

**Die Rolle des Arylhydrocarbon Rezeptors
in der zellulären Antwort
auf ionisierende Strahlung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Marie-Christine Rothmund
aus Weingarten

Tübingen

2010

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.12.2010

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Michael Schwarz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Peter Rodemann

Für Daniel

ZUSAMMENFASSUNG

Da Krebserkrankungen mittlerweile in den Industrienationen die zweithäufigste Todesursache sind und in Zeiten kontinuierlich steigender Lebenserwartung weiter zunehmen werden, ist es überaus wichtig, die Entstehung und Regulation von entarteten Zellen zu verstehen. Nur so können auch bessere Behandlungsmethoden gefunden werden. Die Strahlentherapie ist neben chirurgischen Eingriffen und chemotherapeutischen Methoden eine der wichtigsten Behandlungsart von onkologischen Erkrankungen. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland inzwischen im Bereich von 54 % bis 61 %, unter anderem resultierend aus der Behandlung mit Bestrahlung. Die Aufklärung der Reparaturregulation von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt für die Optimierung der Strahlentherapie und damit für den Erfolg der Behandlung eine wesentliche Rolle.

Das Ziel vorliegender Arbeit war, die Rolle des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR) bei der Regulation der Zellantwort nach ionisierender Strahlung zu untersuchen. Für den AhR ist bislang nur eine Aktivierung nach UV-Strahlung dokumentiert. Es konnte gezeigt werden, dass ionisierende Bestrahlung den AhR im Cytoplasma stabilisiert und dass er in den Zellkern transportiert wird. Durch die Induktion des AhR Zielgens CYP1A1 auf mRNA Ebene konnte nachgewiesen werden, dass der AhR durch ionisierende Strahlung aktiviert wird. Ebenso kommt es zur Aktivierung der im Multiproteinkomplex mit dem AhR vorliegenden c-Src-Kinase. Das Hauptprodukt der Lipidperoxidation Hydroxynonenal stabilisiert cytoplasmatisch den AhR, aktiviert die c-Src-Kinase und der AhR wird in den Kern transportiert. Mit dem Radikalfänger Acetylcystein kann die strahleninduzierte Stabilisierung des AhR und dessen Kerntransport unterdrückt werden. Des Weiteren führt ein knock-down des AhR-Proteins durch siRNA oder shRNA sowohl zu einem erhöhten DNA-Restschaden nach Bestrahlung als auch zu einer Radiosensitivierung im klonogenen Überleben in den untersuchten Zelllinien. Die Hemmung der AhR-Proteinexpression beeinflusst den aktivitätsassoziierten Phosphorylierungszustand der DNA-PK am Threonin Nr. 2609 und am Serin Nr. 2056.

Erstmals konnten AhR-Protein-Foci, die in ähnlichem Zeitverlauf wie γ H2AX-Foci auftraten, im Zellkern nach ionisierender Strahlung nachgewiesen werden. Der AhR wurde im immunpräzipitierten Komplex gemeinsam mit γ H2AX, mit der DNA-PK sowie deren phosphorylierten Formen gefunden. Mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie konnte eine Kolokalisation des AhR und γ H2AX nachgewiesen werden. Jedoch zeigt sich nicht in allen γ H2AX-Foci eine Kolokalisation mit dem AhR. Die Bildung der γ H2AX-Foci ist allerdings durch AhR-Protein-knock-down nicht beeinträchtigt.

Zusammenfassend formuliert zeigt die vorliegende Arbeit zum ersten Mal, dass der AhR in die zelluläre Antwort auf ionisierende Bestrahlung humaner Zellen involviert ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der AhR mit der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung interagiert und der Zelle beim Überleben hilft.

SUMMARY

Today cancer is the second main cause of death in industrialized nations. In times of continuously rising life expectancy this problem will even increase. Thus it is most important to understand the formation of abnormal cells and their regulation. With this understanding new ways in the therapy of cancer can be found. Radiotherapy is a very important method of treatment in oncology along with surgery and chemotherapy. The five-year-survival-rate in Germany ranges between 54 % and 61 %, which is among other reasons due to radiotherapy. The elucidation of the repair regulation of DNA-double strand breaks plays an important role in optimizing radiotherapy and is therefore crucial for therapy success.

Herein we identified the AhR as a new component in the regulation of post irradiation cell response after treatment with ionizing radiation. Uptodate the AhR was known to be activated by aromatic compounds and UV-irradiation exclusively.

We could show that irradiation stabilizes the AhR in cytoplasm and leads to its translocation into the nucleus. The induction of the Cyp1A1 on mRNA level revealed that the activation of the AhR is due to ionizing radiation. The src kinase, which is located in the cytoplasmic multi protein complex together with AhR, is also activated. Hydroxynonenal, one of the main products of lipid peroxidation, stabilizes AhR in cytoplasm, activates the src kinase and translocates the AhR into the nucleus. Using the radical scavenger acetylcysteine the irradiation induced stabilization and translocation of the AhR into the nucleus can be inhibited. The knock down of the AhR protein using siRNA and shRNA results in a radiosensitisation in clonogenic survival and a higher degree of residual DNA damage. Inhibition of the AhR protein expression influences the activity-associated phosphorylation status of DNA-PK residues threonin 2609 and serin 2056.

One of the key findings of the current study is the observation of AhR foci after ionizing radiation. The AhR is found in immunoprecipitated complex together with γ H2AX and activated DNA-PK. Confocal microscopy showed the colocalisation of AhR and γ H2AX, but this is not the case in all foci. After an AhR protein knock down the γ H2AX foci formation is not affected.

In conclusion the obtained results of this study showed for the first time the interaction of AhR in human cells in response to ionizing radiation. These results give a hint that AhR is involved in DNA-double strand break repair after ionizing radiation and enhances cell survival.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	V
SUMMARY	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	VIII
ABKÜRZUNGEN	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Strahlentherapie und damit einhergehende DNA-Schäden	1
1.2 DNA-DSB Detektion mit Hilfe von γH2AX	3
1.3 Der Arylhydrocarbon Rezeptor – Struktur und Signalwege	4
1.4 AhR-Liganden und Zielgene der CYP-Familie	8
1.5 Zielsetzung	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Material	11
2.1.1 Zellen und Zellkulturmedium.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	11
2.1.3 Chemikalien	12
2.1.4 Radiochemikalien.....	12
2.1.5 Geräte	12
2.1.6 Lösungen und Puffer	12
2.1.7 Inhibitoren und siRNA	14
2.1.8 Antikörper	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 Bestrahlung.....	16
2.2.3 Koloniebildungstest.....	16
2.2.4 γ H2AX-Assay	16
2.2.5 Proteinaufarbeitung & Kernextraktion.....	17
2.2.6 Western-Blot-Analyse	17
2.2.7 Immunpräzipitation	18
2.2.8 Behandlung mit Inhibitoren	18
2.2.9 Transfektion mit siRNA	18
2.2.10 Densitometrische Auswertung und Statistik	18
2.2.11 Radioaktive Markierung von Proteinen	19
2.2.12 Lightcycler-PCR.....	19

2.2.13 RNA-Isolierung	19
2.2.14 cDNA Synthese durch Reverse Transkription	20
2.2.15 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	21
2.2.16 Konfokale Mikroskopie.....	21
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Strahleninduzierte Aktivierung bzw. Stabilisierung des AhR.....	22
3.1.1 Stabilisierung des AhR durch UV-B Strahlung	22
3.1.2 Stabilisierung des AhR durch ionisierende Strahlung.....	23
3.2 Stabilisierung bzw. Aktivierung des AhR durch Chemikalien.....	25
3.2.1 Aktivierung des AhR durch den klassischen Induktor 3-Methylcholanthren.....	25
3.2.2 Behandlung mit 3-Methylcholanthren kombiniert mit ionisierender Strahlung	26
3.2.3 Hemmung von Hsp90 im AhR-Multiproteinkomplex	27
3.2.4 Behandlung mit Hydroxynonenal und in Kombination mit ionisierender Strahlung	28
3.3 Reaktive Sauerstoffspezies nach ionisierender Strahlung - sind sie verantwortlich für den Strahleneffekt?	30
3.3.1 Behandlung von Zellen mit dem Radikalfänger Acetylcystein	30
3.3.2 Inhibition von endogene Radikalen.....	31
3.4 Hemmung der AhR-Proteinexpression	32
3.4.1 Hemmung durch siRNA.....	32
3.4.2 Stabile Hemmung der AhR-Expression durch shRNA	35
3.5 Die AhR-Hemmung führte zu einer Radiosensitivierung und zu einem erhöhten DNA-Restschaden.....	37
3.5.1 AhR Reduktion durch siRNA - Effekte auf das klonogene Überleben und den DNA- Restschaden	37
3.5.2 Einfluss einer AhR-Hemmung durch shRNA auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung	38
3.5.3 Einfluss von AhR-shRNA auf die Reparatur von residualen DNA- Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung	39
3.6 Effekt des klassischen AhR-Induktors 3-Methylcholanthren auf das klonogene Überleben	40
3.7 Einfluss von ARNT auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung.....	41
3.8 CYP1A-Expression nach ionisierender Strahlung - welche Rolle spielt das fremdstoffmetabolisierende Enzym nach ionisierender Strahlung.....	43

3.8.1 Lightcycler PCR-Analyse des CYP1A1 mRNA Level in A549 und Hepal1c7 nach ionisierender Strahlung	43
3.8.2 CYP1A1-Expression nach ionisierender Strahlung - Auswirkungen auf die Überlebensrate.....	44
3.8.3 Auswirkung der CYP1A-Expression auf den DNA-Restschaden nach ionisierender Strahlung	46
3.9 AhR-Foci-Formation im Kern nach stabiler Hemmung der AhR-Expression durch shRNA	47
3.9.1 Induktionskinetik im Vergleich zu den γ H2AX-Foci in A549 Tumorzellen.....	47
3.9.2 Induktion von AhR-Foci nach 3-Methylcholanthren-Behandlung	48
3.9.3 Induktion von AhR-Foci in AhR-shRNA-knock-down-Zellen	49
3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern des AhR im Kern bei der DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung	50
3.11 Konfokale Mikroskopie als weiterer Nachweis für die AhR Kolokalisation mit γH2AX im Kern nach ionisierender Strahlung	52
3.11.1 γ H2AX und AhR Kolokalisation in A549-Zellen.....	52
3.11.2 γ H2AX und AhR Kolokalisation in HaCat-Zellen.....	53
3.11.3 Konfokale Mikroskopie in HaCat Leervektor-Zellen - AhR und DNA-PK.....	55
3.12 Beeinflusst der AhR die Zellzyklusregulation oder den MRN-Komplex nach ionisierender Strahlung?	56
4 DISKUSSION.....	58
4.1 Aktivierung des AhR nach ionisierender Strahlung.....	58
4.2 Welchen Effekt hat eine AhR-Proteinreduktion auf die Zelle?	62
4.3 Ist die transkriptionelle Aktivität des AhR nach ionisierender Strahlung von Bedeutung?	63
4.4 Bilden sich AhR-Protein-Foci nach ionisierender Strahlung?.....	64
4.5 Welche Moleküle könnten AhR Interaktionspartner im Kern sein?	65
5 AUSBLICK.....	69
6 LITERATUR.....	70
7 ANHANG	84
7.1 Danksagung.....	84
7.2 Lebenslauf.....	85

ABKÜRZUNGEN

(k)V	(Kilo-) Volt
(μ)M	(Mikro) Molar
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AIP	AhR interacting protein
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	AhR Nuklear Translokator
ATM	Ataxia telangiectasia mutiert
BER	Basen-Excisionsreparatur
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
CYP	Cytochrom p450
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbeco's Modified Eagels Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRE	Dioxin Responsives Element
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzyme linked immunsorbent assay
FACS	Durchflußcytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum
FICZ	Formylindolocarbazol
Gy	Gray
H ₂ Odest	Destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HNE	Hydroxynonenal
HR	Homologe Rekombination
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IP	Immunpräzipitation
IR	Ionisierende Strahlung
IRIF	Strahleninduzierte Foci
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC-PCR	Lightcycler Polymerasekettenreaktion
LFA	Lipofectamin TM 2000
Lsg.	Lösung
LV	Leervektor
mA	Milliampere
MAP	Mitogen activated protein

min	Minute
ml	Milliliter
MMR	Mismatch-Reparatur
MRN	Mre11, Rad 50, Nbs1
NAC	N-Acetylcystein
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nukleotid- Excisionsreparatur
NES	Nukleäre Exportsequenz
NHEJ	Nicht homologes Endjoinig
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per Arnt Sim
PAHs	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIKK	PI ₃ Kinase-related Kinases
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SF	Survival fraction/Überlebensrate
siRNA	Small interfering RNA
shRNA	Small hairpin RNA
Src	Homolog zu v-Src (sarcoma viral oncogene)
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris Base	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV-B	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
wt	Wildtyp
XAP2	hepatitis B virus X-associated protein
XRE	Xenobiotisch Responsives Element
μ	Mikro

1 EINLEITUNG

Das Robert-Koch-Institut beziffert die Zahl der Krebsdiagnosen in Deutschland auf circa 450.000 pro Jahr. Die Sterberate liegt bei den Erkrankten etwa bei der Hälfte. Das Risiko einer Frau, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken, beträgt 38 % im Vergleich zu 47 % für Männer [Robert-Koch-Institut, 2010].

1.1 Strahlentherapie und damit einhergehende DNA-Schäden

Die Haupttherapieformen bei Krebserkrankungen sind Strahlen- und Chemotherapie sowie chirurgische Eingriffe. Dabei kommt heutzutage die Strahlentherapie bei mehr als jedem zweiten Tumorpatienten zum Einsatz. Sie stellt ein vielseitig einsetzbares Behandlungskonzept in der Tumorthherapie dar und kann hier neoadjuvant oder adjuvant genutzt werden. Eine zunehmende Bedeutung nimmt die Strahlentherapie in der palliativen Behandlung fortgeschrittener Tumorleiden ein. Als Standardstrahlentherapie werden hochenergetische Photonen eingesetzt, die durch Linearbeschleuniger produziert werden [Van Dyk, 1999]. Die Modalität der Bestrahlung, der Umfang ihres Einsatzes sowie letztendlich der Behandlungserfolg sind dabei von verschiedenen Faktoren abhängig. So hat neben der Operabilität und dem Allgemeinzustand des Patienten besonders auch das Ansprechen des jeweiligen Gewebes auf ionisierende Strahlung einen wesentlichen Einfluss auf Einsatz und Erfolg dieser Therapieform. Dies kann nahezu 100 % Heilung bedeuten, genauso jedoch gibt es Tumore, die mit Strahlentherapie alleine nicht kurierbar sind [Suit, 2002]. Ebenso variabel stellt sich die Normalgewebsreaktion nach einer therapeutischen Bestrahlung dar [Bentzen & Overgaard, 1994; Turesson *et al.*, 1996].

Der Einsatz ionisierender Strahlen in therapeutischer Absicht hat die Zerstörung des krankhaften Gewebes unter möglicher Schonung des gesunden Nachbargewebes zum Ziel. Der angestrebte Zelltod resultiert dabei aus den erzeugten Schäden in den bestrahlten Zellen. Dabei kann die Strahlung entweder direkt an biologisch wichtigen Molekülen, insbesondere der DNA wirken oder aber indirekt über Radikalbildung. Diese erfolgt vorwiegend über die Radiolyse von Wasser unter Bildung von Hydroxydionen und Peroxiden [Zaider *et al.*, 1994]. Die entscheidende Zielstruktur stellt in jedem Fall die DNA einer Zelle dar, diese kann dabei verschiedene Läsionsformen aufweisen. Zu den wichtigsten strahleninduzierten Schäden gehören Basenschäden, DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), Quervernetzungen in der DNA, Verbindungen zwischen der DNA und Proteinen sowie

Denaturierungen. Die induzierten DNA-Doppelstrangbrüche stellen im Vergleich zu den anderen erwähnten Schäden die vital bedrohlichsten Läsionen des Genoms dar und sind Hauptursache strahleninduzierter Chromosomenaberrationen [Morgan *et al.*, 1998]. Durch jedes Gray (Energiedosis, 1 Gray = 1 Joule x kg⁻¹) wird ein Doppelstrangbruch pro 0,2 x 10⁹ Basenpaare DNA erzeugt [Cedervall *et al.*, 1995]. Bei einer humanen Zelle bedeutet dies, dass circa 40 DNA-Doppelstrangbrüche, 1000 Einzelstrangbrüche und 2700 Schäden an Basen pro Gray entstehen. Betrachtet man die klinisch relevanten Dosen von 2-3 Gy/Fraktion/Tag, wird klar, wie groß das Schadenspotential ionisierender Strahlung ist. Gelingt es der Zelle, diese entstandenen Schäden effektiv zu reparieren, so kann sie dem Zelltod entgehen. Ist sie dazu nicht oder nicht ausreichend in der Lage, so resultieren Zellzyklusarrest, mitotischer Zelltod oder Entartung [Hoeijmakers, 2001; Olive, 1998; Rich *et al.*, 2000; Vamvakas *et al.*, 1997]. Strahleninduzierte Schäden können in reparaturprofizienten Zellen binnen weniger Minuten bis Stunden durch unterschiedliche Prozesse repariert werden. Die Reparaturmechanismen der DNA haben somit einen wesentlichen Einfluss auf die Wirkung bzw. auf das Überleben einer Zelle im Anschluss an die Bestrahlung. Man unterscheidet zwei Hauptreparaturformen von DNA-Doppelstrangbrüchen - das NHEJ (non-homologous-end-joining) und die Reparatur durch Homologe Rekombination (HR). Mit HR ist eine sehr exakte Reparatur unter Verwendung von homologer DNA in Form von Schwesterchromatiden möglich. Jedoch ist der Reparaturprozess mit Hilfe von HR nur in der späten S- und in der G2-Phase des Zellzyklus verfügbar. Die weitaus weniger exakte Reparatur des NHEJ, die ohne Verwendung homologer DNA-Abschnitte einhergeht, kann jedoch auch durchgeführt werden, wenn sich die Zelle in der G0/G1- oder in der S-Phase befindet. Ein fehlerhafter Ablauf dieses Reparaturprozesses kann zur Entstehung von Chromosomenaberrationen wie z. B. dizentrischen Chromosomen führen [Friedberg *et al.*, 2006]. Der genaue Ablauf dieser Reparaturwege stellt einen komplizierten und nur unvollständig verstandenen Prozess dar, an dem zahlreiche Faktoren wie p53, ATM und DNA-PKcs beteiligt sind [Bassing & Alt, 2004; Hoeijmakers, 2001; Kanaar *et al.*, 1998; Peterson & Cote, 2004]. Die Anwesenheit der DNA-PK am DNA-Schaden und im Speziellen deren Aktivierungszustand spielen dabei eine essentielle Rolle und ist somit maßgeblich an der Qualität der nicht homologen DNA-Reparatur (NHEJ) beteiligt [An *et al.*, 2010; Povirk *et al.*, 2007; Weterings & Chen, 2007].

1.2 DNA-DSB Detektion von Hilfe von γ H2AX

In dieser Arbeit wurde die Reparatur von DSB nach ionisierender Strahlung in Zusammenhang mit dem AhR näher untersucht. Voraussetzung für eine solche Untersuchung ist die Detektion von DNA-Schäden. Das momentan sensitivste Detektionsverfahren von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt der Nachweis des Histons γ H2AX dar. Im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren wird dabei nicht die DNA selbst als Messparameter herangezogen, sondern das reparaturassoziierte Histon H2AX. Es besitzt eine für seine Funktion äußerst wichtige und charakteristische Aminosäuresequenz (Ser-Gln-Gln-Tyr), die auch als SQ-Motiv bezeichnet wird [Mannironi *et al.*, 1989]. Über dieses Motiv bzw. seine Modifikation kann die Aktivität dieses Histons gesteuert werden. So kommt es im Rahmen seiner Aktivierung zu einer durch so genannte PIKK-Kinasen (PI3 Kinase-related Kinases) katalysierten Phosphorylierung des hier gelegenen Serin-Restes 139 in humanen Zelllinien [Rogakou *et al.*, 1998]. Die Bedeutung des Histons H2AX im Zusammenhang mit Doppelstrangbrüchen der DNA wurde erstmals von Rogakou *et al.* [1998] beobachtet. Dabei konnte mittels Gelelektrophorese gezeigt werden, dass die Fraktion von phosphoryliertem H2AX (γ H2AX) nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen zunimmt [Rogakou *et al.*, 1998]. Die Gesamtmenge an γ H2AX verhielt sich dabei proportional zur verwendeten Strahlendosis. Pro Gray wurde dabei eine Phosphorylierung von 1 % des vorhandenen H2AX gefunden, was in etwa 0,03 % des H2AX pro DNA-DSB entspricht [Rogakou *et al.*, 1998]. Ebenfalls waren es Rogakou *et al.* [1998], die zeigen konnten, dass γ H2AX als spezifische Antwort auf DNA-DSBs erscheint. Obgleich H2AX normalerweise gleichmäßig im Zellkern verteilt zu sein scheint, kommt es im Anschluss an einen DNA-DSB zur Konzentrierung des γ H2AX am Ort der DNA Läsion [Rogakou *et al.*, 1999]. Das phosphorylierte Protein flankiert dabei große Bereiche des Chromatins in der Umgebung des DNA-DSB und bildet hier fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Foci oder IRIF (irradiation induced foci) [Paull *et al.*, 2000; Rogakou *et al.*, 1999]. Solche Ansammlungen von γ H2AX können bereits wenige Minuten nach dem entstandenen Schaden nachgewiesen werden und erreichen nach etwa 10-30 Minuten ihr Maximum [Redon *et al.*, 2002]. Der Bereich, den diese Foci flankieren, umfasst in etwa 2 Megabasen der DNA [Rogakou *et al.*, 1999]. Zunächst wurde γ H2AX als essentiell für die Rekrutierung der assoziierten Reparaturproteine an den Läsionsort angesehen. Jedoch wurde von Celeste *et al.* [2003] gezeigt, dass Zelllinien auch ohne H2AX nach Induktion eines DNA-DSB entsprechende Reparaturfaktoren im Bereich des DNA-Bruches aufweisen können. Im Gegensatz zu Zelllinien, die H2AX exprimieren konnten,

bildeten die H2AX-defekten Mutanten allerdings keine IRIF aus. Das Histon γ H2AX ist für die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an den Ort des DNA-DSB durch Markierung des Schadens verantwortlich. Es ist essentiell für eine persistierende Ansammlung der Reparaturkomplexe und die Bildung von Foci [Bassing *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2002]. Durch die Erkenntnis, dass jeder γ H2AX-Focus genau einem DNA-DSB entspricht, konnte nun mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen γ H2AX und über den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der 0,1 bis 0,2 μ m großen, fluoreszierenden γ H2AX-Foci eine Quantifizierung der entstandenen DNA-DSB erfolgen [Rogakou *et al.*, 1999; Sedelnikova *et al.*, 2002]. Der Nachweis von DNA-DSB ist mit dieser Methode bis zu einigen hundertstel Gray möglich [MacPhail *et al.*, 2003]. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen dabei in der geringen Zahl benötigter Versuchszellen, in der guten Quantifizierbarkeit von DNA-DSBs für jede einzelne Zelle und der problemlosen sowie schnellen Durchführbarkeit des Verfahrens selbst. Die Quantifizierung der entstandenen γ H2AX-Foci kann durch Auszählen [Taneja *et al.*, 2004], durch die FACS-Analyse [Banath *et al.*, 2004; Olive & Banath, 2004] oder die Messung der Fluoreszenzintensitäten von Einzelbildern erfolgen [MacPhail *et al.*, 2003; Mah *et al.*, 2010; Mahrhofer *et al.*, 2006; Mirzayans *et al.*, 2006]. Darüber hinaus kann eine Quantifizierung von γ H2AX auch mittels elektrophoretischer Verfahren durchgeführt werden [Paull *et al.*, 2000; Taneja *et al.*, 2004]. Es konnte bereits die γ H2AX-Phosphorylierung in A549-Zellen nach Exposition mit Tabakrauch, der unter anderem auch Dioxin enthält, nachgewiesen werden [Tanaka *et al.*, 2007].

1.3 Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) – Struktur und Signalwege

In vorliegender Arbeit wurde untersucht, ob der AhR nach ionisierender Strahlung mit der DNA-Reparatur interagiert. Der AhR, auch Dioxin-Rezeptor genannt, ist ein cytosolischer Rezeptor, der klassischer Weise aus dem Fremdstoffmetabolismus bekannt ist. Er ist ein Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, der durch Ligandenbindungsanalysen mit radioaktiv markiertem Dioxin von Poland *et al.* [1976] identifiziert wurde. Der AhR und die mit ihm in dessen Signaltransduktionskette assoziierten Proteine Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor (AhRR) und Arylhydrocarbon Rezeptor Nuklear Translokator (ARNT), gehören zur Familie der basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS Transkriptionsfaktoren [Gu *et al.*, 2000; Taylor & Zhulin, 1999]. Die Bezeichnung dieser Domäne PAS leitet sich von Per (period)-ARNT-Sim (single minded) ab. Per und Sim sind strukturell homologe und nah verwandte

Proteine zum AhR aus *Drosophila* [Whitlock, 1999]. Nahe des N-terminalen Endes des AhR liegt die bHLH Domäne. Die basic Region führt zur DNA-Bindung, während die HLH Domäne für Protein/Protein Dimerisierungen verantwortlich ist. Am N-Terminus ist des Weiteren ein Bereich zu finden, der sowohl eine nuclear translocation sequence (NLS) als auch eine nuclear export sequence (NES) aufweist. C-terminal zur HLH Region liegt die oben genannte PAS Domäne. Durch ihre Struktur und Position beeinflusst sie Protein/Protein Interaktionen wie die Bindung an das Chaperon Hitzeschockprotein (Hsp) 90 oder die Ligandenbindung [Fukunaga *et al.*, 1995; Reisz-Porszasz *et al.*, 1994]. Hsp90 interagiert sowohl mit der PAS B Region als auch mit der bHLH Domäne. Dadurch wird im Liganden freien Zustand des AhR die NLS maskiert und die Liganden gebundene Konformation stabilisiert. Die NES ist für den nukleären Export des Rezeptors verantwortlich, der seine proteasomale Degradierung zur Folge hat [Davarinos & Pollenz, 1999; Ma & Baldwin, 2000]. Der wenig konservierte C-terminale Bereich des AhR beinhaltet eine komplexe, glutaminreiche (Q-rich subdomain) Domäne, die eine Vielzahl von stimulatorischen und inhibitorischen Untereinheiten enthält.

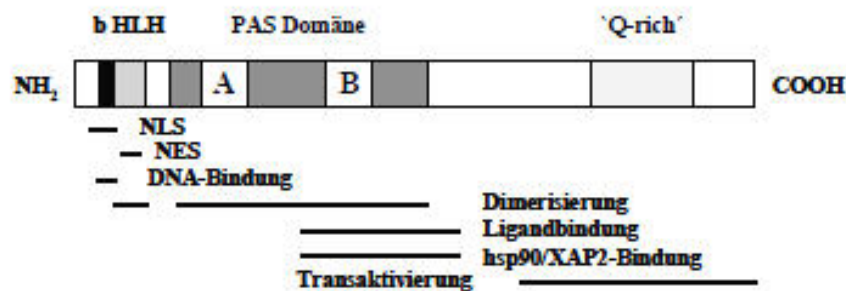


Abb. 1.1: AhR Struktur

Der AhR liegt in seinem inaktiven Zustand in einem cytosolischen Multiproteinkomplex gebunden vor. Dieser besteht aus dem AhR, einem Hsp90 Dimer, dem Ko-Chaperon p23 und dem Immunophilinhomologen AhR interacting protein (AIP) [Petruilis *et al.*, 2003] und der assoziierten c-Src-Kinase [Enan & Matsumura, 1996]. Die Hsp90 Proteine halten den Rezeptor in einer offenen Konformation für die Ligandenbindung und werden durch die Interaktion mit p23 stabilisiert. AIP (auch als XAP2 bezeichnet) ist gemeinsam mit p23 an der cytosolischen Lokalisation des AhR beteiligt [Kazlauskas *et al.*, 2000]. Es blockiert die Bindung von Importin β und hält den Komplex im Cytosol arretiert [Petruilis *et al.*, 2003]. Allerdings wurde gezeigt, dass dieses Protein nicht essentiell für die Funktionalität des AhR ist [Bell & Poland, 2000; Kazlauskas *et al.*, 2000; LaPres *et al.*, 2000; Petruilis & Perdew, 2002]. p23 scheint eine Rolle in der Stabilisierung der ATP-gebundenen Form und der durch Liganden vermittelten Abspaltung von Hsp90 zu spielen [Freeman & MacNaughton, 2000;

Kazlauskas *et al.*, 1999]. Nach Eintritt oder Freisetzung eines Liganden und Bindung dessen an den AhR kommt es zu einer Transformation und Freilegung der NLS. Der Ligand-Rezeptor-Komplex transloziert unter Energieverbrauch in den Zellkern. Nun erfolgt die Bindung an ARNT, welches im Zellkern lokalisiert ist und entgegen seiner Benennung keine Bedeutung für die Liganden aktivierte Translokation des AhR hat [Denison *et al.*, 2002; Scheel *et al.*, 2002; Scheel & Schrenk, 2000]. Die Abspaltung von Hsp90 ist ebenso notwendig für die Bildung des AhR/ARNT Heterodimers [Heid *et al.*, 2000]. Anschließend wird der Rezeptorkomplex unter Aktivierung der NES in das Cytoplasma zurück transportiert und dort Ubiquitin-abhängig im Proteasom abgebaut [Davarinos & Pollenz, 1999; Ma & Baldwin, 2000; Ma & Baldwin, 2002; Song & Pollenz, 2002]. Die Blockierung der AhR Degradation kann zu einer kontinuierlichen Aktivierung der AhR-vermittelten Genexpression führen. Damit verbunden sind nachteilige Effekte für die Zelle, z.B. der Abbau der freien ARNT-Konzentration [Ma & Baldwin, 2002; Song & Pollenz, 2002]. Die Dimerisierung des AhR mit ARNT ist entscheidend für seine spezifische Interaktion mit responsiven DNA-Elementen. [Denison *et al.*, 2002; Hahn, 2002; Mimura & Fujii-Kuriyama, 2003; Nie *et al.*, 2001]. Der entstandene AhR/ARNT-Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor, der mit hoher Affinität an spezifische Enhancer-Sequenzen der DNA bindet. Die DNA-Bindungsaktivität wird über eine Tyrosin Phosphorylierung reguliert [Minsavage *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2000]. Diese sogenannten xenobiotic responsive elements (XRE), auch Dioxin Responsive Elemente (DRE) genannt, enthalten die für die Bindung essentielle Nukleotidfolge 5'-CGTG-3'. Diese Bindung führt zu einer Änderung der lokalen Chromatinstruktur und der Möglichkeit für Transkriptionsfaktoren, mit dem Promotor zu interagieren. Die DNA-Bindung des aktiven Komplexes beeinflusst die Regulation unterschiedlicher Gene.

