

Aus dem
Bundesinstitut für Risikobewertung

**Charakterisierung der
metabolischen Aktivierung und biologischen Wirkung von
Benzo[*a*]pyren in der Haut**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kristin Stolpmann
aus Halberstadt
Juli2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis Dezember 2012 unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Luch am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Luch

2. Gutachter: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

Tag der Disputation: 02. Juli 2014

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Luch danke ich für die Möglichkeit meine Promotion am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Fachgruppe "Experimentelle Forschung" unter sehr guten wissenschaftlichen Bedingungen anfertigen zu können.

Frau Prof. Dr. phil. nat. Monika Schäfer-Korting danke ich für die Übernahme des Gutachtens und die Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der FU Berlin.

Herrn Dr. Frank Henkler danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung beim Erstellen der Arbeit und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joseph Brinkmann für die sehr engagierte Unterstützung, die konstruktiven Anregungen sowie die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche.

Ein Dankeschön an Herrn Dr. Christoph Hutzler für die stetige Hilfe in allen analytischen Fragen.

Danke an das gesamte Team der Fachgruppe 73 für die schönen Jahre innerhalb und außerhalb des Labors. Besonders: Antje und Dora, für ihre charmante und weise Art, die Dinge in die richtige Perspektive zu rücken. Franz und Marc, für die einzigartigen Stunden im Labor und im "Kinderzimmer".

Ein ganz besonderes Dankeschön an Manuel, der mit mir gemeinsam diesen Weg gegangen ist und auf all meine Fragen eine Antwort parat hatte .

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Melanie, Christoph, Anton & Max, die mir gezeigt haben, dass es ein Leben neben der Doktorarbeit gibt und mich in schwierigen Zeiten aufgefangen haben.

Ich danke meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundbausteine für meinen Weg gelegt haben und mich stets in meiner Arbeit bestärkt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe für den Verbraucherschutz.....	2
1.2 Metabolismus von Benzo[<i>a</i>]pyren.....	4
1.3 Biologische Konsequenzen der Benzo[<i>a</i>]pyren-Exposition	4
1.3.1 Benzo[<i>a</i>]pyren-vermittelte Genotoxizität.....	4
1.3.2 Benzo[<i>a</i>]pyren-vermittelte Zytotoxizität	7
1.4 Funktion des Arylhydrocarbon Rezeptors in der menschlichen Haut.....	12
1.5 Zielstellung der Arbeit	14
2. Ergebnisse	15
2.1. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbones: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses	15
2.2. Metabolic Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[<i>a</i>]pyrene	40
2.3. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Sensitises Human Keratinocytes for CD95L- and TRAIL-Induced Apoptosis.....	50
3. Diskussion	61
3.1 Benzo[<i>a</i>]pyren Metabolismus in der Haut.....	62
3.2 Benzo[<i>a</i>]pyren vermittelte Genotoxizität	65
3.3 Sensibilisierung von Keratinozyten für CD95L- und TRAIL-vermittelte Apoptose.....	68
4. Zusammenfassung	74
5. Summary	76
6. Literaturverzeichnis	78
7. Publikationsliste	86
7.1 Publikationen	86
7.2 Konferenzbeiträge	86

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
α -NF	α -Naphtoflavon
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Aphidicolin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ARNT	AHR Nuclear Translocator
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM and Rad3-Related
β -NF	β -Naphtoflavon
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	BCL-2 antagonist/killer
Bax	BCL-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl-2 homology
BH3	Bcl-2 homology domain 3
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BP	Benzo[<i>a</i>]pyren
BPDE	(+)- <i>anti</i> -BP-7,8-diol-9,10-epoxid
CD	Cluster of Differentiation
CD95	Cluster of Differentiation 95 (FAS)
CD95L	CD95 Ligand
c-FLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
cSrc	cellular sarcoma tyrosine kinase
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase

CytC	Cytochrome C
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F	E2-Promotor binding factor
EFT	EpiDerm full thickness
e.V.	empty vector
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	FAS Receptor Associated Death Domain
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FLICE	FADD-like IL-1 β Converting Enzyme
FT	full thickness
h	Stunde
HaCaT cells	human adult low calcium high temperature cells
HepG2	Hepatoma G2 cells
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSP90	heat shock protein 90
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IER3	Immediately Early Response gene 3
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
k.d.	knock-down
LC-MS/MS	Liquid (Flüssigkeits)-Chromatographie-MS/MS
MAP	Mitogen Activated Protein
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
min	Minuten
ml	Milliliter
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NF κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocyte
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate induced protein 1
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
Omi/HtrA2	High temperature requirement protein A2
p23	Protein 23
p48	Protein 48
p53	Protein 53
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (“reactive oxygen species”)
SAPK	Stress-Activated Phospho-Kinase
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF Receptor
TP53	Tumor suppressor protein p53
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL Receptor
Wnt	Wingless-related integration site
WST	water soluble tetrazolium
XAP2	Hepatitis B virus X-associated protein 2
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

XPC	Xeroderma pigmentosum group C
XRE	Xenobiotic-Responsive Element
zVAD	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-(<i>O</i> -Me)- fluoromethylketone

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: apoptotische Signaltransduktionswege und ihre Modulatoren.....	8
---	---

1. Einleitung

Als erste Barriere zur Umwelt kommt die humane Haut mit einer Vielzahl von Chemikalien in Kontakt. Einige dieser Stoffe können neben adversen Effekten - wie Kontaktdermatitis und Arzneimittelallergien - im schlimmsten Fall eine dermale chemische Kanzerogenese auslösen. Daher sind Studien zur dermalen Toxizitätsprüfung potentiell gefährlicher Substanzen von größter Bedeutung¹. Essentiell ist ebenfalls die Aufklärung der Metabolisierung dieser Substanzen in der Haut. Lange Zeit wurden fast ausschließlich Studien zum Metabolismus von Fremdstoffen in der Leber durchgeführt, dem Organ mit der höchsten Vielfalt und Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Erst Mitte der Neunziger Jahre wurde mit der systematischen Untersuchung der metabolischen Kapazität der Haut begonnen^{2,3}. Dabei zeigte sich, dass die Haut über eine Vielzahl der Enzyme sowohl für die Phase I als auch für die Phase II des Fremdstoffmetabolismus verfügt⁴. Fremdstoffmetabolisierende Enzyme katalysieren die metabolische Umsetzung und beeinflussen damit auch die Toxizität vieler Verbindungen. Ein Beispiel für eine gesteigerte Toxizität nach metabolischer Aktivierung sind mutagene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK).

PAK sind ubiquitär vorkommende Substanzen, die häufig als Gemisch von mehr als 100 Einzelkomponenten auftreten. Benzo[*a*]pyren (BP) wird als Leitsubstanz betrachtet und wurde intensiv erforscht. Die Exposition des Menschen gegenüber BP kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: über die Atemluft, die Nahrung oder durch den Kontakt mit kontaminierten Materialien. Nach der Aufnahme in den Körper wird BP durch die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus aktiviert und es kommt zur Bildung von Metaboliten, die zytotoxische und ggf. genotoxische Effekte hervorrufen können.

Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit fehlten Studien zur quantitativen Untersuchung des BP-Metabolismus in der Haut. Unklar waren ebenfalls die biologischen Konsequenzen einer BP-Exposition der Haut. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die dermale Metabolisierung von BP und mögliche genotoxische Effekte, ausgelöst durch die BP-Exposition, untersucht werden.

Gleichzeitig wurden auch die biologischen Konsequenzen dieser Schadstoff-Exposition näher untersucht. BP bindet und aktiviert einen zytoplasmatischen,

Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor: den Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AHR). Der AHR ist neben dem Fremdstoffmetabolismus an einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege, wie Inflammation, Apoptose, Differenzierung und Proliferation beteiligt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass BP über die direkte Aktivierung des AHR Apoptose auslösen kann und über die durch genotoxische Schäden ausgelöste Aktivierung und Stabilisierung des Tumorsuppressor Proteins p53 (p53) in einigen Zellen Apoptose induzieren kann⁵⁻¹⁰.

Zu Beginn der Arbeit gab es keine Daten hinsichtlich der apoptotischen Wirkung von BP in der Haut. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob BP in Hautzellen Apoptose induziert bzw. BP Hautzellen für diese Art des Zelltods sensibilisieren kann.

1.1 Bedeutung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) für den Verbraucherschutz

PAK stellen eine Gruppe mit mehreren hundert Einzelsubstanzen dar, die mindestens drei kondensierte aromatische Ringe aufweisen. Für einige Vertreter aus der Gruppe der PAK wurden kanzerogene Eigenschaften nachgewiesen. PAK, die fast immer als komplexe Gemische vorliegen, sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Sie entstehen bei Pyrolyse-Prozessen, d.h. unvollständiger Verbrennung von organischem Material. So werden PAK durch die Verbrennung von Kraftstoffen, Tabak und Müll in die Umwelt eingebracht. Des weiteren werden sie beim Grillen, Braten und Räuchern von Fleisch gebildet. Zahlreiche PAK sind zudem natürliche Bestandteile von Rohöl, Erdöl, Torf, Braun- und Steinkohle und können an verschiedenen Arbeitsplätzen (Aluminiumproduktion, Konverterbetrieben, Kokereien, Graphitelektrodenproduktion, Gussasphaltarbeiten) vorkommen^{11,12}.

Die Arbeitsplatz-bedingte Exposition erfolgt dabei in der Regel über die Atemwege und die Haut. Ein signifikant erhöhtes Risiko für Lungenkrebs nach PAK-Exposition am Arbeitsplatz konnte in einer Vielzahl epidemiologischer Studien nachgewiesen werden. Bosetti et al. veröffentlichten 2007 eine Übersichtsarbeit, in der Kohortenstudien an Arbeitern mit PAK-Exposition in verschiedenen Industriezweigen ausgewertet wurde. Dabei fand sich in den meisten untersuchten Industriezweigen ein signifikant erhöhtes Risiko für Lungenkrebs¹³. In einer bereits

1. Einleitung

2004 veröffentlichten umfangreichen Metaanalyse konnte ebenfalls ein signifikant erhöhtes Lungenkrebsrisiko in einzelnen Industriezweigen, z.B. in Gaswerken oder in der Aluminiumherstellung, nachweisen werden¹⁴. Diese Untersuchungen sind in Übereinstimmung mit früher durchgeführten Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen PAK-Exposition und Lungenkrebsrisiko für Arbeiter in der Aluminiumherstellung beschrieben wurde¹⁵.

Bei Arbeitern mit erhöhter dermaler Exposition konnte ein erhöhtes Hautkrebsrisiko beobachtet werden^{16,17}. Darüber hinaus wurde nach inhalativer bzw. dermaler Exposition auch ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen in anderen Organen (Blase, Kehlkopf, Mundhöhle, Rachen) nachgewiesen^{14,17,18,19}.

In zahlreichen Tierexperimenten konnte die epidemiologisch beschriebene kanzerogene Wirkung der PAK bestätigt werden. Weiterhin sind toxische, mutagene, reproduktionstoxische, teratogene und immunsuppressive Wirkungen am Tier gut belegt²⁰⁻²⁸.

Eine Exposition der menschlichen Haut mit BP kann neben der Luft auch über kontaminierte Materialien erfolgen. Hier sind Werkzeuggriffe, Uhrenarmbänder oder Plastikkomponenten von Schuhen und Bekleidungsstücken zu nennen. Das Bundesinstitut für Risikobewertung schätzt die dermale Exposition gegenüber BP und anderen PAK über kontaminierte verbrauchernahe Produkte als beträchtliches Gesundheitsrisiko ein¹.

Die unterschiedlichen zellulären Effekte von BP können neben der direkten Aktivierung des AHR durch die Bildung toxischer Metabolite ausgelöst werden. Im nächsten Kapitel soll daher der Fremdstoffmetabolismus von BP genauer besprochen werden.

¹Bei Abschätzung der externen dermalen Exposition auf Grundlage experimentell ermittelter Migrationsraten und BP-Gehalte marktüblicher Verbraucherprodukte ergaben sich Expositionshöhen von 0,3 – 68.613 ng/kg Körpergewicht/Tag. Gemäß dieser dermalen Expositionsabschätzung ist eine Konzentration von bis zu 40 µM BP nach Kontakt mit kontaminierten Produkten möglich: aus einem 200 g schweren Werkzeuggriff mit 100 mg BP migriert pro Stunde 1% BP (1 mg), davon penetrieren 22% (220 µg) in die Haut. Bei einer Kontaktfläche der Hand von 21,6 cm³ (12 cm x 12 cm x 0.15 cm) ergibt sich eine Exposition mit BP von 10 µg/cm³ bzw. 40 µM²⁹.

1.2 Metabolismus von Benzo[*a*]pyren

PAK können prinzipiell auf drei Wegen aktiviert werden: über die Cytochrom P450-abhängige Entstehung von Diol-Epoxiden, den *ortho*-Chinon-Stoffwechselweg und die radikalische Oxidation. Die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen 1A1 und 1B1 (CYP1A1/1B1) katalysieren die Oxidation von PAK zu Epoxid-Derivaten, die enzymatisch und nicht-enzymatisch weiter verstoffwechselt werden können. Im Falle von BP führt eine zweifache Epoxidierung u.a. zur Bildung von (+)-*anti*-BP-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), dem ultimativen Karzinogen.

Durch einen alternativen Stoffwechselweg kommt es zur Bildung von Chinonen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Außerdem können durch Einelektronen-Oxidationen PAK-Radikalkationen gebildet werden³⁰. Die Veröffentlichung *Henkler, F., Stolpmann, K., & Luch, A. (2012). Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, 101, 107-131.* gibt einen detaillierten Überblick über die verschiedenen Metabolisierungswege der PAK und die dabei entstehenden reaktiven Zwischenprodukte.

Durch die metabolische Aktivierung von BP kommt es zur Bildung von elektrophilen bzw. nukleophilen Zwischenprodukten, die sowohl zytotoxische als auch genotoxische Effekte hervorrufen können. Die Auswirkungen einer BP-Exposition auf die Zellen des Organismus werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.3 Biologische Konsequenzen der Benzo[*a*]pyren-Exposition

1.3.1 Benzo[*a*]pyren-vermittelte Genotoxizität

BP aktiviert in der Zelle den AHR und induziert die Transkription verschiedener Gene, wie CYP1A1, und induziert damit seine eigene metabolische Umsetzung. Die Auswirkungen der Bindung von BP an den AHR werden in Abschnitt 1.4 ausführlich erläutert.

Bei der metabolischen Aktivierung von BP durch verschiedene Enzyme der Phase I des Fremdstoffmetabolismus kommt es zur Bildung von elektrophilen Zwischenprodukten, wie BPDE oder BP-Chinonen. Elektrophile Verbindungen können

1. Einleitung

mit endogenen nukleophilen Molekülen der Zelle, wie DNA und Proteinen, reagieren und dabei auch mutagen wirken. Die zellulären Reaktionen auf die so entstandenen Addukte stellen ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Signalwege dar. Beteiligt sind dabei u.a. Serin-Proteinkinase (ATM), Serin/Threonin-Proteinkinase (ATR), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP Kinasen) und das Tumorsuppressorprotein p53^{5,6}. Ob durch die BP verursachten DNA-Schäden tatsächlich Mutationen entstehen, wird maßgeblich beeinflusst von der Lage dieser Modifikationen und der umgebenden Nukleotide sowie der Erkennung und Beseitigung durch DNA-Reparaturmechanismen. Zelluläre Proteine, wie der Tumorsuppressor p53, gewährleisten die genetischen Stabilität. Treten DNA-Schäden auf, so kommt es zunächst zur Akkumulation von p53 im Zellkern. Dadurch kann ein Zellzyklusarrest ausgelöst werden, um nachfolgend eine Reparatur des Schadens zu ermöglichen. BP-DNA-Addukte können durch die von p53 beeinflusste Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) beseitigt werden. Zu den von p53 transkriptionell regulierten Genen zählen die an der NER-Schadenserkennung beteiligten Proteine Xeroderma pigmentosum group C (XPC) und Protein p48^{6,119}. Kann der Schaden nicht repariert werden, vermittelt p53 pro-apoptotische Signale und die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges^{5,6}.

Durch das CYP-abhängig gebildete BPDE können BPDE-DNA-Addukte entstehen. Das kanzerogene Potential von BPDE und die Bedeutung von BPDE-DNA-Addukten bei der Entstehung von Mutationen in dem für p53 codierenden Gen sind gut belegt^{19,31,32}.

Die auf einem alternativen Stoffwechselweg gebildeten Reaktionsprodukte des BP können ebenfalls zur Schädigung der DNA sowie zur Aktivierung vielfältiger Signalwege führen. So können BP-Chinone stabile DNA-Addukte sowie abasische Stellen durch Depurinierung bilden. Die Entstehung von ROS kann zu oxidativen DNA-Modifikationen und -Addukten führen. Durch "Redox-Cycling"-Mechanismen kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS. Die intrazelluläre ROS-Bildung führt zur Induktion von Apoptose und Schädigungen von zellulären Molekülen³³⁻³⁹.

Zudem kann es durch Einelektronen-Oxidation zur Bildung von PAK-Radikalkationen kommen, die bevorzugt an den Positionen N⁷ oder C⁸ der Purinbasen binden. Nach Abspaltung der modifizierten Base entsteht eine apurinische Stelle in der DNA^{40,41}. Schon früh konnte die Kapazität humaner Keratinozyten BP zu metabolisieren

1. Einleitung

nachgewiesen werden⁴². Jedoch blieb die Frage, inwieweit die entstehenden Metabolite in der Lage sind Genotoxizität auszulösen, unbeantwortet. Ebenso wenig fanden sich Studien zur quantitativen Untersuchung des BP-Metabolismus in Keratinozyten. Bereits Ende der 1970er Jahre wiesen Parkinson et al. durch BP verursachte DNA-Addukte in humanen Keratinozyten nach⁴⁴. Mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wurde 1981 von Theall et al. der BP-Metabolismus in humanen Keratinozyten qualitativ untersucht. Die entstehenden Hauptmetabolite (BP-9,10-diol, BP-7,8-diol, Chinone, Phenole und Tetraole) konnten identifiziert und der Grad der resultierenden DNA-Bindung bestimmt werden⁴⁵. In einer japanischen Studie wurden humane Keratinozyten oder Fibroblasten mit V79-Zellen (Chinesische Hamster-Fibroblasten) ko-kultiviert. Nach Exposition mit BP traten nur in den V79 Zellen, die mit Keratinozyten ko-kultiviert wurden, Mutationen auf. Bei einer Ko-Kultivierung der V79-Zellen mit Fibroblasten konnten keine BP-abhängigen Mutationen beobachtet werden⁴⁶. Diese Studie wies erstmals eine unterschiedliche metabolische Kapazität von humanen Keratinozyten und Fibroblasten nach.

Im Jahr 2008 bestimmten Marie et al. direkt das Auftreten von BPDE-DNA-Addukten vergleichend in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und in HepG2-Zellen. Die Menge an entstandenen DNA-Addukten nach Exposition gegenüber BP war in der Hepatozyten-Zelllinie hundertfach höher als in der Keratinozyten-Zelllinie. Nach der direkten Behandlung mit BPDE war der Spiegel an DNA-Addukten in beiden Zelllinien vergleichbar. Dies kann auf eine unterschiedliche Kinetik im BP-Metabolismus hinweisen⁴⁷. Es wirft aber auch die Frage auf, ob HaCaT-Zellen BP effektiv metabolisieren können.

Neben einer direkt, durch reaktive Metabolite ausgelösten "Damage Response", kann es durch die PAK-abhängige Aktivierung von AHR-Signalwegen zu Veränderungen weiterer zellulärer Reaktionen wie Inflammation, Apoptose, Differenzierung und Proliferation, kommen^{48,49,50}. In den folgenden Abschnitten soll daher die Induktion von Apoptose nach BP-Exposition näher erläutert werden.

1.3.2 Benzo[a]pyren-vermittelte Zytotoxizität

Apoptose

Die Apoptose („programmierter Zelltod“) ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und die Homöostase mehrzelliger Organismen. Zudem spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Immunantwort durch negative Selektion von autoreaktiven T-Zellen⁵¹. Eine Deregulation der Apoptose kann unter anderem zu Autoimmunkrankheiten, neurodegenerativen Krankheiten und Krebs führen⁵²⁻⁵⁴. In der Haut trägt die Apoptose zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen proliferierenden und sterbenden Zellen bei. Teraki und Shiohara beschreiben zusammenfassend die Apoptosevorgänge in der menschlichen Haut⁵⁵.

