

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

**In vitro Untersuchungen zur Regulation von p53-, Notch-
und Vitamin D-Signalwegen bei der Photokarzinogenese
des kutanen Plattenepithelkarzinoms**

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

2024

vorgelegt von:
Marie-Madeleine Claudia Simone Preiß
geb. am: 28.02.1992 in Frankenthal (Pfalz)

Meinem Vater

Zusammenfassung

Die UVB-Strahlung der Sonne hat auf die Photokarzinogenese des kutanen Plattenepithelkarzinoms zwei entgegengesetzte Auswirkungen. Einerseits fördert sie als Karzinogen dessen Entstehung, andererseits hat sie über die kutane Bildung von Vitamin D und der Induktion von DNA-Reparaturmechanismen auch einen anti-karzinogenen, schützenden Einfluss. Bei der Photokarzinogenese wird aktuell von einem mehrstufigen Prozess ausgegangen. In der Initiationsstufe verursacht die UVB-Strahlung die Bildung von Pyrimidin-Dimeren, auf diesen molekularen Strukturschaden der zellulären DNA folgt die Promotionsstufe, in der die Expression von Genen, die das Zellwachstum regulieren, moduliert wird. Ziel dieser Arbeit war es an einem Zellkulturmodell die Wirkungen der UVB-Strahlung in verschiedenen Stufen der Photokarzinogenese genauer zu charakterisieren. Dabei lag ein besonderes Interesse bei der Analyse möglicher Interaktionen der Signalwege, denen eine wesentliche Bedeutung bei der Initiierung und Promotion des kutanen Plattenepithelkarzinoms zugeschrieben wird (p53-, Notch- und Vitamin D-Signalweg).

Hierfür untersuchten wir den Einfluss von UVB-Strahlung (keine Bestrahlung, 50mJ/cm^2 , 200mJ/cm^2) und von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf drei verschiedene Zelltypen in vitro. Diese Zellen repräsentieren verschiedene Stadien der Photokarzinogenese des kutanen Plattenepithelkarzinoms und weisen eine unterschiedliche p53-Funktionalität auf (primäre Keratinozyten - funktionell intaktes p53 als Modell für „normale Haut“, HaCaT-Zellen - punktmutiertes p53, Modell für die präkanzeröse aktinische Keratose und SCL-1-Zellen - Fehlen des p53-Proteins, Modell für das kutane Plattenepithelkarzinom). Wir analysierten die Transkriptmengen ausgewählter Gene mittels quantitativer Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) und teilweise auch entsprechende Proteinmengen mittels Westernblotting.

Die Analyse der Transkriptmengen wichtiger Gene des Notch- und p53-Signalwegs spricht für eine pathologisch veränderte UVB-induzierte und teilweise auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierte Modulation in den drei verschiedenen Zelltypen, und zwar sowohl auf den Stufen der Initiation (HaCaT) als auch beim komplett malignen Phänotyp (SCL-1). So zeigte sich beispielsweise nach der Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den primären Keratinozyten eine signifikante Abnahme der TAp53-Transkriptmenge um etwa den Faktor 0.5 in unbestrahlten und moderat-UVB bestrahlten Zellen (50mJ/cm^2). Interessanterweise ließ sich diese Vitamin D-assoziierte Reduktion der TAp53-Transkriptmenge in den primären Keratinozyten nicht mehr nachweisen, wenn die Zellen mit einer hohen UVB-Strahlung (200mJ/cm^2) konfrontiert wurden. Im Gegensatz dazu ließ sich in den HaCaT-Zellen eine solche Vitamin D-assoziierte Reduktion der TAp53-Transkriptmenge nur in den Hochdosis-bestrahlten Zellen nachweisen. In

Übereinstimmung mit der verminderten TAp53-Transkriptmengen in ungestressten primären Keratinozyten nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung fand sich auch bereits früh nach der Vitamin D-Exposition (4h) eine Reduzierung der TAp53-Proteinmenge. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ scheint somit in gesunden Keratinozyten die Menge an TAp53 Protein zu verringern. Dieser Effekt scheint durch starke UVB-induzierte DNA-Schädigung aufgehoben zu werden, nicht jedoch in den punktmutierten HaCaT-Zellen. Eine ähnliche Beobachtung ließ sich auch hinsichtlich des NOTCH1-Gens machen, auch hier ließ sich in den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten primären Keratinozyten eine reduzierte NOTCH1-Transkriptmenge nachweisen, nicht mehr jedoch in den Zellen mit höheren UVB-Strahlendosen sowie HaCaT- und SCL-1-Zellen.

Darüber hinaus fanden wir nach UVB-Behandlung ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$) in den primären Keratinozyten eine signifikante Zunahme der $\Delta\text{Np}73$ - und JAG2-Transkriptmengen während es in den HaCaT- bzw. in den SCL-1-Zellen zu einer signifikanten Abnahme dieser Transkriptmengen kam. Gleichzeitig konnten wir infolge der UVB-Bestrahlung ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$) eine vermehrte NOTCH2-Transkriptmenge in den primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen nachweisen, wohingegen in den SCL-1-Zellen eine Abnahme zu beobachten war. Diese Beobachtung spricht für eine gestörte UVB-induzierte Regulation der NOTCH2-Transkription, welche erst auf der Stufe des kompletten malignen Phänotyps besteht.

In dieser Arbeit konnten wir die Auswirkungen der UVB-Strahlung auf die Photokarzinogenese näher charakterisieren. Unsere Ergebnisse sprechen für eine veränderte Regulation der Transkription von Genen des p53- und Notch-Signalwegs in primären, immortalisierten und transformierten Keratinozyten infolge unterschiedlicher UVB-Strahlendosen sowie teilweise auch einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung. Abhängig vom jeweiligen Gen lassen sich diese sowohl auf der Stufe initiiertter Zellen (HaCaT) als auch in Zellen mit komplett malignem Phänotyp (SCL-1-Zellen) nachweisen. Zudem zeigt sich eine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -assoziierte Reduktion der TAp53- und NOTCH1-Transkriptmengen in primären Keratinozyten, welche sich in dieser Art und Weise in den HaCaT- und SCL-1-Zellen nicht nachweisen lässt. Hinsichtlich der verminderten TAp53-Transkriptmenge in den mit Vitamin D-behandelten UVB-Hochdosis-bestrahlten HaCaT-Zellen ließe sich diskutieren, ob eine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung in HaCaT-Zellen den dritten Schritt der Photokarzinogenese (die Progression) nicht sogar begünstigen könnte. Das Fehlen dieses Effektes in den SCL-1-Zellen könnte darauf hinweisen, dass die Vitamin D-regulierte Transkription von TAp53 und NOTCH1 mit der Anwesenheit von Wildtyp-p53-Protein korreliert. Inwieweit diese Unterschiede tatsächlich durch eine unterschiedliche p53-Funktionalität bedingt sind und inwieweit diese Unterschiede an der Pathogenese beteiligt sind, muss durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden.

Summary

UVB radiation from the sun has two opposing effects on the photocarcinogenesis of cutaneous squamous cell carcinoma. On the one hand, as a carcinogen it promotes its development, on the other hand it also has an anti-carcinogenic, protective influence via the cutaneous formation of vitamin D and the induction of DNA repair mechanisms. Photocarcinogenesis is currently assumed to be a multi-stage process. In the initiation stage, UVB radiation causes the formation of pyrimidine dimers. This molecular structural damage to the cellular DNA is followed by the promotion stage, in which the expression of genes that regulate cell growth is modulated. The aim of this work was to use a cell culture model to characterize the effects of UVB radiation in different stages of photocarcinogenesis in more detail. Of particular interest was the analysis of possible interactions of signaling pathways that are thought to play a key role in the initiation and promotion of cutaneous squamous cell carcinoma (p53, notch and vitamin D signaling pathways).

For this purpose, we investigated the influence of UVB radiation (no irradiation, 50mJ/cm², 200mJ/cm²) and of 1,25(OH)₂D₃ on three different cell types in vitro. These cells represent different stages of photocarcinogenesis of cutaneous squamous cell carcinoma and exhibit different p53 functionality (primary keratinocytes - functionally intact p53 as a model for "normal skin", HaCaT cells - dot-mutated p53, model for precancerous actinic keratosis and SCL-1 cells - lack of p53 protein, model for cutaneous squamous cell carcinoma). We analyzed the transcript levels of selected genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and partially also corresponding protein levels by western blotting.

The analysis of the transcript levels of important genes of the notch and p53 signaling pathway indicates a pathologically altered UVB-induced and partially 1,25(OH)₂D₃-induced modulation in the three different cell types, both at the initiation stages (HaCaT) and in the complete malignant phenotype (SCL-1). As an example, after treatment with 1,25(OH)₂D₃ in primary keratinocytes, there was a significant decrease in TAp53 transcript levels by a factor of approximately 0.5 in unirradiated and moderate-UVB irradiated cells (50mJ/cm²). Interestingly, this vitamin D-associated reduction in TAp53 transcript levels could no longer be detected in primary keratinocytes when the cells were exposed to high UVB radiation (200mJ/cm²). In contrast, in the HaCaT cells, such a vitamin D-associated reduction in TAp53 transcript levels was only detected in the high-dose irradiated cells. In agreement with the reduced TAp53 transcript levels in unstressed primary keratinocytes after 1,25(OH)₂D₃ treatment, a reduction in TAp53 protein levels was also found early after vitamin D exposure (4h). 1,25(OH)₂D₃ thus appears to reduce the amount of TAp53 protein in healthy keratinocytes. This effect appears to be reversed by strong UVB-induced DNA damage.

A similar observation could also be made with regards to the NOTCH1 gene; here, too, a reduced NOTCH1 transcript amount could be detected in the 1,25(OH)₂D₃-treated primary keratinocytes, but no longer in the cells with higher UVB radiation doses as well as HaCaT and SCL-1 cells.

Furthermore, we found a significant increase in Δ Np73 and JAG2 transcript levels in the primary keratinocytes after UVB treatment (200mJ/cm²), while there was a significant decrease in these transcript levels in the HaCaT and SCL-1 cells. At the same time, UVB irradiation (200mJ/cm²) increased NOTCH2 transcript levels in primary keratinocytes and HaCaT cells, whereas a decrease was observed in SCL-1 cells. This observation suggests a disturbed UVB-induced regulation of NOTCH2 transcription, which only exists at the stage of the complete malignant phenotype.

In this work, we were able to characterize the effects of UVB radiation on photocarcinogenesis in more detail. Our results indicate an altered regulation of the transcription of genes of the p53 and notch pathway in primary, immortalized and transformed keratinocytes as a result of different UVB radiation doses and, in some cases, 1,25(OH)₂D₃ treatment. Dependent on the respective gene, these can be detected both at the level of initiated cells (HaCaT) and in cells with a completely malignant phenotype (SCL-1 cells). In addition, a 1,25(OH)₂D₃-associated reduction in TAp53 and NOTCH1 transcript levels can be observed in primary keratinocytes, which cannot be detected in this way in HaCaT and SCL-1 cells. With regards to the reduced TAp53 transcript levels in HaCaT cells irradiated with vitamin D-treated high-dose UVB, it could be discussed whether 1,25(OH)₂D₃- treatment in HaCaT cells might not even favor the third step of photocarcinogenesis (progression). The absence of this effect in SCL-1 cells may indicate that vitamin D-regulated transcription of TAp53 and NOTCH1 correlates with the presence of wild-type p53 protein. To what extent these differences are causal to different p53 functionality and to what extent these differences are involved in pathogenesis needs to be clarified by future studies.

Inhaltsverzeichnis

1..Einleitung	1
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Haut	1
1.2 UV-induzierte Zellschädigung der Haut	3
1.2.1 UV-induzierte DNA-Schädigung	3
1.2.2 UVB-Strahlung und Sonnenbrand.....	5
1.3 Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese – Erklärungsansatz zur Entstehung des kutanen Plattenepithelkarzinoms	6
1.4 Photoprotektive Mechanismen und Faktoren.....	8
1.4.1 DNA-Reparaturmechanismen bei UV-Licht induzierten DNA-Schäden.....	8
1.4.2 Der Tumorsuppressor p53.....	9
1.4.2.1 UV-induzierte Mutationen des p53-Gens in Keratinozyten	13
1.4.3 Andere Mitglieder der p53-Familie: p63 und p73	13
1.4.3.1 P63.....	14
1.4.3.2 P73.....	15
1.4.4 Der Notch-Signalweg.....	16
1.4.4.1 Der Notch-Signalweg bei der Tumorgenese	17
1.4.4.2 Der Notch-Signalweg und die p53-Familie	18
1.4.5 Vitamin D.....	19
1.4.5.1 Vitamin D-Metabolismus	19
1.4.5.2 Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Retinoid X Rezeptor (RXR).....	21
1.4.5.3 Der Effekt von Calcitriol auf die Haut	21
1.4.5.4 Vitamin D in der Prävention von Plattenepithelkarzinomen der Haut 22	
1.4.5.5 Vitamin D und die p53-Familie	23
1.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit.....	23
2..Material und Methoden	25
2.1 Zellkultur.....	25
2.1.1 Ausgewählte eukaryontische Zelllinien	25
2.1.1.1 Primäre Keratinozyten	25
2.1.1.2 HaCaT-Keratinozyten	25
2.1.1.3 SCL-1-Zellen	25
2.1.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen	26
2.1.3 Passagieren eukaryontischer Zellen	26
2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27
2.1.5 Versuchsvorbereitungen und Behandlungsschema	28
2.1.6 Behandlung eukaryontischer Zellen.....	28
2.2 Bestimmung der Transkriptmengen mittels quantitativer Real-Time PCR.....	29

2.2.1	Funktionsprinzip der Real-Time PCR.....	29
2.2.2	Der C _T -Wert.....	30
2.2.3	Relative Quantifizierung.....	31
2.2.3.1	ΔΔC _T -Methode	31
2.2.3.2	Effizienz	32
2.2.4	Aussäen der Zellen.....	32
2.2.5	Manuelles Ernten der HaCaT- und SCL-1-Zellen.....	32
2.2.6	RNA-Isolierung mit Omniscript RT Kit von Qiagen	33
2.2.7	Umschreibung der RNA in cDNA.....	34
2.2.8	Ernte und RNA-Isolierung der primären Keratinozyten mit miRNeasy Mini Kit von Qiagen	34
2.2.9	Durchführung der quantitativen Real-Time PCR.....	35
2.3	Statistik.....	37
2.4	Western Blot.....	38
2.4.1	Funktionsprinzip Western Blot	38
2.4.2	Aussäen der Zellen.....	38
2.4.3	Ernten der Zellen	38
2.4.4	Proteinisolierung.....	39
2.4.5	Durchführung des Western Blots	39
3.	Ergebnisse	43
3.1	Transkriptmengen- und Proteinmengenänderungen in der p53-Familie.....	45
3.1.1	TAp53 45	
3.1.1.1	Primäre Keratinozyten: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	45
3.1.1.2	HaCaT-Keratinozyten: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	46
3.1.1.3	Plattenepithelkarzinomzellen: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	48
3.1.2	TAp53-Proteine in Keratinozyten	49
3.1.2.1	Proteinmenge von TAp53 in normalen Keratinozyten nach unterschiedlicher UVB-Exposition und Vitamin D-Behandlung.....	49
3.1.2.2	Proteinmenge von TAp53 in HaCaT-Zellen.....	50
3.1.2.3	Proteinmenge von TAp53 in SCL-1-Zellen.....	51
3.1.3	Δ133p53	52
3.1.3.1	Primäre Keratinozyten: Δ133p53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	52
3.1.3.2	HaCaT-Zellen: Δ133p53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	53
3.1.3.3	SCL-1-Zellen: Δ133p53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	53
3.1.4	TAp63 55	

3.1.4.1	Primäre Keratinozyten: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	55
3.1.4.2	HaCaT-Zellen: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	56
3.1.4.3	SCL-1-Zellen: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	56
3.1.5	Δ Np63 58	
3.1.5.1	Primäre Keratinozyten: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	58
3.1.5.2	HaCaT-Zellen: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	59
3.1.5.3	SCL-1-Zellen: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	60
3.1.6	TAp73 61	
3.1.6.1	TAp73 -Transkriptmenge in allen drei Zelllinien nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	61
3.1.7	Δ Np73 63	
3.1.7.1	Np73 Transkriptmenge in HaCaT- und SCL-1-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	63
3.1.7.2	Primäre Keratinozyten: Δ Np73 Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	64
3.2	Transkriptmengenveränderungen im Notch-Signalweg	66
3.2.1	JAG1 66	
3.2.1.1	Primäre Keratinozyten: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	66
3.2.1.2	HaCaT-Zellen: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	67
3.2.1.3	SCL-1-Zellen: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	68
3.2.2	JAG2 69	
3.2.2.1	Primäre Keratinozyten: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	69
3.2.2.2	HaCaT-Zellen: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	70
3.2.2.3	SCL-1-Zellen: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	70
3.2.3	NOTCH1	72
3.2.3.1	Primäre Keratinozyten: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	72
3.2.3.2	HaCaT-Zellen: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	73
3.2.3.3	SCL-1: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	74
3.2.4	NOTCH2	75
3.2.4.1	Primäre Keratinozyten: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	75

3.2.4.2	HaCaT-Zellen: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	76
3.2.4.3	SCL-1-Zellen: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	77
3.3	Transkriptmengenänderungen im Vitamin D-Rezeptor (VDR) und RXR- α	78
3.3.1	VDR	78
3.3.1.1	Primäre Keratinozyten: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	78
3.3.1.2	HaCaT-Zellen: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	79
3.3.1.3	SCL-1-Zellen: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	79
3.3.2	RXR- α	81
3.3.2.1	Primäre Keratinozyten: Kein Effekt von UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung auf die RXR- α -Transkriptmenge	81
3.3.2.2	HaCaT-Zellen: RXR- α -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	81
3.3.2.3	SCL-1-Zellen: RXR- α -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	82
3.4	Übersicht über gleichgerichtete und gegenläufige Effekte der UVB-Bestrahlung und 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ -Behandlung auf die Transkriptmengen in den drei Zelllinien	84
3.4.1	Effekte der 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ -Behandlung auf die Transkriptmengen.....	84
3.4.2	Gleichgerichtete Effekte der UVB-Bestrahlung auf die Transkriptmengen in primären Keratinozyten.....	84
3.4.3	Gegenläufige Effekte der UVB-Strahlung auf die Transkriptmengen in den drei verschiedenen Zelllinien	85
3.4.4	UVB-Dosisabhängige Effekte auf die Transkriptmenge	86
3.4.5	Keine Hinweise für kompensatorische Expressionen von anderen p53-Familienmitgliedern in p53-defizienten Zellen	86
4.	Diskussion	87
4.1	Transkriptmengenvariationen in Tumorsuppressor- und Differenzierungs-Signalwegen nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D, in Abhängigkeit vom Transformationsgrad von Keratinozyten	87
4.1.1	Transkript- und Proteinmengenvariationen der p53-Familie nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D.....	88
4.1.2	Transkriptmengenvariationen im Notch-Signalweg nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D	92
4.2	Limitierungen der Studie.....	95
4.2.1	Fehlende Quantifizierung der Zellschädigung durch UVB-Strahlung.....	95
4.2.2	Unterschiedliche Kultivierungs- und Erntebedingungen der drei Zelllinien	95
4.2.3	Einsatz von Ethanol als Trägersubstanz	96
4.2.4	Kritik bei der Übertragung des Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese auf die drei verwendeten Keratinozytenzellreihen.....	96

4.2.4.1 NFK/NHEK-Zellen - „gesunde“ Keratinozyten im Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese	96
4.2.4.2 HaCaT-Zellen – „Präkanzerose“ im Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese	97
4.2.4.3 Beeinflussung der Expression abhängig vom Zellzyklus	97
5.. Schlussfolgerung und Ausblick.....	98
6.. Literaturverzeichnis	100
7.. Danksagung.....	111
8.. Lebenslauf	112
9.. Anhang.....	114
9.1 Abbildungsverzeichnis	114
9.2 Tabellenverzeichnis.....	118
9.3 Verwendete Materialien.....	119

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
18S	ribosomale RNA 18S
25-H-D	25-Hydroxy-Vitamin D ₃
6-4PP	Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
AK	aktinische Keratose
ANOVA	Analysis of variance
ATM-Kinase	ataxia telangiectasia mutated kinase
BCC	Basal cell carcinoma
BER	Basen Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Calcidiol	25-Hydroxy-Vitamin D ₃
Calcitriol	1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
CDK-Inhibitor	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cp	Crossing Point
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
cSCC	cutaneous squamous cell carcinoma
Ct	threshold cycle
DDB2	DNA damage-binding protein2
DLL	Delta-Like-Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch-Reparaturen
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
et al.	et alii (und andere)
FCS	Fetales Kälberserum, fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde/n
HaCaT-Zellen	Human adult low Calcium, high Temperature Keratinocytes
HKG	Housekeepinggen
i.S.	im Sinne, im Sinne
JAG1	Jagged
L	Liter
M	molare Masse
Mdm2	Murine double minute2
min	Minute/n
ml	Milliliter
MMR	Missmatch-Reparatur
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NFK	Normal Human Foreskin Keratinocytes
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMSC	Non-melanoma skin cancer
NRR	negativ regulierenden Region
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
Rb	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	<i>Ribonuklease</i>
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RXR	<i>Retinoid X Rezeptor</i>
s	<i>Sekunde/n</i>
SCC	squamous cell carcinoma
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
T	<i>Thymin</i>
TNS	<i>Trypsin Neutralization Solution</i>
TP53	<i>Tumorsuppressorprotein p53</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
U/min	<i>Umdrehung pro Minute</i>
UV-Strahlung	<i>Ultravioletten-Strahlung, Ultraviolette-Strahlung</i>
VDBP	<i>Vitamin-bindenden Protein</i>
VDR	<i>Vitamin D Rezeptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D Response Elemente</i>
Vitamin D ₂	<i>Ergocalciferol</i>
Vitamin D ₃	<i>Cholecalciferol</i>
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
µl	<i>Mikroliter</i>

1 Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Haut

Das kutane Plattenepithelkarzinom ist eine weitverbreitete maligne Neoplasie der epidermalen Keratinozyten und tritt am häufigsten an der sonnenexponierten Haut von Kopf und Hals hellhäutiger älterer Menschen auf [59]. Synonym wird es auch als spinözelluläres Karzinom, Spinaliom, verhornender Plattenepithelkrebs, Stachelzellkarzinom oder im englischen Sprachraum als squamous cell carcinoma (SCC) bezeichnet [20].

Zusammen mit dem Basalzellkarzinom (BCC vom Englischen „basal cell carcinoma“) zählt man das Plattenepithelkarzinom der Haut zum hellen Hautkrebs (NMSC vom Englischen „non-melanoma skin cancer“). Das SCC stellt mit 20% der NMSC den zweithäufigsten Hautkrebs der europäischen Bevölkerung dar und wird in seiner Zahl nur vom BCC übertroffen [150]. Aus epidemiologischen Daten der letzten 30 Jahre lässt sich ein Trend mit steigenden Inzidenzen ableiten, wonach die Inzidenz von SCC jährlich um 3-10% zunimmt [135]. Die weltweiten Inzidenzen unterscheiden sich dabei stark [4]. So zeigen epidemiologische Studien die höchsten Inzidenzraten in Australien mit etwa 387 Fällen je 100.000 Personenjahre, im Vergleich dazu Skandinavien mit einer Inzidenzrate von nur etwa 10/100.000 pro Jahr [87]. Auch in Deutschland lässt sich dieser Trend nachweisen, so zeigen Daten aus dem deutschen Krebsregister aus dem kurzen Zeitfenster von 2005 bis 2013 bereits einen deutlichen Anstieg der Inzidenz von weißem Hautkrebs, wobei Männer deutlich häufiger davon betroffen sind als Frauen [151] (siehe Abbildung 1). Höchstwahrscheinlich liegen die tatsächlichen Inzidenzraten noch höher, da jedoch viele NMSC vorwiegend ambulant therapiert werden, erfolgt oft keine konsequente Erfassung durch die meisten Krebsregister [149].

Bei der Entstehung des kutanen Plattenepithelkarzinoms muss ein komplexes Zusammenspiel multipler Faktoren berücksichtigt werden. Der Ultravioletten-Strahlung (UV-Strahlung) des Sonnenlichts kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu (siehe Kapitel 1.2). Neben der Art der UV-Strahlung, sowie der Strahlendosis spielt auch der individuelle Hauttyp des Menschen eine entscheidende Rolle beim Ausbilden eines kutanen Plattenepithelkarzinoms. So findet man häufiger kutane Plattenepithelkarzinome und deren Präkanzerosen bei Menschen mit den Hauttypen I und II nach Fitzpatrick, da diese keltischen und nordischen Hauttypen infolge einer UV-Exposition vermehrt zur Ausbildung eines Sonnenbrands tendieren (siehe Kapitel 1.2.2). Weitere pathogene Faktoren sind eine chronische Hitzeeinwirkung (auch ohne Licht) sowie Röntgenstrahlen, chronisch-degenerative und chronisch-entzündliche Hautveränderungen [70] (z.B. straffe Narben und andere Hautatrophien, wie beispielsweise bei einem Lichen sclerosus), chemische Kanzerogene (z.B. aromatische Kohlenwasserstoffe, Arsen, Paraffinöl,

Teer), Infektionen mit humanen Papillomaviren, Immunsuppression [42] und eine Reihe an individuellen Faktoren, wie Alkoholabusus und Rauchen [152]. Zusätzlich leistet die UV-induzierte Immunsuppression einen nicht unerheblichen Beitrag zur Photokarzinogenese [104].

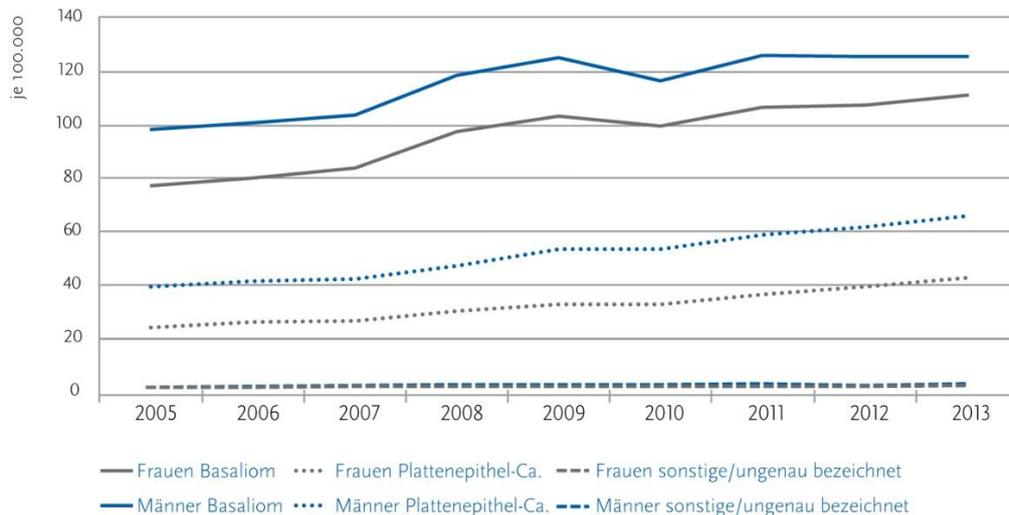


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für die verschiedenen Formen des nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland

Die Daten stammen aus den Bundesländern Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz, Mecklenburg-Vorpommern und dem Regionalbezirk Münster, Erhebungszeitraum 2005-2013, aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts. Bereits Daten aus diesem kurzen Zeitraum zeigen einen deutlichen Anstieg der Inzidenz von weißem Hautkrebs in Deutschland an.

(Online-Abbildung aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten: URL:

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Grafiken_Online/2_9_o4.png?_blob=publicationFile (28.12.2023))

Die Entwicklung eines Spinalioms kann in Etappen fortschreiten. Zunächst besteht nur eine sonnengeschädigte Epidermis mit individuell gestörten Keratinozyten, sogenannten aktinischen Keratosen (AK). Diese können sich über eine veränderte Zelldifferenzierung und -proliferation zu einem Carcinoma in situ entwickeln, welches dann in das maligne Plattenepithelkarzinom übergehen kann. Die aktinische Keratose stellt eine chronische Schädigung der Haut dar und gilt als fakultative Präkanzerose des kutanen Plattenepithelkarzinoms. Wie ihre Synonyme solare Keratose und Licht-Keratose bereits andeuten, entstehen diese infolge einer langjährigen und intensiven Sonnenlichtexposition. Durch die im Sonnenlicht enthaltene UV-Strahlung kann es zu Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 kommen (siehe Kapitel 1.4.2.1), was wiederum zu einer lokal begrenzten, abnormen Zellproliferation führen kann. Diese atypischen Keratinozyten stellen sich klinisch als aktinische Keratosen dar [66]. Eine aktinische Keratose kann sich bei fehlender Sonneneinstrahlung wieder zurückbilden. Besteht die Sonnenexposition allerdings weiterhin, können sie in ihrem Wachstum langsam fortschreiten und in ein Plattenepithelkarzinom übergehen [20]. Aktuelle Studien konnten bisher keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der Übergangswahrscheinlichkeit einer aktinischen Keratose in ein kutanes Plattenepithelkarzinom liefern [49]. Unbestreitbar bleibt jedoch das maligne Potenzial

einer aktinischen Keratose, weshalb nach den aktuellen Leitlinien eine Therapieempfehlung für diese ausgesprochen wird [149].

1.2 UV-induzierte Zellschädigung der Haut

Die Relevanz der Sonnenlicht-Exposition für das Entstehen von Hautkrebs ist lange bekannt und in zahlreichen Studien belegt [18,50,71,73,146]. Dabei konnte beobachtet werden, dass insbesondere die kumulative, intermittierende Sonnenexposition das Risiko für NMSC erhöht [50,127]. Der wohl wichtigste kanzerogene Faktor stellt dabei die Ultraviolette-Strahlung (UV-Strahlung) dar.

1.2.1 UV-induzierte DNA-Schädigung

Die UV-Strahlung unterteilt man nach der Wellenlänge in drei Arten: UVA-(315-400 nm), UVB-(280-315 nm) und UVC- Strahlung (100-280 nm) [68]. Hierbei besteht ein wellenlängenabhängiges Eindringen von UV-Strahlung in die Haut. Die Eindringtiefe in die Epidermisschichten nimmt mit der Wellenlänge zu, da die hochenergetischen kürzeren Wellenlängen stärker gestreut und absorbiert werden. Daher erreicht UVB hauptsächlich die Epidermis, während die weniger energiereichen UVA-Strahlen auch die Hautschichten der Dermis beeinflussen [55] (siehe Abbildung 2). Obwohl die UVC-Strahlung am effizientesten zur Ausbildung sogenannter Photoprodukte in der DNA führt, spielt sie bei der Entstehung von NMSC nur eine untergeordnete Rolle, da sie von der Ozonschicht mindestens 105-fach herausgefiltert wird [79]. In der Hautkrebsforschung wird daher vor allem die Wirkung von UVB- und UVA-Strahlung untersucht.

Die UVA-Strahlung und das sichtbare Licht sind in der Lage reaktive Sauerstoffspezies (ROS vom Englischen „reactive oxygen species“) zu erzeugen, welche zu oxidativen DNA-Schäden führen können [86,153]. Die UVA-Strahlung wird von der menschlichen DNA jedoch nur schwach absorbiert, sodass eine DNA lediglich indirekt, über die Absorption von UVA-Photonen durch endogene und exogene lichtempfindliche Moleküle geschädigt werden kann [52]. Neben dieser karzinogenen Eigenschaft, wird die UVA-Strahlung vornehmlich wegen ihres eminenten Einfluss auf eine vorzeitige Hautalterung erforscht [7].

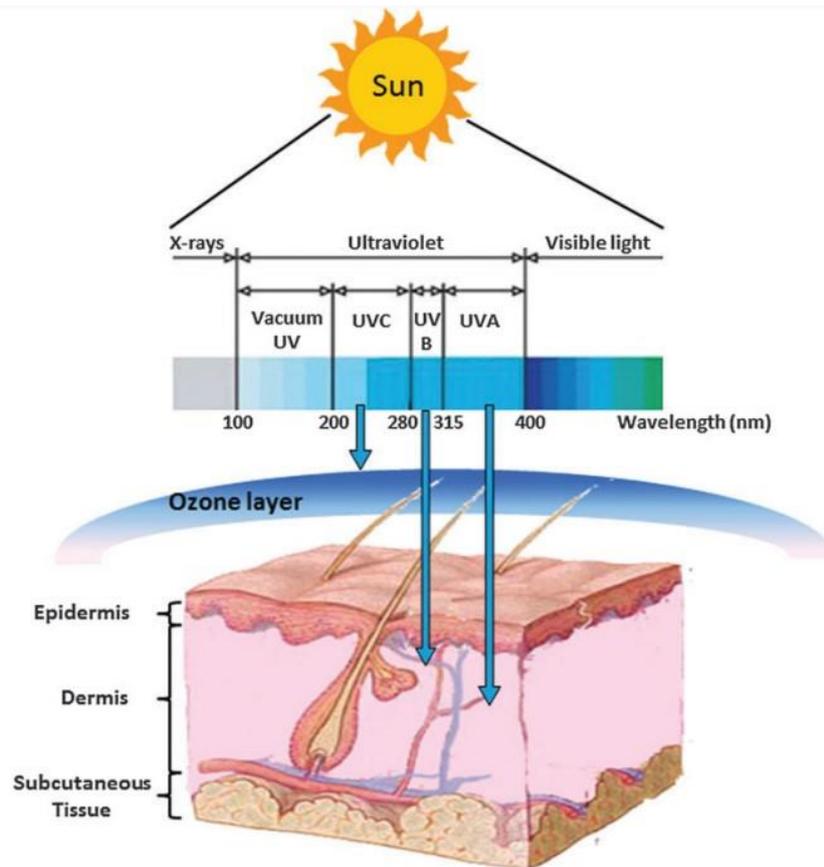


Abbildung 2: Spektrum des UV-Lichts und dessen wellenlängenabhängiges Eindringen in die Haut

Die Eindringtiefe in die Haut nimmt mit zunehmender Wellenlänge zu. Die kürzeren hochenergetischen Wellenlängen werden stärker gestreut, somit erreicht das UVB-Licht hauptsächlich die Epidermis, während die weniger energiereichen langwelligeren UVA-Strahlen bis in die Dermis eindringen.

(Abbildung aus dem Artikel Gupta A, Avci P, Dai T, Huang YY, Hamblin MR. *Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Oct;2(8):422-437. doi: 10.1089/wound.2012.0366. PMID: 24527357; PMCID: PMC3797459. URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797459/pdf/wound.2012.0366.pdf> (28.12.2023))

Von sehr viel größerer Relevanz für die Entstehung UV-induzierter DNA-Schäden und der damit einhergehenden Photokarzinogenese ist die UVB-Strahlung. Obwohl sie weniger als 1% der gesamten Sonnenenergie ausmacht, ist sie maßgeblich für die Entstehung UV-induzierter DNA-Schäden verantwortlich [52]. Sie führt durch die Bildung von D-Dimeren in der DNA zu molekularen Strukturänderungen, was wiederum eine Vielzahl an mutagenen DNA-Schäden zur Folge hat. Diese DNA-Schäden gefährden wiederum die Genomintegrität und -stabilität. Dabei ist die Stabilität der DNA von größter Bedeutung für das ordnungsgemäße Funktionieren und Bestehen aller lebenden Systeme. Eine Beeinträchtigung dieser entsteht infolge von Fehlintegrationen von Basen während des Replikationsprozesses. Zu den häufigsten UVB-induzierten DNA-Schäden zählen DNA-Strangbrüche, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PP), sowie deren Deware-Valenzisomere [117]. Diese UV-typischen DNA-Schädigungen werden auch als UV-Signatur bezeichnet und beschreiben spezifische Mutationen, die nur durch UV-Strahlung induziert werden und die

Ausbildung eines kutanen Plattenepithelkarzinoms begünstigen [19]. In DNA-Sequenzierungsstudien an Escherichia coli-Bakterien konnte man dazu nachweisen, dass sich die UV-Strahlung spezifisch auf bestimmte Stellen des bakteriellen Genoms richtet. Diese Stellen sind charakterisiert durch je zwei benachbarte gleiche Pyrimidine (C= Cytosin oder T= Thymin), weshalb man diese Konformitätsänderung auch als UV-induzierte CC→TT-Doppelbasen-Substitution bezeichnet [69]. Die CC→TT Doppelbasen-Substitutionen scheinen dabei spezifisch nur bei DNA-Schädigungen aufzutreten, die durch UV-Strahlung induziert wurden [95]. Sie stellen eine Störung der DNA-Konformation dar und führen zu einer veränderten Replikation des jeweiligen DNA-Abschnittes. Die so entstandenen Mutationen können sich auf vielfältige Weise und in unterschiedlichsten Signalwegen äußern [68]. So weisen beispielsweise etwa 50% der Hautkrebs TP53-Mutationen auf, die durch solche UVB-induzierte Punktmutationen (C→T- und CC→TT-Transitionen) gekennzeichnet sind [9, 48,120].

Den Pyrimidin-Photoprodukten kommt somit eine entscheidende Rolle bei der Photokarzinogenese zu (siehe Abschnitt 1.3). Sie sind für diejenigen Mutationen im Genom verantwortlich, die dann zur Hoch- oder Herunterregulierung von Signaltransduktionswegen, zu einer Dysregulation des Zellzyklus und zur Erschöpfung der antioxidativen Abwehrkräfte führen. Darüber hinaus konnte man nachweisen, dass Pyrimidin-Dimere eine UV-induzierte Immunsuppression auslösen können, der ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Photokarzinogenese zugesprochen wird [104].

Gesunde Zellen sind dazu in der Lage solchen DNA-Schädigungen durch diverse DNA-Reparaturmechanismen und Apoptose entgegenzuwirken. Welcher Reparaturmechanismus dabei in der Zelle aktiv wird, hängt im Wesentlichen von der Art und Lage sowie dem Ausmaß der Läsion ab [41]. Sollten Gene, die an solchen Reparatur-Mechanismen oder der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind allerdings mutiert sein, kann dies zu einer abnormen Zellproliferation und somit zur Entstehung einer Neoplasie führen [127].

1.2.2 UVB-Strahlung und Sonnenbrand

Die mittellangwelligen UVB-Strahlen können in der Haut sogenannte Sonnenbrandreaktionen erzeugen, die sich in der Epidermis als Hyperkeratosen, partielle Parakeratosen sowie Akanthose präsentieren können [117]. Sie stellen eine UV-Entzündung dar und können bei der Photokarzinogenese den zweiten Schritt (Promotionsphase) induzieren (siehe Kapitel 1.3). Die Formierung sogenannter Sonnenbrandzellen wird dabei maßgeblich durch das Tumorsuppressorprotein p53 bestimmt (siehe Kapitel 1.4.2.1). Diese Sonnenbrandzellen lassen sich klinisch als Sonnenbrand erkennen und sind das charakteristische Merkmal der UV-induzierten Hautschädigung [29]. Eine Zelle mit funktionellem p53 geht nach einer UV-

Exposition dann in Apoptose über, wenn die daraus folgende DNA-Schädigung so stark fortgeschritten ist, dass eine Reparatur nicht mehr möglich wäre. Zusätzlich entstehen Sonnenbrandzellen nur aus denjenigen Hautzellen, die sich zum Zeitpunkt der UV-induzierten DNA-Schädigung, gerade in der DNA-Replikation befanden. Unsere Haut scheint demnach eine p53-abhängige "Wächter des Gewebes"-Reaktion (siehe Kapitel 1.4.2) auf DNA-Schäden zu besitzen, deren Aufgabe darin besteht, präkanzeröse Zellen zu beseitigen, bevor sie schwerwiegendere Folgen nach sich ziehen.

1.3 Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese – Erklärungsansatz zur Entstehung des kutanen Plattenepithelkarzinoms

Das Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese versucht das komplexe multifaktorielle Zusammenspiel aus angehäuften genetischen und immunologischen Veränderungen [92] zu erklären und soll im folgenden Abschnitt zur Erklärung der Plattenepithelkarzinomgenese herangezogen werden. Das Plattenepithelkarzinom stellt hierbei den neoplastischen Phänotyp dar, der durch den Verlust der physiologischen Keratinozytenfunktion, sowie eine unkontrollierte Proliferation gekennzeichnet ist. Dabei erfolgt der Übergang in den neoplastischen Phänotyp schrittweise und erstreckt sich über einen meist langen Zeitraum. Dies spiegelt sich auch in epidemiologischen Daten wieder: obwohl die für die aktinische Keratose und das kutane Plattenepithelkarzinom verantwortliche Sonneneinstrahlung schon im Kindesalter besteht, erscheinen die typischen Hautveränderungen erst nach etwa vierzig oder mehr Jahren chronischer, relativ niedrig dosierter Sonneneinstrahlung [146].

Im Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese wird die Entstehung von Hautkrebs in drei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt, der *Initiationsphase*, bewirkt das Karzinogen UVB-Strahlung spezifische DNA-Mutationen, meist Pyrimidin-Photoprodukte, in bestimmten Genen des Keratinozyten. Damit ein Spinaliom überhaupt erst entstehen kann, muss eine solche Mutation in einem Gen erfolgen, welches für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung verantwortlich ist. Das vielleicht bedeutendste dieser Gene ist das Tumorsuppressorgen p53. Doch neben diesem Vertreter gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Gene, die in unterschiedlichster Art und Weise an diesem Prozess beteiligt sind. Deren Funktionsprinzip sowie die Identifizierung weiterer beteiligter Gene sind Gegenstand aktueller und künftiger wissenschaftlicher Forschung. Sind solche Gene mutiert, so spricht man entweder von mutierten Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen.