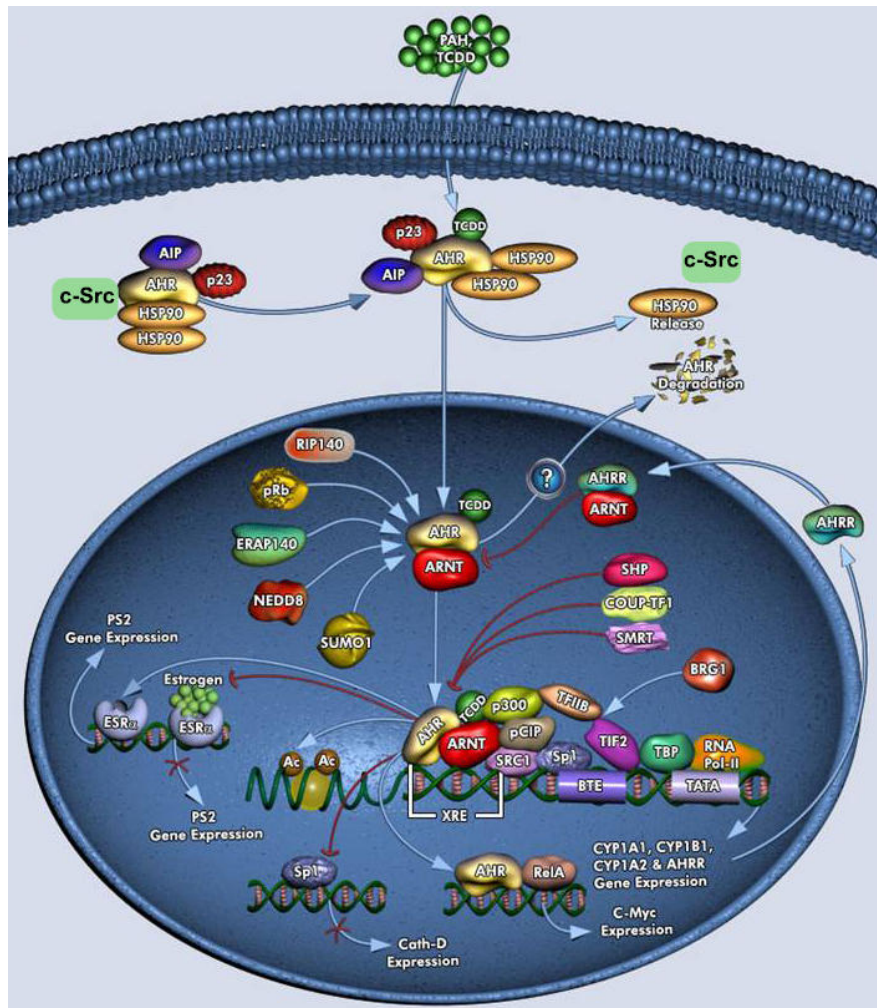


Abb. 1.2: klassischer AhR-Signalweg nach TCDD Aktivierung, modifiziert von Quiagen.com

Der AhR reguliert über die XRE-Bindung eine Vielzahl von Genen. Hierzu gehören die fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)- Familie CYP1A1 und 1A2, CYP1B1 und CYP2A8 (Hamster).

AhR-Liganden beeinflussen die Expression weiterer Gene. So werden unter anderem wichtige Faktoren für Zellwachstum und -differenzierung wie transforming growth factor TGF- α und TGF- β 2, plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2), Interleukin-1 β (IL-1 β), c-jun und c-fos von TCDD induziert [Abbott *et al.*, 1998; Bock, 1994; Hankinson, 1995; Rowlands & Gustafsson, 1997] [Gramatzki *et al.*, 2009]. Der AhR ist in der Lage als Inhibitor für Estrogen-induzierte Gene zu fungieren, z.B. Cathepsin D, tissue plasminogen activator und uterine epidermal growth factor, die unter anderem bei der Modulation des Progesteron- und Estrogen-Rezeptors eine Rolle spielen [Abdelrahim *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2009; Castro-Rivera *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2006; Marconett *et al.*, 2010; Selmin *et al.*, 2005]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass der AhR hierbei als E3 Ubiquitin Ligase agieren kann [Ohtake *et al.*, 2007; Ohtake *et al.*, 2009]. Weitere Kreuzreaktionen sind mit multiplen

Signaltransduktionswegen [Puga *et al.*, 2009], zum Beispiel der MAP-Kinase [Henklova *et al.*, 2008], der Erk-Kinase [Chen *et al.*, 2005], JNK [Diry *et al.*, 2006] oder Apoptose und Aktivierung zellulärer Prozesse als Antwort auf oxidativen Stress [Dalton *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2001; Safe, 2001] bekannt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der AhR die Progression und Regulation des Zellzyklus beeinflusst [Marlowe & Puga, 2005; Puga *et al.*, 2002], indem er als Koaktivator von E2F-1 fungiert [Puga *et al.*, 2000; Watabe *et al.*, 2010]. Außerdem wird die Rolle des AhR als Tumorsuppressor bei der Leber Karzinogenese diskutiert [Fan *et al.*, 2010]. Kürzlich wurde die funktionelle Interaktion des AhR mit der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) und die daraus resultierende Zellzyklus Progression in humanen Brustkrebszellen nachgewiesen [Barhooover *et al.*, 2010; Korzeniewski *et al.*, 2010].

1.4 AhR-Liganden und Zielgene der CYP-Familie

Der AhR wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem in Lunge, Leber, Thymus und Testes. Er bindet, untypisch für Liganden regulierte Rezeptoren, eine Vielzahl an Liganden unterschiedlichen Ursprungs und vielfältiger Struktur [Adachi *et al.*, 2004; Adachi *et al.*, 2001; Denison & Nagy, 2003; Fujii-Kuriyama & Mimura, 2005; Heath-Pagliuso *et al.*, 1998]. Diese Stoffe sind anthropogener, biogener wie auch endogener Herkunft. Hierbei wird unterschieden zwischen einer high affinity Bindung an den AhR, wie etwa bei TCDD und low affinity Liganden, zu denen einige Pharmazeutika und endogene Liganden gehören. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen ergaben, dass Liganden mit hoher Bindungsaffinität zumeist aromatische, planare und relativ hydrophobe Verbindungen sind. Dabei korreliert die Affinität positiv mit der Toxizität und der biologischen Potenz der Verbindung. Schwache Liganden hingegen entsprechen nur unzureichend diesen Kriterien. Die Tatsache, dass viele dieser Substanzen in Liganden-Bindungs-Versuchen nicht mit radioaktiv markiertem TCDD um die Bindung am AhR konkurrieren, führte zu der Hypothese, dass unterschiedliche Bereiche der AhR-Ligandenbindungsdomäne für die Interaktionen der Ligandentypen mit dem Rezeptor verantwortlich sind [Backlund & Ingelman-Sundberg, 2004; Bradshaw *et al.*, 2002; Denison & Nagy, 2003; Denison *et al.*, 2002]. Die Einteilung der Liganden erfolgt jedoch nicht nach ihrer Bindungsaffinität, sondern nach ihrer Herkunft. Es gibt zwei große Kategorien von AhR-Liganden, zum einen die exogenen Liganden, die meist als Folge anthropogener Aktivitäten entstehen und in der Umwelt weit verbreitet sind. Zum anderen gibt es natürliche Liganden, die durch biologische Prozesse entstehen. Sie werden nochmals unterteilt in

exogene Stoffe, die größtenteils über die Nahrung in den Organismus gelangen und endogene Verbindungen, die im Körper gebildet werden. Zur Gruppe der exogenen klassischen Liganden gehören PAKs (z.B. 3-Methylcholanthren, Benzoanthracene, Benzoflavone, Benzo[a]pyren) und HAKs wie polychlorierte Biphenyle (PCBs), polychlorierte Dibenzop-dioxine (PCDDs), polychlorierte Dibenzofurane (PCDFs). Die Mitglieder dieser Verbindungsklassen weisen zumeist eine hohe Bindungsaffinität an den AhR auf und entsprechen den hierfür postulierten Strukturkriterien. Als Leitsubstanz dient TCDD, einer der potentesten Induktoren des AhR. Zu den nicht-klassischen Liganden gehören sehr unterschiedliche Substanzklassen, unter anderem Benzimidazole wie Thiabendazol und der Magensäureblocker Omeprazol. Carbaryl, ein Insektizid, das als schwacher Cholinesterase-Hemmer fungiert, Diflubenzuron, ein Chitin-Syntheseinhibitor, und bestimmte Pharmazeutika wie YH439 zählen ebenfalls zu dieser Gruppe.

Die größte Expositionsquelle für natürliche AhR-Liganden ist die Nahrung. Verschiedene Studien zeigten, dass Resveratrol, ein Inhaltsstoff von Trauben und auch Wein, ebenso wie viele Flavonoide inhibitorisch auf die AhR-induzierte Genexpression von CYP1A1 wirkt und in der Lage sind, pathologische Effekte eines aktivierten AhR auf die Zelle zu verhindern [Casper *et al.*, 1999; Ciolino *et al.*, 1998; Pang *et al.*, 2008]. Auch in der Abwesenheit von exogenen Liganden kann der AhR Signaltransduktionsweg durch endogene Liganden aktiviert werden. Ein Hinweis hierfür ist, dass der aktivierte AhR Komplex im Kern in Gewebeschnitten von unbehandelten Tieren und in unbehandelten Zellkulturen zu finden ist [Andersson *et al.*, 2002; Chang & Puga, 1998]. Auch die Beobachtung, dass eine Blockierung der AhR-Expression in Mausblastozyten zu Entwicklungsstörungen führt, spricht für diese Hypothese [Peters & Wiley, 1995]. Studien an AhR-Knockout Mäusen zeigten, dass der AhR eine Rolle in vielen physiologischen Prozessen sowie bei der Entwicklung der Leber und des Immunsystems spielt [Lin *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1996]. Dass die Aktivierung des Ah-Rezeptors und die damit nachgeschaltete Signalvermittlung nicht nur durch aromatische Kohlenwasserstoffe, sondern auch durch UV-Strahlung induziert werden kann, wurde bereits beschrieben [Fritsche *et al.*, 2007]. Das Tryptophanderivat FICZ ist als endogener Ligand des AhR in der Diskussion [Wincent *et al.*, 2009].

Die Induktion der CYP1A1 Genexpression gilt als der Biomarker für die biologische Aktivität von AhR-Liganden. Sie ist daher ein wichtiger Faktor zur Untersuchung des Mechanismus der Transkription und Regulation von Liganden vermittelten Effekten auf den Organismus. Cytochrom P450 Enzyme sind Häm-haltige Monooxygenasen, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vorliegen. CYPs spielen eine wichtige Rolle in der oxidativen

Biotransformation von Fremdstoffen, was sowohl zu einer Aktivierung der Substrate und eventuell zur Bildung karzinogener Metabolite als auch zur Detoxifizierung führen kann. Weiterhin sind CYPs in die Synthese und den Metabolismus von Steroiden, Retinoiden, Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen, Gallensäuren und anderen endogenen Verbindungen involviert. Sie katalysieren unter anderem Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Dealkylierungen und Dehalogenierungen über die Einführung eines aktivierten Sauerstoff-Atoms in das Substrat. Die humane CYP1A Familie beinhaltet 2 Isoformen, CYP1A1 und 1A2. CYP1A2 wird konstitutiv in stark unterschiedlichen Gehalten vor allem in der Leber exprimiert. CYP1A1 findet sich zumeist in extrahepatischen Geweben, z.B. Lunge, Plazenta, Haut und Lymphozyten, und nur in geringer Konzentration in der Leber. Seine maßgebliche Rolle im hepatischen Metabolismus von PAHs und anderen Umweltkontaminanten geht auf seine hohe, AhR vermittelte Induzierbarkeit zurück. Die Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme dient als adaptive Antwort zur Minimierung toxischer Effekte auf den Organismus.

1.5 Zielsetzung

Fritsche und Mitarbeiter zeigten 2007, dass der AhR nach UV-Strahlung in den Kern transportiert wird und als Transkriptionsfaktor wirkt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden welchen Einfluss der AhR auf die zelluläre Strahlenantwort hat.

Folgende Fragen wurden untersucht:

- 1) Wird der AhR durch ionisierende Strahlung in den Zellkern transloziert und wirkt dort als Transkriptionsfaktor?
- 2) Welchen Einfluss hat eine Inhibition des AhR auf die Radiosensitivität von menschlichen Zellen?
- 3) Welche Rolle spielt der AhR beim NHEJ nach ionisierender Strahlung?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Zellkulturmedium

Es wurden folgende etablierte Zelllinien verwendet:

Tab.:2.1 Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle/Referenz
A549	Lungenkarzinom (human)	ATCC; CCL 185
FaDu	Plattenepithelkarzinom (human)	ATCC; HTB-43
HaCat	Keratinocyten (human)	Fritsche <i>et al.</i> , 2007
Hepa1c1c7	Maushepatom	ATCC; CRL 2026

A549 wurden in D-MEM, HaCat in D-MEM/F12 kultiviert.

Dullbeco's Modified Eagle Medium (D-MEM) wurde 3,7 g/l NaHCO₃ (Biochrom AG) zugesetzt. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nährmischung F-12 (D-MEM/F12), versetzt mit 1,2 g/l NaHCO₃. Alle Medien wurden von Gibco bezogen. Dem Medium wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS) von PAN Biotech und 1 % Penicillin und Streptomycin (Gibco) zugesetzt.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
ECL Detection Kit	Amersham Bioscience
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen
Nitrocellulose Membran (Optitran)	Schleicher-Schuell
Phosphataseinhibitor-Cocktail I	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitoren	Roche
Proteinbestimmungskit	BioRad
Protein-A-Sepharose	Amersham Bioscience
Röntgenfilme	AGFA
Sterilfilter	Sartorius
Sterile Filtertips	Greiner BioOne
Whatman Papier	Schleicher-Schuell
Zellkulturwaren	BD Falcon

2.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck, Roth, Applichem, Serva, BioRad, Amersham oder Pharmacia Biotech bezogen.

2.1.4 Radiochemikalien

³H- Methionin 49 Ci/mmol Amersham Biosciences

2.1.5 Geräte

Tab. 3: Auflistung der Geräte
Gerät

Gerät	Hersteller
ELISA-Reader	Anthos Labtec
Gelelektrophorese-Kammer	Hofer
Light Cycler	Roche
Röntgenbestrahlungseinheit (RS-225)	Gulmay
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	Peqlab
Tank Blot-Apparatur	Pharmacia
PCR-Gerät GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Zentrifugen	Eppendorf
Mikroskope	Zeiss
Konfokales Mikroskop	Leica

2.1.6 Lösungen und Puffer

Tab. 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen

Blottingpuffer	1l Methanol 29g Tris Base 14,5g Glycin 1,85g SDS ad 4l H ₂ O
Coomassie ^R -Blau-Färbelösung	50% Methanol 10% Eisessig 0,25% CoomassieR

Kernextraktionspuffer (Puffer A)	100µl 1M HEPES 40µl 2,5M KCl 12µl 0,5M EDTA ad 10ml H ₂ O
SDS-Probenpuffer	2,5 ml 4x Sammelgelpuffer 2,0 ml SDS (10 %) 2,0 ml Glycerin 0,5 ml β-Mercaptoethanol 0,25 mg Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O
Laufpuffer	115,2g Glycin 24g Tris Base 4g SDS ad 4l H ₂ O
Lysispuffer	1% NP40 0,87g NaCl 0,6g Tris base ad 100ml H ₂ O pH 8,0 (HCl)
Sammelgelpuffer (4x)	30,3g Tris Base 2g SDS ad 500ml H ₂ O pH 6,8 (HCl)
SDS-Probenpuffer (2x)	20ml Glycerin 2g SDS 10mg Bromphenolblau 24ml Sammelgelpuffer (4x) 5,4ml β-Mercaptoethanol ad 100ml H ₂ O

Stripping-Puffer	4,5g Glycin 0,3g SDS 3ml Tween20 ad 300ml H ₂ O pH 2,2 (HCl)
Trenngelpuffer (4x)	90,85g Tris Base 2g SDS ad 500ml H ₂ O pH 8,8 (HCl)
PBS	13,7mM NaCl 2,7mM KCl 80,9mM Na ₂ HPO ₄ 1,5mM KH ₂ PO ₄
Waschpuffer (Western Blot)	11 PBS- 0,1% Tween20

2.1.7 Inhibitoren und siRNA

Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten siRNA

Si-RNA	Sequenz	Firma
AhR	ACAUAUCCAGCUGAAUUA	MWG Biotech AG
AhR	SASI_Hs01_00140197	SASI_Hs01_0014019 7_AS Sigma-Aldrich
AhR Kontrolle	AACUCGGUCUCUAUGCCGC	MWG Biotech AG
ARNT	SASI_Hs01_00166998	SASI_Hs01_0016699 9 Sigma-Aldrich
Kontrolle	AGGUAGUGUAAUCGCCU	MWG Biotech AG

2.1.8 Antikörper

Tab. 2.5: Auflistung der eingesetzten Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Hersteller
Ah-Rezeptor	Maus, monoklonal Hase, polykonal	Abcam
Aktin	Kaninchen, polykonal	Abcam
ARNT	Maus, monoklonal	Upstate
CYP1A1	Kaninchen, polykonal	Abcam
DNA-PK	Maus, monoklonal	Dianova
DNA-PK pT 2609	Kaninchen, polykonal	Rockland
DNA-PK pS 2056	Kaninchen, polykonal	Rockland
DNA	Maus, monoklonal	Abcam
H2AX pS 139	Maus, monoklonal	Abcam
HNE	Kaninchen, polykonal	Abcam
HSP90	Maus, monoklonal	Abcam
Lamin B1	Maus, monoklonal	Biozol
c-Src-Kinase	Maus, monoklonal	Santa Cruz
c-Src-Kinase pY 418	Kaninchen, polykonal	Biosource
Sekundäre Antikörper	Herkunft	Hersteller
Anti-Maus-IgG	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Maus-Alexa 610	Esel	Invitrogen
Anti-Hase-Alexa 350	Esel	Invitrogen

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigten Brutschränken (Heraeus, Binder) bei 37°C und 7 % CO₂ kultiviert.

2.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Gulmay Röntgengenerator R225. Bestrahlt wurde durch Röntgenstrahlung bei einer Dosisleistung von 1 Gy/Minute und mit einer Grundeinstellung von 200 kV und 15 mA bei 37°C. Unerwünschte Quencheffekte wurden durch einen 0,5 mm Kupferfilter minimiert.

2.2.3 Koloniebildungstest

Um die klonogene Überlebensrate verschiedener Zelllinien nach Bestrahlung und / oder Behandlung mit unterschiedlicher Substanzen zu bestimmen, wurden 500 Zellen in Ø 10 cm Zellkulturschalen mit 20 % FCS ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie entsprechend dem Protokoll behandelt oder bestrahlt. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Kulturschalen mit Formaldehyd und Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Kolonien für eine Minute in einer Coomassie-Lösung gefärbt, danach gewässert und im Trockenschrank bei 50°C getrocknet. Unter dem Binokular wurden nur Kolonien die mehr als 50 Zellen aufwiesen gezählt und anschließend das klonogene Überleben mittels einer halblogarithmischen aufgetragenen Überlebenskurve im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Pro Versuchsbedingung wurden drei Schalen ausgezählt.

2.2.4 γ H2AX-Assay

Um die Anzahl an residualen DNS-Doppelstrangbrüchen mit positivem γ H2AX-Focus nach Bestrahlung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurden Zellen auf spezielle Zellkulturobjektträger ausgesät (BD Falcon) und im Brutschrank bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen mit der jeweiligen siRNA transfiziert. Standardmäßig wurden die Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung mit 70 %igem Ethanol fixiert und bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei -20°C gelagert. Zur Färbung mit dem γ H2AX-spezifischen Antikörper wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um positive Foci im Zellkern zu markieren wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem spezifischen sekundär Antikörper (488- Alexa) markiert und

anschließend die DNS mittels einer DAPI Gegenfärbung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert Zeiss). Zu jeder Probe wurden Aufnahmen mit einem Plan-Neofluar 40x/0,75D Objektiv in einer 400-fachen Vergrößerung gemacht. Pro Kondition wurden 100 Kerne ausgezählt.

2.2.5 Proteinaufarbeitung & Kernextraktion

Zellen in der stationären Phase wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst, in 450 µl Lysispuffer aufgenommen und in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt. Eine 30 minütige Inkubation bei + 4°C und eine kurze Ultraschallbehandlung lysierte die Zellen vollständig. Die Lysate wurden mit 14 000 rpm bei + 4°C zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Proteinquantifizierung verwendet.

Die Extraktion der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurde entsprechend der Anweisung im Protokoll des NE-PER® Extraktions-Kit durchgeführt (Pierce). Um die exakte Proteinmenge für jede Probe zu ermitteln, wurde mit Hilfe eines BioRad-Kits die Proteinquantifizierung nach Bradford vorgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers und wurde bei 620 nm im ELISA-Reader ausgelesen. Als Standard wurde BSA verwendet.

2.2.6 Western-Blot-Analyse

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Die Proben, versetzt mit SDS-Probenpuffer, wurden für fünf Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Es wurden 150 µg Protein pro Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen. Bei 0,1 mA/cm² pro Gel wurden die Proteine aufgetrennt [Sambrook & Russell, 2006]. Anschließend wurden die Proteine zur Immundetektion auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei 5,7 mA/cm² und 24 V wurden die Proteine über Nacht bei +4°C in einem Tankblot auf eine Membran geblottet. Es folgte eine Ponceau S-Färbung um die Proteine sichtbar zu machen, entfärbt wurde in Wasser. Die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer 3 %igen BSA-Lösung abgesättigt. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper bei +4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur. Der Nachweis der spezifischen Antikörper-Protein-Bindung

wurde durch eine Chemoluminiszenzreaktion nachgewiesen und über eine Exposition auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

2.2.7 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden 3 mg Protein eingesetzt. Die Extraktion der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion wurden entsprechend der Anweisung im Protokoll des NE-PER® Extraktions-Kit durchgeführt (Pierce).

Die nukleäre oder cytoplasmatische Fraktion wurde mit 5 µl des zu immunpräzipitierenden Antikörpers für drei Stunden bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer 50 %igen Protein-A-Sepharose-Lösung zugegeben und die Proben über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden danach fünfmal mit PBS gewaschen, anschließend mit SDS- Probenpuffer versetzt und 5 Minuten gekocht. Die Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine geschah mittels SDS-PAGE und Immunoblotting, wie unter 2.2.6. beschrieben.

2.2.8 Behandlung mit Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden gemäß den Angaben der Hersteller in Stammlösungen aliquotiert und unter den angegebenen Temperaturen bis zur endgültigen Verwendung gelagert. Bei Substanzen, die in DMSO oder Ethanol gelöst waren, wurden die Kontrollen entsprechend mit der gleichen Konzentration des Lösungsmittels behandelt.

2.2.9 Transfektion mit siRNA

Die Zellen wurden in Ø 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Fünf Stunden vor der Transfektion wurde das entsprechende Medium auf Medium mit 10 % FCS aber ohne Antibiotika gewechselt. Die siRNA (siehe Tab. 2.4) wurde anschließend mit einer Endkonzentration von 30 nM mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers für 72 Stunden transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen gemäß dem Versuchsprotokoll weiter behandelt.

2.2.10 Densitometrische Auswertung und Statistik

Die densitometrische Quantifizierung der Western-Blots wurde mit der Software von Scion image durchgeführt. Um einen Vergleich zwischen Daten aus zwei unabhängigen Gruppen anzustellen, wurde der student's t-test durchgeführt. Alle Werte zeigen den Mittelwert +/- der Standardabweichung oder des Standardfehlers. P-Werte < als 0,05 ($p < 0.05$) wurden als statistisch relevant anerkannt.

2.2.11 Radioaktive Markierung von Proteinen

Zellen in der Stationären Wachstumsphase wurden mit 35 S Methionin Medium versetzt, mit 4 Gy bestrahlt, eine Stunde inkubiert und danach das radioaktiv markierte Methionin durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Zellen wurden für weitere 4, 24 und 48 h im Brutschrank inkubiert, anschließend lysiert und mittels SDS-Page und Röntgenfilmen analysiert

2.2.12 Lightcycler-PCR

Mit Hilfe der Lightcycler-PCR, einer Weiterentwicklung der konventionellen PCR, kann die DNA-Amplifikation in Echtzeit (real-time-PCR) verfolgt werden. Zur Detektion des Amplifikats wurde SYBR Green I verwendet. Aus den Schnittpunkten (sog. crossing points, Cp) der Wendepunkt tangente an den sigmoiden Amplifikationskurven mit der Zeit-/Reaktionszyklenachse kann die relative Menge an der jeweiligen cDNA berechnet werden. Neben dem Zielgen wird zudem ein PCR-Lauf mit einem Referenzgen durchgeführt. Die Cp-Werte des Zielgens werden auf die Werte des Referenzgens normiert bezogen. Es wurde die 18 S rRNA als Referenzgen verwendet. Die Primer und alle Reagenzien wurden vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie der Uni Tübingen bereitgestellt.

Tab. 2.6: Lightcycler-PCR Ansatz für eine Probe (8 µl) :

PCR-Mastermix für Lightcycler	3 mM MgCl ₂
Ampuwa-Wasser	5,7 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µl
Primer forward_LC (20 µM)	0,25 µl
Primer reverse_LC (20 µM)	0,25 µl
10x PCR-Mix	1 µl

Der 10x PCR-Mix enthält SYBR Green I, dNTPs und die Taq-Polymerase.

2.2.13 RNA-Isolierung

Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Trizol / 6 well für 3 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt und anschließend 15 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt

und gemischt. Die Fällung erfolgte 1 h bei -20°C . Danach wurde für 30 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 μl eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen und 15 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde dann in 25 μl DEPC-Wasser gelöst und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde die mRNA zur längeren Aufbewahrung bei -70°C gelagert.

2.2.14 cDNA Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Da die Taq-Polymerase keine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität besitzt, muss die isolierte mRNA zur Verwendung als PCR Template durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Als Primer werden random-Hexamere, welche zufällig mit komplementären RNA-Abschnitten hybridisieren und ein Oligo(dT) Primer verwendet, der an die Poly-Adenosin-Reste von mRNAs bindet. Die Verwendung von Oligo(dT) Primer sichert, dass nur voll prozessierte mRNA die einen polyA-Schwanz trägt in cDNA umgeschrieben wird. Die Reaktionen wurden mit der AMV Reverse Transkriptase durchgeführt.

Folgender Ansatz wird für RT-Reaktion pipettiert

Tab. 2.7. Standardansätze für RT-Reaktionen

RT-Standardansatz AMV	V_{ges} : 15 μl
Ampuwa-Wasser	4,29 μl
MgCl_2 (25 mM)	3 μl
10x RT Puffer	1,5 μl
dNTPs (je 10mM)	1,5 μl
RNA sin	0,76 μl
Primer Oligo dT ₁₅	0,38 μl
Primer random d(N) ₆	0,38 μl
	mischen
AMV-RT	0,19 μl
RNA-Lösung (125 ng/ μl)	3 μl

RT-Reaktion 60 min, 42°C

Denaturierung 5 min, 95°C

2.2.15 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm (Nukleobasen) und $\lambda = 280$ nm (aromatische Aminosäuren in Proteinen). Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA, bzw. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA (empirische Faktoren). Der Quotient 260/280 ist ein Maß für die Reinheit der Probe, er sollte $\geq 1,8$ sein. Die Konzentration kann nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$A_{260} * x / 1000 = \text{Konzentration in } \mu\text{g} / \mu\text{l}.$$

$$x = 50 \text{ für DNA}$$

$$x = 40 \text{ für RNA}$$

Für die Messung wurden 2 μl der Lösung auf die Messfläche des nanodrop-Spektrometers pipettiert und das entsprechende Messprogramm gestartet.

2.2.16 Konfokale Mikroskopie

Zellen wurden auf Zellkulturobjektträger ausgesät, mit der entsprechenden Dosis bestrahlt und nach 1 h mit Periodat-Lysin-Paraformaldehyd fixiert. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Der gebundene primäre Antikörper wurde visualisiert durch einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Alexa-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit YO-PRO-1 gefärbt. Die Zellen wurden mit einem konfokalen Leica TCS SP Mikroskop im elektronenmikroskopischen Labor, Prof. M. Schaller, Universitäts-Hautklinik Tübingen analysiert.

3 ERGEBNISSE

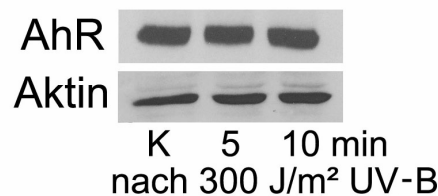
3.1 Strahleninduzierte Aktivierung bzw. Stabilisierung des Arylhydrocarbon Rezeptors

Zunächst wurde geklärt, inwiefern im verwendeten Standard-Tumorzellsystem die aus der Literatur bekannte Aktivierung des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR) durch UV-B Strahlung nachweisbar ist. Nachfolgend wurde die Lungenkarzinom-Zelllinie A549 auf die AhR-vermittelte Zellreaktion nach ionisierender Strahlung untersucht. Sie ist durch die Expression von wt Tp53 charakterisiert.

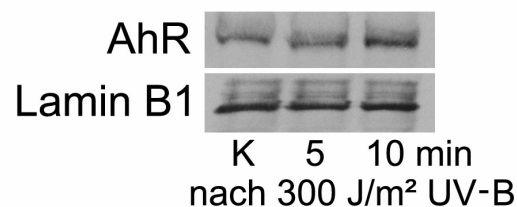
3.1.1 Stabilisierung des AhR durch UV-B Strahlung

Zur Überprüfung unseres Zellsystems auf die Aktivierbarkeit des AhR wurden Zellen mit UV-B bestrahlt und im Western-Blot (Abb. 3.1) das AhR-Protein nachgewiesen. Standardmäßig wurde mit 300 J/m² UV-B bestrahlt. Aus der Literatur ist bekannt, dass der AhR durch UV-Strahlung aus dem cytoplasmatischen Multiproteinkomplex freigesetzt, aktiviert und in den Kern transportiert wird [Fritsche *et al.*, 2007].

(A) WB: A549 cytoplasmatische Fraktion



(B) WB: A549 Kernfraktion



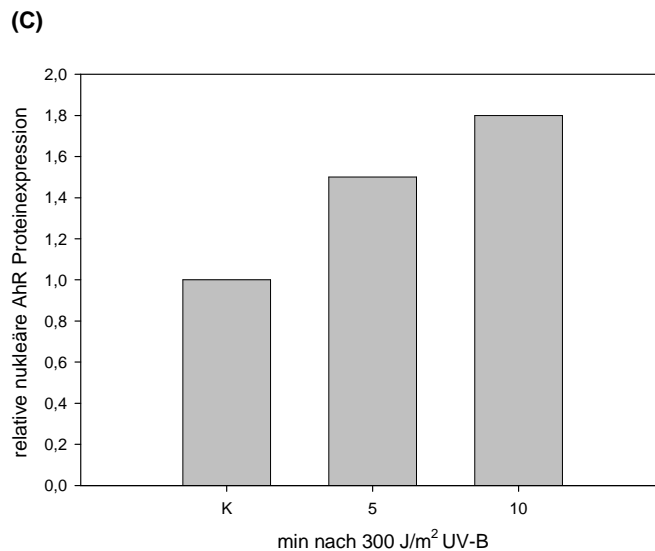


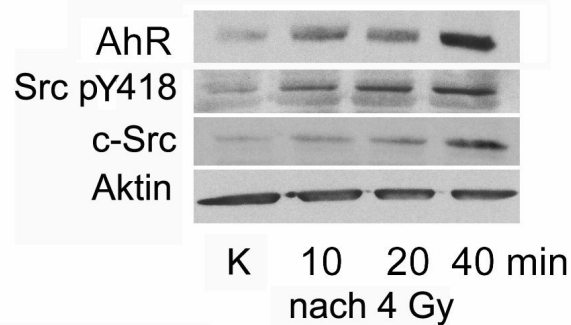
Abb. 3.1: Nukleäre Akkumulation des AhR nach UV-B Strahlung. A549-Zellen wurden in der stationären Phase mit 300 J/m² UV-B bestrahlt, nach 5 bzw. 10 min in cytoplasmatische (A) und Kernfraktion (B) getrennt und anschließend in einem Western-Blot wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert. (C) Quantifizierung der AhR-Proteinexpression durch densitometrische Auswertung, normiert auf die entsprechende Laminkontrolle.