Prinzipiell kann Apoptose durch zwei Mechanismen ausgelöst werden: die extrinsische Apoptose beruht auf der Bindung von Todesliganden an sogenannten Todesrezeptoren. Die intrinsische Apoptose ist abhängig von der Freisetzung proapoptotischer Signale aus den Mitochondrien. Beide Wege führen zur Aktivierung von Caspasen. Darunter versteht man Proteasen mit Cystein im aktiven Zentrum, die Proteine nach einem Aspartat-Rest schneiden. In Abbildung 1 sind beide Apoptosewege zusammenfassend dargestellt [nach Falschlehner et al. 2009]⁵⁶.

1. Einleitung

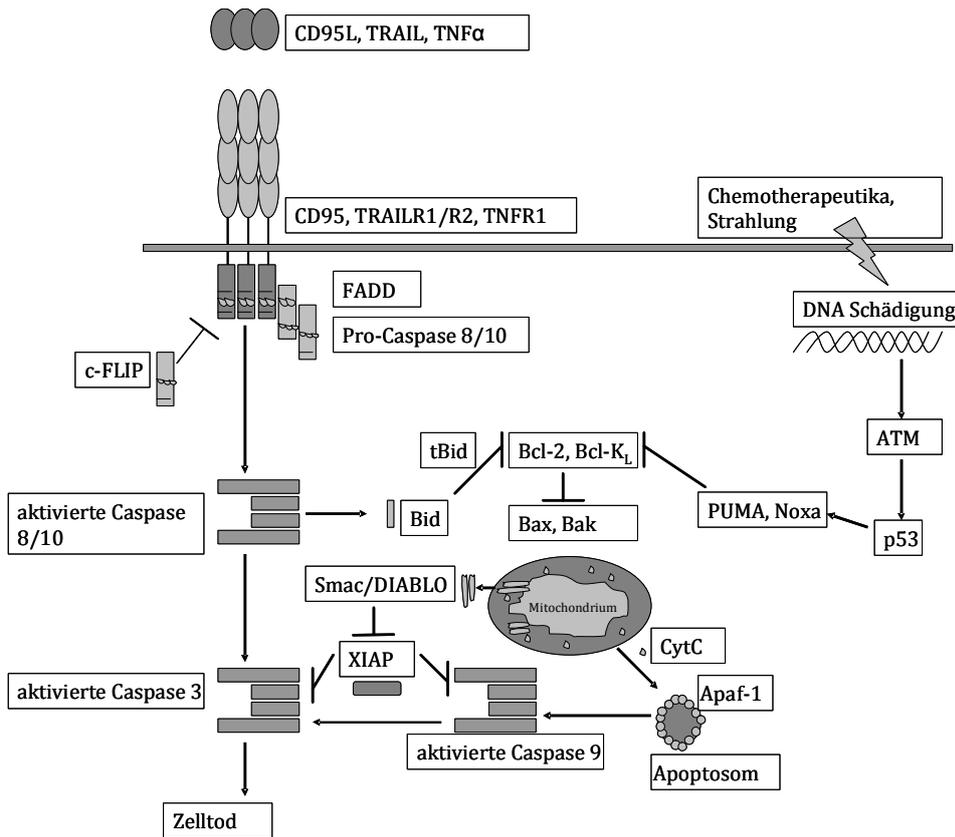


Abbildung 1: apoptotische Signaltransduktionswege und ihre Modulatoren

Extrinsische Apoptoseinduktion (links): Die Bindung der Liganden an Todesrezeptoren (CD95L, TRAIL1/2, TNF α) induziert die Trimerisierung der Rezeptoren (CD95, TRAILR1/2, TNFR1) und die Rekrutierung von cytoplasmatischen Adaptermolekülen, wie FADD. Anschließend kommt es durch die Aktivierung von Pro-Caspase 8/10 zur Spaltung von Bid in tBid sowie zur Aktivierung von Pro-Caspase 3. Dies führt zur Auslösung des apoptotischen Zelltodes.

Intrinsische Apoptose (rechts): Durch DNA-Schädigung wird die Expression und Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen (PUMA, Noxa) ausgelöst. Aus dem Mitochondrium wird CytoC freigesetzt. CytoC bildet gemeinsam mit Apaf-1 das Apoptosom. Dieser Proteinkomplex aktiviert Pro-Caspase 9 und nachfolgend Caspase 3 und 7. Dies führt zur Auslösung des apoptotischen Zelltodes.

Apaf-1: apoptotic protease activating factor 1; ATM: ataxia telangiectasia mutated; Bak: BCL-2 antagonist/killer; Bax: BCL-2 associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; Bcl-X_L: B-cell lymphoma-extra large; BH3: Bcl-2 homology domain 3; Bid: BH3-interacting domain death agonist; CD95: cluster of differentiation 95 (Fas); CD95L: CD95 Ligand; c-FLIP: cellular FLICE-like inhibitory protein; CytoC: Cytochrom C; DIABLO: direct IAP binding protein with low isoelectric point; FADD: Fas receptor associated death domain; Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; p53: protein 53; PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis; Smac: second mitochondria-derived activator of caspase; tBid: truncated Bid; TNF α : tumor necrosis factor alpha; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAILR1/2: TRAIL receptor 1/2; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

1. Einleitung

Durch DNA-Schäden, zellulären Stress oder Mangel an Wachstumsfaktoren kommt es unter Kontrolle von p53 zur Expression und Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen der B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) Familie, wie Phorbol-12-myristate-13-acetate induced protein 1 (Noxa), p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA), BH3-interacting domain death agonist (Bid) und Bcl-2 antagonist of cell death (BAD). Unter diesen Bedingungen können Zellen irreversibel auf den programmierten Zelltod festgelegt werden. Die anschließende Aggregation von Oligomeren aus BCL-2 antagonist (Bak) und BCL-2 associated X protein (Bax) innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran ermöglicht die Freisetzung von Cytochrom C (CytC) in das Cytoplasma. CytC assoziiert im Cytoplasma mit dem apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) und der Pro-Caspase 9. Die dadurch resultierende Bildung eines Apoptosom-Proteinkomplexes führt zur Aktivierung von Caspase 9 und nachfolgend von Caspase 3 und 7. Dies führt zur Auslösung des apoptotischen Zelltods^{56,57}. Neben CytC gelangen durch die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges weitere pro- apoptotische Proteine in das Cytoplasma: Apoptosis-Inducing Factor (AIF), Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point (Smac/DIABLO), High temperature requirement protein A2 (Omi/HtrA2) und Endonuklease G. Während AIF einen Caspase- unabhängigen Zelltod induziert, verstärken Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 die Caspase-Aktivität. Sie hemmen die Aktivität anti-apoptotisch wirkender Proteine, wie von dem X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)⁵⁸.

Todesliganden/-rezeptoren

Beim extrinsischen Apoptoseweg kommt es zunächst zu einer Aktivierung membranständiger Todesrezeptoren. Diese gehören aufgrund struktureller Merkmale in der extrazellulären Domäne zur Tumor Necrosis Factor (TNF)-Rezeptor-Familie. Sie besitzen außerdem eine intrazelluläre Todesdomäne, eine konservierte cytoplasmatische Protein-Protein-Interaktionsdomäne, über die Apoptose vermittelt wird⁵⁹. Durch die Interaktion zwischen extrazellulären Todesliganden, wie Cluster of Differentiation 95 Ligand (CD95L), Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) und TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), und den korrespondierenden transmembranen Todesrezeptoren, wie Cluster of Differentiation 95 (CD95), TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TRAIL Rezeptor 1/2 (TRAILR1/2), findet an der Todesdomäne eine Rekrutierung von cytoplasmatischen Adaptermolekülen, wie FAS Receptor Associated Death Domain (FADD) und TNF Receptor Associated Death

1. Einleitung

Domain (TRADD), statt. Bei CD95 und TRAILR1/2 bindet FADD direkt an den Rezeptor, bei TNFR1 bindet zunächst TRADD an den Todesrezeptor und stellt die Verbindung zu FADD her⁶⁰. FADD besitzt eine "Death Effector" Domäne, an die Pro-Caspase 8 binden kann. Die daraus resultierende Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC) führt zur proteolytischen Aktivierung von Initiator-Caspase 8 oder Pro-Caspase 10 und nachfolgend von Effektor-Caspase 3^{59,61}. Die Aktivierung von Caspase 3 erfolgt somit sowohl bei der intrinsischen als auch bei der extrinsischen Apoptose. Die Aktivierung von Caspase 8 wird unter nicht-apoptotischen Bedingungen durch das cellular FADD-like IL-1 β Converting Enzyme (FLICE)-like Inhibitory Protein (c-FLIP) inhibiert. Dieses Protein ist ein inaktives Caspase 8 Homolog, dessen Expression der Kontrolle von Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF κ B) unterliegt⁶². Weiterhin kann der Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg auch intrinsische Signale verstärken. Das pro-apoptotische Protein der Bcl-2 Familie Bid, ein Substrat von Caspase 8, transloziert nach Prozessierung durch Initiator-Caspasen in das Mitochondrium und verstärkt dort die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges⁵⁶.

Das Tumorsuppressor Protein p53 stellt einen wichtigen Modulator der Apoptose dar. Es reguliert, neben der Expression verschiedener pro-apoptotischer Proteine, auch die Expression von CD95 und TRAILR1/2⁶³⁻⁶⁶.

Die Apoptose in der Haut spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten. So sind an der Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen, wie der ekzematösen Dermatitis, die zytotoxischen Zytokine TRAIL und CD95L maßgeblich beteiligt. Diese werden von infiltrierenden Immunzellen exprimiert. Bei diesen krankhaften Veränderungen der Haut konnte eine deutlich erhöhte Sensibilisierung der Keratinozyten für die CD95L-vermittelte Apoptose beobachtet werden. Gesunde Keratinozyten dagegen sind vergleichsweise unempfindlich gegenüber zytotoxischen Zytokinen^{67,68}. Die in die Epidermis einwandernden aktivierten T-Zellen exprimieren CD95L und induzieren so direkt Apoptose in den Keratinozyten. Dieser Effekt kann durch das von aktivierten T-Zellen freigesetzte Interferon Gamma (IFN γ) und die damit verbundene Induktion von CD95 auf Keratinozyten zusätzlich verstärkt werden⁶⁹. In Keratinozyten konnte neben der beschriebenen pro-apoptotischen Wirkung eine pro-inflammatorische Wirkung von CD95L über die Induktion inflammatorischer Zytokine (TNF α , Interleukin 6,

Interleukin 1 β) und die damit verbundene Rekrutierung weiterer aktivierter T-Zellen nachgewiesen werden⁷⁰.

Induktion von Apoptose durch Benzo[*a*]pyren

Neben den durch genotoxische Metabolite (z.B. BPDE) ausgelösten Mutationen, kann es bei einer entsprechenden Exposition gegenüber BP auch zur Induktion von Apoptose in dem betreffenden Gewebe kommen. Dieser Teil des BP-vermittelten Apoptose-Geschehens ist in verschiedenen Zellarten beobachtet worden. Die Mechanismen sind jedoch bis heute noch nicht hinreichend aufgeklärt⁷¹. So gibt es widersprüchliche Studien, in denen BP zum einen pro-apoptotische Effekte hervorruft, zum anderen aber auch einen positiven Einfluss auf das Überleben verletzter Zellen zu haben scheint. In den Zelllinien HepG2 und MCF-7 konnte eine BP-abhängige Induktion des pro-apoptotischen Proteins Bax beobachtet werden⁷². In beiden Fällen wurde eine Induktion des Immediate-Early-Response-Gens 3 (IER3) nachgewiesen. IER3 kann Apoptose sowohl induzieren als auch inhibieren⁷². In HepG2 Zellen war nach BP-Exposition Survivin induziert, ein Mitglied der anti-apoptotischen IAP-Familie⁷². Diese Ergebnisse belegen, dass als Reaktion auf BP apoptotische und anti-apoptotische Signale induziert werden können⁷².

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte in murinen Hepatoma-Zellen und in humanen Makrophagen sowohl die Induktion pro-apoptotischer Proteine als auch anti-apoptotischer Proteine durch BP nachgewiesen werden. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass BP sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg unter Beteiligung von p53 aktiviert^{7,73,74,75}. Die BP-abhängige Aktivierung von p53 konnte ebenfalls in Adenokarzinomzellen der menschlichen Lunge und in murinen Fibroblasten nachgewiesen werden⁷⁶.

In HepG2 Zellen konnte gezeigt werden, dass die durch BP-7,8-Dihydrodiol ausgelösten Apoptose abhängig von dem AHR ist⁷⁷. Im Einklang mit dieser Studie konnte erst kürzlich in humanen Periodontium-Zellen eine AHR-abhängige Induktion von Apoptose durch BP-Exposition nachgewiesen werden¹⁰. Weiterhin wurde in Hepatozyten eine pro-apoptotische Wirkung ausgehend vom AHR auf den CD95-abhängigen Apoptoseweg beobachtet⁷⁸. Diese Beobachtungen lassen auf einen Verbindung zwischen AHR-vermittelten Signalwegen und BP-induzierter Apoptose schließen.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die Datenlage hinsichtlich der Induktion von Apoptose durch BP zum Beginn der hier vorliegenden Arbeit unklar und teilweise sehr widersprüchlich war. Eindeutige pro-apoptotische Effekte wurden nur in wenigen Zelllinien gefunden. Die BP-abhängige Induktion von Apoptose in der Haut war kaum untersucht. Daher bestand ein großer Bedarf und ein großes Interesse an entsprechenden Untersuchungen zur BP-vermittelten Induktion von Apoptose in der menschlichen Haut.

1.4 Funktion des Arylhydrocarbon Rezeptors (AHR) in der menschlichen Haut

Der evolutionär hoch konservierte und ubiquitär auftretende AHR bindet eine Vielzahl von Liganden unterschiedlichen Ursprungs und Struktur: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), halogenierte Biphenyle, BP und andere mutagene PAK, wie 3-Methylcholanthren und Dibenzo[*a,l*]pyren. Der AHR induziert über die Metabolisierung einiger seiner Liganden deren toxische Effekte. Neben den Liganden kann auch UVB-Licht durch Bildung endogener Photoprodukte die AHR-Aktivität beeinflussen: verschiedene Photoprodukte des Tryptophans - eine der am stärksten UVB-absorbierenden Aminosäuren - weisen eine AHR-Affinität auf⁷⁹.

In cytoplasmatischer Form liegt der Rezeptor in einem Komplex aus Heat Shock Protein 90 (HSP90), Hepatitis B Virus X-Associated Protein 2 (XAP2), Protein 23 (p 23) und der assoziierten Tyrosin-Kinase cSrc gebunden vor⁸⁰. Die Aktivierung des AHR-Signalweges erfolgt durch Bindung des Liganden an die Ligandenbindungsstelle des AHR. Nach der Ligandenbindung untergeht der AHR eine Konformationsänderung. Dies ermöglicht dann die Translokation des AHR in den Nukleus und die Dimerisierung mit dem AHR Nuclear Translocator (ARNT). Das Dimer bindet an sogenannte Xenobiotic-Responsive Elements (XREs), welche in der Enhancer Region von AHR-induzierbaren Genen liegen^{81,82}. Klassische Zielgene des AHR sind CYP1A1/1B1, verschiedene Phase II Enzyme sowie der AHR-Repressor⁸³. Neben dem klassischen AHR-Signalweg - der Liganden-vermittelten Translokation und der damit verbundenen Induktion der Zielgenexpression - unterliegen eine Reihe weiterer, funktionell unabhängiger Gene der Regulation des AHR. Dies ist abhängig von Organismus, Gewebe und Zelltyp.

1. Einleitung

So spielt der AHR eine Rolle bei der Regulation weiterer wichtiger physiologischer Funktionen, wie Inflammation, Differenzierung und Apoptose. Der AHR interagiert dabei mit dem Östrogen-Rezeptor-Signalweg⁸⁴, dem NF κ B-Signalweg⁸³, dem Wnt-related integration site (Wnt)-Signalweg⁸⁵ und mit verschiedenen MAP-Kinasen, wie c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und p38^{9,86}. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der AHR die Regulation des Zellzyklus beeinflussen kann: als Zielgene des AHR sind dabei die Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 von Relevanz⁸⁷. Der AHR interagiert mit dem Transkriptionsfaktor E2-Promotor binding factor (E2F), der für die Aktivierung von Zellzyklus-Genen sowie pro-apoptisch wirkender Gene verantwortlich ist und sowie mit dem Retinoblastoma-Protein (RB)⁸⁸.

Daher kann die Exposition gegenüber BP und die damit verbundene Aktivierung von AHR zu einer Vielzahl zellulärer Effekte führen. In Tierversuchen konnte Mitte der Neunziger Jahre anhand von AHR-defizienten Mäusen eine entscheidende Rolle des AHR in der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden^{89,90,91,92}. Die Mäuse wiesen, neben einem verringerten Lebendgewicht und einer erhöhten Apoptoserate der Parenchymzellen, multiple kardiovaskuläre, immunologische und dermatologische Defekte auf. Kalmes et al. wiesen mit Hilfe von AHR-defizienten HaCaT-Zellen einen Einfluss des AHR auf die Zellzykluskontrolle in Keratinozyten nach^{93,94}.

Ebenfalls belegt ist die Rolle des AHR in der Differenzierung und Funktionalität von Immunzellen und damit bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose oder Rheumatoider Arthritis^{95,96,97}.

Die Frage, ob eine Aktivierung des AHR allein ausreicht, um geschädigte Zellen in die Apoptose zu überführen, ist bislang nur unzureichend beantwortet worden. Park et al. konnten 2005 nachweisen, dass der AHR Hepatozyten für die CD95L-abhängige Apoptose sensibilisiert. Dabei fanden sich Hinweise, dass der AHR die Expression und Funktion von pro- und anti-apoptischen Proteinen reguliert, welche die Freisetzung von CytC kontrollieren und Apoptose auslösen⁷⁸. Puga et al. diskutierten die bisherigen, zum Teil widersprüchlichen Studien zur Rolle des AHR in der Apoptose. Sie kamen zu dem Fazit, dass die Aktivität des AHR die apoptotischen Signalwege auf eine Gewebe- und Zelltyp-spezifische Weise beeinflusst⁹.

1.5 Zielstellung der Arbeit

BP als starker Agonist des AHR kann unterschiedliche zelluläre Effekte auslösen, bedingt durch die metabolische Bildung toxischer Metabolite oder direkt über die Aktivierung des AHR.

Ziel dieser Arbeit war es, die Metabolisierung von BP in der Haut und die damit verbundenen Schäden an der DNA zu untersuchen. Es sollten darüber hinaus die zellulären Auswirkungen einer BP-Exposition auf die humane Haut genauer untersucht werden. Folgenden Fragestellungen sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden:

1. Findet eine effiziente dermale Metabolisierung von BP statt und sind die entstandenen Metabolite in der Lage genotoxische Schäden zu induzieren?

Diese Frage beinhaltet sowohl die Identifikation und Quantifizierung der wichtigsten BP-Metabolite als auch die Bestimmung genotoxischer Endpunkte. Der Metabolismus von BP sollte vergleichend in *ex vivo* Humanhaut, primären humanen Keratinozyten und *in vitro* 3D-Hautmodellen aufgeklärt werden. Dabei wurden unter anderem Full-Thickness-Modelle (Vollhaut-Modelle) mit Epidermis-Modellen verglichen, um die Rolle der Keratinozyten differenzierter betrachten zu können.

2. Was sind die zellulären Konsequenzen einer PAK-Exposition in der Haut, unter besonderer Berücksichtigung der Apoptose? Welche Rolle spielt der AHR bei diesen Vorgängen? Kommt es zu einer BP-abhängigen Induktion von Apoptose in der Haut? Kann BP darüber hinaus Hautzellen gegenüber physiologischen Apoptose-Induktoren wie CD95L und TRAIL sensibilisieren, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündlicher Hautkrankheiten spielen?

Diese Fragen sollten in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen untersucht werden. Um den Einfluss vom AHR genauer bestimmen zu können, wurde in dieser Arbeit mit AHR-Agonisten und einer AHR-defizienten HaCaT Zelllinie gearbeitet.

2. Ergebnisse

2.1. Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses

Henkler, F., *Stolpmann, K.*, & Luch, A. 2012)

Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses.

EXS, 101, 107-131

Dieser Review-Artikel gibt einen Überblick über die verschiedenen Metabolisierungswege der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) und den dabei entstehenden reaktiven Zwischenprodukten. Detailliert wird die damit verbundene Bildung von DNA-Addukten und die beteiligten DNA Reparaturmechanismen aufgezeigt. Darüber hinaus werden die durch PAK ausgelösten komplexen Vorgänge der DNA-Damage Response beschrieben.

Der Anteil von Frau Stolpmann an dieser Arbeit ist mit 30% einzustufen.

http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_5

2.2. Metabolic Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[*a*]pyrene

Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Hutzler, C., & Luch, A. (2012)

Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[*a*]pyrene.