Eine Mutation kann bei diesen Genen entweder zu einem Ausfall (loss of function) oder einer Funktionsänderung (gain of function) führen. Beides kann die normalen Stoffwechselabläufe der Zelle stören und hat zur Folge, dass sich unkontrolliert vermehrende Tumorzellen entstehen, die zusätzlich eine verlängerte Lebensdauer aufweisen [104]. Bei der Entstehung

des Spinalioms kommt es zu einer spezifischen loss of function-Mutation in zunächst nur einem Allel des Tumorsuppressorgens p53. Dadurch entsteht eine Präkanzerose, welche noch keine offensichtliche Veränderung im Phänotyp der Zelle, jedoch eine Störung der terminalen Ausdifferenzierung und Apoptose aufweist. Die so mutierte Zelle ist dann nicht mehr in der Lage den entstandenen DNA-Schaden durch DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose zu beheben. Die Mutation bleibt bestehen und ist damit irreversibel.

Im zweiten Schritt, der *Promotionsphase*, wirkt ein Wachstumsreiz auf die mutierte Zelle ein, die daraufhin mit einer gesteigerten Proliferation reagiert. Einen solchen Wachstumsreiz stellen beispielsweise UVB-induzierte entzündliche Prozesse dar. So können beispielsweise die oben genannten Sonnenbrandreaktionen eine Zellproliferation induzieren [104], bei der die veränderte Zelle ihren DNA-Schaden auf ihre Tochterzelle weitergibt, die dann ebenfalls eine instabile DNA aufweist. Damit steigt das Risiko für weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen, die dann wiederum entweder inaktiv sind oder als Onkogene wirksam werden. Der expandierende zelltodefekte Klon stellt ein bevorzugtes Ziel für künftige UV-Expositionen dar. Zudem ist der Großteil dieser Zellen in der Lage eine Bestrahlung mit UV-Licht zu überleben, was wiederum die Anreicherung weiterer Mutationen begünstigen kann. Kommt es zu einer Mutation des zweiten Allels für p53, hat dies den vollständigen Verlust von Wildtyp-p53 und damit der p53-vermittelten Kontrolle der Zellproliferation und des kontrollierten Zelltods zur Folge. Sonnenlicht scheint demnach nicht nur ein tumorerzeugendes Mutagen darzustellen, sondern auch als Promotor der weiteren Tumorentwicklung zu wirken, indem es die klonale Expansion von bereits p53-mutierten Zellen begünstigt [71]. Die genannten Effekte können durch eine schrittweise Selektion die Anzahl der mutierten Zellen erhöhen, ohne dass dafür ein Mutator-Phänotyp, also das Vorliegen von Mutationen in Reparaturgenen, erforderlich ist.

Die UVB-Strahlung gehört damit zu den als "vollständig" bezeichneten Karzinogenen. Dies bedeutet, dass sie sowohl initiierende als auch promovierende Aktivitäten besitzt und deshalb in der Lage ist ohne zusätzliche Noxe kutane Plattenepithelkarzinome zu verursachen.

Im dritten Schritt, der *Progression*, kommt es zur eigentlichen malignen Transformation. Durch die Hemmung zahlreicher Tumorsuppressorgene und die Aktivierung von Onkogenen bildet sich das Carcinoma in situ. Diese Art der Präkanzerose ist ein präinvasiver maligner epithelialer Tumor, der zunächst noch auf sein Ursprungsgewebe begrenzt ist, später aber in ein invasives Karzinom übergehen kann. Im Gegensatz zum invasiven Karzinom ist die Präkanzerose nicht in der Lage Metastasen zu bilden.

Es sei hier hervorgehoben, dass es sich bei diesem Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese um einen stark vereinfachten Erklärungsansatz handelt, der versucht das komplexe Zusammenspiel aus verschiedenen zellulären, biochemischen und molekularen Prozessen auf die folgenden drei Teilschritte zu reduzieren:

1. Durch UVB-induzierte DNA-Läsionen entstehen genetische Mutationen (Initiation)
2. Die durch UVB-Licht hervorgerufene Entzündung (Sonnenbrand) verursacht eine gesteigerte Proliferation (Promotion)
3. Diese gesteigerte Proliferation kann aufgrund der UVB-induzierten Mutationen nicht durch Tumorsuppressor-initiierte Signalwege gehemmt werden und kann sogar durch Onkogene verstärkt werden. Es entsteht das Carcinoma in situ (Progression).

Neuere Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, dass die Photokarzinogenese weitaus komplexer von statten geht, als oben beschrieben. Alle daran beteiligten Prozesse, die durch verschiedenste zelluläre, biochemische und molekulare Veränderungen vermittelt werden, scheinen dabei eng miteinander verbunden zu sein und viele von ihnen sind immer noch unentdeckt.

1.4 Photoprotektive Mechanismen und Faktoren

Der Mensch hat im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um seine DNA-Integrität vor Noxen wie dem UV-Licht zu schützen. Beispielsweise sind viele Organismen in der Lage UV-absorbierende Pigmente zu produzieren. Dabei reagiert die Haut auf UVB-Strahlung mit einer vermehrten Produktion von Melanin, welches wiederum der Haut als natürlicher Lichtschutz dient. In Studien fand man heraus, dass Melanin in der Lage ist 99,9% der Strahlungsenergie in unschädliche Wärme umzuwandeln [94]. Diese UV-absorbierenden Pigmente sind jedoch nicht in der Lage das Eindringen der UV-Strahlen in die DNA der oberen Gewebe komplett zu verhindern [21,126]. Es muss daher noch eine Reihe weiterer Mechanismen geben, mithilfe derer unser Organismus versucht die Entstehung eines Karzinoms der Haut zu vereiteln.

1.4.1 DNA-Reparaturmechanismen bei UV-Licht induzierten DNA-Schäden

UV-induzierte DNA-Schäden aktivieren in den Zellen Mechanismen zur Beseitigung der entstandenen DNA-Schäden. Dazu gehören neben dem Eingreifen in den Zellzyklus und der Apoptose, diverse DNA-Reparaturmechanismen. Zu diesen zählen die Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur (BER/ NER), die Mismatch-Reparatur (MMR), sowie die Doppelstrangbruch-Reparaturen (DSB).

Bei den Exzisionsreparaturen handelt es sich um einen mehrstufigen Reparaturweg, bei dem eine abnormale oder beschädigte Base entweder durch Basenexzisionsreparatur oder Nukleotidexzisionsreparatur entfernt wird. Die NER ist von entscheidender Bedeutung für die Reparatur von UV-induzierten DNA-Läsionen und eines der vielseitigsten und flexibelsten Reparatursysteme, das in den meisten Organismen vorkommt. Es repariert eine breite Palette von strukturell unabhängigen DNA-Läsionen, darunter auch die UV-Strahlungsinduzierten CPDs und 6-4PPs. Vermutlich werden sowohl 6-4PPs als auch CPDs von den gleichen NER-Proteinen entfernt, allerdings variiert die relative Reparatureffizienz dieser beiden Läsionen in Säugerzellen erheblich. So wurde festgestellt, dass in menschlichen Zellen die Eliminierung von 6-4PP mindestens fünfmal schneller abläuft, als die von CPDs [133]. Die fundamentale Relevanz der Reparatur beim Schutz vor UV-induziertem Hautkrebs wird deutlich, wenn man sich die Pathogenese des Krankheitsbildes Xeroderma pigmentosum (XP) ansieht. Hierbei kommt es aufgrund von diversen Mutationen in Genen, die an verschiedenen Teilschritten des NER-Prozesses beteiligt sind, zu einer Störung der DNA-Reparatur nach Schäden durch Sonnenlichtexposition. Die Patienten mit XP fallen durch eine abnorme Hautreaktion gegenüber UV-Exposition auf, dazu gehören die verfrühte Ausbildung einer Altershaut, sowie ein signifikant vermehrtes Auftreten maligner Hauttumore [30].

DNA-Schäden können, neben der Einleitung von diversen DNA-Reparaturprozessen, zusätzlich zu einem vorübergehenden Stopp des Zellzyklus führen, indem sie sogenannte Zellzyklus-Checkpoints aktivieren. Dadurch geben sie der Zelle die Möglichkeit zur DNA-Reparatur bevor es zur Replikation des betroffenen Chromosoms kommen kann [61]. Ist eine Zelle jedoch irreparabel geschädigt, kommt es durch Induzierung eines apoptotischen Programms zur Beseitigung der beschädigten Zellen, um deren krebserregendes Potenzial abzuwenden. Im Folgenden soll daher die Rolle des Tumorsuppressors p53 als Zellzykluskontroll-Checkpoint näher erläutert werden.

1.4.2 Der Tumorsuppressor p53

Das nach seinem ursprünglich angenommenen Molekulargewicht benannte Tumorsuppressorprotein p53 wurde bereits 1979 von verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt und ist seither Objekt intensiver Forschung. Dabei fand man heraus, dass es sich bei p53 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der an diversen Signalwegen der DNA-Überwachung beteiligt ist, welche das Genom ständig auf DNA-Schäden untersuchen und entsprechend reagieren [45]. Aufgrund der maßgebenden Rolle von p53 bei der Vereitelung genomischer Instabilität und der damit einhergehenden Wahrung der genomischen Integrität, wird es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Es wirkt u.a. als Transaktivator von Genen, deren Produkte an der Hemmung des Zellzyklus beteiligt sind. Infolge von verschiedensten Stressfaktoren, die DNA-Schäden oder sonstige gravierende Beeinträchtigungen der Zelle zur

Folge haben, veranlasst p53 entweder den vorübergehenden Austritt aus dem Zellzyklus (Quieszenz), den permanenten Austritt aus dem Zellzyklus (Seneszenz) oder einen programmierten Zelltod (Apoptose). Welcher dieser Prozesse stattfindet, ist unter anderem vom Zellzyklusstadium abhängig, in dem sich die Zelle zum Zeitpunkt der Schädigung befindet [80].

In gesunden Zellen wird das p53-Protein zwar kontinuierlich gebildet, aber auch stetig wieder abgebaut, sodass normalerweise nur wenig p53-Protein in Zellen vorhanden ist. Dazu bindet die Ubiquitin-Ligase Mdm2 (vom Englischen: „murine double minute“) an p53 und führt so zu dessen Abbau über das 26S-Proteasom. Tritt eine Zellschädigung auf, beispielsweise durch UVB-Strahlung, kommt es zur Dissoziation der Mdm2/p53-Interaktion. Dadurch erfolgt eine Stabilisierung des p53-Proteins und eine Anreicherung von p53 in der Zelle. Die Dissoziation erfolgt zum einen durch die Phosphorylierung des p53 über die ATM-Kinase (vom Englischen „ataxia telangiectasia mutated kinase“), wodurch p53 seine Affinität zur Ubiquitin-Ligase Mdm2 verliert, zum anderem durch die hemmende Wirkung der ATM-Kinase auf Mdm2 [24]. In erhöhter Konzentration und ohne Mdm2 wirkt p53 dann als Transkriptionsfaktor u.a. des p21Cip1-Gens (CDKN1A). Das p21-Protein ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor (CDK-Inhibitor) und in der Lage CDK2 und CDK4 im Komplex mit Cyclin D und E zu hemmen, welche wiederum an der Phosphorylierung des aktiven Retinoblastomproteins (Rb) beteiligt sind. Tritt keine DNA-Schädigung auf und läuft der Zellzyklus normal ab, setzt das durch die Phosphorylierung inaktivierte Rb-Protein den gebundenen Transkriptionsfaktor E2F frei. Dieser aktiviert die S-Phase-Gene, wodurch der Übergang zur S-Phase und damit die Zellproliferation eingeleitet wird. Indem p21 die CDK aber hemmt, findet diese Phosphorylierung nicht statt. Dies hat zur Folge, dass das dephosphorylierte Rb aktiv bleibt und damit nicht in der Lage ist den Transkriptionsfaktor E2F freizusetzen. Somit findet kein Übergang von der G1- in die S-Phase statt und der Zellzyklus wird blockiert, bis der Schaden behoben wurde (siehe Abbildung 3). Findet die DNA-Schädigung also in einer Zelle statt, die sich gerade in der Anfangsphase von G1 befindet, so vermittelt p53 einen vorübergehenden Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Wird die DNA einer Zelle erst nach diesem Kontrollpunkt irreparabel beschädigt, bzw. befindet sich die Zelle schon in einem fortgeschrittenen Stadium des Zellzyklus, so löst p53 den programmierten Zelltod (Apoptose) aus („guardian of the tissue“) [146]. Die Apoptose erfolgt wiederum über weitere Signalwege, wobei unter anderem der Bcl-2-Proteinfamilie eine bedeutende Rolle bei dessen Regulation zugeschrieben wird. P53 kann hierbei direkt die Transkription des Bcl-2-Familienmitglied Bax induzieren, was wiederum die Apoptose einleitet [99].

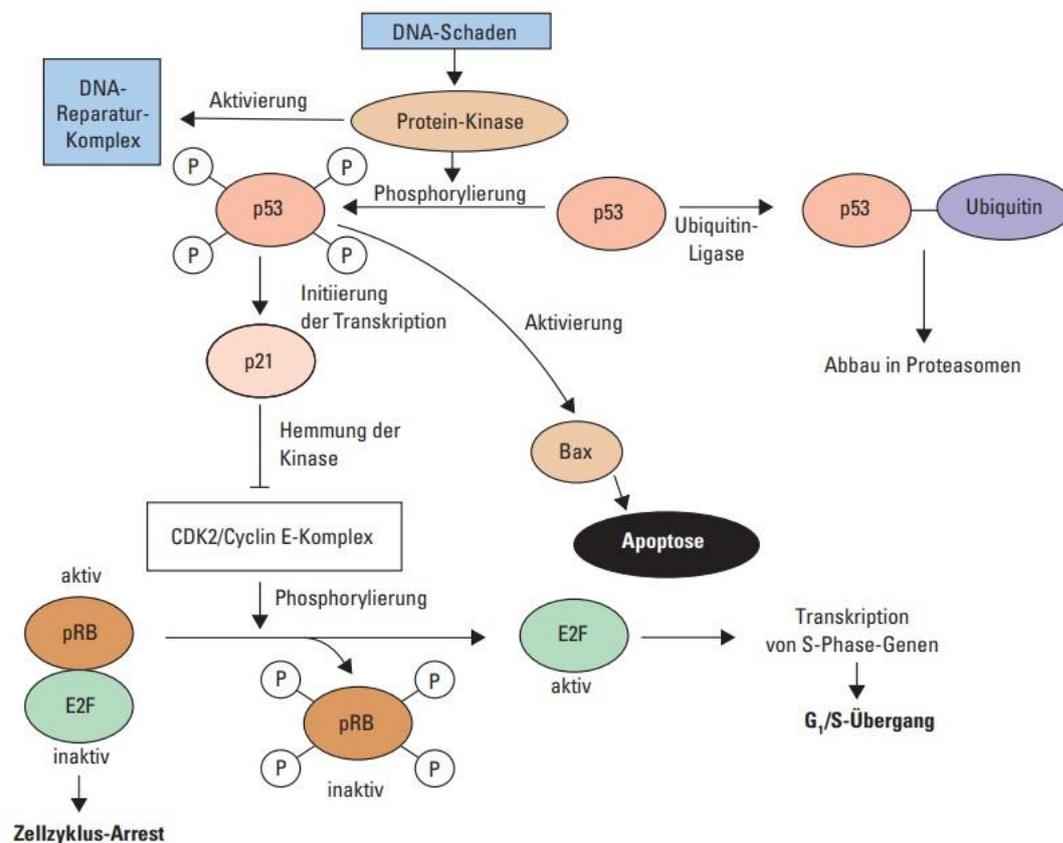


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des p53-Signalweges bei DNA-Schaden

Durch einen DNA-Schaden in der Zelle erfolgt eine Phosphorylierung des p53 durch die Proteinkinase ATM, wodurch die Dissoziation der Ubiquitin-Ligase Mdm2 und p53 erfolgt. P53 wird dadurch stabilisiert und fungiert u.a. als Transkriptionsfaktor für das p21-Gen. Das p21-Protein hemmt wiederum den CDK2/Cyclin E-Komplex, welcher eigentlich das Retinoblastomprotein (pRB) phosphoryliert. Wird das Rb-Protein nicht phosphoryliert so bleibt es aktiv und kann somit den Transkriptionsfaktor E2F nicht freisetzen, wodurch der Übergang in die S-Phase blockiert wird (Zellzyklus-Arrest).

Online-Abbildung von MEDI-LEARN, URL: <file:///C:/Users/madel/OneDrive/Abbildungen/Bc4-24-1.pdf> (20.03.2023)

Die Komplexität des p53-Signalweges wird durch die Menge an unterschiedlichen Spleißvarianten des p53 erhöht [89]. Aktuell sind 13 verschiedene p53-Proteinisoformen bekannt, dazu gehören neben dem populären p53-Protein (Synonym p53 α , TAp53, TAp53 α) unter anderem die TAp53- Isoformen (TAp53 β und TAp53 γ) und die Delta-p53-Isoformen (Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ) [72]. Die verschiedenen Isoformen scheinen an unterschiedlichen Prozessen und Signalwegen beteiligt zu sein und können die p53-Funktion auf unterschiedlichste Art und Weise regulieren [89].

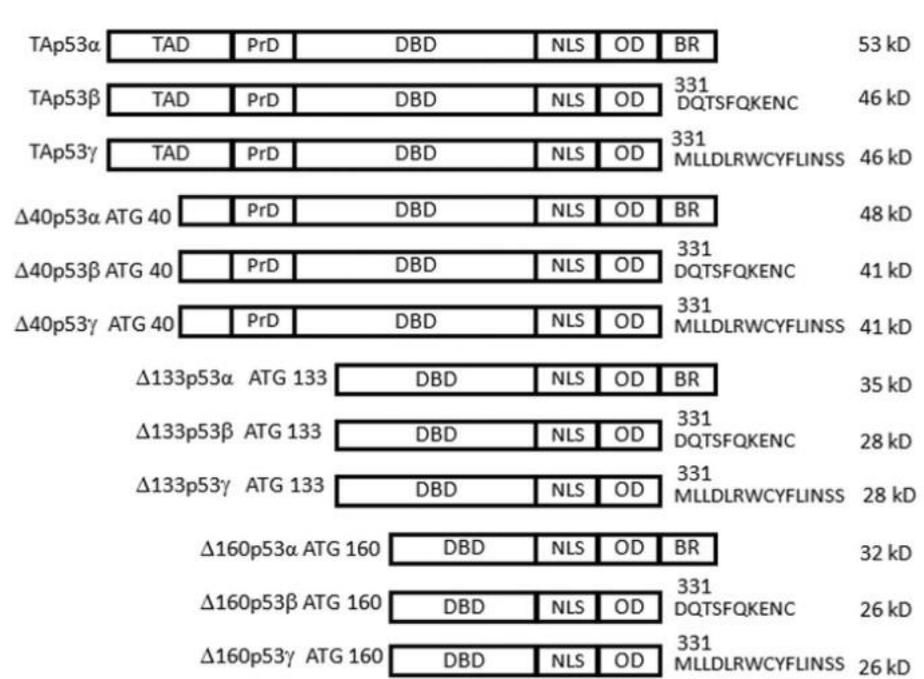


Abbildung 4: Isoformen des Tumorsuppressorproteins p53

Die einzelnen Isoformen des p53 lassen sich unter anderem anhand des spezifischen Molekulargewichts unterscheiden (Abbildung aus dem Artikel Nutthasirikul N, Limpiboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P (2013) Ratio disruption of the Δ 133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. Int J Oncol 42:1181–1188

Das durch DNA-Schädigung aktivierte p53 führt zur Expression von Δ 133p53 und den anderen TAp53-Isoformen. Konträr zur populären proapoptotischen Aktivität (als Reaktion auf einen irreversiblen DNA-Schaden), ist zusätzlich eine überlebensfördernde Eigenschaft von p53 bekannt. So nimmt man an, dass Δ 133p53 und bestimmte TAp53 -Isoformen als eine Art Antagonist bei der apoptotischen Aktivität von p53 fungieren und somit das Überleben einer Zelle begünstigen können [125]. Welche Prozesse dieser offenbar gegensätzlichen Funktion von p53 zugrunde liegen, ist noch weitestgehend unbekannt. Einige Forschergruppen erklären diese überlebensfördernde Eigenschaft der anderen TAp53-Isoformen und Δ 133p53, indem sie diesen Isoformen einen antagonisierenden Effekt auf die apoptotische Wirkung von p53 zuschreiben [125]. Hierzu zeigte eine Studie, dass die p53-vermittelte pro-apoptotische Aktivität über eine Interaktion mit seiner Isoform Δ 133p53 in eine anti-apoptotische Aktivität umgewandelt werden kann [51]. Auf der Basis einer anderen Studie wurde die Annahme getroffen, dass Δ 133p53 die transkriptionelle Kapazität von p53 hemmen könnte, indem es dessen DNA-Bindungskapazität blockiert [88]. Wie auch andere Mitglieder der p53-Familie konnte man in einer Reihe von Krebszellen eine Überexpression von Δ 133p53 α beobachten [10,129].

1.4.2.1 UV-induzierte Mutationen des p53-Gens in Keratinozyten

Durch UVB-Strahlung induzierte p53-Mutationen lassen sich in über 90% der kutanen Plattenepithelkarzinome nachweisen, ebenso wie in den präkanzerösen aktinischen Keratosen [146]. Um zu verstehen wie UVB-Strahlung als Karzinogen wirkt, muss dessen mutagene Wirkung auf das Tumorsuppressorgen p53 näher betrachtet werden.

Der protektive Effekt von p53 in der Haut unter UVB-Strahlung soll anhand der Studienergebnisse der Arbeitsgruppe um Ziegler veranschaulicht werden. In deren Untersuchungen wurden Mäuse verschiedener p53-Ausprägung (Wildtyp p53 +/+ mit intaktem TSG p53, p53-/- mit defizientem TSG p53 und eine heterozygote Form p53+/-) mit unterschiedlichen UVB-Dosen bestrahlt. Bei den Wildtyp-Mäusen (p53+/+) konnte man 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung Sonnenbrandzellen nachweisen und deren Anzahl stieg mit steigender UVB-Strahlendosis [29]. Bei den p53-defizienten Mäusen (p53-/-) konnten nur wenige Sonnenbrandzellen nachgewiesen werden. Auch fiel bei diesen Mäusen die Zunahme an Sonnenbrandzellen bei erhöhter UVB-Strahlendosis weitaus geringer aus als bei den Wildtyp-Mäusen mit intaktem p53. Diese Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Zellen mit intaktem p53 die Fähigkeit besitzen eine Apoptose bei UV-geschädigten Zellen einzuleiten, bevor deren mutierte Genprodukte fatalere Folgen nach sich ziehen könnten. Anders war es bei den heterozygoten Zellen, die trotz des UV-induzierten Zellschadens nicht mehr oder nur noch eingeschränkt dazu in der Lage waren. Die Gendosisreduktion von p53 bewirkte nur noch eine reduzierte Apoptose präkanzeröser Zellen, sodass die geschädigten, heterozygoten Keratinozyten (p53 +/-) ungehindert proliferieren und sich zu aktinischen Keratosen entwickeln konnten [22].

1.4.3 Andere Mitglieder der p53-Familie: p63 und p73

P63 und p73 sind weitere Gene aus der p53-Genfamilie und mit p53 verwandt. Neben einer gewissen Aminosäure-Homologie, einer großen strukturellen und zum Teil auch funktionellen Ähnlichkeit, weisen die p53-Familienmitglieder auch gravierende Unterschiede auf [131]. Insgesamt scheinen p63 und p73 zueinander strukturell homologer zu sein als zu p53 [154]. Jedes p53-Familienmitglied kodiert gleich für mehrere Proteinisoformen, die durch das Vorhandensein von alternativen Promotoren, Translationsinitiationsstellen und Spleißstellen zustande kommen [97]. So besitzen sie je zwei unabhängige Promotoren, aus deren Transkripten, nach alternativem Spleißen, zwei Formen von Proteinen entstehen: die TA- und die Δ N-Isoformen. Die TA-Isoformen enthalten eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, welche aufgrund des verkürzten N-Terminus bei der Δ N-Isoform fehlt. Daneben tragen diese Isoformen durch alternatives Spleißen noch unterschiedliche C-Termini (α , β , γ). Alle Isoformen verfügen über eine DNA-Bindungsdomäne, die eine große Ähnlichkeit mit dem

populären TAp53 α (p53) aufweisen, was es u.a. dem p63-Protein ermöglicht an die p53-Bindungsstellen zu binden [28].

Allgemein ist die Transaktivierungsdomäne (TA) von p63 und p73 für die Transkription einer Reihe von kanonischen Zielgenen mit antiproliferativen, pro-seneszierenden oder pro-apoptotischen und DNA-Reparaturfunktionen notwendig [97]. Damit fungieren die TA-Isoformen von p63 und p73 eher im klassischen Sinne wie auch das p53, in dem sie die jeweiligen Zielgene, wie zum Beispiel p21 aktivieren und bei einer Überexpression die Apoptose einleiten können. Die Δ N-Isoformen scheinen hingegen als wichtige Antagonisten von p53 zu wirken, indem sie überlebensfördernde Gene induzieren und anti-proliferative Gene hemmen können [28]. Auf der einen Seite üben sie eine dominant-negative Funktion auf die TA-Proteine aus, in dem sie an deren Promotoren binden und diese besetzen aber nicht transaktivieren. Auf der anderen Seite können sie eine Reihe von spezifischen Genen aktivieren, indem eine zweite Transaktivierungsdomäne zum Einsatz kommt [97]. So zeigten Studien, dass Δ Np63 und Δ Np73 nicht nur die Funktion von p53 stören können, sondern auch die von TAp63 und TAp73. Die Bedeutung von p63 und p73 während der Onkogenese ist hochkomplex und noch lange nicht vollständig verstanden. In die Tumorphathogenese der Haut scheint jedoch, neben p53 vornehmlich p63 (genauer Δ Np63 als Onkogen) involviert zu sein.

1.4.3.1 P63

Im Gegensatz zu der fast schon allgegenwärtigen Natur des p53-Proteins weist p63 eine gewebespezifische Verteilung auf [139]. Humane Syndrome mit heterozygoten Keimbahnmutationen im p63-Gen, die alle eine ektodermale Fehlentwicklung gemeinsam haben, konnten Aufschluss über dessen Funktion im menschlichen Organismus geben. Dabei zeigte sich, dass p63 während der Entwicklung vor allem im embryonalen Ektoderm, sowie in der Basalzellschicht vieler epithelialer Gewebe exprimiert wird. Es wird dabei vornehmlich als Δ Np63 α in den Stammzellen (Basalzellschicht) mehrschichtiger Plattenepithelien exprimiert und ist dort an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt [139].

Seine immense Bedeutung für die Entwicklung der Haut konnte auch in p63-defizienten Tiermodellen gezeigt werden. Dabei fielen p63-defiziente (p63 $^{-/-}$) Mäuse durch ein komplettes Fehlen des mehrschichtigen Plattenepithels auf. Bekannte p63-Mutationen scheinen aber keine Prädisposition für Tumorerkrankungen darzustellen. Die genauen Wirkmechanismen von p63 sind noch nicht vollständig geklärt. So wurden in zwei unabhängigen Arbeitsgruppen verschiedene Ergebnisse gefunden. Zum einen wird die Funktion von p63 in der Embryogenese bei der ektodermalen Differenzierung gesehen [96], zum anderen in der Aufrechterhaltung der Proliferationseigenschaft basaler Zellen [141]. Andere Forschungsergebnisse stützen wiederum die These, dass dem p63-Protein sowohl eine

Proliferations-, als auch eine Differenzierungseigenschaft zugeschrieben werden kann, in dem es deren Homöostase kontrolliert [6]. Die Unklarheiten bezüglich der genauen Funktionen sind womöglich einem komplexen Zusammenspiel der diversen Isoformen von p63 geschuldet.

Der Isoform $\Delta Np63\alpha$ fehlt die 5'-Region, die eine starke Ähnlichkeit zur Transaktivierungsdomäne von p53 aufweist. Im Gegensatz zu p53 kann $\Delta Np63\alpha$ keine Apoptose induzieren, wenn es in kultivierten Zellen überexprimiert vorliegt. Stattdessen scheint $\Delta Np63\alpha$ die transkriptionelle Aktivität von p53 sogar zu hemmen. Wegen des positiven Zusammenhangs zwischen der Expression von $\Delta Np63$ und dem proliferativen Potenzial von Keratinozyten wird $\Delta Np63$ sogar als Stammzellmarker propagiert [84,109].

Trotz der Fähigkeit von p63 diverse p53-responsive Gene zu aktivieren, konnte man bisher, anders als bei p53, kaum Mutationen von p63 in Tumoren nachweisen [57]. Viel eher konnte beobachtet werden, dass in der Mehrzahl von Tumoren die p63-Expression erhalten bleibt, bzw. p63 sogar transkriptionell überexprimiert wird [90]. So zeigte sich in Plattenepithelkarzinomen, dass $\Delta Np63$ reichlich exprimiert wird und wahrscheinlich als p53-Antagonist die Tumorentstehung und -Progression begünstigt. Dabei scheint es ein enges Zusammenspiel zwischen p53 und p63 mit dem Notch-Signalweg zu geben, der beim kutanen Plattenepithelkarzinom oft inaktiviert ist [97]. Da $\Delta Np63\alpha$ bei der Entwicklung die proliferative Eigenschaft von epithelialen Stammzellen (Basalzellen) aufrechterhält, wird angenommen, dass es dies auch in Tumorzellen bewirken und somit als potenzielles Onkogen fungieren kann. Darüber hinaus gelang es einigen Forschern eine p63-Bindungsstelle im zweiten Intron des JAG1-Genes (siehe Kapitel 1.4.4) zu identifizieren, die in vivo direkt mit dem p63-Protein interagieren kann [123].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass dem p63 eine Schlüsselrolle bei der Genese menschlicher Krebserkrankungen zukommen könnte. Anders als sein Familienmitglied p53 liegt p63 in Krebszellen nur selten mutiert vor, viel eher scheinen hier seine verkürzten Isoformen (ΔN) im Vergleich zu normalem Gewebe hochreguliert zu sein [97].

1.4.3.2 P73

Das p73-Gen wurde 1997 von Kaghad und Kollegen entdeckt [74]. Ähnlich wie p63 weist auch das p73-Gen zwei Hauptisoformen auf: TAp73, das die Transaktivierungsdomäne enthält und $\Delta Np73$, welchem die N-terminale TA-Domäne fehlt. Der TAp73-Isoform wird im Allgemeinen eher eine pro-apoptotische Aktivität zugesprochen [103], während die $\Delta Np73$ -Isoform mit eher anti-apoptotischen Eigenschaften assoziiert zu sein scheint [53].

Wie bei p63 werden auch bei p73 die ΔN -Isoformen als vorherrschende Isoformen in der Haut exprimiert [139]. Diese Isoformen stellen auch die dominierenden Formen dar, die in vielen

menschlichen Krebsarten exprimiert werden. Anders als p53 scheint dieses Familienmitglied nicht mutiert vorzuliegen, sondern, ebenso wie p63, überexprimiert. So konnte in Studien eine Überexpression von p73-mRNA und/ oder -Protein in einer Vielzahl von Tumorarten nachgewiesen werden (u.a. in Neuroblastomen, Gliomen, Brust-, Lungen-, Kolon-, Magen-, Ovarial-, Blasen-, Leber-, HNSCC, cholangiozelluläres Karzinom, CML, AML) [102]. Die grundlegenden Mechanismen der endogenen $\Delta Np63$ - und $\Delta Np73$ -Isoformen in der Entwicklung und Tumorgenese sind weiterhin nur unzureichend verstanden. Zu den zentralen Fragen in diesem Zusammenhang zählen zum einen, ob diese Isoformen ausschließlich als Repressoren fungieren und in welchem Ausmaß sie möglicherweise eine Rolle als Transkriptionsaktivatoren spielen. Zum anderen ob ihre hemmende Funktion auf ihre jeweiligen TA-Isoformen, auf ein anderes p53-Familienmitglied oder unabhängig von den anderen Familienmitgliedern gerichtet ist. Ergebnisse von DeYoung und Kollegen (2007) deuten darauf hin, dass entweder eine $\Delta Np73/\Delta Np63$ -Überexpression oder ein TAp73-Promotor-Silencing erforderlich sein kann, um die tumorsuppressive Eigenschaft von TAp73 zu inaktivieren [36].

Von besonderer Bedeutung könnte hier die Isoform $\Delta Np73$ sein. Dieses scheint unter anderem maßgeblich mit dem Tumorsuppressorgen p53 zu interagieren. So können beispielsweise p53 und die Isoform TAp73 die $\Delta Np73$ -Proteinmenge beeinflussen, indem sie den $\Delta Np73$ -Promotor binden und dessen Transkription induzieren. Dadurch entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, die die Aktivität von TAp73 oder p53 reguliert. $\Delta Np73$ blockiert dann wiederum seinerseits die Wirkung von p53 und TAp73 [53,75]. Grob und Kollegen (2001) sammelten darüber hinaus Daten, die darauf hinweisen, dass eine veränderte Expression der $\Delta Np73$ -Isoformen onkogen wirken könnte, indem sie eine funktionelle Inaktivierung von p53 bewirkt [53].

Die Komplexität der sich überlappenden, gemeinsamen und gegensätzlichen Funktionen der Mitglieder der p53-Familie und ihrer Protein-Isoformen lässt auf die Existenz eines komplizierten funktionellen Netzwerks schließen [36].

1.4.4 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein hochkonservierter interzellulärer Signalweg in Vielzellern, der für die embryonale Entwicklung unerlässlich ist. Er spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Organen und Gewebe, der Gewebserneuerung sowie deren Homöostase. Der Name *Notch* kommt aus dem Englischen und bedeutet „Einkerbung“. Solche Einkerbungen konnte man an Flügeln von *Drosophila melanogaster* beobachten, die eine loss-of-function-Mutation in einem Gen des Notch-Signalwegs aufwiesen [106].

Die Notch-Signalübertragung erfolgt über die Bindung eines transmembranösen Notch-Liganden an einen Notch-Rezeptor, der sich in der Regel auf der Oberfläche einer Nachbarzelle befindet. Bei Säugetieren sind vier transmembranöse Notch-Rezeptoren bekannt (NOTCH1-NOTCH4), die teils überlappende, teils spezifische Funktionen im Notch-Signalweg übernehmen [106]. Ein Notch-Rezeptor setzt sich aus einer einzigen Transmembrandomäne und einer großen extrazellulären Domäne zusammen [144]. Die relativ große extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors besteht aus einer epidermal growth factor (EGF)-ähnlichen Wiederholung, gefolgt von einer negativ regulierenden Region (NRR). Zu den wichtigsten Notch-Liganden zählen die drei Delta-Like-Proteine (DLL1,2,4), sowie die zwei Jagged Proteine (JAG1, JAG2), die ebenfalls transmembranös in den Zellen verankert sind [54]. Daneben gibt es noch eine ganze Reihe weiterer Liganden, die an einen der Notch-Rezeptoren binden und deren Aktivität modulieren können [155].

Die Aktivierung des Notch-Signalweges wird in der Regel durch die direkte Interaktion zwischen einem Notch-Rezeptor und dessen Liganden auf der Zelloberfläche initiiert. Dabei sorgen EGF11 und EGF12 dafür, dass NOTCH1 seine Liganden JAG und DLL erkennt [156]. Die klassische JAG1-NOTCH-Interaktion führt über eine Kaskade aus proteolytischen Spaltungen zu einer Abtrennung des extrazellulären Rezeptoranteils. Dadurch wird die intrazelluläre Transmembrandomäne des Notch-Rezeptors in den Nucleus transportiert, um dort unmittelbar als Gen-Aktivator zu fungieren. Hierfür aktiviert es die Transkription bestimmter Zielgene. Beispielsweise ermöglicht dieser Signalweg durch die Interaktion zwischen Notch-Rezeptor und -Ligand benachbarter Zellen, dass sich diese zunächst noch gleichartigen Zellen in unterschiedliche Gewebe entwickeln können. Damit kodieren Mitglieder der Notch-Genfamilie für transmembrane Rezeptoren, die entscheidend an der Bestimmung des Zellschicksals beteiligt sind [54].

1.4.4.1 Der Notch-Signalweg bei der Tumorgenese

Eine Dysfunktion im Notch-Signalweg kann an der Entstehung von Krebs und anderen Erkrankungen beteiligt sein. Die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Tumorgenese ist aufgrund seiner diversen Interaktionen mit anderen Signalwegen sehr vielfältig und noch nicht gänzlich verstanden. Er scheint in der Entstehung von verschiedenen Krebserkrankungen eine unterschiedliche Rolle zu spielen. So weisen einige Studien daraufhin, dass abhängig von der Krebsart dem Notch-Signalweg sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben werden können. Der Notch-Signalweg kann dabei abhängig vom Gewebe und/oder dem zellulären Kontext entweder onkogen oder tumorsuppressiv wirken. In verschiedenen soliden Tumoren, einschließlich Plattenepithelkarzinomen verschiedener epithelialer Gewebe zeigt er eher eine tumorsuppressive Wirkung [5, 37].

Im Vergleich zu anderen SCC-Typen ist der Notch-induzierte molekulare Mechanismus für das kutane Plattenepithelkarzinom (aus dem Englischen „cutaneous squamous cell carcinoma“ (cSCC) relativ gut charakterisiert. In jüngsten genomischen Analysen von kutanem Plattenepithelkarzinom konnten spezifische Mutationen im NOTCH1-Gen aufgezeigt werden, die zu dessen Inaktivierung führten [144]. Die funktionellen Folgen einer abgeschwächten Notch-Aktivierung in cSCC oder Keratinozyten wurden durch mehrere Studien zum Funktionsverlust des NOTCH1-Rezeptors gut belegt. Verringerte Konzentrationen des Notch-Transkripts sowie des Proteins, parallel mit der reduzierten Expression des HES1-Gens (ein gemeinsames Ziel des Notch-Pfades) konnten in cSCC-Zelllinien beobachtet werden [82]. In Mäuse-Experimenten, in denen der Notch-Signalweg in der Epidermis (durch dominant negatives MAML1-Protein) gehemmt wurde, entwickelten die Mäuse epidermale Hyperplasien sowie spontane cSCC [113]. Darüber hinaus führte die keratinozytenspezifische Ablation von NOTCH1 zu einer signifikanten Proliferation der basalen Epidermisschicht und einer dysregulierten Expressionen mehrerer Differenzierungsmarker, was auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung hinweist [116]. Darüber hinaus wurden in Plattenepithelkarzinomzellen reduzierte Mengen von aktiviertem NOTCH1 gefunden, die wiederum mit ihrem Notch-Mutationsstatus korrelierten [128].

1.4.4.2 Der Notch-Signalweg und die p53-Familie

In Keratinozyten wurde p53 als positiver Regulator des Notch-Signalwegs postuliert [146]. Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis eines p53-reaktiven Elementen im NOTCH1-Promotor, was wiederum nahe legt, dass die NOTCH1-Expression durch aktiviertes Wildtyp-p53 in geschädigten humanen primären Keratinozyten hochreguliert werden könnte [82, 143]. Typischerweise fördert Notch zusammen mit p53 und dessen Familienmitgliedern TAp63 und TAp73 die Differenzierung in Zellen. Allerdings zeigen weitere Forschungsergebnisse, dass Notch zusammen mit den Δ N-Formen von p63 oder p73 dazu beitragen kann, dass undifferenzierte Stammzellkompartimente erhalten bleiben. Betrachtet man dies nun im Hinblick auf die Karzinogenese, scheint Notch als Tumorsuppressor in zellulären Kontexten zu wirken, in denen die Notch-Signalisierung die p53-Aktivierung unterstützt und beide zusammen ein antiproliferatives Programm der Differenzierung, Seneszenz oder Apoptose einleiten können. Im Gegensatz dazu kann Notch in bestimmten Kontexten, in denen eine Differenzierung unerwünscht ist, aber auch als Onkoprotein wirken, in dem es die p53-Aktivierung und -Wirkung unterdrückt [121].

1.4.5 Vitamin D

Vitamin D kommt in der Natur in unterschiedlichen Formen vor, wobei die für uns Menschen wichtigsten Formen das Ergocalciferol (Vitamin D₂) sowie das Cholecalciferol (Vitamin D₃) darstellen. Neben seiner herausragenden Bedeutung für das Aufrechterhalten der Calcium-Phosphat-Homöostase, moduliert das Vitamin D viele Gene, die wiederum für Proteine kodieren, die an der Zellproliferation, -differenzierung und der Apoptose beteiligt sind [11]. Mehrere Studien legen einen protektiven Einfluss von Vitamin D bei einer Vielzahl von Malignomen nahe [112, 145]. In Bezug auf Hautkrebs deuten epidemiologische Studien und Laborstudien darauf hin, dass dem Vitamin D und seinen Metaboliten eine ähnlich schützende Wirkung zugeschrieben werden könnte. In dem folgenden Abschnitt soll zunächst der im menschlichen Organismus stattfindende Metabolismus des Vitamin D geschildert werden. In den darauffolgenden Passagen wird dann näher auf dessen bisher bekannte Effekte in der menschlichen Haut eingegangen.