Dieser Transport in den Zellkern konnte in A549-Zellen bereits 5 min nach UV-B Strahlung nachgewiesen werden und stieg bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt an. Im Cytoplasma allerdings konnte keine Stabilisierung beobachtet werden. Im Kern wurde die Proteinmenge densitometrisch quantifiziert. Es zeigte sich 10 min nach UV-B Strahlung ein Anstieg des AhR um das 1,8-fache.

3.1.2 Stabilisierung des AhR durch ionisierende Strahlung

Um den Effekt von ionisierender Strahlung auf den AhR zu untersuchen, wurden A549-Zellen mit 4 Gray bestrahlt und nach den angegebenen Zeiten geerntet, die Zellfraktionen isoliert und im Western-Blot analysiert (Abb. 3.2). Überraschenderweise wurde eine zunehmende cytoplasmatische Proteinstabilisierung des AhR über die Zeit gefunden. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle stieg die detektierte AhR-Menge bereits 10 min nach 4 Gray an und war nach 40 min um ein Vielfaches erhöht. Nach ionisierender Strahlung wurde auch eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus der c-Src-Kinase gefunden. Sie war am Tyrosinrest Nr. 418 (Autophosphorylierungsstelle) phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsstelle steht für die Aktivität der c-Src-Kinase. Die Aktivierung verlief in ähnlicher Kinetik wie die AhR-Stabilisierung nach ionisierender Strahlung.

(A) WB: A549 cytoplasmatische Fraktion



(B) WB: A549 Kernfraktion

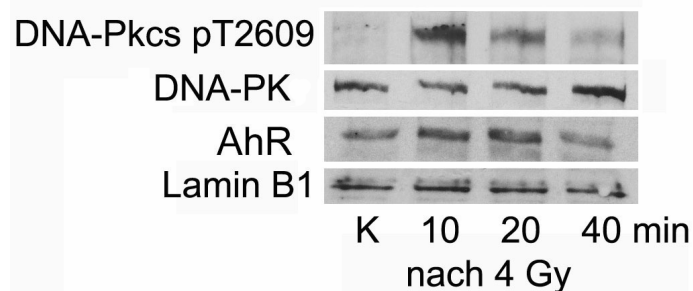


Abb. 3.2: AhR-Stabilisierung nach ionisierender Strahlung. A549-Zellen wurden in der stationären Phase mit 4 Gy bestrahlt und nach 10, 20 und 40 min in cytoplasmatische (A) und nukleäre Fraktion (B) getrennt und anschließend in einem Western-Blot analysiert.

Kurze Zeit nach Bestrahlung war der AhR auch im Zellkern zu finden. Um einen potentiellen Effekt auf die DNA-Reparatur abschätzen zu können, wurde die Phosphorylierung der DNA-PK untersucht. Sie reguliert die Aktivität der Kinase und spielt damit eine wichtige Rolle beim NHEJ. Nach Bestrahlung stieg die Phosphorylierung am Tyrosinrest Nr. 2609 der DNA-PK, verglichen zur unbestrahlten Kontrolle, wie erwartet stark an.

Die zeitliche Stabilisierung des AhR-Proteins im Cytoplasma und im Kern nach ionisierender Strahlung wurde in einem pulse-chase-Experiment untersucht. Dazu wurden A549-Zellen mit ^{35}S Methionin im Medium mit 4 Gy bestrahlt, für eine Stunde inkubiert und dann das freie Methionin entfernt und durch nicht radioaktiv markiertes ersetzt. Nach weiteren 4, 24 bzw. 48 h wurden die Zellen lysiert und neu synthetisierter AhR nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit Röntgenfilmen analysiert.

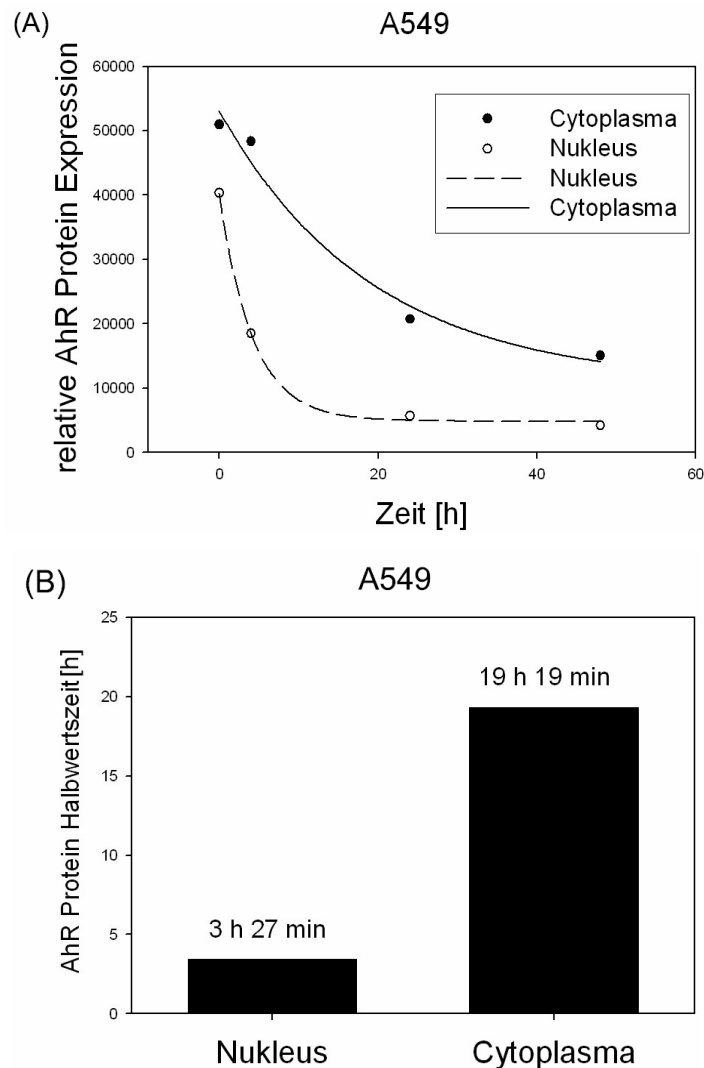


Abb. 3.3: pulse-chase-Experiment zur Klärung des AhR Turnover im Cytoplasma und im Kern nach Bestrahlung mit 4 Gy. 1 h nach Bestrahlung und pulse mit 35 S erfolgte ein Mediumwechsel auf kaltes Methionin. Abstoppen des Versuchs durch SDS-PAGE nach weiteren 4, 24 und 48 h.

Abbildung 3.3 (A) zeigt die Menge an markiertem AhR nach 4 Gy Bestrahlung im Cytoplasma und im Kern. Die Halbwertszeit des AhR im Kern ist in Abb. 3.3 (B) dargestellt. Im Kern hatte der AhR nach Bestrahlung eine Halbwertszeit von rund dreieinhalb Stunden, während im Cytoplasma die Halbwertszeit mit knapp 19,5 h deutlich höher war.

3.2 Stabilisierung bzw. Aktivierung des AhR durch Chemikalien

3.2.1 Aktivierung des AhR durch den klassischen Induktor 3-Methylcholanthren

Als Positiv-Kontrolle für die Aktivierung des AhR in A549-Zellen wurde der klassische Induktor 3-Methylcholanthren verwendet. Es wurde eine Behandlungskinetik erstellt, um das

Zeitfenster der Aktivierung in A549-Zellen für die erwartete AhR vermittelte transkriptionelle Aktivierung von CYP1A zu finden (Abb. 3.4).

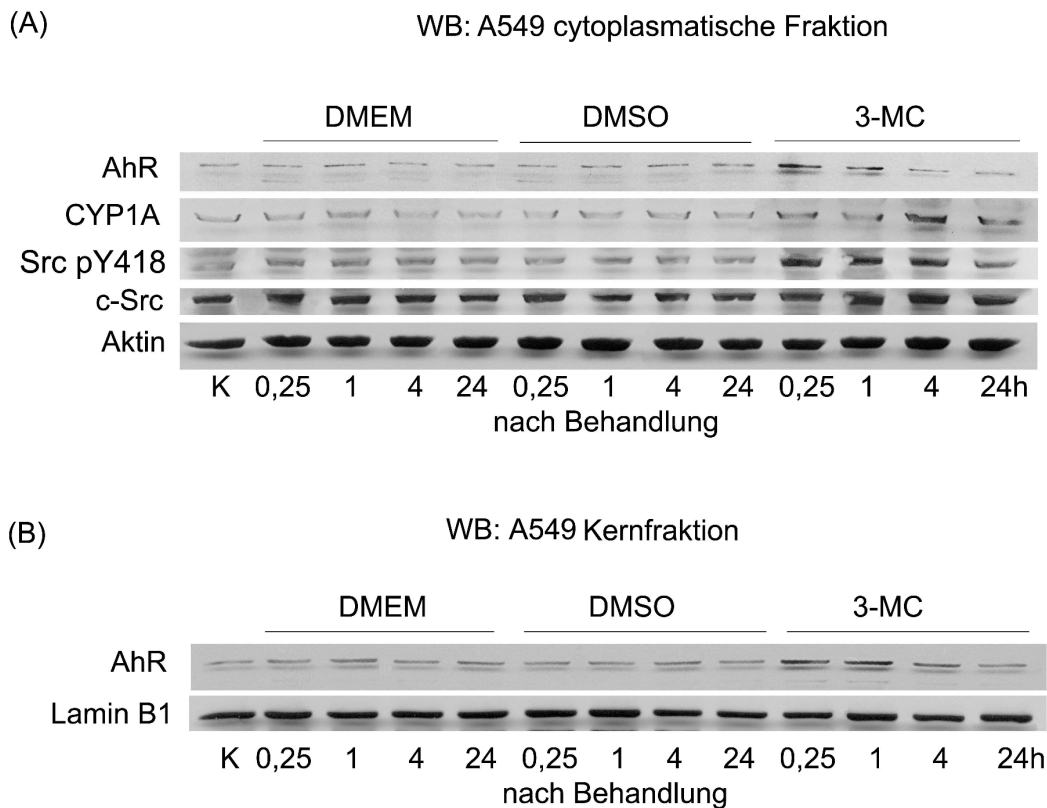


Abb. 3.4: AhR-Aktivierung mit 3-Methylcholanthren im Cytoplasma (A) und im Kern (B). A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 2 μ M 3-Methylcholanthren behandelt, nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen aufgetrennt und anschließend in einem Western-Blot wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert.

Es zeigte sich wie erwartet eine CYP1A-Induktion nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren. Die AhR-Stabilisierung im Cytoplasma und seine Translokation in den Zellkern reduzierte sich innerhalb der ersten Stunde auf den Basalwert. Um einen Lösungsmittelleffekt auszuschließen, wurde dieselbe Kinetik mit Zugabe von D-MEM durchgeführt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Medium und Lösungsmittel.

3.2.2 Behandlung mit 3-Methylcholanthren kombiniert mit ionisierender Strahlung

Um zu klären, ob 3-Methylcholanthren den Strahleneffekt auf den AhR beeinflusst, wurde die Kombination von ionisierender Strahlung und klassischem Induktor in A549 durchgeführt (Abb. 3.5).

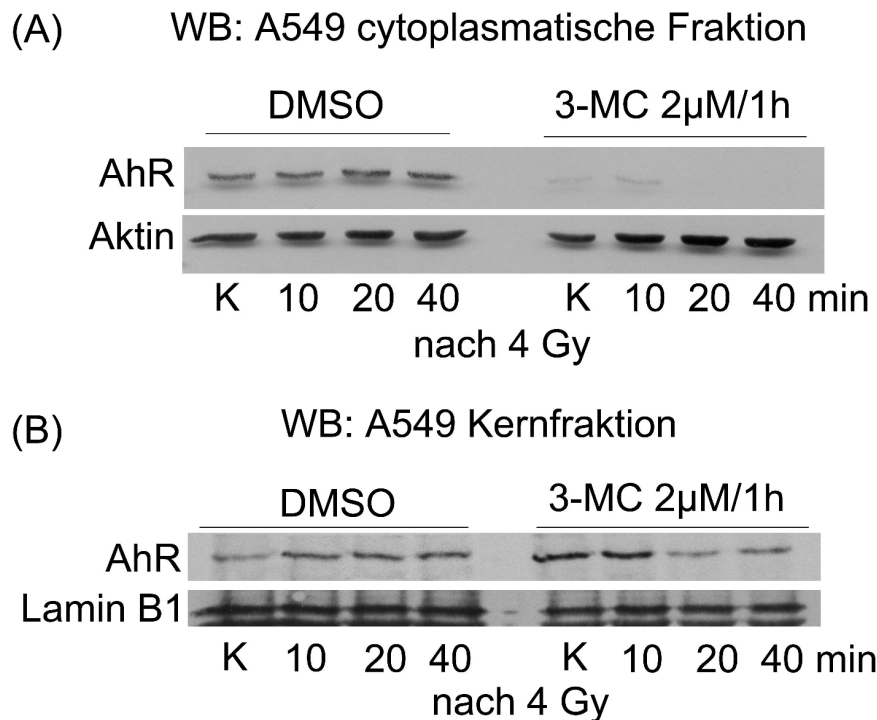


Abb. 3.5: Behandlung mit 3-Methylcholathren kombiniert mit ionisierender Strahlung im Cytoplasma (A) und im Kern (B). A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase eine Stunde mit 2 μ M 3-Methylcholanthren vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen lysiert und anschließend in einem Western-Blot aufgetrennt.

Im Cytoplasma war bereits in der behandelten aber unbestrahlten Kontrolle der AhR nahezu vollständig in den Kern transportiert worden. Nach ionisierender Strahlung verlief die Reaktion deutlich langsamer. Die Kombination von ionisierender Strahlung mit Behandlung durch 3-Methylcholanthren beschleunigte die AhR-Stabilisierung und seine Kerntranslokation. Allein nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren wurde das Maximum des AhR Kernproteins nach einer Stunde erreicht. Kombiniert mit Bestrahlung war bereits nach 10 min die maximale AhR-Menge im Kern erreicht.

3.2.3 Hemmung von Hsp90 im AhR-Multiproteinkomplex

Als Hsp90-Inhibitor wurde Geldanamycin eingesetzt. Dieses bindet an Hsp90 [Miyata, 2005] und macht es somit in seiner Funktion unwirksam. Schließlich kommt es zur Aufspaltung des Multiproteinkomplexes, bestehend aus dem AhR, der c-Src-Kinase, Hsp90, AIP und p23 [Song & Pollenz, 2003]. A549-Zellen in der stationären Wachstumsphase wurden mit 2 μ M Geldanamycin behandelt und mit der angegebenen Kinetik lysiert (Abb. 3.6).

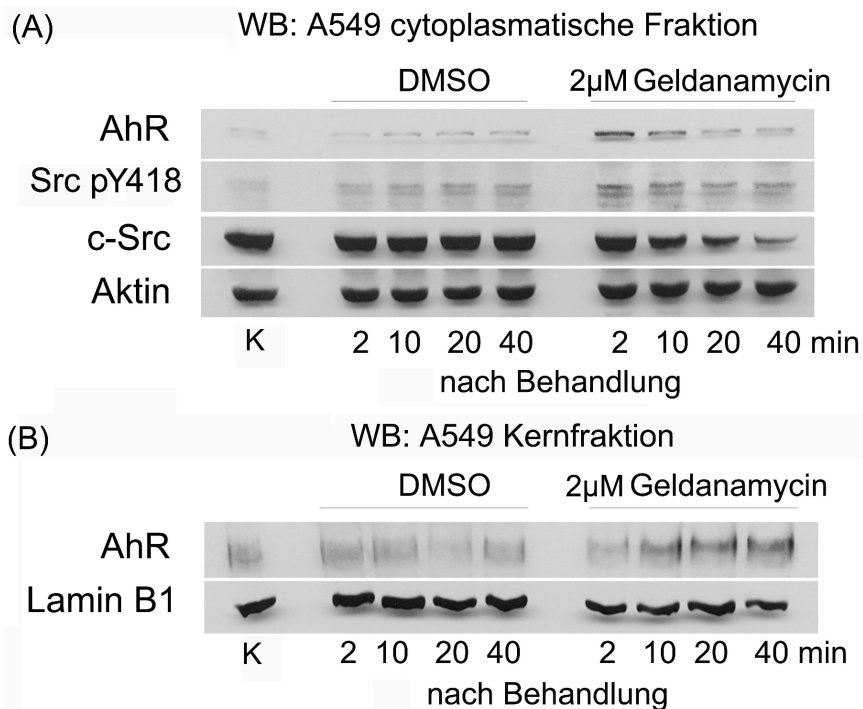


Abb. 3.6: Aktivierung des AhR durch Hemmung von Hsp90 durch Behandlung mit Geldanamycin im Cytoplasma (A) und im Kern (B). A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit 2 µM Geldanamycin behandelt, die Kontrolle blieb unbehandelt. Nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen aufgetrennt und anschließend in einem Western-Blot wie unter 2.2.6 beschrieben analysiert.

Bereits 2 min nach Behandlung wurde eine AhR-Stabilisierung im Cytoplasma beobachtet, die nach diesem kurzen Zeitwert ihren Höhepunkt und nach 40 min nahezu wieder Basalwertniveau erreicht hatte. Eine ähnliche Aktivierungskinetik wurde bei der c-Src-Kinase beobachtet, die wie der AhR nach 2 min Behandlungszeit den höchsten Wert erreichte. Im Kern wurde der AhR nach 10 min gefunden und ein Anstieg der AhR-Menge bis zum 40 min Zeitpunkt nach Behandlung beobachtet.

3.2.4 Behandlung mit Hydroxynonenal und in Kombination mit ionisierender Strahlung

Hydroxynonenal (HNE) ist als Produkt der Lipidperoxidation und für seine Bindung an Hsp90 bekannt [Carbone *et al.*, 2005]. Bei der durch ionisierende Strahlung ausgelösten Lipidperoxidation entsteht HNE als Hauptprodukt, dieses wiederum ist hochreaktiv und verantwortlich für die Aktivierung der c-Src-Kinase nach ionisierender Strahlung [Dittmann *et al.*, 2009]. Es wurden A549-Zellen mit HNE in bestimmten Zeitintervallen behandelt, ebenso wurde HNE-Behandlung mit ionisierender Strahlung kombiniert.

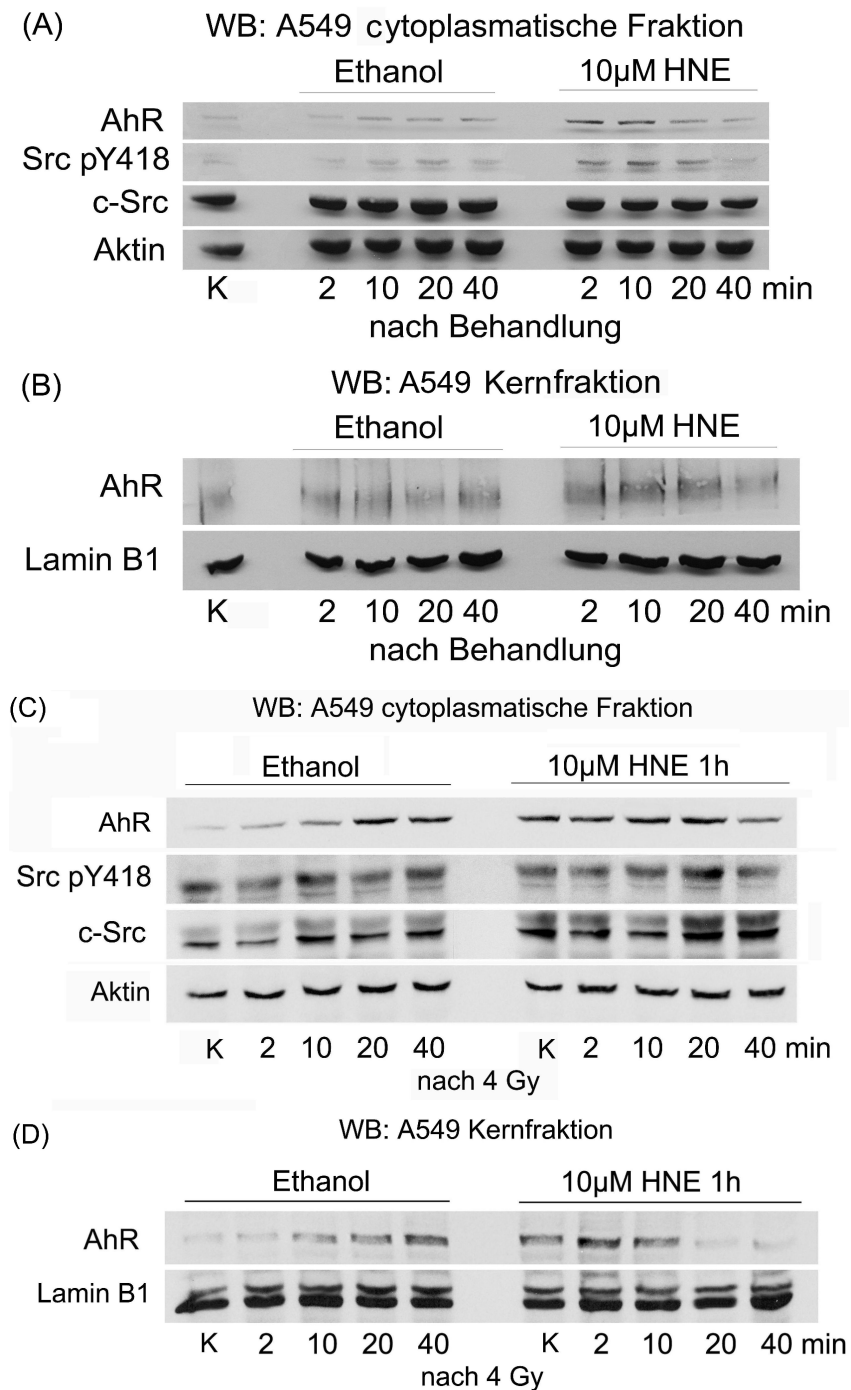


Abb. 3.7: Behandlung von A549-Zellen mit HNE (A + B) kombiniert mit ionisierender Strahlung (C + D). A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase eine Stunde mit 10 μ M Hydroxynonenal vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen lysiert und dann in einem Western-Blot wie unter 2.2.6 beschrieben aufgetrennt.

In den mit Hydroxynonenal inkubierten Zellen wurde eine Stabilisierung des AhR im Cytoplasma gefunden, die bereits nach 2 min Behandlungszeit ihr Maximum erreicht hatte. Allein Behandlung mit HNE bewirkte eine Kerntranslokation des AhR. Das Lösungsmittel hatte keinen Effekt. Nach Hydroxynonenal-Behandlung fand man bereits in der unbestrahlten Kontrolle durch HNE Präsenz eine AhR-Stabilisierung. Ionisierende Strahlung erhöhte das Niveau der nukleären Anreicherung des AhR erheblich, verglichen mit Zellen, die nur mit

HNE behandelt wurden, jedoch nicht bestrahlt waren. Die Kerntransportkinetik des AhR wurde verkürzt. Dieser Effekt wurde bereits bei Kombination von 3-Methylcholanthren und ionisierender Strahlung beobachtet.

3.3 Reaktive Sauerstoffspezies nach ionisierender Strahlung - sind sie verantwortlich für den Strahleneffekt?

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im Cytoplasma könnten für den Strahleneffekt des AhR verantwortlich sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Radikalfänger verwendet und ein Inhibitor der endogenen Radikalbildung eingesetzt.

3.3.1 Behandlung von Zellen mit dem Radikalfänger Acetylcystein

A549-Zellen wurden mit 1 mM Acetylcystein (NAC) für eine Stunde präinkubiert, bestrahlt und nach den angegebenen Zeitwerten lysiert. Im Western-Blot wurden die entsprechenden Proteine detektiert.

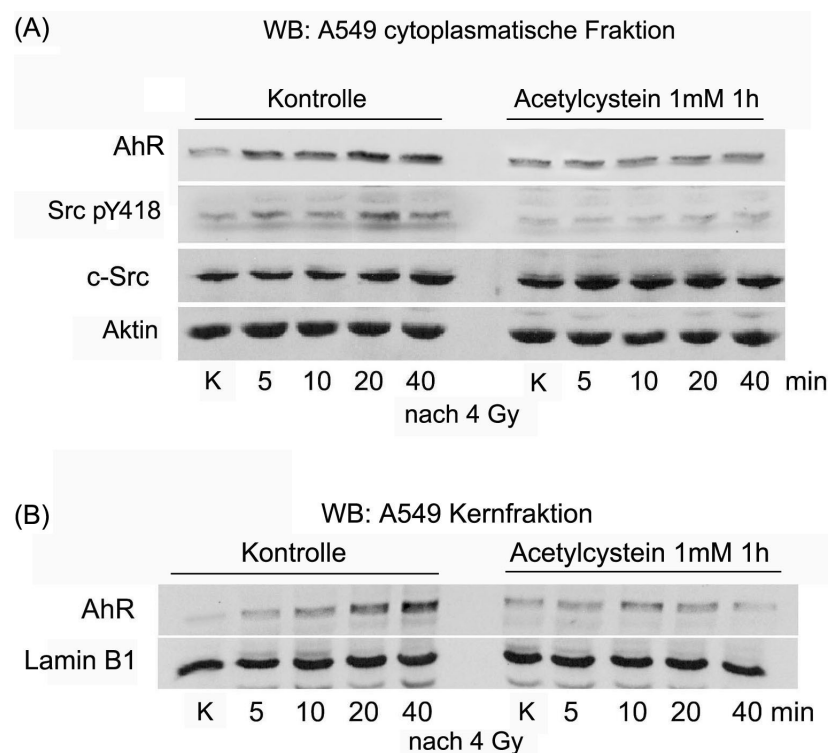


Abb. 3.8: Hemmung der AhR-Aktivierung nach ionisierender Strahlung durch den Radikalfänger Acetylcystein. A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase eine Stunde mit 1 mM Acetylcystein vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen lysiert, in cytoplasmatische Fraktion (A) und Kernfraktion (B) aufgetrennt und anschließend mit SDS-PAGE und spezifischen Antikörpern analysiert.

Eine Bestrahlung führte in der unbehandelten Kontrolle sowohl beim AhR als auch bei der c-Src-Kinase zu einer von der Zeit abhängigen Stabilisierung. Die Kerntranslokation des AhR nach ionisierender Strahlung war ebenfalls klar zu sehen. Nach Acetylcystein-Behandlung war die cytoplasmatische Stabilisierung nach Bestrahlung von c-Src-Kinase und AhR deutlich reduziert, genauso wie der Kerntransport des AhR unterbunden war. Es könnten also reaktive Sauerstoffspezies, die nach ionisierender Strahlung z.B. aus der Zellmembran freigesetzt werden, für die Aktivierung des AhR verantwortlich sein. Hydroxynonenal ist eines der Hauptprodukte, die bei der Lipidperoxidation nach ionisierender Strahlung entstehen. Es aktiviert den AhR wie in Abb. 3.7 gezeigt wird. Um abschließend zu klären, ob durch radiogene Lipidperoxidationsprodukte der AhR tatsächlich aktiviert wird, sind weitere Versuche notwendig.

3.3.2 Inhibition von endogenen Radikalen

Prinzipiell können endogene Liganden in gleicher Weise wie Xenobiotika zur Aktivierung des AhR führen, auch wenn über endogene AhR-Liganden bisher weniger bekannt ist. Nach ionisierender Strahlung ist es denkbar, dass ROS für die Stabilisierung bzw. Aktivierung des AhR verantwortlich sind. Jedoch könnten auch endogene Radikale in diese Reaktion mit einfließen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde mit Hilfe eines Inhibitors (Rac1) die Bildung von endogenen Radikalen gehemmt und der Effekt des Rac1-Inhibitors auf die AhR-Stabilisierung untersucht. Rac1 ist eine kleine GTPase, die zur Familie der Rho GTPasen zählt und unter anderem p67phox reguliert, das die Bildung von Superoxiden beeinflusst [Bosco *et al.*, 2009]. A549-Zellen wurden vor Bestrahlung für 2 h mit dem Rac1-Inhibitor inkubiert und anschließend in bestimmten Zeitintervallen lysiert. Die cytoplasmatische Fraktion wurde weiter mit SDS-PAGE und im Western-Blot analysiert.

WB: A549 cytoplasmatische Fraktion

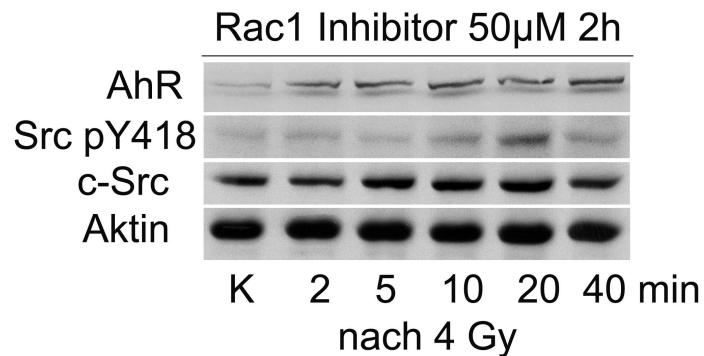


Abb. 3.9: Inhibition der endogenen Radikale beeinflusst die AhR-Stabilisierung nach ionisierender Strahlung nicht. A549-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase eine Stunde mit 50 μ M Rac1 Inhibitor vorbehandelt und anschließend mit 4 Gy bestrahlt. Nach den angegebenen Zeitwerten wurden die Zellen lysiert und anschließend in einem Western-Blot wie unter 2.2.6 beschrieben aufgetrennt.

Abbildung 3.9 zeigt, dass die strahleninduzierte Stabilisierung des AhR unter Hemmung der Bildung von endogenen Radikalen unbeeinträchtigt verläuft. Ebenso ist die c-Src-Aktivierung in Form der Phosphorylierung am Tyrosin Nr. 418 ohne Einschränkung zu beobachten. Die Hemmung der endogenen Radikalproduktion durch Rac1 verhindert somit die strahleninduzierte AhR-Stabilisierung und die Aktivierung der c-Src-Kinase nicht.

3.4 Hemmung der AhR-Proteinexpression

3.4.1 Hemmung durch siRNA

Die Reduktion des Proteins in der cytoplasmatischen und nukleären Fraktion konnte mittels temporärer Transfektion mit spezifischer AhR-siRNA in A549-Zellen erreicht werden (Abb. 3.10). Um die Spezifität der verwendeten siRNA zu überprüfen, wurde die Expression der Strukturproteine Lamin B1 im Kern und Aktin in der cytoplasmatischen Fraktion untersucht. Beide Proteine zeigten weder nach siRNA-Behandlung noch nach Bestrahlung einen Effekt auf ihre Expression. Die Verminderung der AhR-Expression durch siRNA-Behandlung beeinflusste die Expression der c-Src-Kinase nicht, stimulierte jedoch signifikant deren Aktivierung, also die Phosphorylierung am Tyrosin 418. Die Autophosphorylierungsstelle Y 418 steht stellvertretend für den Aktivierungszustand der c-Src-Kinase.

Nachdem mit dem klassischen AhR-Induktor 3-Methylcholanthren die zu erwartende CYP1A-Expression gefunden wurde, sollte nun auch untersucht werden, ob nach ionisierender Strahlung eine Veränderung der CYP1A-Expression vorhanden ist. Unter Kontroll-siRNA-Bedingungen konnte nach nur 15 min eine Stabilisierung von CYP1A

gezeigt werden. Nach den für die Neusynthese aussagekräftigen Zeitwerten von 4 und 24 Stunden zeigte sich eine Erhöhung der CYP1A-Proteinmenge nach ionisierender Strahlung. Mittels real-time-PCR wurde diese vermeintliche CYP1A-Expression näher untersucht (siehe 3.8.1), um eine Proteininstabilisierung auszuschließen.