Toxicol. Sci., 131(2), 351-359

In dieser Arbeit wird der Metabolismus von Benzo[*a*]pyren (BP) vergleichend in humaner Haut, kommerziell erhältlichen 3D-Hautmodellen und primären Keratinozyten untersucht. Verschiedene BP-Metabolite werden mittels LC-MS/MS identifiziert und quantitativ bestimmt. Ferner wird die Genotoxizität von BP und der BP-Metabolite mittels Comet-Assay untersucht. Frau Stolpmann hat die LC-MS/MS Methoden zur Quantifizierung der ausgewählten Verbindungen etabliert. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren dieser Arbeit. Die Etablierung und Durchführung des Comet-Assays erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren dieser Arbeit.

Der Anteil von Frau Stolpmann an dieser Arbeit ist mit 30% einzustufen.

<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfs316>

2.3. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Sensitises Human Keratinocytes for CD95L- and TRAIL-Induced Apoptosis

Stolpmann, K., Brinkmann, J., Salzmann, S., Genkinger, D., Fritsche, E., Hutzler, C., Wajant, H., Luch, A., & Henkler, F. (2012)

Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis.

Cell Death Dis., 3(9), 388

Diese Arbeit beschreibt die apoptotischen Effekte ausgewählter AHR-Liganden in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen. Ein pro-apoptotischer Crosstalk mit CD95L und TRAIL wird aufgezeigt und die Abhängigkeit dieses Effektes vom AHR mittels AHR-Knockdown Zellen nachgewiesen.

Von Frau Stolpmann wurden die Zytotoxizitätsassays, Realtime-PCR Untersuchungen, Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analysen und die Untersuchungen zur CytC-Freisetzung konzipiert und durchgeführt. Western-Blot Untersuchungen wurden von Frau Stolpmann gemeinsam mit den Ko-Autoren dieser Arbeit durchgeführt.

Der Anteil von Frau Stolpmann an dieser Arbeit ist mit 50% einzustufen.

<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2012.127>

Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis

K Stolpmann^{1,4}, J Brinkmann^{1,4}, S Salzmann², D Genkinger¹, E Fritsche³, C Hutzler¹, H Wajant², A Luch¹ and F Henkler^{*1}

In this study, we have analysed the apoptotic effects of the ubiquitous environmental toxin benzo[*a*]pyrene (BP) in HaCaT cells and human keratinocytes. Although prolonged exposure to BP was not cytotoxic on its own, a strong enhancement of CD95 (Fas)-mediated apoptosis was observed with BP at concentrations activating the aryl hydrocarbon receptor (AhR). Importantly, the ultimately mutagenic BP-metabolite, that is, (+)-*anti*-BP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), failed to enhance CD95-mediated cell death, suggesting that the observed pro-apoptotic effect of BP is neither associated with DNA adducts nor DNA-damage related signalling. CD95-induced apoptosis was also enhanced by β -naphthoflavone, a well-known agonist of the AhR that does not induce DNA damage, thus suggesting a crucial role for AhR activation. Consistently, BP failed to sensitise for CD95L-induced apoptosis in AhR knockdown HaCaT cells. Furthermore, inhibition of *CYP1A1* and/or *1B1* expression did not affect the pro-apoptotic crosstalk. Exposure to BP did not increase expression of CD95, but led to augmented activation of caspase-8. Enhancement of apoptosis was also observed with the TRAIL death receptors that activate caspase-8 and apoptosis by similar mechanisms as CD95. Together, these observations indicate an interference of AhR signalling with the activity of receptor-associated signalling intermediates that are shared by CD95 and TRAIL receptors. Our data thus suggest that AhR agonists can enhance cytokine-mediated adversity upon dermal exposure.

Cell Death and Disease (2012) 3, e388; doi:10.1038/cddis.2012.127; published online 6 September 2012

Subject Category: Experimental Medicine

Benzo[*a*]pyrene (BP) is regarded as a carcinogenic lead compound among the group of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). BP is a strong activator of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and a powerful mutagen.¹ Genotoxicity depends on its endogenous biotransformation into mutagenic intermediates, particularly the (+)-*anti*-BP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE). The latter metabolite is regarded as the ultimate carcinogen that triggers formation of bulky DNA adducts and subsequent mutations. Metabolism of BP is initiated by cytochrome *P*450-dependent monooxygenases (CYPs), especially *CYP1A1* (cytochrome *P*450 1A1) and *CYP1B1* (cytochrome *P*450 1B1),² resulting in the generation of a variety of metabolites. Besides BPDE, other metabolites are also of concern to human health. For example, oxidation of phenolic or catecholic intermediates can generate BP quinones.³ As H₂O₂ and superoxide anion radicals (O₂^{•-}) are side products of the corresponding reactions, oxidative stress is generated and might be further enhanced by consecutive redox cycles, which depend on endogenous enzymes and reduction equivalents.

The biotransformation of BP is regulated via AhR. This receptor is also activated by other xenobiotics, notably 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), halogenated biphenyls and other mutagenic PAHs, such as dibenzo[*a,h*]pyrene or 3-methylcholanthrene. In response to agonist binding, AhR translocates into the nucleus, where it associates with the AhR nuclear translocator (ARNT) and triggers transcription of target genes, including *CYP1A1* and *CYP1B1*, as well as several phase II enzymes (i.e., transferases). Thus, BP induces its own biotransformation via AhR. The relevance of endogenous ligands is still a matter of debate. However, there is growing evidence that the AhR protein affects additional physiological functions, besides its essential role in the biotransformation of xenobiotics.⁴ For example, AhR is proposed to link the adaptive immune response to environmental factors.⁵ It is also suggested to play an important role in autoimmunity.⁶ Notably, the structure of AhR is highly conserved and knockout mice show nonlethal developmental defects.⁷ Transcriptional activation of the xenobiotic response element (XRE) is not the only function of the AhR. It also

¹German Federal Institute for Risk Assessment, Department of Product Safety, Berlin, Germany; ²Division of Molecular Internal Medicine, Department of Internal Medicine II, University Hospital Wuerzburg, Wuerzburg, Germany and ³Institut für Umweltmedizinische Forschung GmbH, Department of Molecular Toxicology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

*Corresponding author: F Henkler, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Department of Product Safety, Thielallee 88-92, Berlin 14195, Germany. Tel: +49 30 18412 4931; Fax: +49 30 18412 4928; E-mail: Frank.Henkler@bfr.bund.de

⁴These authors contributed equally to this work.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor (AhR); CD95; apoptosis; benzo[*a*]pyrene; human keratinocytes; HaCaT cells

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; BP, benzo[*a*]pyrene; BPDE, (+)-*anti*-BP-7,8-diol-9,10-epoxide; β -NF, β -naphthoflavone; CD95, cluster of differentiation 95 (Fas); CD95L, CD95 ligand; *CYP1A1*, cytochrome *P*450 1A1; *CYP1B1*, cytochrome *P*450 1B1; e.v., empty vector; k.d., knockdown; NHEK, normal human epithelial keratinocyte; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; shRNA, small hairpin RNA; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand

Received 02.2.12; revised 24.7.12; accepted 24.7.12; Edited by A Stephanou

interacts with NF- κ B subunits as well as with the transcription factor E2F and was shown to affect several MAP kinases, including JNK and p38.⁸ AhR does further act as an ubiquitin ligase that triggers degradation of selected proteins,⁹ as, for instance, the oestrogen receptor.

Exposure of cells to BP can therefore induce multiple cellular effects that are either directly related to activation of the AhR or are due to the formation of toxic metabolites. Mutagenesis via BPDE is regarded as a carcinogenic risk factor to human health. Dependent on the magnitude of DNA lesions induced, genotoxicity can alternatively trigger apoptosis, as part of the DNA damage response. The apoptotic effects of BP have been observed in liver cells,^{10,11} in mammary carcinoma MCF-7 cells¹² as well as in lung cancer cells,¹³ but are not yet well defined. Intriguingly, BP has also been reported to enhance survival of injured cells. The overall capacity of BP to affect apoptosis thus remains enigmatic.

Here, we have analysed the pro-apoptotic effects of BP in human keratinocytes and HaCaT cells. These cells were used as model system to address the effects of dermal BP exposure that can occur via contact with PAH-contaminated synthetic materials. For example, tool handles, watch bands, plastic components of shoes and textile flockings have been recognised as potential sources for dermal exposure, besides the more established dietary and inhalation routes. Although BP does induce tumours in mouse skin, comparatively little is known about its biological effects in humans. Dermal expression and induction of the enzymes crucial for its metabolic conversion, including CYP1A1, CYP1B1 or CYP3A4, has been demonstrated. Recently, we have shown that BP is efficiently metabolised in human skin, keratinocytes as well as in *in vitro* 3D skin models.¹⁴ Here we show that, although direct apoptotic effects were only marginal, a strong enhancement of physiological inducers of apoptosis can be noticed. BP sensitised both keratinocytes and HaCaT cells toward CD95L (cluster of differentiation 95 (Fas) ligand)- and TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis at concentrations that are likely to be reached in exposed human skin by contacts to contaminated materials, according to exposure models currently applied in risk assessment. CD95L and TRAIL are expressed by infiltrating immune cells and play an important role in the pathology of inflammatory skin diseases, especially in eczematous dermatitis.¹⁵ Unexpectedly, the BP-mediated enhancement of CD95L- and TRAIL-induced cell death was not related to genotoxic metabolites of BP, but dependent on activation of AhR. This became evident from experiments using the nongenotoxic AhR agonist β -naphthoflavone (β -NF) and variant HaCaT cell lines in which AhR expression was downregulated via small hairpin RNA (shRNA).

Results

Benzo[a]pyrene augments CD95-mediated apoptosis in keratinocytes. Dermal up-take of BP is a major route of exposure, but comparatively little is known about the BP-mediated adverse effects in human skin. We observed a strong activation of the AhR in human keratinocytes, leading to an increased expression of CYP1A1 at both RNA

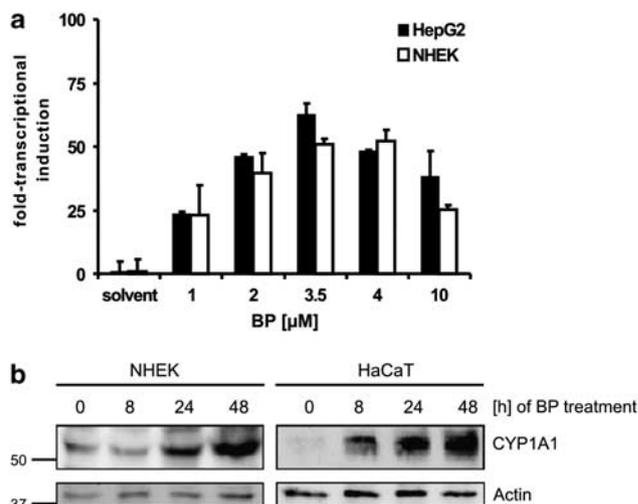


Figure 1 Induction of CYP1A1 by BP in NHEKs and HaCaT cells. (a) Transcriptional induction of the *CYP1A1* gene by BP: transcripts of *CYP1A1* were measured by real-time PCR in normal (primary) human epidermal keratinocytes (NHEKs) and HepG2 cells after exposure to BP for 6 h. Control cells were treated with solvent only (0.1% DMSO). Total RNA was isolated and real-time PCR analysis was performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as fold induction of transcripts. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (b) Induction of CYP1A1 protein levels by BP: cells were treated with 3.5 μ M BP as indicated and analysed by western blotting. Molecular size markers are shown on the left in kDa

and protein levels (Figures 1a and b). Maximal transcriptional induction was observed at 3.5 μ M BP. As exposure levels of $>3 \mu$ M are feasible in human skin after contact with contaminated materials, we usually used a standard concentration of 3.5 μ M BP for everything further.

To address the capacity of BP to promote apoptosis in human skin, cultures of normal (primary) human epidermal keratinocytes (NHEKs) and HaCaT cells were treated with 3.5 and 10 μ M BP (Figure 2). Cell viability was only moderately affected as determined by WST assay. As this method does not distinguish apoptotic and growth-arrested cells, induction of an apoptotic phenotype was directly assayed by annexin V staining. No indication for apoptosis was found in HaCaT cells. Treatment of NHEKs with 10 μ M BP led to a 20% population of annexin V-positive cells after 48 h. However, only a marginal induction of annexin V-positive cells was observed after 24 h or in cells that had been treated with 3.5 μ M BP. In contrast to cultured lung and liver cells,^{10,11,13} where BP-induced cell death was observed, in keratinocytes these effects are comparatively weak and not apparent under conditions where an optimal induction of AhR target genes is achieved. This led to the further question of whether BP can enhance physiological inducers of apoptosis, especially death receptors and their cytotoxic ligands that play a pivotal role in inflammatory skin diseases, such as CD95L.^{15,16}

To analyse whether BP enhances the pro-apoptotic effects of CD95L, we first analysed CD95L-mediated apoptosis in BP-pretreated HaCaT cells revealing strong sensitisation over a wide range of concentrations (Figure 3a). No cell death was apparent in the presence of the pan-caspase inhibitor z-VAD (Figure 3a), indicating that cell death was due to the activation of caspases. Secondly, we demonstrated a synergistic

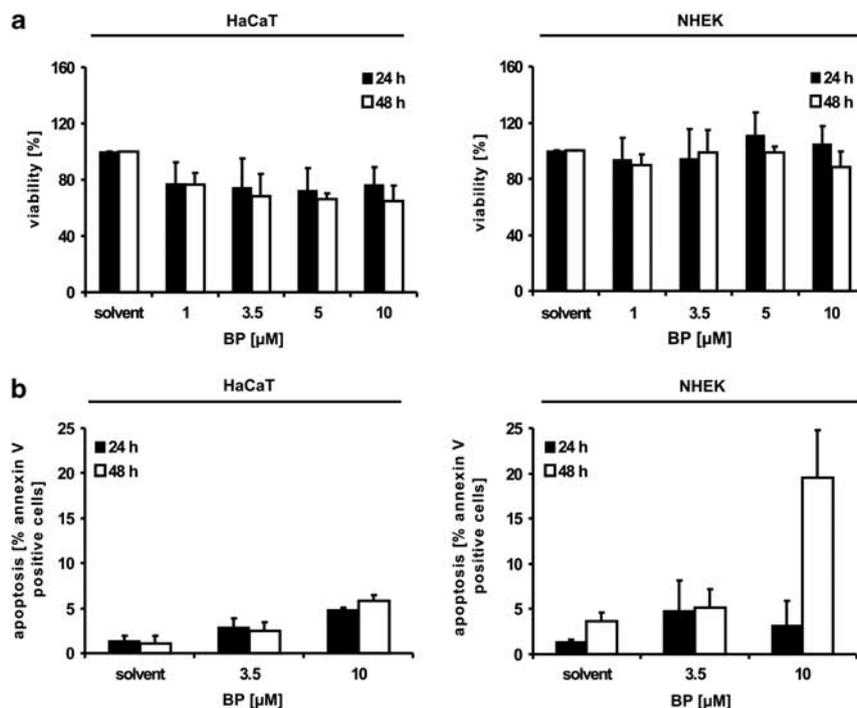


Figure 2 BP does not induce apoptosis in HaCaT cells and NHEKs at exposure levels that trigger optimal induction of CYP1A1. (a) Cell viability and proliferation were determined by WST assays in the indicated cells after treatment with different concentrations of BP for 24 or 48 h. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (b) Quantification of the apoptotic cell population by annexin V staining and flow cytometric analyses after BP treatment of cells for 24 or 48 h. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments

pro-apoptotic effect under conditions where neither CD95L nor BP alone is capable of inducing apoptosis in HaCaT cells or NHEKs. When applying 2.5 ng/ml oligomerised CD95L for 24 h to these cells, up to 30% annexin-positive cells were observed after pretreatment with BP, but not in control experiments (Figures 3b and c). Similarly, an enhanced release of cytochrome *c* was observed in response to a combined application of BP and CD95L (Figure 3d). Consistent with these findings, a significant decrease in cell viability was observed in parallel (data not shown). These data demonstrate that BP can amplify effects of endogenous activators of apoptosis in human keratinocytes, although it failed to act as a direct inducer of apoptosis in human keratinocytes.

Enhancement of CD95-mediated apoptosis by AhR agonists do not depend on the formation of mutagenic metabolites.

One possibility to explain how BP enhances CD95-mediated apoptosis refers to the mutagenic properties of its metabolites. According to this model, DNA adducts might trigger a DNA damage response, thus generating an intrinsic signal to cooperate with death receptor-induced apoptosis by p53-mediated upregulation of CD95. This hypothesis was however not supported in our investigation. When the ultimate DNA-damaging metabolite BPDE was directly applied to HaCaT cells, this compound failed to promote CD95L-induced apoptosis (Figure 4). We also investigated other metabolites of BP that had been previously identified in human skin by LC-MS analysis.¹⁴ Only BP, but none of the other tested metabolites, was capable of initiating a pro-apoptotic crosstalk with CD95L (Figure 4).

This finding suggested that the observed pro-apoptotic effects of BP are not related to induction of DNA damage in cultured skin cells. Because activation of AhR is the initial cellular effect of BP, we next analysed whether this receptor plays a role in the enhancement of CD95-mediated apoptosis. We therefore tested whether alternate AhR agonists trigger similar effects as BP with respect to CD95L-induced apoptosis. We applied β -NF in these experiments, because this compound does not trigger DNA adducts or any other genotoxic effects in eukaryotic cells. The β -NF is a comparably strong activator of AhR signalling like BP, as indicated by transcriptional upregulation of the *CYP1A1* gene (Supplementary Figure 1). Notably, β -NF revealed a comparable potency as BP to enhance CD95L-dependent apoptosis (Figure 5). Our data suggest that an augmented CD95-mediated apoptosis in BP-pretreated keratinocytes is based on the activation of the AhR and not related to the intrinsic toxicity of the various compounds or their metabolites.