1.4.5.1 Vitamin D-Metabolismus

Vitamin D₃ kommt in bestimmten tierischen Produkten, wie beispielsweise Lachs und Kabeljau, vor. Es kann aber auch in humanen Keratinozyten aus der Cholesterin-Vorstufe 7-Dehydrocholesterol synthetisiert werden und stellt damit kein Vitamin im eigentlichen Sinne dar. Die Vitamin D₃-Synthese in der Haut erfolgt grob in einem zweistufigen Prozess (siehe Abbildung 5), bei dem zunächst aus dem 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) der B-Ring durch die UVB-Strahlung der Sonne gebrochen wird. Dabei entsteht das *Prävitamin D₃*, welches dann in einem wärmempfindlichen Prozess zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) isomerisiert wird. Dabei ist die Menge des produzierten Cholecalciferols sowohl abhängig von der UVB-Intensität (und damit einhergehend dem Sonneneinstrahlungswinkel, dem Grad der Bewölkung, der Tages- und Jahreszeit u.v.m.) als auch vom Pigmentierungsgrad der Haut [15]. Unabhängig davon, ob das Vitamin D₃ aus der Sonneneinstrahlung, Lebensmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln gewonnen wurde, muss es zunächst noch zwei Hydroxylierungsschritte im Körper durchlaufen, bevor es biologisch wirksam ist. Die erste Hydroxylierung erfolgt in der Leber, hier entsteht aus dem Vitamin D₃ zunächst das 25-Hydroxy-Vitamin D₃ (25-H-D, Calcidiol) [8]. Calcidiol hat eine relativ lange Halbwertszeit von mehreren Wochen und spiegelt den „zirkulierenden Vitamin D-Speicher“ des Körpers wider [27]. Im zweiten Hydroxylierungsschritt, der in den Nieren stattfindet, wird aus dem 25-Hydroxy-Vitamin D₃ das physiologisch aktive 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃, Calcitriol) [27]. Calcitriol hat im Serum nur eine Halbwertszeit von 6 bis 8 Stunden [114].

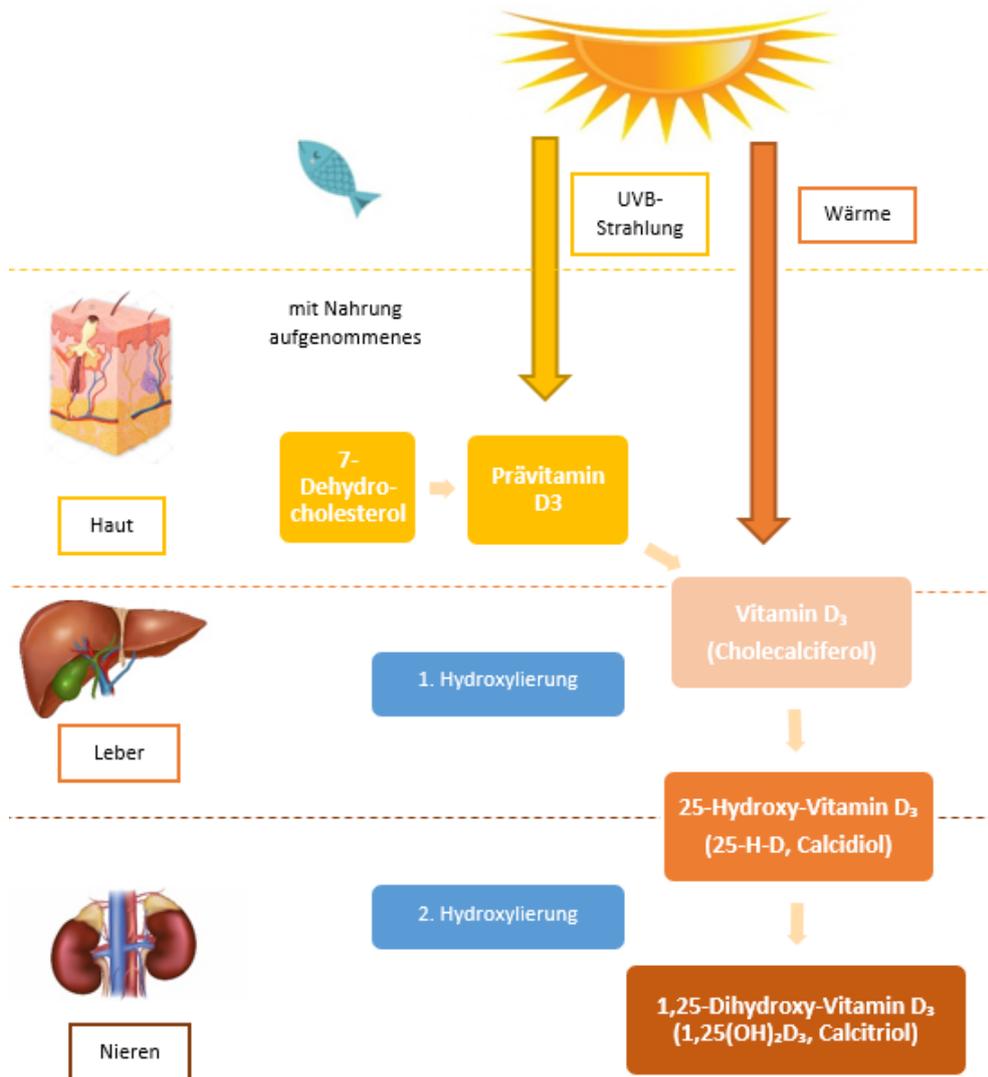


Abbildung 5: Vitamin D-Metabolismus

Aus dem 7-Dehydrocholesterol wird durch UVB-Strahlung das Prävitamin D₃, welches zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) isomerisiert wird und in zwei Hydroxylierungsschritten zum hormonell aktiven Calcitriol wird.

Neben der Niere sind auch Keratinozyten, die einen Vitamin D-Rezeptor (VDR) aufweisen, in der Lage Calcitriol zu produzieren [134]. Die Menge an dort produziertem Calcitriol ist unter normalen Bedingungen jedoch so gering, sodass sie keinen relevanten Anteil am im Blutkreislauf zirkulierenden Calcitriol ausmacht. Studien zeigen aber, dass das von den Keratinozyten synthetisierte 1,25(OH)₂D₃ die epidermale Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose vor Ort modulieren kann [13,101]. So scheint 1,25(OH)₂D₃ primäre Keratinozyten sogar vor einer UVB-Strahleninduzierten Apoptose retten zu können [31].

1.4.5.2 Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Retinoid X Rezeptor (RXR)

Der Vitamin D Rezeptor (VDR) ist ein Transkriptionsfaktor, der an Stellen der DNA bindet, die sich Vitamin D Response Elemente nennen (VDRE). Es gibt tausende von diesen Bindungsstellen, die wiederum hunderte von Genen zellspezifisch regulieren [15]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Calcitriol) ist der Ligand für den Vitamin D Rezeptor. Das neusynthetisierte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird von dem Vitamin-bindenden Protein (VDBP), einem Carrierprotein, gebunden und so im Blutkreislauf transportiert. Erreicht es seine Zielzelle, so dissoziiert das Calcitriol vom VDBP und gelangt über Diffusion in die Zelle zum Zellkern, wo es den intrazellulären VDR bindet, um dann die Gen-Transkription zu regulieren. Die Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an den VDR führt dabei zu einer Konformationsänderung und setzt dadurch Bindungsoberflächen für koaktivierende Faktoren und Dimerisierungen frei. Ein notwendiger Schritt für die vollständige Transaktivierung des VDR ist, dass dieser mit einem Retinoidrezeptor, in der Regel dem Retinoid X Rezeptor (RXR), dimerisiert. Diese Dimerisierung ermöglicht die Interaktion mit dem Zielgen-Promotor am Vitamin D Response Element, wo dann das Heterodimer die Gentranskription von mindestens 200 Genen initiieren kann [8]. Der VDR ist in den meisten Geweben und Zellen des Körpers zu finden und weist eine große Bandbreite an biologischen Wirkungen auf. Diese umfassen unter anderem die Drosselung der Zellproliferation sowie das Induzieren der terminalen Differenzierung. So wird der VDR auch in einer Vielzahl von Zellen und Tumoren exprimiert, entfaltet dort aber Wirkungen, die noch nicht in allen Einzelheiten verstanden sind [100,105].

1.4.5.3 Der Effekt von Calcitriol auf die Haut

In den vergangenen Jahren hat Vitamin D durch seine Fähigkeit, die Zellproliferation zu stoppen und die Zelldifferenzierung zu induzieren, viel Aufmerksamkeit erregt, was beispielsweise für die Behandlung von Krebs und Psoriasis von Bedeutung sein könnte [101]. Wie oben bereits erwähnt (siehe Kapitel 1.4.5.1), findet ein Syntheseschritt des später hormonell wirksamen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ direkt in den Keratinozyten statt, die dann in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung beeinflusst werden können [67]. In hoher Konzentration hemmt das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Keratinozytenproliferation in vitro [111] und kann über eine Interaktion mit Calcium die Keratinozytendifferenzierung regulieren [12]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten, denen der VDR fehlte eine übermäßige Proliferation sowie eine verminderte Apoptose aufwies [39]. Weiter konnte in vitro beobachtet werden, dass nach exogener Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Bildung von Cyclobutandimeren blockiert wurde [32,136]. Dabei könnte der schützende Effekt von Vitamin D dadurch zustande kommen, dass das Calcitriol in der Lage ist DNA-Reparaturprozesse zu unterstützen. Diese Theorie wird von Studienergebnissen gestützt, die zeigen, dass Keratinozyten, die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelt wurden, eine erhöhte Expression zweier DNA-Reparaturenzyme, XPC

(vom Englischen Xeroderma pigmentosum, complementation group C und DDB2 (vom Englischen „DNA damage-binding protein 2“) aufwiesen [46].

Zusammengefasst lässt sich so dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine antiproliferative und Differenzierungsfördernde Eigenschaft in der Haut zuschreiben.

1.4.5.4 Vitamin D in der Prävention von Plattenepithelkarzinomen der Haut

Die protektive Bedeutung von Vitamin D hinsichtlich viszeraler Krebserkrankungen ist wenig umstritten. Das Vitamin D wirkt hierbei, indem es an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) bindet. Studien zeigten beispielsweise, dass bei der kolorektalen Tumorentstehung VDR herunterreguliert wird und ein Fehlen sowie eine geringe Expression von VDR mit einer schlechten Prognose korreliert [43]. Im Gegensatz dazu wird seine schützende Wirkung bei Hautkrebs noch kontrovers diskutiert. Der Schlüsselfaktor, der das Erkennen eines klaren Zusammenhangs zwischen Vitamin D und Hautkrebs erschwert, ist die UVB-Strahlung. Wie oben bereits angesprochen, stellt die UVB-Strahlung den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung von weißem Hautkrebs dar. Gleichzeitig ist sie aber auch der wichtigste Initiator der körpereigenen Vitamin D-Synthese. Es scheint paradox, dass das gleiche Spektrum an UVB-Strahlung, welches die Produktion von Vitamin D in der Haut katalysiert, auch die DNA-Schäden verursacht, welche wiederum zu epidermalen Malignomen führen können.

Eine australische prospektive Studie der Forschergruppe um van der Pols beobachtete dabei folgenden interessanten Sachverhalt: Menschen mit einem 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel über 75 nmol/L wiesen eine höhere Inzidenz von Basalzellkarzinomen und malignen Melanomen auf, als Patienten mit einem 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel unter 75 nmol/L. Dahingegen scheint die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen bei Personen mit Serum-25-Hydroxyvitamin-D-Konzentrationen über 75 nmol/L im Vergleich zu denen unter 75 nmol/L tendenziell geringer auszufallen [132]. Ungeachtet dessen, deuten in vitro-Studien darauf hin, dass Vitamin D und seine Metaboliten das Risiko von weißem Hautkrebs im Allgemeinen verringern können. In Tiermodellen konnte hierzu gezeigt werden, dass bei Mäusen mit fehlendem VDR eine erhöhte Anzahl an NMSC auftraten und deren Wachstum durch Zugabe von Vitamin D reduziert werden konnte [148]. Diese Beobachtung könnte auf eine VDR-unabhängige, protektive Funktion von Vitamin D hinweisen [148]. Die hemmende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die chemisch induzierte Tumorbildung in Mäusen schien dabei dosisabhängig zu sein [25,63,137]. Vitamin-D-Analoga hemmen dabei das Zellwachstum, indem sie einen Zellzyklus-Arrest induzieren, die DNA-Synthese hemmen und Apoptose in SCC-Zelllinien einleiten [1]. Darüber hinaus scheint die lokale Anwendung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Reparatur von Cyclobutandimeren zu beschleunigen. Bis heute sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dazu noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.4.5.5 Vitamin D und die p53-Familie

Studienergebnisse weisen auf ein Wechselspiel zwischen dem p53- und dem Vitamin-D-Signalweg hin. So agieren sowohl p53 als auch VDR als Tumorsuppressoren in verschiedenen Geweben, einschließlich der Haut [80,118,119,157]. Ein Großteil der Tumorsuppressorfunktion in der Haut soll dabei durch die Interaktion der VDR- und p53-Signalwege (durch gegenseitige Aktivierung oder Hemmung) vermittelt werden [119]. Beispielsweise ist bekannt, dass der VDR zusammen mit p53 entscheidend an der Einleitung von DNA-Reparaturprozessen nach UV-Exposition in Keratinozyten beteiligt ist [44].

Zudem scheint es ein komplexes Zusammenspiel zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und ΔNp63 zu geben. Die Arbeitsgruppe um Hill und Zhang lieferten Hinweise dafür, dass VDR/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die ΔNp63 -Expression sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene reguliert [64]. Gleichzeitig scheint der VDR durch eine Isoform des Tumorsuppressorgens p63 induziert zu werden [44]. Vitamin D interagiert mit den Tumorsuppressorgenen p53 oder p63, um Nukleotid-Exzisionsreparaturgene oder andere DNA-Reparaturenzyme wie XPC und DDB2 hochzuregulieren [101]. Diese Reaktion kann sich zwischen normalen Keratinozyten und SCCs unterscheiden [115]. Die epidemiologische Studienlage am Menschen liefert dazu bislang keine konsistenten Ergebnisse.

1.5 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Das ultraviolette Licht der Sonne, genauer dessen UVB-Anteil bei 290-320 nm Wellenlänge, ist für die Synthese ausreichender Mengen an Vorstufen des aktiven Vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) in der Haut absolut essenziell. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert über seinen intrazellulären Rezeptor VDR nicht nur die Calcium-Phosphat-Homöostase des Körpers, sondern scheint neueren Erkenntnissen zufolge auch vor diversen Tumorerkrankungen, einschließlich Tumoren der Haut schützen zu können. UVB-Licht schützt also einerseits, über den Vitamin D-Signalweg, vor Hautkrebs, induziert andererseits aber Mutationen in den Keratinozyten und stellt das Hauptkanzerogen für die Entstehung von weißem Hautkrebs dar. Die molekularen Mechanismen, die diesem ‚trade-off‘ zwischen der durch UVB-Licht verursachten Photokarzinogenese und der Vitamin D-vermittelten Tumorsuppression zugrunde liegen, sind bis heute nicht im Detail verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von UVB-Strahlung auf drei verschiedene tumorsupprimierende Signalwege (Notch-, p53- und Vitamin D-Signalweg) in primären Keratinozyten sowie immortalen und transformierten Keratinozyten-Zelllinien zu untersuchen, um Hinweise auf mögliche molekulare Interaktionen zwischen diesen Signalwegen und deren Versagen bei beginnender oder manifester Entartung zu erhalten.

Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den in der Haut photoprotektiv und tumorsupprimierend wirkenden Vitamin D-Signalweg gelegt, sowie das UV-induzierbare Tumorsuppressorprotein p53 und seine Familienmitglieder sowie dem Transkriptionsfaktor Notch, der am Differenzierungsprozess von Keratinozyten entscheidend beteiligt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Ausgewählte eukaryontische Zelllinien

2.1.1.1 Primäre Keratinozyten

Als Modell für „gesunde“ primäre Keratinozyten wurden in der vorliegenden Studie *Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes* (NHEK) eines single donors von der Firma PromoCell verwendet. Diese Primärzellen stammen aus der Epidermis erwachsener Haut verschiedenster Lokalisation oder juveniler Vorhaut (*Normal Human Foreskin Keratinocytes*, NFK). In dieser Arbeit werden im Folgenden die Abkürzungen NHEK und NFK synonym für normale primäre Keratinozyten verwendet.

2.1.1.2 HaCaT-Keratinozyten

HaCaT-Zellen gehören zu einer spontan immortalisierten, humanen, nicht tumorigenen Keratinozytenzelllinie, die von der Haut am Stamm eines Erwachsenen gewonnen wurde. Ihr Name leitet sich vom Englischen *Human adult low Calcium, high Temperature Keratinocytes* ab. Diese spontan transformierte, epitheliale Zelllinie behält in Kultur weitestgehend ihr Proliferationspotential sowie ihre biochemische Leistungsfähigkeit bei und verfügt, im Gegensatz zu anderen immortalisierten Zelllinien, über annähernd gleiche Differenzierungseigenschaften wie humane Keratinozyten. Aus diesen Gründen werden HaCaT-Zellen in vielen wissenschaftlichen Studien als Modell für humane Keratinozyten mit erhöhtem Proliferations- und niedrigem Differenzierungspotenzial in vitro eingesetzt.

HaCaT-Keratinozyten weisen auf beiden Allelen des p53-Gens Punktmutationen auf [62]. Die in der HaCaT-Zelllinie gefundenen Mutationen, insbesondere die CC-TT Mutationen, decken sich mit Sonnenlicht-induzierten DNA-Schäden [83], weshalb sie in unserer Studie als Modell für die präkanzeröse aktinische Keratose genutzt werden. Lehmann et al postulieren, dass in den HaCaT-Zellen kein Wildtyp-p53-Potein exprimiert wird, da beide p53-Allele mutiert vorliegen [83]. Die in den vorliegenden Experimenten verwendeten HaCaT-Keratinozyten stammen von der Firma CLS Cell Lines Service.

2.1.1.3 SCL-1-Zellen

Die SCL-1 Zellen werden ebenfalls zu den humanen Zelllinien gezählt und stammen von mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinomzellen [17]. Diese Zellen weisen die Eigenschaft auf, dass sie nicht mehr dazu in der Lage sind, einen funktionellen Phänotyp des Tumorsuppressorproteins p53 zu exprimieren. In Anlehnung an das Mehrschrittmodell der

Photokarzinogenese sollen die SCL-1 Zellen hier als Modell für Plattenepithelkarzinomzellen dienen.

2.1.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die gesamte Zellkulturarbeit erfolgte unter einer Sterilbank (Heraeus LaminAir®, Modell: HA 2448 GS), wobei die Zellkulturen in einem 5%-CO₂-begasteten Wärmeschrank (Binder APT.line™ C150 (E2)) bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert und kultiviert wurden.

Die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien unterscheidet sich in der Wahl des Nährmediums, der Zellkulturschalengröße, sowie der Anzahl an initial eingesetzten Zellen. Die drei unterschiedlichen Zelllinien wurden dabei mit drei verschiedenen Keratinozyten-Nährmedien kultiviert: die primären Keratinozyten (NHEK bzw. NFK) mit dem *Keratinocyte Growth Medium 2* (500 ml + Supplement Mix von PromoCell), die HaCaT-Zellen mit dem Nährmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, kurz DMEM (500 ml von gibco) und die SCL-1-Zellen mit dem *RPMI-Medium 1640* (500 ml von gibco), welches am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde und daher seinen Namen trägt). Letzteren beiden Nährmedien wurde zusätzlich 1% L-Glutamin, sowie 10% FCS (aus dem Englischen „fetal calf serum“) zugefügt. Die Kultivierung der HaCaT- und SCL-1-Zellen erfolgte in 10 cm Petrischalen (von Greiner bio-one), die der NHEK-Zellen in 75 cm²-Flaschen (von Greiner bio-one).

2.1.3 Passagieren eukaryontischer Zellen

Bei einer Konfluenz von etwa 80-90% erfolgte die Passagierung der Zellen. Das entsprechende Vorgehen unterscheidet sich hierbei zwischen den drei verschiedenen Zelllinien. Die HaCaT- und SCL-1-Zellen wurden zunächst zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 700 µl 0,25%-Trypsin/EDTA (100 ml von gibco) behandelt. Zur Unterstützung des Ablöseprozesses der Zellen wurden die Petrischalen im Wärmeschrank inkubiert. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Zellen dann kugelig und mobil. Das Trypsin wurde anschließend durch die Zugabe von mindestens 5 ml des entsprechenden Nährmediums neutralisiert. Die Zellsuspensionen wurden dann mittels Pipettierhilfe (RF3000™ Li-Ion Battery Pipet Controller von der Firma Heathrow Scientific) in je ein 50 ml-Falcon übertragen.

Die Ablösung der primären Keratinozyten-Zellen erfolgte mithilfe des DetachKits von der Firma Promocell. Dieses besteht aus drei verschiedenen Lösungen: HEPES BSS (HEPES buffered Balanced Salt Solution), Trypsin/EDTA Lösung und TNS (Trypsin Neutralization Solution) mit einem Mischungsverhältnis von Trypsin/EDTA von 0.04%/0.03%. Die NHEK-Zellen wurden zunächst mit 5 ml HEPES BSS gewaschen und daraufhin mittels 5 ml der Trypsin-/EDTA-Lösung abtrypsiniert. Auch hier wurde der Ablöseprozess durch eine kurze Inkubationsdauer im Wärmeschrank unterstützt. Nach mikroskopischer Kontrolle einer weitestgehend

vollständigen Ablösung der Zellen, erfolgte die Neutralisation des Trypsins mittels 6ml TNS. Im Normalfall sollte die Neutralisation des Trypsins bei einem Trypsin-TNS-Verhältnis von 1:1 erfolgen. Da die Zellen bei diesem Verhältnis allerdings schlechter wieder anwuchsen, verwendeten wir nach Rücksprache mit der Firma PromoCell eine etwas größere Menge an TNS.

Die Zellsuspension wurde zunächst in ein 50 ml-Falcon übertragen und daraufhin bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert (entspricht der deutschen Maßeinheit 1/min), wodurch sich ein Zellpellet am Boden des Falcons absetzte. Der Überstand konnte dann vorsichtig über eine Glaspipette abgesaugt werden, sodass nur noch das Zellpelett im Falcon verblieb, welches anschließend mit 5 ml des Keratinocyte growth Medium 2 resuspendiert wurde.

Zur Zellzahlbestimmung wurde etwa 1 ml der jeweiligen Zellsuspension in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf Reaktionsgefäß, kurz Eppi) übertragen. Im Anschluss daran konnte mithilfe des Cell Counters Scepter™ der Firma Millipore die Zellzahl aus den Einzelsuspensionen ermittelt werden.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die für die Versuche verwendeten HaCaT- und SCL-1 Zellen wurden aus einer Gefrierlagerung in Kultur gebracht. Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach dem folgenden Prozedere: das Nährmedium wurde zunächst mit einer Pasteurpipette von der Zellkultur abgesaugt und die Zellen mit etwa 5 ml PBS gespült. Anschließend wurden 400 µl Trypsin pro 10 cm Zellkulturschale pipettiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Schale gelöst hatten, wurden 400 µl TNS auf die Zellen gegeben und die Zellen daraufhin mit etwas PBS aufgenommen und in ein 15 ml Falcon übertragen. Nachfolgend wurden diese bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und der PBS-Überstand wurde wiederum abgesaugt. Im Anschluss wurden 3 ml vom FCS-Medium auf das Zellpellet gegeben und diese Zellsuspension wurde in die zuvor beschrifteten Eppis überführt.

Das FCS-Medium wurde nach der folgenden Anleitung hergestellt: Zunächst erfolgte der Ansatz des Kulturmediums mit mindestens 20% FCS-Endkonzentration sowie der Ansatz des Kulturmediums mit 10% DMSO-Endkonzentration, welche im Folgenden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt wurden. Nach einer Lagerung von mindestens 24 h bei -70 °C, erfolgte die Überführung zur endgültigen Lagerung in einen Stickstoffbehälter.

Für die Kultivierung wurden die Zellen zunächst in einem etwa 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in wenigen Millilitern des entsprechenden Nährmediums resuspendiert. Hiernach wurden die aufgetauten Zellen in die vorher beschrifteten und mit 10 ml Nährmedium befüllten Zellkulturschalen übertragen. Nach einer kurzen Kontrolle unter dem Lichtmikroskop

wurden die Zellen im Wärmeschrank inkubiert. Die NHEK bzw. NFK wurden bei der Firma PromoCell für die entsprechenden Versuche bestellt und wie unter 2.1.2 beschrieben, kultiviert.

2.1.5 Versuchsvorbereitungen und Behandlungsschema

Da sich das Behandlungsschema in den durchgeführten Versuchen nicht unterscheidet, soll im Folgenden zunächst die Behandlung der Zellen erläutert werden. Das Aussäen und die Ernte der Zellen sowie die Isolierung des jeweiligen Zellmaterials variieren teilweise in den verschiedenen Versuchen und werden daher an entsprechender Stelle nochmals gesondert beschrieben.

2.1.6 Behandlung eukaryontischer Zellen

Vor der Behandlung der Zellen wurde zunächst das vorhandene Nährmedium abgezogen. Für die Behandlung der Zellen wurden den jeweiligen Nährmedien 1% BSA zugesetzt. Der Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) fördert zum einen die Konversion des Vitamin D₃ in die biologische Wirkform 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und zum anderen verhindert es das Anheften von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ an das Plastik der Zellkulturschale.

In einer vorangehenden Studie aus unserem Labor konnte nachgewiesen werden, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in einer Konzentration von 1x10⁻⁷M sowohl in HaCaT-Zellen als auch in kutanen Plattenepithelkarzinomzellen in vitro einen zytoprotektiven Effekt gegenüber dem schädigenden Einfluss von UVB-Strahlung haben kann [158]. Aus diesem Grund legten wir auch in der vorliegenden Studie eine 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlungskonzentration von 1x10⁻⁷M fest. Hierfür wurde 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in absolutem Ethanol zu einer Konzentration von 1x10⁻⁴M verdünnt. Durch eine weitere Verdünnung von 1:1000 im Nährmedium ergibt sich eine Endkonzentration des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ von 1x10⁻⁷M. Da das Calcitriol in Ethanol gelöst wurde, entschieden wir uns auch bei den Kontrollbedingungen (keine Calcitriol-Behandlung) ein Gemisch aus Nährmedium und Ethanol (1:1000 Verdünnung) zu verwenden.

Die Ansätze wurden zunächst in 50 ml Falcons pipettiert und darauffolgend mittels Plastikpipette nach entsprechendem Pipettierschema auf die Zellen verteilt. Abhängig von der Zelllinie und dem jeweiligen Versuch wurden unterschiedliche Größen an Zellkulturschalen verwendet. Im Anschluss wurden die so behandelten Zellen im Wärmeschrank inkubiert.

Die kanzerogene Wirkung von UVB-Strahlung wurde in vielen Studien bereits nachgewiesen. Diese ergaben, dass durch eine UVB-Exposition die Bildung von Pyrimidin-Dimeren in Zellen gefördert wird und dies zu einer Schädigung des Genoms führen kann [21, 98]. Für die

vorliegende Untersuchung legen wir eine moderate UVB-Exposition mit 50mJ/cm² fest und eine maximale UVB-Exposition mit 200mJ/cm².

Nach 24 Stunden erfolgte entweder keine Bestrahlung, eine UVB-Bestrahlung mit einer Dosis von 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² im UVB-Strahler (UVP-Crosslinker von der Firma *Analytik Jena*) und eine darauffolgende erneute Behandlung mit dem jeweiligen Behandlungsmedium (mit oder ohne Calcitriol) und Inkubation. Hierbei bestrahlte der UVP-Crosslinker die Zellen mit UV-Strahlen der Wellenlänge 302nm, wobei die Dauer der Bestrahlung durch die Eingabe der gewünschten Bestrahlungsenergie (50mJ/cm² oder 200mJ/cm²) automatisch bestimmt wurde (wenige Sekunden).

Vor jeder Bestrahlung wurde das Nährmedium zunächst mittels einer Pasteurpipette komplett abgesaugt und vor der erneuten Inkubation nochmals frisch hinzugegeben.

Abhängig vom Versuch, wurden die Zellen entweder danach nochmal für 24 Stunden im Wärmeschrank inkubiert oder direkt nach der Bestrahlung (entspricht 0 h), 4 Stunden bzw. 8 Stunden nach Bestrahlung geerntet. Abhängig von der Zelllinie wurden die Keratinozyten in 10 cm-Zellkulturschale und 60 x 15 mm (6-Well-Zellkulturplatten) ausgesät, was mit den optimalen Wachstumsbedingungen der jeweiligen Zelllinie im Zusammenhang steht (siehe hierzu 2.2.4). Für die 10 cm-Zellkulturschale und die 6-Well-Zellkulturplatte ergeben sich daraus folgende Pipettierschemata:

Kulturgefäß	Vitamin D- Behandlung	Ethanol
10 cm Zellkulturschale	5 ml BSA-Medium + 5 µl 1x10 ⁻⁴ M 1,25 (OH) ₂ D ₃	5 ml BSA-Medium + 5 µl absolutes Ethanol
6-Well-Zellkulturplatte	2 ml BSA-Medium + 2 µl 1x10 ⁻⁴ M 1,25 (OH) ₂ D ₃	2 ml BSA-Medium + 2 µl absolutes Ethanol

Tabelle 1: Pipettierschema für die Vitamin D-Behandlung der Zellkulturplatten

2.2 Bestimmung der Transkriptmengen mittels quantitativer Real-Time PCR

2.2.1 Funktionsprinzip der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR, auch quantitative PCR (qPCR) oder Echtzeit-PCR genannt, ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, wie beispielsweise einer bestimmten DNA-Zielsequenz, die sich in einer Probe befindet. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA erfolgt über eine Fluoreszenz-Messung, welche während eines PCR-Zyklus in Echtzeit gemessen wird. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Am Ende eines, aus mehreren Zyklen bestehenden Laufs, wird anhand der Fluoreszenzsignale die Quantifizierung vorgenommen. Diese kann immer nur in der exponentiellen Phase des PCR-Laufs erfolgen, da nur dann optimale Reaktionsbedingungen

vorliegen. In der ersten Phase der Amplifikation eines PCR-Laufs ist die Menge der Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt (das Template) enthält, noch sehr gering. Somit ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass sich Primer und Polymerase treffen, noch relativ gering. Dahingegen steigt in der dritten Phase der Amplifikation die Template-Menge so stark an, dass es sogar zu einer Hemmung durch die PCR-Produkte kommt, was zur Folge hat, dass die Polymerasen und Nukleotide zerstört werden. Nur in der Phase dazwischen der zweiten Phase, wenn es zum exponentiellen Anstieg der PCR-Produkte kommt (exponentielle Phase) ist diese quantifizierbar. Der C_t -Wert misst genau den Anfangspunkt dieser exponentiellen Phase, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

Das Ziel in unseren Untersuchungen war es herauszufinden, ob es in den verschiedenen Zelllinien unter den unterschiedlichen UVB-Strahlenexpositionen und Vitamin D-Behandlungen Unterschiede in der Quantität der relativen DNA-Menge von den Gensequenzen gibt, die für die folgenden Proteine kodieren: TAp53, $\Delta 133p53$, TAp63, $\Delta Np63$, TAp73, $\Delta Np73$, JAG1, JAG2, NOTCH1, NOTCH2, VDR und RXR- α .

2.2.2 Der C_t -Wert

Der C_t -Wert (vom Englischen „threshold cycle“, zu Deutsch Schwellenwertzyklus) oder auch C_p -Wert (vom Englischen „Crossing Point“) ist eine theoretische Größe, die den Anfang eines exponentiellen Wachstums einer Kurve abbildet. Bei der quantitativen Real Time-PCR dient er der Quantifizierung von bestimmten Zielsequenzen einer DNA. Der C_t -Wert beschreibt hier den Teil der Amplifikationskurve, in dem das Fluoreszenzsignal erstmalig exponentiell über das Hintergrund-Fluoreszenzsignal ansteigt und die Amplifikationskurve den Schwellenwert kreuzt. An diesem Crossing Point liegt in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge der neusynthetisierten Amplifikationsprodukte vor. Je mehr DNA vor der Polymerasekettenreaktion (PCR) in der Probe vorhanden ist, desto mehr Kopien entstehen in den Polymerisierungszyklen und umso früher werden die Fluoreszenzsignale detektiert. Somit ist der C_t -Wert umso niedriger, je höher die Konzentration des Analyten ist, da die bestimmte Menge schon in einem früheren Zyklus erreicht wird. Vergleicht man die C_t -Werte bezüglich der gleichen Zielsequenz von mehreren Proben, so können diese einen Hinweis darauf geben, in welcher Probe sich vor der Amplifizierung mehr von der untersuchten DNA-Sequenz befand. Die Daten kann man dann wie folgt interpretieren, in Proben, in denen eine höhere Menge der zu interessierenden Zielsequenz vorlag, wird diese auch vermehrt repliziert. In der vorliegenden Studie erfolgte eine relative Quantifizierung, indem man die ermittelten Transkriptmengen der Gene von Interesse in Relation zu den Transkriptmengen dreier Haushaltsgene gesetzt hat. Bei den drei Housekeepinggenen handelt es sich um β -Actin (im Folgenden als „Aktin“ abgekürzt), ribosomale RNA 18S (18S) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Im Gegensatz zu den regulierten Genen (TAp53 und

Co), werden Housekeepinggene weitestgehend unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Faktoren konstant transkribiert und exprimiert. Als Maß für die Transkriptmengenänderungen der jeweiligen Gene werden die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert herangezogen (siehe kommender Abschnitt 2.2.3).

2.2.3 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens nicht als absolute Startkopiezahl bzw. -konzentration ermittelt. Stattdessen wird die exprimierte mRNA-Menge eines bestimmten Zielgens ins Verhältnis gesetzt zu einem Referenzgen, dem sogenannten Housekeepinggen (HKG). Dieses HKG wird in der Regel nicht reguliert, weshalb eine Behandlung keinen Einfluss auf seine mRNA-Menge haben sollte. Durch den Vergleich der exprimierten mRNA-Menge eines Zielgens zum Referenzgen erfolgt somit eine Art Normalisierung. Diese minimiert eine mögliche Verfälschung der Expressionsergebnisse, da bestimmte Gewebeeffekte, verschiedene RNA-Extraktionseffizienzen und Fehler der RT-PCR innerhalb eines Laufes das Ziel- und Referenzgen in gleicher Weise betreffen würde. Im Folgenden wird auf die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede genauer eingegangen.

2.2.3.1 $\Delta\Delta Ct$ -Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede verschiedener Gene aus unterschiedlich behandelten Zellen die $\Delta\Delta Ct$ -Methode angewandt und die Transkriptmengenänderungen der untersuchten Gene wurden anhand des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werts beschrieben. Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode wurde ausführlich in einer Arbeit von Pfaffl erläutert [110].

Zur Ermittlung der relativen Expression von Zielgenen werden deren Expressionen ins Verhältnis zu den Expressionen von Housekeepinggenen (HKG) gesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedes Zielgen mit je drei HKG relativiert (18S, β -Aktin, GAPDH). Zunächst erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung des C_t -Wertes, aus der jeweils der Mittelwert berechnet wurde. Danach wurde für jede Probe die Differenz aus dem C_t -Wert des jeweiligen Ziel- und Referenzgens gebildet, was dem sogenannten ΔCt -Wert entspricht. Die Bezeichnung „CP“ in den folgenden Gleichungen bezieht sich auf das englische „Crossing Point“ als Synonym für den C_t -Wert.

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

Anschließend wurde diese relative Expression des untersuchten Zielgens aus einer bestimmten Bedingung, z.B. primäre Keratinozyten nach einer UVB-Bestrahlung mit 50mJ/cm²

(ΔCP *Behandlung*) auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen, in diesem Falle primäre Keratinozyten, die keiner Bestrahlung ausgesetzt wurden (ΔCP Kontrolle). Daraus resultiert dann der sogenannte $\Delta\Delta CP$ -Wert.

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

Zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede zwischen einer behandelten Zellprobe und einer unbehandelten Probe (Kontrolle), wird der $2^{-\Delta\Delta CP}$ -Wert berechnet.

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

2.2.3.2 Effizienz

Die $\Delta\Delta Ct$ -Methode zur Ermittlung von Expressionsunterschieden setzt eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus, was auch als sogenannte Real-time PCR-Effizienz bezeichnet wird. Eine optimale Effizienz von 2 (Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus) ist in der Praxis nicht immer in allen Proben gegeben und schwankt im Bereich von 1,5 bis über 2,0. Da schon geringe Schwankungen der Effizienz zu enormen Unterschieden in den Expressionsunterschieden führen, gibt es Berechnungsmodelle, die den unterschiedlichen Effizienzen von Ziel- und Referenzgen Rechnung tragen.

In unsere Untersuchungen waren nicht die absoluten Amplifikationen von mRNA von Bedeutung, sondern die relativen mRNA-Amplifikationen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen in den drei verschiedenen Zellkulturen. Hierbei wurden in jeder Zelllinie und Bedingung immer die gleichen 12 Primerpaare untersucht und miteinander verglichen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Ermittlung der Effizienzen verzichtet.

2.2.4 Aussäen der Zellen

Für diesen Versuch wurden von den HaCaT- und SCL-1-Zellen jeweils 5×10^5 Zellen pro 100 x 20 mm Zellkulturschale in 5 ml Nährmedium ausgesät. Im Gegensatz dazu wurde die doppelte Zellanzahl der primären Keratinozyten in 60 x 15 mm Zellkulturschalen ausgesät, da vorangegangene Versuche gezeigt hatten, dass die NHEK ohne ausreichenden Zellkontakt ein nur sehr langsames und unzureichendes Zellwachstum aufweisen. Dem Aussäen folgte eine 24-stündige Wachstumsphase im Wärmeschrank und einer sich daran anschließenden Behandlung der Zellen, wie oben in 2.1.6 beschrieben.

2.2.5 Manuelles Ernten der HaCaT- und SCL-1-Zellen

Die Ernte, wie auch die RNA-Isolierung der HaCaT- und SCL-1-Zellen unterscheiden sich von denen der primären Keratinozyten (siehe hierfür 2.2.8). Grund hierfür war, dass wir in

vorangegangenen Versuchen mit den primären Keratinozyten keine ausreichenden RNA-Konzentrationen mithilfe des manuellen Erntevorgangs gewinnen ließ.

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem Behandlungsmedium folgte die Ernte der Zellen. Dafür wurde zunächst das Nährmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS wiederum abgesaugt war, wurden die HaCaT- und SCL-1-Keratinozyten manuell mittels eines Schabers (disposable Cell Scraper von Greiner bio-one) von der Schale abgelöst. Die abgelösten Zellen konnten dann durch Zugabe von 1 ml PBS in 15 ml Falcons übertragen werden. Um möglichst viele Zellen von der Platte zu gewinnen, wurde dieser Schritt einmalig wiederholt, sodass die Zellen in insgesamt 2 ml PBS in das Falcon überführt wurden. Die Zellsuspensionen wurden bei 1200 U/min für 3 min. zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde mit der Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt, sodass nur noch das Zellpellet im Falcon zurückblieb. Erfolgte die RNA-Isolierung nicht unmittelbar nach der Ernte, so wurden die Zellpellets zunächst bei -20°C weggefroren.

2.2.6 RNA-Isolierung mit Omniscript RT Kit von Qiagen

Die RNA-Isolierung der HaCat- und SCL-1 Zellen erfolgte bei diesem Versuch unter Zuhilfenahme des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Als Vorbereitung musste hierfür 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml Buffer RLT hinzugegeben werden sowie 4 Volumen Ethanol zum RPE-Buffer. Auf die geernteten Zellen in den 15 ml Falcons wurden zunächst 350 µl RLT-Buffer (+β-Mercaptoethanol) pipettiert und vermischt. Diese Zellsuspension wurde dann in ein QIAshredder Mini spin column, das in ein 2 ml collection Tube gesteckt wurde, überführt und für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zum Eluat wurde 350 µl absolutes Ethanol gegeben und dieses Gemisch wurde anschließend in ein RNeasy Mini spin column gegeben und für weitere 15 Sekunden bei 10.000 U/min abzentrifugiert. Diesmal wurde das Eluat verworfen und daraufhin 700 µl Buffer RW1 in die RNeasy Mini spin column pipettiert und wieder für 15 Sekunden bei 10.000 U/min in die Zentrifuge gestellt. Ein weiteres Mal wurde das Eluat verworfen, 500 µl Buffer RPE auf die Probe pipettiert und diesmal für 5 Sekunden bei 10.00 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurden nochmal 500 µl Buffer RPE zur Probe gegeben und dann für 2 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das RNeasy Mini spin column in ein neues 2 ml collection Tube überführt und für 1 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Zuletzt wurde das RNeasy Mini spin column in ein neues 1,5 ml collection Tube eingesetzt, 32 µl RNase free water direkt auf die spin column Membran gegeben und 1 min lang bei 10.000 U/min ein letztes Mal in der Zentrifuge platziert.

Nach der RNA-Isolierung folgte die Konzentrationsmessung der RNA-Proben mittels eines Spektrophotometers (Nano Vue von der Firma GE). Zur Vermessung wurden jeweils 2 µl der entsprechenden Probe verwendet. Hierbei erfolgten je drei Messwiederholungen, aus denen

der Mittelwert berechnet wurde. Als Referenzprobe diente RNase free water das auch zuvor schon bei der RNA-Isolierung benutzt wurde.