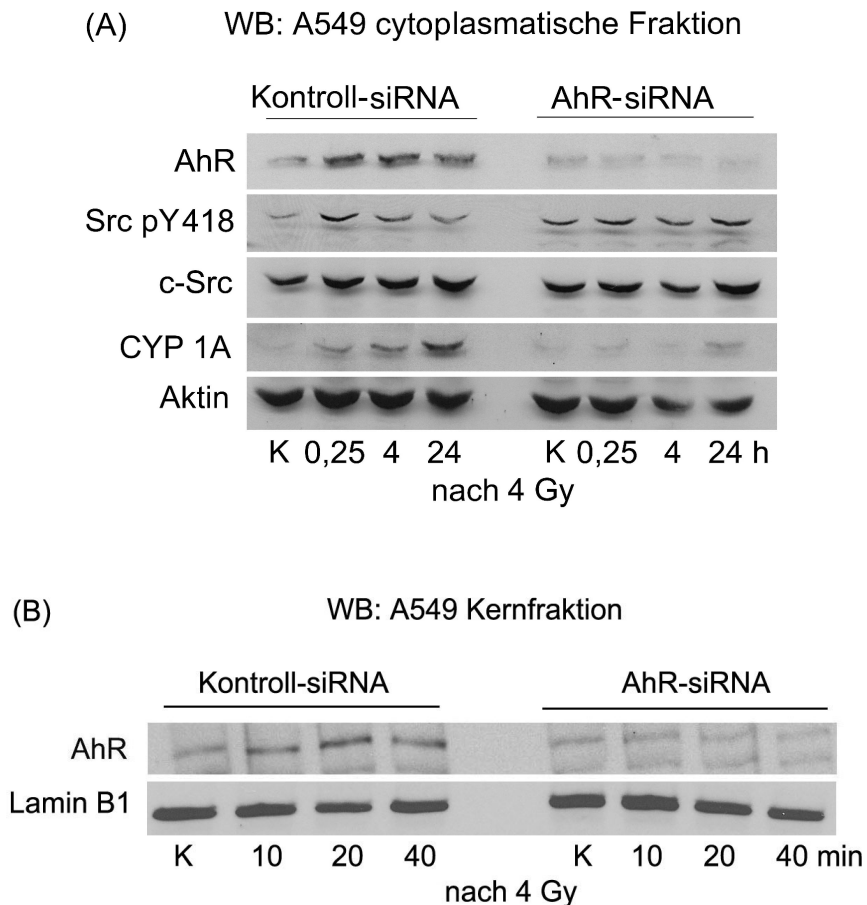


Abb. 3.10: Unterdrückung des AhR-Proteins durch spezifische AhR-siRNA in A549-Zellen führt zur Aktivierung der c-Src-Kinase. Die Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt, nach den entsprechenden Zeiten lysiert und in cytoplasmatische Proteine (A) und Kernproteine (B) getrennt. Mit SDS-PAGE wurden die Proteine nach Molekulargewicht analysiert und mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

Neben der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 wurden auch Zellen eines Kopf-Hals-Tumors (FADU) mit AhR-siRNA behandelt (Abb. 3.11). Auch in FADU-Zellen, die ein mutiertes Tp53 exprimieren, wurde eine strahleninduzierte Stabilisierung des AhR und eine c-Src Aktivierung (siehe Kontroll-siRNA-Bedingungen in Abb. 3.11) gefunden. Nach Behandlung mit spezifischer AhR-siRNA war die AhR-Proteinmenge sowohl im Cytoplasma als auch im Kern maßgeblich reduziert. Die c-Src-Kinase wurde stabilisiert und die aktive Form Src pY418 war in der unbestrahlten, AhR-siRNA behandelten Kontrolle deutlich erhöht, wie bereits in den A549-Tumorzellen beobachtet.

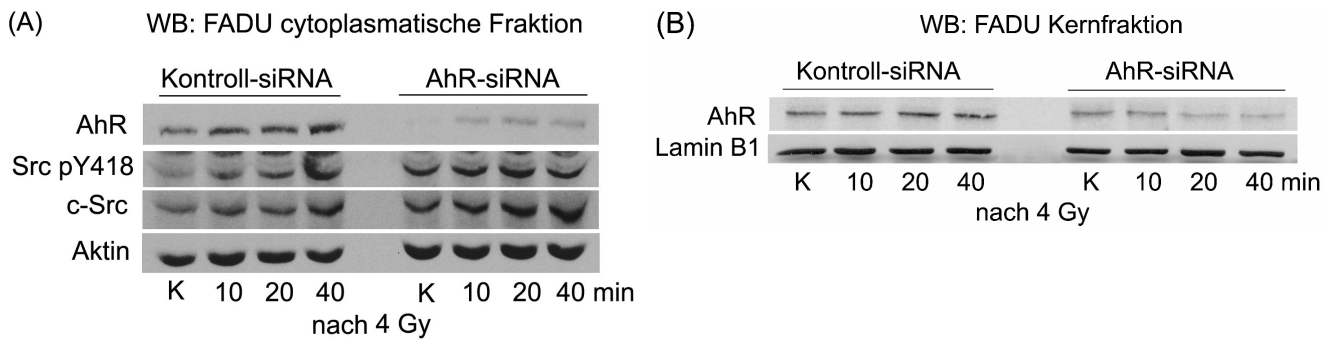


Abb. 3.11: Hemmung der AhR-Expression in FADU-Zellen mit siRNA führt zur Phosphorylierung der c-Src-Kinase am Tyrosinrest 418. FADU-Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt, nach den entsprechenden Zeiten lysiert und in cytoplasmatische (A) bzw. Kernfraktion (B) getrennt. Mit SDS-PAGE wurden die Proteine nach Molekulargewicht analysiert und mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

Neben der Modulation der c-Src-Kinase und des CYP1A wurde die DNA-PK im Kern sowie deren am Threonin Nr. 2609 und Serin Nr. 2056 phosphorylierten Formen unter AhR-siRNA-Bedingungen detektiert (Abb. 3.12).

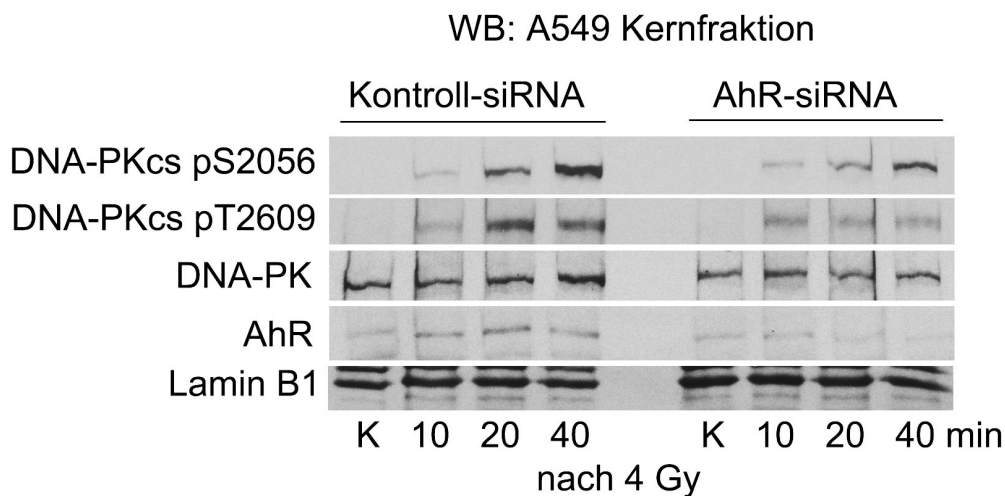


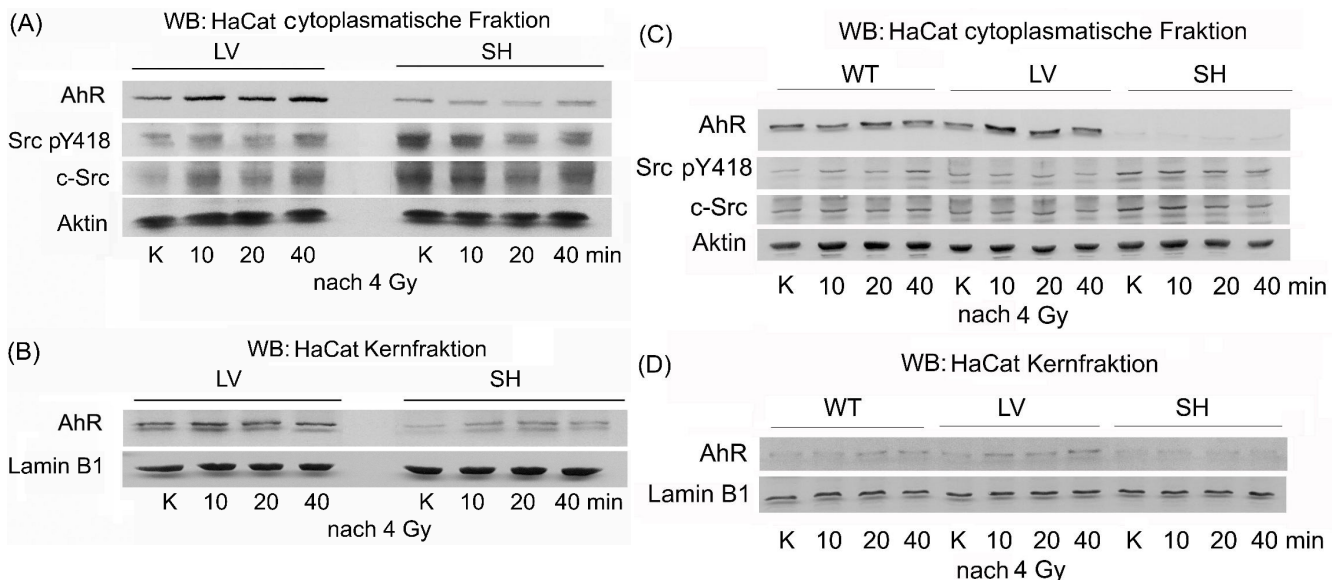
Abb.: 3.12: Hemmung der AhR-Expression in A549-Zellen mit siRNA führte zu einer reduzierten Phosphorylierung der DNA-PK am Threonin Nr. 2609 und am Serin Nr. 2056. A549-Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer AhR-siRNA transfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt, nach den entsprechenden Zeiten lysiert und die Kernfraktion isoliert. Mit SDS-PAGE wurden die Proteine nach Molekulargewicht analysiert und mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

Unter AhR-siRNA-Bedingungen ist die Phosphorylierung der DNA-PK nach Bestrahlung reduziert. Da die untersuchten Reste durch ihre Phosphorylierung die Aktivität der Kinase anzeigen, kann auf eine reduzierte Aktivität geschlossen werden. Jedoch wäre ein Kinaseassay notwendig, um diese Annahme zu bestätigen.

3.4.2 Stabile Hemmung der AhR-Expression durch shRNA

Zusätzlich zu den Versuchen mit temporärem knock-down des AhR durch siRNA wurden Versuche mit einer Keratinozyten-Zelllinie (HaCat) durchgeführt. Diese besitzt lentiviral eine stabil reduzierte AhR-Expression. Zunächst wurden in dieser Zelllinie die siRNA Ergebnisse verifiziert. Es standen sowohl die Wildtyp-Zellen als auch die eigentlichen Kontroll-Zellen mit dem Leervektor zur Verfügung. Nachfolgend ist ein Western-Blot mit allen drei Zelltypen exemplarisch gezeigt (Abb. 3.13). In den weiteren Experimenten wurden zum Teil nur die Leervektor-Zellen als Kontrolle verwendet.

Wie in den A549-Zellen, die mit spezifischer AhR-siRNA behandelt waren, wurde in den AhR-shRNA-HaCat-Zellen verglichen mit den Wildtyp-Zellen beziehungsweise mit den Leervektor-Zellen eine reduzierte AhR-Expression gefunden (Abb. 3.13). Ebenfalls wurde beobachtet, wie auch schon in den AhR-siRNA Experimenten gefunden, dass unter reduziertem AhR die aktivierte Form der c-Src-Kinase bereits im unbestrahlten Basalwert anstieg. Für die phosphorylierten Formen der DNA-PK pS2056 und pT2609 wurde in den AhR-shRNA-HaCat-Zellen ebenfalls eine Reduktion gefunden (K. Dittmann, persönliche Mitteilung).



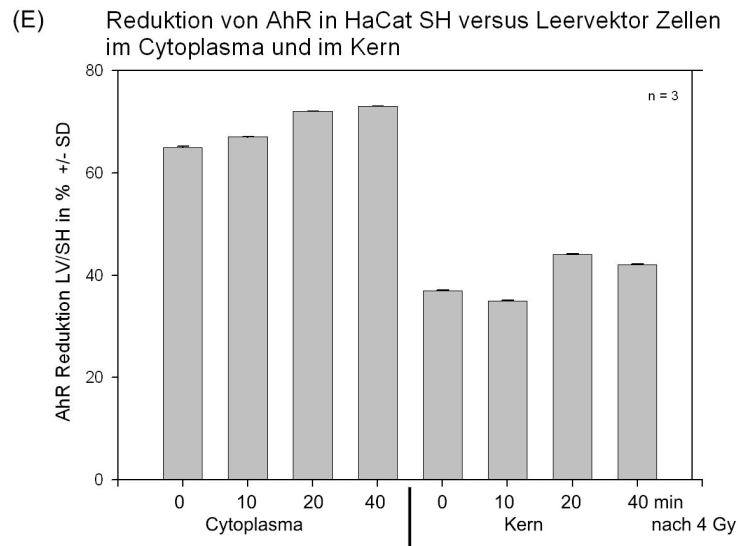


Abb. 3.13: Reduktion des AhR durch shRNA bewirkt eine Stabilisierung der aktivierten c-Src-Kinase. Western-Blot-Analyse von HaCat Wildtyp-, Leervektor- und shRNA-Zellen, die unbestrahlt in der Kontrolle oder mit 4 Gy bestrahlt wurden und 10, 20 oder 40 min später in cytoplasmatische ((A) und (C)) und Kernfraktion ((B) und (D)) getrennt wurden. (E) Densitometrische Auswertung der Reduktion des AhR-Proteins unter shRNA im Cytoplasma und im Kern verglichen zu den Leervektor-Zellen, normiert auf Aktin bzw. Lamin B1. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Reduktion des AhR in der HaCat-Zelllinie wurde densitometrisch ausgewertet. Es ergab sich eine Reduktion des AhR im Cytoplasma um etwa 70 %. Im Kern dagegen wurde nur eine Reduktion um knapp 40 % gefunden.

Um die Funktionalität des AhR-Signalwegs nach ionisierender Strahlung auch in den HaCat-Zellen zu zeigen, wurde die CYP1A-Expression untersucht.

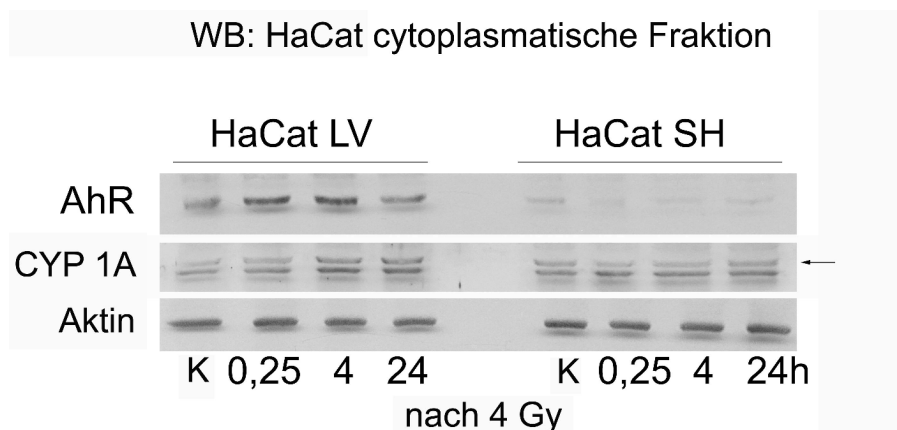


Abb. 3.14: Überprüfung des HaCat-Zellsystems auf die Funktionalität des AhR-Signalwegs mittels CYP1A-Expressionstest nach ionisierender Strahlung im Western-Blot. Zellen in der stationären Wachstumsphase wurden bestrahlt und bis zu 24 h danach lysiert. In der cytoplasmatischen Fraktion wurde CYP1A nachgewiesen.

In den Leervektor-Zellen zeigte sich wiederum eine strahleninduzierte AhR-Stabilisierung sowie eine CYP1A-Expression nach ionisierender Strahlung, während unter shRNA-

Bedingungen die AhR- und die CYP1A-Expressionen reduziert waren. Auch in diesem Zellsystem verhielt sich der AhR-Signalweg wie erwartet. Es fand sich nach Bestrahlung eine AhR-Aktivierung und die damit korrelierte CYP1A-Expression, die in shRNA-Zellen leicht unterdrückt war.

3.5 Die AhR-Hemmung führt zu einer Radiosensitivierung und zu einem erhöhten DNA-Restschaden

3.5.1 AhR-Reduktion durch siRNA - Effekte auf das klonogene Überleben und den DNA-Restschaden

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung unter Beeinflussung des AhR-Proteinlevels wurden jeweils spezifische Tests nach AhR-knock-down durchgeführt. Die Zellen wurden mit spezifischer AhR-siRNA transfiziert und 72 h danach für die Versuche verwendet. Die erfolgreiche temporäre Reduktion des AhR-Proteins wurde im Western-Blot überprüft und ist in Abb. 3.15 (C) dargestellt. Die Überlebensrate nach siRNA-Transfektion wurde anhand der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bestimmt. In den untersuchten A549-Zellen wurde im Koloniebildungstest durch den AhR-knock-down im Vergleich zur Kontroll-siRNA ein dosisabhängiger radiosensitivierender Effekt gefunden (Abb. 3.15 (A)).

Um die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zu untersuchen, wurde die Menge an residualem DNA-Schaden bestimmt. Diese Quantifizierung wird durch Markierung des γ H2AX mit einem Fluoreszenzantikörper ermöglicht. Die markierten Reparatur-Foci pro Kern können dann ausgezählt werden.

In der Tumorzelllinie A549 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der residualen Reparatur-Foci und somit des nicht reparierten DNA-Schadens. Dies trat bei allen untersuchten Strahlungsdosen (Abb. 3.15 (B)) nach Unterdrückung der AhR-Proteinexpression durch siRNA-Behandlung auf.

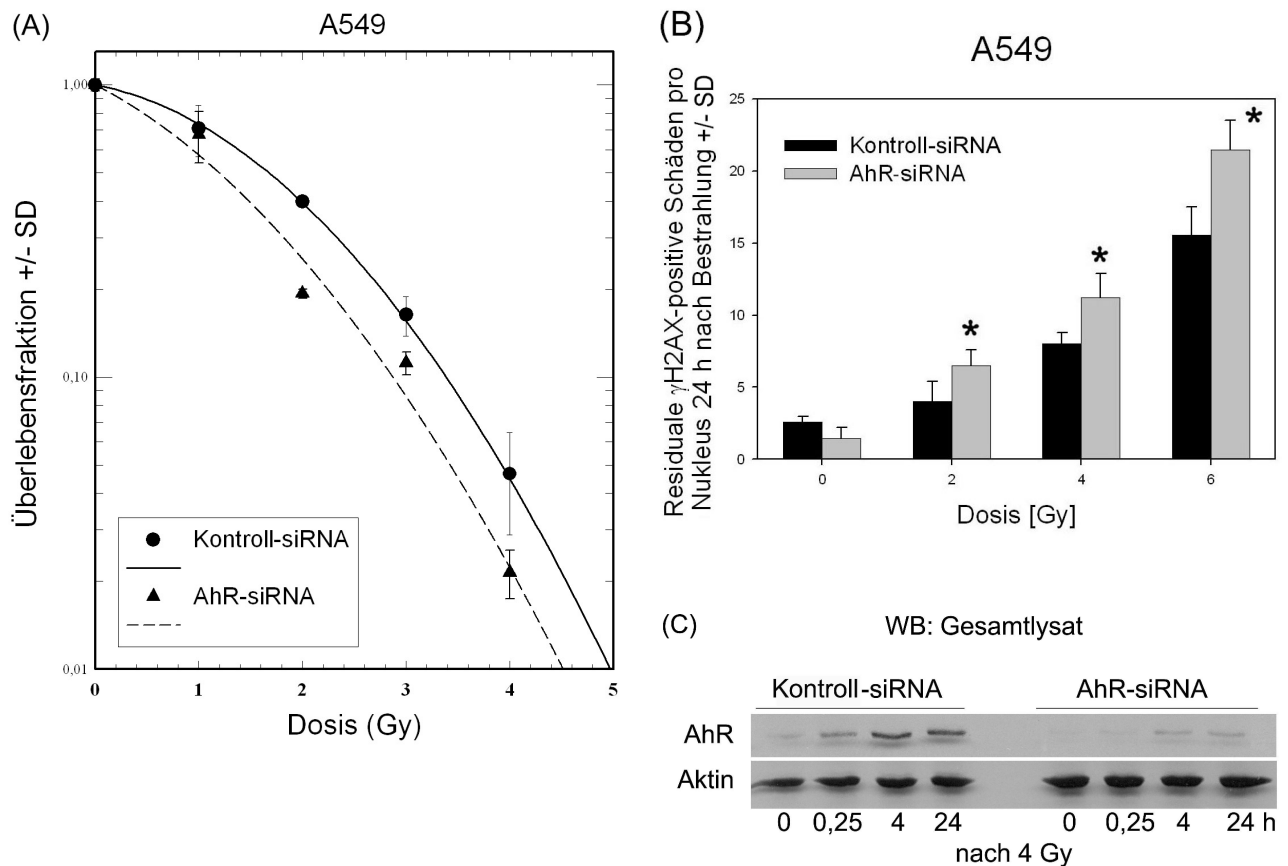


Abb. 3.15: Unterdrückung des AhR-Proteins in A549-Zellen mit spezifischer siRNA führte zu signifikant mehr DNA-Restschaden und einer Radiosensitivierung. Die Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert und für die entsprechenden Versuche verwendet. **(A)** Der Koloniebildungstest zeigt eine geringere klonogene Überlebensrate. Transfizierte A549-Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und 24 h danach mit Einzeldosen von 1 bis 4 Gy bestrahlt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde nach 10 Tagen bestimmt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten. **(B)** γ H2AX-positive Foci 24 h nach Bestrahlung. Die Restschäden wurden mit Hilfe eines Antikörpers gegen die phosphorylierte Form des γ H2AX-Histons visualisiert. Sternchen stehen für eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test, $p < 0,05$) zwischen Kontroll-siRNA und Zellen, die mit spezifischer AhR-siRNA behandelt wurden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten. **(C)** Erfolgreiche Reduzierung des AhR-Proteins nach Transfektion mit AhR-siRNA. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt, nach 15 min, 4 h und 24 h lysiert und mit SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt sowie mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

3.5.2 Einfluss einer AhR-Hemmung durch shRNA auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung

In der HaCat AhR-shRNA-Zelllinie wurden die bereits genannten DNA-Reparaturenendpunkte untersucht. Im Koloniebildungstest wurden HaCats als Klone (Abb. 3.16 (A)) oder in der stationäre Wachstumsphase bestrahlt und 6 h danach ausgesät (Abb. 3.16 (B)). Beide Versuchsansätze ergaben eine klare Radiosensitivierung in AhR-shRNA-Zellen (Abb. 3.16), während die Leervektor-Zellen nur marginal vom Wildtyp abwichen.

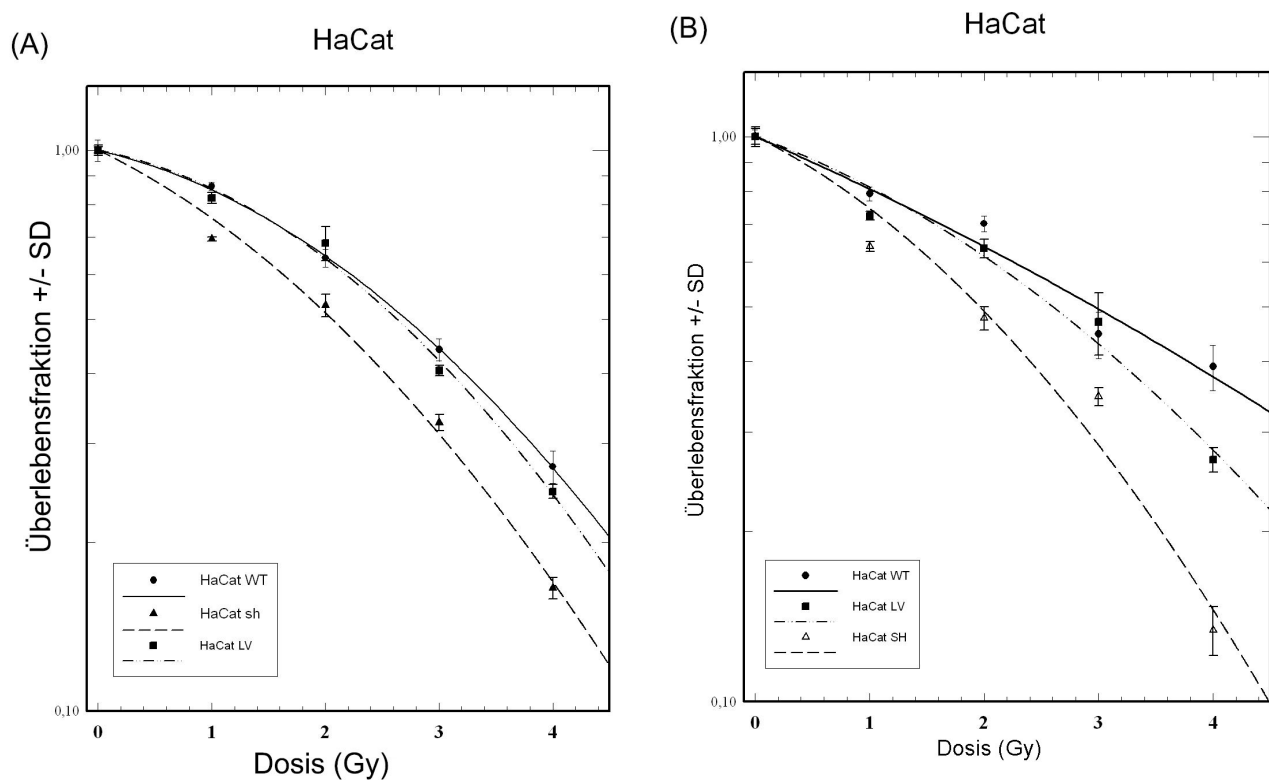


Abb. 3.16: HaCat-Zellen sind nach AhR Unterdrückung durch shRNA radiosensitiver als Leervektor- oder Wildtyp-Zellen. 500 Zellen wurden in 10 cm Schalen pro Versuchsansatz ausgesät. Die Überlebensfraktion wurde mit Kolonien >50 Zellen bestimmt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten. **(A)** Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bestrahlt und anschließend 10 Tage im Brutschrank inkubiert. **(B)** HaCat-Zellen wurden in der stationären Wachstumsphase mit Einzeldosen bestrahlt und 6 h später ausgesät.

Auch hier konnte das Ergebnis aus den A549-Zellen, die mit AhR-siRNA behandelt worden waren, bestätigt werden. Zellen mit reduziertem AhR-Protein zeigten ein signifikant schlechteres klonogenes Überleben nach ionisierender Strahlung.

3.5.3 Einfluss von AhR-shRNA auf die Reparatur von residualen DNA-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung

Um den beobachteten Effekt beim klonogenen Überleben und den zu erwartenden Einfluss auf die Doppelstrangbruchreparatur zu untermauern, wurde in den HaCat-Zellen der residuale DNA-Schaden untersucht. HaCat Wildtyp, Leervektor und shRNA-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät, bestrahlt und nach 24 h fixiert. Nach Fluoreszenzmarkierung des γ H2AX wurden 100 Kerne pro Versuchsansatz ausgezählt.

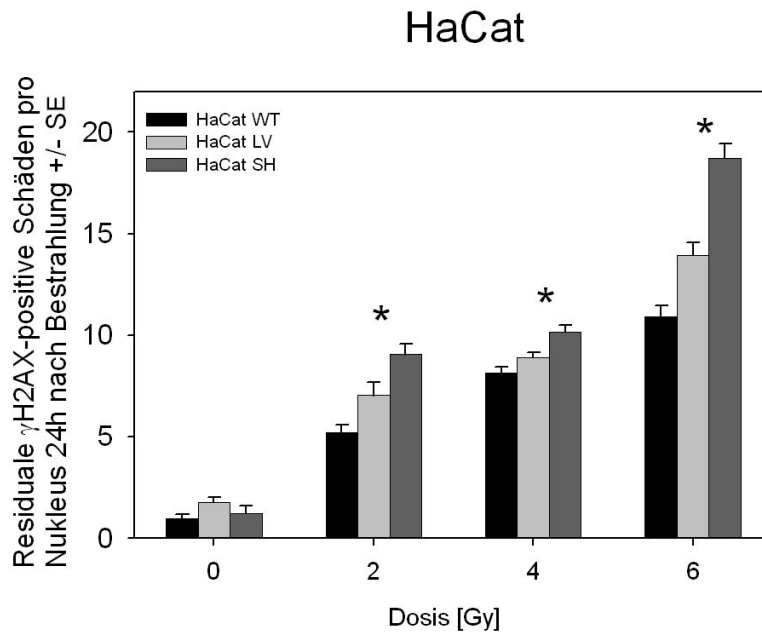


Abb. 3.17: Der residuale DNA-Schaden 24 h nach Bestrahlung in HaCat shRNA-Zellen war signifikant erhöht. Residuale DNA-Schäden wurden 24 h nach Bestrahlung mit 2, 4 und 6 Gy mittels Quantifizierung der γ H2AX-positiven Foci durchgeführt. Jeder Wert stellt den Mittelwert \pm SE an residualen Reparatur-Foci pro Zelle aus drei unabhängigen Experimenten dar. Sternchen beschreiben eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test, $p < 0,05$) zwischen den Leervektor-Zellen und den HaCat shRNA-Zellen.

Nach AhR-knock-down durch shRNA ergab sich 24 h nach Bestrahlung ein signifikant höherer DNA-Restschaden als in den Leervektor-Zellen bzw. den Wildtyp-Zellen (Abb. 3.17). HaCat-Zellen ohne AhR reparierten somit die durch ionisierende Strahlung entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche schlechter als die Leervektor- bzw. die Wildtyp-Zellen. Das frühere Ergebnis mit AhR-siRNA konnte somit in AhR-shRNA-Zellen bestätigt werden. Mit reduziertem AhR reparieren A549- und HaCat-Zellen signifikant schlechter. Die Reduktion des AhR-Proteins ist also mit einer schlechteren DNA-Reparatur assoziiert.

3.6 Effekt des klassischen AhR-Induktors 3-Methylcholanthren auf das klonogene Überleben

Um zu zeigen, dass der beobachtete Effekt des AhR auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung unabhängig von seiner klassischen Aufgabe als Transkriptionsfaktor im Fremdstoffmetabolismus ist, wurde die Auswirkung der Aktivierung des AhR durch aromatische Kohlenwasserstoffe auf die Endpunkte der DNA-Reparatur untersucht. Im Koloniebildungstest wurde der AhR-Induktor 3-Methylcholanthren verwendet. A549-Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden, wurden nach einer Stunde Vorbehandlung mit 2 μ M 3-Methylcholanthren ausgesät und 6 h später bestrahlt (Abb. 3.18).