A crucial role of the AhR for BP-mediated enhancement of CD95-induced apoptosis was further demonstrated in HaCaT cells, in which AhR expression was permanently downregulated by RNA interference (Figure 6).¹⁷ In contrast to control cell, which carry the parental (empty) lentiviral expression vector (e.v.), no AhR protein was detectable in the knockdown (k.d.) cells, indicating an efficient downregulation (Figure 6a). Preincubation of cells with BP or β -NF failed to enhance the apoptotic capacity of CD95L in AhR-deficient cells (Figure 6b). As expected, synergistic apoptotic effects between AhR agonists and CD95L could be confirmed in simultaneous experiments using AhR-proficient (e.v.) control

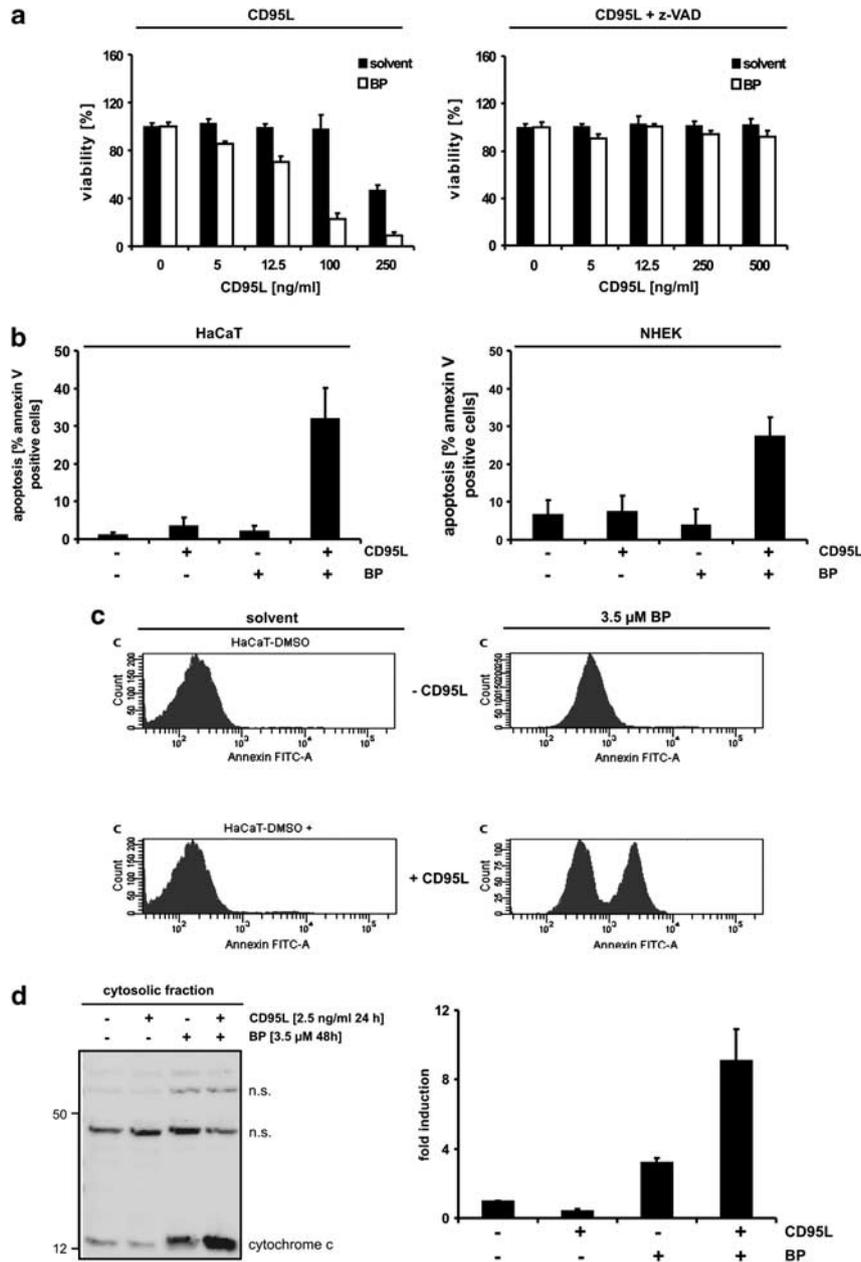


Figure 3 BP sensitises HaCaT cells and NHEKs for CD95L-induced apoptosis. (a) HaCaT cells were pretreated with 3.5 μ M BP (white bars) or 0.1% DMSO (black bars) for 48 h and subsequently exposed to different concentrations of CD95L for further 24 h with or without 20 μ M pan-caspase inhibitor z-VAD (right). Cell viability was determined by crystal violet staining. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (b and c) Cells were pretreated with 3.5 μ M BP or solvent (0.1% DMSO) for 48 h and subsequently exposed to 2.5 ng/ml CD95L for 24 h. The populations of apoptotic cells were determined by annexin V staining and flow cytometric analyses. Data from three independent experiments are summarised in (b), and images obtained in a typical experiment with HaCaT cells are shown in (c). (d) Induction of cytochrome *c* release in CD95L/BP-treated cells was determined by western blotting as described in Materials and Methods. The increase of the cytosolic fraction was quantified by densitometry and average based on three independent experiments in (left panel). The columns shown in the right panel correspond to the bar diagram shown in the lower panel. Molecular size markers are shown on the left in kDa

cells. The magnitude of this crosstalk was comparable to the effects seen before in keratinocytes and wild-type HaCaT cells (cf., above). From this we conclude that the pro-apoptotic crosstalk between CD95L and AhR agonists depends on AhR activation. As AhR acts as a transcription factor, an important question relates to putative target genes that might affect apoptosis. Therefore, we have analysed whether expression of CD95 is affected in NHEK and in wild-type or

AhR-deficient HaCaT cells. Our data show that expression levels of CD95 are not affected during the course of 48 h treatment, although a minute transcriptional induction (1.3–1.5-fold) was observed (Supplementary Figure 2). These results were also confirmed by FACS analysis (Supplementary Figure 3). Furthermore, exposure of NHEK to BP did not lead to a detectable p53 expression (data not shown), which might otherwise account for an indirect upregulation of CD95.¹⁸ Taken

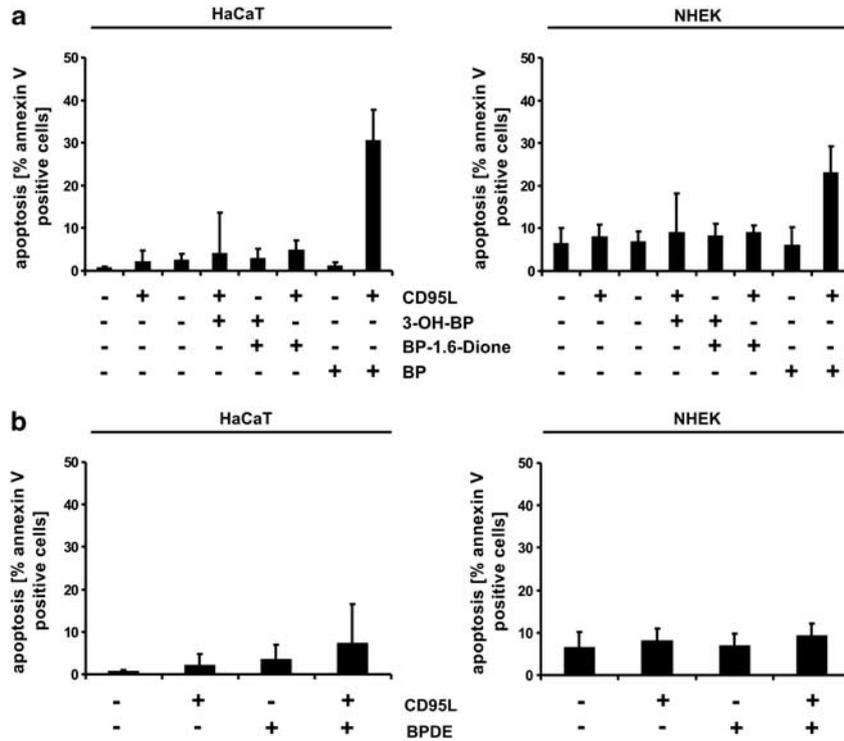


Figure 4 Pro-apoptotic crosstalk between CD95L and BP is not triggered by BP metabolites. (a and b) Cells were pretreated with 3.5 μ M BP, 2 μ M 3-OH-BP or 2 μ M BP-1.6-dione (a), 6 μ M BPDE (b) or solvent (0.1% DMSO) for 48 h and subsequently exposed to 2.5 ng/ml CD95L for further 24 h. The populations of apoptotic cells were determined by annexin V staining and flow cytometric analyses. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments

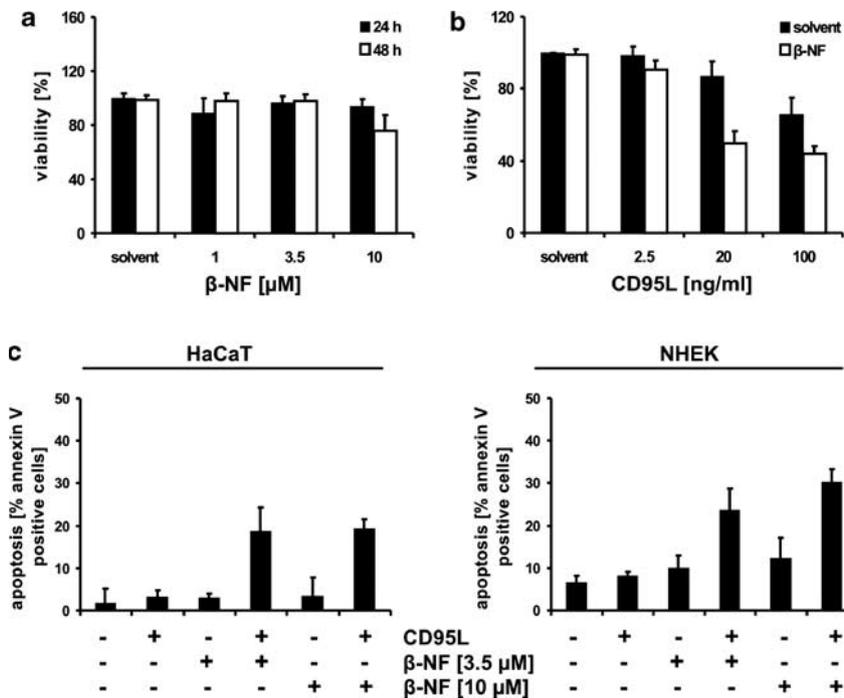


Figure 5 Sensitisation of HaCaT cells and NHEKs for CD95L-induced apoptosis by the non-genotoxic AhR agonist β -naphthoflavone (β -NF). (a) Cell viability in HaCaT cells was determined by crystal violet staining after treatment with β -NF for 24 and 48 h. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (b) HaCaT cells were pretreated with 10 μ M β -NF (white bars) or 0.1% DMSO (black bars) for 48 h and subsequently exposed to CD95L as indicated. Cell viability was then determined by crystal violet staining. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (c) β -NF sensitises HaCaT cells and NHEKs for CD95L-induced apoptosis. Cells were pretreated with β -NF as indicated or with solvent (0.1% DMSO) for 48 h and subsequently exposed to 2.5 ng/ml CD95L for further 24 h. The populations of apoptotic cells were determined by annexin V staining and flow cytometric analyses. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments

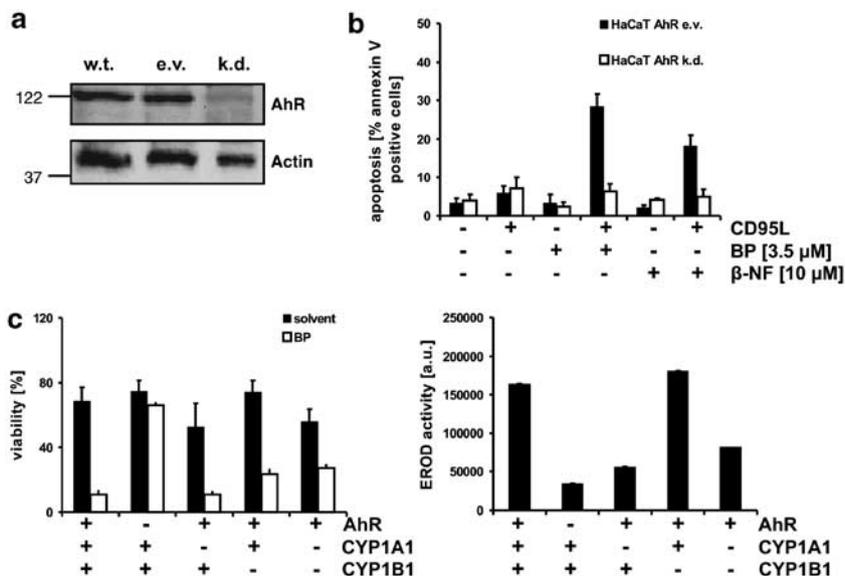


Figure 6 AhR agonists fail to promote apoptosis in AhR-deficient cells. (a) Expression of AhR in AhR-deficient (knockdown (k.d.)) HaCaT cells compared with wild-type (w.t.) and empty vector (e.v.) HaCaT cells, analysed by western blotting. Molecular size markers are shown on the left in kDa. (b) Sensitisation of HaCaT cells for CD95L-induced apoptosis depends on the presence of a functional AhR protein. AhR e.v., parental (empty) control vector (black bars); AhR k.d., shRNA AhR k.d. (white bars). Cells were pretreated with either 3.5 μM BP or 10 μM β-NF for 48 h and subsequently exposed to 2.5 ng/ml CD95L for further 24 h. The populations of apoptotic cells were determined by annexin V staining and flow cytometric analyses. Values represent means ± S.D. of three independent experiments. (c) HaCaT cultures were transfected using HiPerfect (Qiagen, Hilden, Germany) and predesigned siRNAs against AhR (Applied Biosystems), CYP1A1 (Qiagen), CYP1B1 (Applied Biosystems) and a mixture of the CYP1A1 and CYP1B1 siRNAs. Cells were subsequently exposed to 3.5 mM BP for 48 h, followed by an exposure to 200 ng/ml TRAIL until significant cell death was observed (~2–3 h). Cell viability was determined using crystal violet and compared with transfected cells not exposed to TRAIL. A control siRNA from Applied Biosystems was included as experimental control (right). Inhibition of EROD (CYP1A) activities after AhR, CYP1A1 and CYP1B1 k.d. was demonstrated for transfected HaCaT populations in parallel

together, our data do not support transcriptional upregulation of CD95 as underlying mechanism for the pro-apoptotic crosstalk with AhR agonists.

AhR agonists cooperate with both CD95L and TRAIL to promote apoptosis. To characterise the putative mechanism that leads to enhanced apoptosis in response to AhR activation, we analysed next whether this effect is limited to CD95. TRAIL was used in further experiments, because it was previously demonstrated to induce apoptosis in HaCaT cells¹⁹ via two receptors (TRAILR1 and TRAILR2). These receptors belong to the death receptor subgroup of the TNF receptor superfamily and thus induce cell death by mechanisms closely related to CD95. Pretreatment of wild-type and AhR-proficient HaCaT variants with BP did strongly enhance TRAIL-induced apoptosis, indicating that the cytotoxic capacity of AhR activation is not specifically associated with CD95 (Figure 7a). These data suggest an involvement of downstream signalling intermediates that are shared by CD95 and the TRAIL death receptors in the pro-apoptotic crosstalk with AhR agonists. These effects were again completely inhibited by the pan-caspase inhibitor z-VAD, which was applied in control experiments. In contrast to AhR-proficient cells, the corresponding AhR-deficient HaCaT variants were protected from TRAIL-induced apoptosis after sensitising with BP (Figures 7b and c). Consistent with these data, simultaneous application of the inhibitory AhR antagonist α-NF to AhR-proficient HaCaT cells did also abolish the capacity of BP to enhance death receptor-induced apoptosis (Supplementary Figure 4).

Pro-apoptotic effects of AhR are independent from transcriptional induction of CYP1 enzymes and occur in both undifferentiated and differentiating keratinocytes. We have analysed next whether the pro-apoptotic crosstalk between death receptors and AhR agonists depends on classical AhR target genes, especially *CYP1A1* and *1B1*, which play important roles in oxidative biotransformation of xenobiotics. Transient downregulation of AhR using independent siRNAs confirmed its crucial importance for enhanced death receptor-mediated apoptosis, consistent with our previous observations in stable k.d. cells. Inhibition of both CYP enzymes was ascertained at a functional level in all transfected cell populations by EROD assays (Figure 6c). In contrast to AhR, inhibition of both CYP1A1 and 1B1 did not affect the capacity of BP to enhance TRAIL-induced apoptosis (Figure 6c). We conclude that this effect neither depends on oxidative metabolism of endogenous or xenobiotic CYP1 substrates nor on secondary genotoxic injuries. Again, this observation confirms our finding that BP metabolites do not sensitise cells for apoptosis.

TRAIL has previously been shown to induce cell death in dividing NHEKs. Differentiating NHEKs, however, displayed decreased expression of TRAIL receptors and TRAIL-induced apoptosis.²⁰ We have therefore analysed whether the apoptotic crosstalk between TRAIL and AhR agonists was affected by keratinocyte differentiation. In our experiments, differentiation was induced by growth factor withdrawal and confirmed by increased expression of keratins 1 and 10 and involucrin (Supplementary Figure 5). Annexin V staining demonstrated sensitising effects of BP on TRAIL-induced

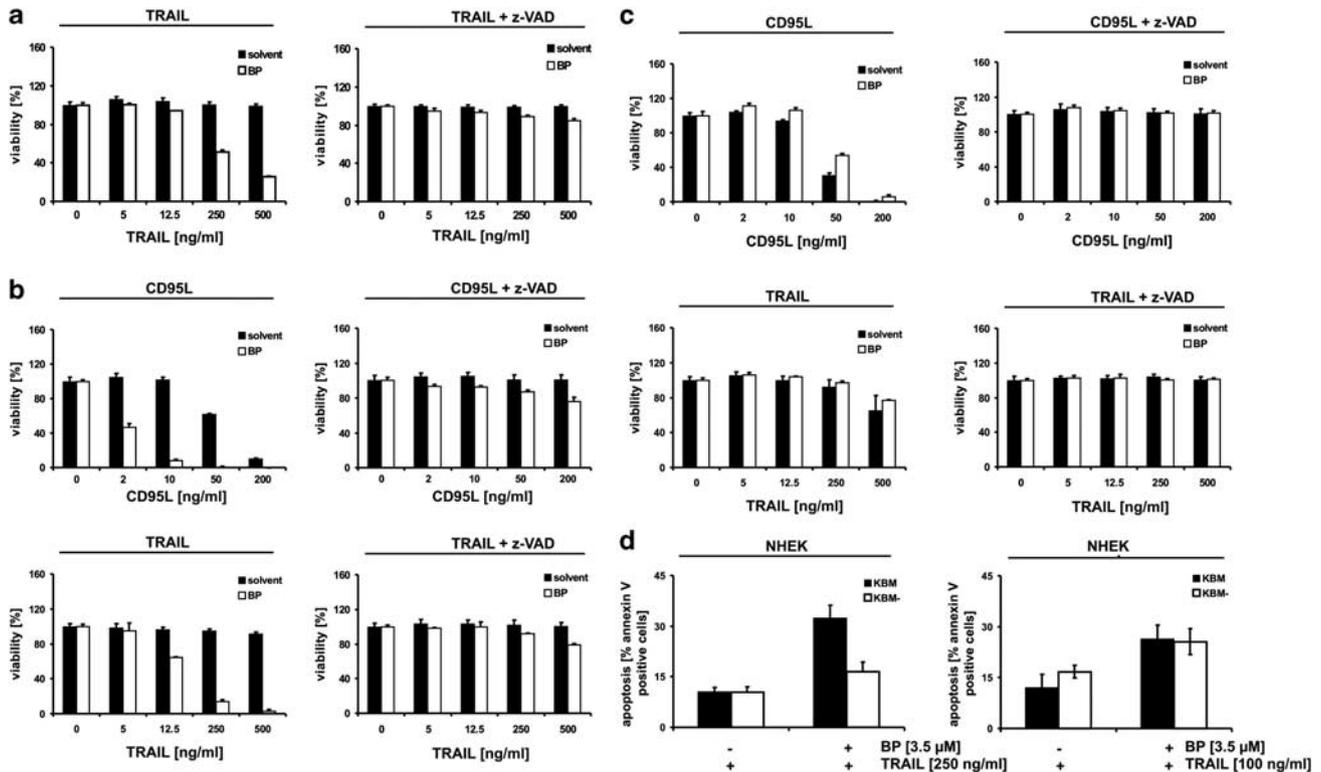


Figure 7 AhR-dependent enhancement of death receptor-mediated apoptosis. (a) HaCaT cells were pretreated with 3.5 μ M BP (white bars) or 0.1% DMSO (black bars) for 48 h and subsequently exposed to different concentrations of TRAIL for further 24 h with or without 20 μ M pan-caspase inhibitor z-VAD (right). Cell viability was then determined by crystal violet staining. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (b) HaCaT AhR parental (empty) control vector cells were pretreated with 3.5 μ M BP (white bars) or 0.1% DMSO (black bars) for 48 h and subsequently exposed to different concentrations of CD95L or TRAIL for further 24 h with or without 20 μ M pan-caspase inhibitor z-VAD (right). Cell viability was then determined by crystal violet staining. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (c) HaCaT shRNA AhR k.d. cells were pretreated with 3.5 μ M BP (white bars) or 0.1% DMSO (black bars) for 48 h and subsequently exposed to different concentrations of CD95L or TRAIL for further 24 h with or without 20 μ M pan-caspase inhibitor z-VAD (right). Cell viability was then determined by crystal violet staining. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments. (d) Sensitisation of undifferentiated (KBM-) and differentiating (KBM-) NHEKs for TRAIL-induced apoptosis: to trigger differentiation, keratinocytes were switched to growth supplement deprived KBM- medium or maintained in KBM- medium for 24 h. Expression of distinct differentiation markers was confirmed by real-time PCR (Supplementary Figure 5). Both populations were pretreated with 3.5 μ M BP for 48 h and subsequently exposed to 250 ng/ml (left) or 100 ng/ml (right) TRAIL until signs of apoptosis were observed by light microscopy. Proportions of apoptotic cells were determined by annexin V staining and flow cytometric analyses. Values represent means \pm S.D. of three experiments

apoptosis in both undifferentiated and differentiating cells, but this effect was less apparent in the second population (Figure 7d). Furthermore, differentiating keratinocytes displayed decreased membrane expression of TRAIL receptors 1 and 2. However, AhR agonists did not affect expression of these receptors in both HaCaT cells and dividing keratinocytes, thus excluding altered receptor levels as putative mechanism (Supplementary Figure 3).

We have further investigated the expression of cytokines in the HaCaT model, including endogenous CD95L, TRAIL, interferon- γ (INF- γ) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) (Supplementary Figure 6). Although some analysed factors displayed altered expression levels upon BP or β -NF exposure, none of these patterns was consistent for explaining the comparable sensitisation of HaCaT (e.v.) cells by both agonists and the lack of sensitisation in AhR k.d. cells. Exposure to BP and subsequently TRAIL did heavily induce (\sim 700-fold) expression of several pro-apoptotic and inflammatory molecules, including CD95L and INF- γ , which was

only observed in cultures showing markedly increased cell death (data not shown). This finding putatively reflects a secondary effect in the process of apoptosis itself.