2.2.7 Umschreibung der RNA in cDNA

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA (aus dem Englischen „complementary deoxyribonucleic acid“, zu Deutsch: komplementäre Desoxyribonukleinsäure) erfolgte mithilfe des Omniscript RT Kit (50) der Firma Qiagen. Das Gesamtvolumen der Probe, die umgeschrieben werden sollte, betrug 20µl. Dieses setzte sich aus der Menge der RNA-Suspension (die 1µg RNA enthält), 7,8µl des Mastermix`, sowie RNase free water zusammen, welches das restliche Volumen auffüllte.

Zunächst wurde die benötigte Menge an RNA-Suspension ermittelt, welche 1 µg RNA enthielt und das benötigte Restvolumen, welches mit RNase free water aufgefüllt wurde, um auf ein Gesamtvolumen von 20µl zu kommen. Für das Ansetzen des Mastermix' für eine Probe war die Mischung folgender Substanzen nötig: 2 µl 10 x RT-Puffer, 2 µl dNTP's (5 mM), 1,8 µl Random Primer (50 µg/ml), 1 µl RNaseInhibitor (10 µg/ µl) und 1 µl Omniscript. Die zuvor beschrifteten Eppendorfgefäße wurden dann mit der errechneten Menge an RNA-Suspension und RNase free water sowie 7,8 µl des Mastermix befüllt, verschlossen und für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden die mit cDNA befüllten Eppendorfgefäße für 5 min in einem 93 °C heißen Heizblock erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8 Ernte und RNA-Isolierung der primären Keratinozyten mit miRNeasy Mini Kit von Qiagen

Die Ernte sowie die RNA-Aufreinigung und Isolierung der primären Keratinozyten erfolgte unter Verwendung des miRNeasy Mini Kit (50) von Qiagen. Die Zellernte fand 24 h nach der Zellbehandlung statt. Um die Zellen von der Zellkulturschale abzulösen, wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und anschließend 700 µl Qiazol Lysis Reagenz auf die Zellen gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren entstand eine visköse Zellsuspension, die in die vorbereiteten Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei Raumtemperatur (15-25°C) inkubiert wurden. Danach wurden 140 µl Chloroform hinzugegeben, das Eppi verschlossen und anschließend für ca. 15 s gevortext, bis die Suspension eine milchig-rosa Farbe annahm. Die Suspension wurde daraufhin für weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben 15 min bei 12.000 U/min bei 4°C in der Kältezentrifuge platziert. Im Folgenden wurde die obere wässrige Phase (etwa 325 µl) vorsichtig in ein neues collection tube überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Interphase mitübertragen wurde. Hierzu wurden 525 µl absolutes Ethanol gegeben und mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren vermengt. Maximal 700 µl dieser Suspension wurden in ein RNeasy Mini column überführt, welches in ein 2 ml collection tube gesetzt wurde. Nach Verschließen des RNeasy

Mini column wurde dieses für 15 s bei 8000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und der vorangegangene Schritt nochmals wiederholt. Darauffolgend wurden 700 µl des Buffer RWT auf das RNeasy Mini column pipettiert und für 15 s bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nicht mehr weiter benötigt. Beim nächsten Schritt wurde dem RNeasy Mini column 500 µl Buffer RPE zugegeben, dann wiederholt für 15 s bei 8000 U/min abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden nochmals 500µl Buffer RPE auf das RNeasy Mini column gegeben und diesmal für 2 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das RNeasy Mini column in ein neues 2 ml collection tube gesteckt und bei 10.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das RNeasy Mini column in ein vorher beschriftetes 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt und RNase free water unmittelbar auf die (RNeasy Mini column) Membran gegeben. Die Menge an RNase free water war dabei abhängig von der zu erwartenden RNA-Konzentration. Bei einer absehbar hohen RNA-Konzentration, wie beispielsweise bei den HaCaT-Zellen, wurden 52µl RNase free water eingesetzt, bei einer angenommenen niedrigen RNA-Konzentration, wie bei den primären Keratinozyten, nur 32µl. Wurden die Zellen zunächst nur geerntet und die RNA-Isolierung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt, so wurden die Proben bei -20°C weggefroren und mussten vor der RNA-Isolierung zunächst 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut werden.

2.2.9 Durchführung der quantitativen Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde unter Verwendung des StepOnePlus Real-Time PCR Systems von Applied Biosystems durchgeführt. Für die qRT-PCR wurden 96-Well-Platten (Fast optical 96 Reactionplate von MicroAmp™) verwendet. Pro 96-Well-Platte konnten alle sechs Versuchsbedingungen einer Zelllinie aufgetragen werden und anhand je drei Primern sowie drei Housekeeping-Genen untersucht werden. Für jeden Wert erfolgte eine Doppelbestimmung. Pro Well wurde ein Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert. Dieses setzte sich zusammen aus 20 µl Mastermix und 5µl der RNA-Suspension. Der Mastermix bestand aus 12,5 µl SYBR® Green (QuantiTect, Qiagen), 2,5 µl Primer (bzw. 5 µl Primer der p53-Familie) und 5 µl RNase free water (bzw. 2,5 µl bei Verwendung der Primer aus der p53-Familie). Die untersuchten Gene waren TAp53, Δ133p53, TAp63, Δ Np63, TAp73, Δ Np73, JAG1, Jag2, NOTCH1, NOTCH2, RXR-α und VDR. Als Housekeeping-Gene wurden 18S, β-Actin und GAPDH verwendet. Tabelle 2 veranschaulicht exemplarisch das Pipettierschema einer 96-Well-Platte mit HaCaT-Zellen und den zu untersuchenden Genen JAG1, JAG2 und VDR. Nachdem die 96-Well-Platte mit den Proben beladen war, wurde diese mit einem MicroAmp™ Optical Adhesive Film von der Firma Thermo Fisher Scientific versiegelt und anschließend für wenige Sekunden anzentrifugiert, sodass sich etwaige am Rand befindliche Probetropfen lösten. Die qRT-PCR-Läufe wurden unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen (Run Method, siehe Abbildung 6: Screenshot der Run Method für die qRT-PCR)

durchgeführt und liefen jeweils etwa 2,5 h lang. Es wurden für alle Primer das gleiche Run Method-Schema angewandt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JAG1	JAG1	JAG2	JAG2	VDR	VDR	18s	18s	Aktin	Aktin	GAPDH	GAPDH
B	JAG1 HaCaT Eth. ☉	JAG1 HaCaT Eth. ☉	JAG2 HaCaT Eth. ☉	JAG2 HaCaT Eth. ☉	VDR HaCaT Eth. ☉	VDR HaCaT Eth. ☉	18s HaCaT Eth. ☉	18s HaCaT Eth. ☉	Aktin HaCaT Eth. ☉	Aktin HaCaT Eth. ☉	GAPDH HaCaT Eth. ☉	GAPDH HaCaT Eth. ☉
C	JAG1 HaCaT Eth. 50J	JAG1 HaCaT Eth. 50J	JAG2 HaCaT Eth. 50J	JAG2 HaCaT Eth. 50J	VDR HaCaT Eth. 50J	VDR HaCaT Eth. 50J	18s HaCaT Eth. 50J	18s HaCaT Eth. 50J	Aktin HaCaT Eth. 50J	Aktin HaCaT Eth. 50J	GAPDH HaCaT Eth. 50J	GAPDH HaCaT Eth. 50J
D	JAG1 HaCaT Eth. 200J	JAG1 HaCaT Eth. 200J	JAG2 HaCaT Eth. 200J	JAG2 HaCaT Eth. 200J	VDR HaCaT Eth. 200J	VDR HaCaT Eth. 200J	18s HaCaT Eth. 200J	18s HaCaT Eth. 200J	Aktin HaCaT Eth. 200J	Aktin Eth. 200J	GAPDH HaCaT Eth. 200J	GAPDH HaCaT Eth. 200J
E	JAG1 HaCaT Vit. D ☉	JAG1 HaCaT Vit. D ☉	JAG2 HaCaT Vit. D ☉	JAG12 HaCaT Vit. D ☉	VDR HaCaT Vit. D ☉	VDR HaCaT Vit. D ☉	18s HaCaT Vit. D ☉	18s HaCaT Vit. D ☉	Aktin HaCaT Vit. D ☉	Aktin HaCaT Vit. D ☉	GAPDH HaCaT Vit. D ☉	GAPDH HaCaT Vit. D ☉
F	JAG1 HaCaT Vit. D 50J	JAG1 HaCaT Vit. D 50J	JAG2 HaCaT Vit. D 50J	JAG2 HaCaT Vit. D 50J	VDR HaCaT Vit. D 50J	VDR HaCaT Vit. D 50J	18s HaCaT Vit. D 50J	18s HaCaT Vit. D 50J	Aktin HaCaT Vit. D 50J	Aktin HaCaT Vit. D 50J	GAPDH HaCaT Vit. D 50J	GAPDH HaCaT Vit. D 50J
G	JAG1 HaCaT Vit. D 200J	JAG1 HaCaT Vit. D 200J	JAG2 HaCaT Vit. D 200J	JAG2 HaCaT Vit. D 200J	VDR HaCaT Vit. D 200J	VDR HaCaT Vit. D 200J	18s HaCaT Vit. D 200J	18s HaCaT Vit. D 200J	Aktin HaCaT Vit. D 200J	Aktin HaCaT Vit. D 200J	GAPDH HaCaT Vit. D 200J	GAPDH HaCaT Vit. D 200J
H	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer

Tabelle 2: Beispielhaftes Pipettierschema für HaCaT, Passage 55 mit den untersuchten Genen JAG1, JAG2 und VDR

In allen qRT-PCR-Versuchen wurden die gleichen drei Haushaltsgene verwendet: 18S, β -Actin und GAPDH. In jedem Lauf wurden alle sechs Versuchsbedingungen einer Passage untersucht (Ethanol keine Bestrahlung, Ethanol 50mJ/cm² UVB-Bestrahlung, Ethanol 200mJ/cm² UVB-Bestrahlung, Vitamin D-Behandlung keine Bestrahlung, Vitamin D-Behandlung 50mJ/cm² UVB-Bestrahlung, Vitamin D-Behandlung 200mJ/cm² UVB-Bestrahlung). In der obersten Reihe (Zeile A) lief die Kontrolle mit, in der anstatt einer RNA RNase free water eingesetzt wurde.

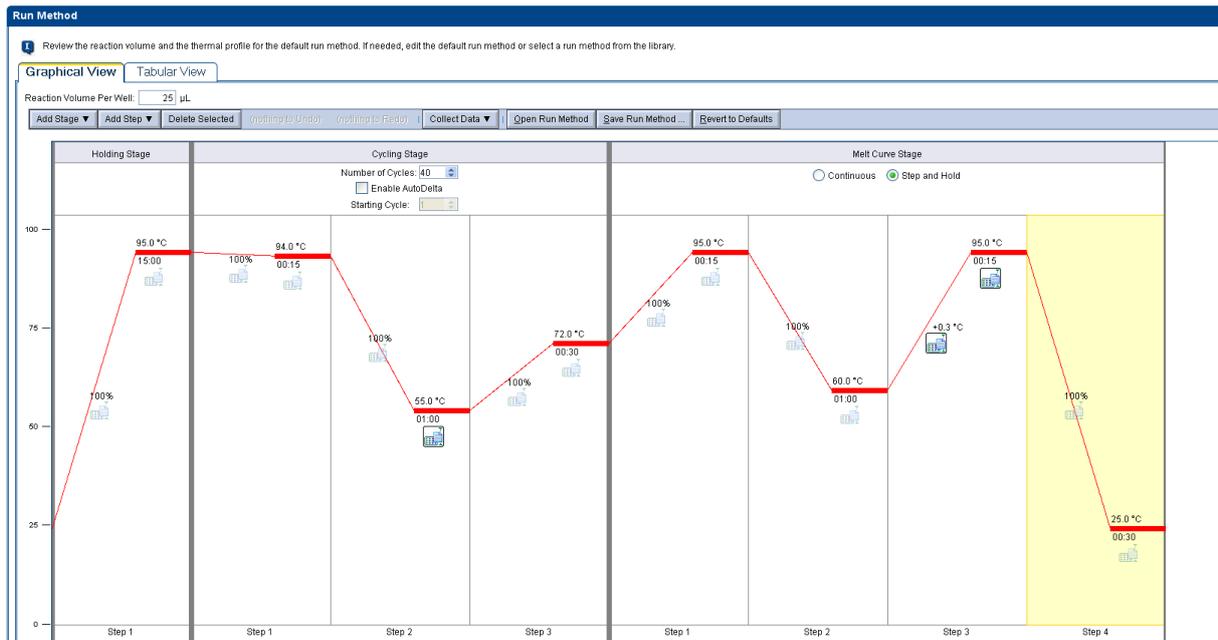


Abbildung 6: Screenshot der Run Method für die qRT-PCR

Holding Stage: 95°C für 15 min, Cycling Stage (40 Zyklen): Step 1: 94°C 15 s, Step 2: 55 °C 1 min, Step 3: 72°C 30 s, Melt Curve Stage: Step1: 95° 15 s, Step 2: 60°C 1 min, Step 3: 95°C 15 s, Step 4: 25°C 30 s.

2.3 Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel dokumentiert. Die statistischen Analysen in der vorliegenden Arbeit erfolgten mithilfe des Statistikprogramms SPSS. Zur visuellen Darstellung der Ergebnisse wurden Säulendiagramme mithilfe eines Algorithmus über die Programmiersprache Python angefertigt.

Als Maß für die Transkriptmengenänderungen der jeweiligen Gene wurden die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte herangezogen (siehe 2.2.3).

Da es sich bei den unabhängigen Variablen (Behandlung: Trägersubstanz Ethanol vs. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Ethanol; Bestrahlung: keine UVB-Bestrahlung, 50mJ/cm² UVB und 200mJ/cm² UVB) nicht um metrische Daten handelt, wurde sich gegen eine lineare Regressionsanalyse entschieden. Stattdessen wurden zur Auswertung der qRT-PCR-Daten univariate ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen (vom Englischen „Analysis of variance“, kurz ANOVA) mithilfe des Statistikprogramms SPSS vorgenommen. Als Zielvariable fungierte der jeweilige $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert, als Faktoren die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vs. Kontrolle (Ethanol) und die drei unterschiedlichen UVB-Strahlungsbedingungen (keine Bestrahlung, 50mJ/cm² und 200mJ/cm²).

Zusätzlich wurden die einzelnen Zelllinien separat auf signifikante Unterschiede zwischen den sechs Versuchsbedingungen untersucht, was als Faktor „Gruppe“ betitelt wurde. Um bei

einem signifikanten Haupteffekt diejenigen Faktorstufen zu ermitteln, die einen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert) haben, erfolgten zusätzlich Post-hoc-Mehrfachvergleiche (LSD und Bonferroni). Der Bonferroni-Test stellt hierbei den restriktiveren dieser beiden Post-hoc-Test dar. Wiesen die Varianzanalysen signifikante Effekte auf und der Bonferroni-Test zeigt keine signifikanten Gruppenmittelwert-Unterschiede an, so werden im Folgenden die Ergebnisse des LSD-Tests berichtet.

Um die dafür notwendige Voraussetzung der Varianzen-Homogenität zu ermitteln, erwies es sich als sinnvoll, einen Levene-Test durchzuführen. In allen Untersuchungen ergab der Levene-Test nicht-signifikante Ergebnisse, sodass von einer Homogenität der Varianzen ausgegangen werden kann.

Bei der statistischen Auswertung wurde ich durch das Institut für *Medizinischen Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI)* der Universität des Saarlandes von der Diplom-Statistikerin Frau Gudrun Wagenfeil unterstützt.

2.4 Western Blot

2.4.1 Funktionsprinzip Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden, die anschließend über verschiedene Reaktionen nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Übertragung der Proteine mittels Elektrophorese.

2.4.2 Aussäen der Zellen

Die Untersuchungen zur Proteinquantität bezogen sich ebenfalls auf alle drei Zelllinien. Dafür wurden von den HaCaT- und SCL-1-Zellen jeweils 2×10^5 Zellen mit 5 ml Nährmedium in eine 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. Von den primären Keratinozyten wurde die doppelte Zellmenge in eine 6 cm-Zellkulturschale eingesetzt, um auch hier die Voraussetzungen (Zellkontakt) für ein angemessenes Wachstum zu gewährleisten. Dem Aussäen folgte eine 24-stündige Wachstumsphase im Wärmeschrank und eine sich daran anschließende Behandlung der Zellen, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben.

2.4.3 Ernten der Zellen

Anders als bei den qRT-PCR-Versuchen, erfolgte hier die Ernte nicht erst nach 24 h, sondern zu drei verschiedenen Zeitpunkten: direkt nach Bestrahlung (entspricht 0 h), 4 h nach Bestrahlung und 8 h nach Bestrahlung. Für diesen Versuch wurde die Zellernte aller drei Zelllinien manuell mittels Zellschaber durchgeführt (wie in 2.2.5 bereits beschrieben). Nach der Ernte wurden die 15 ml Falcons mit der PBS-Zell-Suspension für eine Minute bei 1200

U/min abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgezogen, sodass nur noch das Zellpellet im Falcon zurückblieb. Die Proteinisolierung erfolgte direkt im Anschluss an die Ernte.

2.4.4 Proteinisolierung

Zur Isolierung wurden die Zellpellets in dem zuvor auf 95°C erhitzten SDS-Lysispuffer aufgenommen (HaCaT und SCL-1 jeweils in 100 µl, NFK in 60 µl), in 1 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 100°C im Heizblock gekocht. Der SDS-Lysispuffer ist ein ionisch denaturierendes Reinigungsmittel, welches verwendet wird, um Proteine vollständig zu lösen und zu denaturieren. Das anschließende Scheren der Proben erfolgte mit einer 1 ml Einmalspritze (von der Firma Soft-Ject) mit entsprechendem Nadelaufsatz (0,3 mm x 13 mm von der Firma BD Microlane™3). Danach wurden die Proben bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1 ml Eppi überführt und bei -20°C weggefroren.

Die Vermessung der Proben erfolgte an einem Spektrophotometer (Ultrospec 3100pro von der Firma Amersham Bioscience) bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.4.5 Durchführung des Western Blots

Aufgrund der relativ geringen Proteinkonzentrationen der Proben und der damit einhergehenden hohen notwendigen Füllmenge, wurden die Western Blots mit großen Gelen (14 cm x 16,5 cm) durchgeführt.

Zum Gießen der Gele kamen folgende Substanzen mit entsprechender Menge zum Einsatz:

- Lösung A: Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1), wässrige, 40% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis (37,5:1) von der Firma Carl Roth
- Lösung B: 1,5 M Tris-HCL mit 0,4% SDS, pH 8,8
- Lösung C: 0,5 M Tris HCL mit 0,4% SDS, pH 6,8

Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt:

Trenngel (unteres Gel) 8%:	
Lösung A	4 ml
Lösung B	5 ml
Wasser	11 ml
10% APS	200 µl
TEMED	16,6 µl

Sammelgel (unteres Gel) 5%:	
Lösung A	750 µl
Lösung C	1,6 ml
Wasser	4,25 ml
10% APS	66,6 µl
TEMED	5,4 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Western Blot-Untersuchungen

Nach Säuberung der Glasplatten mit 70% Ethanol erfolgte die Platzierung der Spacer zwischen den beiden Platten, wobei die beiden kürzeren Spacer an die seitlichen Kanten platziert und der lange Spacer an die untere Kante gelegt wurde. Nachdem die Glasplatten und die Spacer mittels Klammern (je 2 an den Seiten mit Spacern) fixiert wurden, konnte der durch die Spacer entstandene Rand von ca. 4mm mit 1%iger Agarose abgedichtet werden. Hiernach wurde zunächst das Trenngel angesetzt (für Zusammensetzung siehe Tabelle 3). Dieses wurde zügig zwischen die Platten gegossen und mit 70% Ethanol aufgefüllt, wobei zur oberen Kante ein ca. 3 cm dicker Rand ausgespart wurde. Nach etwa einer halben Stunde war das Trenngel fest, sodass das Ethanol abgeschüttet und ein 13-Well-Kamm zwischen den beiden Glasplatten platziert werden konnte. Danach wurde das Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) im Bereich des Kamms über das Trenngel gegossen. Nachdem auch dieses ausgehärtet war, wurde der lange Spacer an der unteren Kante entfernt und die Gele wurden im Kühlschrank bei 4 °C in feuchten Tüchern gelagert. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese. Dafür wurden die vorbereiteten Gele zunächst auf Raumtemperatur gebracht und die Kämm vorsichtig entfernt. Die Gele wurden dann so an der Elektrophoresekammer platziert (Ausparung an Glasplatte zeigt nach hinten), dass sie Kontakt zum Elektrophoresepuffer hatten und seitlich mit je einer Klammer fixiert waren.

Der Elektrophoresepuffer wurde für etwa 2 l wie folgt angesetzt: 200 ml 10x SDS-Laufpuffer + 1,8 l destilliertes Wasser. Um etwaige Luftbläschen am unteren Gel-Rand zu entfernen, wurden diese mithilfe einer 10 ml-Spritze verdrängt. Zudem wurden die Slots gespült, um diese von eventuellen Gelschlieren zu befreien. Anhand der zuvor vermessenen Proteinproben wurde die Proteinmenge bestimmt, um jeweils 15 µg Protein für den Western Blot zu erhalten. Die entsprechende Probemenge wurde zusammen mit jeweils 2,5 µl zweifach konzentriertem Lämmli (100 µl Lämmli + Messerspitze Bromphenolblau) in ein beschriftetes Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Unter Verwendung einer 50 µl Hamilton-Spritze wurden die Proben in die einzelnen Taschen geladen und zuletzt 7,5 µl des Markers in die 13. Tasche ganz rechts aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde bei constant Volt 120 V/34 mA angeschaltet. Es dauerte etwa 2,5 h bis die Proben durchgelaufen waren.

Als Vorbereitung für das Blotting wurde zunächst etwa 6 l des Transferpuffers angesetzt. Dieser bestand aus 4,2 l destilliertem Wasser, 600 ml 10x Western Transferpuffer sowie 1,2 l Methanol. Die PBS-Milch setzte sich aus 50 ml PBS und 2,5 g Magermilchpulver zusammen. Die auf 7,0 x 13,5 cm zurechtgeschnittenen Transfermembranen (Transfer Membranes v. Immobilon®-P, Porengröße 0,45 µm) wurden für ca. 10 min in Methanol aktiviert. Nachdem die elektrophoretische Trennung abgeschlossen war, wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer entnommen, die kurzen Spacer zwischen den Glasplatten wurden entfernt und die Platten voneinander gelöst. Danach wurde die aktivierte Membran mithilfe

einer Pinzette direkt auf das Gel platziert und ein Filterpapier darübergerlegt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen dazwischen befanden. Nach Platzierung des zweiten Filterpapiers, wurde das Filter-Membran-Gel-Filter-„Sandwich“ in einen Käfig zwischen zwei Schwämmen eingebettet und in die Blot-Kammer gestellt. Diese wurde dann auf constant 380 mA für 3 h mit Zirkulation eingestellt (oder alternativ über Nacht: bei constant 0,1 A). Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde das Filter-Membran-Gel-Filter-„Sandwich“ der Kammer entnommen, die Membran auf einem Filterpapier 5 min lang getrocknet und für 5 min in Methanol fixiert. Da sich die für meine Untersuchungen wichtigen Gene zwischen 90 und 35 kDa befinden (siehe Abbildung 7) wurden die Membranen oberhalb von 90 kDa und unterhalb von 35 kDa geschnitten.

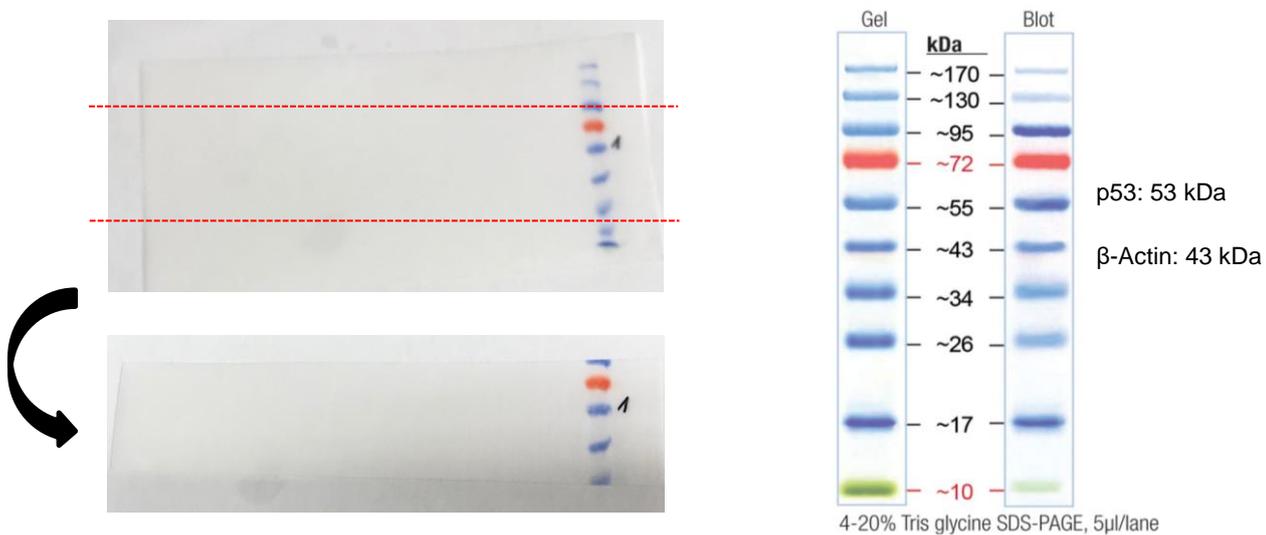


Abbildung 7: Visualisierung der Schnittebenen der Membranen zur Untersuchung von TAp53 mit vorgefärbter Proteinleiter

Geschnitten wurde oberhalb 90 kDa und unterhalb 35 kDa, da sich die untersuchten Proteine dazwischen befinden: p53 mit seinem Molekulargewicht von 53 kDa Molekulargewicht von β -Actin 43 kDa.

(Online-Abbildung einer vorgefärbten Proteinleiter von fisherscientific: URL: <https://www.fishersci.de/shop/products/fisher-bioreagents-ez-run-prestained-i-rec-i-protein-ladder-3/10638393> (20.08.2023))

Nun wurde die Membran zunächst mit PBS gespült und daraufhin dreimal 10 min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem dritten Durchgang wurde die Membran in PBS-Milch für ca. 1 h auf dem Schüttler geblockt, währenddessen wurde der Primärantikörper angesetzt. Dafür wurde sowohl der Anti-p53-Antikörper als auch der Anti- β -Actin Antikörper 1:2000 verdünnt (2,5 μ l Anti-p53-Antikörper bzw. Anti- β -Actin Antikörper auf 5 ml PBS-Milch) und gemeinsam in ein 50 ml Falcon gefüllt. Für die Inkubation wurde die Membran spiralförmig in das Falcon mit den Primärantikörpern platziert und über Nacht auf einem Roll Rotor bei 4°C mobilisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit PBS gewaschen (mit einem Tablett abgedeckt, um sie vor Licht zu schützen). Der

Sekundärantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:5000 (2 µl Anti-Mouse in 10 ml PBS-Milch) eingesetzt. Nach dem Waschvorgang wurde die Membran zusammen mit dem Sekundärantikörper-PBS-Milch-Gemisch in Folie eingeschweißt und lichtgeschützt für eine Stunde inkubiert. Daraufhin folgten erneut drei lichtgeschützte Waschgänge mit PBS für jeweils 10 min.

Erst in der Dunkelkammer erfolgte das Mischen der Detektionslösung, bestehend aus 3 ml Detection Reagent 1 Peroxidase Solution sowie 3 ml Detection Reagent 2 Luminol-Enhancer Solution (von der Firma Thermo Scientific). Diese wurde gleichmäßig auf der Membran verteilt und dort für ca. 1 min belassen. Danach wurde die Membran in eine vorbereitete Folie gelegt, die wiederum in einer Kassette platziert wurde. Anschließend wurde ein Film (Amersham Hyperfilm™ECL, High performance chemiluminescence film von GE Healthcare) auf die Folie mit der Membran gelegt und die Kassette verschlossen. Die Entwicklungszeit variierte dabei zwischen 1 min und 30 min. Nach Entwickeln und Fixieren des Films wurde dieser mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3 Ergebnisse

Für die folgenden Resultate wurden in gut charakterisierten Zelltypen Änderungen in der Genexpression unter jeweils einer von insgesamt sechs verschiedenen Bedingungen bestimmt. Hierzu wurden die Transkriptmengen ausgewählter Gene mittels quantitativer Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) gemessen und zum Teil die entsprechenden Variationen in der Proteinmenge mittels Westernblotting untersucht.

Es wurden drei unterschiedliche Zelltypen analysiert:

- humane primäre Keratinozyten
- immortale humane HaCaT Keratinozyten, die Punktmutationen in beiden p53-Allelen tragen und als Präkanzerose gelten sowie,
- transformierte humane SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen.

Die Zellen wurden jeweils entweder

- mit UVB-Licht bestrahlt ($50\text{mJ}/\text{cm}^2$ oder $200\text{mJ}/\text{cm}^2$) bzw. nicht bestrahlt sowie
- mit Vitamin D behandelt (1,25-Dihydroxyvitamin D_3 in einer Konzentration von $1 \times 10^{-7}\text{M}$) bzw. mit Ethanol, der Trägersubstanz von Vitamin D, scheinbehandelt.

Für die drei verschiedenen Zelltypen ergaben sich demnach insgesamt sechs unterschiedliche Versuchsbedingungen:

- keine UVB-Exposition, nur Ethanol als Trägersubstanz von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (Kontrolle)
- moderate UVB-Lichtexposition ($50\text{mJ}/\text{cm}^2$); Ethanol (UVB-low)
- hohe UVB-Lichtexposition ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$); Ethanol (UVB-high)
- keine UVB-Exposition; 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (VitD)
- moderate UVB-Lichtexposition ($50\text{mJ}/\text{cm}^2$); 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (UVB-low; VitD)
- hohe UVB-Lichtexposition ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$); 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (UVB-high; VitD)

24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung wurden die folgenden ausgewählten Gentranskripte quantifiziert:

(a) Transkripte des Tumorsuppressorgens p53 (TAp53, $\Delta 133\text{p53}$), dessen Produkte die Teilung und das Überleben von (Tumor-) Zellen der Haut nach Schädigung regulieren

(b) Transkripte der p53-Familienmitglieder p63 und p73 (TAp63, ΔNp63 , TAp73, ΔNp73), die ebenfalls bei der Regulation von Hautzellen eine wichtige Rolle spielen

(c) Transkripte des NOTCH-Signalweges (JAG1, JAG2, NOTCH1, NOTCH2), dessen Produkte die Differenzierung von Zellen der Haut regulieren und schließlich,

(d) die Transkripte des Vitamin D-Rezeptors VDR sowie seines Bindungspartners RXR α , die zur Übermittlung der Signale des Liganden Vitamin D in der Zelle notwendig sind.

Die ermittelten Transkriptmengen wurden jeweils in Relation zur Expression eines Haushaltsgens präsentiert.

Als Maß für die Transkriptmengenänderungen der jeweiligen Gene werden die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert herangezogen (siehe 2.2.3). Zur Auswertung der qRT-PCR-Daten wurden univariate ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen über das Statistikprogramm SPSS vorgenommen, wobei als Faktoren die Behandlung mit Vitamin D (1,25-Dihydroxyvitamin D₃) vs. Kontrolle (Ethanol) (im Folgenden auch als Faktor „Vitamin D-Behandlung“ beschrieben) und die drei unterschiedlichen UVB-Strahlungsbedingungen dienten (als Faktor „UVB-Bestrahlung“ bezeichnet). Zusätzlich wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den sechs Versuchsbedingungen gefahndet (Faktor „Gruppe“). Anhand von Post-hoc-Mehrfachvergleichen (LSD und Bonferroni) konnte bei einem signifikanten Haupteffekt diejenigen Faktorstufen ermittelt werden, die einen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert) hatten.

Die Säulendiagramme wurden mittels eines Algorithmus über die Programmiersprache Python angefertigt.

Signifikanzen und Tendenzen wurden wie folgt gekennzeichnet:

* = p-Wert <0.05, ** = p-Wert <0.01, *** = p-Wert <0.001).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in den Abbildungen die folgenden Kürzel verwendet:

- keine (keine Bestrahlung),
- 50mJ/cm² als mittlere UVB-Strahlendosis,
- 200mJ/cm² als maximale UVB-Strahlendosis.

Außerdem wird 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ vereinfacht als Vitamin D bezeichnet.

3.1 Transkriptmengen- und Proteinmengenänderungen in der p53-Familie

3.1.1 TAp53

3.1.1.1 Primäre Keratinozyten: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Das Vollängen-Transkript des Tumorsuppressorgens p53 wird in Zellen allgemein eher geringfügig reguliert. Stattdessen akkumuliert das p53-Protein, als Antwort auf eine Zellschädigung, nach posttranslationaler Modifikation und initiiert entweder einen Zellzyklusarrest, die Reparatur der Schäden oder das Absterben der Zelle durch Apoptose (bei irreparabler Schädigung).

Da die p53-Regulation hauptsächlich auf Proteinebene stattfindet, wurden bei den hier durchgeführten Behandlungen allenfalls kleine Änderungen der TAp53-Transkriptmengen infolge einer UVB-Bestrahlung bzw. Vitamin D-Behandlung erwartet.

In den primären Keratinozyten zeigten sich in der Tat kaum merkliche Unterschiede in den TAp53-Transkriptmengen 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung (Abbildung 8, blaue Balken). Betrachtet man jedoch die statistischen Auswertungen, so lässt sich in den Hochdosis bestrahlten primären Keratinozyten signifikant mehr TAp53-Transkript nachweisen als in den unbestrahlten Zellen (zweifaktorielle Varianzanalyse: Faktor UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.017$), UVB-Bestrahlung: Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 200 mJ/cm^2 UVB vs. kein UVB $p < 0.05$ ($p = 0.016$)).

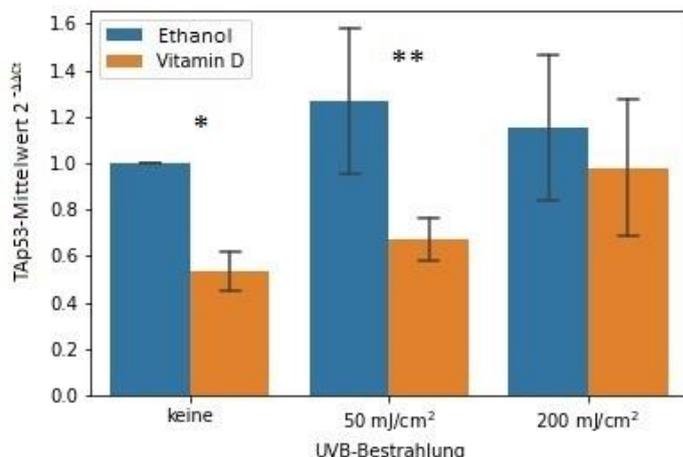


Abbildung 8: Relative TAp53-Transkriptmengen in primären Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Primäre Keratinozyten weisen eine geringere TAp53-Transkriptmenge auf, wenn sie mit Vitamin D behandelt wurden. Diese geringere TAp53-Transkriptmenge zeigt sich auch bei den Zellen, die mit einer moderaten UVB-Dosis bestrahlt wurden, jedoch nicht mehr bei den Hochdosis-bestrahlten Zellen. Zusätzlich wird in Zellen bei einer hohen UVB-Belastung mehr TAp53 transkribiert als in Zellen ohne Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend

entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (* $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp53 mit Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.017$), Vitamin D-Behandlung $p < 0.001$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, UVB-Bestrahlung: Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 200 mJ/cm^2 UVB vs. kein UVB $p < 0.05$ ($p = 0.016$); einfakt.

ANOVA: Gruppe $p < 0.001$ Bonferroni: Kontrolle vs. Vitamin D $p < 0.05$ ($p = 0.035$), 50 mJ/cm^2 UVB vs. Vitamin D + 50 mJ/cm^2 $p < 0.01$ ($p = 0.003$), 200 mJ/cm^2 UVB vs. Vitamin D + 200 mJ/cm^2 $p > 0.05$.

Im Gegensatz zur geringfügigen Variabilität der TAp53-Transkriptmenge unter der UVB-Exposition, variierte diese jedoch eindeutig unter Vitamin D-Exposition. Die mit Vitamin D behandelten primären Keratinozyten wiesen eine niedrigere TAp53-Transkriptmenge auf als Zellen, die keine Vitamin D-Behandlung erfahren hatten (vergleiche die orangenen Balken mit den blauen Balken in Abbildung 8). Dieser Effekt ließ sich auch in den mit 50mJ/cm² UVB-Licht bestrahlten Zellen beobachten. Wurden die primären Keratinozyten hingegen mit der hohen UVB-Dosis von 200mJ/cm² bestrahlt, so konnte bei einer zusätzlichen Behandlung mit Vitamin D keine Reduktion der TAp53-Transkriptmenge mehr beobachtet werden (zweifaktorielle Varianzanalyse: Faktor Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ mit 0.001, Bonferroni-Test: keine UVB-Bestrahlung und keine Vitamin D-Behandlung (Kontrolle) vs. keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ ($p = 0.035$); 50mJ/cm² ohne Vitamin D-Behandlung vs. 50mJ/cm² + Vitamin D-Behandlung $p < 0.005$ ($p = 0.003$)).

Insgesamt zeigen die Untersuchungen zur TAp53-Transkriptmengenänderung in primären Keratinozyten also, dass Vitamin D in unbestrahlten oder moderat bestrahlten Zellen eine Verringerung der Transkriptmenge um etwa den Faktor 0.5 induzieren kann.

3.1.1.2 HaCaT-Keratinozyten: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

HaCaT-Zellen exprimieren mutiertes TAp53. Zumindest einige HaCaT-Zellpopulationen scheinen aber zudem noch ein Wildtyp-Allel zu besitzen. Das mutierte TAp53 ist zwar dominant; es bleibt aber unklar, ob und wieviel vom verbleibenden TAp53 noch Wildtyp-Funktionen beitragen kann, in dem es beispielsweise in stark geschädigten Zellen eine Apoptose induziert.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte, dass die HaCaT-Zellen auf die verschiedenen Bestrahlungsbedingungen mit signifikanten Unterschieden in der TAp53-Transkriptmenge reagieren (Abbildung 9; Faktor UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.038$); Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50mJ/cm² UVB $p > 0.05$, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.041$), 200mJ/cm² UVB vs. kein UVB $p < 0.05$ ($p = 0.018$)). Die Ergebnisse des LSD-Post-Hoc-Tests legen dabei nahe, dass HaCaT-Zellen, die einer hohen Dosis an UVB-Licht (200mJ/cm²) ausgesetzt waren, eine höhere TAp53-Transkriptmenge aufweisen als HaCaT-Zellen, die keine oder nur eine moderate UVB-Strahlendosis (50mJ/cm²) erfahren haben (LSD-Test: keine UVB-Bestrahlung vs. 200mJ/cm² UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.018$); 50mJ/cm² UVB-Bestrahlung vs. 200mJ/cm² UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.041$)).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen an primären Keratinozyten wurden in HaCaT Zellen unter Vitamin D keine signifikanten Veränderungen der TAp53-Transkriptmenge gefunden (zweifaktorielle Varianzanalyse: Faktor UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.038$), Vitamin D-

Behandlung $p > 0.05$ ($p = 0.087$), deren Interaktionsterm $p > 0.05$ ($p = 0.074$). Allerdings weist die einfaktorielle Varianzanalyse (welche signifikante Unterschiede zwischen den sechs verschiedenen Versuchsbedingungen angibt) darauf hin, dass Vitamin D die Zunahme der TAp53-Transkriptmenge unter der hohen UVB-Strahlendosis reduzieren könnte (einfaktorielle Varianzanalyse sechs Versuchsbedingungen < 0.05 ($p = 0.019$); LSD-Korrektur: 200 mJ/cm^2 UVB vs. Vitamin D + 200 mJ/cm^2 $p < 0.01$ ($p = 0.006$)).

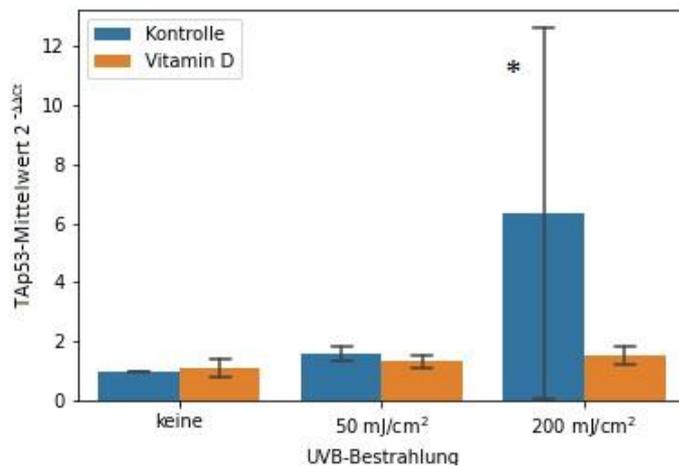


Abbildung 9: Relative TAp53-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Bei einer hohen UVB-Bestrahlung (200 mJ/cm^2) wird in HaCaT-Zellen signifikant mehr TAp53 transkribiert als bei einer moderaten und keiner UVB-Bestrahlung. Diese vermehrte TAp53-Transkriptmenge infolge einer erhöhten UVB-Dosis hebt sich auf, wenn die Zellen zuvor mit Vitamin D behandelt wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

TAp53 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.038$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$ ($p = 0.087$), deren Interaktionsterm $p > 0.05$ ($p = 0.074$), Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.041$), 200 mJ/cm^2 UVB vs. kein UVB $p < 0.05$ ($p = 0.018$); einfakt. ANOVA: Gruppe < 0.05 ($p = 0.019$), LSD: 200 mJ/cm^2 UVB vs. Vitamin D + 200 mJ/cm^2 $p < 0.01$ ($p = 0.006$).