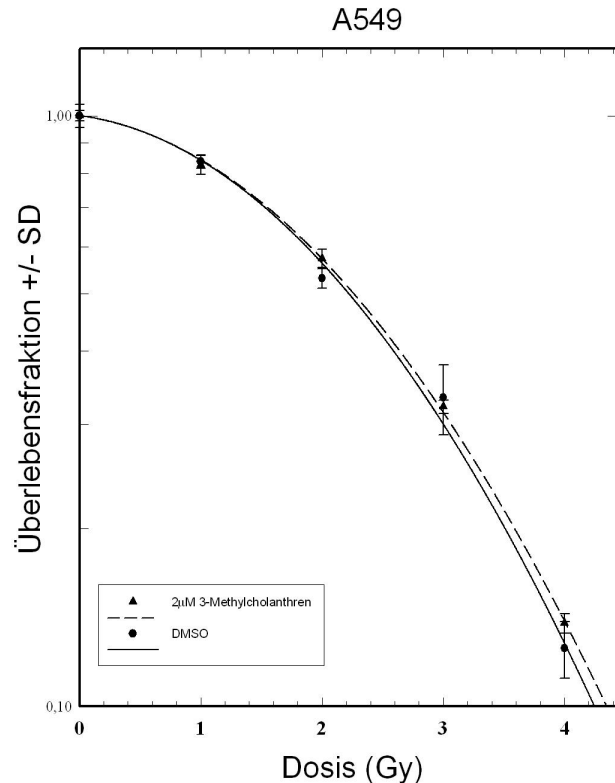


Abb. 3.18: Klonogenes Überleben nach klassischer Aktivierung des AhR mit 3-Methylcholanthren. A549-Zellen wurden eine Stunde mit 2 μ M 3-Methylcholanthren inkubiert oder mit dem gleichen Volumen DMSO (Lösungsmittel) versetzt und in 10 cm Schalen ausgesät. 24 h danach wurden die Zellen mit einer Einzeldosis von 1 bis 4 Gy bestrahlt. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Zellen abgestoppt und die überlebenden Klone (>50 Zellen) ausgezählt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten.

Das Ergebnis zeigte keinen Effekt von 3-Methylcholanthren-Behandlung auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung von A549-Zellen. Dies konnte als Hinweis angesehen werden, dass 3-Methylcholanthren als klassischer Aktivator des AhR demnach nicht die strahleninduzierte Reaktion des Rezeptors triggert. Die beobachteten Effekte sind also unabhängig vom AhR-Signalweg nach Aktivierung mit Xenobiotika wie Dioxin, 3-Methylcholanthren oder andere.

3.7 Einfluss von ARNT auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung

Um seine Wirkung als Transkriptionsfaktor zu entfalten, dimerisiert der AhR im Kern mit ARNT, um an das XRE binden zu können. Deshalb wurde geklärt, ob eventuell die Dimerisierung mit ARNT eine Rolle bei der strahleninduzierten Reaktion des AhR spielen könnte. Außerdem sollten weitere Hinweise erhalten werden, ob der klassische Signalweg des AhR nach ionisierender Strahlung in die Zellantwort involviert ist.

Das ARNT-Protein wurde mit Hilfe von spezifischer siRNA in seiner Expression unterdrückt. Dazu wurden A549-Zellen 72 h nach Transfektion mit der ARNT-siRNA bestrahlt und nach

unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Die Kernfraktionen wurden im Western-Blot untersucht. Abbildung 3.19 zeigt die temporäre Unterdrückung des ARNT-Proteins nach Behandlung mit spezifischer siRNA im Kern.

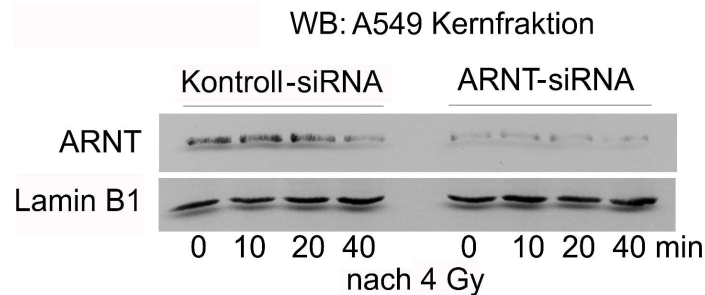


Abb. 3.19: Western-Blot-Analyse von A549-Zellen zur Verdeutlichung der erfolgreichen Unterdrückung der ARNT-Proteinexpression. Die Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt und nach den entsprechenden Zeiten lysiert. Mit SDS-PAGE wurden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

Parallel dazu wurde mit diesen Zellen eine Bestimmung des residuellen DNA-Restschadens 24 h nach Bestrahlung durchgeführt, um die Rolle von ARNT bei der Zellreaktion im Kern nach ionisierender Strahlung zu untersuchen (Abb. 3.20).

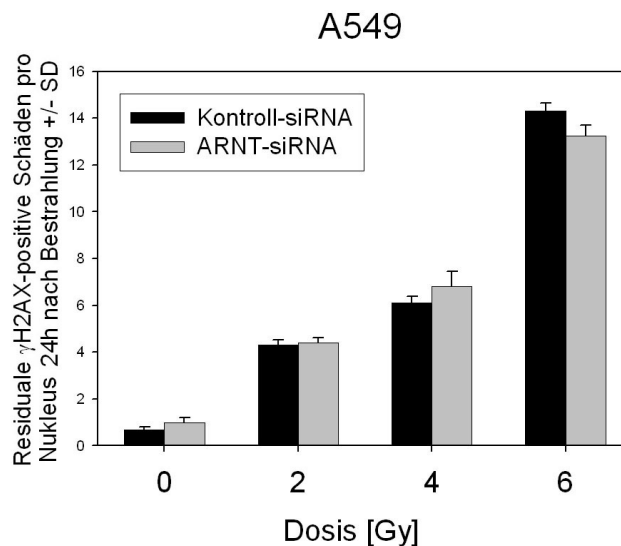


Abb. 3.20: Residuale γ H2AX-Foci 24 h nach Bestrahlung in A549-Zellen nach ARNT-siRNA Behandlung. Die Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert und für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten.

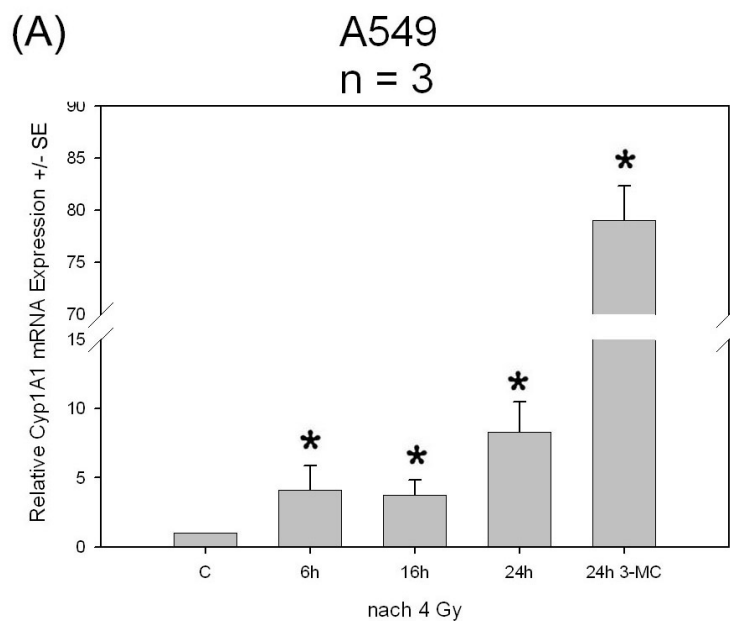
Der Knock-Down des ARNT-Proteins zeigte überraschenderweise keine nennenswerte Veränderung der Anzahl der Reparatur-Foci pro Einzelzelle im Vergleich zur Kontrolle. Die Dimerisierung von AhR und ARNT spielt somit nach ionisierender Strahlung keine Rolle für

die Signalweiterleitung im Gegensatz zur klassischen Induktion des AhR mit aromatischen Kohlenwasserstoffen. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Induktion des AhR durch ionisierende Strahlung unabhängig von seiner klassischen Funktion ist.

3.8 CYP1A-Expression nach ionisierender Strahlung - welche Rolle spielt das fremdstoffmetabolisierende Enzym nach ionisierender Strahlung?

3.8.1 Lightcycler PCR-Analyse des CYP1A1 mRNA Levels in A549 und Hepa1c1c7 nach ionisierender Strahlung

Im Western-Blot der Abbildung 3.10 wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung CYP1A-Stabilisierung beziehungsweise CYP1A-Expression bedingt. Mit einer real-time-PCR wurde diese Beobachtung näher untersucht. Verwendet wurden zwei unterschiedliche Zelllinien, zum einen die menschliche Lungenkarzinomzelllinie A549, zum anderen die Mauszelllinie Hepa1c1c7. Nachfolgende Abbildungen zeigen die Lightcycler-PCR Ergebnisse.



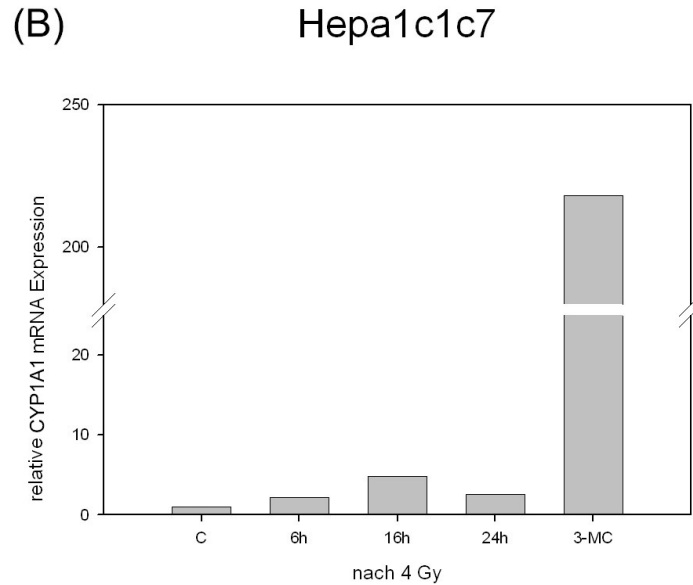


Abb. 3.21: Real-time-PCR-Analyse der CYP1A-Expression nach ionisierender Strahlung in A549 und Hepa1c1c7 Zellen. Die relative mRNA Expression in A549 (A) und Hepa1c1c7 (B) wurde auf Basis der 18sRNA quantifiziert. Sternchen zeigen eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test, $p < 0,05$, $n=3$) zwischen der unbestrahlten Kontrolle und den bestrahlten Zellen.

In beiden Zelllinien wurde eine strahleninduzierte relative CYP1A1-Expression gefunden. Als Positiv-Kontrolle wurde wiederum 3-Methylcholanthren eingesetzt. Die dadurch bewirkte CYP1A1-Expression war in A549 bis zu einem Faktor 7 höher als nach ionisierender Strahlung. In der Maushepatomzelllinie wurde ein noch wesentlich größerer Unterschied zwischen 3-Methylcholanthren und ionisierender Strahlung gefunden.

3.8.2 CYP1A1-Expression nach ionisierender Strahlung - Auswirkungen auf die Überlebensrate

Zur Untersuchung der möglichen Einwirkung von CYP1A auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung wurde der CYP1A-Inhibitor Daidzein verwendet.

Zunächst wurde im Western-Blot die Funktionalität des Inhibitors getestet. In Abbildung 3.22 (A) ist zu sehen, dass eine einstündige Vorbehandlung mit 50 μ M Daidzein die CYP1A Stabilisierung und Expression signifikant zu hemmen vermochte. Parallel dazu wurde unter dem Einfluss von Daidzein ein Koloniebildungstest durchgeführt (Abb. 3.22 (B)).

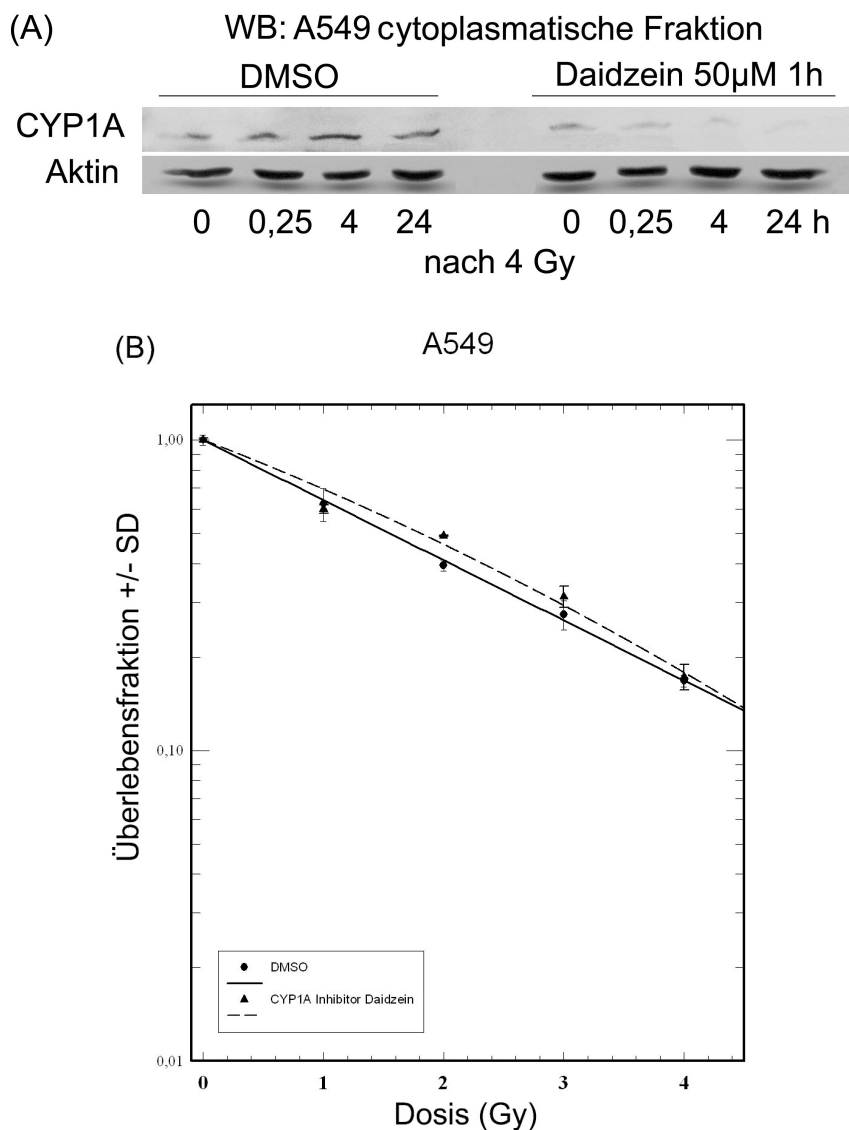


Abb. 3.22: Inhibition von CYP1A hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung. (A) Western-Blot-Analyse von A549-Zellen zur Kontrolle der Inhibition von CYP1A durch einstündige Präinkubation mit 50 µM Daidzein. (B) Koloniebildungstest in A549-Zellen nach Inhibition von CYP1A. Pro Versuchsansatz wurden 500 Zellen ausgesät und mit Einzeldosen von 1-4 Gy bestrahlt. Nach zehntägiger Inkubation wurden die Klone ausgezählt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 parallelen Experimenten.

Es zeigte sich kein Unterschied im klonogenen Überleben nach verschiedenen Strahlungsdosen unter Hemmung von CYP1A. Für die beobachtete Radiosensitivierung nach AhR-Protein-knock-down ist demnach nicht die Hemmung der AhR vermittelten CYP1A-Induktion verantwortlich. Die CYP1A-Expression könnte für die Metabolisierung bzw. die Detoxifizierung des AhR-Liganden nach ionisierender Strahlung notwendig sein.

3.8.3 Auswirkung der CYP1A-Expression auf den DNA-Restschaden nach ionisierender Strahlung

Um jedoch zu klären, ob sich die gefundene strahleninduzierte CYP1A-Expression auf die DNA-Reparatur auswirkt, wurde unter Hemmung der CYP1A1-Aktivität der residuale DNA-Schaden 24 h nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen untersucht (Abb. 3.23).

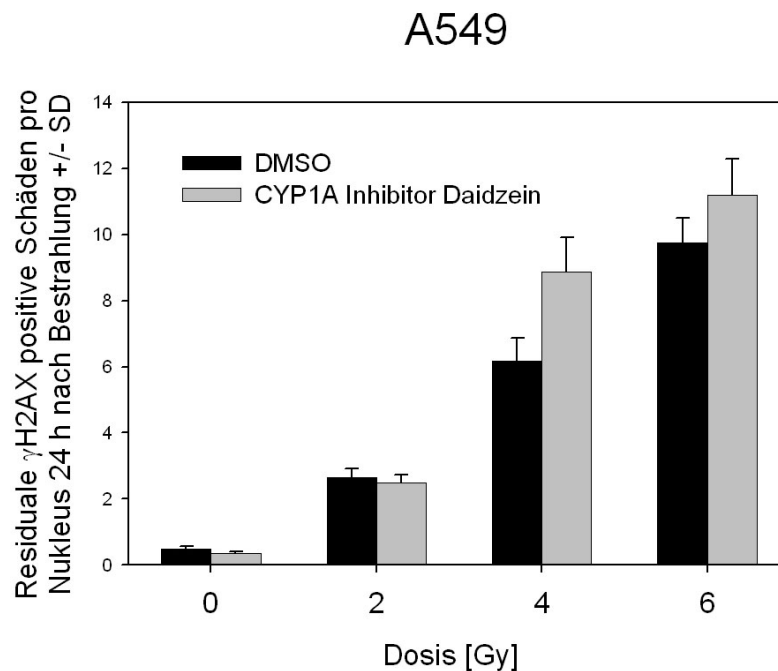


Abb. 3.23: Residuärer DNA-Restschaden 24 h nach Bestrahlung und Inhibition von CYP1A. Die Zellen wurden 24 h nach Aussaat bestrahlt. Nach 10 Tagen wurden die Kolonien (>50 Zellen) quantifiziert. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm SD aus drei parallelen Experimenten.

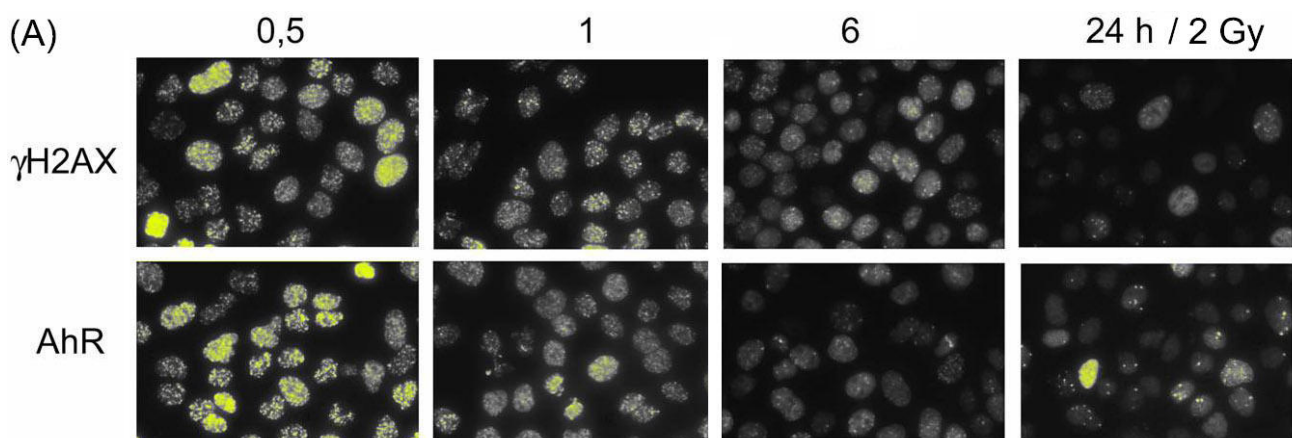
Nach 2 Gy Bestrahlung fanden sich nach 24 h etwa gleich viele residuale Reparatur-Foci in der Kontrolle wie nach CYP1A-Hemmung. Nach 4 und 6 Gy blieben mehr DNA-Schäden unrepariert, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Wie im Koloniebildungstest zeigte sich auch im γ H2AX-Test kein entscheidender Effekt von CYP1A auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung. Für den beobachteten Einfluss des AhR bei der DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung ist somit weder die Dimerisierung mit ARNT (siehe 3.7) noch die resultierende CYP1A-Expression notwendig.

3.9 AhR-Foci-Formation im Kern nach stabiler Hemmung der AhR-Expression durch shRNA

Zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung des nukleären AhR für die DNA-Reparatur wurde die nukleäre Lokalisation des AhR untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass der AhR, etwa wie H2AX, dosisabhängig focal am DNA-Schaden Proteinkomplexe bildet.

3.9.1 Induktionskinetik im Vergleich zu den γ H2AX-Foci in A549 Tumorzellen

Um das Auftreten von AhR-Foci im Kern zu klären, wurde eine Induktionskinetik in A549-Zellen nach Bestrahlung durchgeführt. Die Zellen wurden 30 min, 1 h, 6 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Nachfolgende Abbildung 3.24 (A) zeigt Fluoreszenzaufnahmen von A549-Zellen, die mit γ H2AX- oder AhR-Antikörper inkubiert wurden. 30 min nach Bestrahlung sind deutlich die γ H2AX-Reparatur-Foci zu sehen, die über die Zeit nach erfolgreicher DNA-Reparatur abnehmen.



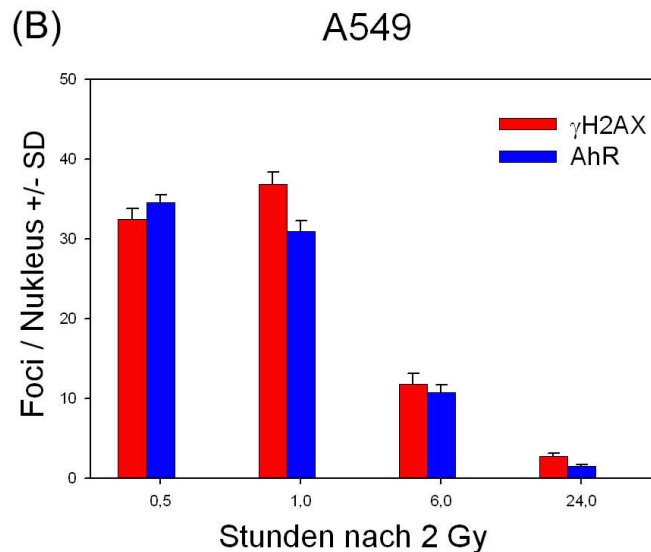


Abb. 3.24: Bildung von AhR-Foci in A549-Zellen nach ionisierender Strahlung. (A) Fluoreszenzmikroskopie nach 2 Gy Bestrahlung und Antikörperfärbung von γ H2AX und AhR. Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht. (B) Quantifizierung der AhR- und γ H2AX-Foci im Nukleus. Die A549-Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und 30 min, 1 h, 6 h und 24 h später fixiert und für die Mikroskopie weiterverwendet.

24 Stunden nach Bestrahlung ist der überwiegende Teil der DNA-Doppelstrangbrüche, visualisiert durch Antikörperfärbung von γ H2AX, repariert und es sind annähernd keine Foci mehr zu sehen. Überraschenderweise wurden auch AhR-Foci beobachtet, die in ihrer Kinetik einen ähnlichen Verlauf hatten wie die γ H2AX-Foci. Zur besseren Auswertung wurden in 100 Kernen die Foci ausgezählt und in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3.24 (B)).

3.9.2 Induktion von AhR-Foci nach 3-Methylcholanthren-Behandlung

Um die Relevanz der gefundenen AhR-Foci nach ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurde mit 3-Methylcholanthren behandelt und auf Präsenz von AhR- und γ H2AX-Foci im Kern untersucht (Abb. 3.25). A549-Zellen wurden mit 2 μ M 3-Methylcholanthren für eine Stunde inkubiert, anschließend wurde das Medium gewechselt und nach 1 h, 6 h und 24 h die Zellen fixiert. Es konnten auch in diesem Versuchsansatz AhR-Foci detektiert werden, die über die Zeit zunahmten und nach etwa 10 Stunden eine Sättigung erreichten. Die gefundene Anzahl der AhR- und γ H2AX-Foci war 10-12 mal geringer als nach ionisierender Strahlung.

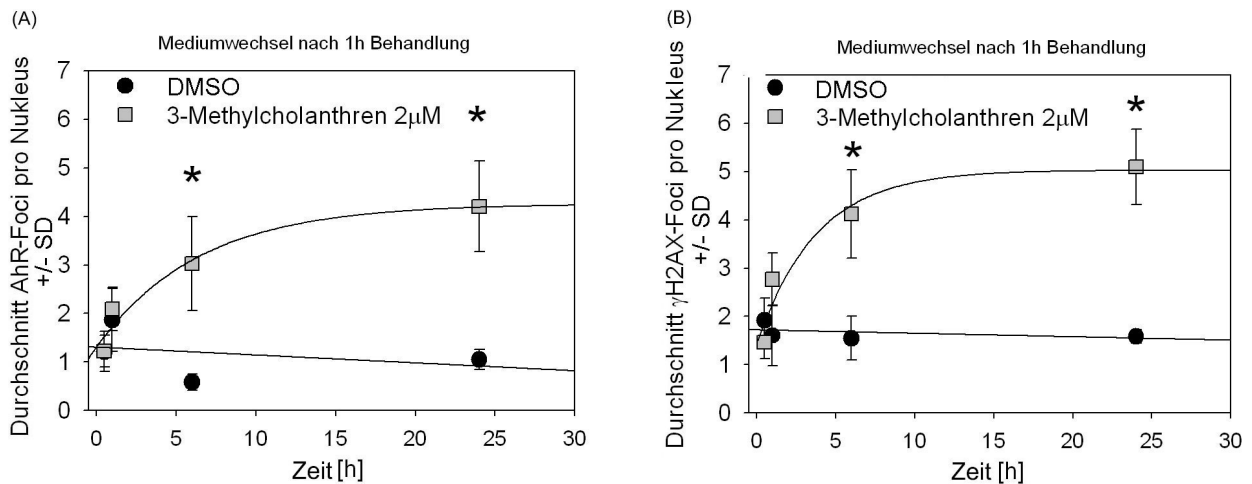


Abb. 3.25: AhR- und γ H2AX-Foci nach 3-Methylcholanthren-Behandlung in A549-Zellen. Quantifizierung der AhR- und γ H2AX-Foci pro Kern nach einstündiger Vorbehandlung der Zellen mit 2 μ M 3-Methylcholanthren und anschließendem Mediumwechsel. Nach 1 h, 6 h und 24 h wurden die Zellen für die Antikörperfärbung und die nachfolgende Fluoreszenzmikroskopie fixiert.

3.9.3 Induktion von AhR-Foci in AhR-shRNA-knock-down-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht wie sich die AhR-Foci-Bildung und die Kinetik der Foci-Formation verändert, wenn die Proteinmenge des AhR reduziert ist. Dazu wurden HaCat AhR-shRNA-Zellen und als Kontrolle die Leervektor-Zellen verwendet. Nach 30 min, 1h, 6 h und 24 h nach 2 Gy Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und für die Antikörperfärbung (AhR und γ H2AX) verwendet. Es wurden Fluoreszenz-Bilder angefertigt und die Anzahl der Foci in 100 Kernen pro Ansatz erfasst. Die Auswertung zeigt Abb. 3.26 (A) für die AhR- und (B) für die γ H2AX-Foci.

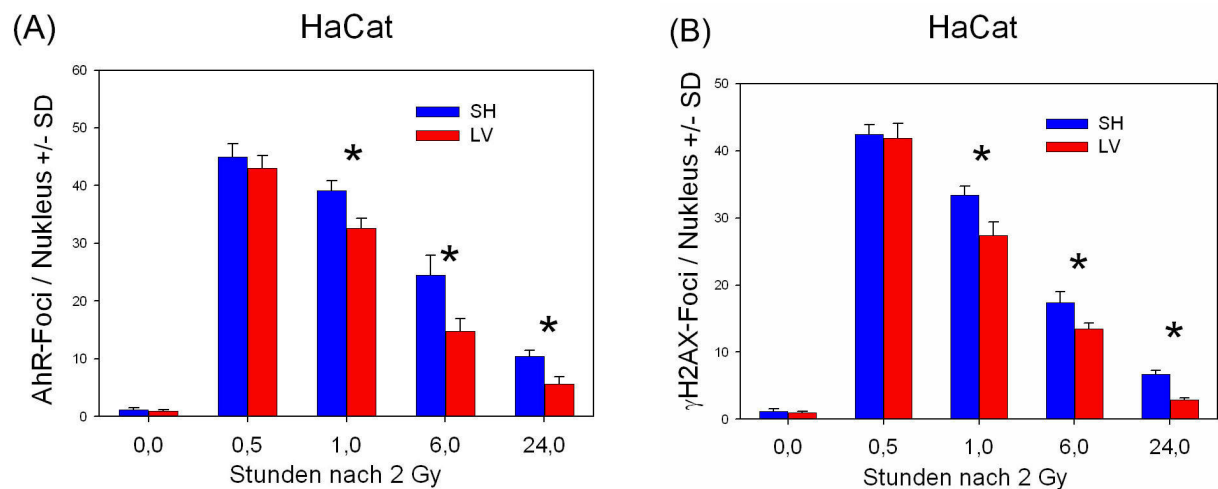


Abb. 3.26: AhR- und γ H2AX-Foci in HaCat shRNA-Zellen sind signifikant erhöht. HaCat Leervektor- und shRNA-Zellen wurden 30 min, 1 h, 6 h und 24 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Sternchen zeigen eine statistisch signifikante Differenz (student's t-test,

p < 0,05) zwischen den Leervektor-Zellen und den AhR-shRNA-Zellen. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Überraschenderweise waren auch in den Zellen mit AhR-knock-down 30 min nach Bestrahlung annähernd gleich viele AhR-Foci wie in den Leervektor-Zellen gefunden worden. Nach 1 h fanden sich signifikant mehr AhR-Foci als in der Kontrolle, was sich bis 24 h nach Bestrahlung fortsetzte. Das Ergebnis zeigt, dass die AhR-shRNA-Zellen schlechter reparieren als die Kontroll-Zellen. Dies ist mit dem Ergebnis des Koloniebildungstests konform. Verwunderlich jedoch war die kaum reduzierte Anzahl der AhR-Foci in den shRNA-Zellen, obgleich das AhR-Protein im Kern um 40 % reduziert ist (Abb. 3.13). Optisch waren in den HaCat AhR-shRNA-Zellen die AhR-Foci kleiner (siehe Abb. 3.27), was auf einen geringeren AhR-Anteil schließen lässt. Für γ H2AX fand sich erwartungsgemäß eine sehr ähnliche Kinetik. Es waren 24 h nach Bestrahlung in den AhR-shRNA-Zellen signifikant mehr γ H2AX-Reparatur-Foci als in der Kontrolle zu finden, was für einen größeren residuellen DNS-Schaden spricht.

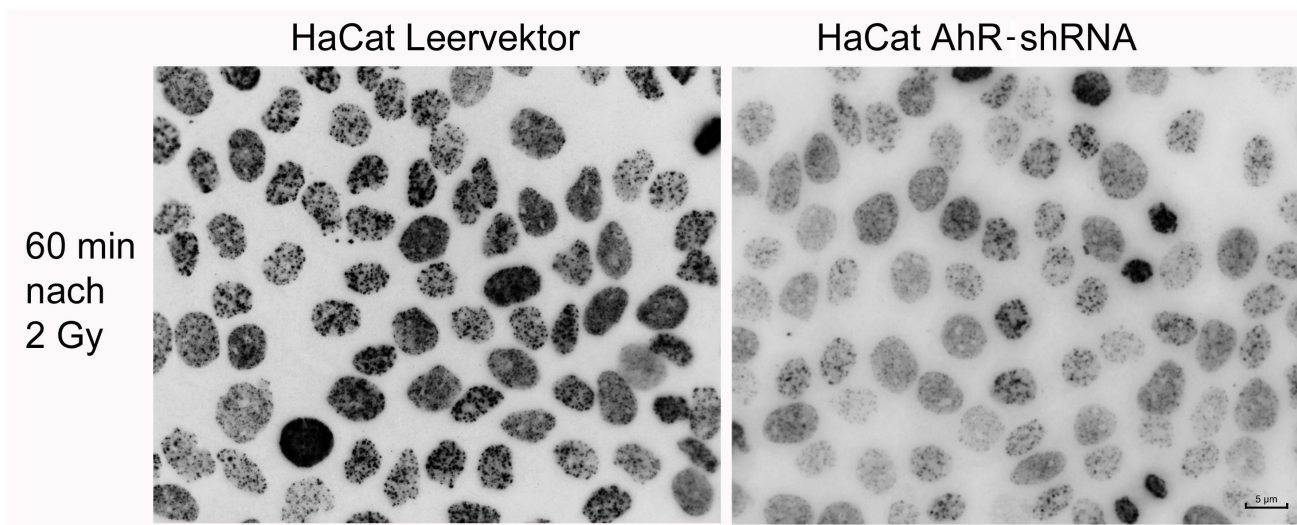


Abb. 3.27: Übersichtsaufnahme von AhR-Foci in HaCat-shRNA- und Leervektor-Zellen. Im HaCat Zellsystem wurden Leervektor- und shRNA-Zellen 60 min nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern des AhR im Kern bei der DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung

Um die Rolle des AhR bei DNA-Reparaturprozessen aufzuklären und um mögliche Interaktionspartner des AhR im Kern zu finden, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden A549-Zellen bestrahlt, nach den angegebenen Zeiten lysiert und die Kernfraktion isoliert. Nach Präzipitation mit AhR-Antikörper im Kernlysat von A549-Zellen

(Abb. 3.28 (A)) wurde mittels SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit spezifischen Antikörpern die an den AhR gebundenen Proteine untersucht. Es wurde sowohl die DNA-PK pT 2609 (Transphosphorylierung) als auch die DNA-PK pS 2056 (Autophosphorylierungsstelle) gefunden. Die Aktivierung der Kinase nach ionisierender Strahlung wurde bereits in Abb. 3.2 gezeigt. Ebenso wurde beobachtet, dass nach AhR-siRNA-Behandlung die Aktivität der DNA-PK reduziert war (Abb. 3.12). Die aktive Form des γ H2AX, phosphoryliert am Serin 139, wurde auch im Komplex gefunden.

Die Interaktion des AhR mit γ H2AX und der DNA-PK spricht dafür, dass der AhR mit der NHEJ-Reparatur interferiert.

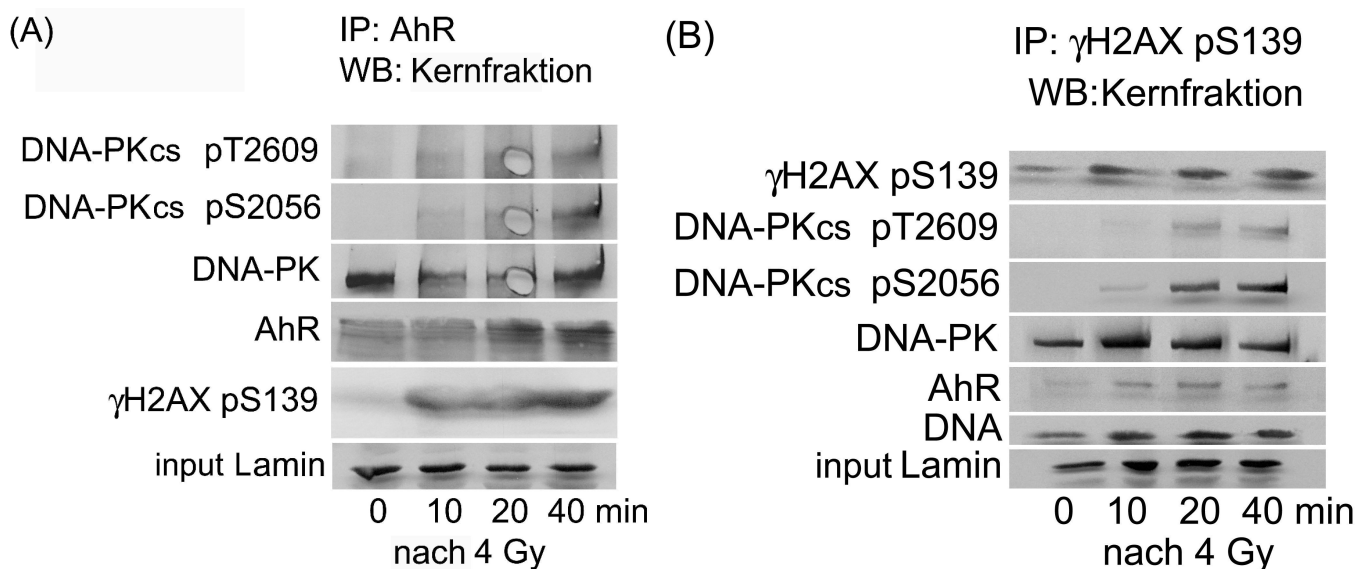


Abb. 3.28: Co-Immünpräzipitation des AhR (A) und der am Serin 139 phosphorylierten Form von γ H2AX (B) im Kernlysate von A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt und nach 10, 20 und 40 min lysiert und die Proteine mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Kernfraktionen (3 mg Protein) wurden für die Immunpräzipitationen mit AhR (A) oder γ H2AX (B) Antikörper eingesetzt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert. Als Kontrolle für die eingesetzte Proteinmenge wurde Laminin verwendet.

Die Ergebnisse der AhR-Immünpräzipitation sollten im Umkehrversuch mit γ H2AX pS139 reproduziert werden. Auch in diesem Versuchsansatz wurden beide aktiven Formen der DNA-PK gefunden, ebenso wie der AhR. In diesem Versuch wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen DNA inkubiert und gezeigt, dass sich der untersuchte Komplex tatsächlich an der DNA befindet (Abb. 3.28 (B))

3.11 Konfokale Mikroskopie als weitere Nachweis für die AhR Kolokalisation mit γ H2AX im Kern nach ionisierender Strahlung

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde die nukleäre Kolokalisation von AhR und γ H2AX weiter untersucht.

3.11.1 γ H2AX und AHR Kolokalisation in A549-Zellen

Es wurde mit konfokaler Mikroskopie untersucht, ob sich der AhR tatsächlich im γ H2AX Focus nachweisen lässt. Abbildung 3.29 zeigt das Ergebnis in A549-Zellen. Es zeigte sich, dass in der unbestrahlten Kontrolle der blau gefärbte AhR zwar im Cytoplasma vorliegt, jedoch im Kern quasi nicht auftaucht. Während nach ionisierender Strahlung eine deutliche Stabilisierung im Cytoplasma und eine Kerntranslokation des AhR stattgefunden hat.

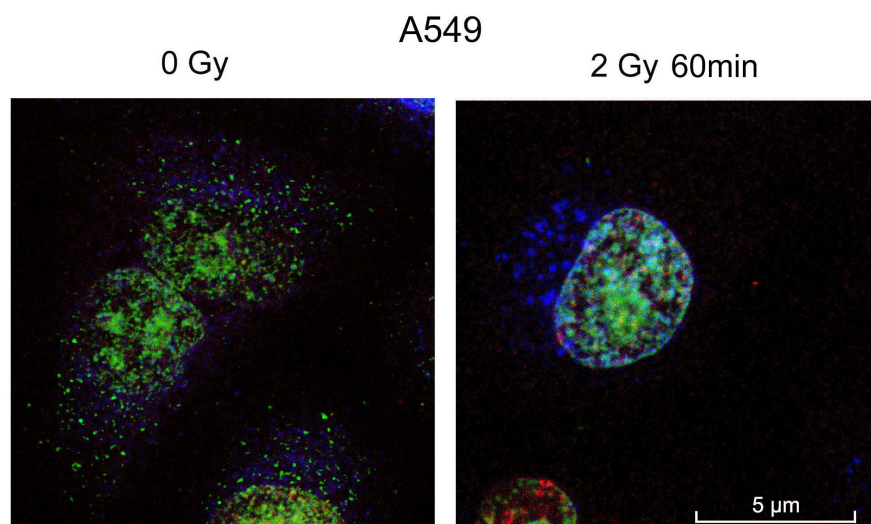


Abb. 3.29: Konfokale Mikroskopie in A549-Zellen zeigt Kolokalisation von AhR und γ H2AX nach ionisierender Strahlung. Konfokale Aufnahme von A549-Zellen unbestrahlt und 60 min nach 2 Gy Bestrahlung. Färbung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen von AhR (blau), γ H2AX (rot) und des Kerns (grün).

Ähnlich verhält es sich mit γ H2AX (in Rot) in der unbestrahlten Kontrolle findet sich relativ wenig, während nach 2 Gy Bestrahlung deutliche γ H2AX-Foci im Kern auftauchen.

Legt man die Bilder übereinander erhält man weiße Regionen, die durch Superposition der Farben Rot, Grün und Blau entstehen. Diese merge-colour Weiss, bzw. die sehr hellen Bereiche sind deutlich zu sehen, was eine Kolokalisation anzeigt (reines Weiß ist nur zu sehen, wenn alle drei Farben denselben Anteil haben).

3.11.2 γ H2AX und AhR-Kolokalisation in HaCat Zellen

Wie in Abb. 3.27 (A) gezeigt, verändert sich die AhR-Foci Bildung in HaCat AhR-shRNA. Um diesen Befund auch bildlich zu verdeutlichen, wurden Versuche mit diesen Zellen unter dem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Eine Stunde nach Bestrahlung zeigte sich eine klare Bildung von γ H2AX-Foci (Rot). Der AhR konnte ebenfalls in Form von Foci nachgewiesen werden (Blau). Auch hier fanden sich nach Überlagerung der drei Farbbilder in der merge-Farbe sehr helle, fast weiße Bereiche. Außerdem fanden sich pinkfarbene Foci aus der Überlagerung von Rot und Blau.

In unten stehender Abbildung ist die strahleninduzierte Rekrutierung von γ H2AX in den Kern zum DNA-Schaden klar zu erkennen.

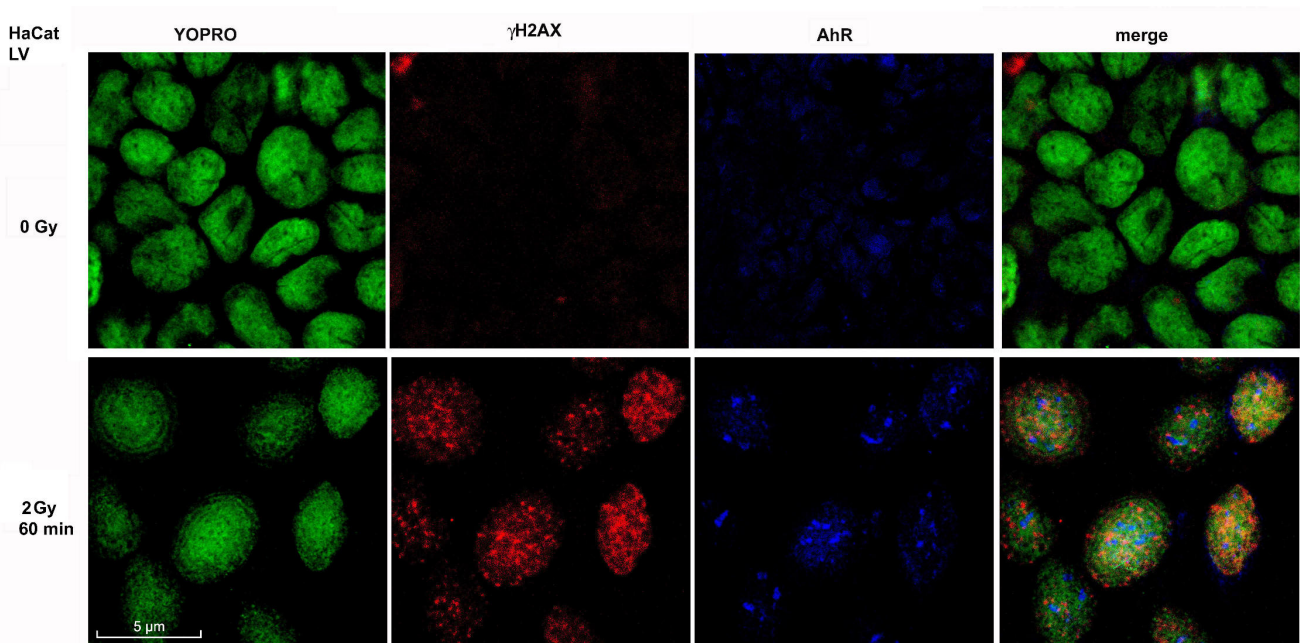


Abb. 3.30: Konfokale Mikroskopie zeigt Kolokalisation von AhR und γ H2AX in HaCat Leervektor-Zellen nach ionisierender Strahlung. Konfokale Aufnahmen von HaCat LV-Zellen unbestrahlt und 60 min nach 2 Gy Bestrahlung, Färbung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen von AhR (blau), γ H2AX (rot) und des Kerns (YOPRO, grün). Die Überlagerung aller drei Signale ergibt das merge-Bild und zeigt nach Bestrahlung in den Kernen eine deutliche Kolokalisation von AhR und γ H2AX.

Ebenso deutlich wird beim AhR die Focus-Bildung nach ionisierender Strahlung. In der übereinander gelegten Abbildung (merge) wird nach Bestrahlung auch die Überlagerung der Proteine durch die weiße Farbe sichtbar. Somit wurde auch in den HaCat Leervektor-Zellen die Kolokalisation von γ H2AX und AhR nach ionisierender Strahlung detektiert. Das heißt in den HaCat Leervektor-Zellen findet sich nach einer Bestrahlung der AhR zusammen mit γ H2AX im DNA-Reparaturfokus.

Nachfolgende Abbildung 3.31 zeigt HaCat shRNA und Leervektor-Zellen im Vergleich 1 h nach 2 Gy Bestrahlung.

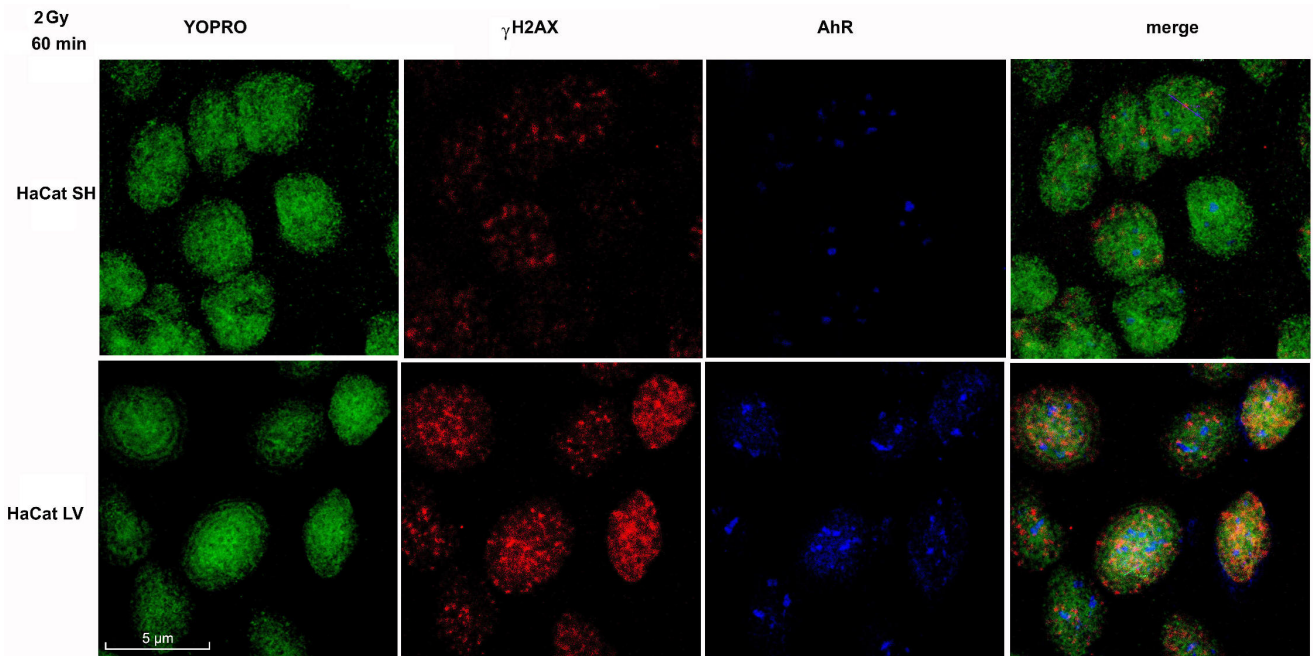


Abb. 3.31: Konfokale Mikroskopie zeigt eine stark reduzierte Kolokalisation von AhR und γ H2AX in HaCat shRNA-Zellen nach ionisierender Strahlung. Konfokale Aufnahmen von HaCat LV und AhR-shRNA-Zellen 60 min nach 2 Gy Bestrahlung, Färbung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen von AhR (blau), γ H2AX (rot) und des Kerns (YOPRO, grün).

Vergleicht man die strahleninduzierte Foci-Bildung in Leervektor-Zellen mit der in AhR-shRNA-Zellen zeigte sich, dass sowohl die γ H2AX- als auch die AhR-Foci-Bildung in den AhR-shRNA-Zellen klar gehemmt war. Der optische Eindruck wurde auch bei einer quantitativen Auswertung bestätigt (Abb. 3.32 (A)). Dabei zeigte sich, die Menge von γ H2AX-Foci in den AhR-shRNA-Zellen leicht reduziert war. Analysierte man jedoch das Ausmaß einer Kolokalisation von γ H2AX- und AhR-Foci (Abb.3.32 (B)), zeigte sich, dass in den AhR-shRNA-Zellen diese deutlich reduziert war. Das heißt, dass die Bildung der γ H2AX-Foci auch bei deutlich reduziertem AhR-Protein funktioniert.

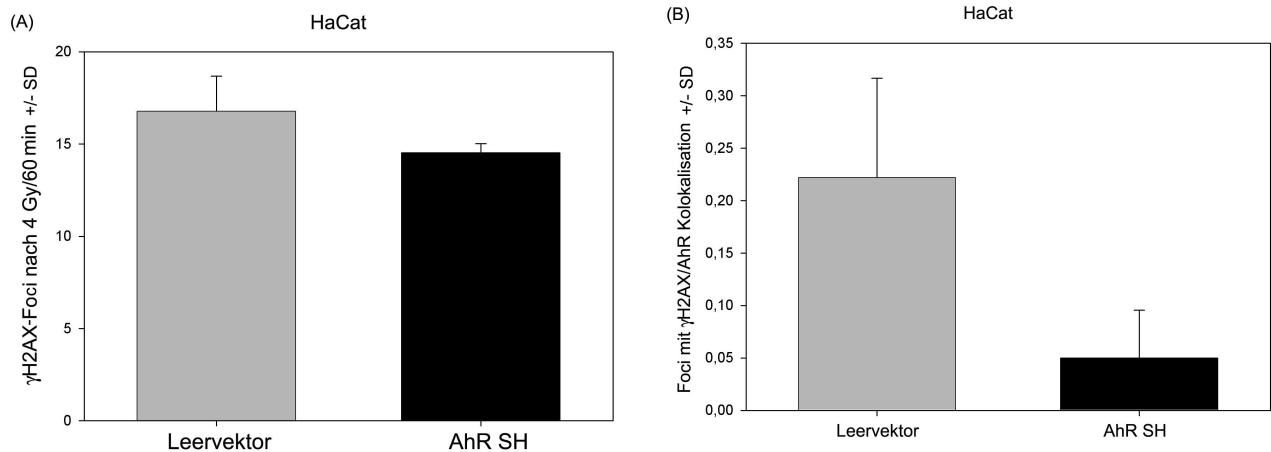


Abb. 3.32: Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach ionisierender Strahlung in HaCat LV-Zellen im Vergleich mit den AhR-shRNA-Zellen (A) und Foci die eine Kolo-kalisation von AhR und γ H2AX zeigen (B)

3.11.3 Konfokale Mikroskopie in HaCat Leervektorzellen - AhR und DNA-PK

In den Western-Blot-Analysen wurde in A549 die Aktivierung des DNA-PK nach ionisierender Strahlung untersucht (Abb. 3.2) und in den Immunpräzipitationen (Abb. 3.28 (A) und (B)) wurden die DNA-PK pT 2609 und pS 2056 im Komplex mit γ H2AX und dem AhR gefunden. Es wurde auch in AhR-siRNA Versuchen die DNA-PK-Phosphorylierungen T 2609 und S 2056 untersucht und eine Reduktion in A549-Zellen gefunden (Abb. 3.12). Unter dem konfokalen Mikroskop sollten nun weitere Hinweise zur möglichen Bindung des AhR an die DNA-PK gefunden werden. Zunächst wurden HaCat Leervektor-Zellen ohne und nach 2 Gy Bestrahlung untersucht (Abb. 3.33).

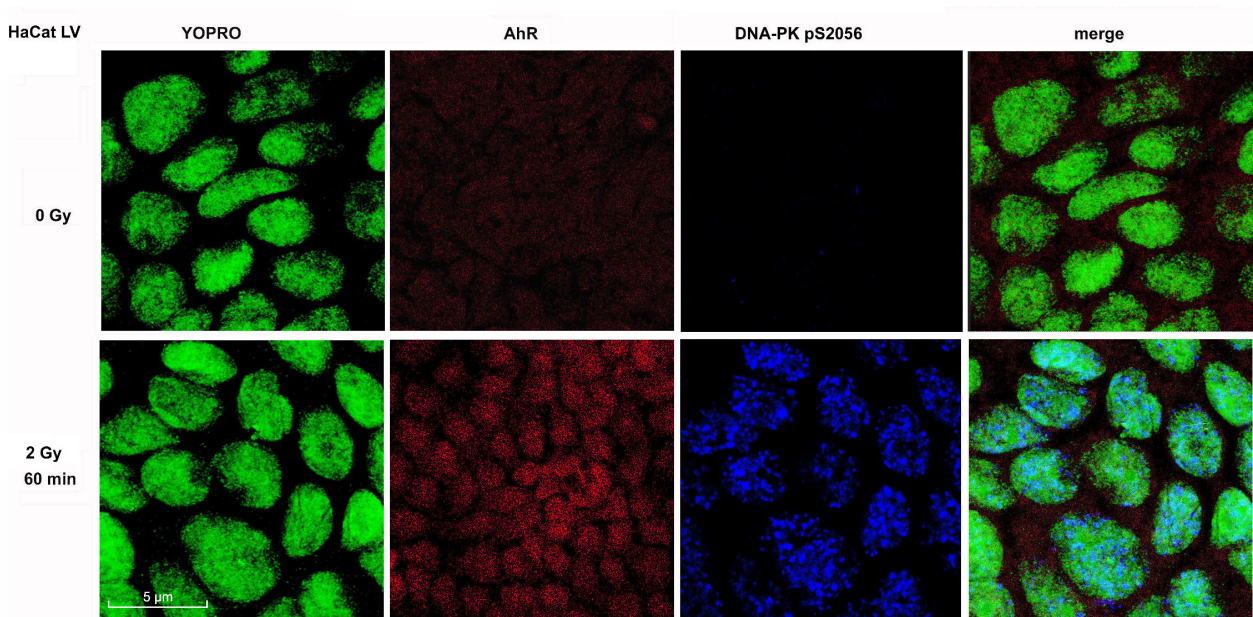


Abb. 3.33: Konfokale Mikroskopie zeigt eine Kolokalisation von AhR und der aktiven Form der DNA-PK pS 2056 in HaCat Leervektor-Zellen nach ionisierender Strahlung. Konfokale Aufnahmen von HaCat LV-Zellen unbestrahlt und 60 min nach 2 Gy Bestrahlung, Färbung mit spezifischen Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen von AhR (rot), DNA-PK pS 2056 (blau) und des Kerns (YOPRO, grün).

In den HaCat Leervektor-Zellen wurde erwartungsgemäß in der unbestrahlten Kontrolle weder für den AhR noch für die DNA-PK pS2056 eine starke Präsenz im Kern gefunden. Nach 2 Gy Bestrahlung hingegen fand sich für die DNA-PK pS2056 eine klare Phosphorylierung und für den AhR war ebenfalls ein starkes Signal zu beobachten. Das merge-Bild zeigt eine Stunde nach 2 Gy mit der sehr hellen, fast weißen Färbung eine mögliche Kolokalisation.

Dieser Versuch muss mit den HaCat AhR-shRNA-Zellen ergänzend durchgeführt werden.

3.12 Beeinflusst der AhR die Zellzyklusregulation oder den MRN-Komplex nach ionisierender Strahlung?

Weiter wurde untersucht, ob der AhR den Zellzyklusarrest im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur beeinflusst. Um diese Frage zu klären wurde in einem Western-Blot der Einfluss des AhR auf den Zellzyklusregulator p21 untersucht. p21 ist ein Cyclin-abhängiger Kinasen Inhibitor, der maßgeblich an der Zellzyklussteuerung beteiligt ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass der AhR nach Aktivierung mit klassischen Agonisten p21 beeinflusst [Pang *et al.*, 2007]. Zu Klärung dieser Frage wurden A549-Zellen mit AhR-siRNA transfiziert und 72 h später bestrahlt und 45 min, 4 h und 24 h danach lysiert. Die cytoplasmatische Fraktion wurde mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit spezifischen Antikörpern

identifiziert. Allerdings wurde unter AhR-Hemmung bei der p21 Expression kein Unterschied zur Kontrolle gefunden.

Desweiteren wurde Mre11, ein Protein des MRN-Komplexes untersucht. Dies ist ein heterotrimerischer Protein Komplex, der sich aus Mre11, Rad50 und Nbs1 zusammensetzt. Dieser Komplex ist in Säugern in die DNA-Reparatur involviert. Er erkennt DNA-Schäden, bindet schnell an den DNA-Doppelstrangbruch und leitet die Bildung der γ H2AX-Foci ein. Es wurde Nbs1 im Western-Blot der cytoplasmatischen Fraktion von A549-Zellen, in denen der AhR durch siRNA unterdrückt worden war untersucht (Abb. 3.34). A549-Zellen wurden verwendet, da sie wie bereits erwähnt wt Tp53 exprimieren, während die HaCat-Zellen eine p53 Mutation auf beiden Allelen tragen.

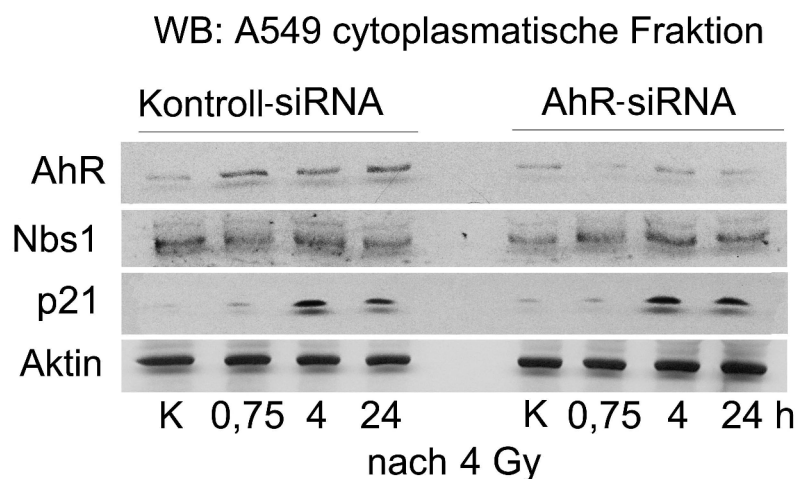


Abb. 3.34: AhR-Protein-Hemmung zeigt keinen Einfluss auf p21 und Nbs1

Die A549-Zellen wurden mit 30 nM Kontroll-siRNA oder spezifischer siRNA gegen AhR transfiziert. 3 Tage später wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt, nach den entsprechenden Zeiten lysiert. Mit SDS-PAGE wurden die Proteine nach Molekulargewicht analysiert und mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

Auch für Nbs1 konnte kein Einfluss des AhR festgestellt werden. Somit gab es keinen konkreten Hinweis darauf, dass der AhR nach ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusregulation wirkt, er in den MRN-Komplex involviert sein könnte oder diesen beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung des AhR nach ionisierender Strahlung

Die Aktivierung des AhR durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und andere xenobiotische Verbindungen ist seit Jahrzehnten ein Thema in der Wissenschaft. In den letzten Jahren wurden immer mehr Erkenntnisse gewonnen, die Aufgaben und Funktionen des AhR auch außerhalb des Fremdstoffmetabolismus nachweisen [Bock & Köhle, 2009; Fan *et al.*, 2010; Gasiewicz *et al.*, 2010]. Fritsche *et al.* [2007] zeigten, dass der AhR nach UV-Strahlung durch das Tryptophanderivat Formylindolocarbazol aktiviert und die CYP1A1-Expression induziert wird. Außerdem wurde die Freisetzung der c-Src-Kinase aus dem cytoplasmatischen Muliproteinkomplex und ihre Aktivierung gezeigt [Fritsche *et al.*, 2007].

In vorliegender Arbeit wurde die Rolle des AhR bei der Regulation der Zellantwort nach ionisierender Strahlung untersucht. Zunächst sollte überprüft werden, ob die von Fritsche *et al.* [2007] gefundene AhR-Aktivierung durch UV-Strahlung auch im humanen Lungenkarzinom-Zellsystem A549 eintritt, das in vorliegender Studie verwendet wurde. Es konnte eine Stabilisierung des AhR im Cytoplasma und eine AhR-Kerntranslokation nach UV-Strahlung nachgewiesen werden. Der Reaktionsverlauf war dabei ähnlich wie nach Behandlung mit dem klassischen AhR-Agonist 3-Methylcholanthren, der als Positiv-Kontrolle verwendet wurde. Nach Inkubation mit 3-Methylcholanthren war bereits nach 15 min der cytoplasmatische AhR nahezu vollständig in den Kern transportiert worden. Weiterhin wurde untersucht, ob die Kerntranslokation des AhR und die Stabilisierung im Cytoplasma auch nach ionisierender Strahlung zu finden ist. In der A549 Zelllinie konnte gezeigt werden, dass der AhR nach ionisierender Strahlung in einer zeitlichen Abhängigkeit cytoplasmatisch stabilisiert und in den Kern transportiert wird. Die Behandlung mit 3-Methylcholanthren wurde auch mit ionisierender Strahlung kombiniert. Das Ergebnis zeigte einen immens schnellen Reaktionsverlauf. Die Stabilisierung im Cytoplasma konnte zeitlich nicht mehr aufgelöst werden. Dies setzte sich auch im Kern fort, denn bereits nach 10 min hatte der AhR im Kern wieder cytoplasmatisches Niveau erreicht. Es scheint hier einen synergistischen Effekt zwischen Behandlung mit 3-Methylcholanthren und ionisierender Strahlung zu geben, denn die AhR-Menge war bereits 10 min nach Bestrahlung in den behandelten Zellen fast vollständig vom Cytoplasma in den Kern transloziert. Während nach ionisierender Strahlung allein der AhR im Cytoplasma bis 40 min zunahm.

Nach Aktivierung des AhR wird die Expression von CYP1A1 induziert [Bondy & Naderi, 1994; Nebert & McKinnon, 1994; Rifkind *et al.*, 1990], die als Indikator eines funktionierenden AhR-Signalweges gilt. In der verwendeten Tumorzelllinie A549 konnte die Expression der CYP1A-Familie im Western-Blot ebenfalls nachgewiesen werden. Somit verfügen diese Zellen über einen funktionierenden AhR-Signalweg. Um zu klären, wie stark die Aktivierung des AhR nach ionisierender Strahlung ist und um das Ergebnis auf Proteinebene zu verifizieren, wurde die CYP1A1-Expression auf mRNA Ebene untersucht. In den verwendeten A549-Zellen wurde eine signifikante CYP1A1 mRNA Expression nach ionisierender Strahlung gefunden. Vergleicht man diese jedoch mit der als Positiv-Kontrolle verwendeten Expression des klassischen AhR-Agonisten 3-Methylcholanthren, ist sie um ein 10-faches geringer. Der gleiche Versuchsansatz wurde auch in der Maushepatomzelllinie Hepa1c1c7 durchgeführt. Diese Zelllinie wird häufig im Zusammenhang mit Untersuchungen des AhR-Signalweges verwendet [Darlington, 1987; Darlington *et al.*, 1980; Hankinson, 1979]. Auch in diesen Zellen wurde eine strahleninduzierte CYP1A1-Expression gefunden, die allerdings um das 25-fache geringer war als nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach ionisierender Strahlung die AhR-vermittelte CYP1A1-Expression nicht von Bedeutung ist.

In einem pulse-chase-Experiment wurde die Halbwertszeit des AhR-Proteins im Cytoplasma und im Kern von A549-Zellen nach Bestrahlung untersucht. Nach klassischer AhR-Aktivierung mit β -Naphthoflavon ist eine Halbwertszeit des AhR im Cytoplasma von 7,7-17,6 h beschrieben [Swanson & Perdew, 1993], für den Kern wurden aber keine Daten erhoben. Nach ionisierender Strahlung zeigte sich eine etwas längere Halbwertszeit des AhR mit 19,5 h im Cytoplasma und mit 3,5 h im Kern eine deutlich kürzere als nach klassischer Aktivierung.

Festzuhalten ist, dass auch in A549-Zellen der klassische AhR-Signalwege nach Aktivierung mit 3-Methylcholantren funktioniert und die bisher unbeschriebene Stabilisierung des AhR im Cytoplasma und der Transport in den Zellkern nach ionisierender Strahlung beobachtet wurde. Dass es sich hierbei um eine Aktivierung des AhR im klassischen Sinn handelt, zeigt die Expression des bekanntesten Zielgens CYP1A1 auf mRNA Ebene nach ionisierender Strahlung. Dies konnte in zwei unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden.

Der AhR befindet sich im Komplex mit der c-Src-Kinase, die wie von Dittmann *et al.* [2009] beschrieben bei der Zellantwort nach ionisierender Strahlung eine Rolle spielt. So ergibt sich die Frage, ob der AhR an der Regulation der c-Src-Kinase beteiligt ist.

In den Western-Blot-Analysen wurde diese Kinase detektiert, um ihre Aktivierung durch ionisierender Strahlung zu bestätigen. Die aktive Form der c-Src-Kinase wurde nach Bestrahlung mit Hilfe eines Antikörpers identifiziert. Sie ist am Tyrosin-Rest Nr. 418 phosphoryliert [Chiarugi, 2008; Enan & Matsumura, 1996; Köhle *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2007]. Die Kinetik der c-Src-Aktivierung verlief erwartungsgemäß in ähnlicher Weise wie die Stabilisierung des AhR im Cytoplasma nach ionisierender Strahlung. Enan & Matsumura [1996] zeigten, dass die c-Src-Kinase im Komplex mit dem AhR vorliegt und dass es zu ihrer Aktivierung nach AhR-Liganden Bindung kommt. Die beobachtete Phosphorylierung der c-Src-Kinase am Tyrosin Nr. 418 nach Behandlung mit dem klassischen AhR-Agonisten 3-Methylcholanthren kann somit als Hinweis auf die Funktionalität des AhR-Signalwegs angesehen werden.

Die Aktivierung des AhR führt nicht nur zur Expression von Zielgenen, sondern auch zur Tyrosinphosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR). Diese Phosphorylierung am Tyrosinrest Nr. 845 wurde als c-Src-abhängiger Mechanismus beschrieben [Khan *et al.*, 2006]. Vor kurzem wurde die Involvierung des strahleninduzierten Lipidperoxidationsprodukts Hydroxynonenal in die Aktivierung der c-Src-Kinase hinsichtlich des EGFR gezeigt [Dittmann *et al.*, 2009]. Dass die c-Src-Kinase im Multiproteinkomplex um den AhR unmittelbar an der EGFR-Signalkaskade beteiligt ist, wurde bereits nachgewiesen [Fritsche *et al.*, 2007; Köhle *et al.*, 1999]. Unklar ist, ob der AhR auf die strahleninduzierte EGFR-Signalkaskade, die auch eine Phosphorylierung des Rezeptors nach sich zieht [Dittmann *et al.*, 2005; Rodemann *et al.*, 2007] einen Einfluss hat.

Die Aufspaltung des AhR-Multiproteinkomplexes kann auch durch Hemmung des Chaperons Hsp90 erfolgen. Ein bekannter Inhibitor von Hsp90 ist Geldanamycin [Grenert *et al.*, 1997; Pearl & Prodromou, 2000; Stebbins *et al.*, 1997]. Dies ist ein benzochinoides Ansamycin und hemmt durch kompetitive Bindung mit ATP die essentielle ATPase-Funktion von Hsp90 [Miyata, 2005; Wegele *et al.*, 2004]. Die Behandlung mit Geldanamycin führte zu einer Stabilisierung des AhR im Cytoplasma und zur nachfolgenden Kerntranslokation. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Song & Pollenz [2003] gezeigt. Der Multiproteinkomplex wurde durch die Hsp90-Hemmung mit Geldanamycin aufgelöst, wie dies in der Literatur auch für andere Proteinkomplexe beschrieben wurde [Schulte *et al.*, 1995; Whitesell *et al.*, 1994].

Ionisierende Strahlung führt unter anderem zur Schädigung der Membran durch Lipidperoxidation. Ein Hauptprodukt der Lipidperoxidation ist das hochreaktive Hydroxynonenal (HNE) [Carini *et al.*, 2004; Esterbauer *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2003]. HNE wird intrazellulär durch oxidativen Stress in verhältnismäßig großen Mengen von 0,1-

5 mmol/l produziert [Demozay *et al.*, 2008]. Beschrieben ist auch die Bindung von HNE an das im Komplex mit dem AhR und der c-Src-Kinase vorliegende Hsp90 [Carbone *et al.*, 2005]. Das Produkt der Lipidperoxidation HNE könnte für die Auflösung des AhR-Multiproteinkomplexes nach ionisierender Strahlung verantwortlich sein.

Tatsächlich bewirkte die Inkubation mit HNE die Auflösung des Komplexes und eine Stabilisierung des AhR im Cytoplasma. Ebenso wurde ein Transport des freien AhR in den Zellkern beobachtet. Die aktive Form der c-Src-Kinase wurde auch in vermehrter Menge detektiert. Dies spricht für eine Auflösung des Proteinkomplexes. Kombinierte man die HNE Inkubation mit ionisierender Strahlung, zeigte sich für den AhR eine verstärkte Stabilisierung im Cytoplasma und ein verstärkter Kerntransport. Durch die exogene Gabe von HNE wurde diese beobachtete Reaktion beschleunigt.

Um zu überprüfen, ob bei der Aktivierung des AhR durch ionisierende Strahlung ROS eine Rolle spielen, wurde der Einfluss von Radikalfängern auf diesen Vorgang untersucht. In dieser Arbeit wurde als solcher das N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt, das aus der klinischen Anwendung weitreichend bekannt ist [Kelly, 1998]. Seine Eigenschaften als Radikalfänger, zum Beispiel durch Bindung des Superoxidradikals, wurden von Benrahmoune *et al.* [2000] beschrieben. Die Präinkubation mit NAC in der hier vorliegenden Arbeit zeigte einen eindeutigen Effekt auf die AhR-Stabilisierung und dessen Kerntransport sowie auf die aktive Form der c-Src-Kinase. Die strahleninduzierte Stabilisierung des AhR im Cytoplasma wurde durch den Radikalfänger ebenso klar unterbunden wie der Transport des AhR in den Zellkern. Die Phosphorylierung der c-Src-Kinase am Tyrosinrest Nr. 418 war erwartungsgemäß reduziert. Diese Erkenntnisse konnten als Hinweis auf die Involvierung von ROS in die strahleninduzierte Stabilisierung des AhR aufgefasst werden.

Die Auflösung des AhR-Multiproteinkomplexes könnte statt durch strahleninduzierte ROS auch durch endogene reaktive Sauerstoffspezies erfolgen. Diese Möglichkeit wurde durch Inhibition von Rac-1, einer kleinen GTPase, untersucht, die als Signalgeber für verschiedene Stimuli, unter anderem p67phox, fungiert [Bosco *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2004; Ushio-Fukai, 2006]. p67phox ist eine NADPH-Oxidase, die hauptverantwortlich für die Produktion von endogenen reaktiven Sauerstoffspezies ist. Es zeigte sich jedoch, dass deren Hemmung auf den strahleninduzierten Effekt keinen Einfluss hatte. Für die beobachtete AhR-Stabilisierung im Cytoplasma und die folgende Kerntranslokation sind somit endogene ROS nicht ausschlaggebend.

4.2 Welchen Effekt hat eine AhR-Proteinreduktion auf die Zelle?

Es stellte sich die Frage, wie Zellen auf ionisierende Strahlung in Abwesenheit des AhR reagieren. Dass der AhR wichtige endogene Aufgaben hat, ist unbestritten. AhR-knock-out-Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Entwicklung der Leber und des Immunsystems [Andreola *et al.*, 1997; Gonzalez & Fernandez-Salguero, 1998; Gonzalez *et al.*, 1995; Harstad *et al.*, 2006]. Ebenso zeigen unterschiedliche Berichte eine wichtige Rolle des AhR unabhängig vom Fremdstoffmetabolismus in der Zelle [Afaq *et al.*, 2009; Barouki *et al.*, 2007; Beischlag *et al.*, 2008; Carlson & Perdew, 2002; Marlowe *et al.*, 2008; Mukai & Tischkau, 2007]. Nach ionisierender Strahlung wäre ein verändertes DNA-Reparaturverhalten der Zellen oder eine Strahlenprotektion bzw. -sensitivierung im klonogenen Überleben denkbar.

Um die Bedeutung des AhR bei der Regulation der DNA-Reparatur zu klären, wurden Untersuchungen mit AhR-siRNA und mit AhR-shRNA-Zellen durchgeführt. Die Hemmung des AhR-Proteins hatte eine Stabilisierung der cytoplasmatischen c-Src-Kinase zur Folge, die bereits im unbestrahlten Basalwert auftrat. Dies kann eine Folge des AhR-Verlustes sein. Die CYP1A1-Expression war erwartungsgemäß auf Proteinebene deutlich unterdrückt. Diese Resultate wurden in den Zelllinien A549 und FADU nach Behandlung mit AhR-siRNA beobachtet. In den AhR-shRNA-Zellen konnte ebenfalls auf Proteinebene sowohl eine Stabilisierung der aktiven Form der c-Src-Kinase als auch eine reduzierte CYP1A1 Menge nach ionisierender Strahlung gefunden werden. Somit wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden in drei verschiedenen Zelllinien die AhR-Proteinexpression erfolgreich gehemmt. Die erhaltenen Ergebnisse auf Proteinebene waren durchweg konsistent.

Um einen Einfluss des AhR-knock-down auf die DNA-Reparatur nach Bestrahlung zu untersuchen, wurde der Nachweis von γ H2AX-Foci eingesetzt. Zusätzlich wurde der Koloniebildungstest verwendet, um das Überleben der Zellen nach AhR-knock-down zu untersuchen. Dieser Test wurde bereits in den Fünfzigerjahren des 20. Jahrhunderts [Puck & Marcus, 1956] entwickelt und anschließend weiter modifiziert. Das Verfahren misst die Fähigkeit einer Einzelzelle nach Kontakt zu einer Noxe, in diesem Fall ionisierende Strahlung, zu überleben und durch Zellteilungen eine Kolonie von mindestens 50 Zellen zuzubilden. Dies spiegelt sich in der Überlebensfraktion (surviving fraction, SF) bei verschiedenen Strahlendosen wider. Ein gängiger Wert ist der SF2-Wert, der den überlebenden Zellanteil bei 2 Gy angibt. Der Koloniebildungstest wird heute als gültiger Standard zur Vorhersage der Strahlensensibilität einer Zelllinie eingesetzt und die SF2-Werte

werden häufig als Vergleichswerte für neuere prädikative Verfahren zur Bestimmung der Strahlensensibilität herangezogen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung in Zellen untersucht, in denen mittels AhR-siRNA oder -shRNA das AhR-Protein stark reduziert war. In diesen Versuchsansätzen fand sich eine Radiosensitivierung der Zellen, was durchaus überraschend war, zumal es bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung des AhR an der Regulation der Zellantwort auf ionisierende Strahlung gab. Dieser Effekt wurde sowohl in den transient siRNA transfizierten Zellen als auch in den stabilen shRNA-Zellen reproduziert. Überraschenderweise hatte eine Behandlung mit 3-Methylcholanthren, einem klassischen Agonisten des AhR, keinen Effekt auf das klonogene Überleben. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Aktivierung des AhR im klassischen Sinn von der Rolle unabhängig ist, die der AhR nach ionisierender Strahlung einnimmt.

Als weiterer Endpunkt für die Funktionalität der DNA-Reparatur wurde der γ H2AX-Nachweis eingesetzt. Auch hier wurden sowohl siRNA als auch shRNA-Zellen untersucht. Erstaunlicherweise zeigten sich in beiden Ansätzen 24 h nach ionisierender Strahlung signifikant mehr DNA-Restschäden. Die Zellen reparierten den radiogenen DNA-Schaden schlechter, wenn sie nur weniger als 50 % von der AhR-Proteinmenge der Kontroll-Zellen zur Verfügung hatten. Offensichtlich hat der AhR Einfluss auf die DNA-Reparatur nach ionisierender Strahlung. Um aber die genaue Rolle des AhR dabei zu klären, sind weitere Versuche notwendig.

4.3 Ist die transkriptionelle Aktivität des AhR nach ionisierender Strahlung von Bedeutung?

Unklar war, inwiefern die transkriptionelle Aktivität des AhR und die Dimerisierung mit ARNT bei den gefundenen Effekten auf die DNA-Reparatur und auf das Zellüberleben involviert sind. Dass ionisierende Strahlung nicht nur den AhR-Multiproteinkomplex im Cytoplasma auflöst, sondern auch den AhR in den Kern transloziert, wurde in vorliegender Arbeit gezeigt. Außerdem konnte eine CYP1A1-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Sie war zwar signifikant, fiel aber deutlich geringer aus als mit dem klassischen AhR-Agonist 3-Methylcholanthren. Trotzdem wäre es möglich, dass die radiogene transkriptionelle Aktivität Einfluss auf die Strahlenreaktion nimmt, denn es könnte z. B. die Metabolisierung der Noxe das klonogene Überleben verbessern. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden

Koloniebildungstests mit dem CYP1A1-Inhibitor Daidzein durchgeführt. Mehrere Berichte zeigen den inhibitorischen Einfluss von natürlichen Flavonoiden auf die Cytochrom P450 Enzyme [Dai *et al.*, 1998; Mukai *et al.*, 2010; Obermeier *et al.*, 1995; Siess *et al.*, 1995; Tsyrllov *et al.*, 1994; Zhai *et al.*, 1998]. Für Daidzein wurde die nicht kompetitive Hemmung von CYP1A1 in einem NADPH abhängigen Prozess nachgewiesen [Shertzer *et al.*, 1999]. Die Hemmung der Oxidoreduktase zeigte jedoch keinen negativen Einfluss im klonogenen Überleben der Zellen. Ebenso wenig war nach Daidzein Behandlung der residuale DNA-Schaden 24 h nach Bestrahlung signifikant erhöht. Demnach ist die Expression von CYP1A1 nach ionisierender Strahlung weder für die DNA-Schadensreparatur noch für das klonogene Überleben ausschlaggebend. Die strahleninduzierte CYP1A1-Expression könnte für die Metabolisierung der potentiellen AhR-Liganden relevant sein.

Die Dimerisierung des AhR mit ARNT [Hankinson, 1995; Reisz-Porszasz *et al.*, 1994] könnte auch den beobachteten Strahleneffekt bewirken. Für ARNT sind ebenfalls AhR unabhängige Funktionen beschrieben [Chang *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 1996], wie das Synonym Hif 1-beta (hypoxia inducible factor 1 beta) errahnen lässt. Zum Beispiel ist die Rolle von ARNT bei der EGF-induzierten c-Jun/Sp1-vermittelten Gen Expression [Huang *et al.*, 2010] oder in der Karzinogenese [Shi *et al.*, 2010] beschrieben. In vorliegender Arbeit wurde ARNT mit Hilfe von siRNA in seiner Expression gehemmt, um einen möglichen Effekt auf die DNA-Reparatur zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die ARNT-Protein Reduktion mit siRNA keinen Effekt auf den residualen DNA-Schaden nach ionisierender Strahlung hatte. Die Dimerisierung mit ARNT ist demnach ebenso wenig wie die CYP1A1-Expression für den erhöhten residualen DNA-Schaden nach Hemmung des AhR verantwortlich. Ob ARNT für den beobachteten radiosensitivierenden Effekt nach Unterdrückung des AhR-Proteins eine Rolle spielt, muss in einem Koloniebildungstest nach ARNT-Protein Hemmung untersucht werden.

4.4 Bilden sich AhR-Protein-Foci nach ionisierender Strahlung?

Die Bildung der γ H2AX-Foci am DNA-Schaden nach ionisierender Strahlung ist seit Jahren bekannt [Celeste *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2010; Paull *et al.*, 2000; Pilch *et al.*, 2003; Rogakou *et al.*, 1999; Rogakou *et al.*, 1998]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es zur Bildung von γ H2AX-Foci nach Behandlung mit unterschiedlichen genotoxischen Substanzen kommt. Gezeigt wurde die ATM (Ataxia Telangiectasia mutiert) aktivierte H2AX-Phosphorylierung

in A549-Zellen nach Inkubation der Zellen mit Tabakrauch [Tanaka *et al.*, 2007] oder auch die H2AX-Phosphorylierung nach UV-Strahlung [Halicka *et al.*, 2005; Hanasoge & Ljungman, 2007; Marti *et al.*, 2006].

In vorliegender Arbeit wurden erstmals im Kern AhR-Foci nach ionisierender Strahlung nachgewiesen. In A549-Zellen wurden mit Hilfe eines AhR-Antikörpers Foci im Kern nach ionisierender Bestrahlung detektiert. Diese Focusbildung verlief nicht nur in ähnlicher Kinetik wie die γ H2AX Focusbildung, sondern es wurden bei beiden Prozessen auch ähnliche Zahlen von Foci detektiert. Aufgrund der bereits gefundenen Effekte auf das klonogene Überleben und den DNA-Restschaden nach Reduktion des AhR-Proteins wurde auch in der AhR-shRNA-Zelllinie die Induktion der AhR-Foci untersucht. Überraschenderweise wurden nicht nur in den Wildtyp- und den Leervektor-Zellen, sondern auch in den AhR-shRNA-Zellen AhR-Protein-Foci gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sowohl in AhR-shRNA- als auch in AhR-siRNA-Zellen die AhR-Proteinexpression nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Restliches Protein ist offenbar in der Lage, im Kern die Focusbildung durchzuführen, denn im Kern wurde in den AhR-sh-Zellen nur eine Reduktion des AhR-Proteins um 40 % gefunden. Cytoplasmatisch lag eine Reduktion der AhR-Proteinmenge um 70 % vor. Verglichen mit der in Kontroll-Zellen induzierten Focizahl, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der AhR-Foci in AhR-shRNA-Zellen. Dasselbe wurde bei γ H2AX-Foci beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Reduktion des AhR-Proteins nicht maßgeblich die Bildung der Foci hemmt, aber die Reparatur der DNA-Schäden behindert.

Um diese Beobachtung von AhR-Protein-Foci nach ionisierender Strahlung weiter aufzuklären, wurde untersucht, ob mit 3-Methylcholanthren AhR-Foci induziert werden können. Tatsächlich wurden auch nach Behandlung mit 3-Methylcholanthren AhR-Foci in A549-Zellen detektiert. Die gefundene Anzahl der AhR- und γ H2AX-Foci war nach 3-Methylcholanthren-Behandlung jedoch 10-12 mal geringer als nach ionisierender Strahlung. Dieser Sachverhalt war nicht allzu überraschend, da 3-Methylcholanthren ganz im Gegensatz zu ionisierender Strahlung nur sekundäre Doppelstrangbrüche verursacht.

4.5 Welche Moleküle könnten AhR-Interaktionspartner im Kern sein?

Um mögliche Interaktionspartner des AhR im Kern zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen und konfokale Mikroskopie verwendet. Erste Hinweise konnten bereits

aus dem Nachweis der AhR-Foci gezogen werden. Der zeitliche Verlauf war annähernd identisch mit dem der γ H2AX-Foci-Bildung. Außerdem konnte eine direkte Wechselwirkung des AhR mit γ H2AX mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Neben dem AhR und γ H2AX wurden im Komplex auch die DNA-PK und deren aktive Formen gefunden, die am Threonin-Rest Nr. 2609 bzw. am Serin Nr. 2056 phosphoryliert sind. Der Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungszustand der DNA-PK ist besonders aussagekräftig, da er über die Kinase-Aktivität Auskunft gibt [Chen *et al.*, 2005]. Die DNA-PK und der mit ihr assoziierte Komplex aus dem Ku-Heterodimer, das aus den Untereinheiten Ku 70 und Ku 80 besteht, spielt für die Erkennung und Behebung von strahleninduzierten DNA-Schäden eine essentielle Rolle. Der Ku/DNA-PK-abhängige Reparaturprozess (NHEJ) ist der Hauptreparaturweg von Säugerzellen bei DNA-Doppelstrangbrüchen nach ionisierender Strahlung [Collis *et al.*, 2005].

Es ist nicht weiter überraschend, dass in der hier vorliegenden Arbeit die DNA-PK zusammen mit γ H2AX im Komplex gefunden wurde. Berichte über die Phosphorylierung des H2AX durch die DNA-PK und auch ATM sind gleichermaßen vorhanden [An *et al.*, 2010; Stiff *et al.*, 2004]. Auf Proteinebene wurden im Hinblick auf die DNA-Reparatur-Endpunkte neben dem AhR und der c-Src-Kinase auch die DNA-PK und deren aktive Formen untersucht. In Western-Blot-Analysen nach AhR-siRNA Behandlung wurde sowohl die Transphosphorylierungsstelle am Threonin Nr. 2609 als auch der Autophosphorylierungsrest am Serin Nr. 2056 detektiert. Für beide zeigte sich eine deutliche Reduktion nach AhR-siRNA Behandlung und nachfolgender Bestrahlung. Der AhR hat einen Effekt auf die Aktivität dieses Reparaturenzyms nach ionisierender Strahlung. Ob dieser Effekt direkt oder indirekt wirkt, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Denkbar wäre auch eine Einwirkung des AhR auf die ATM-Kinase, die wie die DNA-PK entscheidend an der Reparatur von DNA-DSB ist und für die auch die Phosphorylierung des H2AX beschrieben ist. Bekannt ist die ATM assoziierte γ H2AX-Phosphorylierung für die Exposition mit Tabakrauch in A549-Zellen [Tanaka *et al.*, 2007]. Dies könnte ein Hinweis auf die Involvierung des AhR auch nach ionisierender Strahlung in Zusammenhang mit der ATM-Kinase sein, was in weiteren Experimenten überprüft werden muss.

Der DNA-DSB Reparaturkomplex ist kompliziert aufgebaut und besteht aus mehreren Komponenten. Er wird als MRN-Komplex bezeichnet (Mre11, Rad50, Nbs1 (Xrs2)) und ist für die unmittelbare Reparatur von DNA-Schäden essentiell [Czornak *et al.*, 2008; Furuta *et al.*, 2003; Lavin, 2007; Riches *et al.*, 2008; Rupnik *et al.*, 2010]. In vorliegender Arbeit wurde die Reaktion von Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) auf Proteinebene nach

ionisierender Strahlung unter reduziertem AhR-Protein untersucht. Dieses Syndrom ist mit einer homozygoten Mutation des NBS1-Gens assoziiert. NBS ist eine seltene autosomal rezessive Funktionsstörung, die durch Chromosomeninstabilität und Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung charakterisiert ist. Nbs1 wird von der ATM-Kinase phosphoryliert und ist wiederum essentiell für die Phosphorylierung von Mre11 [Carney *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 1999; Petrini & Stracker, 2003]. Eine Heterozygotie des NBS1-Gens wird mit erhöhtem Krebsrisiko in Verbindung gebracht [di Masi & Antocchia, 2008].

Eine AhR-Proteinreduktion zeigte im Western-Blot jedoch keinen Einfluss auf den Nbs1-Gehalt im MRN-Komplex. Da Nbs1 nur eine Komponente des MRN-Komplexes ist, kann aus dieser Beobachtung kein abschließendes Fazit auf die eventuelle Beeinflussung des MRN-Reparaturkomplexes durch den AhR gezogen werden.

Dass der AhR Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus hat, wurde bereits beschrieben [Bar Hoover *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2004; Watabe *et al.*, 2010]. Es ist auch bekannt, dass p21 und p27, beides Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen, durch 3-Methylcholanthren aktiviert werden und einen Zellzyklusarrest induzieren [Pang *et al.*, 2008]. Deshalb sollte geklärt werden, ob ionisierende Strahlung durch den AhR die Expression von p21 beeinflusst. Dazu wurde auf Proteinebene nach AhR-siRNA-Behandlung mit anschließender Bestrahlung p21-Protein detektiert. Es konnte jedoch kein Effekt festgestellt werden. In den AhR-shRNA-Zellen wurde p21 nicht überprüft, da die HaCat-Zellen in beiden Allelen TP53 mutiert sind. So sprechen die Ergebnisse dafür, dass der AhR nicht direkt am strahleninduzierten p21-abhängigen Zellzyklusarrest beteiligt ist.

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde nachgewiesen, dass der AhR und γ H2AX im Kern nach ionisierender Strahlung eine Kolokalisation zeigen. In A549-Zellen und in der HaCat-Zelllinie wurde nach Bestrahlung eine klare Kolokalisation der beiden Proteine im Kern beobachtet. Außerdem ist die cytoplasmatische Stabilisierung des AhR in den A549-Zellen nach ionisierender Strahlung deutlich zu sehen. In den HaCat-Leervektor-Zellen zeigte sich eine Stunde nach Bestrahlung sowohl für γ H2AX als auch für den AhR eine klare Stabilisierung. Und in der Überlagerung aller Signale wurde in diesen Zellen ebenfalls eine Kolokalisation beider Proteine deutlich. In den AhR-shRNA-Zellen zeigte sich eine klar reduzierte AhR-Foci-Bildung, die γ H2AX-Foci blieben jedoch in ihrer Bildung unbeeinträchtigt. Das heißt also, dass trotz deutlich reduziertem AhR-Protein die Bildung der γ H2AX-Foci funktioniert. Die Analyse des Ausmaßes der Kolokalisation beider Proteine ergab in den Leervektor-Zellen knapp 25 %. Also liegt nicht in jedem γ H2AX-Focus auch der AhR vor. In den AhR-shRNA-Zellen wurde diese Kolokalisation durch die AhR-

Proteinreduktion auf unter 5 % gebracht. In den mikroskopischen Versuchen konnte man den Eindruck gewinnen, dass zwar die Initiation der Foci zeitlich annähernd identisch ablief, aber die Auflösung der AhR-Foci zeitlich etwas versetzt war. Die AhR-Foci persistierten länger als die γ H2AX-Foci. Um eine mögliche Rolle des AhR bei der DNA-Schadensreparatur nach ionisierender Strahlung zu klären, bedarf es daher weiterer Experimente.

Zu diskutieren ist auch der bei der Durchführung der Versuche erhaltene optische Eindruck in Bezug auf die Größe beziehungsweise die Helligkeit der AhR-Foci. Rein optisch waren in den AhR-shRNA-Zellen die AhR-Foci nicht von derselben Helligkeit wie in den Leervektor-Zellen. Möglicherweise bedingt die Reduktion des AhR-Proteins weniger AhR-Antikörperbindung. Die Reduktion des AhR-Proteins im Kern der sh-Zellen um knapp 50 % wurde nachgewiesen. Zur Bildung eines Focus steht in AhR-shRNA-Zellen also weniger Protein zu Verfügung, was die Ausbildung kleinerer Foci zur Folge hat. Der AhR könnte für die Markierung oder Reparatur bestimmter DNA-Schäden eine Rolle spielen oder bei der Auflösung der Foci von Bedeutung sein. Um diese Hypothesen zu bestätigen, sind weitere Versuche notwendig.

5 AUSBLICK

Mit den hier präsentierten Daten wurde zum ersten Mal eine Verbindung zwischen ionisierender Strahlung und dem AhR-Signalweg gezeigt. Mit der Involvierung des AhR in die DNA-Reparatur konnte ein Angriffspunkt des AhR in der zellulären Strahlenantwort identifiziert werden. Jedoch gilt es, auf der Basis der hier präsentierten Daten die Funktion des AhR zu klären. Um die Rolle des AhR in diesem Kontext besser zu verstehen, muss untersucht werden, ob und mit welchen weiteren Proteinen der AhR assoziiert ist, z.B. mit der ATM-Kinase, den DNA-PK-Untereinheiten Ku 70 und Ku 80 oder Mitgliedern des MRN-Komplexes. Geklärt werden sollte auch, ob der AhR mit Bildung von Foci im Kern die γ H2AX-Foci in ihrer Auflösung beeinflusst, oder ob die AhR-Foci einen bestimmten DNA-Schaden markieren. Ebenso sollte untersucht werden, ob die Aktivität der DNA-PK durch AhR knock-down tatsächlich beeinträchtigt ist. Es stellt sich auch die Frage, ob nicht nur das NHEJ, sondern auch die homologe Rekombination oder die Basen-Excisionsreparatur vom AhR beeinflusst wird.

Außerdem sollte die cytoplasmatische Rolle des AhR nach Bestrahlung weiter untersucht werden, z.B. ob der AhR über die c-Src-Kinase, von der die Aktivierung des EGFR Signalweges bekannt ist [Khan *et al.*, 2006], oder unabhängig von ihr, den EGFR-Signalweg beeinflusst. Weitere Versuche zum Aktivierungsmechanismus des AhR im Cytoplasma sind notwendig, um die Schritte des zugrunde liegenden Mechanismus nach ionisierender Strahlung gänzlich zu verstehen. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass Hydroxynonenal als Ligand des AhR nach ionisierender Strahlung fungieren könnte, jedoch sind abschließende Versuche notwendig um dies zu bestätigen. Ferner ist zu klären, ob die cytoplasmatische AhR-Aktivierung bzw. Stabilisierung für die Bildung der AhR-Foci notwendig ist.

6 LITERATUR

- Abbott, B. D., M. R. Probst, G. H. Perdew & A. R. Buckalew (1998). "AH receptor, ARNT, glucocorticoid receptor, EGF receptor, EGF, TGF alpha, TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 expression in human embryonic palate, and effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." *Teratology* **58**(2): 30-43.
- Abdelrahim, M., E. Ariazi, K. Kim, S. Khan, R. Barhoumi, R. Burghardt, S. Liu, D. Hill, R. Finnell, B. Wlodarczyk, V. C. Jordan & S. Safe (2006). "3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha." *Cancer Res* **66**(4): 2459-67.
- Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui & T. Matsuda (2004). "Comparison of gene expression patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and a natural arylhydrocarbon receptor ligand, indirubin." *Toxicol Sci* **80**(1): 161-9.
- Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. Miller, 3rd, T. Kato, K. Saeki & T. Matsuda (2001). "Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine." *J Biol Chem* **276**(34): 31475-8.
- Afaq, F., M. A. Zaid, E. Pelle, N. Khan, D. N. Syed, M. S. Matsui, D. Maes & H. Mukhtar (2009). "Aryl hydrocarbon receptor is an ozone sensor in human skin." *J Invest Dermatol* **129**(10): 2396-403.
- Ahmed, S., E. Valen, A. Sandelin & J. Matthews (2009). "Dioxin increases the interaction between aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha at human promoters." *Toxicol Sci* **111**(2): 254-66.
- An, J., Y. C. Huang, Q. Z. Xu, L. J. Zhou, Z. F. Shang, B. Huang, Y. Wang, X. D. Liu, D. C. Wu & P. K. Zhou (2010). "DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression." *BMC Mol Biol* **11**: 18.
- Andersson, P., J. McGuire, C. Rubio, K. Gradin, M. L. Whitelaw, S. Pettersson, A. Hanberg & L. Poellinger (2002). "A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(15): 9990-5.
- Andreola, F., P. M. Fernandez-Salguero, M. V. Chiantore, M. P. Petkovich, F. J. Gonzalez & L. M. De Luca (1997). "Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism." *Cancer Res* **57**(14): 2835-8.
- Backlund, M. & M. Ingelman-Sundberg (2004). "Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation." *Mol Pharmacol* **65**(2): 416-25.
- Banath, J. P., S. H. Macphail & P. L. Olive (2004). "Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines." *Cancer Res* **64**(19): 7144-9.

- Barhoover, M. A., J. M. Hall, W. F. Greenlee & R. S. Thomas (2010). "Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4." *Mol Pharmacol* **77**(2): 195-201.
- Barouki, R., X. Coumoul & P. M. Fernandez-Salguero (2007). "The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein." *FEBS Lett* **581**(19): 3608-15.
- Bassing, C. H. & F. W. Alt (2004). "The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 781-96.
- Bassing, C. H., K. F. Chua, J. Sekiguchi, H. Suh, S. R. Whitlow, J. C. Fleming, B. C. Monroe, D. N. Ciccone, C. Yan, K. Vlasakova, D. M. Livingston, D. O. Ferguson, R. Scully & F. W. Alt (2002). "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(12): 8173-8.
- Beischlag, T. V., J. Luis Morales, B. D. Hollingshead & G. H. Perdew (2008). "The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**(3): 207-50.
- Bell, D. R. & A. Poland (2000). "Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90." *J Biol Chem* **275**(46): 36407-14.
- Benrahmoune, M., P. Therond & Z. Abedinzadeh (2000). "The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine." *Free Radic Biol Med* **29**(8): 775-82.
- Bentzen, S. M. & J. Overgaard (1994). "Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury." *Semin Radiat Oncol* **4**(2): 68-80.
- Bock, K. W. & C. Köhle (2009). "The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver." *Biol Chem* **390**(12): 1225-35.
- Bock, K. W. (1994). "Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **125**: 1-42.
- Bondy, S. C. & S. Naderi (1994). "Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species." *Biochem Pharmacol* **48**(1): 155-9.
- Bosco, E. E., J. C. Mulloy & Y. Zheng (2009). "Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades." *Cell Mol Life Sci* **66**(3): 370-4.
- Bradshaw, T. D., V. Trapani, D. A. Vasselin & A. D. Westwell (2002). "The aryl hydrocarbon receptor in anticancer drug discovery: friend or foe?" *Curr Pharm Des* **8**(27): 2475-90.
- Carbone, D. L., J. A. Doorn, Z. Kiebler, B. R. Ickes & D. R. Petersen (2005). "Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver disease." *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1): 8-15.
- Carini, M., G. Aldini & R. M. Facino (2004). "Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins." *Mass Spectrom Rev* **23**(4): 281-305.

- Carlson, D. B. & G. H. Perdew (2002). "A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins." *J Biochem Mol Toxicol* **16**(6): 317-25.
- Carney, J. P., R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates, 3rd, L. Hays, W. F. Morgan & J. H. Petrini (1998). "The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response." *Cell* **93**(3): 477-86.
- Casper, R. F., M. Quesne, I. M. Rogers, T. Shirota, A. Jolivet, E. Milgrom & J. F. Savouret (1999). "Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity." *Mol Pharmacol* **56**(4): 784-90.
- Castro-Rivera, E., M. Wormke & S. Safe (1999). "Estrogen and aryl hydrocarbon responsiveness of ECC-1 endometrial cancer cells." *Mol Cell Endocrinol* **150**(1-2): 11-21.
- Cedervall, B., R. Wong, N. Albright, J. Dynlacht, P. Lambin & W. C. Dewey (1995). "Methods for the quantification of DNA double-strand breaks determined from the distribution of DNA fragment sizes measured by pulsed-field gel electrophoresis." *Radiat Res* **143**(1): 8-16.
- Celeste, A., O. Fernandez-Capetillo, M. J. Kruhlak, D. R. Pilch, D. W. Staudt, A. Lee, R. F. Bonner, W. M. Bonner & A. Nussenzweig (2003). "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks." *Nat Cell Biol* **5**(7): 675-9.
- Celeste, A., S. Petersen, P. J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H. T. Chen, O. A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M. J. Difilippantonio, C. Redon, D. R. Pilch, A. Oлару, M. Eckhaus, R. D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W. M. Bonner, M. C. Nussenzweig & A. Nussenzweig (2002). "Genomic instability in mice lacking histone H2AX." *Science* **296**(5569): 922-7.
- Chang, C. Y. & A. Puga (1998). "Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor." *Mol Cell Biol* **18**(1): 525-35.
- Chang, K. Y., M. R. Shen, M. Y. Lee, W. L. Wang, W. C. Su, W. C. Chang & B. K. Chen (2009). "Epidermal growth factor-activated aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/HIF-1{beta} signal pathway up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression associated with squamous cell carcinoma." *J Biol Chem* **284**(15): 9908-16.
- Chen, B. P., D. W. Chan, J. Kobayashi, S. Burma, A. Asaithamby, K. Morotomi-Yano, E. Botvinick, J. Qin & D. J. Chen (2005). "Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks." *J Biol Chem* **280**(15): 14709-15.
- Chen, S., T. Operana, J. Bonzo, N. Nguyen & R. H. Tukey (2005). "ERK kinase inhibition stabilizes the aryl hydrocarbon receptor: implications for transcriptional activation and protein degradation." *J Biol Chem* **280**(6): 4350-9.
- Chiarugi, P. (2008). "Src redox regulation: there is more than meets the eye." *Mol Cells* **26**(4): 329-37.

- Ciolino, H. P., P. J. Daschner & G. C. Yeh (1998). "Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor." *Cancer Res* **58**(24): 5707-12.
- Collis, S. J., T. L. DeWeese, P. A. Jeggo & A. R. Parker (2005). "The life and death of DNA-PK." *Oncogene* **24**(6): 949-61.
- Czornak, K., S. Chughtai & K. H. Chrzanowska (2008). "Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair." *J Appl Genet* **49**(4): 383-96.
- Dai, R., S. Zhai, X. Wei, M. R. Pincus, R. E. Vestal & F. K. Friedman (1998). "Inhibition of human cytochrome P450 1A2 by flavones: a molecular modeling study." *J Protein Chem* **17**(7): 643-50.
- Dalton, T. P., A. Puga & H. G. Shertzer (2002). "Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 77-95.
- Darlington, G. J. (1987). "Liver cell lines." *Methods Enzymol* **151**: 19-38.
- Darlington, G. J., H. P. Bernhard, R. A. Miller & F. H. Ruddle (1980). "Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells." *J Natl Cancer Inst* **64**(4): 809-19.
- Davarinos, N. A. & R. S. Pollenz (1999). "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export." *J Biol Chem* **274**(40): 28708-15.
- Demozay, D., J. C. Mas, S. Rocchi & E. Van Obberghen (2008). "FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes." *Diabetes* **57**(5): 1216-26.
- Denison, M. S. & S. R. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**: 309-34.
- Denison, M. S., A. Pandini, S. R. Nagy, E. P. Baldwin & L. Bonati (2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 3-24.
- di Masi, A. & A. Antoccia (2008). "NBS1 Heterozygosity and Cancer Risk." *Curr Genomics* **9**(4): 275-81.
- Diry, M., C. Tomkiewicz, C. Koehle, X. Coumoul, K. W. Bock, R. Barouki & C. Transy (2006). "Activation of the dioxin/aryl hydrocarbon receptor (AhR) modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism." *Oncogene* **25**(40): 5570-4.
- Dittmann, K., C. Mayer, B. Fehrenbacher, M. Schaller, U. Raju, L. Milas, D. J. Chen, R. Kehlbach & H. P. Rodemann (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **280**(35): 31182-9.

- Dittmann, K., C. Mayer, R. Kehlbach, M.-C. Rothmund & H. Peter Rodemann (2009). "Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport." *Radiother Oncol* **92**(3): 379-82.
- Dong, Z., Q. Zhong & P. L. Chen (1999). "The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage." *J Biol Chem* **274**(28): 19513-6.
- Enan, E. & F. Matsumura (1996). "Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway." *Biochem Pharmacol* **52**(10): 1599-612.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur & H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." *Free Radic Biol Med* **11**(1): 81-128.
- Fan, Y., G. P. Boivin, E. S. Knudsen, D. W. Nebert, Y. Xia & A. Puga (2010). "The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis." *Cancer Res* **70**(1): 212-20.
- Freeman, S. L. & W. K. MacNaughton (2000). "Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**(2): G243-50.
- Friedberg, E. C., A. Aguilera, M. Gellert, P. C. Hanawalt, J. B. Hays, A. R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin & R. D. Wood (2006). "DNA repair: from molecular mechanism to human disease." *DNA Repair (Amst)* **5**(8): 986-96.
- Fritsche, E., C. Schafer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hubenthal, J. E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, L. O. Klotz, A. Rannug, P. Furst, H. Hanenberg, J. Abel & J. Krutmann (2007). "Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(21): 8851-6.
- Fujii-Kuriyama, Y. & J. Mimura (2005). "Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1): 311-7.
- Fukunaga, B. N., M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz & O. Hankinson (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **270**(49): 29270-8.
- Furuta, T., H. Takemura, Z. Y. Liao, G. J. Aune, C. Redon, O. A. Sedelnikova, D. R. Pilch, E. P. Rogakou, A. Celeste, H. T. Chen, A. Nussenzweig, M. I. Aladjem, W. M. Bonner & Y. Pommier (2003). "Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes." *J Biol Chem* **278**(22): 20303-12.

- Gao, Y., J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng & Y. Zheng (2004). "Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7618-23.
- Gasiewicz, T. A., K. P. Singh & F. L. Casado (2010). "The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene-induced hematopoietic toxicity." *Chem Biol Interact* **184**(1-2): 246-51.
- Gonzalez, F. J. & P. Fernandez-Salguero (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice." *Drug Metab Dispos* **26**(12): 1194-8.
- Gonzalez, F. J., P. Fernandez-Salguero, S. S. Lee, T. Pineau & J. M. Ward (1995). "Xenobiotic receptor knockout mice." *Toxicol Lett* **82-83**: 117-21.
- Gramatzki, D., G. Pantazis, J. Schittenhelm, G. Tabatabai, C. Köhle, W. Wick, M. Schwarz, M. Weller & I. Tritschler (2009). "Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells." *Oncogene* **28**(28): 2593-605.
- Grenert, J. P., W. P. Sullivan, P. Fadden, T. A. Haystead, J. Clark, E. Mimnaugh, H. Krutzsch, H. J. Ochel, T. W. Schulte, E. Sausville, L. M. Neckers & D. O. Toft (1997). "The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation." *J Biol Chem* **272**(38): 23843-50.
- Gu, Y. Z., J. B. Hogenesch & C. A. Bradfield (2000). "The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 519-61.
- Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 131-60.
- Halicka, H. D., X. Huang, F. Traganos, M. A. King, W. Dai & Z. Darzynkiewicz (2005). "Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis." *Cell Cycle* **4**(2): 339-45.
- Hanasoge, S. & M. Ljungman (2007). "H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase." *Carcinogenesis* **28**(11): 2298-304.
- Hankinson, O. (1979). "Single-step selection of clones of a mouse hepatoma line deficient in aryl hydrocarbon hydroxylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1): 373-6.
- Hankinson, O. (1995). "The aryl hydrocarbon receptor complex." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 307-40.
- Harstad, E. B., C. A. Guite, T. L. Thomae & C. A. Bradfield (2006). "Liver deformation in Ahr-null mice: evidence for aberrant hepatic perfusion in early development." *Mol Pharmacol* **69**(5): 1534-41.
- Heath-Pagliuso, S., W. J. Rogers, K. Tullis, S. D. Seidel, P. H. Cenijn, A. Brouwer & M. S. Denison (1998). "Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites." *Biochemistry* **37**(33): 11508-15.

- Heid, S. E., R. S. Pollenz & H. I. Swanson (2000). "Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor." *Mol Pharmacol* **57**(1): 82-92.
- Henklova, P., R. Vrzal, J. Ulrichova & Z. Dvorak (2008). "Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling." *Chem Biol Interact* **172**(2): 93-104.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-74.
- Huang, W. C., S. T. Chen, W. C. Chang, K. Y. Chang & B. K. Chen (2010). "Involvement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in EGF-induced c-Jun/Sp1-mediated gene expression." *Cell Mol Life Sci*.
- Jin, D. Q., J. W. Jung, Y. S. Lee & J. A. Kim (2004). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits cell proliferation through arylhydrocarbon receptor-mediated G1 arrest in SK-N-SH human neuronal cells." *Neurosci Lett* **363**(1): 69-72.
- Kanaar, R., J. H. Hoeijmakers & D. C. van Gent (1998). "Molecular mechanisms of DNA double strand break repair." *Trends Cell Biol* **8**(12): 483-9.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger & I. Pongratz (1999). "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." *J Biol Chem* **274**(19): 13519-24.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger & I. Pongratz (2000). "The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor." *J Biol Chem* **275**(52): 41317-24.
- Kelly, G. S. (1998). "Clinical applications of N-acetylcysteine." *Altern Med Rev* **3**(2): 114-27.
- Khan, E. M., J. M. Heidinger, M. Levy, M. P. Lisanti, T. Ravid & T. Goldkorn (2006). "Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking." *J Biol Chem* **281**(20): 14486-93.
- Köhle, C., H. Gschaidmeier, D. Lauth, S. Topell, H. Zitzer & K. W. Bock (1999). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells." *Arch Toxicol* **73**(3): 152-8.
- Korzeniewski, N., S. Wheeler, P. Chatterjee, A. Duensing & S. Duensing (2010). "Role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in centrosome amplification: implications for chemoprevention." *Mol Cancer* **9**(1): 153.
- LaPres, J. J., E. Glover, E. E. Dunham, M. K. Bunger & C. A. Bradfield (2000). "ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **275**(9): 6153-9.
- Lavin, M. F. (2007). "ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks." *Oncogene* **26**(56): 7749-58.

- Lin, T. M., K. Ko, R. W. Moore, D. L. Buchanan, P. S. Cooke & R. E. Peterson (2001). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice." *J Toxicol Environ Health A* **64**(4): 327-42.
- Liu, S., M. Abdelrahim, S. Khan, E. Ariazi, V. C. Jordan & S. Safe (2006). "Aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells." *Biol Chem* **387**(9): 1209-13.
- Ma, Q. & K. T. Baldwin (2000). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR." *J Biol Chem* **275**(12): 8432-8.
- Ma, Q. & K. T. Baldwin (2002). "A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor." *Chemosphere* **46**(9-10): 1491-500.
- Ma, S., X. Liu, B. Jiao & Y. Yang (2010). "Low-dose radiation-induced responses: Focusing on epigenetic regulation." *Int J Radiat Biol* **86**(7): 517-28.
- MacPhail, S. H., J. P. Banath, T. Y. Yu, E. H. Chu, H. Lambur & P. L. Olive (2003). "Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays." *Int J Radiat Biol* **79**(5): 351-8.
- Mah, L. J., R. S. Vasireddy, M. M. Tang, G. T. Georgiadis, A. El-Osta & T. C. Karagiannis (2010). "Quantification of gammaH2AX foci in response to ionising radiation." *J Vis Exp*(38).
- Mahrhofer, H., S. Burger, U. Oppitz, M. Flentje & C. S. Djuzenova (2006). "Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**(2): 573-80.
- Mannironi, C., W. M. Bonner & C. L. Hatch (1989). "H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals." *Nucleic Acids Res* **17**(22): 9113-26.
- Marconett, C. N., S. N. Sundar, K. M. Poindexter, T. R. Stueve, L. F. Bjeldanes & G. L. Firestone (2010). "Indole-3-carbinol triggers aryl hydrocarbon receptor-dependent estrogen receptor (ER)alpha protein degradation in breast cancer cells disrupting an ERalpha-GATA3 transcriptional cross-regulatory loop." *Mol Biol Cell* **21**(7): 1166-77.
- Marlowe, J. L. & A. Puga (2005). "Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis." *J Cell Biochem* **96**(6): 1174-84.
- Marlowe, J. L., Y. Fan, X. Chang, L. Peng, E. S. Knudsen, Y. Xia & A. Puga (2008). "The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis." *Mol Biol Cell* **19**(8): 3263-71.

- Marti, T. M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale & J. E. Cleaver (2006). "H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 9891-6.
- Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." *Biochim Biophys Acta* **1619**(3): 263-8.
- Minsavage, G. D., S. K. Park & T. A. Gasiewicz (2004). "The aryl hydrocarbon receptor (AhR) tyrosine 9, a residue that is essential for AhR DNA binding activity, is not a phosphoresidue but augments AhR phosphorylation." *J Biol Chem* **279**(20): 20582-93.
- Mirzayans, R., D. Severin & D. Murray (2006). "Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **66**(5): 1498-505.
- Miyata, Y. (2005). "Hsp90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents." *Curr Pharm Des* **11**(9): 1131-8.
- Morgan, W. F., J. Corcoran, A. Hartmann, M. I. Kaplan, C. L. Limoli & B. Ponnaiya (1998). "DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability." *Mutat Res* **404**(1-2): 125-8.
- Mukai, M. & S. A. Tischkau (2007). "Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor." *Toxicol Sci* **95**(1): 172-81.
- Mukai, R., Y. Shirai, N. Saito, I. Fukuda, S. Nishiumi, K. I. Yoshida & H. Ashida (2010). "Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." *Arch Biochem Biophys*.
- Nebert, D. W. & R. A. McKinnon (1994). "Cytochrome P450: evolution and functional diversity." *Prog Liver Dis* **12**: 63-97.
- Nie, M., A. L. Blankenship & J. P. Giesy (2001). "Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways." *Environ Toxicol Pharmacol* **10**(1-2): 17-27.
- Obermeier, M. T., R. E. White & C. S. Yang (1995). "Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities." *Xenobiotica* **25**(6): 575-84.
- Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama & S. Kato (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." *Nature* **446**(7135): 562-6.
- Ohtake, F., Y. Fujii-Kuriyama & S. Kato (2009). "AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 474-84.
- Olive, P. L. & J. P. Banath (2004). "Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**(2): 331-5.

- Olive, P. L. (1998). "The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation." *Radiat Res* **150**(5 Suppl): S42-51.
- Pang, P. H., Y. H. Lin, Y. H. Lee, H. H. Hou, S. P. Hsu & S. H. Juan (2008). "Molecular mechanisms of p21 and p27 induction by 3-methylcholanthrene, an aryl-hydrocarbon receptor agonist, involved in antiproliferation of human umbilical vascular endothelial cells." *J Cell Physiol* **215**(1): 161-71.
- Park, S., B. Dong & F. Matsumura (2007). "Rapid activation of c-Src kinase by dioxin is mediated by the Cdc37-HSP90 complex as part of Ah receptor signaling in MCF10A cells." *Biochemistry* **46**(3): 899-908.
- Park, S., E. C. Henry & T. A. Gasiewicz (2000). "Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation." *Arch Biochem Biophys* **381**(2): 302-12.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert & W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* **10**(15): 886-95.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert & W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." *Curr Biol* **10**(15): 886-95.
- Pearl, L. H. & C. Prodromou (2000). "Structure and in vivo function of Hsp90." *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 46-51.
- Peters, J. M. & L. M. Wiley (1995). "Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor." *Toxicol Appl Pharmacol* **134**(2): 214-21.
- Peterson, C. L. & J. Cote (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." *Genes Dev* **18**(6): 602-16.
- Petrini, J. H. & T. H. Stracker (2003). "The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators." *Trends Cell Biol* **13**(9): 458-62.
- Petrulis, J. R. & G. H. Perdew (2002). "The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 25-40.
- Petrulis, J. R., A. Kusnadi, P. Ramadoss, B. Hollingshead & G. H. Perdew (2003). "The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity." *J Biol Chem* **278**(4): 2677-85.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig & W. M. Bonner (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." *Biochem Cell Biol* **81**(3): 123-9.
- Poland, A., E. Clover, A. S. Kende, M. DeCamp & C. M. Giandomenico (1976). "3,4,3',4'-Tetrachloro azoxybenzene and azobenzene: potent inducers of aryl hydrocarbon hydroxylase." *Science* **194**(4265): 627-30.

- Povirk, L. F., R. Z. Zhou, D. A. Ramsden, S. P. Lees-Miller & K. Valerie (2007). "Phosphorylation in the serine/threonine 2609-2647 cluster promotes but is not essential for DNA-dependent protein kinase-mediated nonhomologous end joining in human whole-cell extracts." *Nucleic Acids Res* **35**(12): 3869-78.
- Puck, T. T. & P. I. Marcus (1956). "Action of x-rays on mammalian cells." *J Exp Med* **103**(5): 653-66.
- Puga, A., C. Ma & J. L. Marlowe (2009). "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways." *Biochem Pharmacol* **77**(4): 713-22.
- Puga, A., S. J. Barnes, T. P. Dalton, C. Chang, E. S. Knudsen & M. A. Maier (2000). "Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest." *J Biol Chem* **275**(4): 2943-50.
- Puga, A., Y. Xia & C. Elferink (2002). "Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation." *Chem Biol Interact* **141**(1-2): 117-30.
- Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock & W. Bonner (2002). "Histone H2A variants H2AX and H2AZ." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 162-9.
- Reisz-Porszasz, S., M. R. Probst, B. N. Fukunaga & O. Hankinson (1994). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6075-86.
- Rich, T., R. L. Allen & A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." *Nature* **407**(6805): 777-83.
- Riches, L. C., A. M. Lynch & N. J. Gooderham (2008). "Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks." *Mutagenesis* **23**(5): 331-9.
- Rifkind, A. B., M. Gannon & S. S. Gross (1990). "Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: a new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity." *Biochem Biophys Res Commun* **172**(3): 1180-8.
- Rodemann, H. P., K. Dittmann & M. Toulany (2007). "Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair." *Int J Radiat Biol* **83**(11-12): 781-91.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon & W. M. Bonner (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." *J Cell Biol* **146**(5): 905-16.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova & W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-68.
- Rowlands, J. C. & J. A. Gustafsson (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction." *Crit Rev Toxicol* **27**(2): 109-34.

- Rupnik, A., N. F. Lowndes & M. Grenon (2010). "MRN and the race to the break." *Chromosoma* **119**(2): 115-35.
- Safe, S. (2001). "Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis." *Toxicol Lett* **120**(1-3): 1-7.
- Sambrook & Russell (2006), CSH protocols
- Scheel, J. & D. Schrenk (2000). "Genomic structure of the human Ah receptor nuclear translocator gene (hARNT)." *Hum Genet* **107**(4): 397-9.
- Scheel, J., R. Hussong, D. Schrenk & H. J. Schmitz (2002). "Variability of the human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene." *J Hum Genet* **47**(5): 217-24.
- Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon & C. A. Bradfield (1996). "Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6731-6.
- Schulte, T. W., M. V. Blagosklonny, C. Ingui & L. Neckers (1995). "Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association." *J Biol Chem* **270**(41): 24585-8.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin & W. M. Bonner (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." *Radiat Res* **158**(4): 486-92.
- Selmin, O., P. A. Thorne, F. M. Blachere, P. D. Johnson & D. F. Romagnolo (2005). "Transcriptional activation of the membrane-bound progesterone receptor (mPR) by dioxin, in endocrine-responsive tissues." *Mol Reprod Dev* **70**(2): 166-74.
- Shertzer, H. G., A. Puga, C. Chang, P. Smith, D. W. Nebert, K. D. Setchell & T. P. Dalton (1999). "Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones." *Chem Biol Interact* **123**(1): 31-49.
- Shi, S., D. Y. Yoon, K. Hodge-Bell, S. Huerta-Yepez & O. Hankinson (2010). "Aryl hydrocarbon nuclear translocator (hypoxia inducible factor 1beta) activity is required more during early than late tumor growth." *Mol Carcinog* **49**(2): 157-65.
- Siess, M. H., J. Leclerc, M. C. Canivenc-Lavier, P. Rat & M. Suschetet (1995). "Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes." *Toxicol Appl Pharmacol* **130**(1): 73-78.
- Song, Z. & R. S. Pollenz (2002). "Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation." *Mol Pharmacol* **62**(4): 806-16.
- Song, Z. & R. S. Pollenz (2003). "Functional analysis of murine aryl hydrocarbon (AH) receptors defective in nuclear import: impact on AH receptor degradation and gene regulation." *Mol Pharmacol* **63**(3): 597-606.

- Stebbins, C. E., A. A. Russo, C. Schneider, N. Rosen, F. U. Hartl & N. P. Pavletich (1997). "Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent." *Cell* **89**(2): 239-50.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich & P. A. Jeggo (2004). "ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation." *Cancer Res* **64**(7): 2390-6.
- Suit, H. (2002). "The Gray Lecture 2001: coming technical advances in radiation oncology." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**(4): 798-809.
- Swanson, H. I. & G. H. Perdew (1993). "Half-life of aryl hydrocarbon receptor in Hepa 1 cells: evidence for ligand-dependent alterations in cytosolic receptor levels." *Arch Biochem Biophys* **302**(1): 167-74.
- Tanaka, T., X. Huang, E. Jorgensen, D. Gietl, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz & A. P. Albino (2007). "ATM activation accompanies histone H2AX phosphorylation in A549 cells upon exposure to tobacco smoke." *BMC Cell Biol* **8**: 26.
- Taneja, N., M. Davis, J. S. Choy, M. A. Beckett, R. Singh, S. J. Kron & R. R. Weichselbaum (2004). "Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy." *J Biol Chem* **279**(3): 2273-80.
- Taylor, B. L. & I. B. Zhulin (1999). "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 479-506.
- Tsyrllov, I. B., V. M. Mikhailenko & H. V. Gelboin (1994). "Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids." *Biochim Biophys Acta* **1205**(2): 325-35.
- Tureson, I., J. Nyman, E. Holmberg & A. Oden (1996). "Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**(5): 1065-75.
- Ushio-Fukai, M. (2006). "Localizing NADPH oxidase-derived ROS." *Sci STKE* **2006**(349): re8.
- Vamvakas, S., E. H. Vock & W. K. Lutz (1997). "On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis." *Crit Rev Toxicol* **27**(2): 155-74.
- Watabe, Y., N. Nazuka, M. Tezuka & S. Shimba (2010). "Aryl hydrocarbon receptor functions as a potent coactivator of E2F1-dependent transcription activity." *Biol Pharm Bull* **33**(3): 389-97.
- Wegele, H., L. Muller & J. Buchner (2004). "Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**: 1-44.
- Weterings, E. & D. J. Chen (2007). "DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys?" *J Cell Biol* **179**(2): 183-6.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers & L. M. Neckers (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation

- by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8324-8.
- Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 103-25.
- Wincent, E., N. Amini, S. Luecke, H. Glatt, J. Bergman, C. Crescenzi, A. Rannug & U. Rannug (2009). "The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans." *J Biol Chem* **284**(5): 2690-6.
- Wood, S. M., J. M. Gleadle, C. W. Pugh, O. Hankinson & P. J. Ratcliffe (1996). "The role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxic induction of gene expression. Studies in ARNT-deficient cells." *J Biol Chem* **271**(25): 15117-23.
- Yang, Y., R. Sharma, A. Sharma, S. Awasthi & Y. C. Awasthi (2003). "Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling." *Acta Biochim Pol* **50**(2): 319-36.
- Zaider, M., M. Bardash & A. Fung (1994). "Molecular damage induced directly and indirectly by ionizing radiation in DNA." *Int J Radiat Biol* **66**(5): 459-65.
- Zhai, S., R. Dai, F. K. Friedman & R. E. Vestal (1998). "Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids." *Drug Metab Dispos* **26**(10): 989-92.

7 ANHANG

7.1 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Rodemann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die freundliche Betreuung. Herrn Prof. Schwarz danke ich für die Gesamtbetreuung an der Fakultät für Chemie und Pharmazie und seinem stets kritischen Interesse an meiner Arbeit. Herrn Prof. Klaus Dittmann danke ich für die sehr gute fachliche Betreuung und stetige Unterstützung.

Ebenfalls danke ich allen Mitgliedern der Sektion für Strahlenbiologie und Molekularen Umweltforschung für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für seine Hilfestellung im Labor und seinen Humor danke ich Claus Mayer. Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung Toxikologie für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Daniel, meinen Eltern und meiner gesamten Familie ohne deren uneingeschränkte Unterstützung mein Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Marie-Christine Rothmund

Geb. 8. Januar 1981
in Weingarten
Nationalität deutsch

Studium

10/2001-06/2007	Studium der Biochemie , Universität Tübingen
10/2004-09/2005	Praktisches Jahr , MPI für Biochemie und Neurobiologie, Abteilung Membranbiochemie, Prof. Dr. Dieter Oesterhelt Neurobiologie, Prof. Dr. Rüdiger Klein Molekulare Zellbiologie, Prof. Dr. Stefan Jentsch LMU München Biochemie, Prof. Dr. Walter Neupert Genzentrum, AG Drosophila Neurobiologie, Dr. Claudia Petritsch Genzentrum, AG Hefegenetik, Dr. Katja Sträßer
06/2007	Diplomarbeit: Einfluss des Hairless-Gens auf die β -Catenin Signalfunktion in Hepatozyten. Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen (Endnote sehr gut)
07/2007-06/2010	Dissertation: Die Rolle des Arylhydrocarbon Rezeptors in der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung. Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Klinik für Radioonkologie, Universität Tübingen

Publikationen

Rothmund, M.-C., C. Mayer, B. Fehrenbacher, M. Schaller, E. Fritsche, J. Abel, T. Haarmann-Stemmann, R. Kehlbach, P.A. Münzel, A. Braeuning, M. Schwarz, H.P. Rodemann and K. Dittmann. Nuclear AhR is indispensable for DNA-repair and cell survival following treatment with ionizing radiation. Ready for submission.

Dittmann, K., C. Mayer, R. Kehlbach, **M.-C. Rothmund** & H. Peter Rodemann (2009). "Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport." Radiother Oncol **92**(3): 379-82.

Vorträge

11. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung; Tübingen, 2008.
Marie-Christine Rothmund, Klaus Dittmann, Claus Mayer und H. Peter Rodemann Ionisierende Strahlung aktiviert den Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) und moduliert EGFR abhängig die DNA-Reparatur

Poster Präsentationen

11th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology; Ermatingen, Switzerland, 2009.
Marie-Christine Rothmund, Klaus Dittmann, Claus Mayer und H. Peter Rodemann Ionizing radiation activates the aryl-hydrocarbon receptor (Ahr) and modulates EGFR internalization via src kinase

48. Frühjahrstagung der DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie; Mainz, 2007.
Armbruster N., **Rothmund M.-C.**, Schwarz M., Münzel P.A. (Tübingen)
Der β -Catenin-Signalweg in mit dem „hairless gene“ stabil transfizierten Hepatomazellen der Maus

Lehrerfahrung

3-malige Betreuung Studentenpraktikum Anorganische Chemie im Biochemie Grundstudium
Betreuung Studenten im Hauptstudium Biochemie im Praktikum Molekularbiologie und Zellkultur
Betreuung Studenten der Molekularen Medizin im Praktikum Molekularbiologie

Schulbildung und Freiwilliges Ökologisches Jahr

2000-2001	Freiwilliges Ökologisches Jahr, NABU-Vogelschutzzentrum Mössingen
2000	Abitur (Note 1,5) Edith-Stein-Gymnasium Ravensburg