Apoptotic crosstalk between BP and death receptors involves enhanced processing of caspase-8.

Activation of death receptors triggers recruitment of FADD and subsequent processing of caspase-8. In contrast to caspase-3, which integrates multiple endogenous and extracellular stimuli, caspase-8 is specifically activated within the death receptor-induced signalling complex (DISC). To test whether AhR agonists promote apoptosis at the level of receptor complexes, we have investigated processing of pro-caspase-8 by western blotting (Figure 8). In these experiments, varying concentrations of CD95L and TRAIL were applied and adopted to cell viability tests to assure an optimal enhancement of apoptosis by BP. A strongly enhanced formation of the pro-caspase-8 cleavage products (p43/41 and p18) was observed after 8 h in HaCaT cells that

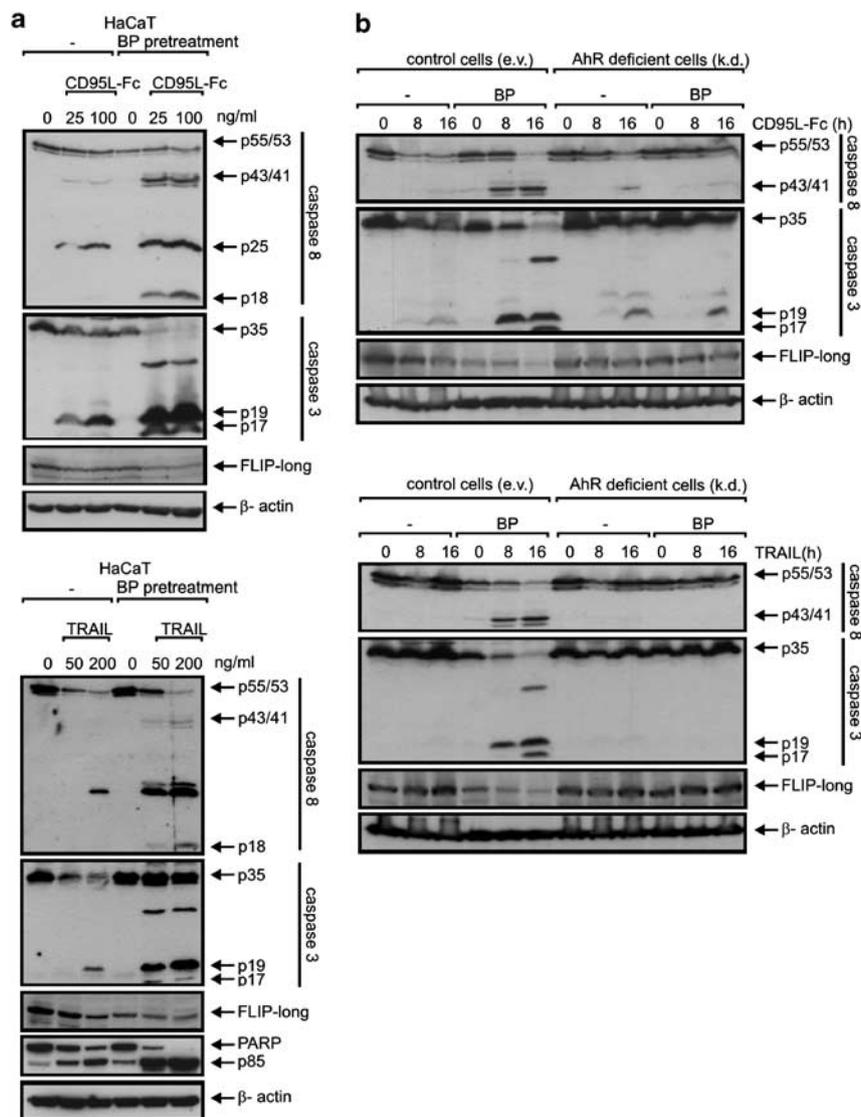


Figure 8 BP promotes activation of caspase-8 and caspase-3 in AhR-proficient but not in AhR-deficient cells. **(a)** HaCaT cells were pretreated with 3.5 μ M BP or 0.1% DMSO for 48 h, subsequently exposed to indicated concentrations of CD95L (upper panel) or TRAIL (lower panel) and analysed by western blotting. Caspase cleavage products, FLIP long and actin are indicated. In addition, PARP cleavage was analysed in the TRAIL experiment. **(b)** HaCaT parental (empty) control vector cells (e.v.) and HaCaT shRNA AhR knockdown cells (k.d.) were pretreated with 3.5 μ M BP or 0.1% DMSO for 48 h, subsequently exposed for different time intervals to 20 ng/ml of CD95L-Fc (upper panel) or 100 ng/ml TRAIL (lower panel) and analysed by western blotting. Caspase cleavage products, FLIP long and actin are indicated

had been pretreated with BP (Figure 8a). As expected, an equivalent processing pattern was found for the downstream effector caspase-3. Processing of either pro-caspase-8 or pro-caspase-3 in response to TRAIL was only observed in cells that had been pretreated with BP (Figure 8a). As the pro-apoptotic effect of BP involves enhanced processing of pro-caspase-8, the observed crosstalk between BP and CD95L or TRAIL is expected to occur at the receptor complex level.

Next, we analysed whether enhanced processing of pro-caspase-8 and -3 was dependent on AhR, using again the variant HaCaT k.d. cells and the corresponding e.v. control cells (Figure 8b). Consistent with the functional data on apoptosis induction and our findings in wild-type HaCaT cells,

an enhanced processing of both pro-caspases was exclusively observed in the control (AhR-proficient cells) cell line and only after preincubation with BP (Figure 8b). In contrast, the AhR-deficient cells were again protected, indicating that AhR signalling is required for the processing of both caspase precursors.

Discussion

Transcriptional induction of metabolising enzymes remains a central function of AhR function, despite a much wider spectrum of activities that had been recognised in recent years. However, oxidative biotransformation is always linked to generation of reactive intermediates that might lead to

cellular injuries. Several AhR agonists, including BP, trigger adverse effects, including formation of DNA adducts or induction of oxidative stress. A tight regulation is therefore required to limit such adverse effects at the cellular level. Importantly, prolonged activation and nuclear translocation of AhR induces ubiquitination and subsequent degradation of the receptor itself,²¹ thus retaining the capacity of AhR to induce CYP1A monooxygenases and trigger oxidative biotransformation of toxicological relevant xenobiotics. Intriguingly, although AhR can act as ubiquitin E3 ligase, no auto-ubiquitination has yet been described in the literature. AhR forms an atypical E3 complex that mediates proteasome-dependent degradation of defined substrates, notably steroid receptors, including oestrogen receptors α and β , as well as the androgen receptor.⁹ Besides these specific E3 ligase activities, activated AhR might also induce ubiquitination of alternate target proteins. For example, the long isoform of FLIP, an inactive homologue of caspase-8^{22,23} was found to be decreased in BP-treated cells (Figure 8). On the other hand, chemical inhibition of the proteasomal activity did not exert any effect on the pro-apoptotic functions of BP-activated AhR (Supplementary Figure 7). Therefore, the pro-apoptotic function of AhR reveals unrelated to its E3 ubiquitin ligase activity. Alternatively, AhR activation might inhibit expression of FLIP, which is partly controlled by NF- κ B,²⁴ or regulate other target genes that remain to be characterised.

A further mechanism to limit putative mutagenic effects as consequence of excessive CYP activation might involve regulation of cell cycle progression and apoptosis. In fact, prolonged activation of AhR led to G1 phase cell cycle arrest in serum released mouse liver.²⁵ It was proposed that CYP1A1 removes putative endogenous ligands, leading again to an inactivation of this receptor. In contrast, cell cycle arrest is maintained in the presence of stable xenobiotic ligands, such as TCDD.²⁵ On the other hand, there is only limited evidence that activated AhR is sufficient to enhance elimination of potentially injured cells via apoptosis. Sustained AhR activity via a constitutively active mutant led to inflammation,²⁶ as well as tumour promotion.²⁷ This is consistent with our data, showing no significant apoptosis induction by BP in keratinocytes. However, the physiological context is changed when cells are exposed to apoptotic stimuli, as it can occur during inflammatory skin diseases. In human skin, death receptors, especially CD95, play a pivotal role in inflammatory diseases,²⁸ such as eczematous dermatitis. Initially, apoptosis is only triggered in few keratinocytes by CD95L that is expressed by infiltrating T cells.²⁹ Enhanced apoptosis by chemical exposures could thus disproportionately increase the overall tissue damage, thereby modulating the pathology of inflammatory diseases. Notably, CD95-induced apoptosis plays a pivotal role in toxic epidermal necrolysis (TEN), a rare skin disease that is also affected by exposures to drugs and chemicals.³⁰ The pathology of TEN is marked by excessive apoptosis and can be blocked by antagonising CD95-specific antibodies.³¹

Our data indicate that AhR agonists can sensitise keratinocytes for death receptor-induced apoptosis, independently from putative genotoxic metabolites that can be formed from subsequent biotransformation. This finding is in agreement with other data,³² showing that hepatic mouse AhR knockout

cells as well as fibroblasts are less susceptible to CD95-mediated apoptosis when compared with the corresponding reconstituted cells. Our data argue that apoptosis is a mechanism to prevent prolonged AhR signalling especially in cells that had been exposed to cytotoxic cytokines. The precise molecular mediators of AhR agonists to enhance receptor-induced apoptosis remains to be identified, but could involve transcriptional control of putative AhR target genes. Apoptosis-inducing ligands, especially CD95L, have been shown to induce proinflammatory cytokines and signalling in keratinocytes^{34–37} and could potentially be affected by AhR signalling. In our study, however, we did not find any evidence for altered cytokine expression levels contributing to the pro-apoptotic effects of AhR described here. However, we provide evidence that DISC, and especially caspase-8, is a primary target for the enhancement of apoptosis by AhR agonists. Altogether, our results suggest that receptor-induced apoptosis can be modulated by environmentally relevant AhR agonists such as BP, the carcinogenic lead compound from the class of PAHs.

Materials and Methods

Reagents. BP and β -NF were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). BPDE, BP-3-phenol and BP-1,6-dione were obtained from NCI Chemical Carcinogen Reference Standards Repository, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA. Liquor Carbonis Detergens was obtained from Caesar & Loretz (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Germany). Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody was purchased from Sigma-Aldrich (F3165).

Cell culture. The human keratinocyte cell line HaCaT was cultured in DMEM containing L-glutamine (2 mM), 10% fetal calf serum (v/v) and penicillin/streptomycin (100 U/ml). Only cells before passage no. 55 were used in this study. Lentiviral transduced HaCaT cells, containing either shRNA sequences for AhR silencing or nonsilencing, are described elsewhere.¹⁷ Primary human keratinocytes (i.e., NHEKs) were isolated from foreskin tissue samples by overnight trypsin digestion. The culture medium was a 3 : 1 mixture of Ham's F-12 medium (L-glutamine (2 mM) and penicillin/streptomycin (100 U/ml)) and DMEM (low glucose (1 g/l), L-glutamine (8 mM) and penicillin/streptomycin (100 U/ml)), supplemented with adenine, insulin, fetal calf serum, hydrocortisone, epidermal growth factor and forskoline. Cell culture dishes were coated with collagen (2 mg/ml) diluted to 10% (v/v) in sterile water for 30 min at 37°C and then washed twice with PBS before cell culture. Alternatively, NHEKs were cultured to confluence in Keratinocyte Growth Medium 2 (KBM, PromoCell, Heidelberg Germany) on noncoated cell culture plastic. Differentiation was triggered by withdrawal of all supplements, except bovine pituitary extract and CaCl₂, 24 h before the start of experiments.

Cytotoxicity assay. BP and β -NF stock solutions were prepared in DMSO at a final concentration of 10 mM. Working concentration (3.5–10 μ M) of BP, as well as of applied metabolites, had been verified by LC-MS/MS (data not shown). Compound-dependent cytotoxicity in cell lines and NHEKs was evaluated with WST assays and crystal violet staining according to Scaffidi *et al.*²² Cells were plated at a density of 2×10^4 cells per cm² and grown overnight. Culture medium was replaced before treatment with BP or other indicated reagents. The final concentration of the solvent did not exceed 0.1% (v/v) in the culture medium. The water-soluble dye WST-1 was added and absorbance was measured in a Tecan (Männedorf, Switzerland) microplate reader at 450 nm.

RNA analysis. RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and cDNA was prepared using either the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). Real-time PCR was carried out using the pre-designed TaqMan assays Hs00153120_m1, Hs00236330_m1 and Hs99999903_m1, or using a SYBR green assay (5Prime, Hamburg, Germany) with the primers listed in Supplementary Table 1. Actin or HPRT were used as reference genes.

Western blot analysis. Cells were lysed on ice in RIPA buffer containing 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal and 0.25% sodium deoxycholate, with protease inhibitor cocktail (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Equal amounts of proteins were applied to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted according to the manufacturer's instructions. Antibodies against the following proteins were used: CYP1A1/1B1 1 : 200 (sc-20772, sc-32882; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), cytochrome *c* 1 : 200 (556433; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), AhR 1 : 200 (sc-8087; Santa Cruz Biotechnology), caspase-8 (sc-6136; Santa Cruz Biotechnology); caspase-3 (no. 9662; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and FLIP Alx-804-428 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

Primary antibody probed blots were visualised with appropriate horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) using enhanced chemiluminescence (34078; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for detection.

Cytochrome *c* release. Selective permeabilisation with digitonin was used to analyse the release of cytochrome *c* from mitochondria. Cytosolic and mitochondrial fractions were prepared according to Ndozangue-Tourguine *et al.*³³ Briefly, after harvesting, 6×10^6 cells were washed twice with ice-cold PBS and resuspended for 30 min on ice in cytosolic lysis buffer. After centrifugation (1000 $\times g$) the supernatant was collected as cytosolic fraction and the pellet was resuspended for 5 min on ice in mitochondrial lysis buffer. The supernatant after centrifugation at 10000 $\times g$ was collected as mitochondrial fraction. Equal amounts of protein were analysed by western blot as described above. For densitometric analysis, the public domain (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) Java image processing program ImageJ was used. Each signal has been evaluated in comparison with the control and equalised for the loading control.

Annexin V staining and flow cytometric analysis. A total of 7.5×10^4 cells were cultured in six-well plates and allowed to grow overnight. The cells were then incubated as indicated and harvested by trypsinisation at the indicated time points. Expression of CD95 was analysed by staining of 1×10^5 cells with FITC-conjugated mouse monoclonal anti-human CD95 (FAB142F; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and – as a control of analysis – with FITC-conjugated mouse IgG1 antibody (555748; BD Biosciences,) by a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendations. Apoptosis was determined by staining with annexin V/ 7-AAD (550475/559925; BD Biosciences) according to the recommendations of the manufacturer. Briefly, 1×10^5 cells were washed with ice-cold annexin buffer (HEPES (10 mM), NaCl (140 mM) and CaCl₂ (5 mM)) and stained with 5 μ l of annexin V and 5 μ l of 7-AAD for 15 min at room temperature in the dark. After adding annexin, buffer cells were analysed by a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). The percentage of apoptotic population (annexin V-positive cells) was calculated using BD FACS Diva software (BD Biosciences). Untreated cells were used to define basal levels of apoptotic and death cells.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was partly supported by the Federal Ministry of Education and Research (0315226A) and the DFG (He 5275/2-1). We are grateful to the German Federal Institute for Risk Assessment for funding of this project.

- Hall M, Grover PL. Chemical carcinogenesis and mutagenesis. In: Cooper CS, Grover PL (eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 1. Springer-Verlag: Berlin, 1990, pp 327–372.
- Luch A, Baird WM. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. In: McQueen CA, Roberts R (eds), *Comprehensive Toxicology*, Vol 14. Elsevier: Oxford, 2010, pp 85–124.
- Zhu H, Li Y, Trush MA. Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; **130**: 108–120.
- Bock KW, Köhle C. The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver. *Biol Chem* 2009; **390**: 1225–1235.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renaud JC *et al*. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008; **453**: 106–109.
- Esser C, Rannug A, Stockinger G. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* 2009; **30**: 449–455.
- Esser C. The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**: 597–607.
- Puga A, Ma C, Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**: 713–722.
- Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H *et al*. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; **446**: 562–666.
- Ko CB, Kim SJ, Park C, Kim BR, Sung TH, Koh DH *et al*. Benzo[a]pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* 2004; **199**: 35–46.
- Kim SJ, Ko CB, Park C, Kim BR, Sung TH, Koh DH *et al*. p38 MAP kinase regulates benzo[a]pyrene-induced apoptosis through the regulation of p53 activation. *Arch Biochem Biophys* 2005; **444**: 121–129.
- Tampio M, Loikkanen J, Myllynen P, Mertanen A, Vähäkangas KH. Benzo[a]pyrene increases phosphorylation of p53 at serine 392 in relation to p53 induction and cell death in MCF-7 cells. *Toxicol Lett* 2008; **178**: 152–159.
- Xiao H, Rawal M, Hahn ER, Singh SV. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. *Cell Cycle* 2007; **6**: 2826–2834.
- Brinkmann J, Hutzler C, Trappe S, Stolpmann K, Bock U, Liebsch M *et al*. Comparative studies on the metabolism of benzo[a]pyrene in keratinocytes. in *in vitro skin models and human skin ex vivo — metabolite patterns as indicator for the metabolic capacity of skin equivalents?* Skin-In-Vitro Conference Frankfurt/Main 2010.
- Leverkus M, Trautmann A. CD95-mediated signals in the skin: going out with an (inflammatory) bang? *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 2364–2366.
- Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 141–148.
- Kalmes M, Neumeyer A, Rio P, Hanenberg H, Fritsche E, Blömeke B. Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biol Chem* 2006; **387**: 1201–1207.
- Sheard MA, Vojtesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int J Cancer* 1997; **73**: 757–762.
- Leverkus M, Sprick MR, Wachter T, Denk A, Bröcker EB, Walczak H *et al*. induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 149–155.
- Jansen BJ, van Ruissen F, Cerneus S, Cloin W, Bergers M, van Eip PE *et al*. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand triggers apoptosis in dividing but not in differentiating human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 1433–1439.
- Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosolic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem* 1999; **274**: 28708–28715.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1541–1548.
- Siegmund D, Wicovsky A, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Kreuz S, Leverkus M *et al*. Death receptor-induced signalling pathways are differentially regulated by γ -interferon upstream of caspase 8 processing. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 6363–6379.
- Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF- κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signalling. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3964–3973.
- Levine-Fridman A, Chen L, Elferink CJ. Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol Pharmacol* 2004; **65**: 461–469.
- Tauchi M, Hida A, Negishi T, Katsuoka F, Noda S, Mimura J *et al*. Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 9360–9368.
- Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, Kawajiri K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol* 2009; **77**: 588–596.
- Ehrenschröder M, Wajant H. The role of FasL and Fas in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 2009; **647**: 64–93.
- Kerstan A, Leverkus M, Trautmann A. Effector pathways during eczematous dermatitis: where inflammation meets cell death. *Exp Dermatol* 2009; **18**: 893–899.
- Harr T, French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2010; **5**: 35.
- Viard I, Wehrli P, Bullani R, Schneider P, Holler N, Salomon D *et al*. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 1998; **282**: 490–493.
- Park KT, Mitchell KA, Huang G, Elferink CJ. The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 612–622.
- Ndozangue-Tourguine O, Sebbagh M, Mérimin D, Michéau O, Bertoglio J, Bréard J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* 2008; **27**: 6012–6022.
- Iordanov MS, Sundholm AJ, Simpson EL, Hanifin JM, Ryabinina OP, Choi RJ *et al*. Cell death-induced activation of epidermal growth factor receptor in keratinocytes:

- implications for restricting epidermal damage in dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 134–412.
35. Farley SM, Dotson AD, Purdy DE, Sundholm AJ, Schneider P, Magun BE *et al*. Fas ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. *J Invest Dermatol* 2006; **126**: 2438–151.
36. Farley SM, Purdy DE, Ryabinina OP, Schneider P, Magun BE, Iordanov MS. Fas ligand-induced proinflammatory transcriptional responses in reconstructed human epidermis. Recruitment of the epidermal growth factor receptor and activation of MAP kinases. *J Biol Chem* 2008; **283**: 919–928.
37. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK *et al*. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 2007; **129**: 447–450.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)

3. Diskussion

In Abschnitt 3.1 wird der Metabolismus von BP in humaner Haut, kommerziell erhältlichen 3D-Hautmodellen und primären Keratinozyten diskutiert. Die Veröffentlichung *Henkler, F., Stolpmann, K., & Luch, A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. EXS, 101, 107-131.* gibt einen detaillierten Überblick über die Metabolisierung von PAK und der Bildung von PAK-DNA-Addukten (siehe Abschnitt 2.1).