Zusammengefasst lässt sich somit annehmen, dass unter fehlender oder moderater UVB-Bestrahlung die Vitamin D-induzierte TAp53-Transkriptmengenreduktion in primären Keratinozyten (Abbildung 8) und das Fehlen dieses Effektes in HaCaT Zellen (Abbildung 9), mit der Anwesenheit von Wildtyp-p53-Protein korrelieren könnte. Hinsichtlich der verminderten TAp53-Transkriptmenge in den mit Vitamin D-behandelten UVB-Hochdosis bestrahlten HaCaT-Zellen ließe sich diskutieren, ob eine Vitamin D-Behandlung in HaCaT-Zellen den dritten Schritt der Photokarzinogenese (die *Progression*) nicht sogar begünstigen könnte.

3.1.1.3 Plattenepithelkarzinomzellen: TAp53-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen produzieren kein funktionelles Wildtyp- oder mutiertes p53-Protein (p53^{-/-}), jedoch findet sich noch p53-Transkript [80, 107, 146].

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Effekt der UVB-Bestrahlung auf die TAp53-Transkriptmenge in den SCL-1-Zellen (Abbildung 10; $p < 0.001$). Hierbei ergab der Bonferroni-Post-Hoc-Test signifikante Unterschiede zwischen allen drei UVB-Strahlenbedingungen und deutete darauf hin, dass mit steigender UVB-Dosis auch die Menge an TAp53-Transkript zunahm (kein UVB vs. 50mJ/cm² $p < 0.05$ ($p = 0.023$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 200mJ/cm² UVB vs. kein UVB $p < 0.001$).

Im Gegensatz zu normalen Keratinozyten und HaCaT Zellen konnte in den SCL-1 Zellen kein Effekt einer Vitamin D-Behandlung auf die Transkriptmenge von TAp53 nachgewiesen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse: $p = 0.352$).

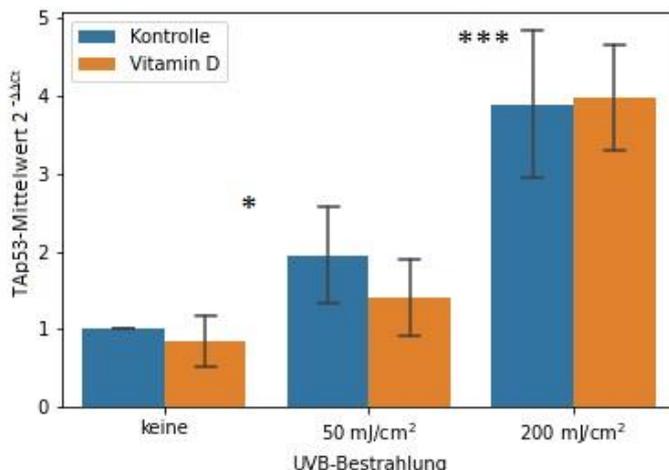


Abbildung 10: Relative TAp53-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Die TAp53-Transkriptmenge nimmt in SCL-1-Zellen mit zunehmender UVB-Bestrahlungsdosis zu, Vitamin D hat dabei keinen Einfluss auf die TAp53-Transkriptmenge. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden einfaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp53 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50mJ/cm² $p < 0.05$ ($p = 0.023$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 200mJ/cm² UVB vs. kein UVB $p < 0.001$.

Insgesamt weisen die Resultate also darauf hin, dass in primären, immortalen und transformierten Zellen der Haut die Effekte der UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Exposition auf die Expression des TAp53-Gens durch die An- oder Abwesenheit von funktionellem Wildtyp- oder mutiertem TAp53-Protein – direkt oder indirekt – beeinflusst werden können.

3.1.2 TAp53-Proteine in Keratinozyten

Im Folgenden werden zunächst die Western Blot-Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von TAp53-Protein in den verschiedenen Zelllinien dargestellt. Das Molekulargewicht von TAp53 ist abhängig von der Isoform (siehe Abbildung 4). So weist TAp53 (Vollängen-p53) ein Molekulargewicht von etwa 53 kDa auf, wohingegen $\Delta 133p53\alpha$ durch ein Molekulargewicht von nur etwa 35 kDa gekennzeichnet ist [107]. In unseren Untersuchungen wiesen wir nur TAp53 α (entspricht TAp53) nach. Das Haushaltsgen β -Actin befindet sich auf den Blots mit einem Molekulargewicht von 43 kDa unterhalb von TAp53.

3.1.2.1 Proteinmenge von TAp53 in normalen Keratinozyten nach unterschiedlicher UVB-Exposition und Vitamin D-Behandlung

TAp53 wird in ungestressten humanen Zellen kontinuierlich exprimiert und ständig über das 26S Proteasom wieder abgebaut, sodass im Regelfall nur eine geringe Menge in ungestressten Zellen vorliegt. Nach DNA-Schädigung wird TAp53 posttranslational modifiziert und dadurch stabilisiert, sodass es vermehrt in der Zelle anfällt. Wie bereits die Ergebnisse oben andeuten, ist die Menge an TAp53-*Transkript* vom Vorliegen von DNA-Schäden weitgehend unbeeinflusst.

Wie erwartet zeigte sich, dass das TAp53-Protein in primären Keratinozyten stabilisiert wird. Die Zunahme war abhängig von der UVB-Strahlendosis und unabhängig von Vitamin D (siehe Abbildung 12). Interessanterweise erfolgte die Stabilisierung in Keratinozyten im Vergleich mit anderen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten [16], erst relativ spät nach Bestrahlung (24 h).

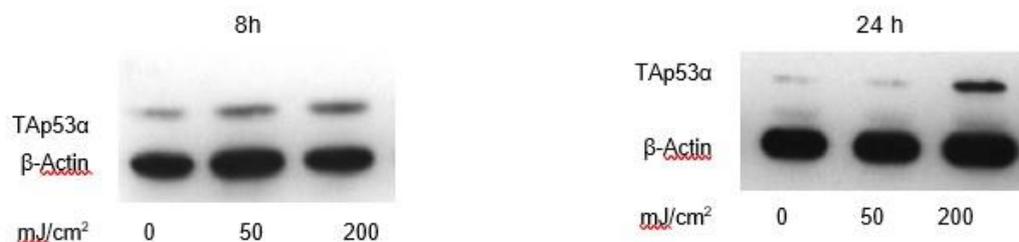


Abbildung 11: TAp53-Protein in primären Keratinozyten 8- und 24 h nach UVB-Bestrahlung

In primären Keratinozyten erfolgt die Stabilisierung von TAp53 α mit zunehmender UVB-Strahlendosis. Dies lässt sich erst 8-24 Stunden post UVB-Bestrahlung nachweisen. Die primären Keratinozyten wurden zunächst für 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1×10^{-7} M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals entweder für 8 Stunden oder für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet.

3.1.2.3 Proteinmenge von TAp53 in SCL-1-Zellen

Erwartungsgemäß exprimierten SCL-1 Zellen kein TAp53 (Abbildung 14).

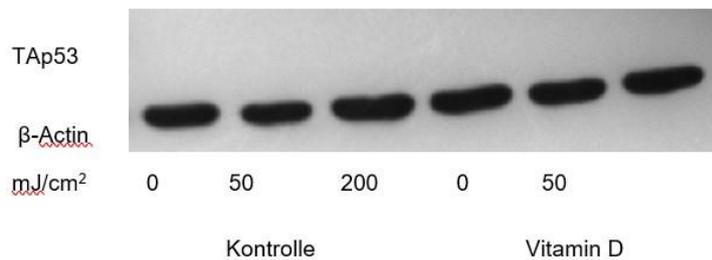


Abbildung 14: TAp53-Protein in SCL-1 Zellen nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

TAp53 wird in SCL-1 Zellen unabhängig von UVB-Bestrahlung oder Vitamin D-Behandlung nicht exprimiert. Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt.

Zusammen betrachtet lässt sich demnach schließen, dass die Mengen an TAp53-Protein in den verwendeten Hautzellen unterschiedlicher Transformation auf UVB-Licht, wie bereits in der Literatur vielfach beschrieben, reagierten. Unerwartet und bislang unbeobachtet war, dass unter einer Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ die Menge an TAp53-Protein in ungestressten primären Keratinozyten bereits früh, nach 4h, abnahm.

3.1.3 $\Delta 133p53$

3.1.3.1 Primäre Keratinozyten: $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Ähnlich wie beim Vollängen-TAp53-Protein wird auch die $\Delta 133p53$ -Expression durch ein mildes oder moderates Level an Stress induziert [51]. Studien zeigten, dass die Isoform $\Delta 133p53$ dazu in der Lage ist, die durch p53 induzierte Apoptose und den Zellzyklus-Arrest zu inhibieren [3,47]. Ähnlich wie TAp53 kann auch $\Delta 133p53$ die Transkription von TAp53 beeinflussen [3].

In primären Keratinozyten zeigte sich ein signifikanter Effekt der moderaten UVB-Strahlung (siehe Abbildung 15, zweifaktorielle Varianzanalyse: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ mit $p = 0.022$), wobei der Bonferroni-Test signifikant höhere $\Delta 133p53$ -Transkriptmengen in den moderat UVB-bestrahlten primären Keratinozyten anzeigte als in den unbestrahlten Zellen (keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.05$ ($p = 0.031$)). Vitamin D hatte keinen Einfluss auf die $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in primären Keratinozyten.

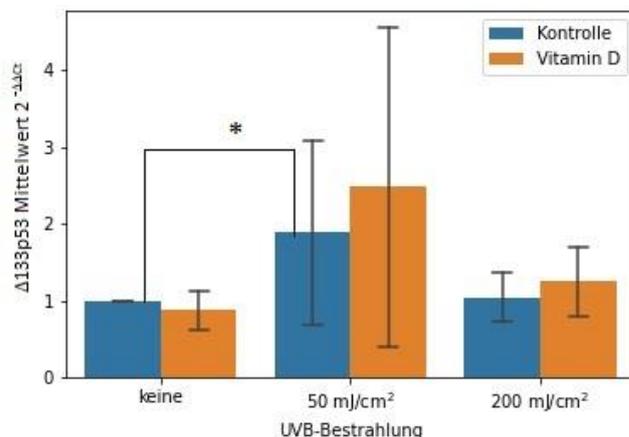


Abbildung 15: Relative $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In primären Keratinozyten lassen sich signifikant höhere $\Delta 133p53$ -Transkriptmengen in den moderat bestrahlten Keratinozyten nachweisen verglichen mit den unbestrahlten Zellen. Ein Effekt durch eine Vitamin D-Behandlung ließ sich nicht beobachten. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (* $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

$\Delta 133p53$ und Haushaltsgen Aktin: zweifaktorielle ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.022$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$; Bonferroni Post-hoc-Test: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.05$ ($p = 0.031$).

3.1.3.2 HaCaT-Zellen: $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In HaCaT Zellen konnten wir keine signifikante Beeinflussung der $\Delta 133p53$ -Transkription durch UVB-Strahlung und einer Vitamin D-Behandlung nachweisen (siehe Abbildung 16).

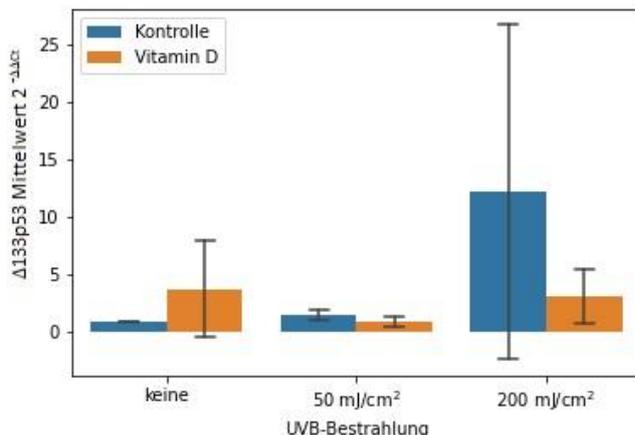


Abbildung 16: Relative $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen lässt sich keine $\Delta 133p53$ -Transkriptmengenänderung infolge unterschiedlicher UVB-Expositionen und Vitamin D-Behandlung beobachtet. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend

wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (ANOVA: * p<0.05/ ** p<0.01/ *** p<0.001; n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

$\Delta 133p53$ und Haushaltsgen Aktin: zweifaktorielle ANOVA: UVB-Bestrahlung **p>0.05**, Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**.

3.1.3.3 SCL-1-Zellen: $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte in diesem Zelltyp einen signifikanten Effekt der UVB-Bestrahlung auf die $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge (p<0.001), der mit dem Effekt auf das TAp53-Gen korrelierte (siehe zum Vergleich Abbildung 10). SCL-1-Zellen, die einer maximalen UVB-Bestrahlung (200mJ/cm²) ausgesetzt waren, enthielten signifikant mehr $\Delta 133p53$ -Transkript als moderat bzw. nicht-bestrahlte SCL-1-Zellen (Bonferroni Post-hoc-Test: kein UVB vs. 50mJ/cm² UVB p<0.05 bei p=0.023, kein UVB vs. 200mJ/cm² UVB p<0.001, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB p<0.001). Ein Effekt von Vitamin D auf die $\Delta 133p53$ -Transkription ließ sich auch hier nicht beobachtet. Unsere Ergebnisse legen damit die Vermutung nahe, dass $\Delta 133p53$ in Plattenepithelkarzinomzellen stärker transkribiert wird, wenn diese einer hohen UVB-Bestrahlungsdosis ausgesetzt wurden. Hier ähnelt das $\Delta 133p53$ -Transkriptionsverhalten dem von TAp53 in SCL-1-Zellen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse an den p53-Transkriptmengen bislang, dass UVB sowohl die Menge an TAp53- als auch an $\Delta 133p53$ -Transkript in den unterschiedlichen Zellen der Haut in Abhängigkeit von TAp53-Protein beeinflussen könnte. Vitamin D hatte in primären Keratinozyten der Haut auf das TAp53-Transkript, nicht jedoch auf das $\Delta 133p53$ -Transkript, einen eher hemmenden Einfluss.

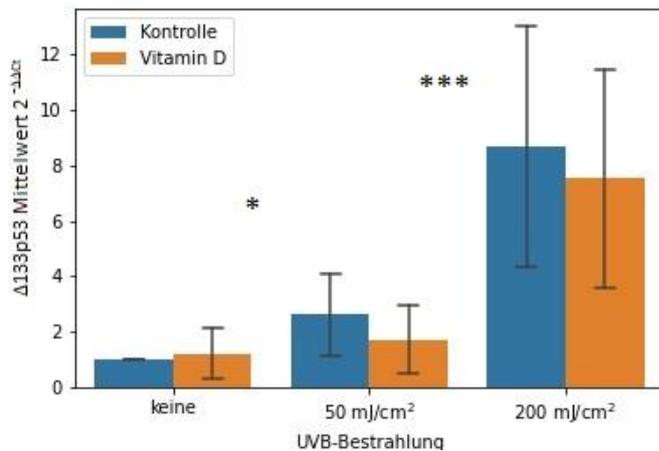


Abbildung 17: Relative $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In SCL-1-Zellen ist mit steigender UVB-Strahlendosis auch ein $\Delta 133p53$ -Transkriptmengenanstieg zu beobachten. Ein Effekt durch Vitamin D ließ sich nicht nachweisen. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} M$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm² oder 200 mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃)

$\Delta 133p53$ und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **$p < 0.001$** , Vitamin D-Behandlung **$p > 0.05$** , deren Interaktionsterm **$p > 0.05$** , Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 50 mJ/cm² UVB **$p < 0.05$** ($p = 0.023$), keine vs. 200 mJ/cm² UVB **$p < 0.001$** , 50 mJ/cm² vs. 200 mJ/cm² UVB **$p < 0.001$** .

3.1.4 TAp63

3.1.4.1 Primäre Keratinozyten: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Das p63 Gen generiert aufgrund zwei unterschiedlicher Promotoren die Protein-Isoformen TAp63 (Volllängen-p63) und Δ Np63. Während Δ Np63 ein Stammzellmarker ist und ihm eine onkogene Funktion zugeschrieben wird, scheint sich TAp63 ähnlich wie TAp53 zu verhalten, in dem es in gestressten Zellen Apoptose induzieren und den Zellzyklus kontrollieren kann [139,159].

Wir konnten zeigen, dass bei einer maximalen UVB-Strahlendosis von $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ in normalen Keratinozyten signifikant weniger TAp63 transkribiert wird als bei einer niedrigeren bzw. fehlenden UVB-Exposition (Abbildung 18; zweifaktorielle Varianzanalyse: Haupteffekt durch UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Bonferroni Post-hoc-Test: kein UVB vs. $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ $p < 0.05$ ($p = 0.016$), kein UVB vs. $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB $p < 0.001$, $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ vs. $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB $p < 0.001$). Vitamin D hatte keinen messbaren Einfluss auf die TAp63-Transkriptmenge.

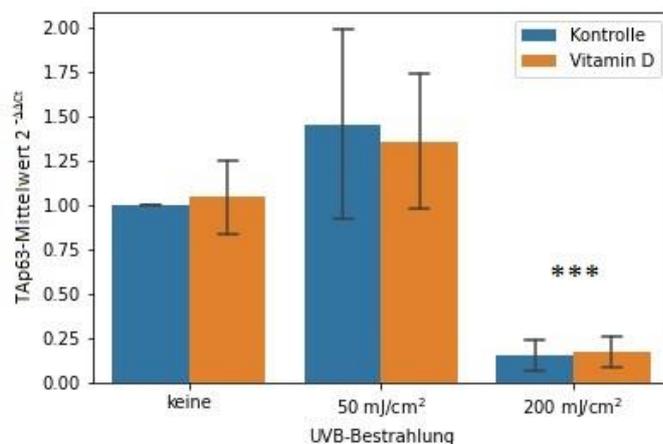


Abbildung 18: Relative TAp63-Transkriptmenge in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In primären Keratinozyten wird bei einer hohen UVB-Strahlendosis ($200\text{mJ}/\text{cm}^2$) weniger TAp63 transkribiert als in Zellen, die mit einer geringeren bzw. keiner UVB-Strahlung konfrontiert wurden. Die Vitamin D-Behandlung scheint darauf keinen Einfluss zu nehmen. Die normalen Keratinozyten wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ oder $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet. (ANOVA: *** $p < 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃)

TAp63 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ $p < 0.05$, kein UVB vs. $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB $p < 0.001$, $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ vs $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB $p < 0.001$.

3.1.4.2 HaCaT-Zellen: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Über die Transkription von TAp63 in HaCaT Zellen war nur wenig bekannt [90]. Wir beobachteten, dass eine UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung in diesen Zellen keinen messbaren Einfluss auf die TAp63-Transkriptmenge hatten.

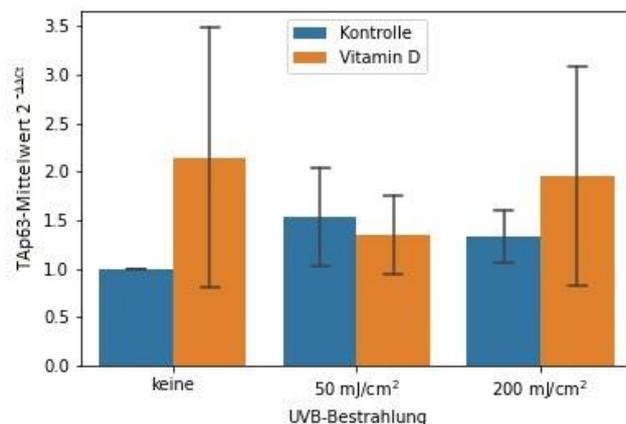


Abbildung 19: Relative TAp63-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und Vitamin D-Behandlung

Die unterschiedlichen UVB-Strahlenbedingungen haben keinen signifikanten Effekt auf die Transkriptmenge von TAp63 in HaCaT-Zellen. Die HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung

erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet. In den HaCaT-Zellen wird ungeachtet der UVB-Strahlendosis sowie der Vitamin D-Behandlung in etwa gleiche Mengen TAp63 transkribiert (n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp63 und Haushaltsgen Aktin zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$.

3.1.4.3 SCL-1-Zellen: TAp63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten UVB-Bestrahlungseffekts sowie einen Interaktionseffekt der UVB-Strahlung mit der Vitamin D-Behandlung auf die TAp63-Transkriptmenge in SCL-1-Zellen (zweifaktorielle Varianzanalyse: Haupteffekt UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.043$), Interaktionseffekt von UVB-Bestrahlung und Vitamin D $p < 0.05$ ($p = 0.028$)). Der LSD-Post-hoc-Test zeigt an, dass unbestrahlte SCL-1-Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, die höchste Menge an TAp63-Transkript aufwiesen (siehe Abbildung 20): LSD-Post-hoc-Test: Kontrolle vs. keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D $p < 0.05$ ($p = 0.011$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 50mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.012$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.038$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 50mJ/cm² + Vitamin D $p < 0.005$ ($p = 0.001$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 200mJ/cm² UVB + Vitamin D $p < 0.05$ ($p = 0.021$).

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse also, dass die Transkriptmenge an TAp63 unter UVB und Vitamin D in den verwendeten Zellen der Haut eher vom Grad der Transformation abhing.

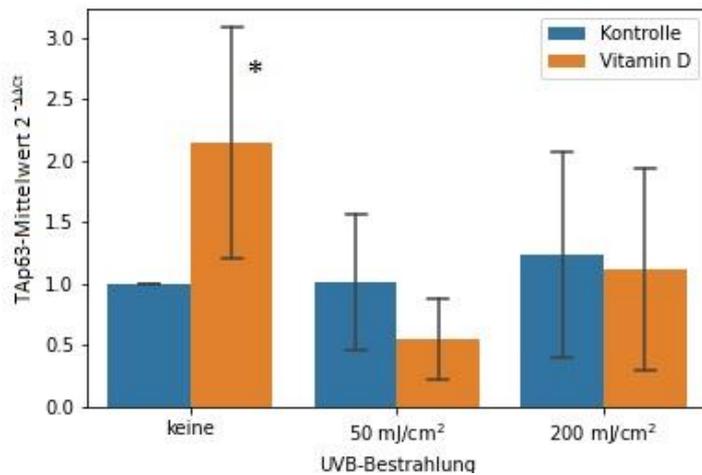


Abbildung 20: Relative TAp63-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit Vitamin D-Behandlung

Mit Vitamin D behandelte unbestrahlte SCL-1-Zelle weisen, verglichen mit allen anderen Bedingungen die höchste TAp63-Transkriptmenge auf. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden einfaktorielle Varianzanalysen berechnet. (ANOVA: * $p < 0.05$; $n=3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp63 und Haushaltsgen GAPDH zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p=0.043$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p=0.028$), ANOVA Gruppe: $p < 0.05$ ($p=0.022$), Post-hoc-Test (LSD-Korrektur): Kontrolle vs. keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D $p < 0.05$ ($p=0.011$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 50mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p=0.012$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p=0.038$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 50mJ/cm² + Vitamin D $p < 0.005$ ($p=0.001$), keine UVB-Bestrahlung + Vitamin D vs. 200mJ/cm² UVB + Vitamin D $p < 0.05$ ($p=0.021$).

3.1.5 Δ Np63

3.1.5.1 Primäre Keratinozyten: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In gesunden Keratinozyten fördert Δ Np63 die Proliferation und hemmt die Ausdifferenzierung der Zellen. Ein Überexpression von Δ Np63 kann zu einer unkontrollierten, vermehrten Proliferation führen, sodass Δ Np63 in der Literatur als potenzielles Onkogen diskutiert wird.

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalysen zeigten keine signifikanten Effekte der UVB-Bestrahlung und der Vitamin D-Behandlung auf die Δ Np63-Transkriptmenge (zweifaktorielle ANOVA mit Haupteffekt UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Kontrolle vs. Vitamin D $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

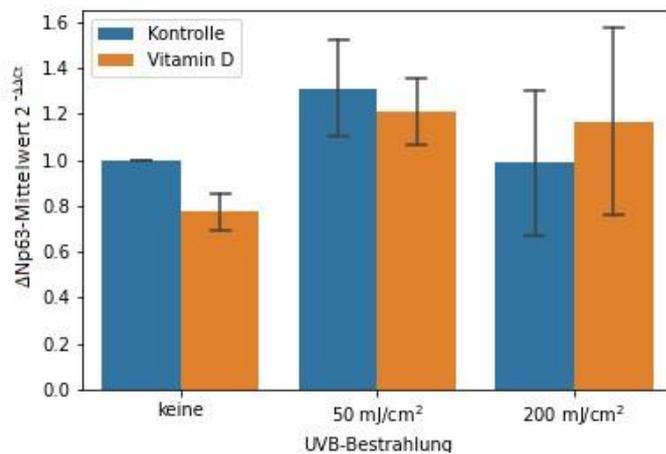


Abbildung 21: Relative Δ Np63-Transkriptmengen in NFK-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In primären Keratinozyten konnten keine Effekte der UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung nachgewiesen werden. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol behandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n=3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

Δ Np63 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Kontrolle vs. Vitamin D $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$.

3.1.5.2 HaCaT-Zellen: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse ergaben einen signifikanten Effekt der UVB-Bestrahlung auf die Δ Np63-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen. Hierbei deutet der Bonferroni Post-Hoc-Test daraufhin, dass in HaCaT-Zellen, die mit einer hohen UVB-Lichtdosis von 200mJ/cm² bestrahlt wurden, signifikant weniger Δ Np63 transkribiert wird als in Zellen, die keiner bzw. einer moderaten UVB-Strahlendosis ausgesetzt wurden (siehe Abbildung 22; zweifaktorielle Varianzanalyse mit einem Haupteffekt der UVB-Bestrahlung mit $p < 0.01$. Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² UVB $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.02$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$).

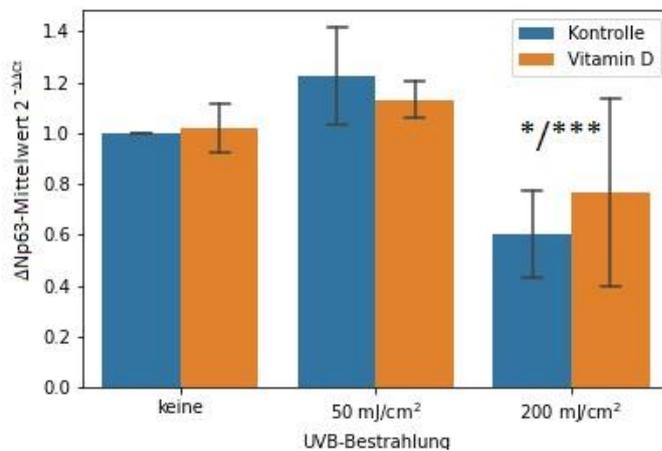


Abbildung 22: Relative Δ Np63-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

HaCaT-Zellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, weisen signifikant geringere Δ Np63-Transkriptmengen auf als Zellen, die keiner bzw. nur einer moderaten UVB-Strahlendosis ausgesetzt waren. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

Δ Np63 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Kontrolle vs. Vitamin D $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² UVB $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.02$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$.

3.1.5.3 SCL-1-Zellen: Δ Np63-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Auch in den SCL-1-Zellen zeigte sich, dass die unterschiedlichen UVB-Bedingungen zu unterschiedlich hohen Δ Np63-Transkriptmengen führten (zweifaktorielle Varianzanalyse mit einem Haupteffekt der UVB-Bestrahlung mit $p < 0.01$). Wie schon bei den HaCaT-Zellen beobachteten wir auch in diesem Zelltyp bei maximaler UVB-Bestrahlung geringere Δ Np63-Transkriptmengen als unter der fehlenden- bzw. moderaten UVB-Bestrahlungsbedingung (siehe Abbildung 23; vgl. Bonferroni-Korrekturen: kein UVB vs. 200 mJ/cm^2 $p < 0.01$ ($p = 0.007$), kein UVB vs. 200 mJ/cm^2 + Vitamin D $p < 0.01$ ($p = 0.005$), Vitamin D ohne Bestrahlung vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.008$); 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.014$); 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB + Vitamin D $p < 0.05$ ($p = 0.01$)).

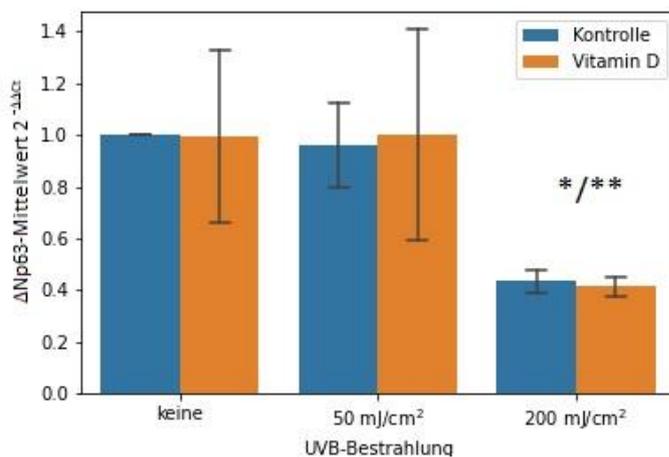


Abbildung 23: Relative Δ Np63-Transkriptmenge in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

SCL-1-Zellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, weisen niedrigere Δ Np63-Transkriptmengen auf, als solche die keine bzw. eine moderate UVB-Bestrahlung erfahren haben. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

Δ Np63 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 200 mJ/cm^2 $p < 0.01$ ($p = 0.007$), kein UVB vs. 200 mJ/cm^2 + Vitamin D $p < 0.01$ ($p = 0.005$), Vitamin D ohne Bestrahlung vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.008$); 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.014$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB + Vitamin D $p < 0.05$ mit $p = 0.01$).

Zusammengefasst beobachteten wir, dass die Δ Np63-Transkriptmengen eher nicht nach dem Grad der Transformation, sondern nach der Dosis der UVB-Strahlung reguliert wurden. Die maximale UVB-Dosis reduzierte die Menge an Δ Np63 Transkript spezifisch in den beiden Wildtyp-TAp53-negativen Zellen der Haut (HaCaT und SCL-1).

3.1.6 TAp73

3.1.6.1 TAp73 -Transkriptmenge in allen drei Zelllinien nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die Transkriptmengen an TAp73 verhielten sich in unseren Versuchsreihen in gleicher Weise wie die Mengen an Δ Np63 Transkript. In den primären Keratinozyten ließen sich keine Unterschiede in den TAp73-Transkriptmengen infolge der unterschiedlichen UVB-Bestrahlungen und Vitamin D-Behandlungen nachweisen (siehe Abbildung 24). In den HaCaT- und SCL-1 Zellen wiesen die Hochdosis-UVB-bestrahlten Zellen die geringste Menge an TAp73-Transkript auf (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den Wildtyp-p53-defizienten Zellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, ebenso wie bei Δ Np63 signifikant weniger TAp73 transkribiert wurde im Vergleich zu Zellen, die nicht oder nur mit einer moderaten UVB-Dosis bestrahlt wurden. Ein Einfluss von Vitamin D auf die Transkriptmenge von TAp73 oder Δ Np63 ließ sich nicht nachweisen.

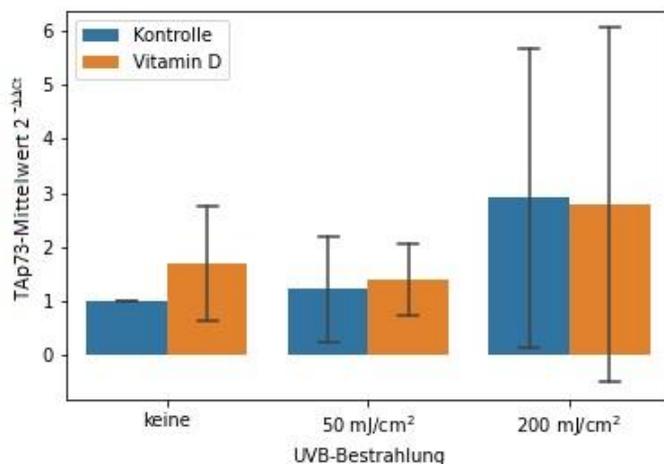


Abbildung 24: Relative TAp73-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Kein Effekt von UVB-Strahlung und Vitamin D auf die Transkriptmenge von TAp73 in primären Keratinozyten. Die Keratinozyten wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (* p<0.05/ ** p<0.01/ *** p<0.001, n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp73 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p>0.05**, Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**.

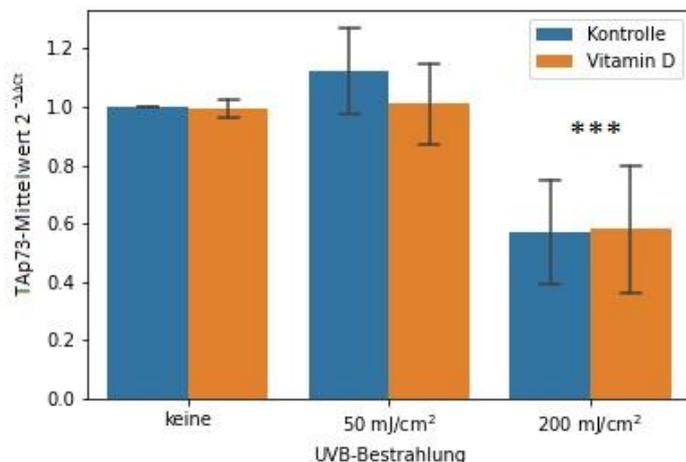


Abbildung 25: Relative TAp73-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen wird bei einer hohen UVB-Lichtdosis von 200mJ/cm² weniger TAp73 transkribiert als in Zellen ohne oder mit einer moderaten UVB-Exposition. Die HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (* p<0.05/ ** p<0.01/ *** p<0.001, n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

TAp73 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.001**, Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05** (p=0.103); Bonferroni-Korrektur: keine UVB vs. 50mJ/cm² **p>0.05**, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**, 200mJ/cm² vs. kein UVB **p<0.001**.

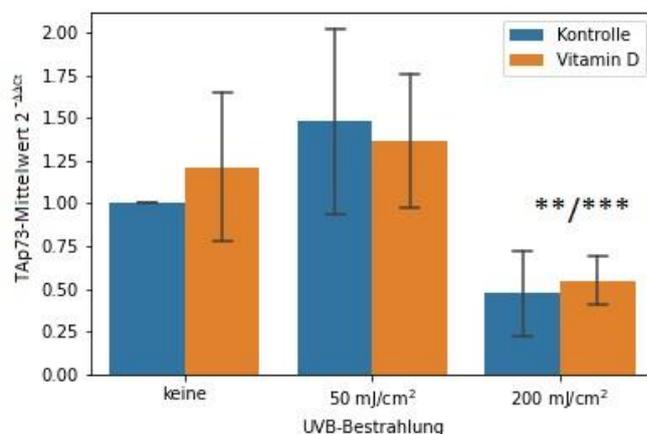


Abbildung 26: Relative TAp73-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In den SCL-1-Zellen hoher UVB-Strahlung lässt sich die geringste TAp73-Transkriptmenge unter den drei Bestrahlungsbedingungen (keine, moderate, hohe UVB-Lichtexposition) nachweisen. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden einfaktorielle Varianzanalysen berechnet. (ANOVA: * p<0.05 / ** p<0.01/ *** p<0.001; n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃)

TAp73 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.001**, Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² UVB **p>0.05**, keine vs. 200mJ/cm² **p<0.01** (p=0.002), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**.

3.1.7 Δ Np73

3.1.7.1 Np73 Transkriptmenge in HaCaT- und SCL-1-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Ähnliches wurde auch bei der Bestimmung der Δ Np73-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen gefunden: eine hohe UVB-Strahlendosis reduzierte die Menge an Δ Np73-Transkript ebenso wie zuvor schon bei TAp73 oder Δ Np63, aber wiederum nur in den HaCaT-Zellen. In den anderen Wildtyp-TAp53-defizienten SCL-1-Zellen ließ sich in den Hochdosis bestrahlten Zellen eine ähnlich hohe Δ Np73-Transkriptmenge nachweisen wie in den unbestrahlten Zellen (siehe Abbildung 28).

Die Post-hoc Tests zeigen in den Hochdosis-UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen eine signifikant geringere Δ Np73-Transkriptmenge als in HaCaT-Zellen ohne bzw. mit einer moderaten UVB-Exposition (vergleiche Abbildung 27; Bonferroni-Korrektur: kein UVB vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² $p < 0.001$; kein UVB vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$). Neben diesem UVB-Bestrahlungseffekt lässt sich in den HaCaT-Zellen auch ein Effekt der Vitamin D-Behandlung sowie deren Interaktion nachweisen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekte durch UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ ($p = 0.022$) und der Interaktion zwischen den beiden Faktoren UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ ($p = 0.043$)). Hierbei ließ sich in den unbestrahlten HaCaT-Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, eine signifikant höhere Δ Np73-Transkriptmenge nachgewiesen werden verglichen mit Zellen ohne Vitamin D-Behandlung (Bonferroni-Korrektur Kontrolle vs. Vitamin D $p < 0.01$ bei $p = 0.001$).

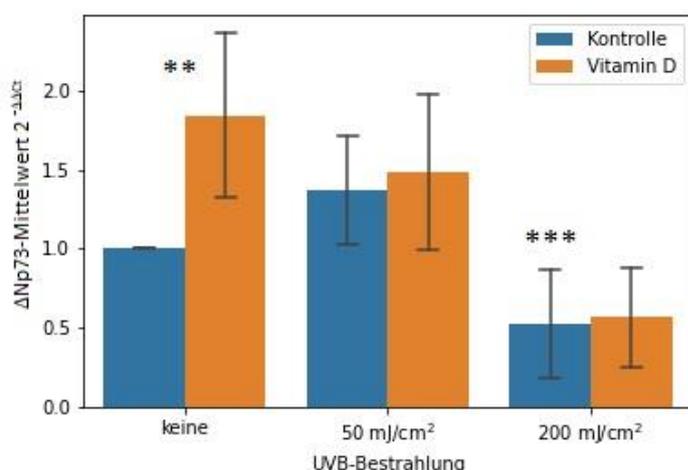


Abbildung 27: Relative Δ Np73-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung
In HaCaT-Zellen tritt in Zellen, die einer hohen UVB-Strahlendosis ausgesetzt wurden, die geringste Δ Np73-Transkriptmenge auf. Zudem weisen unbestrahlte HaCaT-Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, eine höhere Δ Np73-Transkriptmenge als Zellen ohne eine solche Behandlung. Die HaCaT-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1×10^{-7} M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder

200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$, $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

Δ Np73 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ ($p = 0.022$), deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p = 0.043$), Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$. ANOVA Gruppe: $p < 0.001$, Tests der Zwischensubjekteffekte (Bonferroni): Kontrolle vs. Vitamin D $p < 0.01$ ($p = 0.001$).

In den SCL-1-Zellen ließ sich die höchste Δ Np73-Transkriptmenge in den moderat UVB-bestrahlten Zellen nachweisen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt durch die UVB-Bestrahlung $p < 0.001$ mit Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$). Die Hochdosis-bestrahlten SCL-1-Zellen wiesen etwa gleiche Mengen an Δ Np73-Transkript auf wie die unbestrahlten Zellen.

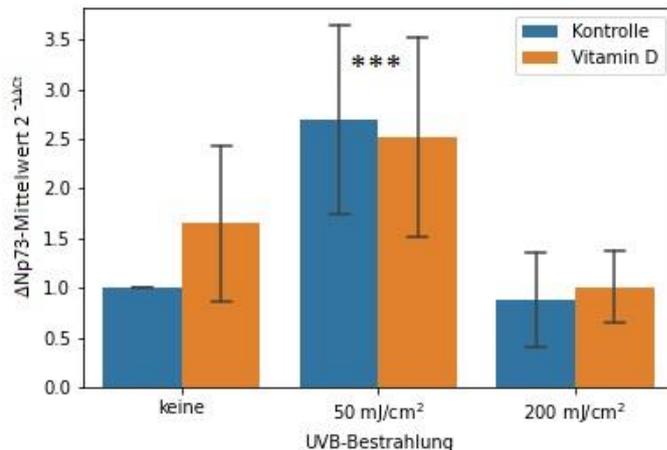


Abbildung 28: Relative Δ Np73-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

SCL-1-Zellen, die mit einer moderaten UVB-Strahlung konfrontiert wurden, weisen die höchste Δ Np73-Transkriptmenge auf. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden einfaktorielle Varianzanalysen berechnet. In den SCL-1-Zellen wird ungeachtet der UVB-Strahlendosen sowie der Vitamin D-Behandlung Δ Np73 in etwa gleichen Mengen transkribiert ($n=3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

Δ Np73 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$.

3.1.7.2 Primäre Keratinozyten: Δ Np73 Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Anders verhielten sich hingegen primäre Keratinozyten. Sie wiesen nach Bestrahlung mit einer hohen UVB-Dosis eine stark erhöhte Δ Np73-Transkriptmenge auf, während primäre Keratinozyten, die eine moderate UVB-Dosis bzw. keine UVB-Bestrahlung erfahren hatten, sich in ihren Δ Np73-Transkriptmengen nicht signifikant voneinander unterschieden (siehe Abbildung 29; einfaktorielle Varianzanalyse: Haupteffekt UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$). Eine zusätzliche Behandlung mit Vitamin D führte hierbei zu keiner signifikanten Veränderung der Δ Np73-Transkriptmengen ($p > 0.05$).

