560882/>
740. Regulation of CYP3A4 by pregnane X receptor: The role of nuclear receptors competing for response element binding | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006291X10002780?token=CEF9D55F6C6AFF8E7A5A595E428ED900320270228F15D440C0ED90981160EEF3DD7314D30AE90DD413B4D043EFB6124F&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220705210525>
741. 23-carboxy-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 (calcioic acid) and 24-carboxy-25,26,27-trinorvitamin D3 (cholocalcioic acid): end products of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in rat kidney through C-24 oxidation pathway - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17027908/>
742. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes - PubMed. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16849327/>
743. HaCaT Cell Line as a Model System for Vitamin D3 Metabolism in Human Skin | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0022202X15427824?token=43CDAA1914F559F9C6AE91876C475417BFACCBBC0271E14CB455800910278A26AA6CFFA66A1547B3DFD0F66E872C46D52>

7 Abkürzungsverzeichnis

%	<i>Prozent</i>
°C	<i>Grad Celsius</i>
µg	<i>Mikrogramm</i>
1,25(OH) ₂ D ₃	<i>1,25-Dihydroxyvitamin D₃; Calcitriol</i>
25(OH)D ₃	<i>25-Hydroxyvitamin D₃; Calcidiol</i>
5-FU	<i>5-Furouracil</i>
64PP	<i>Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukte</i>
7-DHC	<i>7-Dehydrocholesterol</i>
A	<i>Adenin</i>
Abb.	<i>Abbildung</i>
AF2	<i>Activation Function 2</i>
AhR	<i>Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor</i>
AhR-A	<i>AhR-Antagonist</i>
AhRR	<i>AhR Repressor</i>
AK	<i>Aktinische Keratose</i>
ALA	<i>Aminolävulinsäure</i>
ANP	<i>atriales natriuretisches Peptid</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ARNT	<i>AhR Nuclear Translocator</i>
AS	<i>Aminosäuren</i>
BaP	<i>Benzo(a)pyre</i>
BCC	<i>Basal Cell Carcinoma (Basalzellkarzinom)</i>
BER	<i>Basen-Exzisionsreparatur</i>
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix</i>
BSA	<i>Bovines Serum-Albumin</i>
C	<i>Cytosin</i>
Ca ²⁺	<i>Calcium (Kalzium)</i>
CAR	<i>Constitutive-Androstane-Receptor</i>
CDK	<i>Cyclin-abhängige Kinase</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)</i>
cm ²	<i>Quadratzentimeter</i>
CMM	<i>Cutaneous malignant melanoma</i>

Abkürzungsverzeichnis

CO ₂	<i>Kohlendioxid</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CP	<i>Crossing Point</i>
CPD	<i>Cyclobutan Pyrimidin Dimere</i>
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
CS	<i>Cockayne-Syndrom</i>
cSCC	<i>cutaneous Squamous Cell Carcinoma (kutanes Plattenepithelkarzinom)</i>
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
CXCL5	<i>C-X-C motif chemokine 5</i>
CYP1A1	<i>Cytochrom P450 1A1</i>
CYP27A1	<i>Cytochrom P450 27A1</i>
CYP27B1	<i>Cytochrom P450 27B1</i>
CYP2R1	<i>Cytochrom P450 2R1</i>
DBD	<i>DNA-Bindungsdomäne</i>
dFICZ	<i>6,12-Diformylindolo[3,2-b]carbazol</i>
DFMO	<i>Difluormethylornithin</i>
DGE	<i>Deutsche Gesellschaft für Ernährung</i>
DKFZ	<i>Deutschen Krebsforschungszentrum</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
dNTPs	<i>Deoxynukleosidtriphosphate</i>
DSB	<i>Doppelstrangbruch-Reparatur</i>
E ₂	<i>Östradiol</i>
EASI	<i>Eczema Area and Severity Index</i>
ECM	<i>extracellular Matrix (extrazelluläre Matrix)</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
ESB	<i>Einzelstrangbruch-Reparatur</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
FADH ₂	<i>Flavin-Adenin-Dinucleotid</i>
FasL	<i>Fas-Ligand</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)</i>

Abkürzungsverzeichnis

FGF23	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23</i>
FICZ	<i>6-Formylindolo[3,2-b]carbazol</i>
g	<i>Gramm</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	<i>Group Specific Component</i>
GGR	<i>Global Genome Repair</i>
GOF	<i>gain-of-function</i>
GR	<i>Glucocorticoid-Rezeptor</i>
GSK3b	<i>Glykogensynthase-Kinase-3b</i>
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i>
h	<i>hour(s) (Stunden)</i>
H ₂ O	<i>Wasserdampf</i>
HAHs	<i>halogenated aromatic hydrocarbons (halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe)</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>
HIF1 α	<i>Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α</i>
HKG	<i>Housekeeping Gene</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90 kDa</i>
HWZ	<i>Halbwertszeit</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IDBP	<i>intrazelluläre Vitamin-D-bindende Proteine</i>
IDO	<i>Indolamin-2,3-Dioxygenase</i>
IE	<i>Internationale Einheit</i>
IFN γ	<i>Interferon-gamma</i>
IGF-BP	<i>Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-bindende Proteine</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IN	<i>Involucrin</i>
IPD	<i>immediate pigment darkening</i>
IR	<i>infrarot</i>
J	<i>Joule</i>
kB	<i>Kilobase</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
KO	<i>Knockout</i>
L	<i>Liter</i>
lat.	<i>Latein</i>
LBD	<i>Ligandenbindungsdomäne</i>
LXR	<i>Leber-X-Rezeptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

M	<i>Molare Masse</i>
MAPK	<i>Mitogen-Aktivierte Proteinkinase</i>
min	<i>Minuten</i>
MITF	<i>Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor</i>
mJ	<i>Millijoule</i>
mmol	<i>Millimol</i>
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
MP	<i>Metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)</i>
MSC	<i>Melanoma Skin Cancer (Melanom-Hautkrebs)</i>
Na ⁺	<i>Natrium</i>
NER	<i>Nukleotid-Exzisionsreparatur</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHEK	<i>Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NMSC	<i>Non-Melanoma Skin Cancer (Nicht-Melanom-Hautkrebs)</i>
NR111	<i>Nuclear Receptor, Subfamilie 1, Gruppe I, Member 1</i>
nVDREs	<i>negative Vitamin-D-response Elements</i>
O ₂	<i>Sauerstoff</i>
O ₃	<i>Ozon</i>
p	<i>Irrtumswahrscheinlichkeit</i>
p23	<i>protein 23 kDa</i>
p53mut	<i>Mutation von p53</i>
p53null	<i>Abwesenheit von p53</i>
PAHs	<i>polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (polycyclic aromatic hydrocarbons)</i>
PAI-2	<i>Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2</i>
PAS	<i>Per-ARNT-Sim</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell Death 1 Ligand</i>
PDT	<i>photodynamischen Therapie</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
PMCA	<i>Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i>
PO ₄	<i>Phosphat</i>

Abkürzungsverzeichnis

PPAR	<i>Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor</i>
Ptch	<i>Patched</i>
PTH	<i>Parathormon</i>
PUVA	<i>Psoralen-UV-A-Therapie</i>
PXR	<i>Pregnan-X-Rezeptor</i>
RAR	<i>Retinoid-Säure-Rezeptor</i>
RG	<i>Referenzgene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)</i>
ROR	<i>retinoid acid receptor-related orphan receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)</i>
ROX	<i>6-Carboxyl-X-Rhodamine</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RQ	<i>RNA Qualified</i>
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid (ribosomale-Ribonukleinsäure)</i>
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
RTPTPj	<i>Rezeptor-Typ Protein-Tyrosin-Phosphatase-j</i>
RW	<i>RNA Wash</i>
RXR	<i>Retinoid-X-Rezeptor</i>
s	<i>Sekunden</i>
sCa ²⁺	<i>serum Calcium</i>
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom)</i>
SCORAD	<i>SCORing Atopic Dermatitis</i>
SNPs	<i>Small Nucleotide Polymorphisms (Nukleotid-Polymorphismen)</i>
T	<i>Thymin</i>
TAD	<i>Transaktivierungsdomäne Domäne</i>
TCDD	<i>2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin</i>
TCR	<i>Transcription Coupled Repair (transkriptionsgekoppelte Reparatur)</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
TG	<i>Transglutaminase</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNFα	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TRAIL	<i>TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand</i>
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid (Transport-Ribonukleinsäure)</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potential channel of the Vanilloid subtype</i>

Abkürzungsverzeichnis

TTD	<i>Trichothiodystrophie</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
UCA	<i>cis-Urocaninsäure</i>
UDP	<i>Uridindiphosphat</i>
US	<i>United States</i>
UTR	<i>untranslated region (Untranslatierte Region)</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
v.a.	<i>vor allem</i>
VDBP	<i>Vitamin D Bindendes Protein</i>
VDR	<i>Vitamin D-Rezeptor</i>
VDREs	<i>Vitamin D responsive Elements</i>
VDR-I	<i>VDR-Inhibitor</i>
XAP-2	<i>Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2</i>
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRE	<i>Xenobiotic Responsive Element</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Strukturformel der unterschiedlichen Vitamin D ₃ Formen	6
Abb. 2.2: Abbau von Vitamin D ₃ in inaktive Nebenprodukte.....	8
Abb. 2.3: Vitamin D ₃ Synthese im menschlichen Körper.....	10
Abb. 2.4: Aufbau des VDR	11
Abb. 2.5: VDR-Signaltransduktion nach 1,25(OH) ₂ D ₃ -Behandlung	12
Abb. 2.6: Bereiche des elektromagnetischen Spektrums.....	22
Abb. 2.7: Struktur von dimeren Thymin Photoprodukten.....	25
Abb. 2.8: Umwandlung von 64PP in ein Dewar Isomer unter UV-Einfluss	26
Abb. 2.9: Funktionelle Domänen des AhR.....	29
Abb. 2.10: AhR-Signaltransduktion nach UV-B-Bestrahlung.....	31
Abb. 2.11: Kutane AhR-Effekte nach Exposition gegenüber UV-B-Bestrahlung oder Umweltschadstoffen	36
Abb. 2.12: Stoffwechselweg von klassischen und nicht-klassischen Vitamin D ₃ Derivaten ...	38
Abb. 3.1: Ablauf der RNA-Isolierung.....	48
Abb. 3.2: Funktionsweise der reversen Transkriptase	50
Abb. 3.3: Durchführung der reversen Transkription	50
Abb. 3.4: Phasen der PCR	51
Abb. 3.5: Funktionsprinzip des DNA-Farbstoffes SYBR® Green I	52
Abb. 3.6: Bestandteile einer 96-Well-Platte	53
Abb. 3.7: StepOnePlus™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems™	54
Abb. 3.8: Pipettierschema im ersten Experiment	55
Abb. 3.9: Pipettierschema A im zweiten Experiment.....	56
Abb. 3.10: Pipettierschema B im zweiten Experiment.....	57
Abb. 3.11: Run Method: Das thermische Profil für den RTqPCR-Gerätelauf	58
Abb. 3.12: Ct-Werte im Kurvenverlauf	59
Abb. 4.1: AhR-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR).....	69

Abb. 4.2: CYP1A1-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR)69

Abb. 4.3: COX-2-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR).....70

Abb. 4.4: VDR-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR)70

Abb. 4.5: CYP24A1-Expression in unbehandelten HaCaT- und SCL-1-Zellen (RTqPCR)71

Abb. 4.6: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR) ..72

Abb. 4.7: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)72

Abb. 4.8: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)
.....73

Abb. 4.9: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)73

Abb. 4.10: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)
.....74

Abb. 4.11: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR).74

Abb. 4.12: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)75

Abb. 4.13: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)....75

Abb. 4.14: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in unbestrahlten HaCaT-Zellen
(RTqPCR)76

Abb. 4.15: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in bestrahlten HaCaT-Zellen (RTqPCR)
.....76

Abb. 4.16: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)..77

Abb. 4.17: EtOH-Effekt auf die AhR-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR).....77

Abb. 4.18: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)
.....78

Abb. 4.19: EtOH-Effekt auf die CYP1A1-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR).
.....78

Abb. 4.20: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)
.....79

Abb. 4.21: EtOH-Effekt auf die COX-2-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)..79

Abb. 4.22: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR) .80

Abb. 4.23: EtOH-Effekt auf die VDR-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)	80
Abb. 4.24: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in unbestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)	81
Abb. 4.25: EtOH-Effekt auf die CYP24A1-Expression in bestrahlten SCL-1-Zellen (RTqPCR)	81
Abb. 4.26: AhR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	83
Abb. 4.27: CYP1A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	83
Abb. 4.28: CYP1A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	84
Abb. 4.29: COX-2-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	85
Abb. 4.30: COX-2-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	86
Abb. 4.31: VDR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	86
Abb. 4.32: CYP24A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	87
Abb. 4.33: CYP24A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in HaCaT-Zellen (RTqPCR)	88
Abb. 4.34: AhR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR)	89
Abb. 4.35: CYP1A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH) ₂ D ₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR)	89
Abb. 4.36: CYP1A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR)	90

Abb. 4.37: COX-2-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR)91

Abb. 4.38: COX-2-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR).....92

Abb. 4.39: VDR-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR)92

Abb. 4.40: CYP24A1-Expression nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D₃ und UV-B in SCL-1-Zellen (RTqPCR)93

Abb. 4.41: CYP24A1-Expression 6h (A) und 24h (B) nach Behandlung mit Rezeptor-Antagonisten in SCL-1-Zellen (RTqPCR)94

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Bereiche des UV-Spektrums	22
Tab. 3.1: Behandlungsbedingungen im ersten Experiment.....	43
Tab. 3.2: Behandlungsbedingungen im zweiten Experiment (A).....	44
Tab. 3.3: Behandlungsbedingungen im zweiten Experiment (B).....	45
Tab. 3.4: Irrtumswahrscheinlichkeit p	62
Tab. 3.5: Verwendete Geräte	63
Tab. 3.6: Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	64
Tab. 3.7: Verwendete Substanzen.....	66
Tab. 3.8: Verwendete Datenbanken und Computerprogramme.....	67

10 Anhang

HaCaT-Keratinocyten und SCL-1-Zellen:

- RTqPCR: Genexpression ohne Behandlung (1 Mittelwert = 6 Messungen)

AhR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	HaCaT	SA	SCL-1	SA	p-Wert
0h	1,00	0,00	0,32	0,25	0,0001
6h	2,10	0,94	0,43	0,32	0,0020
12h	1,57	0,33	0,25	0,18	0,0000
18h	1,21	0,42	0,33	0,30	0,0020
24h	2,00	1,28	0,49	0,40	0,0199
AUC	29,12	13,81	2,21	3,07	0,0009

CYP1A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	HaCaT	SA	SCL-1	SA	p-Wert
0h	1,00	0,00	0,27	0,10	0,0000
6h	2,35	1,23	0,83	0,67	0,0245
12h	3,69	3,60	0,50	0,24	0,0558
18h	2,83	2,42	0,31	0,12	0,0291
24h	1,94	0,97	0,30	0,09	0,0021
AUC	110,57	129,31	3,21	2,70	0,0694

COX-2-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	HaCaT	SA	SCL-1	SA	p-Wert
0h	1,00	0,00	2,56	2,38	0,1396
6h	6,34	3,32	6,79	5,76	0,8700
12h	2,30	1,15	2,53	2,86	0,8607
18h	1,46	0,62	3,06	3,05	0,2357
24h	1,35	0,59	2,72	3,12	0,3136
AUC	88,63	65,17	259,10	324,72	0,2360

VDR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	HaCaT	SA	SCL-1	SA	p-Wert
0h	1,00	0,00	2,19	1,65	0,1071
6h	0,88	0,26	2,28	1,82	0,0924
12h	1,42	0,49	2,47	1,71	0,1810
18h	1,76	0,60	3,74	2,91	0,1344
24h	2,00	1,01	4,01	2,61	0,1089
AUC	26,68	18,73	149,86	161,84	0,0937

CYP24A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$				
	HaCaT	SA	SCL-1	SA	p-Wert
0h	1,00	0,00	9,72	8,48	0,0305
6h	2,37	1,49	9,04	6,56	0,0357
12h	0,88	0,25	7,74	5,96	0,0182
18h	1,24	0,50	14,54	12,68	0,0280
24h	2,79	2,17	13,59	8,28	0,0115
AUC	30,17	24,59	2060,29	3224,01	0,1540

HaCaT-Keratinocyten:

- RTqPCR: Vergleich 1% BSA vs 1% BSA+EtOH (1 Mittelwert = 6 Messungen)

AhR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	2,10	0,94	0,0167
12h 1% BSA	1,57	0,33	0,0017
18h 1% BSA	1,21	0,42	0,2415
24h 1% BSA	2,00	1,28	0,0841
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,65	0,61	0,0276
12h 1% BSA+EtOH	1,36	0,36	0,0356
18h 1% BSA+EtOH	1,08	0,56	0,7227
24h 1% BSA+EtOH	1,28	0,60	0,2821
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	1,66	0,61	0,0241
12h 1% BSA+UV-B	4,09	5,61	0,2066
18h 1% BSA+UV-B	2,36	2,62	0,2313
24h 1% BSA+UV-B	2,34	1,74	0,0882
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,56	0,69	0,0711
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,79	0,43	0,0012
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,25	2,04	0,1634
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,08	1,25	0,0598

CYP1A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	2,35	1,23	0,0229
12h 1% BSA	3,69	3,60	0,0970
18h 1% BSA	2,83	2,42	0,0935
24h 1% BSA	1,94	0,97	0,0393
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,88	0,42	0,0004
12h 1% BSA+EtOH	1,79	0,97	0,0733
18h 1% BSA+EtOH	1,83	1,19	0,1194
24h 1% BSA+EtOH	1,53	0,38	0,0071
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	2,48	1,24	0,0154
12h 1% BSA+UV-B	3,03	2,99	0,1275
18h 1% BSA+UV-B	2,51	1,78	0,0638
24h 1% BSA+UV-B	1,72	1,04	0,1194
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	4,61	3,61	0,0346
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,56	2,90	0,0562
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	4,54	4,24	0,0686
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,12	0,77	0,0001

COX-2-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	6,34	3,32	0,0028
12h 1% BSA	2,30	1,15	0,0194
18h 1% BSA	1,46	0,62	0,1024
24h 1% BSA	1,35	0,59	0,1784
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	2,63	0,93	0,0015
12h 1% BSA+EtOH	1,59	0,91	0,1412
18h 1% BSA+EtOH	1,12	0,55	0,6139
24h 1% BSA+EtOH	0,91	0,23	0,3708
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	5,08	2,68	0,0039
12h 1% BSA+UV-B	5,01	4,68	0,0620
18h 1% BSA+UV-B	2,09	0,78	0,0066
24h 1% BSA+UV-B	1,19	0,61	0,4698
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	5,43	3,58	0,0127
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,03	2,38	0,0641
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,83	1,72	0,0262
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,41	0,17	0,0002

VDR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	0,88	0,26	0,2950
12h 1% BSA	1,42	0,49	0,0614
18h 1% BSA	1,76	0,60	0,0107
24h 1% BSA	2,00	1,01	0,0367
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	0,92	0,26	0,4952
12h 1% BSA+EtOH	1,50	0,38	0,0088
18h 1% BSA+EtOH	2,04	0,82	0,0114
24h 1% BSA+EtOH	1,98	0,67	0,0050
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	0,65	0,29	0,0132
12h 1% BSA+UV-B	1,69	0,56	0,0131
18h 1% BSA+UV-B	1,86	1,09	0,0830
24h 1% BSA+UV-B	1,86	1,53	0,2020
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	0,71	0,24	0,0140
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,89	0,47	0,0010
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,03	0,60	0,0017
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,06	1,11	0,0402

CYP24A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	2,37	1,49	0,0483
12h 1% BSA	0,88	0,25	0,2704
18h 1% BSA	1,24	0,50	0,2719
24h 1% BSA	2,79	2,17	0,0709
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,96	1,28	0,0967
12h 1% BSA+EtOH	0,93	0,19	0,4013
18h 1% BSA+EtOH	2,19	0,45	0,0001
24h 1% BSA+EtOH	1,53	0,36	0,0043
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	1,30	0,41	0,1104
12h 1% BSA+UV-B	1,48	0,46	0,0286
18h 1% BSA+UV-B	1,09	0,43	0,6050
24h 1% BSA+UV-B	1,08	0,77	0,7923
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,46	0,90	0,2416
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,33	0,44	0,0926
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,43	0,37	0,0185
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	0,99	0,45	0,9644

- RTqPCR: Flächen unter den Kurven/AUC (1 Mittelwert = 6 Messungen)

AhR-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	20,96	1,00	0,00	-
UV-B	15,39	0,83	0,30	0,2013
1,25(OH) ₂ D ₃	45,10	2,16	1,86	0,1570
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	19,47	0,99	0,40	0,9681

CYP1A1-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	36,60	1,00	0,00	-
UV-B	85,71	2,78	3,80	0,2780
1,25(OH) ₂ D ₃	205,58	7,71	11,53	0,1841
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	114,13	3,71	2,95	0,0483

COX-2-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	31,36	1,00	0,00	-
UV-B	384,18	16,15	14,27	0,0264
1,25(OH) ₂ D ₃	127,73	5,40	7,08	0,1589
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	853,99	38,29	31,14	0,0149

VDR-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	30,34	1,00	0,00	-
UV-B	28,44	1,00	0,31	0,9919
1,25(OH) ₂ D ₃	32,67	1,11	0,35	0,4356
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	32,98	1,11	0,51	0,5928

CYP24A1-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	27,21	1,00	0,00	-
UV-B	193337818,7	6233470,99	7091371,57	0,0568
1,25(OH) ₂ D ₃	21,25	0,75	0,34	0,1041
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	147416156,1	5127778,28	3112451,02	0,0024

Anhang

- RTqPCR: Genexpression nach AhR- und VDR-Blockade (1 Mittelwert = 6 Messungen)

CYP1A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	2,13	0,21	0,0000
6h EtOH+UV-B	1,18	0,37	0,2659
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	2,90	1,25	0,0040
6h EtOH+CH223191	0,06	0,02	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	0,16	0,09	0,0000
6h EtOH+UV-B+CH223191	0,06	0,03	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	0,16	0,07	0,0000
6h EtOH+25(OH)D ₃	0,44	0,05	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	2,63	0,86	0,0009
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	0,52	0,15	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	2,86	0,82	0,0002
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,05	0,01	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,08	0,03	0,0000
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,06	0,02	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,09	0,03	0,0000
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	1,17	0,22	0,0960
24h EtOH+UV-B	0,99	0,49	0,9547
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	1,33	0,68	0,2689
24h EtOH+CH223191	0,05	0,01	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	0,15	0,04	0,0000
24h EtOH+UV-B+CH223191	0,04	0,02	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	0,19	0,12	0,0000
24h EtOH+25(OH)D ₃	0,81	0,24	0,0837
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	1,23	0,40	0,1814
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	0,54	0,25	0,0012
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	1,06	0,51	0,7691
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,06	0,02	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,11	0,06	0,0000
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,05	0,03	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,12	0,07	0,0000

Anhang

COX-2-mRNA:

	2 ^{-ΔΔCt}		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	2,79	0,58	0,0000
6h EtOH+UV-B	1,25	0,85	0,4818
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	3,09	1,73	0,0146
6h EtOH+CH223191	0,63	0,07	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	3,78	1,20	0,0002
6h EtOH+UV-B+CH223191	0,80	0,29	0,1160
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	2,12	0,74	0,0039
6h EtOH+25(OH)D ₃	0,61	0,06	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	4,21	1,49	0,0004
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	0,95	0,50	0,8143
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	3,94	2,13	0,0070
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,48	0,08	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	2,73	0,95	0,0012
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,57	0,20	0,0004
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	1,66	0,49	0,0081
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	2,29	0,88	0,0048
24h EtOH+UV-B	3,40	4,31	0,2024
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	5,45	6,92	0,1467
24h EtOH+CH223191	0,85	0,12	0,0106
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	3,08	1,04	0,0006
24h EtOH+UV-B+CH223191	1,97	2,10	0,2863
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	6,17	6,30	0,0725
24h EtOH+25(OH)D ₃	0,87	0,12	0,0271
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	2,40	0,61	0,0002
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	2,35	2,90	0,2812
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	5,45	5,92	0,0953
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,81	0,11	0,0011
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	1,62	0,40	0,0033
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	1,92	2,15	0,3216
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	3,89	4,01	0,1080

Anhang

CYP24A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	713,43	499,58	0,0058
6h EtOH+UV-B	1,34	0,48	0,1180
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	536,36	390,79	0,0073
6h EtOH+CH223191	0,81	0,08	0,0002
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	955,01	637,12	0,0043
6h EtOH+UV-B+CH223191	0,82	0,19	0,0390
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	411,95	215,86	0,0009
6h EtOH+25(OH)D ₃	1,18	0,13	0,0081
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	1317,81	925,00	0,0059
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	1,35	0,41	0,0640
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	579,55	432,14	0,0083
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	1,05	0,23	0,6414
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	900,59	738,99	0,0138
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,97	0,32	0,8121
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	405,17	238,77	0,0020
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	739,54	815,56	0,0509
24h EtOH+UV-B	1,08	0,29	0,5262
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	624,40	510,33	0,0135
24h EtOH+CH223191	0,90	0,16	0,1710
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	911,51	1006,81	0,0511
24h EtOH+UV-B+CH223191	0,74	0,15	0,0020
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	910,22	869,89	0,0284
24h EtOH+25(OH)D ₃	79,59	82,77	0,0423
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	723,77	796,65	0,0505
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	27,51	13,50	0,0007
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	848,07	883,87	0,0408
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	69,51	76,90	0,0540
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	492,45	492,03	0,0345
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	37,40	31,81	0,0187
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	648,32	656,56	0,0364

SCL-1-Zellen:

- RTqPCR: Vergleich 1% BSA vs 1% BSA+EtOH (1 Mittelwert = 6 Messungen)

AhR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	1,42	0,22	0,0008
12h 1% BSA	0,83	0,21	0,0792
18h 1% BSA	1,10	0,28	0,4177
24h 1% BSA	1,54	0,45	0,0155
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,63	0,49	0,0101
12h 1% BSA+EtOH	1,24	0,29	0,0696
18h 1% BSA+EtOH	1,52	0,69	0,0937
24h 1% BSA+EtOH	2,00	0,84	0,0154
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	2,62	2,00	0,0742
12h 1% BSA+UV-B	2,68	2,96	0,1957
18h 1% BSA+UV-B	3,48	3,76	0,1375
24h 1% BSA+UV-B	3,84	3,51	0,0753
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,71	0,58	0,0138
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,47	0,28	0,0020
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,79	0,40	0,0007
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,39	0,46	0,0000

CYP1A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	2,78	1,60	0,0214
12h 1% BSA	1,81	0,35	0,0002
18h 1% BSA	1,21	0,34	0,1573
24h 1% BSA	1,18	0,23	0,0855
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	3,02	1,93	0,0283
12h 1% BSA+EtOH	2,51	0,73	0,0005
18h 1% BSA+EtOH	1,49	0,61	0,0778
24h 1% BSA+EtOH	1,32	0,53	0,1750
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	2,07	0,68	0,0034
12h 1% BSA+UV-B	3,00	1,04	0,0008
18h 1% BSA+UV-B	5,87	6,11	0,0796
24h 1% BSA+UV-B	2,38	1,43	0,0400
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,96	0,76	0,0113
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,37	1,62	0,0050
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	4,10	1,71	0,0013
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,91	1,06	0,0013

COX-2-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	2,76	0,65	0,0001
12h 1% BSA	1,00	0,44	0,9847
18h 1% BSA	1,20	1,10	0,6682
24h 1% BSA	1,15	1,38	0,7908
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	2,90	0,48	0,0000
12h 1% BSA+EtOH	1,65	0,58	0,0211
18h 1% BSA+EtOH	1,23	1,03	0,5874
24h 1% BSA+EtOH	1,37	1,52	0,5636
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	8,85	2,21	0,0000
12h 1% BSA+UV-B	4,18	2,26	0,0063
18h 1% BSA+UV-B	3,15	2,20	0,0374
24h 1% BSA+UV-B	1,93	1,41	0,1365
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	6,90	3,90	0,0041
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,85	0,69	0,0001
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,99	1,42	0,1186
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,67	1,26	0,2230

VDR-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	1,09	0,16	0,2071
12h 1% BSA	1,29	0,28	0,0302
18h 1% BSA	1,94	0,52	0,0013
24h 1% BSA	2,29	0,81	0,0030
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,36	0,32	0,0213
12h 1% BSA+EtOH	1,83	0,41	0,0006
18h 1% BSA+EtOH	2,71	1,07	0,0028
24h 1% BSA+EtOH	2,99	1,29	0,0036
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	0,90	0,26	0,3736
12h 1% BSA+UV-B	2,50	0,47	0,0000
18h 1% BSA+UV-B	3,09	0,33	0,0000
24h 1% BSA+UV-B	3,20	0,91	0,0001
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	0,88	0,22	0,2287
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,56	0,54	0,0000
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,02	0,77	0,0001
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	3,40	0,90	0,0001

CYP24A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
0h 1% BSA	1,00	0,00	-
6h 1% BSA	0,98	0,19	0,8438
12h 1% BSA	0,83	0,27	0,1504
18h 1% BSA	1,54	0,63	0,0595
24h 1% BSA	1,59	0,62	0,0418
0h 1% BSA+EtOH	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH	1,54	0,45	0,0148
12h 1% BSA+EtOH	1,43	0,75	0,1900
18h 1% BSA+EtOH	1,82	0,77	0,0254
24h 1% BSA+EtOH	1,62	0,45	0,0070
0h 1% BSA+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+UV-B	0,68	0,11	0,0000
12h 1% BSA+UV-B	1,04	0,51	0,8542
18h 1% BSA+UV-B	2,03	0,90	0,0187
24h 1% BSA+UV-B	2,24	1,16	0,0265
0h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,00	0,00	-
6h 1% BSA+EtOH+UV-B	0,78	0,12	0,0015
12h 1% BSA+EtOH+UV-B	1,06	0,28	0,6110
18h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,28	0,76	0,0020
24h 1% BSA+EtOH+UV-B	2,07	0,57	0,0009

- RTqPCR: Flächen unter den Kurven/AUC (1 Mittelwert = 6 Messungen)

AhR-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	27,54	1,00	0,00	-
UV-B	14,20	0,74	0,59	0,2960
1,25(OH) ₂ D ₃	34,08	1,59	0,86	0,1218
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	19,44	0,91	0,56	0,7046

CYP1A1-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	47,87	1,00	0,00	-
UV-B	327,12	6,90	1,20	0,0000
1,25(OH) ₂ D ₃	108,04	2,43	1,55	0,0478
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	456,67	9,77	5,87	0,0044

COX-2-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	38,85	1,00	0,00	-
UV-B	63,49	1,83	0,65	0,0112
1,25(OH) ₂ D ₃	114,87	3,92	3,35	0,0584
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	114,91	4,18	3,50	0,0499

VDR-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	55,42	1,00	0,00	-
UV-B	29,76	0,62	0,25	0,0038
1,25(OH) ₂ D ₃	66,30	1,36	0,50	0,1138
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	51,72	1,04	0,51	0,8380

CYP24A1-mRNA:

	Flächen unter den Kurven/AUC			
	MW (absolut)	MW (relativ)	SA	p-Wert
EtOH	30,48	1,00	0,00	-
UV-B	1257678,75	44703,49	9376,04	0,0000
1,25(OH) ₂ D ₃	27,40	1,03	0,29	0,7888
1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	3739965,30	119233,41	23497,60	0,0000

Anhang

- RTqPCR: Genexpression nach AhR- und VDR-Blockade (1 Mittelwert = 6 Messungen)

CYP1A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	2,35	0,44	0,0000
6h EtOH+UV-B	0,97	0,59	0,9017
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	2,19	1,18	0,0332
6h EtOH+CH223191	0,18	0,05	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	0,38	0,08	0,0000
6h EtOH+UV-B+CH223191	0,22	0,12	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	0,44	0,20	0,0000
6h EtOH+25(OH)D ₃	0,35	0,13	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	2,53	0,45	0,0000
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	0,51	0,28	0,0015
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	2,35	1,21	0,0213
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,17	0,04	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,34	0,07	0,0000
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,23	0,14	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,30	0,13	0,0000
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	1,22	0,20	0,0207
24h EtOH+UV-B	2,66	2,28	0,1050
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	6,33	4,88	0,0233
24h EtOH+CH223191	0,12	0,05	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	0,26	0,04	0,0000
24h EtOH+UV-B+CH223191	0,33	0,39	0,0017
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	0,65	0,70	0,2471
24h EtOH+25(OH)D ₃	0,64	0,27	0,0093
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	1,07	0,27	0,5527
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	1,75	1,60	0,2775
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	4,29	3,23	0,0318
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,11	0,03	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,14	0,03	0,0000
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,31	0,37	0,0010
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,48	0,55	0,0433

Anhang

COX-2-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	1,06	0,22	0,5114
6h EtOH+UV-B	11,26	23,99	0,3195
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	8,45	17,90	0,3321
6h EtOH+CH223191	0,49	0,06	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	0,88	0,13	0,0512
6h EtOH+UV-B+CH223191	6,68	14,13	0,3479
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	9,42	19,83	0,3230
6h EtOH+25(OH)D ₃	0,65	0,03	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	1,36	0,16	0,0002
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	8,87	19,01	0,3345
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	13,46	28,62	0,3115
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,40	0,05	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,77	0,14	0,0030
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	5,90	12,61	0,3642
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	7,76	16,32	0,3339
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	1,39	0,18	0,0003
24h EtOH+UV-B	2,79	2,81	0,1488
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	3,43	3,25	0,0974
24h EtOH+CH223191	0,37	0,13	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	1,20	0,33	0,1648
24h EtOH+UV-B+CH223191	1,38	1,45	0,5398
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	3,35	3,53	0,1343
24h EtOH+25(OH)D ₃	0,77	0,29	0,0754
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	2,07	0,39	0,0001
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	2,44	2,51	0,1914
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	5,65	6,03	0,0879
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,33	0,11	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	0,97	0,32	0,8221
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	1,10	1,18	0,8455
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	2,83	2,95	0,1593

Anhang

CYP24A1-mRNA:

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$		
	MW	SA	p-Wert
6h EtOH	1,00	0,00	-
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	82,72	28,10	0,0000
6h EtOH+UV-B	0,80	0,13	0,0030
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	36,44	16,40	0,0004
6h EtOH+CH223191	0,78	0,09	0,0001
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	95,37	32,42	0,0000
6h EtOH+UV-B+CH223191	0,69	0,14	0,0002
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	20,58	8,71	0,0003
6h EtOH+25(OH)D ₃	0,65	0,06	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	133,11	42,91	0,0000
6h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	0,57	0,16	0,0001
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	33,61	14,70	0,0003
6h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	0,64	0,09	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	107,23	43,83	0,0001
6h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	0,56	0,11	0,0000
6h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	22,68	5,06	0,0000
24h EtOH	1,00	0,00	-
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃	94,91	7,84	0,0003
24h EtOH+UV-B	1,23	0,72	0,1488
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B	201,14	100,67	0,0974
24h EtOH+CH223191	0,77	0,08	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191	118,01	36,62	0,1648
24h EtOH+UV-B+CH223191	1,02	0,70	0,5398
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191	212,18	113,62	0,1343
24h EtOH+25(OH)D ₃	1,09	0,34	0,0754
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +25(OH)D ₃	123,52	51,87	0,0001
24h EtOH+UV-B+25(OH)D ₃	1,31	0,58	0,1914
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+25(OH)D ₃	301,13	185,73	0,0879
24h EtOH+CH223191+25(OH)D ₃	1,35	0,57	0,0000
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +CH223191+25(OH)D ₃	101,18	44,09	0,8221
24h EtOH+UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	1,49	0,78	0,8455
24h EtOH+1,25(OH) ₂ D ₃ +UV-B+CH223191+25(OH)D ₃	270,72	215,58	0,1593

11 Publikationen/Dank

Publikationen:

1. Christoforos Christofi, Leandros Lamnis, Alexandra Stark, Heike Palm, Thomas Vogt and Jörg Reichrath (2022). CROSS TALK OF ARYL-HYDROCARBON-RECEPTOR (AHR) - AND VITAMIN D RECEPTOR (VDR) - SIGNALING IN HUMAN KERATINOCYTES *Anticancer research 42: 2193-2222(2022)-Abstract*
2. Leandros Lamnis, Christoforos Christofi, Alexandra Stark, Heike Palm, Thomas Vogt and Jörg Reichrath (2022). REGULATION OF CIRCADIAN CLOCK GENES BY UVB RADIATION AND VITAMIN D: A PILOT STUDY IN HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES DURING DIFFERENT STAGES OF SKIN PHOTOCARCINOGENESIS *Anticancer research 42: 2193-2222(2022)-Abstract*
3. Christoforos Christofi, Leandros Lamnis, Alexandra Stark, Heike Palm, Thomas Vogt and Jörg Reichrath (2022). Cross-talk of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)- and Vitamin D Receptor (VDR)-signaling in human keratinocytes *Anticancer research 42: 5049-5067 (2022)*

Postervorstellung:

1. Christoforos Christofi, Leandros Lamnis, Alexandra Stark, Heike Palm, Klaus Römer, Thomas Vogt and Jörg Reichrath (2022). Cross-talk of Aryl-Hydrocarbon- (AhR) and Vitamin D- Receptor (VDR) signaling in human keratinocytes
Joint International Symposia "Vitamin D in Prevention and Therapy" and „Biologic Effects of Light“, May 04-06, 2022, Homburg/Germany
2. Leandros Lamnis, Christoforos Christofi, Alexandra Stark, Heike Palm, Thomas Vogt and Jörg Reichrath (2022). Regulation of circadian clock genes by UVB radiation and vitamin D: a pilot study in human epidermal keratinocytes representing different stages of skin photocarcinogenesis
Joint International Symposia "Vitamin D in Prevention and Therapy" and „Biologic Effects of Light“, May 04-06, 2022, Homburg/Germany

An dieser Stelle würde ich gerne folgenden Personen meinen großen Dank aussprechen:

besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herr Prof. Dr. Jörg Reichrath, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in der Dermatologie anzufangen und erfolgreich durchzuführen. Über den gesamten Zeitraum unserer Zusammenarbeit nahm er sich bei jeder Gelegenheit reichlich Zeit und versuchte mir bei jeder Schwierigkeit weiterzuhelfen;

Herr Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt, Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, für die einzigartige Möglichkeit im Labor seiner Klinik meine Experimente durchführen zu dürfen;

Frau Alexandra Stark, Biologisch-technische Assistentin an der Universitäts-Hautklinik Homburg/Saar, für die detaillierte Einarbeitung und großartige, unabdingbare Hilfe in allen Aspekten der Laborarbeit;

Herr Prof. Dr. Klaus Römer, PhD, José Carreras Zentrum des Universitätsklinikum des Saarlandes, für seine wertvolle Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse;

Frau Anne Kerber und Frau Sonja Dauskardt, Medizinisch-technische Assistentinnen an der Universitäts-Hautklinik Homburg/Saar, für die freundliche Unterstützung und das herzliche Arbeitsklima im Labor;

meinen guten Freunden Sebastian Schreiber, Julius Bastian, Hugo Rimbach, Mert Tokcan, Samer Alasmi, Lukas Brust, Daniel Engelbrecht, Davide Bassano und Alexander Angleitner für ihre motivierenden Worte und Glauben an mich;

meinem ehemaligen Bremser und guten Freund Dr. med. Denis Höfer, für seine zahlreichen Tipps, aufleuchtende Worte und permanente Hilfe während dieser Arbeit und des gesamten Medizinstudiums;

meiner Mitdotorandin Madeleine Preiss, für ihre kollegiale Hilfe bei der Auswertung der Experimente;

meinem Mitdotoranden Leandros Lamnis, für die Zusammenarbeit und Hilfe in den theoretischen und praktischen Aspekten der Arbeit;

meinen geliebten Eltern, Sotirios und Ruth Christofi, und meiner geliebten Schwester, Ismini Christofi, die mir mein Leben lang bei Seite standen, mich zu jeder Zeit unterstützten und sicherstellten, dass mir nie etwas fehlt;

dem Springer, Springer Nature, Elsevier und John Wiley & Sons Verlag, Qiagen GmbH, Thermo Fisher Scientific GmbH, AAAS, Herr Prof. Dr. Vogeley und International Journal of Molecular Sciences, MDPI-Verlag für ihre freundliche Genehmigung zur Nutzung ihrer Abbildungen.

12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.