Im Detail werden verschiedene BP-Metabolite, die im Rahmen dieser Arbeit mittels LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert wurden, diskutiert. Dabei wird die Vergleichbarkeit von Haut und kommerziell erhältlichen *in vitro* Hautmodellen hinsichtlich der Metabolisierung von BP erörtert.

Die über metabolische Aktivierung von BP gebildeten elektrophilen Zwischenprodukte können genotoxische Effekte hervorrufen. Dies führte zu der Frage, ob BP in der Haut DNA-Schäden verursacht. Im Abschnitt 3.2 dieser Arbeit werden die genotoxischen Auswirkungen einer dermalen BP-Exposition erläutert. Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Veröffentlichung publiziert: *Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Hutzler, C., & Luch, A. (2012). Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[a]pyrene. Toxicol. Sci., 131 (2), 351-359.* (siehe Abschnitt 2.2).

Abschließend geht es im Abschnitt 3.3 um die zytotoxischen und apoptotischen Effekte der BP-Exposition. Im Vordergrund steht dabei der Einfluss von BP auf apoptotische Signaltransduktionswege und die Rolle des AHR hierbei. Gegenstand der Betrachtung ist im Anschluss der pro-apoptotische Crosstalk mit physiologisch relevanten Apoptose-Induktoren. Basierend auf diesen Ergebnissen ist folgende Veröffentlichung entstanden: *Stolpmann, K., Brinkmann, J., Salzmann, S., Genkinger, D., Fritsche, E., Hutzler, C., Wajant, H., Luch, A., & Henkler, F. (2012). Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinozytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis. Cell Death Dis., 3(9), e388* (siehe Abschnitt 2.3).

3.1 Benzo[*a*]pyren-Metabolismus in der Haut

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob eine enzymatisch-katalysierte Umsetzung von BP in *ex vivo* Humanhaut, kommerziell erhältlichen 3D-Hautmodellen und in primären Keratinozyten stattfindet und welche Metabolite dabei gebildet werden.

Im Rahmen von Studien zur Untersuchung der metabolischen Aktivierung von Fremdstoffen in der Haut rückten in den letzten Jahren zunehmend metabolisch kompetente 3D-Hautmodelle in den Fokus der Toxizitätstestung. Für den histologischen Aufbau dieser, der humanen Haut nachgebildeten dreidimensionalen Testsysteme, werden primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten neonataler Vorhäute eingesetzt. Diese haben während einer physiologischen Kultivierung ihre zellspezifischen Eigenschaften und Funktionen weitgehend behalten. Im Gegensatz zu dermalen Zelllinien, wird damit eine Barrierefunktion über die Nachbildung des *Stratum corneum* ermöglicht¹¹⁸.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das dermale Metabolitenprofil von BP mittels einer neu etablierten Analysemethoden untersucht. Dabei fand bei der LC-MS/MS-Kopplung eine Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)-Ionenquelle Anwendung. Die Massenspektren wurden mit positiver Ionisation aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Mit dieser Methode konnten die Metabolitenprofile von *ex vivo* Humanhaut, primären Keratinozyten, primären Fibroblasten sowie Epidermis- und Vollhautmodellen verglichen werden. Es wurden sieben verschiedene BP-Metabolite identifiziert und quantifiziert: 3-Hydroxy-BP, 7-Hydroxy-BP, BP-1,6-dion, BP-7,8-dion, *trans*-BP-7,8-dihydrodiol, *trans*-BP-9,10-dihydrodiol und BP-7,8,9,10-tetraol (Hydrolyseprodukt von BPDE).

Sowohl in den primären Zellkulturen als auch in den 3D-Hautmodellen war eine Metabolisierung von BP in die wichtigsten Metabolite nachweisbar. Zunächst wurden primäre Keratinozyten für 24, 48 und 72 Stunden mit 3,5 µM BP behandelt und die Gehalte an BP und BP-Metaboliten bestimmt. In diesem Konzentrationsbereich erfolgt eine optimale Induktion von CYP1A1 und CYP1B1. Alle sieben untersuchten Metabolite wurden zeitabhängig gebildet. Der Nachweis von BP-7,8,9,10-tetraol bestätigte indirekt die Bildung von BPDE. Entsprechende Versuche mit primären Fibroblasten führten zu ähnlichen Ergebnissen: alle untersuchten Metabolite wurden zeitabhängig in

3. Diskussion

vergleichbaren Mengen gebildet, mit Ausnahme von *trans*-BP-7,8-dihydrodiol und BP-7,8,9,10-tetraol. Fibroblasten bildeten im Vergleich zu Keratinozyten etwa 10-fach geringere Mengen an BP-7,8,9,10-tetraol und etwa 6-fach höhere Mengen an *trans*-BP-7,8-dihydrodiol. Aus der Literatur ist bekannt, dass humane Keratinozyten, jedoch nicht humane Fibroblasten BP metabolisch aktivieren und mutagene Metaboliten bilden können. Kuroki et al. zeigten, dass Fibroblasten aus BP zwar *trans*-BP-7,8-dihydrodiol, jedoch keine mutagen wirkenden Metabolite bilden⁴⁶. Die im Vergleich zu den Keratinozyten erhöhte Menge an *trans*-BP-7,8-dihydrodiol steht im Einklang mit der nachgewiesenen erhöhten Expression der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) in humanen Fibroblasten⁹⁸.

Die verminderte Bildung von BP-7,8,9,10-tetraol deutet auf eine ineffiziente CYP-abhängige Epoxidierung des Dihydrodiols in Fibroblasten hin. CYP1A1 und CYP1B1 werden in humanen Fibroblasten im geringen Maße exprimiert, eine enzymatische Aktivität wurde in früheren Studien jedoch nicht nachgewiesen^{99,100}. Andererseits exprimieren Fibroblasten im hohen Maße den AHR-Repressor. Es wird vermutet, dass dadurch die Expression und die Aktivität der CYP1-Enzyme unterdrückt wird¹⁰¹. Da jedoch *trans*-BP-7,8-dihydrodiol effizient gebildet wird und der erste Schritt dafür die CYP1A1/CYP1B1-abhängige Epoxidierung von BP ist, kann die mangelnde zweite Epoxidierung nicht allein mit der unterdrückten Aktivität der CYP1-Enzyme begründet werden.

Die Frage nach der Vergleichbarkeit von Hautmodellen und Haut bezüglich der metabolischen Kompetenz ist von großer Relevanz. Hautmodelle sollten für dermatotoxische Studien unbedingt eine metabolische Kompetenz aufweisen, da häufig die reaktiven Metabolite adverse Effekte verursachen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 50 nmol BP pro cm² für die Dauer von 48 Stunden topisch auf *ex vivo* Humanhaut, einem Epidermis-Modell und einem Vollhautmodell appliziert. Die *ex vivo* Humanhaut wurde von der Firma Across Barriers zur Verfügung gestellt. Sie wurde während kosmetischer Operationen aus der Bauchregion entnommen. Sowohl in der Humanhaut als auch in beiden Hautmodellen konnten vergleichbare Mengen an allen untersuchten Metaboliten nachgewiesen werden. Es gab geringfügige Unterschiede hinsichtlich der entstandenen Dihydrodiole: in dem Epidermis-Modell wurde weniger *trans*-BP-7,8-dihydrodiol gebildet, in dem Vollhautmodell wurde dagegen weniger *trans*-BP-9,10-dihydrodiol gebildet.

3. Diskussion

Hinsichtlich der entstandenen Metabolite gibt es zwischen dem Epidermis-Modell und dem aus Epidermis und Dermis bestehenden Full-Thickness-Modell keine quantitativen Unterschiede. Die Tatsache deutet darauf hin, dass, zumindest bei 3D-Hautmodellen, die dermale Metabolisierung von BP bei topischer Applikation in der Epidermis stattfindet. Daher ist anzunehmen, dass vor allem Keratinozyten die relevanten Zellen hinsichtlich der Metabolisierung und möglichen Genotoxizität von BP in der Haut sind.

Verglichen mit *ex vivo* Humanhaut und Hautmodellen wiesen primäre Keratinozyten eine deutlich geringere Metabolisierungsrate auf. Normalisiert auf die Fläche wurden deutlich weniger Metabolite in primären Keratinozyten gebildet. Da die menschliche Epidermis aus 5-6 Keratinozyten-Schichten besteht, kann man für primäre Keratinozyten im Vergleich zur menschlichen Haut eine etwa 6-fach geringere Metabolisierung von BP extrapolieren.

Abschließend kann festgehalten werden, dass kommerziell erhältliche *in vitro* Hautmodelle, primäre Keratinozyten gleichermaßen wie *ex vivo* Humanhaut in der Lage sind, BP effektiv zu metabolisieren. Die Bildung komplexer Metabolitenmuster zeigte in den untersuchten 3D-Hautmodellen eine ausgeprägte Vergleichbarkeit mit der menschlichen Haut und spiegelte so die *in vivo* Situation besser wieder als die primären Zellkulturen. Die morphologischen Eigenschaften und die in dieser Arbeit nachgewiesene metabolische Kapazität der 3D-Hautmodelle belegen die Eignung dieser Modelle für die Toxizitätstestung und damit die Bedeutung der Modelle bei der Entwicklung von Ersatzmethoden zu Tierversuchen.

Durch die nachgewiesene metabolische Aktivierung von BP kann es zur Bildung von elektrophilen Zwischenprodukten kommen, die genotoxische Effekte hervorrufen können. Die Auswirkungen einer BP-Exposition auf die Haut werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Zunächst wird die BP-vermittelte Genotoxizität im nächsten Abschnitt diskutiert.

3.2 Benzo[a]pyren-vermittelte Genotoxizität

Im Laufe der metabolischen Umsetzung von BP kann es zur Bildung reaktiver Zwischenprodukte mit einem hohen genotoxischen Potential kommen. Obwohl bereits früh die Kapazität humaner Keratinozyten BP zu metabolisieren nachgewiesen werden konnte, blieb die Frage, inwieweit die entstehenden Metabolite in der Lage sind DNA-Addukte zu bilden oder oxidative DNA-Schäden auszulösen, unbeantwortet^{42,43}.

Um die genotoxische Relevanz der nachgewiesenen BP-Metabolisierung in der Haut zu untersuchen, wurden primäre Keratinozyten für 24 und 48 Stunden mit 3,5 µM BP behandelt. Die Genotoxizität von BP und den BP-Metaboliten wurde anschließend durch Anwendung des Comet-Assays untersucht. In der verwendeten alkalischen Version kann der Comet-Assay direkt induzierte DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, und auch die durch die Exzisions-Reparatur eingeführten DNA-Strangbrüche auf Einzelzellniveau nachweisen. Es ist damit ein äußerst hilfreiches Werkzeug zur Charakterisierung von genotoxischen Wirkungen und der DNA-Reparaturkapazität¹⁰².

Anders als anhand früherer Studien in anderen Zellsystemen zu erwarten gewesen wäre, konnte in primären Keratinozyten unter Bedingungen, in denen BP nachweislich metabolisch aktiviert wird, keine DNA-Schädigung gezeigt werden^{103,104}. Wurden die Zellen für 2 h direkt mit dem stark genotoxischen BPDE behandelt, konnte nur in einem sehr hohen Konzentrationsbereich von 2,5 µM BPDE Genotoxizität nachgewiesen werden. In dem biologisch relevanteren Bereich von 0,5 µM BPDE zeigte sich dagegen keine Genotoxizität.

Auf Grund dieser fehlenden nachweisbaren genotoxischen Aktivität bei erwiesener Entstehung reaktiver Metabolite, wurde zur Steigerung der Sensitivität des Comet-Assays der DNA-Reparatur-Inhibitor Aphidicolin (APC) eingesetzt. APC ist ein spezifischer Inhibitor der DNA-Polymerasen α , δ und ϵ , der durch Konkurrenz mit Desoxycytidintriphosphat (dCTP) um Bindungsstellen der Polymerasen die DNA-Replikation blockiert¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Wird an DNA-Addukten eine Exzisions-Reparatur durchgeführt, so kann der entfernte Bereich durch die Polymerase nicht wieder aufgefüllt werden und der Strangbruch bleibt manifest. Wird in der Zelle eine durch genotoxische Schädigungen ausgelöste DNA-Exzisions-Reparatur initiiert, so akkumulieren Inzisionsstellen in Anwesenheit von APC, die so zu einem verstärkten Gesamtsignal beitragen. In einer kürzlich am Bundesinstitut für Risikobewertung

3. Diskussion

abgeschlossenen Masterarbeit konnte am Beispiel von BP und drei anderen genotoxischen Substanzen die sensitivitäts-steigernde Wirkung von APC für den Comet-Assay nachgewiesen werden¹⁰⁹. In der Arbeit konnte darüber hinaus, durch Untersuchung von sechs nicht-genotoxischen Substanzen, die Generierung irrelevant positiver Signale durch APC ausgeschlossen werden.

APC führte zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität des Comet-Assay. Nach Behandlung mit 0,5 µM BPDE und APC war der nachweisbare DNA-Schaden 5-fach erhöht und vergleichbar mit dem DNA-Schaden nach Behandlung mit 2,5 µM BPDE ohne APC Applikation. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (4 h Inkubation mit 5 µg/ml APC) führte APC alleine zu keinem positiven Befund. Auch die Nachweisgrenze für BPDE-bedingte Genotoxizität wurde durch Applikation von APC signifikant gesenkt. Nach Behandlung von primären Keratinozyten mit 100 nM BPDE für 15 min bis 2 h konnte nur bei Anwesenheit von APC eine signifikante Genotoxizität nachgewiesen werden. Im niedrigen Konzentrationsbereich von 5 nM bis 100 nM konnte für BPDE eine konzentrationsabhängige Zunahme der Genotoxizität beobachtet werden.

In primären Keratinozyten konnte nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung mit 3,5 µM BP durch die APC-Applikation ein 4- bzw. 5-fach erhöhtes DNA-Schädigungssignal nachgewiesen werden. Die durch 3,5 µM BP verursachte Genotoxizität war dabei mit den durch 50 nM - 100 nM BPDE verursachten Schäden vergleichbar. Für diese BPDE-Konzentration war eine signifikante Menge an DNA-Addukten und eine damit verbundene Stabilisierung von p53 in humanen Fibroblasten nachweisbar¹¹⁰. In Keratinozyten des Vollhautmodells konnte nach 48-stündiger topischer Applikation von 50 nmol BP unter APC-Applikation eine etwa 4-fach erhöhte DNA-Schädigung beobachtet werden. Das Ausmaß der Genotoxizität war dabei vergleichbar mit primären Keratinozyten nach Behandlung mit 3,5 µM BP.

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, konnte in primären Fibroblasten eine im Vergleich zu Keratinozyten deutlich geringere Bildung von BP-7,8,9,10-tetraol und eine deutlich höhere Bildung von *trans*-BP-7,8-dihydrodiol gezeigt werden. Im Einklang mit diesem Ergebnis wurde in primären Fibroblasten nach Behandlung mit BP auch nach Zugabe von APC keine Genotoxizität nachgewiesen. Die durch direkte Gabe von BPDE ausgelöste Genotoxizität war dagegen in Keratinozyten und Fibroblasten vergleichbar.

Dies deutet darauf hin, dass in humanen Fibroblasten auf Grund der geringen Bildung von BPDE eine im Vergleich zu Keratinozyten geringere Genotoxizität nach BP-

3. Diskussion

Behandlung auftritt. Im Gegensatz dazu konnte in Fibroblasten des Vollhautmodells nach BP-Behandlung und unter APC-Applikation eine signifikante Genotoxizität nachgewiesen werden. Die Metabolisierung von BP in den Keratinozyten der Epidermis des Vollhautmodells scheint demnach effektiv genug zu sein, um in Fibroblasten des dermalen Kompartiments Genotoxizität auszulösen. Diese Beobachtung wird durch Studien untermauert, in denen gezeigt wurde, dass auch in V79-Hamsterzellen, die BP nicht metabolisieren können, in Kokultur mit primären Keratinozyten Genotoxizität nach BP-Behandlung auftrat¹¹¹.

Zusammenfassend kann im Hinblick auf die nachgewiesene metabolische Aktivierung von BP festgestellt werden, dass die BP-vermittelte Genotoxizität in primären Zellkulturen und 3D-Hautmodellen vergleichbar ist. Vor dem Hintergrund der Etablierung von Ersatzmethoden zum Tierversuch für die Hauttoxizitätsprüfung konnte die Eignung der untersuchten Hautmodelle und des modifizierten Comet-Assays zum Nachweis genotoxischer Wirkungen dermal applizierter Chemikalien gezeigt werden.

Die in der dieser Arbeit nachgewiesene effektive Metabolisierung und die daraus resultierende Genotoxizität deutet auf ein Risiko für die menschliche Gesundheit hin, das mit einer dermalen BP-Exposition verknüpft ist.

Neben der direkt durch reaktive Metabolite ausgelösten Genotoxizität kann BP auch Veränderungen anderer zellulärer Reaktionen, wie Inflammation, Apoptose, Differenzierung und Proliferation, auslösen^{49,50,112}. Welche Konsequenzen sich aus der BP-Exposition für primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen hinsichtlich der apoptotischen Signaltransduktion ergeben, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

3.3 Sensibilisierung von Keratinozyten für CD95L- und TRAIL- vermittelte Apoptose

Bei Exposition gegenüber BP kann entweder über die direkte Aktivierung des AHR oder über die durch genotoxische Schäden ausgelöste Aktivierung und Stabilisierung von p53 Apoptose induziert werden ⁵⁻¹⁰.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob BP in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen Apoptose auslöst. In Vorversuchen konnte im eingesetzten Konzentrationsbereich von 3,5 µM eine starke Aktivierung des AHR und damit einhergehend die optimale Induktion von CYP1A1/CYP1B1 gezeigt werden. Die Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit BP behandelt und die Induktion von Apoptose mit Hilfe von Zytotoxizitätsassays sowie FACS-Färbungen untersucht. Im water soluble tetrazolium (WST)-Assay wurde sowohl in primären Keratinozyten als auch in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 3,5 und 10 µM BP eine nur geringfügige Abnahme der Zellviabilität beobachtet.

Mit Hilfe der Annexin V-Färbung konnte im Durchflusszytometer der Anteil apoptotischer Zellen differenziert und selektiv untersucht werden. In primären Keratinozyten wurde nach Behandlung mit 3,5 µM BP keine Induktion von Apoptose beobachtet. Dagegen kam es nach Behandlung mit 10 µM BP nach 48 Stunden zu einer Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen um 15%. Nach 24 Stunden war der Anteil apoptotischer Zellen unverändert. In HaCaT-Zellen konnte keine Induktion von Apoptose durch BP-Behandlung nachgewiesen werden.

Der Befund, dass BP in Keratinozyten-Zellkulturen keine Apoptose auslöst, steht im Widerspruch zu einigen publizierten Ergebnissen hinsichtlich der pro-apoptotischen Wirkung von BP. Die pro-apoptotische Wirkung von BP in vergleichbaren Konzentrationsbereichen wurde für einzelne Zelllinien belegt ^{8,10,72,112,113}. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, ist die Datenlage hinsichtlich der pro-apoptotischen Wirkung von BP allerdings relativ unübersichtlich. Eindeutige apoptotische Effekte wurden nur in wenigen Zelltypen nachgewiesen.

In der Haut spielen physiologische Apoptose-Induktoren, wie CD95L und TRAIL, eine wichtige Rolle. Todesrezeptoren, hier besonders CD95, sind entscheidende Faktoren bei der Entstehung bestimmter inflammatorischer Hautkrankheiten, wie etwa Psoriasis oder Atopische Dermatitis.⁶⁷ Infiltrierende T-Zellen exprimieren CD95L, jedoch wird in

3. Diskussion

Keratinocyten nur vereinzelt Apoptose ausgelöst. Findet aber eine Verstärkung der Apoptose durch bestimmte Chemikalien statt, so könnte der Gewebeschaden deutlich erhöht werden und somit die Pathogenese der inflammatorischen Hautkrankheiten beeinflussen. Park et al. konnten nachweisen, dass eine AHR-Aktivierung Hepatozyten für die CD95L-abhängige Apoptose sensibilisiert⁷⁸. Um eine mögliche Sensibilisierung für eine Todesrezeptor-vermittelte Apoptose durch BP nachzuweisen, wurde die CD95L-vermittelte Apoptose in BP-behandelten HaCaT-Zellen untersucht. Nach Vorbehandlung mit 3,5 μM BP für 48 Stunden konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität durch CD95L-Behandlung nachgewiesen werden.

In Anwesenheit des Caspase-Inhibitors *N*-Benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-(*O*-Me)-fluoromethylketone (zVAD) zeigte sich dagegen keine Abnahme der Zellviabilität. Dies deutet auf die Abhängigkeit der beobachteten Sensibilisierung von einer Caspase-Aktivierung hin. Mit Hilfe der Annexin V-Färbung wurde die synergistische Wirkung von BP und CD95L hinsichtlich der Apoptoseinduktion bestätigt. Sowohl in primären Keratinocyten als auch in HaCaT-Zellen wurde unter Vorbehandlung mit BP nach 24 h Exposition gegenüber 2,5 ng/ml CD95L eine signifikante Zunahme der Zahl der apoptotischen Zellen beobachtet, während weder BP noch CD95L allein unter diesen Bedingungen Apoptose induzieren konnten. Gleichzeitig wurde unter den beschriebenen Bedingungen eine verstärkte Freisetzung von CytC gezeigt.

Obwohl es selbst keinen direkten apoptotischen Effekt hat, kann BP die durch den physiologischen Apoptose-Induktor CD95L vermittelte Apoptose in Keratinocyten verstärken.

Der primäre molekulare Effekt von BP beruht in der Aktivierung des AHR. Daher wurde in den darauf folgenden Experimenten die Rolle des AHR bei der Sensibilisierung für CD95L-induzierte Apoptose näher charakterisiert. Wie in Abschnitt 1.4 dieser Arbeit beschrieben, waren die Befunde in der Literatur hinsichtlich der Beteiligung des AHR an der Induktion von Apoptose widersprüchlich.

Zunächst wurde in Keratinocyten-Zellkulturen eine mögliche Sensibilisierung für CD95L durch β -Naphthoflavon (β -NF) untersucht. β -NF ist ein nicht-genotoxischer AHR-Agonist, der in der eingesetzten Konzentration von 10 μM eine mit 3,5 μM BP vergleichbare Aktivierung des AHR zeigt. Sowohl in primären Keratinocyten als auch in HaCaT-Zellen konnte mittels Zytotoxizitätsassays und Apoptose-spezifischen FACS-Analysen gezeigt

3. Diskussion

werden, dass β -NF die Zellen gegenüber CD95L in vergleichbarer Weise wie BP sensibilisierte.

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der Aktivierung des AHR für die verstärkte CD95L-induzierte Apoptose wurden AHR-defiziente HaCaT-Zellen mit BP oder β -NF vorbehandelt und die Sensibilisierung gegenüber CD95L untersucht. In den von Prof. Dr. Ellen Fritsche (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellten HaCaT-Zellen war die Expression des AHR durch ein lentivirales shRNA Konstrukt inhibiert. Die entsprechenden Kontrollzellen trugen das parentale "leere" Konstrukt⁷⁹. In den AHR-defizienten Zellen wurde nach BP- bzw. β -NF-Vorbehandlung keine Sensibilisierung für CD95L beobachtet, während in den Kontrollzellen eine deutliche Zunahme der Zahl an apoptotischen Zellen - vergleichbar mit primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen - zu beobachten war. Dies belegt, dass der pro-apoptische "Crosstalk" zwischen den AHR-Agonisten und CD95L von der Aktivierung des AHR abhängt. Dieser Zusammenhang steht im Einklang mit der Beobachtung, dass durch eine Liganden-unabhängige Aktivierung des AHR, Hepatozyten über einen nicht-genotoxischen Mechanismus für die CD95-abhängige Apoptose prädisponiert werden⁷⁸. Findet eine Verstärkung der CD95L-vermittelten Apoptose durch bestimmte Chemikalien statt, so kann der Gewebeschaden stark erhöht werden und somit die Pathogenese der inflammatorischer Hautkrankheiten beeinflusst werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass die AHR-abhängige Sensibilisierung nicht auf die CD95L-vermittelte Apoptose beschränkt ist. In der Haut ist neben CD95L der Todesligand TRAIL von Bedeutung. TRAIL wird ebenfalls von infiltrierenden Immunzellen exprimiert und ist maßgeblich an der Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen beteiligt⁶⁸. Die Vorbehandlung mit BP sensibilisierte HaCaT-Zellen auch für die TRAIL-vermittelte Apoptose. Nach Vorbehandlung mit 3,5 μ M BP für 48 h konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität durch TRAIL-Behandlung in HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. In der Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zVAD war dagegen keine Abnahme der Zellviabilität zu beobachten. In den AHR-defizienten Zellen erfolgte dagegen keine Sensibilisierung für die TRAIL-vermittelte Apoptose, während in den Kontrollzellen eine vergleichbare Zunahme an apoptotischen Zellen gezeigt werden konnte.

3. Diskussion

Weiterhin wurde dazu auch der AHR-Antagonist α -Naphthoflavon (α -NF) verwendet. Nach Behandlung von AHR-profizienten HaCaT-Zellen mit α -NF kam es nicht mehr zu einer BP-abhängigen Sensibilisierung gegenüber den beiden physiologischen Apoptose-Induktoren. Es läßt sich schlußfolgern, dass AHR-Agonisten demnach Keratinozyten für die physiologischen Apoptose-Induktoren CD95L und TRAIL sensibilisieren.

Da die Aktivierung des AHR unter anderem maßgeblich von den zellulären Differenzierungsstadien bestimmt wird und BP die Differenzierung von Keratinozyten möglicherweise inhibiert, stellte sich die Frage, inwieweit der beobachtete Sensibilisierungs-Effekt der AHR-Agonisten von dem Differenzierungsstadium der Keratinozyten beeinflusst wird¹¹⁴. Mit zunehmender Differenzierung nimmt die Expression an AHR zu¹¹⁵. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass BP sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Keratinozyten für die TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisiert. Wenngleich letztere allerdings in einem etwas geringeren Maße. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass der Effekt unabhängig von der Expression der AHR-Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 ist. HaCaT-Zellen, deren CYP1A1- und CYP1B1-Expression inhibiert war, zeigten trotzdem die BP-abhängige Sensibilisierung gegenüber TRAIL. Anhand dieser Ergebnisse wurde bestätigt, dass die Sensibilisierung der Keratinozyten für CD95L- und TRAIL-bedingte Apoptose durch BP nicht in der Metabolisierung und der damit verbundenen Entstehung von DNA Schäden begründet ist.

Durch die Interaktion mit den Todesliganden CD95L und TRAIL, die z.B. von infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden, findet an der „Death Domain“ der korrespondierenden Rezeptoren eine Rekrutierung des zytoplasmatischen Adaptormoleküls FADD statt. FADD besitzt eine "Death Effector" Domäne, an die Pro-Caspase 8 binden kann. Die daraus resultierende Bildung des DISC-Komplexes führt zur proteolytischen Aktivierung der Initiator-Caspase 8 sowie Pro-Caspase 10 und nachfolgend von Effektor-Caspasen, z.B. Caspase 3. Ob die AHR-abhängige Sensibilisierung für CD95L und TRAIL auf einer verstärkten Aktivierung der DISC-induzierten Pro-Caspase 8 beruht und damit auf der Rezeptor-Komplex Ebene stattfindet, wurde im Western-Blot untersucht. Nach 48-stündiger Vorbehandlung mit 3,5 μ M BP wurde nach 8 h Exposition gegenüber TRAIL in HaCaT Zellen eine gesteigerte Prozessierung von Pro-Caspase 8 zu p43/p41- und p18-Intermediaten beobachtet. Für

3. Diskussion

die nachfolgende Effektor-Caspase 3 konnte ebenfalls eine Prozessierung unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden. In den AHR-defizienten Zellen fand dagegen keine Prozessierung der Caspasen statt. Daraus konnte gefolgert werden, dass AHR bei der Aktivierung dieser Pro-Caspasen eine Rolle spielt. Die Sensibilisierung der Keratinozyten durch AHR-Liganden beruht somit auf einer verstärkten Aktivierung der DISC-induzierten Caspase 8.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BP in Konzentrationsbereichen, die zu einer deutlichen Aktivierung des AHR führten, in Keratinozyten nur geringfügig Apoptose induziert. Dagegen wurde eine starke, Caspase-abhängige Sensibilisierung der BP-behandelten Zellen gegenüber den physiologischen Apoptose-Induktoren CD95L und TRAIL nachgewiesen. Sowohl primäre Keratinozyten als auch HaCaT-Zellen wurden durch BP gegenüber der CD95L- und TRAIL-induzierten Apoptose sensibilisiert, in Konzentrationsbereichen, die auch bei realer Exposition der Haut mit kontaminiertem Material denkbar sind. CD95L und TRAIL werden von infiltrierenden T-Zellen exprimiert und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündlicher Hautkrankheiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Sensibilisierung unabhängig von der CYP-Expression und der Bildung von BP-Metaboliten ist.

Durch den Einsatz von β -NF (AHR Agonist), α -NF (AHR Antagonist) und von HaCaT-Zellen, deren AHR-Expression mittels shRNA deutlich herabgesetzt war, konnte nachgewiesen werden, dass diese Sensibilisierung gegenüber CD95L- und TRAIL-abhängiger Apoptose auf der Aktivierung des AHR beruht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nach direkter Behandlung mit dem genotoxischen BP-Metaboliten, BPDE, in HaCaT-Zellen keine Sensibilisierung gegenüber der CD95L-vermittelten Apoptose stattfand. Auch nach Behandlung mit anderen BP-Metaboliten konnte keine Sensibilisierung beobachtet werden. Nur der Mutterkohlenwasserstoff BP selbst war zu einem pro-apoptotischen "Crosstalk" mit CD95L und TRAIL fähig. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit in primären Keratinozyten nach BP-Behandlung weder eine nachweisbare Aktivierung von p53 noch eine transkriptionelle Hochregulation des p53-Zielgens CD95 gezeigt. Eine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von p53 und die damit indirekt verursachte Hochregulation von CD95 ist demnach nicht die Grundlage für die Verstärkung der CD95L-induzierten Effekte durch BP.

Zusammenfassend wird festgehalten, dass die dermale Exposition gegenüber AHR-Liganden, wie BP und β -NF, einen verstärkenden Effekt auf physiologische Apoptose-

3. Diskussion

Induktoren vermittelt. Dies geschieht unabhängig von den nachgewiesenen genotoxischen Effekten der AHR- bzw. CYP-abhängigen BP-Metaboliten.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eine neue Funktion des AHR im zellulären Apoptose-Prozess. Wie in Abschnitt 1.4 erläutert, muss die Rolle des AHR in zellulären Apoptose-Prozessen als „ambivalent“ bezeichnet werden. Die Fähigkeit verschiedener AHR-Liganden als Tumor-Promotoren zu wirken, beruht auf ihrem Vermögen, die Apoptose genotoxisch geschädigter Zellen zu inhibieren^{9,116}. Marlowe et al. konnten zeigen, dass es durch Aktivierung der AHR und der damit verbundenen Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor E2F zu einer Unterdrückung von pro-apoptotischen E2F-Zielgenen kommt. Die Aktivierung des AHR hemmt somit die E2F-vermittelte Apoptose⁸⁸.

Demgegenüber stehen Studien, die eine pro-apoptotischen Rolle des AHR nachweisen. Eine Aktivierung des AHR sensibilisiert Zellen für bestimmte pro-apoptotische Stimuli sowie intrinsische Stressoren⁹. Park et al. wiesen nach, dass die AHR- Expression und -Aktivität Hepatozyten für die CD95L-induzierte Apoptose prädisponiert. Die pro-apoptotische Wirkung des AHR wurde in dieser Studie durch eine verstärkte Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges begründet⁷⁸. Der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene pro-apoptotische Crosstalk zwischen Todesrezeptoren und AHR liefert neue Hinweise auf die physiologische Rolle des AHR in zellulären Apoptose-Prozessen. Der AHR kann daher als „Modulator“ der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose betrachtet werden. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Funktion des AHR im zellulären Apoptose-Prozess der Keratinozyten muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

4. Zusammenfassung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind ubiquitär auftretende Schadstoffe in der Umwelt. Unter den PAK wird Benzo[*a*]pyren (BP) seit Jahrzehnten als Leitsubstanz betrachtet und ist daher intensiv erforscht. Die Exposition des Menschen gegenüber BP kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: über die Atemluft, die Nahrung oder durch den Kontakt mit kontaminiertem Material. In den Körper aufgenommen wird BP durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus metabolisch aktiviert und es kommt zur Bildung von Derivaten, die zytotoxische und/oder genotoxische Effekte hervorrufen können. BP als starker Agonist des Arylhydrocarbon Rezeptors (AHR) kann unterschiedliche zelluläre Effekte auslösen, bedingt durch die Bildung toxischer Metabolite oder direkt über die Aktivierung des AHR. Der AHR ist neben dem Fremdstoffmetabolismus an einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege, wie Inflammation, Apoptose, Differenzierung und Proliferation, beteiligt. In der Haut spielen physiologische Apoptose-Induktoren, wie Cluster of Differentiation 95 Ligand (CD95L) und TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündlicher Hautkrankheiten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kompetenz von kommerziell erhältlichen *in vitro* Hautmodellen, primären Keratinozyten und *ex vivo* Humanhaut hinsichtlich der Metabolisierung von BP verglichen werden. Sowohl kommerziell erhältliche *in vitro* Hautmodelle, primäre Keratinozyten und Fibroblasten als auch *ex vivo* Humanhaut sind in der Lage BP effektiv zu metabolisieren. Mittels LC-MS/MS konnte gezeigt werden, dass die Metabolisierung von BP und die damit verbundene Bildung komplexer Metabolitenmuster in den untersuchten 3D-Hautmodellen eine sehr große Ähnlichkeit zu der menschlichen Haut aufweist und in diesem Punkt die *in vivo* Situation deutlich besser widerspiegeln als die untersuchten primären Zellkulturen. Dagegen war in primären Zellkulturen und 3D -Hautmodellen nach dermalen Exposition gegenüber BP gleichermaßen eine signifikant erhöhte Genotoxizität nachweisbar.

Neben der direkt durch die reaktiven Metabolite ausgelösten "Damage Response" kann es durch die PAK-abhängige Aktivierung von AHR-Signalwegen zu Veränderungen verschiedenster zellulärer Reaktionen kommen. Im Rahmen dieser

4. Zusammenfassung

Arbeit wurde der pro-apoptische Effekt von BP in primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen näher charakterisiert. Obwohl BP alleine in Keratinozyten nur eine niedrige Apoptoserate auslöste, wurde eine verstärkte Sensibilisierung gegenüber den physiologischen Apoptose-Induktoren CD95L und TRAIL beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Sensibilisierung der Keratinozyten für CD95L- und TRAIL-bedingte Apoptose durch BP nicht in der Bildung genotoxischer Metabolite und der dadurch ausgelösten Aktivierung von p53 begründet ist.

Die Abhängigkeit der beobachteten Sensibilisierung vom AHR wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels AHR-defizienter HaCaT-Zellen, in denen der Sensibilisierungseffekt nicht auftrat, gezeigt. Dieser Befund konnte auch mit dem nicht-genotoxischen AHR-Agonisten β -Naphthoflavon (β -NF) bestätigt werden. Die gewonnenen Ergebnisse liefern klare Hinweise darauf, dass AHR-Liganden in der menschlichen Haut die apoptotischen Effekte physiologischer Apoptose-Induktoren verstärken können und belegen damit eine neue Funktion des AHR im zellulären Apoptose-Prozess.

5. Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous environmental pollutants, whose lead compound is the most thoroughly investigated benzo[*a*]pyrene (BP). Exposure to BP can occur via air, food or contacts with contaminated products. Upon uptake BP is enzymatically metabolized toward reactive intermediates that can induce cytotoxicity and/or genotoxicity. BP is a strong agonist of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) and can therefore initiate multifarious cellular effects, due to formation of toxic metabolites or directly via activation of AHR. Besides its essential role in the biotransformation of xenobiotics, the transcription factor AHR modulates a multitude of intracellular signaling pathways, like inflammation, apoptosis, differentiation or proliferation. In the skin, physiological inducers of apoptosis like CD95L and TRAIL play an important role in the pathology of inflammatory skin diseases.

In this PhD thesis, BP metabolism in commercially available *in vitro* 3D skin models, primary 2D skin cell cultures and excised human skin was compared, and the occurrence of seven different BP metabolites by means of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was analyzed. All models investigated were competent to metabolize BP. The metabolic profiles generated by the skin models were remarkably similar to the *ex vivo* human skin. Therefore 3D skin models reflect the *in vivo* situation better than the skin-derived cell culture models. Upon dermal exposure significant amounts of BP-derived DNA damage in skin-derived cell culture models and 3D skin models was detectable.

Besides damage responses triggered by reactive intermediates, PAH-mediated activation of AHR signaling can also more directly trigger changes in diverse cellular pathways. Within this thesis the pro-apoptotic function of BP in primary keratinocytes and HaCaT cells was further characterized. Although BP failed to induce apoptosis in keratinocytes, a strong enhanced sensitization toward the physiological inducers of apoptosis, CD95L and TRAIL, was observed in BP-treated cells. Enhancement of CD95- and TRAIL-mediated apoptosis by BP did not depend on the formation of genotoxic metabolites and the associated activation of p53. The BP-induced sensitization of CD95L- and TRAIL-induced apoptosis fully depends on the presence of an active AHR, confirmed by AHR-deficient HaCaT cells, in which no

5. Summary

sensitization occurred. Further, β -NF, a non-genotoxic activator of AHR signaling was also shown being capable of increasing death receptor-dependent apoptosis.

The results obtained in this PhD thesis provide clear evidence that receptor-induced apoptosis can be modulated by environmentally relevant AhR agonists such as BP, the carcinogenic lead compound from the class of PAHs. It thus describes a new aspect of the role of AHR in apoptosis.

6. Literaturverzeichnis

1. **Merk, H. F., Abel, J., Baron, J. M. & Krutmann J. (2004)** Molecular pathways in dermatotoxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 267-277
2. **Steinstrasser, I., & Merkle, H. P. (1995)** Dermal metabolism of topically applied drugs: pathways and models reconsidered. *Pharm. Acta Helv.* 70, 3-24.
3. **Jugert, F., Agarwal, R., Kuhn, A., Bickers, D. R., Merk, H. F., & Mukhtar, H. (1994)** Multiple cytochrome P450 isozymes in murine skin: induction of P450 1A, 2B, 2E, and 3A by dexamethasone. *J. Invest. Dermatol.* 102, 970-975.
4. **Baron, J. M., Holler, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H. F., & Jugert, F. K. (2001)** Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 541-548.
5. **Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., & Fornace, A. J. Jr. (1992)** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 70, 587-597.
6. **Nelson, W., & Kastan, M. (1994)** DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1815-1823.
7. **Ko, C.-B., Kim, S.-J., Park, C., Kim, B.-R., Shin, C.-H., Choi, S., Chung, S.-Y., Noh, J.-H., Jeun, J.-H., Kim, N.-S., & Park, R. (2004)** Benzo[a]pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* 199, 35-46.
8. **Tampio, M., Loikkanen, J., Myllynen, P., Mertanen, A., & Vähäkangas, K. H. (2008)** Benzo[a]pyrene increases phosphorylation of p53 at serine 392 in relation to p53 induction and cell death in MCF-7 cells. *Toxicol. Lett.* 178, 152-159.
9. **Puga, A., Ma, C., & Marlowe, J. (2009)** The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713-722.
10. **Tomokiyo, A., Maeda, H., Fujii, S., Monnouchi, S., Wada, N., Hori, K., Koori, K., Yamamoto, N., Teramatsu, Y., & Akamine, A. (2012)** Alternation of extracellular matrix remodeling and apoptosis by activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in human periodontal ligament cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 3093-3103.
11. **Xue, W., & Warshawsky, D. (2005)** Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73-93.
12. **Luch, A., & Baird, W. M. (2010)** Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Comprehensive Toxicology (2nd ed.)*, 14, 85-123.
13. **Bosetti, C., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2007)** Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann. Oncol.* 18, 431-446.
14. **Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., & Fletcher, T. (2004)** Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 112, 970-978.

6. Literaturverzeichnis

15. **Armstrong, B., Tremblay, C., Baris, D., & Thèriault, G. (1994)** Lung cancer mortality and polynuclear aromatic hydrocarbons: a case-cohort study of aluminum production workers in Arvida, Quebec, Canada. *Am. J. Epidemiol.* 139, 250-262.
16. **Boffetta, P., Jourenkova, N., & Gustavsson, P. (1997)** Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8, 444- 472.
17. **Bosetti, C., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2007)** Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann. Oncol.* 18, 431-446.
18. **Greim, H. (2008)** Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten und Einstufungen. *DFG-Publikationen: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe*, 45(1).
19. **Smith, L., & Denissenko, M. (2000).** Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 803-811.
20. **Anselstetter, V., & Heimpel, H. (1986)** Acute hematotoxicity of oral benzo[*a*]pyrene: the role of the Ah locus. *Acta Haematol.* 76, 217-223.
21. **Shami, S. G., Wolff, R. K., Hahn, F. F., Brooks, A. L., & Griffith, W. C. (1985)** Early cytokinetic and morphological response of rat lungs to inhaled benzo[*a*]pyrene, gallium oxide, and SO₂. *Environ. Res.* 37, 12-25.
22. **Bui, Q. Q., Tran, M. B., & West, W. L. (1986)** A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo[*a*]pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. *Toxicology* 42, 195-204.
23. **Pruess-Schwartz, D., & Baird, W. (1986)** Benzo[*a*]pyrene: DNA adduct formation in early-passage Wistar rat embryo cell cultures: evidence for multiple pathways of activation of benzo[*a*]pyrene. *Cancer Res.* 46, 545-552.
24. **Legraverend, C., Guenther, T. M., & Nebert, D. W. (1984)** Importance of the route of administration for genetic differences in benzo[*a*]pyrene-induced *in utero* toxicity and teratogenicity. *Teratology* 29, 35-47.
25. **White, K., & Holsapple, M. (1984)** Suppression of *in vitro* antibody production by mouse spleen cells by the carcinogen benzo[*a*]pyrene but not by the noncarcinogenic congener benzo[*e*]pyrene. *Cancer Res.* 44, 3388-3393.
26. **Penn, A., & Snyder, C. (1988)** Arteriosclerotic plaque development is 'promoted' by polynuclear aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 9, 2185-2189.
27. **Krieger, J. A., Davila, D. R., Lytton, J., Born, J. L., & Burchiel, S. W. (1995)** Inhibition of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) by polycyclic aromatic hydrocarbons in HPB-ALL human T cells and other tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133, 102-108.
28. **Gairola, C. G., Drawdy, M. L., Block, A. E., & Daugherty, A. (2001)** Sidestream cigarette smoke accelerates atherogenesis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *Atherosclerosis* 156, 49-55.
29. **BfR (2010)** Krebs erzeugende polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Verbraucherprodukten sollen EU-weit reguliert werden - Risikobewertung des BfR im Rahmen eines Beschränkungsvorschlages unter REACH. *Stellungnahme Nr. 032/2010*.

6. Literaturverzeichnis

30. **Jiang, H., Gelhaus, S. L., Mangal, D., Harvey, R. G., Blair, I. A., & Penning, T. M. (2007)** Metabolism of benzo[*a*]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1331-1341.
31. **Yoon, J. H., Besaratinia, A., Feng, Z., Tang, M. S., Amin, S., Luch, A., & Pfeifer, G. P. (2004)** DNA damage, repair, and mutation induction by (+)-*syn*- and (-)-*anti*-dibenzo[*a,l*]pyrene-11,12-diol-13,14-epoxides in mouse cells. *Cancer Res.*, 64(20), 7321-7328.
32. **Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M., Bouvier, G., Kriek, E., & Bartsch, H. (2002)** CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[*a*]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis* 23, 1969-1977.
33. **Smithgall, T., Harvey, R., & Penning, T. (1988)** Spectroscopic identification of *ortho*-quinones as the products of polycyclic aromatic *trans*-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential. *J. Biol. Chem.* 263, 1814-1820.
34. **Penning, T. M., Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., & Harvey, R.G. (1996)** Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon *trans*-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 84-92.
35. **Flowers, L., Bleczynski, W. F., Burczynski, M. E., Harvey, R. G., & Penning, T. M. (1996)** Disposition and biological activity of benzo[*a*]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* 35, 13664-13672.
36. **Flowers, L., Ohnishi, S.T., & Penning, T. M. (1997)** DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and *o*-semiquinone anion radicals. *Biochemistry* 36, 8640-8648.
37. **Finkel, T. (1998)** Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248-253.
38. **Park, J., & Gopishetty, S. (2005)** Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH *o*-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper (II)/copper (I) redox cycling. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1026-1037.
39. **Fruehauf, J. P., & Meyskens, F. L. (2007)** Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* 13, 789-794.
40. **Cavalieri, E. L., & Rogan, E. G. (1995).** Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, 25(7), 677-688.
41. **Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A., & Baird, W. M. (2000)** Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 10-17.
42. **Fox, C., Selkirk, J., Price, F., & Croy, R. (1975)** Metabolism of benzo[*a*]pyrene by human epithelial cells *in vitro*. *Cancer Res.* 35, 3551-3557.
43. **Selkirk, J. K., MacLeod, M. C., Kuroki, T., Drevon, C., Piccoli, C., & Montesano, R. (1982)** Benzo[*a*]pyrene metabolites: formation in rat liver cell-culture lines, binding to macromolecules, and mutagenesis in V79 hamster cells. *Carcinogenesis* 3, 635-639.
44. **Parkinson, E. K., & Newbold, R. F. (1980)** Benzo(a)pyrene metabolism and DNA adduct formation in serially cultivated strains of human epidermal keratinocytes. *Int. J. Cancer* 26, 289-299.

6. Literaturverzeichnis

45. **Theall, G., Eisinger, M., & Grunberger, D. (1981)** Metabolism of benzo[*a*]pyrene and DNA adduct formation in cultured human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis* 2, 581-587.
46. **Kuroki, T., Hosomi, J., & Munakata, K. (1982)** Metabolism of benzo[*a*]pyrene in epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts of humans and mice with reference to variation among species, individuals, and cell. *Cancer Res.* 42, 1859-1865.
47. **Marie, C., Maitre, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A., & Ravanat, J. L. (2008)** Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[*a*]pyrene DNA adducts. *J. Appl. Toxicol.*, 28(5), 579-590.
48. **Umannova, L., Machala, M., Topinka, J., Novakova, Z., Milcova, A., Kozubik, A., & Vondracek, J. (2008)** Tumor necrosis factor-alpha potentiates genotoxic effects of benzo[*a*]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression. *Mutat. Res.* 640, 162-169.
49. **Kepley, C. L., Lauer, F. T., Oliver, J. M., & Burchiel, S. W. (2003)** Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[*a*]pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils. *Clin. Immunol.* 107, 10-19.
50. **Perez, D. S., Handa, R. J., Yang, R. S. H., & Campain, J. A. (2008)** Gene expression changes associated with altered growth and differentiation in benzo[*a*]pyrene or arsenic exposed normal human epidermal keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.*, 28, 491-508.
51. **Zhang, J., Xu, X., & Liu, Y. (2004)** Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* 1, 186-192.
52. **Cacciapaglia, F., Spadaccio, C., Chello, M., Gigante, A., Coccia, R., Afeltra, A., & Amoroso, A. (2009)** Apoptotic molecular mechanisms implicated in autoimmune disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 13, 23-40.
53. **Friedlander, R. M. (2003)** Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N. Engl. J. Med.* 348, 1365-1375.
54. **Lowe, S., & Lin, A. (2000)** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495.
55. **Teraki, Y., & Shiohara, T. (1999)** Apoptosis and the skin. *Eur. J. Dermatol.* 9, 413-425.
56. **Falschlehner, C., Schaefer, U., & Walczak, H. (2009)** Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145-154.
57. **Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008)** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231-241.
58. **van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., & Vandenabeele, P. (2002)** The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9, 1031-1042.
59. **Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003)** Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45-65.
60. **Sheikh, M., & Huang, Y. (2003)** Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2, 550-552.
61. **Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009)** Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777-21781.

6. Literaturverzeichnis

62. **Kavuri, S. M., Geserick, P., Berg, D., Dimitrova, D. P., Feoktistova, M., Siegmund, D., Gollnick, H., Neumann, M., Wajant, H., & Leverkus, M. (2011)** Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* 286, 16631-16646.
63. **Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., & Haupt, Y. (2003)** Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* 116, 4077-4085.
64. **Liu, X., Yue, P., Khuri, F. R., & Sun, S.-Y. (2004)** P53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res.* 64, 5078-5083.
65. **Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., & El-Deiry, W. S. (2011)** The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage *in vitro* and *in vivo*. *Cell Cycle* 10, 2380-2389.
66. **Hau, A., Ceppi, P., & Peter, M. E. (2012)** CD95 is part of a Let-7/p53/miR-34 regulatory network. *PLoS ONE* 7, e49636.
67. **Leverkus, M., & Trautmann, A. (2006)** CD95-mediated signals in the skin: going out with an (inflammatory) bang? *J. Invest. Dermatol.* 126, 2364-2366.
68. **Kerstan, A., Leverkus, M., & Trautmann, A. (2009)** Effector pathways during eczematous dermatitis: where inflammation meets cell death. *Exp. Dermatol.* 18, 893-899.
69. **Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H. U., Graeve, T., Noll, M., Bröcker, E.-B., Blaser, K., & Akdis, C. A. (2000)** T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J. Clin. Invest.* 106, 25-35.
70. **Farley, S. M., Dotson, A. D., Purdy, D. E., Sundholm, A. J., Schneider, P., Magun, B. E., & Jordanov, M. S. (2006)** Fas ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2438-2451.
71. **Xiao, H., Rawal, M., Hahm, E. R., & Singh, S. V. (2007).** Benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. *Cell Cycle* 6, 2826-2834.
72. **Hockley, S. L., Arlt, V. M., Brewer, D., Giddings, I., & Phillips, D. H. (2006)** Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo[*a*]pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2. *BMC Genomics* 7, 260-283.
73. **Solhaug, A., Refsnes, M., & Holme, J. A. (2004)** Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[*a*]pyrene and cyclopenta[*c,d*]pyrene in Hepa1c1c7 cells. *J. Cell. Biochem.* 93, 1143-1154.
74. **Kim, S. J., Ko, C.-B., Park, C., Kim, B.-R., Sung, T.-H., Koh, D.-H., Kim, N.-S., Oh, K.-J., Chung, S.-Y., & Park, R. (2005)** p38 MAP kinase regulates benzo[*a*]pyrene-induced apoptosis through the regulation of p53 activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 121-129.
75. **van Grevenynghe, J., Sparfel, L., Le Vee, M., Gilot, D., Drenou, B., Fauchet, R., & Fardel, O. (2004)** Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 708-716.

6. Literaturverzeichnis

76. **Pei, X. H., Nakanishi, Y., Takayama, K., Bai, F., & Hara, N. (1999)** Benzo[*a*]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *J. Biol. Chem.* 274, 35240-35246.
77. **Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., & Tukey, R. H. (2003)** The role of the Ah receptor and p38 in benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 19526-19533.
78. **Park, K. T., Mitchell, K. A., Huang, G., & Elferink, C. J. (2005)** The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 67, 612-622.
79. **Fritsche, E., Schafer, C., Calles, C., Bernsmann, T., Bernshausen, T., Wurm, M., Hubenthal, U., Cline, J. E., Hajimiragha, H., Schroeder, P., Klotz, L.-O., Rannug, A., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J., & Krutman J. (2007)** Lightning up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8851-8856.
80. **Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., & Abel, J. (2009)** Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 508-520.
81. **Mimura, J., & Fujii-Kuriyama, Y (2003)** Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619 , 263-268.
82. **Ko, H. P., Okino, S. T., Ma, Q., & Whitlock, J. P. (1996)** Dioxin-induced CYP1A1 transcription *in vivo*: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 16, 430-436.
83. **Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., & Perdew, G. H. (2008).** The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 207-250.
84. **Swedenborg, E., & Pongratz, I. (2010)** AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 268, 132-138.
85. **Mathew, L., Simonich, M., & Tanguay, R. (2009)** AHR-dependent misregulation of Wnt signaling disrupts tissue regeneration. *Biochem. Pharmacol.* 77, 498-507.
86. **Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., & Kato, S. (2007)** Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.
87. **Levine-Fridman, A., Chen, L., & Elferink, C. J. (2004)** Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 65, 461-469.
88. **Marlowe, J., Fan, Y., Chang, X., Peng, L., Knudsen, E., Xia, Y., & Puga, A. (2008)** The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 19, 3263-3271.
89. **Schmidt, J. V, Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C., & Bradfield, C. A. (1996)** Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6731-6736.

6. Literaturverzeichnis

90. **Mimura, J., Yamashita, K., & Nakamura, K. (1997)** Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2, 645-654.
91. **Fernandez-Salguero, P., Ward, J. M., Sundberg, J. P., & Gonzalez, F. J. (1997)** Lesions of Arylhydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet. Pathol.* 34, 605-614.
92. **Okey, A. B. (2007)** An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the Deichmann Lecture, International Congress of Toxicology-XI. *Toxicol. Sci.* 98, 5-38.
93. **Kalmes, M., Neumeyer, A., Rio, P., Hanenberg, H., Fritsche, E., & Blömeke, B. (2006)** Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). *Biol. Chem.* 387, 1201-1207.
94. **Kalmes, M., Hennen, J., Clemens, J., & Blömeke, B. (2011)** Impact of aryl hydrocarbon receptor (AhR) knockdown on cell cycle progression in human HaCaT keratinocytes. *Biol. Chem.* 392, 643-651.
95. **Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., & Stockinger, B. (2008)** The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106-109.
96. **Esser, C., Rannug, A., & Stockinger, B. (2009)** The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.* 30, 447-454.
97. **Jux, B., Kadow, S., & Esser, C. (2009)** Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol. (Baltimore, Md. : 1950)* 182, 6709-6717.
98. **Luu-The, V., Duche, D., Ferraris, C., Meunier, J. R., Leclaire, J., & Labrie, F. (2009)** Expression profiles of phases 1 and 2 metabolizing enzymes in human skin and the reconstructed skin models Episkin and full thickness model from Episkin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 116, 178-186.
99. **Hakkola, J., Pasanen, M., Pelkonen, O., Hukkanen, J., Evisalmi, S., Anttila, S., Rane, A., Mäntylä, M., Purkunen, R., Saarikoski, S., Tooming, M., & Raunio, H. (1997)** Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis* 18, 391-397.
100. **Tigges, J., Weighardt, H., Wolff, S., Götz, C., Förster, I., Kohne, Z., Huebenthal, U., Merk, H. F., Abel, J., Haarmann-Stemmann, T., Krutmann, J., & Fritsche, E. (2013)** Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) function revisited: repression of CYP1 activity in human skin fibroblasts is not related to AhRR expression. *J. Invest. Dermatol.* 133, 87-96.
101. **Haarmann-Stemmann, T., & Bothe, H. (2007)** Analysis of the transcriptional regulation and molecular function of the aryl hydrocarbon receptor repressor in human cell lines. *Drug Metab. Dispos.* 35, 2262-2269.
102. **Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., & Speit, G. (2005)** The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-254.
103. **Speit, G., & Hartmann, A. (1995)** The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559.
104. **Park, S. Y., Lee, S. M., Ye, S. K., Yoon, S. H., Chung, M. H., & Choi, J. (2006)** Benzo[*a*]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol. Lett.* 167, 27-33.

6. Literaturverzeichnis

105. **Sheaff, R., Ilsley, D., & Kuchta, R. (1991)** Mechanism of DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin. *Biochemistry* 30, 8590-8597.
106. **Byrnes, J. J. (1984)** Structural and functional properties of DNA polymerase delta from rabbit bone marrow. *Mol. Cel. Biochem.* 62, 13-24.
107. **Cheng, C. H., & Kuchta, R. D. (1993)** DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry* 32, 8568-8574.
108. **Speit, G., Schütz, P., & Hoffmann, H. (2004)** Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol. Lett.* 153, 303-310.
109. **Pfeiffer, E. (2012)** Entwicklung von Ersatzmethoden zum Tierversuch: Optimierung und Modifikation des Comet Assays zum Nachweis genotoxischer Effekte in 3D-Hautmodellen und Keratinozyten. Masterarbeit, Bundesinstitut für Risikobewertung & Charité-Universitätsmedizin, Berlin.
110. **Venkatachalam, S., Denissenko, M., & Wani, A. A. (1997)** Modulation of (+/-)-anti-BPDE mediated p53 accumulation by inhibitors of protein kinase C and poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* 14, 801-809.
111. **Kuroki, T., Nemoto, N., & Kitano, Y. (1980)** Metabolism of benzo[a]pyrene in human epidermal keratinozytes in culture. *Carcinogenesis* 1, 559-565.
112. **Umannova, L., Machala, M., Topinka, J., Novakova, Z., Milcova, A., Kozubik, A., & Vondracek, J. (2008)** Tumor necrosis factor-alpha potentiates genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression. *Mutat. Res.*, 640(1-2), 162-169.
113. **Lei, W., Yu, R., Mandlekar, S., & Kong, A. N. (1998)** Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo[a]pyrene. *Cancer Res.* 58, 2102-2106.
114. **Perez, D. S., Armstrong-Lea, L., Fox, M. H., Yang, R. S. H., & Campain, J. A. (2003)** Arsenic and benzo[a]pyrene differentially alter the capacity for differentiation and growth properties of primary human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Sci.* 76, 280-290.
115. **Swanson, H. I. (2004)** Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem. Biol. Interact.* 149, 69-79.
116. **Schwarz, M., Buchmann, A., Stinchcombe, S., & Kalkuhl, T. (2000)** Ah receptor ligands and tumor promotion survival of neoplastic cells. *Toxicol. Lett.* 112-113, 69-77.
117. **Neis, M. M., Wendel, A., Wiederholt, T., Marquardt, Y., Jousen, S., Baron, J. M., & Merk, H. F. (2010)** Expression and induction of cytochrome p450 isoenzymes in human skin equivalents. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23, 29-39.
118. **Hu, T., Khambatta, Z. S., Hayden, P. J., Bolmarcich, J., Binder, R. L., Robinson, M. K., Carr, G. J., Tiesman, J. P., Jarrold, B. B., Osborne, R., Reichling, T. D., Nemeth, S. T., & Aardema, M. J. (2010)** Xenobiotic metabolism gene expression in the EpiDerm *in vitro* 3D human epidermis model compared to human skin. *Toxicol. In Vitro* 24, 1450-1463.
119. **Fitch, M. E., Cross, I. V., & Ford, T. M. (2003)** p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, *in vivo*. *Carcinogenesis* 24(5), 843-850.

7. Publikationsliste

7.1 Publikationen

Henkler, F., Stolpmann, K., & Luch, A. (2012) Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS*, 101, 107-131.

Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Hutzler, C., & Luch, A. (2012) Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo[*a*]pyrene. *Toxicol. Sci.*, 131, 351-359

Stolpmann, K., Brinkmann, J., Salzmann, S., Genkinger, D., Fritsche, E., Hutzler, C., Wajant, H., & Henkler, F. (2012) Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitises human keratinocytes for CD95L- and TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Dis.*, 3, e388.

7.2 Konferenzbeiträge

Stolpmann, K., Henkler, F., Hutzler, C., Desai, D., Amin, S., Luch, A. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons in consumer products – metabolism and toxicity in human skin. *European Societies of Toxicology Meeting 2009, Dresden, Poster*

Brinkmann, J., Hutzler, C., Trappe, S., Stolpmann, K., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Luch, A. (2010) Comparative studies on the biotransformation of benzo[*a*]pyrene in human keratinocytes, *in vitro* skin models and skin *ex vivo*: metabolite patterns as indicator for the metabolic capacity of skin equivalents? *DECHEMA Skin in Vitro 2010, Frankfurt am Main, Poster*

Stolpmann, K., Brinkmann, J., Hutzler, C., Henkler, F., Luch, A. (2010) Benzo[*a*]pyrene sensitizes human keratinocytes for FasL-induced apoptosis . *Cancer and Metabolism: Pathways to the Future 2010, Edinburgh, Poster*

Brinkmann, J., Hutzler, C., Trappe, S., Stolpmann, K., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., Luch, A. (2011) Biotransformation of benzo[*a*]pyrene and cinnamic aldehyde in *in vitro* skin models and human skin *ex vivo* confirm comparable metabolic capacities. *8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2011, Montreal, Poster*

Stolpmann, K., Brinkmann, J., Salzman, S., Genkinger, D., Fritsche, E., Hutzler, C., Wajant, H., Luch, A., Henkler, F. (2011) Activation of the aryl hydrocarbon receptor sensitizes human keratinocytes for CD95L-induced apoptosis. *7th Düsseldorf Symposium on Immunotoxicology 2011, Düsseldorf, Poster*

Brinkmann, J., Hutzler, C., Trappe, S., Stolpmann, K., Bock, U., Liebsch, M., Henkler, F., & Luch, A. (2011) Biotransformation of benzo[a]pyrene and cinnamic aldehyde in *in vitro* skin models and human skin *ex vivo* confirm comparable metabolic capacities. *In Vitro Testing Industrial Platform Spring 2011 Meeting, Monte Carlo, Poster*