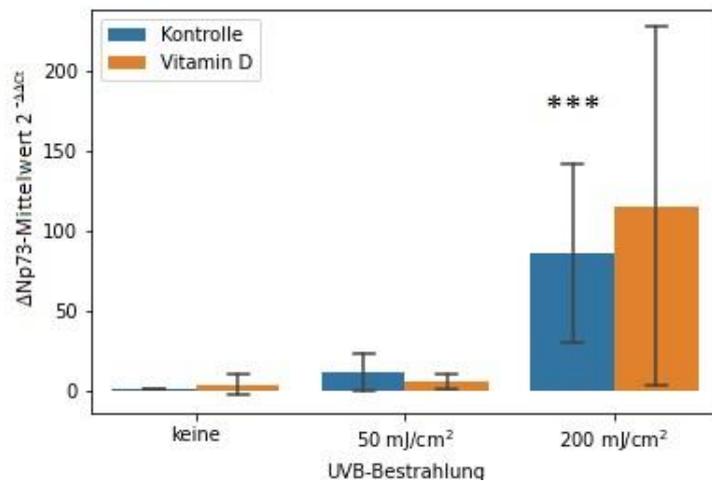


Abbildung 29: Relative $\Delta Np73$ -Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In primären Keratinozyten fällt die $\Delta Np73$ -Transkriptmenge in Zellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, sehr viel höher aus als in Zellen, die keine oder nur eine moderate UVB-Bestrahlungsdosis erfahren haben. Eine Beeinflussung der $\Delta Np73$ -Transkriptmenge durch eine Behandlung mit Vitamin D konnte nicht nachgewiesen werden. Die NFK-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} M$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm² oder 200 mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen berechnet (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$, $n=3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

$\Delta Np73$ und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm² vs 200 mJ/cm² UVB $p < 0.001$.

3.2 Transkriptmengenveränderungen im Notch-Signalweg

3.2.1 JAG1

3.2.1.1 Primäre Keratinozyten: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

JAG1 zählt ebenso wie JAG2 zu den Hauptliganden des Notch-Signalwegs, dem bei der Ausdifferenzierung von Zellen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Eine Überexpression von JAG1 wurde bei vielen verschiedenen Tumorarten festgestellt und korrelierte mit einer schlechten klinischen Prognose [138].

In der vorliegenden Studie konnten höhere JAG1-Transkriptmengen in primären Keratinozyten nachgewiesen werden, die einer hohen UVB-Bestrahlungsdosis von 200mJ/cm² ausgesetzt waren (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.006$), vergleiche Abbildung 30. Die Transkriptmenge von JAG1 in den Hochdosis-bestrahlten Zellen unterschied sich sowohl signifikant von den moderat bestrahlten (50mJ/cm²) als auch von den nicht bestrahlten primären Keratinozyten (Bonferroni-Korrektur keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.014$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.017$). Es ließen sich keine Unterschiede in den JAG1-Transkriptmengen infolge einer Vitamin D-Behandlung nachweisen.

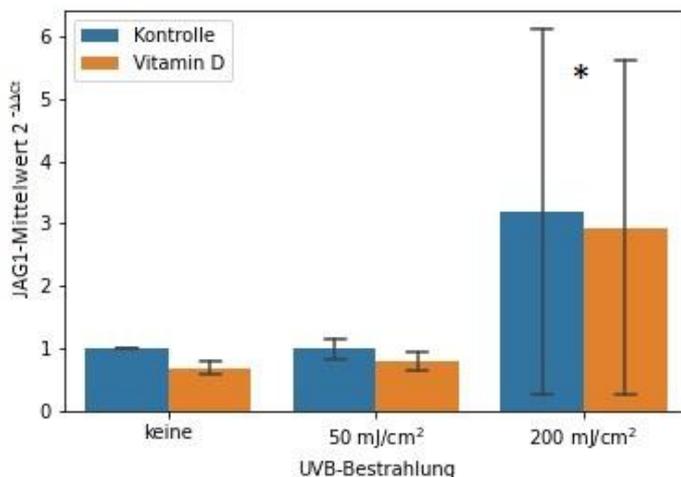


Abbildung 30: Relative JAG1-Transkriptmengen in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Primäre Keratinozyten weisen bei einer hohen UVB-Bestrahlung höhere JAG1-Transkriptmengen auf als bei einer moderaten oder keiner UVB-Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

JAG1 und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.006$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.014$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.017$).

3.2.1.2 HaCaT-Zellen: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnten Haupteffekte hinsichtlich der UVB-Exposition, der Vitamin D-Behandlung sowie dessen Interaktionsterm nachgewiesen werden (UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.001$), Vitamin D < 0.05 ($p = 0.020$); deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p = 0.014$). Hierbei zeigte der Post-hoc-Test signifikant höhere JAG1-Transkriptmengen in den HaCaT Zellen an, die mit einer moderaten UVB-Strahlendosis von 50 mJ/cm^2 bestrahlt wurden, verglichen mit den unbestrahlten Zellen (Bonferroni-Korrektur: 50 mJ/cm^2 UVB vs. Kein UVB $p < 0.01$ ($p = 0.009$), 50 mJ/cm^2 UVB vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$). Wurden die moderat UVB-exponierten Zellen zusätzlich mit Vitamin D behandelt, so ließ sich diese JAG1-Transkriptzunahme nicht mehr beobachten (Bonferroni-Korrektur: 50 mJ/cm^2 UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB + Vitamin D $p < 0.01$ ($p = 0.007$)).

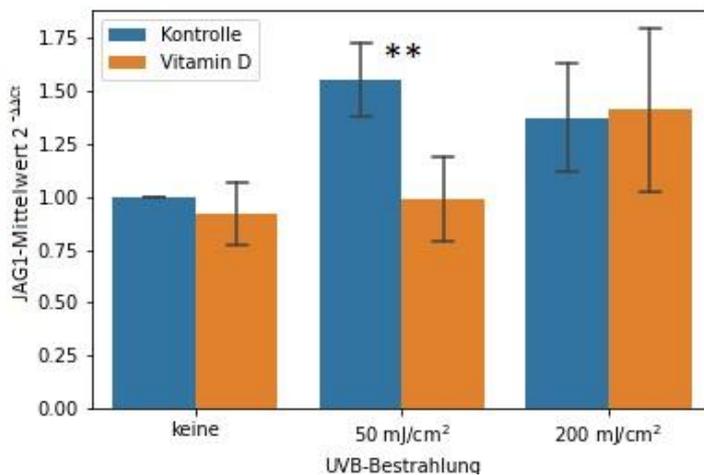


Abbildung 31: Relative JAG1-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen weisen die moderat bestrahlten Zellen signifikant höhere JAG1-Transkriptmengen auf als die unbestrahlten Zellen. Wurden diese Zellen mit Vitamin D behandelt weisen sie etwa die gleiche Menge an JAG1-Transkript auf wie die unbestrahlten Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

JAG1 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.001$), Vitamin D-Behandlung < 0.05 ($p = 0.020$) und deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p = 0.014$), Bonferroni-Korrektur: 50 mJ/cm^2 UVB vs. Kein UVB $p < 0.01$ ($p = 0.009$), 50 mJ/cm^2 UVB vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 50 mJ/cm^2 UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB + Vitamin D $p < 0.01$ ($p = 0.007$).

3.2.1.3 SCL-1-Zellen: JAG1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In den Plattenepithelkarzinomzellen konnte kein signifikanter Effekt der unterschiedlichen UVB-Expositionen und Vitamin D-Behandlung auf die Transkriptmenge von JAG1 nachgewiesen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse: UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

Zusammengefasst scheint die JAG1-Transkriptmenge in nicht-transformierten Zellen der Haut, unabhängig von der Anwesenheit von Wildtyp-TAp53, durch UVB-Bestrahlung induziert werden zu können. Die Rolle von Vitamin D ist dabei nicht eindeutig.

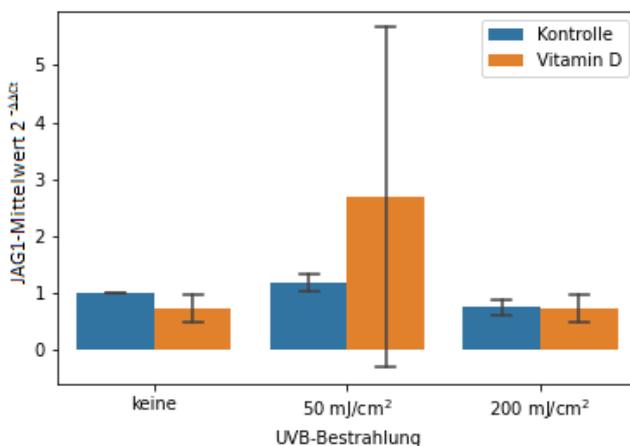


Abbildung 32: Relative JAG1-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Kein signifikanter Effekt von einer UVB-Exposition und Vitamin D-Behandlung auf die JAG1-Transkriptmenge in SCL-1-Zellen. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorieller Varianzanalysen berechnet ($n=3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃). JAG1 und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$.

3.2.2 JAG2

3.2.2.1 Primäre Keratinozyten: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die Ergebnisse bezüglich der Transkriptmenge von JAG2 in den primären Keratinozyten fallen ähnlich die die Ergebnisse zu den Transkriptmenge von JAG1 aus. Auch hier konnte in den Hochdosis-bestrahlten primären Keratinozyten die höchste JAG2-Transkriptmenge nachgewiesen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.034$)), siehe Abbildung 33.

Die JAG2-Transkriptmenge in den Hochdosis-bestrahlten Zellen unterschied sich auch hier signifikant sowohl von den moderat bestrahlten (50 mJ/cm^2) als auch von den nicht bestrahlten primären Keratinozyten (LSD-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.023$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.024$)).

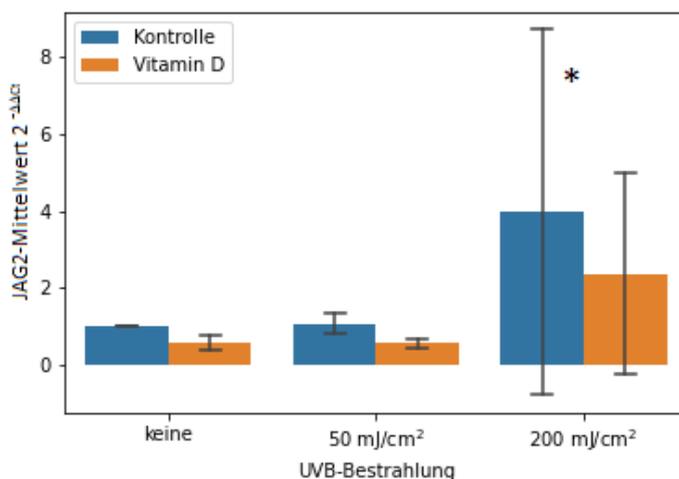


Abbildung 33: Relative JAG2-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Primäre Keratinozyten weisen infolge einer hohen UVB-Bestrahlung höhere JAG2-Transkriptmengen auf als Zellen, die einer moderaten oder keiner UVB-Bestrahlung ausgesetzt waren. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

JAG2 und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p = 0.034$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, LSD-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.023$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.024$)).

3.2.2.2 HaCaT-Zellen: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Gegensätzlich zu den Ergebnissen der primären Keratinozyten fällt in den HaCaT Zellen die JAG2-Transkriptmenge bei einer maximalen UVB-Strahlenexposition signifikant geringer aus als in den Zellen, die einer moderaten bzw. keiner UVB-Strahlung ausgesetzt waren (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$ und Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$).

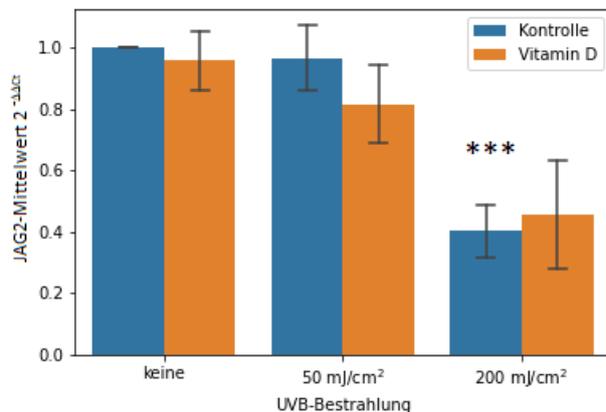


Abbildung 34: Relative JAG2-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen, die mit einer hohen UVB-Strahlendosis konfrontiert wurden, konnten signifikant geringere Mengen an JAG2-Transkript nachgewiesen werden als in Zellen, die einer moderaten bzw. keiner UVB-Exposition ausgesetzt waren. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n=3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

JAG2 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$.

3.2.2.3 SCL-1-Zellen: JAG2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Auch in den Plattenepithelkarzinomzellen ließ sich eine signifikante Reduktion der Transkriptmenge unter UVB-Bestrahlung ausmachen; ein Einfluss von Vitamin D auf die Transkriptmenge von JAG2 konnte auch in dieser Zelllinie nicht nachgewiesen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse UVB-Bestrahlung $p < 0.05$ ($p=0.017$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$), deren Interaktionsterm $p > 0.05$). Auch hier wurde in den Zellen, die einer hohen UVB-Bestrahlung (200 mJ/cm^2) ausgesetzt worden waren, eine geringere JAG2-Transkriptmenge beobachtbar, verglichen zu den moderat UVB-bestrahlten Zellen (siehe Abbildung 35).

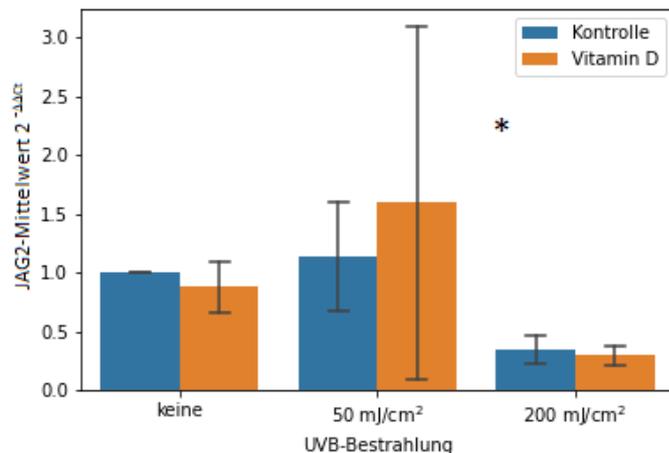


Abbildung 35: Relative JAG2 Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

SCL-1-Zellen, die mit einer hohen UVB-Strahlungsdosis konfrontiert wurden, weisen eine geringere JAG2-Transkriptmenge auf als solche die mit einer moderaten UVB-Dosis bestrahlt wurden. Kein Effekt Vitamin D auf die Transkriptmenge von JAG2 in Plattenepithelkarzinomzellen. Die SCL-1-Zellen wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorieller Varianzanalysen berechnet. In den Plattenepithelkarzinomzellen wird ungeachtet der UVB-Strahlendosen sowie der Vitamin D-Behandlung JAG2 in etwa gleichen Mengen transkribiert (n=3; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

JAG2 und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.05** (p=0.017), Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² p>0.05, keine vs. 200mJ/cm² UVB p>0.05, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.05** (p=0.016).

Insgesamt zeigte sich also, dass die JAG2-Transkriptmengen nach UVB-Bestrahlung reduziert waren, wenn die Zellen immortal oder transformiert waren und keinen Wildtyp-TAp53 mehr exprimierten. Primäre Keratinozyten hingegen reagierten nahezu spiegelbildlich.

3.2.3 NOTCH1

3.2.3.1 Primäre Keratinozyten: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Die NOTCH1-Transkriptmengen in primären Keratinozyten ließen sich durch die unterschiedlichen UVB-Bestrahlungs- und Vitamin D-Behandlungsbedingungen beeinflussen. Nach einer hohen UVB-Lichtdosis zeigten sich dezent, jedoch signifikant höhere Mengen an NOTCH1-Transkript im Vergleich zu unbestrahlten bzw. moderat-bestrahlten Zellen.

Zudem wiesen unbestrahlte Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, geringere NOTCH1-Transkriptmengen auf als solche, die keine Vitamin D-Behandlung erhalten haben, wie schon bei TAp53 (siehe Abbildung 8). Dieser Unterschied verschwand bei moderaten oder hohen UVB-Lichtdosen (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.01$ ($p = 0.003$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.034$), Vitamin D vs. Kontrolle: $p < 0.05$ ($p = 0.044$).

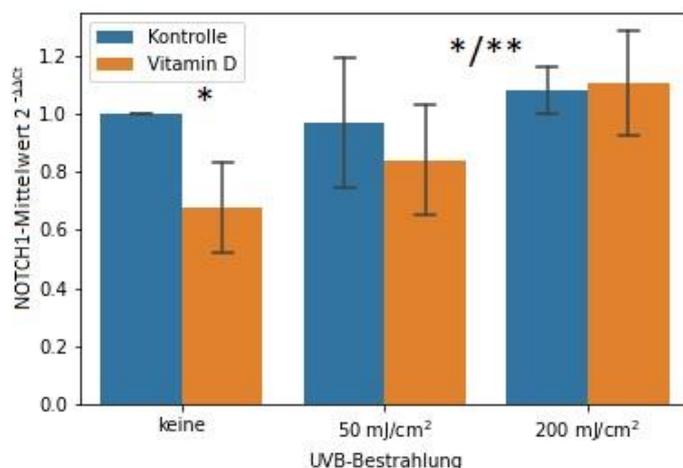


Abbildung 36: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Hochdosis bestrahlte primäre Keratinozyten weisen höhere NOTCH1-Transkriptmengen auf als nicht bzw. moderat bestrahlte Zellen. Nicht UVB-bestrahlte primäre Keratinozyten, die mit Vitamin D behandelt wurden, weisen eine geringere NOTCH1-Transkriptmenge auf als unbehandelte Keratinozyten. In Zellen, die einer moderaten- oder hohen UVB-Lichtdosis ausgesetzt waren, kann durch eine zusätzliche Vitamin D-Behandlung keine Reduktion der NOTCH1-Transkriptmenge nachgewiesen werden. Die normalen Keratinozyten wurden 24 Stunden mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1x10⁻⁷M) oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorieller Varianzanalysen berechnet (* $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ /*** $p < 0.001$; $n = 3$; Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

NOTCH1 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.003$), Vitamin D-Behandlung $p < 0.05$ ($p = 0.019$), deren Interaktionsterm $p > 0.05$. Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.01$ ($p = 0.003$), 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.05$ ($p = 0.034$), Vitamin D vs Kontrolle $p < 0.05$ ($p = 0.044$).

3.2.3.2 HaCaT-Zellen: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In den HaCaT-Zellen ließ sich ebenfalls ein signifikanter Effekt der UVB-Bestrahlung ausmachen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$ Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

HaCaT Zellen, die einer hohen UVB-Bestrahlung ausgesetzt worden waren, enthielten eine höhere NOTCH1-Transkriptmenge als solche, die nicht bzw. nur mit einer moderaten UVB-Dosis konfrontiert worden waren, vergleiche hierzu Abbildung 37 (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den NOTCH1-Transkriptmengen nach Vitamin D-Behandlung nachweisen.

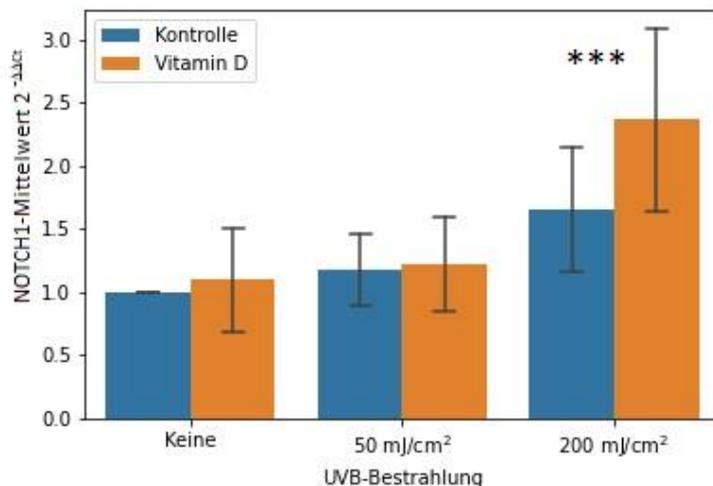


Abbildung 37: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen wird mehr NOTCH1 transkribiert, wenn die Zellen mit einer hohen UVB-Lichtdosis bestrahlt wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n=3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃). NOTCH1 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$.

3.2.3.3 SCL-1: NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In Plattenepithelkarzinomzellen, die einer moderaten UVB-Lichtdosis ausgesetzt waren, zeigte sich eine signifikant höhere NOTCH1-Transkriptmenge als in Zellen, die einer hohen UVB-Bestrahlung exponiert waren (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² p>0.05, keine vs. 200mJ/cm² UVB p>0.05, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB p<0.01 (p=0.005)). Ein Effekt einer Vitamin D-Behandlung auf die NOTCH1-Transkriptmenge ließ sich auch hier nicht nachweisen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung p<0.01 (p=0.006) Vitamin D-Behandlung p>0.05, deren Interaktionsterm p>0.05).

Die Regulation der NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung war also ebenfalls abhängig von Zustand der Transformation des Hautzelltyps. Vitamin D-Gabe hatte auch hier keine signifikante Auswirkung.

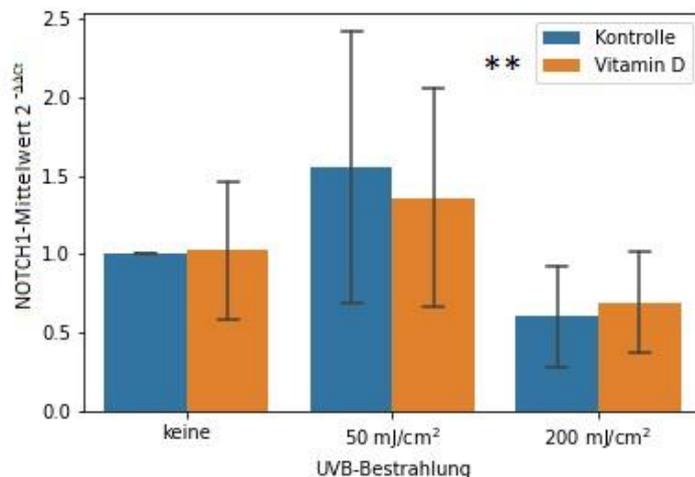


Abbildung 38: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In SCL-1-Zellen ist bei einer moderaten UVB-Bestrahlung eine höhere NOTCH1-Transkriptmenge nachweisbar als in den Hochdosis-bestrahlten Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * p<0.05 / ** p<0.01/ *** p=0.001; n=3, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

NOTCH1 und Haushaltsgen GAPDH: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.01** (p=0.006), Vitamin D-Behandlung **p>0.05** (p=0.885), deren Interaktionsterm **p>0.05** (p=0.0811), Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² **p>0.05**, keine vs. 200mJ/cm² UVB **p>0.05**, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.01** (p=0.005).

3.2.4 NOTCH2

3.2.4.1 Primäre Keratinozyten: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

NOTCH2 gehört, ebenso wie NOTCH1, zu den Rezeptoren des Notch-Signalwegs. Auch in Bezug auf die NOTCH2-Transkriptmenge konnten wir einen signifikanten Einfluss der UVB-Strahlung in primären Keratinozyten beobachten. Eine Beeinflussung der NOTCH2-Transkriptmenge durch eine Behandlung mit Vitamin D konnte wiederum nicht nachgewiesen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

Unsere Resultate ergaben signifikant höhere NOTCH2-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten, die mit einer hohen UVB-Strahlenexposition (200 mJ/cm^2) konfrontiert wurden, verglichen mit Zellen, die keiner oder einer moderaten UVB-Strahlendosis ausgesetzt worden waren, vergleiche Abbildung 39 (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$).

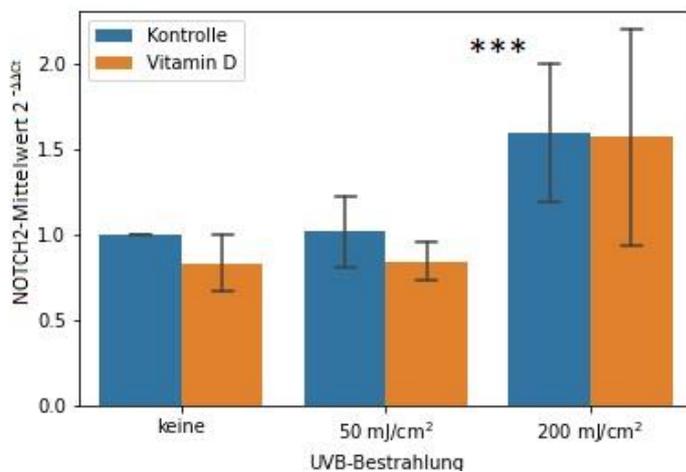


Abbildung 39: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Bei einer hohen UVB-Strahlendosis mit 200 mJ/cm^2 zeigen sich in normalen Keratinozyten die NOTCH2-Transkriptmengen signifikant höher, verglichen mit den unbestrahlten und moderat bestrahlten Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n=3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

NOTCH2 und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$.

3.2.4.2 HaCaT-Zellen: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In HaCaT Zellen zeigte sich ein signifikanter Effekt sowohl der UVB-Strahlung auf die NOTCH2-Transkriptmenge als auch ein Interaktionseffekt von Vitamin D und UVB-Strahlung (zweifaktorielle Varianzanalyse, Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.006$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p = 0.039$)).

Hierbei weisen HaCaT-Zellen, die mit UVB-Licht bestrahlt wurden, signifikant höhere Mengen an NOTCH2-Transkript auf als unbestrahlten Zellen (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.05$ ($p = 0.02$), keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.013$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$). Der Interaktionseffekt zwischen der UVB-Bestrahlung und der Vitamin D-Behandlung zeigt an, dass HaCaT-Zellen die einer moderaten UVB-Lichtdosis von 50 mJ/cm^2 UVB ausgesetzt waren und zusätzlich mit Vitamin D behandelt wurden, signifikant geringere Mengen an NOTCH2-Transkript aufweisen als Zellen, die keine zusätzliche Vitamin D-Behandlung erfahren haben (Bonferroni-Korrektur: Vitamin D + 50 mJ/cm^2 UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.039$)).

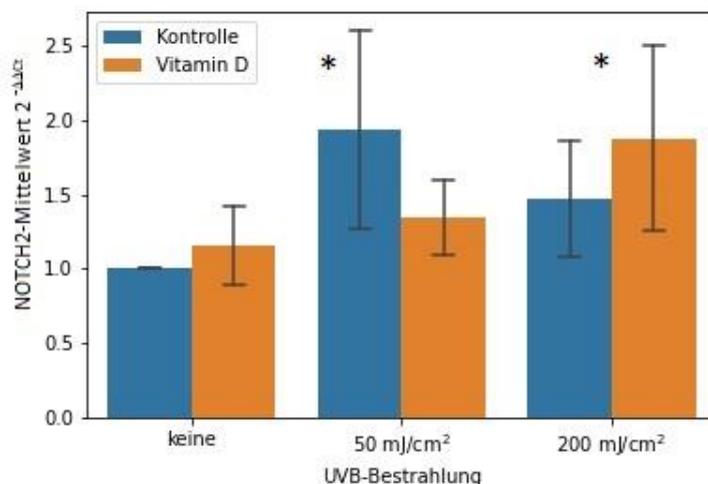


Abbildung 40: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen zeigt sich in UVB-bestrahlten Zellen eine signifikant höhere Menge an NOTCH2-Transkript als in Zellen ohne Bestrahlung. Ferner fällt die NOTCH2-Transkriptmenge in der moderaten UVB-Expositionsbedingung geringer aus, wenn die Zellen zusätzlich mit Vitamin D behandelt wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

NOTCH2 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.006$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$ ($p = 0.966$), deren Interaktionsterm $p < 0.05$ ($p = 0.039$); Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p < 0.05$ ($p = 0.02$), keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.013$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$; Vitamin D + 50 mJ/cm^2 UVB vs. 50 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.039$)).

3.2.4.3 SCL-1-Zellen: NOTCH2-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In Plattenepithelkarzinomzellen ließ sich ebenfalls ein signifikanter Effekt der UVB-Strahlung auf die NOTCH2-Transkriptmenge nachweisen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

Nach einer moderaten UVB-Strahlendosis (50 mJ/cm^2) beobachteten wir in SCL-1-Zellen höhere NOTCH2-Transkriptmengen als in Zellen, die mit einer hohen bzw. keiner UVB-Bestrahlung konfrontiert wurden. Zudem lag in Hochdosis-bestrahlten Zellen eine geringere NOTCH2-Transkriptmenge vor als in Zellen, die keine UVB-Bestrahlung erfahren hatten (Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$ ($p = 0.12$), keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.009$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$).

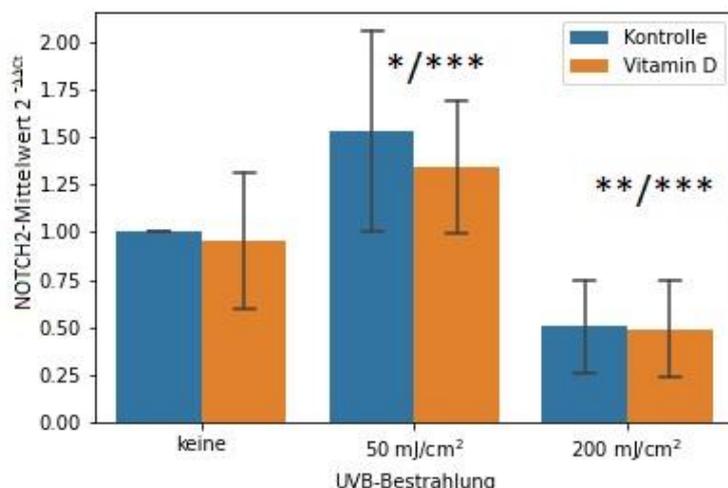


Abbildung 41: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In Plattenepithelkarzinomzellen liegt die höchste NOTCH2-Transkriptmenge in den moderat bestrahlten SCL-1-Zellen vor und die geringste NOTCH2-Transkriptmenge in den Hochdosis-bestrahlten Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3).

NOTCH2 und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$. Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$ ($p = 0.12$), keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.009$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$.

Zusammengenommen fiel bei allen Untersuchungen zu den Transkriptmengen von NOTCH1 und 2 auf, dass in transformierten SCL-1 Zellen ohne TAp53, hohe UVB-Dosen eher zu einer Transkriptmengenreduktion führten. Die Effekte von Vitamin D auf die gemessenen Transkriptmengen waren marginal. Letzteres hätte auch an Veränderungen oder Fehlen der Expression des Vitamin D-Rezeptors oder seines Interaktionspartners $\text{RXR}\alpha$ in den jeweiligen Zellen liegen können.

3.3 Transkriptmengenänderungen im Vitamin D-Rezeptor (VDR) und RXR- α

3.3.1 VDR

3.3.1.1 Primäre Keratinozyten: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In normalen Keratinozyten, die einer hohen UVB-Lichtexposition ausgesetzt worden waren, wurde eine signifikant höhere VDR-Transkriptmenge gemessen als in den moderat bzw. nicht-bestrahlten Zellen (siehe Abbildung 42). Ein Effekt der Vitamin D-Behandlung auf die Transkriptmenge von VDR konnte jedoch nicht beobachtet werden (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.003$)).

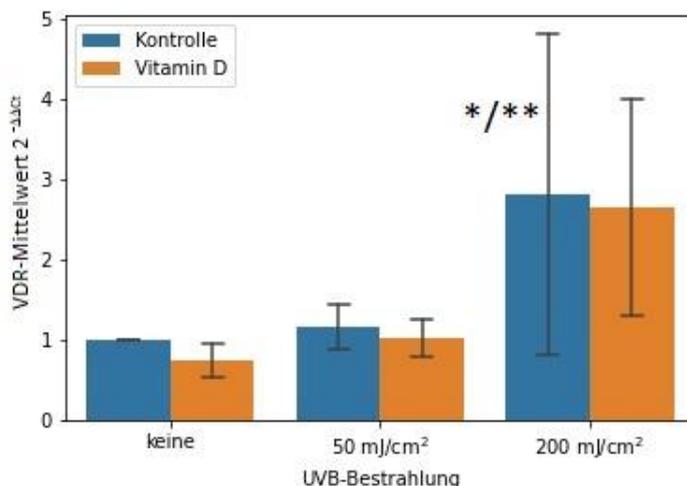


Abbildung 42: Relative VDR-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In normalen Keratinozyten fällt infolge einer hohen UVB-Bestrahlung mehr VDR-Transkriptmenge an als in den nicht- bzw. moderat UVB-bestrahlten Zellen. Eine Vitamin D-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von VDR. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃)

VDR und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$ ($p = 0.606$), deren Interaktionsterm $p > 0.05$ ($p = 0.993$), Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.001$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.003$).

3.3.1.2 HaCaT-Zellen: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Es wurde auch hier eine signifikant höhere VDR-Transkriptmengen in den bestrahlten Zellen als in den unbestrahlten Zellen nachgewiesen (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.007$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$).

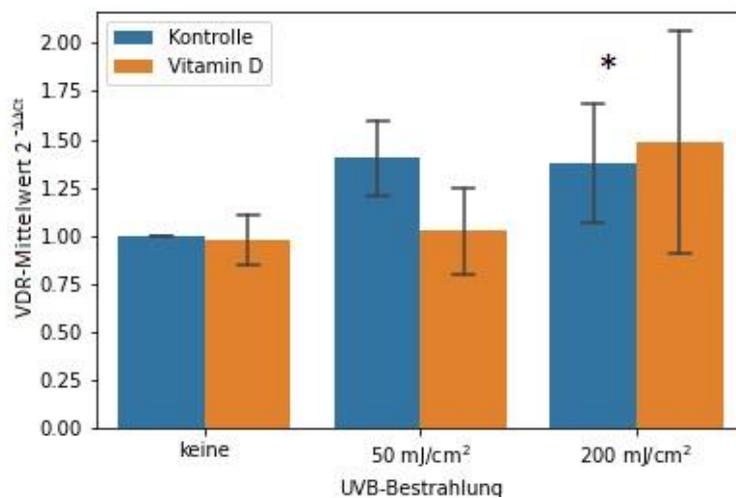


Abbildung 43: Relative VDR-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen ließen sich in den Hochdosis-bestrahlten Zellen höhere VDR-Transkriptmengen nachweisen als in den unbestrahlten Zellen. Eine Vitamin D-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Transkriptmenge von VDR. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50 mJ/cm^2 oder 200 mJ/cm^2 UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p < 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃). VDR und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.05$ ($p = 0.007$), 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$.

3.3.1.3 SCL-1-Zellen: VDR-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In Plattenepithelkarzinomzellen war nur nach einer moderaten UVB-Exposition mehr VDR-Transkript nachweisbar als in den unbestrahlten Zellen. Eine Vitamin D-Behandlung hatte auch hier keinen Effekt auf die VDR-Transkriptmenge (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.01$ ($p = 0.005$), Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50 mJ/cm^2 $p > 0.05$, keine vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p > 0.05$, 50 mJ/cm^2 vs. 200 mJ/cm^2 UVB $p < 0.01$ ($p = 0.005$)).

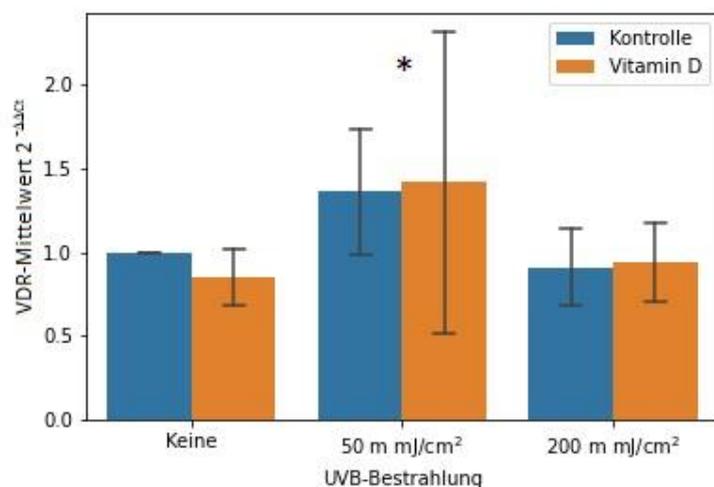


Abbildung 44: Relative VDR-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In Plattenepithelkarzinomzellen lässt sich in moderat bestrahlten Zellen eine höhere VDR-Transkriptmenge nachweisen als in hoch-UVB-bestrahlten Zellen. Ein Einfluss der Vitamin D-Behandlung auf die VDR-Transkriptmenge konnte nicht nachgewiesen werden. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * p<0.05 / ** p<0.01/ *** p=0.001; n=3, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

VDR und Haushaltsgen 18S: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.01** (p=0.005), Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**; Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² **p>0.05**, keine vs. 200mJ/cm² UVB **p>0.05**, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.01** (p=0.005).

Insgesamt reagierten die primären Keratinozyten mit einer deutlichen Zunahme der VDR-Transkriptmenge unter Hochdosis-UVB-Bestrahlung und die HaCaT-Keratinozyten mit einer dezenteren VDR-Transkriptmengenzunahme. Dies führte allerdings nicht zu einer entsprechenden Verstärkung der verschiedenen, oben untersuchten Vitamin D-Antworten primärer Keratinozyten nach Hochdosis-UVB-Exposition.

3.3.2 RXR- α

3.3.2.1 Primäre Keratinozyten: Kein Effekt von UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung auf die RXR- α -Transkriptmenge

In primären Keratinozyten führten weder die unterschiedlichen UVB-Bestrahlungen noch eine Vitamin D-Behandlung zu signifikanten Unterschieden in der RXR- α -Transkriptmenge (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$).

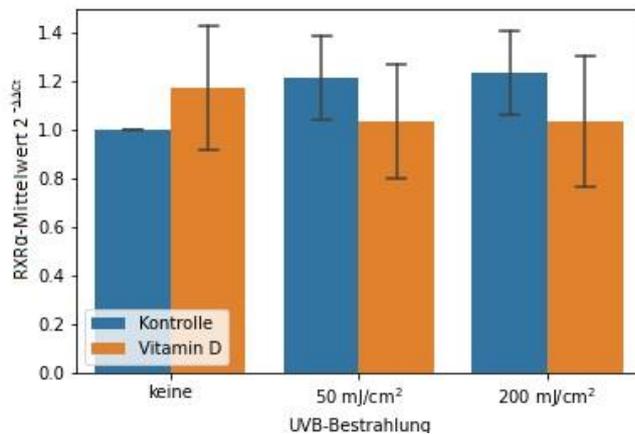


Abbildung 45: Relative RXR- α -Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

In primären Keratinozyten hat weder eine UVB-Bestrahlung noch eine Vitamin D-Behandlung einen Einfluss auf die Transkriptmenge von RXR- α . Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen. (ANOVA: * $p < 0.05$ / ** $p < 0.01$ / *** $p = 0.001$; $n = 3$, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

VDR und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung $p > 0.05$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$.

3.3.2.2 HaCaT-Zellen: RXR- α -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

In HaCaT-Zellen, die mit einer hohen UVB-Lichtdosis von 200mJ/cm² bestrahlt wurden, konnte eine signifikant geringere Menge an RXR- α -Transkript beobachtet werden als in Zellen, die eine moderate bzw. keine UVB-Bestrahlung erfahren hatten (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung $p < 0.001$, Vitamin D-Behandlung $p > 0.05$, deren Interaktionsterm $p > 0.05$, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² $p > 0.05$, keine vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB $p < 0.001$), siehe Abbildung 46.

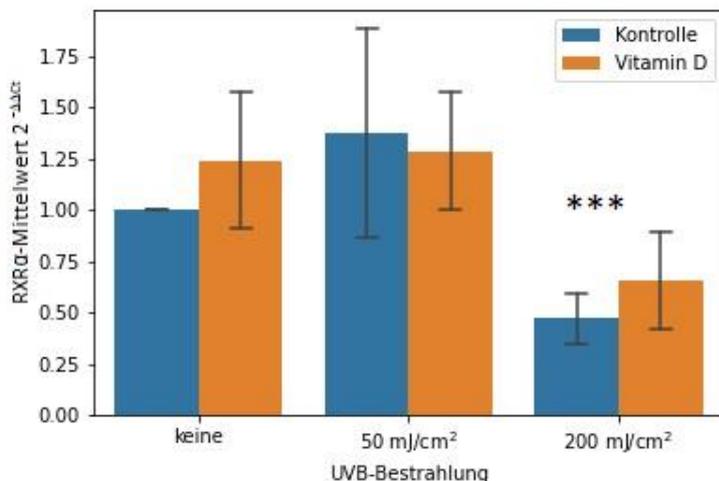


Abbildung 46: Relative RXR- α -Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Werden die HaCaT-Zellen mit einer hohen UVB-Lichtdosis von 200mJ/cm² bestrahlt, so weisen diese Zellen signifikant geringere RXR- α -Transkriptmengen auf als Zellen, die eine moderate oder keine UVB-Exposition erhalten haben. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * p<0.05 / ** p<0.01/ *** p=0.001; n=3, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃).

RXR- α und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.001**, Vitamin D-Behandlung **p>0.05**, deren Interaktionsterm **p>0.05**, Bonferroni-Korrektur: Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² **p>0.05**, keine vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**).

3.3.2.3 SCL-1-Zellen: RXR- α -Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung

Wie in den HaCaT Zellen konnten wir auch in den SCL-1 Plattenepithelkarzinomzellen bei einer hohen UVB-Strahlendosis eine geringere RXR- α -Transkriptmenge nachweisen als in SCL-1, die nicht- beziehungsweise mit einer moderaten UVB-Lichtdosis bestrahlt wurden (vergleiche Abbildung 47). Zudem zeigen SCL-1-Zellen, die keiner UVB-Exposition ausgesetzt waren, aber mit Vitamin D behandelt wurden, höhere RXR- α -Transkriptmengen als die unbestrahlten Zellen ohne Vitamin D-Behandlung (zweifaktorielle Varianzanalyse mit Haupteffekt von UVB-Bestrahlung p<0.001, Vitamin D-Behandlung p<0.001, deren Interaktionsterm p>0.001, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² p>0.05, keine vs. 200mJ/cm² UVB p<0.001, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB p<0.001, Kontrolle vs. Vitamin D p<0.001).

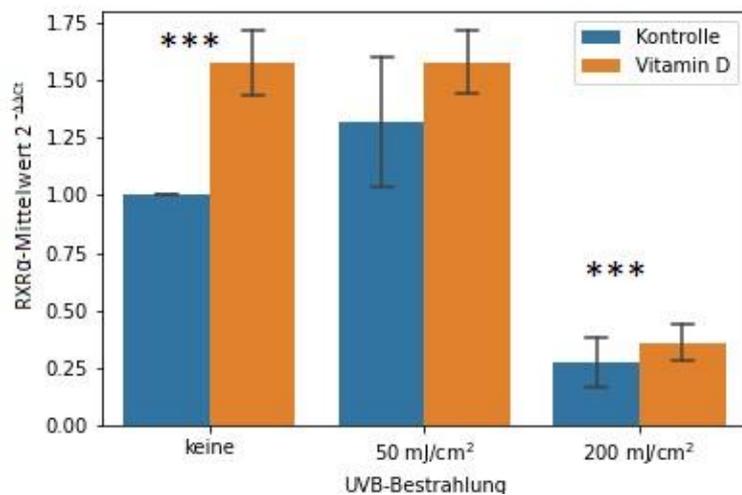


Abbildung 47: Relative RXR- α -Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung

Plattenepithelkarzinomzellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, weisen eine geringere RXR- α -Transkriptmenge auf als Zellen, die nicht bzw. mit einer moderaten UVB-Dosen bestrahlt wurden. Zudem wird in unbestrahlten SCL-1-Zellen, die mit Vitamin D behandelt wurden, eine höhere Menge an RXR- α -Transkript gemessen als in den unbehandelten Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit Vitamin D oder Ethanol vorbehandelt und anschließend entweder nicht bestrahlt oder einmalig mit 50mJ/cm² oder 200mJ/cm² UVB-Licht bestrahlt. Das Medium (einschließlich Vitamin D bzw. Ethanol) wurde nach der Bestrahlung erneuert, anschließend wurden die Zellen nochmals für 24 Stunden bebrütet und danach geerntet. Zur Signifikanzprüfung wurden ein- und zweifaktorielle Varianzanalysen vorgenommen (ANOVA: * p<0.05 / ** p<0.01/ *** p=0.001; n=3, Kontrolle: Ethanol, Vitamin D: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃). RXR- α und Haushaltsgen Aktin: zweifakt. ANOVA: UVB-Bestrahlung **p<0.001**, Vitamin D-Behandlung **p<0.001** (p=0.028), deren Interaktionsterm **p<0.001**, Bonferroni-Korrektur: keine vs. 50mJ/cm² **p>0.05**, keine vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**, 50mJ/cm² vs. 200mJ/cm² UVB **p<0.001**, Kontrolle vs. Vitamin D **p<0.001**).

Zusammengefasst induzierten also hohe UVB-Dosen in Wildtyp-TAp53-defizienten, immortalen oder transformierten SCL-1 Hautzellen, nicht aber in primären Keratinozyten, eine Reduktion der RXR α Transkriptmenge. Ähnliche Effekte wurden an den Transkriptmengen von TAp63, Δ Np63, JAG2, NOTCH1 und NOTCH2, nicht aber von TAp53, Δ 133p53 oder JAG1, beobachtet. Vitamin D hatte nur marginale und sehr variable Effekte, die nicht mit der Expression des Vitamin D-Rezeptors oder seines Interaktionspartners RXR α korrelierten.

3.4 Übersicht über gleichgerichtete und gegenläufige Effekte der UVB-Bestrahlung und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung auf die Transkriptmengen in den drei Zelllinien

In den drei verschiedenen Zelllinien (primäre Keratinozyten, HaCaT- und SCL-1-Zellen) ließen sich infolge der unterschiedlichen Versuchsbedingungen teilweise gleichgerichtete und teilweise gegensätzliche Effekte auf die jeweiligen Transkriptmengen beobachten.

3.4.1 Effekte der 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung auf die Transkriptmengen

Die Effekte der 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung fiel in den verschiedenen Zelllinien sowie Genen unterschiedlich aus. In unbestrahlten primären Keratinozyten, die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden, konnten wir sowohl eine Abnahme der TAp53- als auch der NOTCH1-Transkriptmenge beobachten (vergleiche Abbildung 8 und Abbildung 36). Zudem wurde auch in den moderat UVB-bestrahlten primären Keratinozyten eine geringere TAp53-Transkriptmenge nachgewiesen, wenn die Zellen zusätzlich mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden. In den Hochdosis-bestrahlten (200mJ/cm²) primären Keratinozyten führte eine zusätzlich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung zu keiner Transkriptmengenreduktion mehr. Interessanterweise ließ sich in den HaCaT-Zellen, die mit 200mJ/cm² bestrahlt wurden eine vermehrte TAp53-Transkriptmenge aufweisen, welche durch eine 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung verhindert zu werden scheint (siehe Abbildung 9). In den HaCaT- und SCL-1-Zellen hingegen ließ sich in den unbestrahlten Zellen tendenziell eher einer Zunahme bestimmter Transkriptmengen infolge einer 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung beobachten. Dies gilt für TAp63 und RXR-α in den SCL-1-Zellen sowie für ΔNp73 in den HaCaT-Zellen.

3.4.2 Gleichgerichtete Effekte der UVB-Bestrahlung auf die Transkriptmengen in primären Keratinozyten

Eine hohe UVB-Exposition (200mJ/cm²) führte in den folgenden Zelllinien zu einer **Zunahme** der Transkriptmengen folgender Gene:

Gen/transkript	Zelllinie		
TAp53	NFK	HaCaT	SCL-1
Δ133p53			SCL-1
ΔNp73	NFK		
JAG1	NFK		
JAG2	NFK		
NOTCH1	NFK	HaCaT	
NOTCH2	NFK	HaCaT	
VDR	NFK	HaCaT	

Tabelle 4: Übersicht der Zunahme der Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien infolge einer hohen UVB-Dosisexposition

Im Gegensatz dazu führte eine hohe UVB-Exposition in den folgenden Zelllinien zu einer **Abnahme** der Transkriptmengen folgender Gene:

Gentranskript	Zelllinie		
TAp63	NFK		
ΔNp63		HaCaT	SCL-1
TAp73		HaCaT	SCL-1
ΔNp73		HaCaT	
JAG2		HaCaT	SCL-1
NOTCH2			SCL-1
RXR-α		HaCaT	SCL-1

Tabelle 5: Übersicht der Abnahme der Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien infolge einer hohen UVB-Dosisexposition

Somit zeigte sich in primären Keratinozyten bei den folgenden Genen ein ähnliches Transkriptionsverhalten infolge der UVB-Exposition: bei einer hohen UVB-Bestrahlung von 200mJ/cm² konnte eine vermehrte Transkriptmenge des TAp53, ΔNp73, JAG1 und JAG2 sowie NOTCH1, NOTCH2 und VDR nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich diese Signalwege in primären Keratinozyten durch eine hohe UVB-Strahlung gleichgerichtet beeinflussen lassen und miteinander interagieren könnten.

Dahingegen zeigte sich infolge einer hohen UVB-Exposition von 200mJ/cm² insbesondere in den HaCaT- und SCL-1-Zellen eine Abnahme bestimmter Transkriptmengen:

- HaCaT-Zellen: ΔNp63, TAp73, ΔNp73, JAG2, RXR-α
- SCL-1-Zellen: ΔNp63, TAp73, JAG2, NOTCH2, RXR-α

3.4.3 Gegenläufige Effekte der UVB-Strahlung auf die Transkriptmengen in den drei verschiedenen Zelllinien

Interessant sind auch die Ergebnisse, welche eine gegensätzliche Auswirkung der hohen UVB-Strahlungsdosis auf die Transkriptmengen in den drei verschiedenen Zelltypen zeigen.

Gentranskript	Zunahme in den folgenden Zelllinien	Abnahme in den folgenden Zelllinien
ΔNp73	NFK ↑	HaCaT ↓
JAG2	NFK ↑	HaCaT ↓
		SCL-1 ↓
NOTCH2	NFK ↑	SCL-1 ↓
	HaCaT ↑	

Tabelle 6: Übersicht der gegenläufigen Effekte der hohen UVB-Exposition auf die Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien

Während in den primären Keratinozyten eine hohe UVB-Strahlungsdosis von 200mJ/cm² zu einer deutlichen Zunahme der ΔNp73- und JAG2- Transkriptmengen führte, beobachteten wir in den HaCaT- bzw. den SCL-1-Zellen eine Abnahme der ΔNp73- und JAG2- Transkriptmengen infolge der hohen UVB-Strahlungsdosis.

Dies könnte darauf hinweisen, dass in den primären Keratinozyten (mit funktionell intaktem p53-Protein) eine p53-moderierte Interaktion zwischen den Signalwegen vorliegt, an dem $\Delta Np73$ und JAG2 beteiligt sind und dass diese bei p53-defizienten Zelllinien (HaCaT- und SCL-1-Zellen) nicht mehr aktiv ist.

Überdies zeigte sich in den primären Keratinozyten wie auch in den HaCaT-Zellen eine Zunahme der NOTCH2-Transkriptmenge während in den SCL-1-Zellen sich eine Abnahme der NOTCH2-Transkriptmenge verzeichnen ließ.

3.4.4 UVB-Dosisabhängige Effekte auf die Transkriptmenge

Nur in den SCL-1-Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, ein funktionell aktives p53-Protein zu exprimieren, konnten wir eine UVB-Strahlendosis abhängige Zunahme der TAP53- und der $\Delta 133p53$ -Gentranskriptmengen beobachten.

3.4.5 Keine Hinweise für kompensatorische Expressionen von anderen p53-Familienmitgliedern in p53-defizienten Zellen

Hinweise für eine kompensatorische vermehrte Transkription von p63 oder p73 in den p53-defizienten Zellen (HaCaT- und SCL-1-Zellen) konnten wir nicht beobachten. Vielmehr beobachteten wir infolge einer erhöhten UVB-Exposition in den HaCaT- und SCL-1-Zellen eine Abnahme der $\Delta Np63$ - und TAp73-Transkriptmengen, sowie eine Abnahme der $\Delta Np73$ -Transkriptmenge isoliert in den Hochdosis-bestrahlten HaCaT-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Transkriptmengenvariationen in Tumorsuppressor- und Differenzierungs-Signalwegen nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D, in Abhängigkeit vom Transformationsgrad von Keratinozyten

Die kontroversen Effekte von UVB-Strahlung auf die Haut sind schon lange Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Ohne die entsprechenden UV-Strahlen der Wellenlängen 290-320nm, was dem UVB-Lichtspektrum entspricht, ist der menschliche Körper außerstande, eine für ihn ausreichende Menge an 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu bilden. Gleichzeitig stellt das UVB-Licht den größten Risikofaktor für die Entwicklung von Hauttumoren dar [14]. An der Photokarzinogenese ist eine ganze Reihe von Signalwegen beteiligt, wobei diese abhängig vom jeweiligen Kontext unterschiedliche Wirkungen zeitigen können. Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur weiteren Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Photokarzinogenese geleistet werden, die nach UVB-induzierten DNA-Schäden über die wichtigen p53/p63/p73-, NOTCH/JAG- und VDR/RXR-Signalwege wirksam werden.

Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit bereits die große Bedeutung der Transkriptionsfaktor- und Tumorsuppressor-Familie p53/p63/p73 nicht nur für die Unterdrückung der Transformation von Zellen der Haut (und anderen Organen), sondern auch für die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden, etwa durch UVB-Strahlung, belegt [30,53,85]. Auch die NOTCH/JAG-Rezeptor/Liganden-Familie von zellulären Regulations- und Differenzierungsfaktoren scheint hierbei ein potentiell wichtiger interagierender Signalweg zu sein [93].

Um einen Einblick in die Bedeutung dieser Signalwege nach DNA-Schädigung durch UVB-Strahlung in menschlichen Hautzellen unterschiedlichen Transformationsgrades zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Transkriptmengen ausgewählter Gene mittels quantitativer Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) gemessen und zum Teil die entsprechenden Variationen in der Proteinmenge mittels Westernblotting verifiziert. Bei den drei unterschiedlichen Zelltypen handelte es sich um normale humane Keratinozyten, immortale (aber nicht transformierte) humane HaCaT Keratinozyten sowie transformierte humane SCL-1-Plattenepithelkarzinomzellen. Diese unterschieden sich u.a. in ihrem Status des TAp53-Gens: normale Keratinozyten exprimierten Wildtyp-TAp53; HaCaT Zellen exprimieren mutiertes TAp53 und SCL-1 Zellen exprimiert überhaupt kein TAp53-Tumorsuppressorprotein. Die Zellen wurden mit UVB bestrahlt und/oder mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt und die Transkriptmengen ausgewählter Gene wurden mittels

qRT-PCR quantifiziert. Es wird vermutet, dass Vitamin D über die Stimulierung des Steroidhormonrezeptor-Transkriptionsfaktors Vitamin D Rezeptor (VDR) und andere Mechanismen in der Haut und anderswo als Tumorsuppressor wirken kann und darüber hinaus mit TAp53 zu interagieren vermag [119].

4.1.1 Transkript- und Proteinmengenvariationen der p53-Familie nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D

TAp53 und $\Delta 133p53$ und der Effekt von UVB-Licht

TAp53 wird in Zellen gewöhnlich zwar überwiegend über die Stabilität des Proteins reguliert [80], ein Beitrag der Regulation des TAp53-Gens oder der -Transkriptstabilität zur Kontrolle der TAp53-Funktionen in geschädigten Zellen war aber nicht auszuschließen und ist bislang kaum untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung beeinflusste die UVB-Strahlung sowohl die Menge an TAp53- als auch an $\Delta 133p53$ -Transkript in den unterschiedlichen Zellen der Haut in Abhängigkeit vom TAp53-Status, hierbei erwiesen sich beide p53-Transkripte als etwa in gleicher Weise reguliert. Im Gegensatz zu den primären Keratinozyten wiesen die HaCaT- und SCL-1-Zellen höhere TAp53-Transkriptmengen auf, wenn sie mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurde.

Auf Proteinebene hingegen ließ sich in den primären Keratinozyten eine Zunahme der TAp53-Proteinmenge nach einer erhöhten UVB-Exposition beobachten (siehe Abbildung 11). Interessanterweise erfolgte die Stabilisierung in Keratinozyten im Vergleich mit anderen Zellen (z.B. Fibroblasten) [16], erst relativ spät nach Bestrahlung (8-24 h). Diese Beobachtung deckt sich weitestgehend mit der Literatur [81], wo sich ebenfalls direkt nach der UVB-Bestrahlung noch keine Mengenänderungen in der TAp53-Proteinmenge nachweisen ließen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Produktion und Stabilisierung des TAp53-Proteins aufwändiger ist (was einige Stunden in Anspruch nehmen könnte), zum anderen könnte es auch ein Hinweis darauf sein, dass bei diesem Prozess noch weitere Signalwege involviert sind.

TAp53 und $\Delta 133p53$ und der Effekt von Vitamin D

Bemerkenswerterweise zeigte sich in primären Keratinozyten, dass Vitamin D in unbestrahlten oder moderat bestrahlten Zellen eine Verringerung der TAp53-Transkriptmenge um etwa den Faktor 0.5 induzieren kann. Dies konnte weder in HaCaT- noch in SCL-1-Zellen beobachtet werden. Interessanterweise ließ sich diese Vitamin D-assoziierte Reduktion der TAp53-Transkriptmenge in den primären Keratinozyten nicht mehr nachweisen, wenn die Zellen mit einer hohen UVB-Strahlung konfrontiert wurden. Im Gegensatz dazu ließ sich in den HaCaT-

Zellen eine solche Vitamin D-assoziierte TAp53-Transkriptmengenreduktion auch in der Hochdosis-UVB-Bestrahlungsbedingungen nachweisen. Das Fehlen dieses Effektes in SCL-1-Zellen könnte darauf hinweisen, dass die Vitamin D-regulierte Transkription von TAp53 mit der Anwesenheit von Wildtyp-p53-Protein korreliert.

Im Gegensatz zu TAp53 zeigte $\Delta 133p53$, eine Variante, von der bekannt war, dass sie eher eine onkogene Wirkung besitzt, keine Beeinflussbarkeit durch Vitamin D.

Vitamin D ist bekannt für seine Funktion (übermäßiges) Zellwachstum regulieren zu können und Zelldifferenzierung einzuleiten [65]. Besteht kein Hinweis auf eine übermäßige Zellproliferation (z.B. induziert durch Mutationen), so wäre eine regelrechte Zelldifferenzierung und ein regelrechtes Zellwachstum wünschenswert. Da in den Bedingungen ohne Bestrahlung kaum Mutationen entstehen, braucht es i.d.R. auch keine erhöhte Menge an TAp53. In Übereinstimmung mit der Verminderung der TAp53-Transkriptmengen in ungestressten primären Keratinozyten durch Vitamin D fand sich auch bereits früh nach der Vitamin D-Exposition (4h) eine Reduzierung der TAp53-Proteinmenge. Vitamin D scheint also in gesunden Zellen der Haut (Keratinozyten) TAp53 negativ zu beeinflussen. Dieser Effekt wird durch starke, UVB-induzierte DNA-Schädigung aufgehoben. Dies korreliert mit zahlreichen früheren Beobachtungen auch in anderen Organen, wo nachgewiesen werden konnte, dass eine Schädigung der DNA alle eventuell aktiven negativen Regulationsmechanismen des TAp53-Signalwegs zu ‚überstimmen‘ vermag [60].

Es bleibt zu diskutieren, weshalb auch in den mit $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ bestrahlten primären Keratinozyten die TAp53-Transkriptmenge geringer ausfällt, wenn sie mit Vitamin D behandelt wurden. Ein Erklärungsansatz für eine solche Reduktion der TAp53-Transkriptmenge in NFK-Zellen nach 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 -Behandlung könnte sein, dass es durch das Vitamin D ggf. zu einer geringeren DNA-Schädigung gekommen ist bzw. andere Signalwege zum Schutz der Zelle aktiviert wurden und somit TAp53 weniger von Nöten war. In der Vergangenheit gelang es bereits mehreren Forschungsgruppen einen solchen protektiven Effekt des 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 in UVB-bestrahlten Keratinozyten nachzuweisen [32,130]. Hierbei nimmt man u.a. einen Zusammenhang mit dem Einleiten bestimmter DNA-Reparaturmechanismen sowie einer Aktivierung von p53-Abwehrmechanismen an [23, 56]. So konnten Trémezaygues und Kollegen in Keratinozyten (HaCaT-Zellen), die mit 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 behandelt wurden, weniger CPD nachweisen als in Zellen, die nicht mit Vitamin D behandelt wurden [130]. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit wurden in einer Studie von De Haes und Kollegen Keratinozyten mit einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis von 10^{-6} M behandelt und anschließend mit UVB-Lichtdosen von $16\text{mJ}/\text{cm}^2$ bestrahlt. Auch hier führte die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung in den Keratinozyten zu einer Abnahme der TAp53-Akkumulation nach der UVB-Bestrahlung [32]. Diese Forschungsgruppe beobachtet, dass die Behandlung von bestrahlten Keratinozyten mit

1,25(OH)₂D₃ zu einem Anstieg der Bcl-2-Expression führte, wobei man einen Rückgang der p53-Expression nach Bestrahlung messen konnte [32]. Die von uns beobachtete TAp53-Reduktion nach einer 1,25(OH)₂D₃-Behandlung könnte somit dadurch erklärt werden, dass das 1,25(OH)₂D₃ die UVB-induzierte CPD-Bildung unterdrückt und somit eine geringere Zellschädigung resultiert, sodass kein höherer Bedarf an TAp53-Transkript besteht.

In den HaCaT- und SCL-1-Zellen ließ sich auf Proteinebene dagegen keine Beeinflussung durch eine Vitamin D-Behandlung und UVB-Exposition nachweisen. Unsere Untersuchungen könnten Hinweise darauf geben, dass in den HaCaT- und SCL-1-Zellen auf Transkriptebe- noch bestimmte regulatorische Prozesse stattfinden (infolge einer vermehrten DNA-Schädigung durch UVB-Exposition kommt es zu einer vermehrten Transkription von TAp53), dass sich diese Einflussnahme jedoch nicht mehr auf die Proteinebene übertragen lässt, zum Beispiel aufgrund eines funktionell eingeschränkten/nicht mehr funktionellen p53-Proteins. Dies ließe sich zum einen durch die Punktmutationen im p53-Gen in den HaCaT-Zellen sowie dem kompletten Funktionsverlust des TAp53-Proteins in SCL-1-Zellen, erklären. Im Gegensatz dazu, scheint eine Regulation des TAp53 durch UVB-Licht und Vitamin D in den primären Keratinozyten sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene stattzufinden.

Obwohl der wesentliche p53-Proteinanstieg vornehmlich durch posttranslationale Stabilisierung zustande kommt, deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass in Keratinozyten das TAp53 durch Vitamin D und eine UVB-Exposition bereits auf Transkriptionsebene reguliert werden könnte. Insgesamt zeigte sich, dass in primären, immortalen und transformierten Zellen der Haut die Effekte der UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Exposition auf die Transkriptmenge des p53-Gens mit der An- oder Abwesenheit von funktionellem Wildtyp- oder mutiertem p53-Protein – direkt oder indirekt – korrelieren.

TAp63 und ΔNp63

Im Gegensatz zu TAp53 wurden die Transkriptmengen der an der Differenzierung und Proliferation der Haut wesentlich beteiligten TAp53-Verwandten TAp63 und ΔNp63 eher durch die Dosis der erhaltenen UVB-Strahlung reguliert als durch den Grad der Transformation der Zellen.

In primären Keratinozyten konnten wir signifikant weniger TAp63-Transkript nachweisen, wenn die Zellen einer hohen UVB-Bestrahlung ausgesetzt waren. TAp63 werden ähnliche Funktionen wie dem TAp53 zugeschrieben, so scheint es zum Beispiel in gestressten Zellen eine Apoptose zu induzieren und den Zellzyklus zu kontrollieren [159]. Die von uns beobachtete reduzierte TAp63-Transkription infolge einer hohen UVB-Strahlungsdosis könnte ggf. damit erklärt werden, dass durch die gleichzeitig erhöhte Konzentration an TAp53-Protein eine vermehrte TAp63-Transkription gehemmt wird, i.S. einer negativen Feedbackschleife.

In gesunden Keratinozyten kann $\Delta Np63$ die Proliferation von Zellen fördern und die Ausdifferenzierung von Zellen hemmen, weshalb es auch als potenzielles Onkogen diskutiert wird. Sowohl HaCaT- als auch SCI-1-Zellen, die mit einer hohen UVB-Dosis bestrahlt wurden, weisen signifikant geringere $\Delta Np63$ -Transkriptmengen auf als solche, die keiner bzw. nur einer moderaten UVB-Strahlendosis ausgesetzt waren. Dagegen scheint sich das $\Delta Np63$ -Transkript in primären Keratinozyten unbeeinflusst durch eine Vitamin D-Behandlung und UVB-Bestrahlung zu zeigen. Liefer und Kollegen nehmen an, dass für eine funktionelle UVB-induzierte Apoptose zunächst eine Runterregulierung von $\Delta Np63\alpha$ nötig ist [159]. Die UVB-induzierte Apoptose stellt eine aktive und physiologische Form des Zelltods dar, die an der Kontrolle der Gewebemöostase und an der Deletion von DNA-geschädigten Zellen beteiligt ist [62]. Zur Apoptose kommt es erst dann, wenn die UVB-induzierte Zellschädigung nicht mehr vom intrazellulären Reparatursystem repariert werden. Vor dem Hintergrund, dass $\Delta Np63$ onkogen wirken kann, und es in den Hochdosis-bestrahlten Zellen zu einer DNA-Schädigung kam, könnte man eine funktionelle Runterregulierung von $\Delta Np63$ annehmen. Läge ein solcher Schutzmechanismus auch noch in den Plattenepithelkarzinomzellen vor, so scheint dieser unabhängig von einem funktionellen TAp53-Protein zu agieren.

TAp73 und $\Delta Np73$

Die unterschiedliche Expression von der TA- und ΔN -p73-Isoform kann die Funktion von p73 und p53 innerhalb eines bestimmten Zelltyps oder in einer bestimmten Phase des Zellzyklus oder Differenzierungsstadiums bestimmen [53]. Das Gleichgewicht zwischen den beiden Formen könnte auf der Transkriptionsebene über die alternative Nutzung von Promotoren fein reguliert werden. Eine Veränderung der relativen Mengen der beiden Isoformen könnte für ihre Funktion (z. B. ihre Beteiligung an der Entwicklung und möglicherweise an der Krebsentstehung) von großer Bedeutung sein. Da die beiden Formen unterschiedliche (wenn nicht sogar gegensätzliche) Funktionen haben, ist es wichtig, sie beim Menschen zu identifizieren, ihr normales Expressionsmuster und ihre Funktionen zu klären und ihre unterschiedliche Regulierung zu untersuchen.

Die Transkriptmengen an TAp73 verhielten sich in unseren Versuchsreihen in gleicher Weise wie die Mengen an $\Delta Np63$ Transkript. Auch hier ließ sich in den HaCaT- und SCL-1-Zellen eine reduzierte TAp73-Transkriptmenge in den Hochdosis UVB-bestrahlten Zellen nachweisen. Die TAp73-Transkriptmenge in den primären Keratinozyten ließ sich hingegen durch eine UVB-Bestrahlung nicht beeinflussen.

Im Gegensatz dazu ließ sich in den primären Keratinozyten infolge einer hohen UVB-Exposition eine deutlich höhere Menge an $\Delta Np73$ -Transkript nachweisen als in den unbestrahlten bzw. moderat-UVB-Dosis bestrahlten Zellen.

DeYoung und Kollegen (2006) postulierten, dass Δ Np73 die Keratinozyten dominierende Isoform darstellt [35]. Ferner ist bekannt, dass die Δ Np73-Expression durch p53 sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene induziert wird, wobei das p53 direkt einen zweiten Promotor innerhalb des humanen p73-Gens aktivieren kann [75]. Grob und Kollegen konnten zeigen, dass p53 und TAp73 den Δ Np73-Proteinspiegel regulieren, indem sie an den Δ Np73-Promotor binden und dessen Transkription induzieren, wodurch eine negative Rückkopplungsschleife entsteht, welche wiederum die Aktivität von TAp73 oder p53 eng reguliert [53]. Dies kann dann zu erhöhten Δ Np73 mRNA- und Proteinspiegeln führen und das Δ Np73-Protein ist dann wiederum in der Lage die Transkriptionsaktivität von p53 (und TAp73) zu antagonisieren und so auch die durch p53-induzierte Apoptose zu blockieren. Somit könnte Δ Np73 eine regulatorische Rückkopplungsschleife für die effiziente Kontrolle der p53-Aktivität darstellen.[75]. Demnach könnte man annehmen, dass es aufgrund der UVB-induzierten Zellschädigung zu einer Stabilisierung von p53-Protein in den primären Keratinozyten kam und die vermehrte p53-Proteinmenge induzierte wiederum die Δ Np73- Transkription. Nicht zuletzt aufgrund seiner p53-antagonisierenden Wirkung wird diskutiert, dass eine veränderte Expression von Δ Np73 bei der Krebsentstehung beteiligt sein könnte [33,40,53,91,142].

Zusammengefasst scheint eine starke UVB-Bestrahlung in transformierten, TAp53-defizienten Tumorzellen der Haut (HaCaT, SCL-1) die Transkriptmengen an Δ Np73 und des verwandten Δ Np63 zu verringern. Dieser Effekt war unerwartet angesichts der Tatsache, dass beide Gene in vielen Zelltypen als Onkogene wirken können [28,36]. Eine solche scheinbar ‚paradoxe‘ Wirkung konnte auch in gesunden Keratinozyten beobachtet werden. Hier führte eine starke UVB-Bestrahlung zu einer stark erhöhten Δ Np73-Transkriptmenge. Δ Np73 kann ebenso wie Δ Np63 als negativer Regulator des TAp53-Tumorsuppressors fungieren [53], der unter Bestrahlung eigentlich aktiv und nicht über Δ Np73 oder Δ Np63 inaktiviert werden sollte.

4.1.2 Transkriptmengenvariationen im Notch-Signalweg nach UVB-Exposition und unter Einfluss von Vitamin D

Ganz unterschiedlich reagierten auch die NOTCH-Rezeptorliganden JAG1 und JAG2 auf die UVB-Bestrahlung. Während die JAG1-Transkriptmengen in den nicht-transformierten Zellen (Keratinozyten und HaCaT) infolge einer erhöhten UVB-Strahlendosis zunahmen, nahmen die JAG2-Transkriptmengen in primären Keratinozyten zwar ebenfalls zu, in den anderen beiden Zelltypen (HaCaT und SCL-1) jedoch ab, sodass sich dort ein nahezu spiegelbildliches Verhalten ergab. JAG1 und JAG2 können NOTCH auf unterschiedliche Weise regulieren [26], ihre differentiellen UVB-Antworten reflektieren somit womöglich die Bedeutung des Notch-Signalwegs nach UVB-Schädigung der Haut, in Abhängigkeit vom Transformationsgrad

und/oder der An/Abwesenheit von Wildtyp-p53 [121]. Vitamin D übte hier keine eindeutigen Effekte aus.

In Übereinstimmung mit der Antwort seiner Liganden erwies sich auch die Regulation der NOTCH1-Transkriptmenge nach UVB-Bestrahlung als abhängig vom Zustand der Transformation des Hautzelltyps. Vitamin D hatte auch hier keine signifikante Auswirkung.

Schon seit einigen Jahren wird ein Crosstalk zwischen dem Notch-Signalweg und den p53-Familienmitgliedern proklamiert, welchem bei der Entstehung von Krebs eine bedeutende Rolle zukommen könnte. G.P. Dotto widmete sich unter anderem auch diesem komplexen Zusammenspiel zwischen dem Notch- und dem p53-Signalweg in der Photokarzinogenese. Er sah Hinweise dafür, dass der Notch-Signalweg an der Reaktion von Keratinozyten auf UVB induzierte DNA-Schäden beteiligt sein könnte [38]. Er nimmt dabei an, dass der Notch-Signalweg die Aktivität von p53 abhängig vom Kontext entweder unterdrückt oder verstärkt, was wiederum eng mit der Entstehung bzw. Unterdrückung von Tumoren in Verbindung stehen könnte [38]. Hierbei postuliert er eine direkte Interaktion zwischen Notch und p53, indem p53 in aktiviertem NOTCH1 direkt binden kann, was u.a. zu einer Hemmung der p53-Phosphorylierung führt [78]. Die Interaktion des Notch- und p53-Signalweges ist bislang am besten in Untersuchungen zu akuten lymphoblastischen T-Zell-Leukämien beschrieben worden [34,122]. Hierbei beobachtete man, dass eine Abnahme der Notch-Expression die p53-Level stark erhöhte, was wiederum durch eine verstärkte Apoptose die Tumorrückbildung begünstigte. Im Allgemeinen spricht man dem Notch-Signalweg eher eine tumorfördernde Wirkung zu, indem es die Expression potenziell onkogener Gene induziert. Gleichzeitig fand man, dass eine Hochregulierung solcher potenziell onkogener Gene wiederum als Stresssignal eine p53-angängige Apoptose auslösen kann [38]. In unseren Untersuchungen verhielten sich sowohl die TAp53- als auch die NOTCH1-Transkriptmenge in den primären Keratinozyten in Folge der verschiedenen Versuchsbedingungen in ähnlicher Art und Weise. Bei beiden Genen beobachteten wir eine Reduktion der Transkriptmengen, wenn die unbestrahlten Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden. Zudem zeigte sich eine Zunahme der TAp53- und NOTCH1-Transkriptmengen, wenn die primären Keratinozyten mit einer UVB-Hochdosis (200mJ/cm²) bestrahlt wurden. Um nachzuweisen ob infolge der erhöhten TAp53- und NOTCH1-Transkriptmengen tatsächlich auch eine vermehrte Apoptose stattgefunden hat, sollte in künftigen Untersuchungen diese zusätzlich gemessen werden (beispielsweise mittels Caspase activity assay).

Eine Frage, die man sich hierbei stellen sollte, ist, wie sich die Interaktion zwischen dem p53- und Notch-Signalweg in Zellen verhält, wenn das p53-Gen mutiert vorliegt. In den SCL-1-Zellen konnten wir eine Zunahme der Transkriptmengen des mutierten TAp53-Gens nach einer maximalen UVB-Bestrahlung beobachten. Im Gegensatz dazu, zeigte sich in den

maximal UVB-exponierten SCL-1-Zellen eine Abnahme der NOTCH1-, NOTCH2- und JAG2-Transkriptmengen. Könnte eine erhöhte TAp53-Transkription zu einer Reduktion der NOTCH-Aktivität geführt haben? Yugawa und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass p53-Mutationen die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen durch die Herunterregulierung von NOTCH1 fördern können [143]. Weiter vermuteten sie, dass die Regulierung von NOTCH1 durch p53 als eine Art Abwehrmechanismus gegen die durch UVB induzierten DNA-Schäden entstanden sein könnte, welche wiederum durch anderer Mitglieder der p53-Familie reguliert werden kann [143].

Zusammengenommen fiel bei allen Untersuchungen zu den Transkriptmengen des Notch-Signalwegs auf, dass in transformierten SCL-1 Zellen ohne TAp53, hohe UVB-Dosen eher zu einer Reduktion des entsprechenden Gentranskripts führten. Die Effekte von Vitamin D auf die gemessenen Transkriptmengen waren marginal. Letzteres hätte allerdings auch an Veränderungen oder dem Fehlen der Expression des Vitamin D-Rezeptors (oder seines Interaktionspartners RXR α) in den jeweiligen Zellen liegen können [13, 27, 105]. Unsere Untersuchungen zeigten jedoch, dass starke UVB-Bestrahlung zu einer deutlichen Zunahme der VDR-Transkriptmengen in primären Keratinozyten führte. Eine mangelnde Expression des VDR kann also die oben beschriebenen, unbedeutenden VDR-Antworten nicht erklären.

Die RXR α Transkriptmenge war in den immortalen bzw. transformierten HaCaT- und SCL-1-Zellen, nicht aber in primären Keratinozyten, nach starker UVB-Bestrahlung vermindert. Eine solche vermutlich durch UVB-Licht induzierte Transkriptmengen-Verminderung fand sich auch bei TAp63, Δ Np63, JAG2, NOTCH1 und NOTCH2, nicht aber von TAp53, Δ 133p53 und JAG1. Hier scheinen also ‚Cluster‘ von Genen, die noch kaum verstanden sind, unter UVB in jeweils ähnlicher Weise zu reagieren.

Zusammengefasst ergibt sich ein äußerst komplexes Bild, in dem die Transkriptmengen in den p53/p63/p73-, den NOTCH/JAG- und den VDR/RXR-Signalwegen der Zellen der Haut durch UVB-Exposition teils gemeinsam und teils scheinbar unabhängig voneinander verändert werden. Das Zusammenspiel dieser Signalwege muss in weiteren Studien aufgeklärt werden. Als besonders interessant könnte sich dabei die Reduktion von TAp53 sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene in primären, gesunden Keratinozyten der Haut unter Vitamin D erweisen. Allgemein hatte Vitamin D aber nur marginale und sehr variable Effekte, die nicht mit der Expression des Vitamin D-Rezeptors oder seines Interaktionspartners RXR α korrelierten.

4.2 Limitierungen der Studie

4.2.1 Fehlende Quantifizierung der Zellschädigung durch UVB-Strahlung

Es ist unumstritten, dass UVB-Strahlungsinduzierte DNA-Schäden zu einer Akkumulation und Aktivierung des TAp53-Proteins führen, welches wiederum an Signalwegen zur Einleitung des Zellzyklusarrests, der DNA-Reparaturmechanismen und Apoptose beteiligt ist [58]. Die TAp53-Akkumulation ist somit auch Sensor für DNA-Schäden [160]. In der vorliegenden Studie wurde keine weitere Objektivierung einer UVB-induzierten Zellschädigung, z.B. in Form von Messungen der entstandenen Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), vorgenommen. Um eine UVB-induzierte Zellschädigung zu quantifizieren (und die damit einhergehenden TAp53-Akkumulation) sollte in künftigen Studien zusätzlich eine Prüfung der UVB-induzierten Zellschädigung beispielsweise in Form von Messungen der resultierenden CPDs erfolgen.

4.2.2 Unterschiedliche Kultivierungs- und Erntebedingungen der drei Zelllinien

Wie unter 2.2.4 beschrieben, herrschten für die drei Zelllinien nicht exakt die gleichen Kultivierungsbedingungen. Im Gegensatz zu den HaCaT- und SCL-1-Zellen, die mit jeweils 5×10^5 Zellen pro 100 x 20 mm Zellkulturschale in 5 ml Nährmedium ausgesät wurden, wurde bei den primären Keratinozyten etwa die doppelte Zellzahl eingesetzt. Zudem wurden letzter in kleinerer (60 x 15 mm) Zellkulturschalen ausgesät, da vorangegangene Versuche gezeigt hatten, dass die Keratinozyten ohne ausreichenden Zellkontakt ein nur sehr langsames und unzureichendes Zellwachstum aufwiesen. Zellen kommunizieren über Signaltransduktion auch mit benachbarten Zellen. Die räumliche Nähe der Zellen könnte somit zu Signaltransduktionsunterschieden zwischen den Zelltypen geführt haben, die so *in vivo* nicht stattgefunden hätten. Es ist nicht auszuschließen, dass die Verwendung unterschiedlicher Zellzahlen sowie der Einsatz verschiedener Kulturschalen einen Einfluss auf die Zellen hatte, zum Beispiel i.S. eines vermehrten Zellstresses.

Darüber hinaus sollte nicht unerwähnt bleiben, dass neben den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen auch die zwei unterschiedlichen Erntevorgänge bzw. auch RNA-Isolierungsvorgänge einen Einfluss auf die Zellen (und damit deren Transkriptmengen) haben könnten. Hierbei wurden die HaCaT- und SCL-1-Zellen manuell mithilfe eines Schabers (disposable Cell Scraper) geerntet. Später wurde die erhaltene Zellsuspension (nach dem Zentrifugieren) zusätzlich bei -20°C eingefroren, bevor die RNA-Isolierung vorgenommen wurde. Dagegen erfolgte die Ernte, RNA-Aufreinigung und -Isolierung der primären Keratinozyten unter Verwendung des miRNeasy Mini Kit (50) von Qiagen, sodass diese drei Vorgänge in einem Schritt vorgenommen werden konnten (ohne zusätzliches Zentrifugieren oder Wegfrieren). Ob sich diese zwei verschiedenen Erntevorgänge tatsächlich in

Unterschieden der Transkription bzw. Expression bestimmter Gene niederschlagen kann, bleibt zu diskutieren.

4.2.3 Einsatz von Ethanol als Trägersubstanz

In unserer Studie setzten wir Ethanol als Trägersubstanz für das 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ ein und mussten somit auch bei den Kontrollbedingungen ein Gemisch aus Nährmedium und Ethanol (1:1000 Verdünnung) verwenden. Damit waren zwar alle Zellen in allen sechs Versuchsbedingungen Ethanol ausgesetzt, es bleibt hierbei jedoch unklar, ob die Exposition gegenüber Ethanol einen Stressfaktor für die Zellen darstellt.

4.2.4 Kritik bei der Übertragung des Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese auf die drei verwendeten Keratinozytenzellreihen

In der vorliegenden Studie versuchten wir in Anlehnung an das Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese die unterschiedlichen Stufen mithilfe der drei verschiedenen Zelltypen primäre Keratinozyten (NHEK oder NFK), HaCaT- und SCL-1-Zellen abzubilden. Die primären Keratinozyten stellen hierbei die gesunden Keratinozyten dar, während die HaCaT-Zellen mit ihren Punktmutationen im p53-Gen Präkanzerosen repräsentieren sollten und die SCL-1-Zellen die voll-transformierten Plattenepithelkarzinomzellen. Es bleibt dabei offen, ob die genannten Zelltypen sich wirklich dazu eignen, die unterschiedlichen Stufen der kutanen Photokarzinogenese realistisch abzubilden.

4.2.4.1 NFK/NHEK-Zellen - „gesunde“ Keratinozyten im Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese

Bezüglich der primären Keratinozyten konnte nicht gewährleistet werden, dass diese keine Mutationen oder kulturbedingte epigenetische Veränderungen aufwiesen. Verwendet wurden zwar nur Zellen bis zur Passage 9, jedoch könnte unter den gegebenen in vitro-Bedingungen das Risiko für das Auftreten solcher Veränderungen mit zunehmender Passage zunehmen [76].

Überdies lässt sich zusätzlich über die Auswahl bzw. die Lokalisation und die Spender der primären Keratinozyten diskutieren, da diese einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Studienergebnisse haben könnten. So verwendete etwa die Forschungsgruppe um Gupta Keratinozyten, die sie aus menschlicher neonataler Vorhaut von kaukasischen Spendern gezüchtet hatten, (wie bereits zuvor von der Forschergruppe um Gordon-Thomson (2001) beschrieben wurde), sowie Keratinozyten, die aus der Haut einer weiblichen Spenderin, welche im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs vom Rücken entnommen worden war [56]. Die von uns verwendeten primären Keratinozyten stammen hingegen allesamt von menschlicher juveniler Vorhaut unterschiedlicher Spender.

4.2.4.2 HaCaT-Zellen – „Präkanzerose“ im Mehrschrittmodell der Photokarzinogenese

HaCaT-Zellen stellen eine spontan transformierte, immortale Zelllinie der adulten menschlichen Haut dar. Sie sind charakterisiert durch eine hohe Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit. Verglichen mit primären Keratinozyten weisen HaCaT-Zellen mit ihrer schnellen Proliferationsfähigkeit bei bestehender Ausdifferenzierung einige praktische Vorteile bei der Kultivierung *in vitro* auf. Während primäre Keratinozyten nur eine relativ kurze Kulturlebensdauer aufweisen, können HaCaT-Zellen theoretisch unendlich oft weiter passagiert werden [108].

HaCaT-Keratinozyten tragen Punktmutationen im TAp53-Gen, die einem TAp53-Mutationsspektrum entsprechen, welches typisch für UV-Licht-induzierte Mutationen ist [83]. Unklar bleibt jedoch, ob das TAp53-Protein in diesen Zellen partiell funktionsfähig bleibt. In der vorliegenden Studie nutzen wir die HaCaT-Zelllinie als Modell für die Präkanzerose „aktinische Keratose“. Ebenso wie in den HaCaT-Zellen, liegen auch in den aktinischen Keratosen in bis zu 60% der Fälle typische UV-Licht-induzierte Mutationsmuster (sogenannte Mutationssignaturen) im TAp53-Gen vor [58]. Trotz der Gemeinsamkeit bleibt unklar, wie ähnlich sich die HaCaT- und aktinische Keratose-Zellen wirklich sind.

4.2.4.3 Beeinflussung der Expression abhängig vom Zellzyklus

Keratinozyten, ebenso wie andere Zellen, können sich in ihrem jeweiligen Transkriptions- und Expressionsverhalten bestimmter Gene erheblich unterscheiden, je nach dem, in welcher jeweiligen Zellzyklusphase sie sich zum Zeitpunkt der Messung befinden [2,77,124]. So lassen sich Zellen in verschiedenen Zyklusphasen durch bestimmte Stimuli unterschiedlich stark beeinflussen. In der vorliegenden Studie konnten diese unterschiedlichen Teilungsphasen der Zellen nicht berücksichtigt werden.

Insgesamt bleibt also festzustellen, dass die vorliegende Studie zahlreiche Limitierungen aufweist, die jedoch beim gegenwärtigen Stand der technischen Möglichkeiten nicht vollständig aufgehoben werden können. Zellen in Kultur verändern sich unkontrolliert, wachsen ‚zweidimensional‘ und meist nicht synchron, während sie *in situ* natürlich dreidimensional organisiert und überwiegend teilungsinaktiv sind. Abhilfe könnten hier vielleicht Arbeiten an Mausmodellen der Haut-Photokarzinogenese schaffen, die es womöglich erlauben würden, alle Stadien am selben Tier und unter identischen Bedingungen zu untersuchen.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns gelungen, einen Einfluss von UVB-Strahlung und einer 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Behandlung in den untersuchten p53-, Notch- und Vitamin D-Signalwegen in in vitro-Zellkulturmodellen von primären Keratinozyten sowie immortalen und transformierten Keratinozyten nachzuweisen.

Obwohl die wesentliche Zunahme des p53-Proteins nach Zellschädigung vor allem durch posttranslationale Stabilisierung zustande kommt, sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass in Keratinozyten der p53-Signalweg durch UVB-Strahlung und 1,25(OH)₂D₃ bereits auf Transkriptionsebene reguliert wird. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die TAp53-Transkript- und Proteinmenge in primären Keratinozyten 24 Stunden nach einer hohen UVB-Belastung höher ausfällt als in unbestrahlten primären Keratinozyten. In den HaCaT- und SCL-1-Zellen ließen sich deutliche TAp53-Transkriptmengenanstiege in den Hochdosis bestrahlten Zellen beobachten.

Während in den unbestrahlten und moderat UVB-bestrahlten (50mJ/cm²) primären Keratinozyten eine Behandlung mit Vitamin D im Zusammenhang mit einer reduzierten TAp53-Transkriptmenge stehen könnte, lässt sich ein solcher Vitamin D-Effekt in den Hochdosis-bestrahlten primären Keratinozyten nicht mehr nachweisen. Vor dem Hintergrund, dass durch eine Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ eine geringere Zellschädigung auftritt, könnte man trotz der in diesem Zusammenhang beobachteten geringeren TAp53-Transkriptmenge, einen protektiven Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung von UVB-Strahlung annehmen. Dieser Vitamin D-Effekt auf das TAp53-Transkript könnte UVB-Dosis-abhängig sein und sich somit beispielsweise nur bis zu einem gewissen Zellschädigungsgrad aktiv zeigen. Wohingegen bei stärkeren Zellschäden (infolge höherer UVB-Strahlendosen) wiederum zusätzliche zytoprotektive Signalwerke notwendig sind, welche über TAp53 moderiert werden müssen. Hierbei bleibt weiterhin unklar, welche Signalwege und Prozesse durch das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Gang gesetzt werden, um diesen UVB-induzierten DNA-Schäden entgegenzuwirken. Liegt eine direkte Interaktion zwischen dem Vitamin D und dem p53-Signalweg vor?

Interessanterweise ließ sich in den p53-Punktmutierten HaCaT-Zellen eine solche Vitamin D-reduzierte TAp53-Transkriptmenge ausschließlich in der Hochdosis-bestrahlten Bedingung beobachten. Hinsichtlich dieser womöglich 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induzierten TAp53-Transkriptmengenabnahme in den UVB-Hochdosis bestrahlten HaCaT-Zellen ließe sich diskutieren, ob eine Vitamin D-Behandlung in HaCaT-Zellen den dritten Schritt der Photokarzinogenese (die *Progression*) nicht sogar begünstigen könnte. In den SCL-1-Zellen war kein solcher Vitamin D-Effekt nachzuweisen. Um dies weitergehend zu untersuchen, sollte

in künftigen Studien zusätzlich zu den hier untersuchten TAp53-Transkriptmengen auch das Maß an Zellschädigung gemessen (z.B. mittels Anzahl an Cyclobutandimeren) sowie die entsprechenden DNA-Reparaturmechanismen quantifiziert werden. Vor diesem Hintergrund wäre dann auch die Empfehlung einer Vitamin D-Substitution für Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von kutanen Plattenepithelkarzinomen zu diskutieren.

Ferner konnten wir zeigen, dass sich die Transkriptmengen an TAp73 in gleicher Weise verhielten, wie die des $\Delta Np63$. Eine maximale UVB-Dosis reduzierte in den beiden Wildtyp-TAp53-negativen Zellen der Haut (HaCaT und SCL-1) sowohl die Menge an $\Delta Np63$ - ebenso wie an TAp73-Transkript. Könnte es hier ein Interplay zwischen dem eigentlich als Onkogen bekannten $\Delta Np63$ und dem eher zytoprotektiven TAp73 geben?

Überdies schien auch das $\Delta Np73$ - Transkript in HaCaT-Zellen durch eine starke UVB-Bestrahlung in einer reduzierten Menge vorzuliegen. Im Gegensatz dazu konnte in gesunden Keratinozyten in Folge einer starken UVB-Bestrahlung eine deutlich erhöhte $\Delta Np73$ -Transkriptmenge nachgewiesen werden. Diese Beobachtung scheint paradox, da $\Delta Np73$ ebenso wie $\Delta Np63$ in der Literatur als negative Regulatoren des TAp53-Tumorsuppressors bekannt sind [53]. Das TAp53 sollte unter vermehrter UVB-Exposition eigentlich aktiv werden und nicht über eine vermehrte $\Delta Np73$ -Transkription inaktiviert werden. Zur Auflösung dieser scheinbaren Paradoxien sind weitere Untersuchungen notwendig, die insbesondere die Rolle des $\Delta Np73$ weiter charakterisieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Alagbala AA, Johnson CS, Trump DL, Posner GH, Foster BA (2006) Antitumor effects of two less-calcemic vitamin D analogs (Paricalcitol and QW-1624F2-2) in squamous cell carcinoma cells. *Oncology* 70:483–492
2. Al-Mohanna MA, Al-Khodairy FM, Krezolek Z, Bertilsson PA, Al-Houssein KA, Aboussekhra A (2001) p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 22:573–578
3. Aoubala M, Murray-Zmijewski F, Khoury MP, Fernandes K, Perrier S, Bernard H, Prats A-C, Lane DP, Bourdon J-C (2011) p53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ* 18:248–258
4. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D (2017) Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept* 7:1–6
5. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC (2017) The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol* 12:245–275
6. Barbieri CE, Pietenpol JA (2006) p63 and epithelial biology. *Exp Cell Res* 312:695–706
7. Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C, Verschoore M (2014) New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Exp Dermatol* 23 Suppl 1:7–12
8. Bell NH (1985) Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest* 76:1–6
9. Benjamin CL, Melnikova VO, Ananthaswamy HN (2008) p53 Protein and Pathogenesis of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer. Springer, New York, NY. URL: https://doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_21
10. Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Berghe LVD, Peurichard A, Javerzat S, Bikfalvi A, Lane DP, Bourdon JC, Prats A-C (2013) The p53 isoform, [DELTA]133p53[alpha], stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* 32:2150–2161
11. Bikle D (2009) Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94:26–34
12. Bikle DD, Gee E, Pillai S (1993) Regulation of keratinocyte growth, differentiation, and vitamin D metabolism by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Invest Dermatol* 101:713–718
13. Bikle DD (2004) Vitamin D and skin cancer. *J Nutr* 134:3472S-3478S
14. Bikle DD (2008) Vitamin D receptor, UVR, and skin cancer: a potential protective mechanism. *J Invest Dermatol* 128:2357–2361
15. Bikle DD (2014) Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol* 21:319–329
16. Blattner C, Tobiasch E, Litfen M, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1999) DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene* 18:1723–1732

17. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761–771
18. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 88:10124–10128
19. Brash DE (2015) UV Signature Mutations. *Photochem Photobiol* 91:15–26
20. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W, Landthaler M, Herausgeber (2005) *Dermatologie und Venerologie*. 5. edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
21. Britt AB (1995) Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol* 108:891–896
22. Cairns J (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255:197
23. Chaiprasongsuk A, Janjetovic Z, Kim T-K, Jarrett SG, D’Orazio JA, Holick MF, Tang EKY, Tuckey RC, Panich U, Li W, Slominski AT (2019) Protective effects of novel derivatives of vitamin D3 and lumisterol against UVB-induced damage in human keratinocytes involve activation of Nrf2 and p53 defense mechanisms. *Redox Biol* 24:101206
24. Cheng Q, Chen L, Li Z, Lane WS, Chen J (2009) ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity. *EMBO J* 28:3857–3867
25. Chida K, Hashiba H, Fukushima M, Suda T, Kuroki T (1985) Inhibition of tumor promotion in mouse skin by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Cancer Res* 45:5426–5430
26. Choi K, Ahn Y-H, Gibbons DL, Tran HT, Creighton CJ, Girard L, Minna JD, Qin FX-F, Kurie JM (2009) Distinct Biological Roles for the Notch Ligands Jagged-1 and Jagged-2. *J Biol Chem* 284:17766–17774
27. 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
28. Crum CP, McKeon FD (2010) p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. *Annu Rev Pathol* 5:349–371
29. Danno K, Horio T (1987) Sunburn Cell: Factors Involved in Its Formation. *Photochem Photobiol* 45:683–690
30. de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:19–27
31. De Haes P, Garmyn M, Carmeliet G, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S (2004) Molecular pathways involved in the anti-apoptotic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* 93:951–967
32. 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

33. De Laurenzi V, Catani MV, Costanzo A, Terrinoni A, Corazzari M, Levrero M, Knight RA, Melino G (1999) Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants ϵ and ζ . *Cell Death Differ* 6:389–390
34. Demarest RM, Ratti F, Capobianco AJ (2008) It's T-ALL about Notch. *Oncogene* 27:5082–5091
35. DeYoung MP, Johannessen CM, Leong C-O, Faquin W, Rocco JW, Ellisen LW (2006) Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 66:9362–9368
36. Deyoung MP, Ellisen LW (2007) p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26:5169–5183
37. Dotto GP (2008) Notch tumor suppressor function. *Oncogene* 27:5115–5123
38. Dotto GP (2009) Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nat Rev Cancer* 9:587–595
39. 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
40. El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, Mims B, Lippman SM, Coombes M, Luna MA, Lozano G (2001) p73 gene alterations and expression in primary oral and laryngeal squamous carcinomas. *Carcinogenesis* 22:729–735
41. Essers J, Vermeulen W, Houtsmuller AB (2006) DNA damage repair: anytime, anywhere? *Curr Opin Cell Biol* 18:240–246
42. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A (2003) Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348:1681–1691
43. Evans SR, Nolla J, Hanfelt J, Shabahang M, Nauta RJ, Shchepotin IB (1998) Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 4:1591–1595
44. Ferguson-Yates BE, Li H, Dong TK, Hsiao JL, Oh DH (2008) Impaired repair of cyclobutane pyrimidine dimers in human keratinocytes deficient in p53 and p63. *Carcinogenesis* 29:70–75
45. Fisher DE (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78:539–542
46. Ford JM (2005) Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* 577:195–202
47. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, Bowman ED, Mathe EA, Schetter AJ, Pine SR, Ji H, Vojtesek B, Bourdon J-C, Lane DP, Harris CC (2009) p53 isoforms, $\Delta 133p53$ and p53 β , are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* 11:1135–1142
48. Giglia-Mari G, Sarasin A (2003) TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 21:217–228
49. Glogau RG (2000) The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol* 42:23–24

50. Gloster HM, Brodland DG (1996) The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg AI* 22:217–226
51. Gong L, Pan X, Abali GK, Little JB, Yuan Z-M (2020) Functional interplay between p53 and $\Delta 133p53$ in adaptive stress response. *Cell Death Differ* 27:1618–1632
52. Greinert R, Volkmer B Gefährdungen durch verstärkte UV-Einstrahlung. 10
53. Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Lüthi AU, Pirnia F, Hügli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G, Tobler A (2001) Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* 8:1213–1223
54. Grochowski CM, Loomes KM, Spinner NB (2016) Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene* 576:381–384
55. Gupta A, Avci P, Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR (2013) Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Adv Wound Care* 2:422–437
56. 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
57. Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC (1999) Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res* 59:4165–4169
58. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP (1993) High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8:203–207
59. Hanlon A (2013) Metastatic Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology and Available Systemic Therapies. *Curr Dermatol Rep* 2:118–124
60. Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24:2899–2908
61. Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629–634
62. Henseleit U, Zhang J, Wanner R, Haase I, Kolde G, Rosenbach T (1997) Role of p53 in UVB-Induced Apoptosis in Human HaCaT Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109:722–727
63. 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
64. Hill NT, Zhang J, Leonard MK, Lee M, Shamma HN, Kadakia M (2015) 1α , 25-Dihydroxyvitamin D3 and the vitamin D receptor regulates $\Delta Np63\alpha$ levels and keratinocyte proliferation. *Cell Death Dis* 6:e1781
65. Holick MF (2003) Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 88:296–307
66. Holmes C, Foley P, Freeman M, Chong AH (2007) Solar keratosis: Epidemiology, pathogenesis, presentation and treatment. *Australas J Dermatol* 48:67–76

67. Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T (1983) Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 113:1950–1957
68. Humans IWG on the E of CR to (2012) SOLAR AND ULTRAVIOLET RADIATION. International Agency for Research on Cancer
69. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21–39
70. Jellouli-Elloumi A, Kochbati L, Dhraief S, Ben Romdhane K, Maalej M (2003) [Cancers arising from burn scars: 62 cases]. *Ann Dermatol Venereol* 130:413–416
71. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, Leffell DJ, Tarone RE, Brash DE (1996) Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14025–14029
72. Joruz SM, Bourdon J-C (2016) p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:
73. Kabir S, Schmults CD, Ruiz ES (2018) A Review of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Int J Cancer Manag* 11:
74. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90:809–819
75. Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stöppler C, Roth J, Dobbstein M (2002) p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 21:4715–4727
76. Kim M, Rhee J-K, Choi H, Kwon A, Kim J, Lee GD, Jekarl DW, Lee S, Kim Y, Kim T-M (2017) Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing. *Sci Rep* 7:
77. Kim RH, Kang MK, Kim T, Yang P, Bae S, Williams DW, Phung S, Shin K-H, Hong C, Park N-H (2015) Regulation of p53 during senescence in normal human keratinocytes. *Aging Cell* 14:838–846
78. Kim SB, Chae GW, Lee J, Park J, Tak H, Chung JH, Park TG, Ahn JK, Joe CO (2007) Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation. *Cell Death Differ* 14:982–991
79. Kuschal C, Thoms K-M, Schubert S, Schäfer A, Boeckmann L, Schön MP, Emmert S (2012) Skin cancer in organ transplant recipients: effects of immunosuppressive medications on DNA repair. *Exp Dermatol* 21:2–6
80. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15–16
81. Latonen L, Taya Y, Laiho M (2001) UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene* 20:6784–6793
82. Lefort K, Mandinova A, Ostano P, Kolev V, Calpini V, Kolfschoten I, Devgan V, Lieb J, Raffoul W, Hohl D, Neel V, Garlick J, Chiorino G, Dotto GP (2007) Notch1 is a p53 target

- gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases. *Genes Dev* 21:562–577
83. 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
 84. Leonard MK, Kommagani R, Payal V, Mayo LD, Shamma HN, Kadakia MP (2011) Δ Np63 α regulates keratinocyte proliferation by controlling PTEN expression and localization. *Cell Death Differ* 18:1924–1933
 85. Liefer KM, Koster MI, Wang X-J, Yang A, McKeon F, Roop DR (2000) Down-Regulation of p63 Is Required for Epidermal UV-B-induced Apoptosis. *Cancer Res* 60:4016–4020
 86. Liu-Smith F, Jia J, Zheng Y (2017) UV-Induced Molecular Signaling Differences in Melanoma and Non-melanoma Skin Cancer. *Adv Exp Med Biol* 996:27–40
 87. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F (2012) A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 166:1069–1080
 88. Marcel V, Vijayakumar V, Fernández-Cuesta L, Hafsi H, Sagne C, Hautefeuille A, Olivier M, Hainaut P (2010) p53 regulates the transcription of its Δ 133p53 isoform through specific response elements contained within the TP53 P2 internal promoter. *Oncogene* 29:2691–2700
 89. Marcel V, Dichtel-Danjoy M-L, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, Olivier M, Hall J, Mollereau B, Hainaut P, Bourdon J-C (2011) Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ* 18:1815–1824
 90. Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP, Gonzalez AL (2003) Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 63:7113–7121
 91. Matos P, Isidro G, Vieira E, Lacerda AF, Martins AG, Boavida MG (2001) P73 Expression in Neuroblastoma: A Role in the Biology of Advanced Tumors? *Pediatr Hematol Oncol* 18:37–46
 92. Matsumura Y, Ananthaswamy HN (2002) Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci J Virtual Libr* 7:d765-783
 93. McIntyre B, Asahara T, Alev C (2020) Overview of Basic Mechanisms of Notch Signaling in Development and Disease. *Adv Exp Med Biol* 1227:9–27
 94. Meredith P, Riesz J (2004) Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 79:211–216
 95. Miller JH (1983) Mutational Specificity in Bacteria. *Annu Rev Genet* 17:215–238
 96. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398:708–713
 97. Missero C, Antonini D (2014) Crosstalk among p53 family members in cutaneous carcinoma. *Exp Dermatol* 23:143–146

98. Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805–819
99. Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–299
100. Mocellin S, Nitti D (2008) Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 113:2398–2407
101. Moll PR, Sander V, Frischauf A-M, Richter K (2007) Expression profiling of vitamin D treated primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* 100:574–592
102. Moll UM, Slade N (2004) p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. *National Cancer Institute. Mol Cancer Res* 2:371–386
103. Müller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, Oren M, Koch A, Tannapfel A, Stremmel W, Melino G, Krammer PH (2005) TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* 12:1564–1577
104. Nishigori C (2015) Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 14:1713–1721
105. Norman AW (2006) Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147:5542–5548
106. Nowell CS, Radtke F (2017) Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 17:145–159
107. Nutthasirikul N, Limpaboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P (2013) Ratio disruption of the $\Delta 133p53$ and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 42:1181–1188
108. Ölschläger V, Schrader A, Hockertz S (2009) Comparison of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes with Immortalized Cell Lines Regarding their Sensitivity to Sodium Dodecyl Sulfate in a Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay. *Arzneimittelforschung* 59:146–152
109. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3156–3161
110. Pfaffl MW Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 4
111. Popadic S, Ramic Z, Medenica L, Mostarica Stojkovic M, Trajković V, Popadic D (2008) Antiproliferative effect of vitamin A and D analogues on adult human keratinocytes in vitro. *Skin Pharmacol Physiol* 21:227–234
112. Porojnicu AC, Robsahm TE, Ree AH, Moan J (2005) Season of diagnosis is a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a possible role of sun-induced vitamin D. *Br J Cancer* 93:571–574
113. Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, Millar SE, Pear WS, Parmacek MS (2006) Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* 66:7438–7444
114. PubChem Calcitriol. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280453>

115. Quigley DA, To MD, Pérez-Losada J, Pelorosso FG, Mao J-H, Nagase H, Ginzinger DG, Balmain A (2009) Genetic architecture of mouse skin inflammation and tumour susceptibility. *Nature* 458:505–508
116. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP (2001) Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 20:3427–3436
117. Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP (2010) Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* 2010:592980
118. Reichrath J, Reichrath S, Heyne K, Vogt T, Roemer K (2014) Tumor suppression in skin and other tissues via cross-talk between vitamin D- and p53-signaling. *Front Physiol* 5:
119. Reichrath J, Reichrath S, Vogt T, Römer K (2020) Crosstalk Between Vitamin D and p53 Signaling in Cancer: An Update. *Adv Exp Med Biol* 1268:307–318
120. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V (2011) Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene. *Genes Cancer* 2:466–474
121. Roemer K (2012) Notch and the p53 clan of transcription factors. *Adv Exp Med Biol* 727:223–240
122. Roy M, Pear WS, Aster JC (2007) The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17:52–59
123. Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T (2002) The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* 277:719–724
124. Sebag M, Gulliver W, Kremer R (1994) Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and calcium on growth and differentiation and on c-fos and p53 gene expression in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103:323–329
125. Shi H, Tao T, Huang D, Ou Z, Chen J, Peng J (2015) A naturally occurring 4-bp deletion in the intron 4 of p53 creates a spectrum of novel p53 isoforms with anti-apoptosis function. *Nucleic Acids Res* 43:1035–1043
126. Sinha RP, Singh SP, Häder D-P (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *J Photochem Photobiol B* 89:29–35
127. Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy ON (1997) Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci J Virtual Libr* 2:d538-551
128. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems N, Dimon M, Arron ST, Kluk MJ, Aster JC, McHugh A, Xue DJ, Dayal JH, Robinson KS, Rizvi SH, Proby CM, Harwood CA, Leigh IM (2014) NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 134:2630–2638
129. Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C (2013) Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Oncotargets Ther* 7:57–68
130. Trémezaygues L, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J (2009) 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes against UV-B-induced damage. *Dermatoendocrinol* 1:239–245

131. Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D (1998) A new human p53 homologue. *Nat Med* 4:747–748
132. van der Pols JC, Russell A, Bauer U, Neale RE, Kimlin MG, Green AC (2013) Vitamin D Status and Skin Cancer Risk Independent of Time Outdoors: 11-Year Prospective Study in an Australian Community. *J Invest Dermatol* 133:637–641
133. van Hoffen A, Venema J, Meschini R, van Zeeland AA, Mullenders LH (1995) Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J* 14:360–367
134. Vantieghem K, Kissmeyer A-M, De Haes P, Bouillon R, Segaert S (2006) UVB-induced production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D activity in human keratinocytes pretreated with a sterol delta7-reductase inhibitor. *J Cell Biochem* 98:81–92
135. Wadhera A, Fazio M, Bricca G, Stanton O (2006) Metastatic basal cell carcinoma: a case report and literature review. How accurate is our incidence data? *Dermatol Online J* 12:7
136. 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
137. 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
138. Xiu M-X, Liu Y-M, Kuang B-H (2020) The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 129:110416
139. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2:305–316
140. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2:305–316
141. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714–718
142. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F, Caput D (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404:99–103
143. Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T (2007) Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27:3732–3742
144. Zhang M, Biswas S, Qin X, Gong W, Deng W, Yu H (2016) Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? *Cancer Med* 5:
145. Zhou W, Suk R, Liu G, Park S, Neuberg DS, Wain JC, Lynch TJ, Giovannucci E, Christiani DC (2005) Vitamin D is associated with improved survival in early-stage non-

- small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 14:2303–2309
146. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773–776
 147. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773–776
 148. Zinser GM, Sundberg JP, Welsh J (2002) Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis. *Carcinogenesis* 23:2103–2109
 149. (2018) S3 Leitlinie Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut. 198
 150. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. - PubMed - NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8176018?dopt=Abstract>
 151. Kapitel2_Epidemiologie.pdf. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile
 152. Tobacco smoking, snuff dipping and the risk of cutaneous squamous cell carcinoma: a nationwide cohort study in Sweden. - PubMed - NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15770206>
 153. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells - Alscher - 1997 - *Physiologia Plantarum* - Wiley Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04778.x>
 154. Das Tumorsuppressor-Homologe p63 als Modulator des Wnt-Signalweges | Request PDF. URL: https://www.researchgate.net/publication/36724740_Das_Tumorsuppressor-Homologe_p63_als_Modulator_des_Wnt-Signalweges
 155. The molecular basis of Notch signaling: a brief overview. - PubMed - NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399335>
 156. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and serrate: Implications for notch as a multifunctional receptor - ScienceDirect. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867491900646>
 157. (PDF) TP53 Tumor Suppressor Gene and Skin Carcinogenesis. URL: https://www.researchgate.net/publication/15234909_TP53_Tumor_Suppressor_Gene_and_Skin_Carcinogenesis
 158. Doktorarbeit_Lea.pdf. URL: https://publikationen.sulb.uni-saarland.de/bitstream/20.500.11880/21362/1/Doktorarbeit_Lea.pdf
 159. Down-Regulation of p63 Is Required for Epidermal UV-B-induced Apoptosis | Cancer Research. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/15/4016>
 160. PII: S1011-1344(01)00204-4 | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1011134401002044?token=26C07062A68CEC3501E7AAAC1F89655D8A9853CC4ADE742E412AC4F420107B24E1A51164C8D00E2597735973E2507BFE&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210713154737>

Abbildungen – Quellen inklusive URL-Links:

Zu Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für die verschiedenen Formen des nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland.

Die Daten stammen aus Schleswig-Holstein, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz, Mecklenburg-Vorpommern und Regionalbezirk Münster, 2005-2013, aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten. Bereits Daten aus diesem kurzen Zeitraum von 2005 bis 2013 zeigen einen deutlichen Anstieg der Inzidenz von weißem Hautkrebs in Deutschland an.

(Online-Abbildung aus dem Zentrum für Krebsregisterdaten:

URL:

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Grafiken/Online/2_9_o4.png?blob=publicationFile (28.12.2023))

Zu Abbildung 2: Spektrum des UV-Lichts und dessen wellenlängenabhängiges Eindringen in die Haut

Die Eindringtiefe in die Haut nimmt mit zunehmender Wellenlänge zu. Die kürzeren hochenergetischen Wellenlängen werden stärker gestreut, somit erreicht das UVB-Licht hauptsächlich die Epidermis, während die weniger energiereichen langwelligen UVA-Strahlen bis in die Dermis eindringen.

(Abbildung aus dem Artikel Gupta A, Avci P, Dai T, Huang YY, Hamblin MR. *Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013 Oct;2(8):422-437. doi: 10.1089/wound.2012.0366. PMID: 24527357; PMCID: PMC3797459. URL:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797459/pdf/wound.2012.0366.pdf> (28.12.2023))

Zu Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des p53-Signalweges bei DNA-Schaden

Durch einen DNA-Schaden in der Zelle erfolgt eine Phosphorylierung des p53 durch die Proteinkinase ATM, wodurch die Dissoziation der Ubiquitin-Ligase Mdm2 und p53 erfolgt. P53 wird dadurch stabilisiert und fungiert u.a. als Transkriptionsfaktor für das p21-Gen. Das p21-Protein hemmt wiederum den CDK2/Cyclin E-Komplex, welcher eigentlich das Retinoblastomprotein (pRB) phosphoryliert. Wird das Rb-Protein nicht phosphoryliert so bleibt es aktiv und kann somit den Transkriptionsfaktor E2F nicht freisetzen, wodurch der Übergang in die S-Phase blockiert wird (Zellzyklus-Arrest).

(Online-Abbildung von MEDI-LEARN, URL: <file:///C:/Users/madel/OneDrive/Abbildungen/Bc4-24-1.pdf> (28.12.2023))

Zu Abbildung 7: Visualisierung der Schnittebenen der Membranen zur Untersuchung von TP53 mit vorgefärbter Proteinleiter

Geschnitten wurde oberhalb 90 kDa und unterhalb 35 kDa, da sich die uns interessierenden Proteine dazwischen befinden: p53 mit seinem Molekulargewicht von 53 kDa Molekulargewicht von β -Actin 43 kDa.

(Online-Abbildung einer vorgefärbten Proteinleiter von fisherscientific: URL:

<https://www.fishersci.de/shop/products/fisher-bioreagents-ez-run-prestained-i-rec-i-protein-ladder-3/10638393> (28.12.2023))

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung einiger Personen nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Reichrath, meinem Doktorvater und Lehrer, dessen Geduld und wissenschaftliche Expertise mich vieles gelehrt hat und der mich mit seiner Begeisterungsfähigkeit stets in meinem Handeln bestärkte.

Herrn Prof. Dr. Thomas Vogt, dem ich für die Unterstützung und die herzliche Aufnahme in die *Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums des Saarlandes* danken möchte.

Dem *José-Carreras-Zentrum* des Universitätsklinikum des Saarlandes und hier insbesondere Herrn Prof. Dr. Klaus Römer, der mich stets dazu ermutigte, nachzufragen und zu hinterfragen.

Zudem möchte ich mich beim Institut für *Medizinischen Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI)* der Universität des Saarlandes und hier insbesondere bei Frau Gudrun Wagenpfeil, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Alexandra Stark, derer Unterstützung als Freundin und Kollegin ich mir immer sicher sein konnte. Ebenso möchte ich Anne Kerber und Sonja Dauskardt für eine Labor-Atmosphäre danken, wie sie herzlicher nicht hätte sein können.

Meinen Freunden, die mir gezeigt haben, dass alles halb so wild ist und manchmal sogar wunderschön sein kann, wenn man mit den richtigen Leuten im selben Boot sitzt.

Und meiner Familie und hier vor allem den stets beruhigenden Worten meiner Mutter und den motivierenden Gesprächen mit meinem Vater, der nie müde wurde, mich daran zu erinnern "das Ding nicht kalt werden zu lassen". Meiner Schwester, der es, wenn mich der Unmut überkam, immer gelang, mir die schönen Seiten des Lebens näherzubringen und meinem Bruder, auf den stets Verlass ist.

8 Lebenslauf

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

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für die verschiedenen Formen des nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland	2
Abbildung 2:	Spektrum des UV-Lichts und dessen wellenlängenabhängiges Eindringen in die Haut.....	4
Abbildung 3:	Vereinfachte Darstellung des p53-Signalweges bei DNA-Schaden	11
Abbildung 4:	Isoformen des Tumorsuppressorproteins p53	12
Abbildung 5:	Vitamin D-Metabolismus.....	20
Abbildung 6:	Screenshot der Run Method für die qRT-PCR.....	37
Abbildung 7:	Visualisierung der Schnittebenen der Membranen zur Untersuchung von TAp53 mit vorgefärbter Proteinleiter	41
Abbildung 8:	Relative TAp53-Transkriptmengen in primären Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung.....	45
Abbildung 9:	Relative TAp53-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	47
Abbildung 10:	Relative TAp53-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	48
Abbildung 11:	TAp53-Protein in primären Keratinozyten 8- und 24 h nach UVB-Bestrahlung	49
Abbildung 12:	TAp53-Protein in primären Keratinozyten 4h nach UVB-Bestrahlung und unter Vitamin D-Behandlung.....	50
Abbildung 13:	TAp53-Protein in HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung.....	50
Abbildung 14:	TAp53-Protein in SCL-1 Zellen nach UVB-Bestrahlung und Vitamin D-Behandlung	51
Abbildung 15:	Relative $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	52
Abbildung 16:	Relative $\Delta 133p53$ -Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	53

Abbildung 17: Relative Δ 133p53-Transkriptmenge in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	54
Abbildung 18: Relative TAp63-Transkriptmenge in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung..	55
Abbildung 19: Relative TAp63-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und Vitamin D-Behandlung.....	56
Abbildung 20: Relative TAp63-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit Vitamin D-Behandlung	57
Abbildung 21: Relative Δ Np63-Transkriptmengen in NFK-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	58
Abbildung 22: Relative Δ Np63-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	59
Abbildung 23: Relative Δ Np63-Transkriptmenge in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	60
Abbildung 24: Relative TAp73-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	61
Abbildung 25: Relative TAp73-Transkriptmenge in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen und zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	62
Abbildung 26: Relative TAp73-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	62
Abbildung 27: Relative Δ Np73-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	63
Abbildung 28: Relative Δ Np73-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	64
Abbildung 29: Relative Δ Np73-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	65
Abbildung 30: Relative JAG1-Transkriptmengen in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung..	66
Abbildung 31: Relative JAG1-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	67

Abbildung 32: Relative JAG1-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	68
Abbildung 33: Relative JAG2-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	69
Abbildung 34: Relative JAG2-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	70
Abbildung 35: Relative JAG2 Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	71
Abbildung 36: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	72
Abbildung 37: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	73
Abbildung 38: Relative NOTCH1-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	74
Abbildung 39: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	75
Abbildung 40: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	76
Abbildung 41: Relative NOTCH2-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	77
Abbildung 42: Relative VDR-Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung..	78
Abbildung 43: Relative VDR-Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	79
Abbildung 44: Relative VDR-Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	80
Abbildung 45: Relative RXR- α -Transkriptmengen in normalen Keratinozyten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung	81

- Abbildung 46: Relative RXR- α -Transkriptmengen in HaCaT-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung82
- Abbildung 47: Relative RXR- α -Transkriptmengen in SCL-1-Zellen nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen mit zusätzlicher Vitamin D-Behandlung83

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Pipettierschema für die Vitamin D-Behandlung der Zellkulturplatten	29
Tabelle 2:	Beispielhaftes Pipettierschema für HaCaT, Passage 55 mit den untersuchten Genen JAG1, JAG2 und VDR	36
Tabelle 3:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Western Blot-Untersuchungen	39
Tabelle 4:	Übersicht der Zunahme der Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien infolge einer hohen UVB-Dosisexposition	84
Tabelle 5:	Übersicht der Abnahme der Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien infolge einer hohen UVB-Dosisexposition	85
Tabelle 6:	Übersicht der gegenläufigen Effekte der hohen UVB-Exposition auf die Transkriptmengen in den verschiedenen Zelllinien.....	85

9.3 Verwendete Materialien

Verwendete Zellen

Zelltyp	Hersteller
NHEK.f-p single donor	PromoCell, Heidelberg, Deutschland (Cat No. C12002),
HaCaT-Zellen	CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland
SCL-1-Zellen	CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland

Verwendete Kulturmedien und Mediumzusätze

Medien/Zusätze	Hersteller
Keratinocyte Growth Medium 2 + Supplement Mix/, Keratinocyte growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, fisher scientific/ Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
RPMI-Medium1640	Gibco, fisher scientific/ Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Kits mit Herstellerangaben

Reagenzien, Chemikalien, Kits	Hersteller
HEPES BSS	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin EDTA	Gibco, fisher scientific/ Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
TNS (Trypsin Neutralization Solution)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol absolute for analysis	Emsure ®
1 α ,25 Dihydroxyvitamin D ₃	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Cat. No. 17936-1MG-F)
RNase-freies Wasser Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphatgepufferte Standardsalzlosung)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Detach Kit (für NHEK)	PromoCell (Cat No.: C-40010)
miRNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat No.: 217004)
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat No.:74104)
Omnicript RT Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat No.: 205111)
QIAshredder (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat No.: 79654)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit for 1000 x 50 μ l reactions	Qiagen, Hilden, Deutschland Cat. No.: 204145
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, USA (Cat No. N251B)
QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix 1,7	Qiagen, Hilden, Deutschland
ROTIPHORESE®Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Detection Reagent 1 Peroxidase Solution und Detection Reagent 2 Luminol-Enhancer Solution aus dem Pierce™ Peroxidase IHC Detection Kit	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA

Verwendete Primer, Zusätze und Antikörper

Primer, Zusätze und Antikörper	Hersteller
Random Primers, 20 µg	Promega, Madison, Wisconsin, USA (Cat No.: C118A)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_RRN18s_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00199367)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_GAPDH_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00079247)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_ACTB_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00095431)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_RXRA-1SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat.No. QT00005726)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_VDR_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT01010170)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_NOTCH1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00231056)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_NOTCH1_2_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00072212)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_JAG1_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00031948)
Quanti Tect® Primer Assay Hs_JAG2_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland (Cat. No. QT00054397)
Primer der p53-Familie: Custom Primers Forward TAp53 CGCAGTCAGATCCTAGCGTC Reverse TAp53 CTGGACCTGGGTCTTCAGTG Forward Δ133p53 GGTTGCAGGAGGTGCTTACAC Reverse Δ133p53 GTTGAGGGCAGGGGAGTACTG Forward TAp63 GTCCCAGAGCACACAGACAA Reverse TAp63 GAGGAGCCGTTCTGAATCTG Forward DNp63 CTGGAAAACAATGCCAGAC Reverse DNp63 GGGTGATGGAGAGAGAGCAT Forward TAp73 GGCTGCGACGGCTGCAGAGC Reverse TAp73 GCTCAGCAGATTGAACTGGGCCATG Forward DNp73 CAAACGGCCCGCATGTTCCC Reverse DNp73 TGGTCCATGGTGCTGCTCAGC Basierend auf Nutthasirikul N, Limpiboon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P (2013) <i>Ratio disruption of the Δ133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma</i> . Int J Oncol 42:1181–1188.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Monoclonal Anti p53-Antibody produced in mouse	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Cat. No. P6874-200UL)
Anti-p53 (Ab-6) (Pantropic) Mouse mAb (DO-1) Calbiochem®	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Recombinant Anti-p63 antibody [EPR5701] (ab124762)	Abcam, Cambridge, England (Cat. No. 124762)
Ab735 250 µl MsmAb to p63 [4A4] Mouse Monoclonal antibody	Abcam, Cambridge, England
Anti-β-Actin monoclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Disposable Cell Scraper [Sterile]	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen: Cellstar®, 60 x 15 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen: Cellstar®, 100 x 20 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen: Cellstar® 259ml, 75 cm ²	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
6 Well Cell Cultur Plate Cellstar®	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte, 0,1 ml	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp™ optische Klebefolie	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminescence film, 180 x240 mm	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Immobilon®-P PVDF-Membran, Porengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
1 ml Soft Ject® Einmalspritze	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
BD Microlance 3 – Kanülen, 0,3 x 13 mm, gelb, 30G 1/2	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland

Verwendete Geräte und Softwares

Geräte	Hersteller
RF 3000 Pipettierhilfe mit Lithium-Ionen Akku	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Zellzähler: Septer	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
Mikroliterspritze Serie 700 Spitzentyp 3, 50 µl	Hamilton, Reno, Nevada, USA
Thermo Heraeus Megafuge 1.0R Refrigerated Centrifuge	Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland
Kältezentrifuge Universal 320/ 320 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Gekühlte Mikroliterzentrifuge Z 216 MK	Hermle, Gosheim, Deutschland
Mikrozentrifuge: SIGMA 1-15 PK	Satorius, Goettingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator mit FPI-Sensorsystem und Regler PPI, APT.line™ Serie C150 (E2)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
UVB-Strahler: UVP-Crosslinker CL-1000	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Sterilbank Laminair® HB 2448 GS	Heraeus, Hanau, Deutschland
NanoVue™ Plus Spectrophotometer	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA / Amersham Bioscience, Amersham, England
PowerPac 200 Netzteil Elektrophorese Supply	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
MR 3001 K Magnetrührer mit Heizung	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Elektrophoreseeinheit - TE62 Standard Transfer Tank with Cooling Chamber	Hoefer Inc., Holliston, Massachusetts, USA
Elektrophoresekammer	Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Real-Time PCR-System StepOnePlus	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
SPSS (Statistical Package für Social Sciences)	IBM, Armonk, New York, USA
Programmiersprache Python	Python Software Foundation, Wilmington, Delaware, USA

Tag der Promotion: 17.07.2024
Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Reichrath
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth