Bedeutung von Arylhydrocarbon Rezeptor regulierten Phase I Enzymen für die Kanzerogenität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte
Dissertation

(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Stefanie Knerr

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
Kaiserslautern 2006

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. Oktober 2006

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk zwischen Mai 2002 und Februar 2006 durchgeführt.

Sein und Wissen ist ein uferloses Meer: Je weiter wir vordringen, umso unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt; jeder Triumph des Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.

Isaac Newton

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 4
2 Abbildungsverzeichnis 8
3 Tabellenverzeichnis 13
4 Abkürzungsverzeichnis 15
5 Theorie 19
5.1 Chemische Kanzerogenese 19
5.1.1 Kanzerogenese Mehrstufenmodell 19
5.1.2 Gentoxische und nicht-gentoxische Kanzerogene 20
5.2 Apoptose 21
5.3 Fremdstoffmetabolismus 24
5.3.1 Mehrphasen-Konzept des Fremdstoffmetabolismus 25
5.3.2 Enzyme des Fremdstoffmetabolismus 25
5.3.3 Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYP) 26
5.3.3.1 Enzymatischer Mechanismus 27
5.3.3.2 Die CYP1A Unterfamilie 28
5.3.4 Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) 29
5.3.4.1 Struktur des AhR 29
5.3.4.2 AhR Signaltransduktion und CYP1A Induktion 31
5.3.4.3 Liganden des AhR 34
5.4 Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe 36
5.4.1 Allgemein 36
5.4.2 Toxicity Equivalency Factors (TEFs) 37
5.4.3 TCDD 40
5.4.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften 40
5.4.3.2 Produktion, Verwendung und Exposition 40
5.4.3.3 Toxikokinetik 41
5.4.3.4 Metabolismus und Ausscheidung 42
5.4.3.5 Toxizität 43
5.4.3.6 Kanzerogenität 47
5.4.3.7 Mechanistische Aspekte 62
5.5 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) 65
5.5.1 Endogene Entstehung von ROS im Fremdstoffmetabolismus 69
5.6 Oxidative DNA-Modifikationen und Reparatur 71
5.7 Transgene Mäuse 75

5.8 Das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem 76
6 Problemstellung....78
7 Material und Methoden 81
7.1 Geräteliste....81
7.2 Material 83
7.3 Methoden 83
7.4 Generierung der transgenen, hCYP1A1 überexprimierenden Maus 84
7.4.1 Generierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 84
7.4.1.1 Umklonierung des humanen CYP1A1 cDNA Klons IRAKp961N1042 .... aus dem Vektor pCMV•SPORT6 in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet 84
7.4.1.2 Insert 86
7.4.1.3 Vektor 89
7.4.1.4 Klonierung 91
7.4.1.5 Lagerung von Plasmiden 93
7.4.2 Sequenzierung des Plasmids 93
7.4.3 Generierung der transgenen Maus mittels Pronucleusinjektion....94
7.4.3.1 Aufreinigung des Transgen-Konstruktes....95
7.4.3.2 Pronucleus Mikroinjektion....95
7.4.3.3 Screening nach transgenen Foundern (F0-Generation) 96
7.4.3.4 Weiterzucht der F0-Founder 97
7.4.4 Luciferase-Reportergenassay zur Bestimmung der tTA-Expression 100
7.4.5 F1-Zucht.... 101
7.4.5.1 Genotypisierung der F1-Generation 101
7.4.5.2 Organpräparation von doppelt-transgenen F1-Foundern.... 102
7.5 Versuchstierhaltung und weitere Versuchstiere 102
7.5.1 verwendete Mauslinien 103
7.5.1.1 Inzuchtstamm C57/B6.... 103
7.5.1.2 Auszuchtstamm NMRI 103
7.5.1.3 Die transgene CA-AhR Mauslinie.... 103
7.5.2 verwendete Rattenlinie.... 104
7.5.2.1 Sprague-Dawley Linie 104
7.5.3 Tierbehandlung und Organentnahme.... 105
7.6 Mikrosomenpräparation aus Gewebe 106
7.7 Proteinbestimmung.... 107
7.8 RNA-Isolierung mit Trizol®.... 108
7.9 RNA Agarose Gelelektrophorese.... 108
7.10 cDNA-Synthese 110

7.11 Real-time PCR ... 111
7.12 SDS-PAGE ... 113
7.13 Western-Blot ... 115
7.14 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)-Aktivität ... 117
7.15 Quantifizierung von 8-oxo dG ... 119
7.15.1 Isolierung der genomischen DNA ... 119
7.15.2 DNA-Hydrolyse ... 120
7.15.3 HPLC-MS ... 121
7.16 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der Leber der Maus ... 122
7.16.1 RNA-Isolierung ... 124
7.16.2 RNA-Qualitätskontrolle ... 124
7.16.3 *In-vitro* Transkription und Dot-Blot ... 124
7.16.4 Hybridisierung und Detektion ... 125
7.16.5 Auswertung und Dokumentation ... 126
7.17 H_2DCFDA-Assay ... 127
7.17.1 Lebermikrosomen-Ansatz ... 128
7.17.2 Supersomes™ ... 129
7.18 Statistische Auswertung ... 130
8 Ergebnisse ... 131
8.1 Generierung und Charakterisierung der CYP1A1 transgenen Maus ... 131
8.1.1 Generierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 ... 132
8.1.2 Sequenzierung ... 134
8.1.3 Aufreinigung des Transgen-Konstruktes ... 137
8.1.4 Pronucleusinjektion ... 138
8.1.5 Screening nach transgenen Foundern (F0 Generation) ... 139
8.1.6 F1-Zucht ... 140
8.2 Charakterisierung der hCYP1A1 Expression in den transgenen Mauslinien ... 142
8.2.1 Real-time PCR ... 142
8.2.1.1 Qualitätskontrolle der für die Real-time PCR präparierten RNA ... 142
8.2.1.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J ... 144
8.2.1.3 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J ... 145
8.2.1.4 CYP1A1 mRNA Expression in mit TCDD behandeltem Lebergewebe ... 146
8.2.2 Luciferase-Reportergenassay in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J ... 147
8.2.3 Western-Blot ... 148
8.2.3.1 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J ... 149
8.2.3.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J ... 150

8.2.4 EROD Assay 152
8.2.4.1 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)..... 152
8.2.4.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J..... 153
8.3 Expression des AhR Repressorproteins in verschiedenen Organen ..... transgener- sowie TCDD behandelter Mäuse 155
8.3.1 AhRR mRNA Expression in der doppelt transgenen Mauslinie ..... Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J und in Wildtyp C57/B6 Mäusen..... 155
8.3.2 AhRR mRNA Expression in der transgenen Mauslinie CA-AhR ..... sowie in TCDD behandelten Mäusen 156
8.4 Zusammenhang zwischen TCDD vermittelter CYP1A Induktion und ..... Bildung von ROS bzw. oxidativen DNA-Schäden 157
8.4.1 Maus 159
8.4.1.1 H_2DCFDA-Assay 160
8.4.1.2 8-oxo dG 161
8.4.1.3 EROD..... 162
8.4.1.4 Western-Blot 163
8.4.2 Ratte..... 164
8.4.2.1 H_2DCFDA-Assay 165
8.4.2.2 8-oxo dG 166
8.4.2.3 EROD..... 168
8.4.2.4 Western-Blot 170
8.4.3 Analyse des ROS Bildungspotenzials individueller CYPs in Supersomes™..... 171
8.4.4 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der ..... Leber von TCDD behandelten- und transgenen CA-AhR Mäusen 175
9 Diskussion 184
9.1 Generierung und Charakterisierung der hCYP1A1 transgenen Maus..... 185
9.2 Zusammenhang zwischen TCDD vermittelter CYP1A Induktion und ..... Bildung von ROS bzw. oxidativen DNA-Schäden 192
9.3 Analyse des ROS Bildungspotenzials individueller CYPs in Supersomes™..... 199
9.4 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der ..... Leber von TCDD behandelten- und transgenen CA-AhR Mäusen 202
10 Zusammenfassung 206
11 Literaturverzeichnis..... 209
12 Lebenslauf 243
13 Publikationen..... 244
14 Danksagung 246
15 Anhang

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese

Abbildung 2 Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen der Zelle während Apoptose und Nekrose

Abbildung 3 Querschnitt durch die ER-Membran mit kreisförmig um ein Molekül Reduktase angeordneten CYPs

Abbildung 4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenierung

Abbildung 5 Schematische Darstellung der Struktur des AhR

Abbildung 6 Schematische Darstellung des AhR Signaltransduktionsweges

Abbildung 7 Strukturformeln ausgewählter polychlorierter aromatischer Kohlenwasserstoffe

Abbildung 8 Sequenzielle Reduktion von molekularem Sauerstoff

Abbildung 9 Fenton-Reaktion

Abbildung 10 Haber-Weiss-Reaktion

Abbildung 11 Redox-Cycling eines Chinons

Abbildung 12 Katalytische Reaktion der Superoxiddismutase

Abbildung 13 Katalytische Reaktion der Katalase

Abbildung 14 Katalytische Reaktion der Glutathionperoxidase

Abbildung 15 Oxidation und Reduktion von Glutathion durch GPx bzw. GSR

Abbildung 16 Möglichkeiten der ROS Entstehung während der CYP katalysierten Monooxygenierung

Abbildung 17 Keto-Enolgleichgewicht von 8-Oxoguanin

Abbildung 18 Entstehung von FaPy durch Modifikation von Desoxyguanin

Abbildung 19 Schematische Darstellung der Basen-Exzisions-Reparatur

Abbildung 20 Schematische Darstellung des Tet-off Prinzips

Abbildung 21 Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1), mRNA

Abbildung 22 Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site (MCS) von pCMV·SPORT6/ IRAKp961N1042

Abbildung 23 Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site (MCS) von pBiEGFP-Tet

Abbildung 24 Schematische Darstellung der Pronucleusinjektion zur Erzeugung transgener Nachkommen

Abbildung 25 Injektion des Transgen-Konstrukts in den männlichen Vorkern

Abbildung 26 Plasmid pUHD15-1

Abbildung 27 Plasmid pUHC13-3

Abbildung 28 Autoregulatorische Strategie für induzierbare Genexpression

Abbildung 29 Die Luciferase-Reaktion

Abbildung 30 Schematische Darstellung des Wildtyp Maus AhR (mAhR) und des konstitutiv aktiven AhR (CA-AhR)

Abbildung 31 CYP1A-vermittelte Reaktion von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Abbildung 32 Reaktion von Fluorescamin mit Proteinen

Abbildung 33 Schematischer Ablauf eines Microarray-Experiments

Abbildung 34 Mechanismus der Fluoreszenzbildung beim H_2DCFDA-Assay

Abbildung 35 Elektrophoretische Auftrennung des jeweils mit MluI/NheI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet und des PCR-Produktes hCYP1A1 (Insert)

Abbildung 36 Elektrophoretische Auftrennung des unverdauten, mit MluI/NheI bzw. EcoRI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1

Abbildung 37 Sequenz-Alignment des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 mit der humanen CYP1A1 cDNA

Abbildung 38 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBi-EGFP-Tet/hCYP1A1

Abbildung 39 Elektrophoretische Auftrennung des mit AatII/VspI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1, sowie des aufgereinigten Transgen-Konstruktes

Abbildung 40 Screening nach hCYP1A1-GFP-TRE transgenen Foundern: PCR-Produkte von 42 Nachkommen

Abbildung 41 Schematische Darstellung des Verpaarungsschemas von NMRI-Tg(GFP-TRE-Cyp1A1)- und tTA exprimierenden Mauslinien

Abbildung 42 Screening nach tTA transgenen Foundern: PCR-Produkte von 15 Nachkommen

Abbildung 43 Exemplarisches Beispiel aufgetrennter RNA im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel

Abbildung 44 Real-time PCR: mRNA Expression von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

Abbildung 45 Real-time PCR: mRNA Expression von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J

Abbildung 46 PCR Real-time PCR: mRNA Expression von Maus CYP1A1 in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse bzw. in der Kontrolle

Abbildung 47 Luciferase-Reportergenassay: relative Expression von tTA in verschiedenen Organen der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J sowie in der Leber von Wildtyp C57/B6 Mäusen

Abbildung 48 Repräsentative Western Blots der CYP1A1 Proteinexpression unterschiedlicher Organe in der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

Abbildung 49 Repräsentative Western Blots der CYP1A1 Proteinexpression in unterschiedlichen Organen der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

Abbildung 50 Katalytische Aktivität von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) im EROD Assay

Abbildung 51 Katalytische Aktivität von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J im EROD Assay

Abbildung 52 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle

Abbildung 53 Real-time PCR: mRNA Expression von Maus AhRR in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc) 1Dgs/J sowie im Wildtyp C57/B6

Abbildung 54 Real-time PCR der AhRR mRNA Expression in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR sowie in TCDD behandelten Mäusen

Abbildung 55 Exemplarische Darstellung der drei charakteristischen Massenübergänge bei der Quantifizierung von 8-oxo dG mittels HPLC-MS

Abbildung 56 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Mikrosomen aus männlicher und weiblicher Mausleber

Abbildung 57 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber

Abbildung 58 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR bzw. in der Wildtyp Kontrolle

Abbildung 59 Repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle und im Wildtyp, sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR

Abbildung 60 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten; TCDD Dosis = 1 µg/kg KG für 96 h

Abbildung 61 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten; TCDD Dosis = 10 µg/kg KG für 14 Tage

Abbildung 62 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber; TCDD Dosis = 1 µg/kg KG für 96 h

Abbildung 63 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber; TCDD-Dosis = 10 µg/kg KG für 14 Tage

Abbildung 64 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle

Abbildung 65 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten (10 µg/kg KG für 14 Tage) bzw. in der Kontrolle

Abbildung 66 Repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber männlicher und weiblicher, TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten bzw. in der Kontrolle

Abbildung 67 H_2DCFDA-Assay zur Bestimmung des ROS Bildungspotenzials individueller, isolierter CYPs in Supersomes™

Abbildung 68 Spezifische EROD-Aktivität in Supersomes™

Abbildung 69 Repräsentative cDNA Membranen des GEArray™ Q Series gene expression Arrays „Stress and Toxicity“ unterschiedlich behandelter Proben

Abbildung 70 Scatterplot der Auswertung für TCDD-behandelte Tiere und deren entsprechende Kontrollen

Abbildung 71 Scatterplot der Auswertung für transgene CA-AhR Tiere und deren entsprechende Wildtyp Kontrollen

Abbildung 72 Darstellung der x-fachen Veränderung der Genexpression in TCDD behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle in Bezug auf das normalisierte Hauskeeping-Gen ß-Actin

Abbildung 73 Darstellung der x-fachen Veränderung der Genexpression in CA-AhR Mäusen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle in Bezug auf das normalisierte Hauskeeping-Gen ß-Actin

Abbildung 74 ROS Bildung in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden, gemessen mittels H_2DCFDA Assay

Abbildung 75 8-oxo dG Gehalte in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden, gemessen mittels HPLC-MS

Abbildung 76 Spezifische EROD Aktivität in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden

Abbildung 77 Effekte einer Einzeldosis TCDD (1 oder 3 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden) auf die 8-oxo dG Bildung in weiblichen Sprague-Dawley Ratten

Abbildung 78 TCDD induzierte 8-oxo dG Bildung im Tumorpromotionsexperiment in weiblichen Sprague-Dawley Ratten (Initiation: 175 mg/kg KG DEN, Einzeldosis; Promotion: 700 ng/kg KG TCDD wöchentlich für 30 Wochen)

Abbildung 79 Schematische Darstellung von Prozessen, die an der kanzerogenen Wirkung von TCDD beteiligt sein könnten

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TEF-Schema für I-TEQ

Tabelle 2 TEF-Schema für TEQ-WHO_{94}

Tabelle 3 TEF-Schema für TEQ-WHO_{98}

Tabelle 4 TEF-Schema für TEQ-WHO_{2006}

Tabelle 5 LD_{50} Daten für TCDD nach akuter Gabe in verschiedenen Spezies

Tabelle 6 Übersicht der vorhandenen TCDD Langzeitkanzerogenitätsstudien am Nager

Tabelle 7 Studien mit TCDD und bekannten Tumorpromotoren am Nager

Tabelle 8 Standardmortalitätsraten und relatives Krebsrisiko von TCDD-exponierten Kohorten

Tabelle 9 Zusammensetzung von LB-Amp-Medium

Tabelle 10 Zusammensetzung von LB-Amp-Agar

Tabelle 11 PCR-Ansatz zur Amplifikation der humanen CYP1A1 cDNA

Tabelle 12 PCR-Programm zur Amplifikation der humanen CYP1A1 cDNA

Tabelle 13 Zusammensetzung von 50x TAE-Puffer

Tabelle 14 PCR Genotypisierungsprotokoll zur Identifizierung transgener Founder (F0-Generation)

Tabelle 15 PCR Genotypisierungsprotokoll zur Identifizierung transgener F1-Founder

Tabelle 16 Schematische Darstellung der Tierversuchsgruppen und Behandlungen

Tabelle 17 Zusammensetzung von 1x Isotonic Extraction Buffer

Tabelle 18 Zusammensetzung von 50 mM NaPi Puffer, pH 7.6

Tabelle 19 Zusammensezung von RNA-Auftragspuffer

Tabelle 20 Zusammensetzung von 10x MOPS

Tabelle 21 Zusammensetzung von DEPC-Wasser

Tabelle 22 Zusammensetzung des MOPS-Formaldehyd-Agarosegels

Tabelle 23 RT-Ansatz für die Real-time PCR

Tabelle 24 Reaktionsprotokoll zur Durchführung der Real-time PCR

Tabelle 25 Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die Real-time PCR

Tabelle 26 Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel in der SDS-PAGE

Tabelle 27 Zusammensetzung von 10xSDS-Laufpuffer

Tabelle 28 Zusammensetzung von 6x Ladepuffer

Tabelle 29 Zusammensetzung von 1x Blotting-Puffer

Tabelle 30 Zusammensetzung von Blocking-Puffer

Tabelle 31 Zusammensetzung von TBS und TBS-Tween

Tabelle 32 Reaktionsansatz für 1 Well im EROD-Assay

Tabelle 33 Zusammensetzung von NaPi-Puffer, pH 8.0

Tabelle 34 Zusammensetzung von Nuclei Lysis Puffer

Tabelle 35 Zusammensetzung von Tris EDTA, pH 8.0

Tabelle 36 Zusammensetzung der Puffer für die DNA-Hydrolyse

Tabelle 37 Verwendete Kits und Reagenzien zur Durchführung des Arrayexperiments

Tabelle 38 Zusammensetzung der Waschpuffer

Tabelle 39 Zusammensetzung von 20x SSC

Tabelle 40 Reaktionsansatz mit Mikrosomenproben im H_2DCFDA-Assay für 1 Well

Tabelle 41 Reaktionsansatz mit Supersomes™-Proben im H_2DCFDA -Assay für 1 Well

Tabelle 42 Eingesetzte Testsubstanzen und Konzentrationen im H_2DCFDA–Assay mit Supersomes™

Tabelle 43 Übersicht über die durchgeführten Mikroinjektionen

Tabelle 44 Auflistung der Gene, die bei TCDD behandelten bzw. CA-AhR transgenen Mäusen um mindestens den Faktor 2 reguliert wurden

4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro
8-MOP	8-Methoxypsoralen
8-oxo dG	7,8-Dihydro-8-oxo-2´-desoxyguanosin
Abb.	Abbildung
ADI	acceptable daily intake
AhR	aryl hydrocarbon receptor
AhRR	aryl hydrocarbon receptor repressor
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APS	Ammoniumperoxosulfat
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	base excision repair
bHLH	basic helix-loop-helix
bidest. H_2O	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
CA-AhR	constitutively active aryl hydrocarbon receptor
CAT	Katalase
cDNA	komplementäre DNA
CO_2	Kohlendioxid
CYP	Cytochrom P450
dATP	2’-desoxy-Adenosin-5’-Triphosphat
dCTP	2’-desoxy-Cytidin-5’-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dG	Desoxyguanosin
dGTP	2’-desoxy-Guanosin-5’-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DRE	Dioxin responsive element
dTTP	2’-desoxy-Thymidin-5’-Triphosphat

E2	17ß-Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ER	Ethoxyresorufin
EROD	7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase
for	forward
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GSR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H_2DCF	2´,7´-Dihydrodichlorfluorescein
H_2DCFDA	2´,7´-Dihydrodichlorfluorescein-Diacetat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography
hsp 90	heat shock protein 90
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LC-MS	liquid chromatography coupled with mass spectrometer
LD_{50}	lethale Dosis (bei 50%)
M	molar
m	milli
min	Minute
MOPS	4-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	nano
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NER	nucleotid excision repair
NES	nuclear export signal

NLS	nuclear localisation signal
NOAEL	no observed adverse effect level
NRE	negative regulatory element
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatiche Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
PCR	polymerase chain reaction
Per	period
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	revers
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
RT	reverse Transkription
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sim	single minded
Std.	Stunde
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TEQ	TCDD-Equivalents
Tet	Tetrazyklin
tg	transgen
TGF	transforming growth factor
TRE	Tetrazyklin-responsives Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tTA	tet transcriptional activator
u	units
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	volume per volume

w/v	weight per volume
WHO	World Health Organisation
XAP2	hepatitis B virus X-associated protein 2
XRE	xenobiotic responsive element

5 Theorie

5.1 Chemische Kanzerogenese

Kaum eine andere Erkrankung wird so sehr gefürchtet wie Krebs und keine andere toxische Wirkung belastet eine Substanz so sehr wie das Stigma „krebserzeugend“. Unter Krebs wird ein bösartiger Tumor verstanden, dessen Wachstum autonom und überschießend ist. Zellatypien, invasives Wachstum sowie Metastasierungen sind typische pathologische Charakteristika maligner Tumoren. Obwohl ionisierende Strahlung, Viren, Ernährungsverhalten und genetische Vorbelastung ebenfalls als Ursachen für die Krebsentstehung beim Menschen zu nennen sind, gilt es heute als gesichert, dass die Mehrzahl menschlicher Tumoren durch Einwirkung chemischer Substanzen verursacht werden. Heute stellen Krebserkrankungen in der westlichen Welt nach Herz-Kreislauf Problemen die zweithäufigste Todesursache dar [Marquardt und Schaefer 2004].

5.1.1 Kanzerogenese Mehrstufenmodell

Der Übergang einer gesunden Zelle in eine Krebszelle und deren Wachstum zu einem Tumor ist ein mehrstufiger Prozess, der Zeit benötigt. Dieser Prozess wird in drei Stufen aufgeteilt: Initiation, Promotion und Progression.

Die Initiation stellt die irreversible Veränderung des genetischen Materials dar, die an die Tochterzellen weitergegeben wird. Sie besteht in Mutationen des Genoms, die in kurzer Zeit (Stunden bis Tage) vollzogen sind. Auslöser hierfür können ionisierende Strahlung oder gentoxische Kanzerogene (z.B. *N*-Nitrosoverbindungen) sein. Erfolgt keine Behebung des DNA-Schadens und bleibt die Eliminierung der geschädigten Zellen aus, so wird der Schaden bei der nächsten Zellteilung als Mutation fixiert [Cayama *et al.* 1978; Pitot und Sirica 1980]. Die Initiation reicht jedoch für eine Tumorentstehung nicht aus.

Während der Promotionsphase wird das Zellwachstum stimuliert, in Gegenwart von Substanzen mit tumorpromovierender Wirkung kommt es zur klonalen Expansion der initiierten Zellen. Die Wirkung des Tumorpromotors ist meist reversibel und muss über Wochen oder Monate anhalten, damit aus initiierten Zellen durch selektive Vermehrung, z.B. in der Leber, präneoplastische Herde (Foci) entstehen. Diese entwickeln sich zu benignen Neoplasien (Noduli) weiter. Das Risiko der Entstehung eines malignen Tumors

korreliert mit der Anzahl der Präneoplasien und deren relativer Größe [Pitot *et al.* 1978; Pitot und Sirica 1980; Rabes *et al.* 1982; Schulte-Hermann 1985].
Durch Initiation und Promotion entstehen zunächst gutartige Tumore. Die Entstehung bösartiger Tumore durch weitere genetische Veränderungen präneoplastischer Zellen wird als Progression bezeichnet. Die Wachstumsautonomie und das Metastasierungspotential des Tumors nimmt dabei zu. Dieser Prozess wird durch weitere Mutationen und andere Vorgänge begünstigt und dauert Monate bis Jahre [Pitot 1989]. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese.

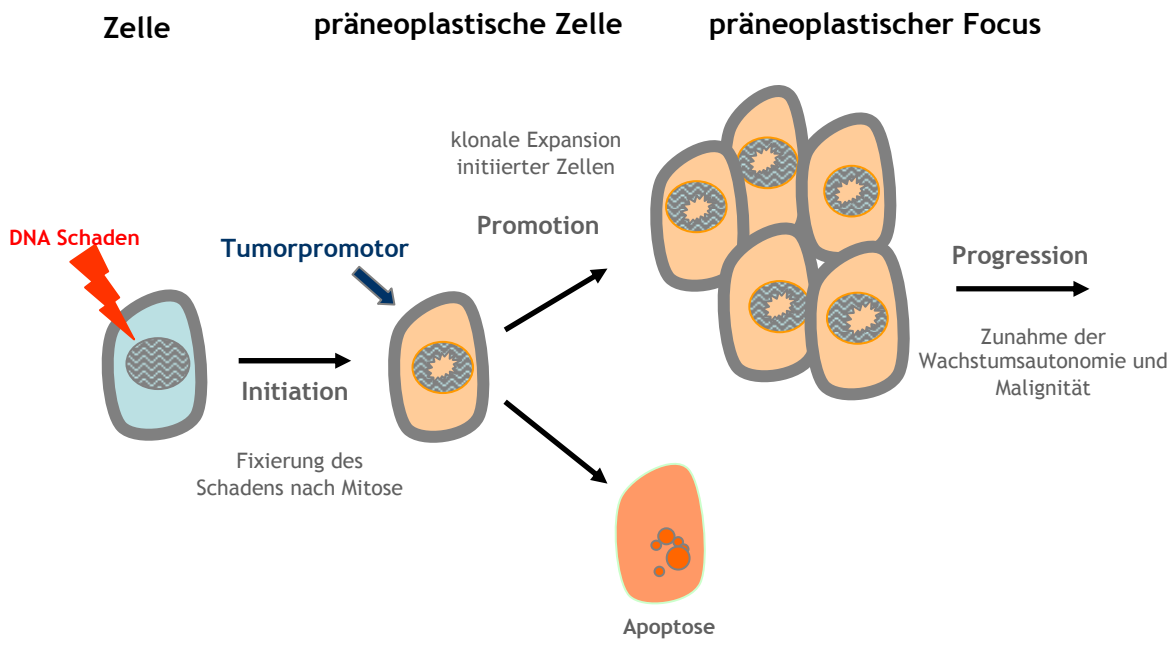


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese

5.1.2 Gentoxische und nicht-gentoxische Kanzerogene

Gentoxische Kanzerogene reagieren mit Bestandteilen der Zelle, insbesondere der DNA und sind mutagen. Man unterscheidet zwischen direkten und indirekten gentoxischen Kanzerogenen. Als direkte Kanzerogene werden Substanzen bezeichnet, die ohne metabolische Aktivierung aktiv sind. Diese Stoffe sind chemisch reaktiv (elektrophil) und reagieren spontan mit Strukturen der Zelle, insbesondere der DNA, wobei sie DNA-Addukte bilden und somit zur Mutation führen. Beispiele sind Epoxide, Nitrosoharnstoffderivate oder Nitrosamide. Indirekte Kanzerogene sind erst nach metabolischer Aktivierung

kanzerogen wirksam. Die überwiegende Anzahl der gentoxischen Kanzerogene ist in dieser Gruppe angesiedelt, als klassisches Beispiel sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zu nennen.
Unter nicht-gentoxischen oder epigenetischen Kanzerogenen werden Substanzen verstanden, für die keine DNA-Reaktion nachweisbar ist und die andere biologische Wirkungen haben, die die Basis für ihre Kanzerogenität sind. Zu diesen gehören u.a. Zytotoxizität mit der Folge gesteigerter regenerativer Zellproliferation, chronischer Entzündungsreaktionen, hormoneller Einflüsse, immunologischer Wirkungen und Tumor-promotion.
Auch Festkörper-Kanzerogene wirken nicht direkt gentoxisch. Zu dieser Klasse zählen neben Asbest auch künstliche Mineralfasern, Steinwolle, Glaswolle sowie Rußpartikel. Diese Substanzen verursachen Tumore in unterschiedlichen Geweben des Respirations-traktes. Meistens geht diesen Tumore eine chronische Entzündung voraus. Es ist eine weit verbreitete Lehrmeinung, dass nicht-gentoxische Kanzerogene im Gegensatz zu gentoxischen Kanzerogenen eine Wirkungsschwelle besitzen.
Viele chemische Kanzerogene können sowohl initiierend als auch promovierend wirken. Sie werden daher als so genannte vollständige oder komplette Kanzerogene bezeichnet [Marquardt und Schaefer 2004].

5.2 Apoptose

In allen Organismen spielt die Regulation des Gleichgewichtes von Zellteilung und Zelltod eine wichtige Rolle. Als Zelltod bezeichnet man den irreversiblen Verlust von zellulärer Struktur und Funktion. Es ist ein Phänomen das essenziell für Entwicklungsprozesse ist. Man denke an die Organentstehung im embryonalen Zustand oder an die Zellerneuerung. Als Beispiel hierfür sei das ständige Absterben und die stete Erneuerung der Zotten in der Darmwand genannt. Auf der anderen Seite ist der Zelltod natürlich auch ein pathologischer Prozess als Konsequenz verschiedenster Einflüsse auf die Zelle [Kerr *et al.* 1972; Gewies 2003; Lawen 2003; Marquardt und Schaefer 2004].
Basierend auf den morphologischen Veränderungen absterbender Zellen, konnten zwei unterschiedliche Muster des Zelltods identifiziert werden, nämlich die Nekrose und die Apoptose.

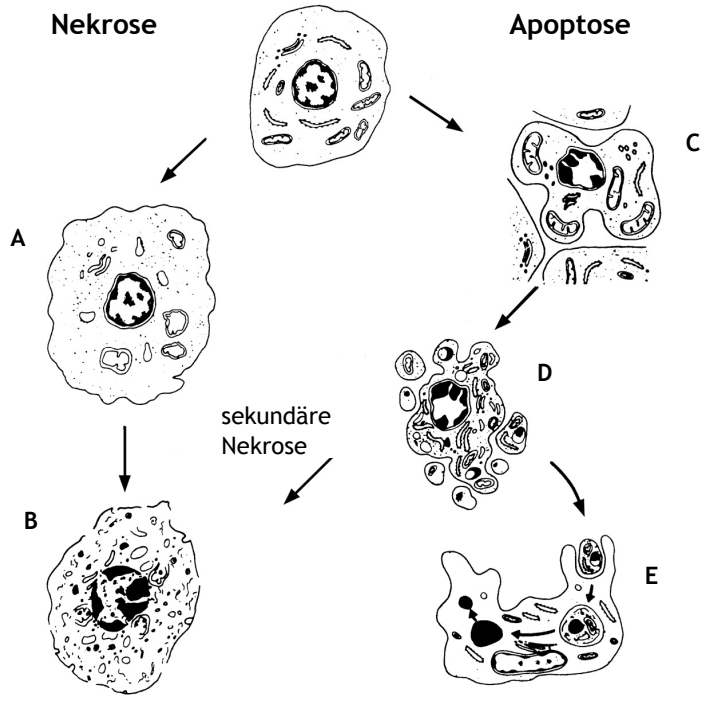


Abbildung 2 Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen der Zelle während Apoptose und Nekrose; nach [Blom 2000]

Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen der Zelle während Apoptose und Nekrose: Bei der Nekrose schwillt die Zelle an (A), platzt auf und setzt die zellulären Komponenten nach Permeabilisierung der Plasmamembran frei (B) Als Folge dessen kommt es zu lokalen Entzündungsreaktionen, da Makrophagen die freigesetzten zellulären Komponenten eliminieren. Bei der Apoptose, oftmals auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet, laufen verschiedene morphologische und biochemische Prozesse ab, die sich von der Nekrose unterscheiden: Eine apoptotische Zelle schrumpft zunächst zusammen und löst sich vom Nachbarzellverband, dabei bleiben die Plasmamembran sowie die zellulären Organellen zunächst intakt (C). Im Zellkern kondensiert das Chromatin an der Kernmembran. Schließlich zerfällt die Zelle in so genannte apoptotische Körperchen (D), welche von Nachbarzellen durch Endocytose aufgenommen werden (E). Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, d.h. sie ist ein Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dadurch unterliegt die Zelle einer strengen Kontrolle, so dass sie, als Konsequenz der Apoptose, ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Initiations- und Effektorphase. Bei der Initiationsphase wird zwischen zwei Vorgängen unterschieden: Dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg.

Der extrinsische Weg wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor Familie (z.B. CD95, auch als Fas-Rezeptor bezeichnet). Diese so genannten Todesrezeptoren verfügen über eine Todesdomäne („death domain“). Liganden sind zum Beispiel der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) sowie weitere Zytokine. Durch Bindung des Liganden trimerisiert der Rezeptor, die Todesdomänen bilden eine Struktur, an welche nun Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne binden können, nämlich das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ (TRADD) und das „Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). Es bindet an die Todesdomäne von TRADD. FADD besitzt neben der Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne (DED, „death effector domain“), über die die Procaspase 8 mit ihrer DED an den Komplex bindet. Diese kann sich nun durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktivieren. Die aktive Caspase 8 löst die so genannte Caspase Kaskade aus, wodurch in einer signalverstärkenden Rückkopplung weitere Caspase 8 Moleküle aktiviert werden.

Beim intrinsischen Weg kommt es durch bislang noch nicht geklärte Mechanismen zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Dieser Weg kann durch Tumorsuppressoren ausgelöst werden, wie z.B. p53, ein Transkriptionsfaktor, der durch DNA Schädigung aktiviert wird. p53 stimuliert die Expression proapoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. Bax, Bad). Diese führen dann zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Durch die Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 (apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD Domäne der Procaspase 9 binden kann. Dies ist Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase 9. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt. Er stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Analog zur Caspase 8 initiiert aktive Caspase 9 die Caspase-Kaskade. Eine Signalverstärkung dieses Weges wird innerhalb der Caspase-Kaskade durch Caspase 7 vermittelt, welche nicht nur Substrate spaltet die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase 9 aktiviert.

So genannte Effektorcaspasen, vornehmlich Caspasen 3, 6 und 7 führen zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie aktivieren sekundäre Zielproteine (z.B. DNase oder andere Caspasen) durch limitierte Proteolyse. Des weiteren sind sie selbst aktiv am Abbau von Lamin (in der Zellkernmembran) und Actin (Teil des Zytoskeletts) beteiligt. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die wiederum durch Phagozyten aufgenommen werden [Hengartner 2000; Stennicke und Salvesen 2000; Strasser *et al.* 2000; Adams und Cory 2001; Curtin und Cotter 2003; Gewies 2003; Marquardt und Schaefer 2004].
Die Störung apoptotischer Prozesse wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Hemmung der Apoptose einen wesentlichen Vorgang im Rahmen der Karzinogenese darstellt. In Tumorzellen steht der Zellproliferation eine zu niedrige Apoptoserate gegenüber. Dies führt zu einer selektiven Vermehrung der malignen Zellen. Die wichtigsten bei der Unterdrückung der Apoptose beteiligten Proteine sind die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2 und Bcl-x) sowie die IAPs (Apoptose-inhibitorische Proteine, engl. inhibitor-of-apoptosis proteins) [Stinchcombe *et al.* 1995; Wörner und Schrenk 1996; Jackel 1998; Gewies 2003; Schrenk *et al.* 2004].

5.3 Fremdstoffmetabolismus

Alle Organismen nehmen täglich eine Vielzahl an Substanzen auf, die sie weder als Baustoffe, noch als Energiesubstrate nutzen können. Damit diese Stoffe sich nicht anreichern, müssen sie vom Körper effizient eliminiert werden. Hauptwege der Elimination sind dabei Niere und Galle, in einem geringeren Maß auch die Lunge und die Muttermilch. Wichtigstes Kriterium für die renale bzw. biliäre Ausscheidung ist eine ausreichende Wasserlöslichkeit der Substanz. Ist dieses Kriterium nicht erfüllt, müssen lipophile Substanzen in einer metabolischen Reaktion zu hydrophileren Produkten transformiert werden. In höheren Organismen ist die Leber das Hauptorgan für die Metabolisierung von Fremdstoffen, aber auch andere Organe wie Darm, Niere und Lunge sind mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen ausgestattet [Marquardt und Schaefer 2004].

5.3.1 Mehrphasen-Konzept des Fremdstoffmetabolismus

Der Metabolismus eines Fremdstoffes verläuft über mehrere, aufeinander folgende Schritte. Im klassischen Modell wird die Funktionalisierungsreaktion als Phase I, die Konjugationsreaktion als Phase II bezeichnet. In Phase I wird zunächst eine funktionelle Gruppe in das Molekül eingefügt, typische Zwischenprodukte sind Epoxide und α,ß-ungesättigte Carbonylverbindungen als elektrophile Intermediate, sowie Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Amino oder Carboxylgruppen als typische nukleophile Komponenten. In Phase II wird der funktionalisierte Phase I Metabolit mit einem hydrophilen, endogenen Baustein (z.B. Glucuronsäure, Glutathion oder Sulfat) konjugiert. Die Konjugation steigert zumeist die Wasserlöslichkeit der Substanz und ermöglicht so die Ausscheidung [Marquardt und Schaefer 2004].

5.3.2 Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Am Phase I Metabolismus sind im wesentlichen Oxidoreduktasen und Hydrolasen beteiligt. Zu den Oxidoreduktasen gehören die Familie der Cytochom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP), die flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO) und die Cyclo-oxygenasen (COX). Diese Enzyme führen molekularen Sauerstoff in ihre Substrate ein oder entziehen ihnen Elektronen. Dehydrogenasen und Reduktasen entziehen ihren Substraten Wasserstoff oder fügen ihn ein. Die Enzymfamilie der Hydrolasen hydrolysieren Ester, Amide, Glucuronide, Sulfate oder Epoxide.
Transferasen sind für die Phase II des Fremdstoffmetabolismus verantwortlich. Glutathion-S-Transferasen katalysieren dabei die Konjugation elektrophiler Substrate, UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT), Acetyltransferasen (AT), Acetyl-CoA-Aminosäure-N-Acyltransferasen und Methyltransferasen die nucleophiler Substrate [Marquardt und Schaefer 2004].

5.3.3 Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen (CYP)

Die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYP) bilden eine Superfamilie von strukturell verwandten Enzymen. Sie werden unterteilt in Familien, Subfamilien und individuelle Formen basierend auf ihrer Nukleinsäure- und Aminosäurehomologie. Die Bezeichnung „P450“ beruht auf dem relativen Absorptionsmaximum bei 450 nm, welches bei der Komplexierung von reduziertem Häm im aktiven Zentrum der Enzyme mit Kohlenmonoxid entsteht. Nach internationaler Übereinkunft werden die Cytochrome zunächst mit CYP bezeichnet, dann mit einer arabischen Ziffer für die Familie (bei mindestens 40 % Sequenzhomologie), dann mit einem lateinischen Großbuchstaben für die Unterfamilie (mindestens 5 % Homologie) und schließlich mit einer weiteren arabischen Ziffer für das individuelle Enzym (Sequenzunterschied mindestens 3 %). Beim Eukaryonten sind CYPs membranständige Enzyme, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, und dort zu einem Komplex mit der Cytochrom P450 Reduktase assoziiert sind. Die Reduktase hat die Aufgabe, Reduktionsäquivalente (NADPH + H^+) auf oxidierte CYPs zu übertragen, damit diese nach Reduktion wieder für eine weitere Monooxygenierung zur Verfügung stehen. Dabei ist ein Reduktasemolekül für die Reduktion von ca. 10-20 CYPs zuständig. Die Reduktase ist mit einem lipophilen Anker in der ER-Membran verankert, um sie herum gruppieren sich die CYPs. Abbildung 3 zeigt eine schematische Abbildung der Anordnung von CYPs und Reduktase in der ER-Membran [Danielson 2002; Heine 2005].
Da alle CYPs Einelektronenakzeptoren sind, kann die Reduktase die zur vollständigen Substratoxidation notwendigen Elektronen nur nacheinander und nicht gleichzeitig übertragen. In einigen Geweben übernimmt auch Cytochrom b_5 den Elektronentransfer für das erste oder zweite Elektron [Schenkman und Jansson 2003].

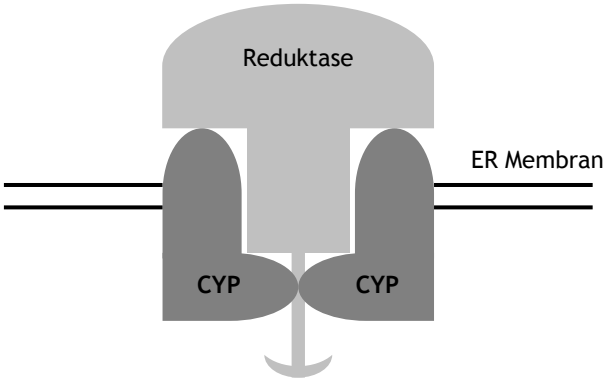


Abbildung 3 Querschnitt durch die ER-Membran mit kreisförmig um ein Molekül Reduktase angeordneten CYPs [Heine 2005]

CYPs sind an vielen Stoffwechselprozessen beteiligt, z.B. an der Biosynthese von Steroidhormonen, Gallensäuren und Eicosanoiden. Die größere Gruppe der CYP, vor allem die Enzyme der CYP1-, CYP2- und CYP3 Familie, katalysieren jedoch wichtige Phase I Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus. Die prosthetische Gruppe der CYPs ist das Hämin, das über ein Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms verankert ist. Nach Reduktion zu Häm bindet es molekularen Sauerstoff. Die enzymatische Monooxygenase-Aktivität beruht auf der reduktiven Spaltung des gebundenen Sauerstoffs. Eines der beiden Sauerstoffatome wird auf ein Akzeptormolekül (Substrat) übertragen, das zweite unter Verbrauch von NADPH zu Wasser reduziert [Nelson 1999; Anzenbacher und Anzenbacherova 2001; Danielson 2002].

5.3.3.1 Enzymatischer Mechanismus

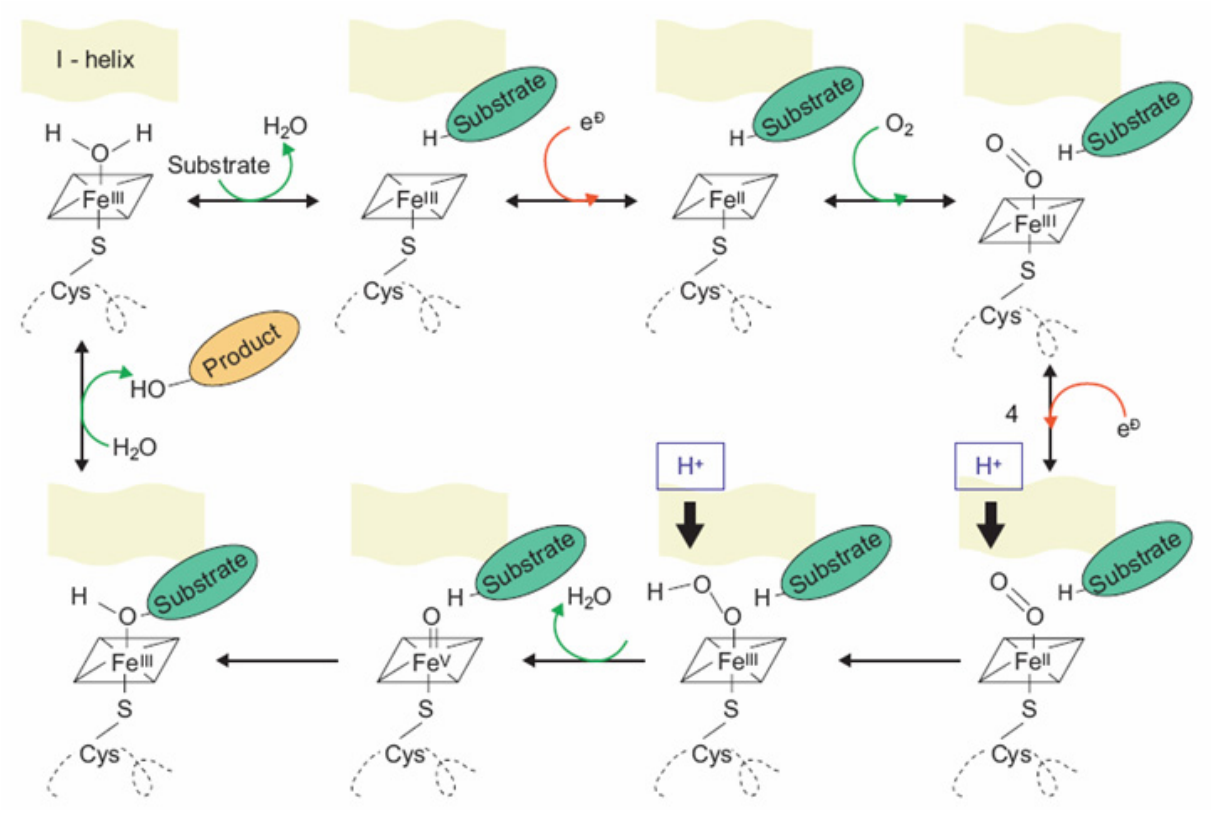


Abbildung 4 Katalytischer Zyklus der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenierung [Werck-Reichhart und Feyereisen 2000]

Über den Ablauf der CYP-katalysierten Monooxygenierung über mehrere Zwischenstufen herrscht folgende Vorstellung: Zunächst bindet das Eisen-(III)-Ion im Häm-Zentrum das Substrat und wird durch Aufnahme eines Elektrons zu Eisen (II) reduziert. Das resultierende Häm kann nun molekularen Sauerstoff in Form eines Fe^{2+}-O_2-Komplexes binden. Der Transfer eines zweiten Elektrons und ein Valenzwechsel des Eisens zu Fe^{3+} reduzieren den gebundenen Sauerstoff zum Peroxid. Unter Aufnahme eines Protons entsteht H_2O, dabei bildet sich ein Ferryl-Sauerstoffkomplex FeO^{3+} mit hohem Sauerstofftransferpotenzial, der das Substrat oxigeniert. Durch Abdissoziation des Produkts kehrt das Enzym in den Ausgangszustand zurück. Der katalytische Zyklus einer CYP vermittelten Monooxygenierung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt [Werck-Reichhart und Feyereisen 2000].

5.3.3.2 Die CYP1A Unterfamilie

Die CYP1A Unterfamilie besteht aus zwei Enzymen, CYP1A1 und CYP1A2, deren Genprodukte am Metabolismus exogener Substanzen, insbesondere planarer Substrate wie z.B. polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs), beteiligt sind [Whitlock 1999]. Es gibt gute Hinweise darauf, dass neben exogenen Substraten auch endogene Substrate wie z.B. Arachidonsäure, Estrogene, Bilirubin und Melatonin metabolisiert werden [Rifkind 2006]. Die Aminosäuresequenzen der beiden CYP1A Gene stimmen bei der Ratte zu 78 %, beim Menschen zu 68 % überein, zudem ist die Genorganisation beider Gene sehr ähnlich [Jaiswal *et al.* 1985; Quattrochi *et al.* 1986]. Beim Nager wird CYP1A1 in sehr geringen Mengen in der Leber und Lunge exprimiert [Ryan und Levin 1990]. Nach Exposition mit einem Induktor, z.B. TCDD, wird CYP1A1 in verschiedenen Geweben stark induziert, CYP1A2 jedoch wird lediglich in der Leber konstitutiv exprimiert [Strom *et al.* 1992]. Im Gegensatz dazu wird CYP1A1 beim Menschen überwiegend in extrahepatischen Geweben wie z.B. Lunge, Plazenta, Haut und Lymphozyten, und nur in geringer Konzentration in der Leber exprimiert. Humanes CYP1A1 ist z.B. durch Zigarettenrauch oder PAKs induzierbar. Die Expression von humanem CYP1A2 ist lediglich in der Leber Erwachsener nachweisbar [Xu *et al.* 2000]. Generell ist zu betonen, dass die Induktionspotenz hepatischer, humaner CYP1A Enzyme, nach Exposition mit einem geeigneten Induktor, wesentlich schwächer ausgeprägt ist als die analoge Induktionspotenz hepatischer CYP1A Enzyme der Ratte [Xu *et al.* 2000; Zeiger *et al.* 2001; Silkworth *et al.* 2005].

5.3.4 Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR)

Wegen der außergewöhnlich hohen Toxizität von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) wurde in der Vergangenheit über die Existenz eines Rezeptors für Dioxin spekuliert. Poland *et al.* gelang schließlich 1982 unter Verwendung von radioaktiv gelabeltem TCDD als Ligand der Nachweis, dass die cytosolische Fraktion der Leber aus C57/B6 Mäusen ein Protein enthält, das Dioxin mit hoher Affinität (im nanomolaren Bereich) reversibel bindet. Das Protein wurde Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) genannt, denn es bindet neben TCDD aromatische Kohlenwasserstoffe („aromatic/aryl hydrocarbons"), oftmals wird der Rezeptor aber auch als „Dioxin-Rezeptor" bezeichnet [Poland und Knutson 1982]. Die Isolierung und Aufreinigung des Rezeptors erfolgte erst im Jahr 1991 durch Photoaffinitätslabeling mit radioaktiv markiertem ^{125}I-2-Azido-3-iodo-7-8-dibromdibenzo-*p*-dioxin [Bradfield *et al.* 1991].
Weitergehende genetische- und Struktur-Aktivitäts Untersuchungen führten zur Identifizierung des AhR als Ligand-aktivierten Transkriptionsfaktor. Die toxikologischen und biologischen Effekte seiner Liganden konnten nun durch Aktivierung einer Vielzahl von Genen erklärt werden. Der AhR ist außerdem für Zelldifferenzierung und Zellwachstum mitverantwortlich. Neben diesen Prozessen ist er auch an der Regulation anderer Signaltransduktionswege, z.B. der Aktivierung zellulärer Prozesse als Antwort auf oxidativen Stress, involviert [Nie *et al.* 2001; Safe 2001; Dalton *et al.* 2002]. Der AhR wird in vielen Geweben unterschiedlich stark exprimiert, unter anderem in Lunge, Leber, Thymus und Testes. Die Sensitivität gegenüber Liganden ist dabei speziesabhängig. Polymorphismen des AhR und seiner Genbatterie nehmen Einfluss auf viele physiologische Prozesse sowie toxische Effekte von Xenobiotika [Carver *et al.* 1994; Hayashi *et al.* 1994; Anttila *et al.* 2001; Cauchi *et al.* 2001; Hahn 2002; Harper *et al.* 2002; Nebert *et al.* 2004; Racky *et al.* 2004].

5.3.4.1 Struktur des AhR

Nachdem der AhR isoliert worden war, konnte die cDNA kloniert und somit die Aminosäuresequenz bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass der AhR zur Familie der basic Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS Transkriptionsfaktoren gehört. Die Bezeichnung PAS Domäne leitet sich von „period" (Per), AhR/ARNT und „Single Minded" (Sim) ab. Per und Sim sind strukturell zum AhR homologe und nah verwandte Proteine aus *Drosophila*. Zur bHLH Familie zählen ebenso die in der AhR Signaltransduktionskette zusammenwirkenden

Proteine „Aryl Hydrocarbonrezeptor Repressor“ (AhRR) und „Aryl Hydrocarbonrezeptor Nuclear Translocator“ (ARNT) [Whitlock 1999]. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur des AhR.

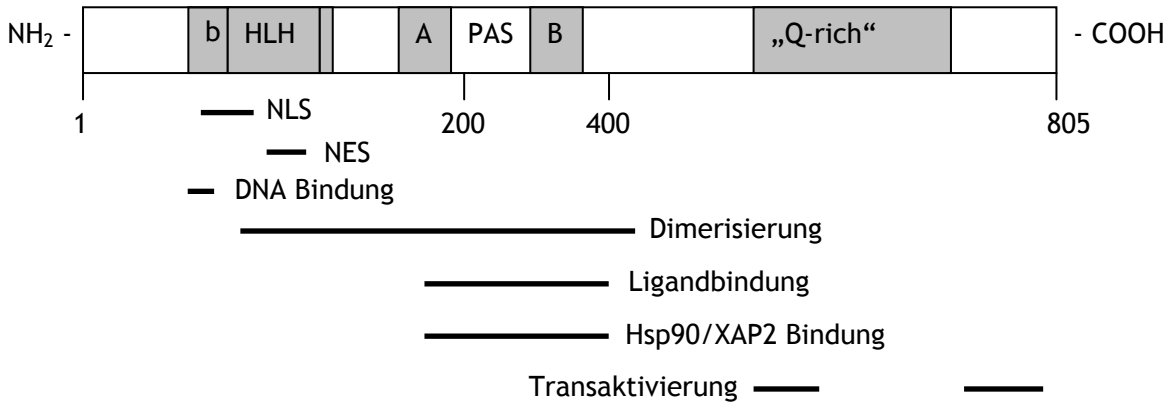


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Struktur des AhR [Whitlock 1999]

Die bHLH Domäne ist nahe am N-terminalen Ende angesiedelt. Im Bereich der „basischen“ Region findet die Bindung an die DNA statt, die HLH Domäne ist für Protein-Protein Dimerisierung verantwortlich. Die Dimerisierung des AhR mit ARNT ist entscheidend für seine spezifische Interaktion mit responsiven DNA-Elementen. Außerdem ist in diesem Bereich ein „AhR nuclear translocation signal“ (NLS) und ein „nuclear export signal“ (NES) zu finden. Weiter abwärts in Richtung C-Terminus ist die PAS-Domäne lokalisiert. Sie setzt sich aus den Untereinheiten A und B zusammen. Diese Domäne ist auch in zahlreichen anderen Proteinen vorhanden, die unter anderem in zelluläre Prozesse der Hypoxieantwort, Fremdstoffmetabolismus, hormonellen Regulation, Neurogenese oder Transkriptionskoaktivierung involviert sind. Struktur- und positionsbedingt beeinflusst sie Protein-Protein Interaktionen, wie z.B. die Bindung an das Chaperon „heat shock protein“ (Hsp) 90, sowie die Ligandenbindung. Im Ligand-freien Zustand interagiert Hsp 90 sowohl mit der PAS B Region, als auch mit der bHLH Domäne. Dies hat zur Folge, dass NLS maskiert, und die Ligand-bindende Konformation des AhR stabilisiert wird. NES ist für den Export des Rezeptors aus dem Kern verantwortlich. Im Anschluss daran wird der Rezeptor Ubiquitin-abhängig proteasomal degradiert. Der C-terminale Bereich des AhR ist weniger konserviert. Er beinhaltet eine glutaminreiche „Q-rich“ Domäne mit mehreren stimulatorischen und inhibitorischen Untereinheiten. Dieser Bereich ist verantwortlich für die funktionellen Unterschiede in der Transaktivierung von ARNT und AhRR, verglichen mit

dem AhR [Bradfield *et al.* 1991; Swanson und Bradfield 1993; Whitlock 1999; Hahn 2002; Denison und Nagy 2003; Mimura und Fujii-Kuriyama 2003].

5.3.4.2 AhR Signaltransduktion und CYP1A Induktion

Liganden-vermittelte Induktion

Der AhR ist in seinem inaktiven Zustand Teil eines zytosolischen Multiproteinkomplexes. Dieser setzt sich aus dem AhR, einem Hsp 90 Dimer, dem Cochaperon p23, der Proteinkinase c-Src und dem „Hepatitis Virus X-assoziierten Protein 2“ (XAP-2), auch „AhR associated protein“ genannt, zusammen [Enan und Matsumura 1996; Schmidt und Bradfield 1996; Denison *et al.* 2002]. XAP-2 bindet sowohl an den AhR als auch an Hsp 90. Vermutlich trägt es so zur Stabilisierung des zytosolischen, ligandfreien AhR-Komplexes bei. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass dieses Protein nicht essenziell für die Funktionalität des AhR zu sein scheint [Bell und Poland 2000; Petrulis und Perdew 2002; Lees *et al.* 2003]. Tritt ein Ligand, z.B. TCDD, in die Zelle ein, bindet er an den AhR. Es kommt zur Transformation, was die Ligandenbindung verstärkt, und die Freilegung des NLS zu Folge hat. Unter Energieverbrauch tranzloziert der Ligand-Rezeptor-Komplex in den Nukleus. Dabei ist nach wie vor ungeklärt, ob die rezeptorassoziierten Proteine bereits im Zytosol oder erst im Kern abgelöst werden. Im Zellkern erfolgt die Bindung mit ARNT, welcher, entgegen seines Namens, nicht relevant für die Ligand-aktivierte Translokation des AhR in den Nucleus ist [Reyes *et al.* 1992; Carver *et al.* 1994; Denison *et al.* 2002]. Die Hsp 90 Abspaltung ist Voraussetzung für die Bildung des AhR/ARNT Heterodimers [Heid *et al.* 2000]. Der AhR-ARNT-Ligand-Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, er bindet mit hoher Affinität an spezifische Enhancer-Sequenzen der DNA. Diese Sequenzen werden als so genannte „xenobiotic responsive elements“ (XRE), oder auch „dioxin responsive elements“ (DRE) bezeichnet. Sie enthalten die für die Bindung wesentliche Nukleotidabfolge 5´-CGTG-3´. Die Bindung an die DNA ändert die dortige Chromatinstruktur und gibt Transkriptionsfaktoren damit die Möglichkeit, mit dem Promotor zu interagieren. Dies beeinflusst die Regulation einer Vielzahl von Genen, die zusammengefasst als AhR-Genbatterie bezeichnet werden. Dazu gehören die Phase I Enzyme der CYP1 Familie, CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1. Auch ein Enzym der CYP2 Familie, CYP2S1 ist über den AhR induzierbar. Es wird in der Lunge konstitutiv exprimiert. Wegen seiner Induzierbarkeit z.B. durch Liganden im Tabakrauch wird diskutiert, dass es eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese spielen könnte [Safe und Krishnan 1995; Rivera *et al.* 2002; Song und

Pollenz 2002; Saarikoski *et al.* 2005]. Neben diesen CYPs werden auch Glutathion-S-transferase Ya, NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase, Aldehyd-3-dehyrdrogenase (ALDH3) und UDP-Glucuronosyltransferasen 1A6 (UGT1A6) bzw. 1A9 über den AhR Signaltransduktionsweg kontrolliert [Bock 1994; Rowlands und Gustafsson 1997; Sogawa und Fujii-Kuriyama 1997]. In Abbildung 6 ist eine schematische Darstellung des AhR Signaltransduktionsweges abgebildet.

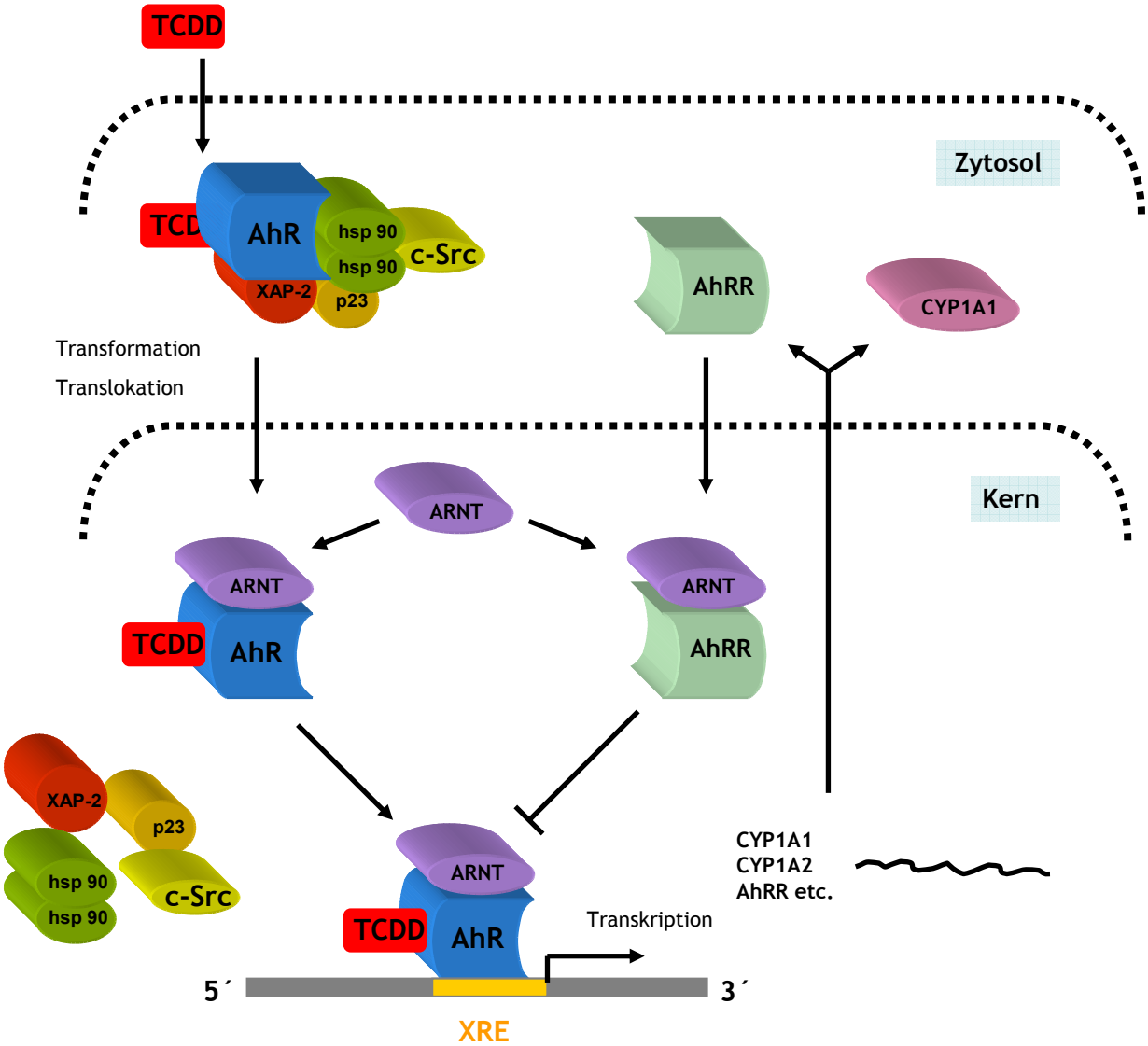


Abbildung 6 Schematische Darstellung des AhR Signaltransduktionsweges

Neben der aktivierenden transkriptionellen Kontrolle des AhR kann die CYP1A1 Expression auch durch andere Transkriptionsfaktoren zell- und speziesspezifisch negativ reguliert werden. So konnten negative regulatorische Elemente (NREs) im CYP1A1 Promotor von Mensch und Ratte nachgewiesen werden. Sie binden auf noch ungeklärte Weise Kernfaktoren und reprimieren so die Transkription [Hines *et al.* 1988; Boucher *et al.* 1993; Boucher *et al.* 1995; Piechocki und Hines 1998]. Untersuchungen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinsynthese, führte *in-vitro* zur Superinduktion von CYP1A1, was zu der Vermutung führt, dass konstitutiv gebundene Proteine an der negativen Regulierung beteiligt sind [Lusska *et al.* 1992]. Verantwortlich hierfür ist vermutlich der konstitutiv exprimierte AhR Repressor (AhRR). Er reguliert über einen Feedback-Mechanismus die Signaltransduktion des AhR durch Konkurrieren mit dem AhR um die Heterodimerisierung mit ARNT (Abbildung 6) [Mimura *et al.* 1999; Baba *et al.* 2001; Karchner *et al.* 2002].
Eine weitere Hypothese besagt, dass ein endogenes Substrat die Transkription von CYP1A1 stimuliert und dadurch selbst inaktiviert wird. In Abwesenheit eines funktionellen Enzyms akkumuliert es in der Zelle und aktiviert die Transkription. Alternativ könnte das endogene Substrat zunächst durch CYP1A1 metabolisch aktiviert werden [Hankinson *et al.* 1985; RayChaudhuri *et al.* 1990; Chang und Puga 1998].

Liganden-unabhängige Regulation

Im letzten Jahrzehnt wurden CYP1A1 Induktoren entdeckt, die sich strukturell von den klassischen Liganden unterscheiden, wie z.B. Benzimidazole, Carotinoide, Retinoide, Carbaryl und Primaquin. Sie steigern die CYP1A1 Genexpression, konkurrieren aber nicht mit TCDD um die AhR-Bindung [Backlund *et al.* 1999; Fontaine *et al.* 1999]. Dies könnte darin begründet sein, dass diese Substanzen sehr schwache Liganden des AhR darstellen und die Bindung an den AhR bislang nur ungenügend nachgewiesen werden kann. Die Hypothese konnte insofern bestätigt werden, als in neueren Studien unter anderem für Carbaryl und Primaquin eine Bindungsaffinität zum AhR gezeigt werden konnte [Werlinder *et al.* 2001; Backlund und Ingelman-Sundberg 2004]. Alternativ ist es auch vorstellbar, dass ein AhR-bindender Metabolit aus den Ausgangsverbindungen gebildet wird [Bradshaw *et al.* 2002]. Die CYP1A1 Induktion könnte auch durch Interaktionen über andere Signaltransduktionswege erfolgen. So scheinen Retinoide und Carotinoide CYP1A1 über ein so genanntes „Retinoid Acid Responsive Element“ zu aktivieren. Vermutlich sind auch die Proteinkinase C und Tyrosinkinasen in die Aktivierung des Enzyms involviert [Vecchini *et al.* 1994; Backlund *et al.* 1997; Delescluse *et al.* 2000]. Eine weitere Möglichkeit der CYP1A1 Induktion besteht im indirekten Einfluss des AhR Signaltransduktionsweges auf

verschiedene Rezeptoren, wie z.B. Glukokortikoidrezeptor (GR), Estrogenrezeptor und Retinoidrezeptor (RR) über Feedback-Regulation oder gewebespezifische Interaktionen. Somit ist die Induktion von CYP1A1 prinzipiell auch ohne AhR-Liganden möglich [Brake *et al*. 1998; Angus *et al*. 1999; Bradshaw *et al*. 2002].

5.3.4.3 Liganden des AhR

Der AhR als Ligand-regulierter Rezeptor besitzt die für einen Rezeptor untypische Eigenschaft, strukturell sehr unterschiedliche Substanzen binden zu können. Man unterscheidet hierbei zwischen so genannten „high affinity“ und „low affinity“ Liganden, die unterschiedlich stark an den AhR binden. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen ergaben, dass es sich bei Liganden mit hoher Bindungsaffinität zumeist um aromatische, planare und relativ hydrophobe Verbindungen handelt. Schwache Liganden entsprechen diesen Kriterien nicht, auch konkurrieren viele dieser Substanzen in Bindungsassays mit radioaktiv gelabeltem TCDD nicht um die Bindung am AhR. Dies führte zu der Vermutung, dass unterschiedliche Bereiche der AhR-Ligandenbindungsdomäne für Interaktionen der beiden Ligandbindungstypen mit dem Rezeptor verantwortlich sind [Hankinson 1995; Bradshaw *et al*. 2002; Denison *et al*. 2002; Denison und Nagy 2003; Backlund und Ingelman-Sundberg 2004].

exogene Liganden

In dieser Gruppe finden sich zum einen die so genannten „klassischen Liganden“. Hierzu gehören polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. 3-Methylcholanthren, ß-Naphthoflavon und Benzo[a]pyren sowie polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie die polychlorierten Biphenyle (PCBs), polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs). Zu den „nicht-klassischen“ Liganden gehören sehr unterschiedliche Substanzen, unter anderem Benzimidazole wie der Magensäureblocker Omeprazol oder Carbaryl, ein Insektizid, und bestimmte Pharmazeutika wie z.B. YH439, ein hepatoprotektiver Wirkstoff [Lee *et al*. 1996; Ledirac *et al*. 1997; Denison und Heath-Pagliuso 1998; Backlund *et al*. 1999].

Die größte Expositionsquelle an AhR Liganden für Organismen ist die aufgenommene Nahrung. Viele in der Nahrung vorkommenden Liganden haben eine schwache Bindungsaffinität zum AhR. Ihr Vorkommen beschränkt sich hauptsächlich auf pflanzliche Nahrung wie Gemüse, Früchte oder Kräuter. Beispiele pflanzlicher Liganden sind u. a. Indol-3-

carbinol (I3C), Carotinoide und Flavonoide. Kruziferen (Kreuzblütler) wie Spargel, Kohl, Brokkoli und Blumenkohl enthalten große Mengen an Indolylglukosinolaten, z.B. Glukobrassicin. Der Abbau dieser Stoffe führt z.B. zur Bildung von I3C. Des weiteren sind verschiedene Bakterien des Gastrointestinaltraktes in der Lage, AhR Liganden aus Tryptophan und Indolen zu generieren [Takahashi *et al.* 1995; Renwick *et al.* 1999; Bonnesen *et al.* 2001]. Die säurekatalysierte Reaktion von I3C führt zur Bildung von wesentlich potenteren AhR-Liganden, wie 3,3´-Diindolylmethan (DIM) und dem hochaktiven Indol-[3,2-b]-carbazol (ICZ). ICZ hat eine AhR-Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich und eine EC_{50} von 296 nM für die Induktion von CYP1A1 in der Zelllinie Hepa1 [Bjeldanes *et al.* 1991; Gillner *et al.* 1993; Kleman *et al.* 1994; Park *et al.* 1996].

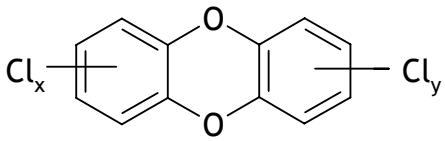
endogene Liganden

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die AhR Signaltransduktion auch in Abwesenheit exogener Liganden aktiv ist, was für das Vorhandensein endogener Liganden spricht. So konnte z.B. der aktivierte AhR-Komplex im Zellkern unbehandelter Proben *in-vitro* und *in-vivo* nachgewiesen werden. Außerdem ist der AhR in Abwesenheit exogener Liganden in die Zellzyklusregulation involviert [Abbott *et al.* 1994; Ma und Whitlock 1996; Chang und Puga 1998]. So konnten einige schwache endogene Liganden (Indole, Tetrapyrole und Arachidonsäuremetabolite) bereits identifiziert werden, die genaue physiologische Bedeutung der AhR-Funktion bedarf jedoch weiterer Forschung [Denison und Nagy 2003].

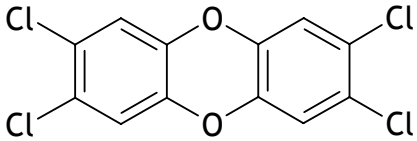
5.4 Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe

5.4.1 Allgemein

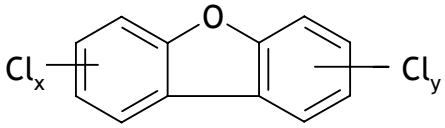
Die Familie der polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe beinhaltet die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs) und polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs), polybromierten Dibenzo-*p*-dioxine (PBDDs) und polybromierten Dibenzofurane (PBDFs), sowie die polychlorierten bzw. polybromierten Biphenyle (PCBs bzw. PBBs). Abhängig von Position und Anzahl der Chlorsubstituenten ergeben sich 75 chlorierte-, bzw. bromierte Dibenzodioxine, 135 chlorierte-, bzw. bromierte Dibenzofurane, sowie 209 chlorierte Biphenyle, so genannte Kongenere. Lediglich 7 der 75 Kongenere der PCDDs bzw. PBDDs sowie 10 der 135 möglichen PCDFs bzw. PBDFs werden eine dioxinartige Toxizität zugesprochen. Es handelt sich dabei um diejenigen Kongenere, die in Position 2,3,7 und 8 substituiert sind. Von den 209 PCB Kongeneren sind lediglich 12 als dioxinartig eingestuft. Es handelt sich bei diesen PCBs um Kongenere mit 4 oder mehr lateralen Chloratomen, wobei sich höchstens eine Substitution in *ortho*-Position befindet. Diese Substanzen werden oftmals als „koplanar“ bezeichnet, was bedeutet, dass sie eine flache Konformation einnehmen können, wenn die aromatischen Ringe in einer Ebene liegen. Von den ähnlich konfigurierten PBBs werden vergleichbare Eigenschaften angenommen [USEPA 2000b]. Das bekannteste und toxischste Kongener ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) mit Chlorsubstituenten an den vier lateralen Positionen. Abbildung 7 zeigt einige Strukturformeln ausgewählter chlorierter aromatischer Kohlenwasserstoffe.



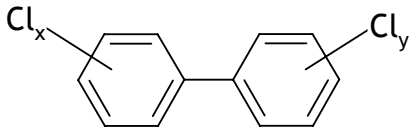
polychlorierte Dibenzodioxine



2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin



polychlorierte Dibenzofurane



polychlorierte Biphenyle

Abbildung 7 Strukturformeln ausgewählter polychlorierter aromatischer Kohlenwasserstoffe

5.4.2 Toxicity Equivalency Factors (TEFs)

PCDDs, PCDFs, und PCBs liegen üblicherweise als individuelle, komplexe Mischungen in der Umwelt oder in biologischen Proben vor. Diese Tatsache erschwert die Risikobewertung dioxinartiger Stoffe für den Menschen. Zur Lösung dieses Problems wurde das TEF-Konzept entwickelt: Mit Hilfe sogenannter Toxizitätsäquivalenzfaktoren (Toxicity Equivalency Factors; TEFs) wird die Toxizität einzelner Kongenere aus komplexen Mischungen relativ zur Toxizität von TCDD beschrieben. Da TCDD in der Gruppe der dioxinartigen Stoffe die höchste Toxizität aufweist, wird es als Referenzsubstanz für das Dioxin TEF-Konzept verwendet und ist mit einem TEF von 1.0 belegt. Durch Multiplikation der Masse der Einzelverbindung mit ihrem TEF und Summation dieser Produkte lassen sich TCDD-Äquivalente (TCDD or Toxicity Equivalents; TEQ) berechnen, die als Maß für die Wirksamkeit von dioxinartigen Gemischen im Vergleich zur Einzelverbindung TCDD dienen. Mathematisch ausgedrückt lässt sich dafür folgende Gleichung formulieren:

$$\mathbf{TEQ \cong \Sigma_{i\text{-}n}\,(Kongener_i \times TEF_i) + (Kongener_j \times TEF_j) + \ldots + (Kongener_n \times TEF_n)}$$

Die TEF Werte für PCDDs und PCDFs wurden erstmals im Jahr 1989 nach internationalem Abkommen von der EPA vereinbart, die daraus resultierenden TEQ werden als I-TEQ bezeichnet [USEPA 1989]. Nach der ersten Veröffentlichung wurden im Jahr 1994 von der WHO auch TEFs für 13 dioxinartige PCBs eingeführt [Ahlborg 1994], die resultierenden TEQ werden als TEQ-WHO_{94} bezeichnet. Die Bezeichnung TEQ-WHO_{98} bezieht sich auf die Aktualisierung im Jahr 1998. Sie kombiniert TEFs für Dioxine, Furane und 12 dioxinartige PCBs [Van den Berg *et al.* 1998]. Die letzte Aktualisierung fand im Jahr 2006 statt [van den Berg *et al.* 2006]. Ausgewählte dioxinartige Verbindungen sowie PCBs wurden dabei von einem WHO Expertengremium neu bewertet. Ein Problem für die Risikoanalyse das nach wie vor besteht, ergibt sich aus der Tatsache, dass in vielen Studien nicht angegeben ist, welches der drei bestehenden TEF Konzepte zur TEQ-Berechnung herangezogen wurde. Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3 und Tabelle 4 geben einen Überblick über die einzelnen TEFs der existierenden TEF-Konzepte.

Tabelle 1 TEF-Schema für I-TEQ

Dioxin Kongener	TEF	Furan Kongener	TEF
2,3,7,8-TCDD	1.0	2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	1,2,3,7,8-PeCDF	0.05
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	2,3,4,7,8-PeCDF	0.5
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
OCDD	0.001	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
		OCDF	0.001

Tabelle 2 TEF-Schema für TEQ-WHO_{94}

PCB Kongener	IUPAC Nummer	TEF
3,3´,4,4´-TeCB	PCB 77	0.0005
2,3,3´,4,4´-PeCB	PCB 105	0.0001
2,3,4,4´,5-PeCB	PCB 114	0.0005
2,3´4,4´,5-PeCB	PCB 118	0.0001
2´,3,4,4´,5´-PeCB	PCB 123	0.0001
3,3´,4,4´,5-PeCB	PCB 126	0.1
2,3,3´,4,4´,5-HxCB	PCB 156	0.0005
2,3,3´,4,4´,5´-HxCB	PCB 157	0.0005
2,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 167	0.00001
3,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 169	0.01
2,2´,3,3´4,4´,5-HpCB	PCB 170	0.0001
2,2´,3,4,4´,5,5´-HpCB	PCB 180	0.00001
2,3,3´,4,4´,5,5´-HpCB	PCB 189	0.0001

Tabelle 3 TEF-Schema für TEQ-WHO_{98}

Dioxin Kongener	TEF	Furan Kongener	TEF	PCB Kongener	IUPAC Nummer	TEF
2,3,7,8-TCDD	1.0	2,3,7,8-TCDF	0.1	3,3´,4,4´-TeCB	PCB 77	0.0001
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	3,4,4´,5-TeCB	PCB 81	0.0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	2,3,3´,4,4´-PeCB	PCB 105	0.0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	2,3,4,4´,5-PeCB	PCB 114	0.0005
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	2,3´,4,4´,5-PeCB	PCB 118	0.0001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	2´,3,4,4´,5´-PeCB	PCB 123	0.0001
OCDD	0.001	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	3,3´,4,4´,5-PeCB	PCB 126	0.1
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	2,3,3´,4,4´,5-HxCB	PCB 156	0.0005
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	2,3,3´,4,4´,5´-HxCB	PCB 157	0.0005
		OCDF	0.001	2,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 167	0.00001
				3,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 169	0.01
				2,3,3´,4,4´,5,5´-HpCB	PCB 189	0.0001

Tabelle 4 TEF-Schema für TEQ-WHO_{2006}

Dioxin Kongener	TEF	Furan Kongener	TEF	PCB Kongener	IUPAC Nummer	TEF
2,3,7,8-TCDD	1.0	2,3,7,8-TCDF	0.1	3,3´,4,4´-TeCB	PCB 77	0.0001
1,2,3,7,8-PeCDD	0.5	1,2,3,7,8-PeCDF	0.03	3,4,4´,5-TeCB	PCB 81	0.0003
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	2,3,4,7,8-PeCDF	0.3	2,3,3´,4,4´-PeCB	PCB 105	0.0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	2,3,4,4´,5-PeCB	PCB 114	0.0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	2,3´,4,4´,5-PeCB	PCB 118	0.0003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	2´,3,4,4´,5´-PeCB	PCB 123	0.0003

OCDD	0.0003	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	3,3´,4,4´,5-PeCB	PCB 126	0.1
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	2,3,3´,4,4´,5-HxCB	PCB 156	0.0003
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	2,3,3´,4,4´,5´-HxCB	PCB 157	0.0003
		OCDF	0.0003	2,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 167	0.0003
				3,3´,4,4´,5,5´-HxCB	PCB 169	0.03
				2,3,3´,4,4´,5,5´-HpCB	PCB 189	0.0003

5.4.3 TCDD

5.4.3.1 Chemische und physikalische Eigenschaften

Bei TCDD handelt es sich um ein farbloses bis weißlich kristallines Pulver mit einem Schmelzpunkt von 305°C. Es ist unlöslich in Wasser, schwach löslich in *n*-Octanol, Methanol und gut löslich in den organischen Lösungsmitteln *o*-Dichlorbenzol, Chlorbenzol, Benzol und Chloroform [IARC 1997; Lewis 1997; ATSDR 1998]. TCDD ist stabil in DMSO, 95 %igem Ethanol oder Aceton. Unter besonderen Bedingungen kann es zu einer langsamen photochemischen oder bakteriellen Degradation kommen, allerdings ist TCDD unter Standardbedingungen extrem stabil. Obwohl es nicht entzündbar ist, degradiert TCDD bei Temperaturen über 500°C [Lewis 1988; Sittig 1988].

5.4.3.2 Produktion, Verwendung und Exposition

TCDD wurde außer für wissenschaftliche Forschungszwecke niemals kommerziell hergestellt. Der Haupteintrag von TCDD in die Umwelt erfolgt durch Verbrennungsvorgänge und Prozesse innerhalb der chemischen Industrie, sowie in begrenztem Umfang durch biologische und photochemische Prozesse. Bei der Herstellung von Herbiziden, Farben und Pigmenten und der Zellstoffbleichung kann TCDD als unerwünschtes Nebenprodukt gebildet

werden. TCDD entsteht zudem bei Verbrennungsprozessen von Abfall, Klärschlamm und Holz und wird vor allem in Abgasen emittiert [USEPA 2000b].
Wegen seiner hohen Liphophilie und sehr geringen Löslichkeit in wässrigen Medien akkumuliert TCDD im Lipidanteil von Organismen. Die höchsten TCDD Konzentrationen werden in Fleisch, Fisch, Eiern und Milchprodukten nachgewiesen [Schecter *et al.* 1994a; Schecter *et al.* 1994b; (USEPA) 2000]. Es wird angenommen, dass 90 % der TCDD Körperlast vom Menschen über die Nahrungskette aufgenommen wird. Nur ein geringer Anteil wird über Inhalation oder Absorption über die Haut aufgenommen. Die tägliche Aufnahme dioxinhaltiger Substanzen (PCDDs, PCDFs und dioxinartige PCBs) wird auf ca. 70 pg TEQ geschätzt. Grundlage hierfür sind die TEFs der Weltgesundheitsorganisation WHO. Die tägliche Aufnahme an PCDDs und PCDFs wird dabei auf 45 pg TEQ-WHO_{98} geschätzt, die Aufnahme dioxinartiger PCBs auf 25 pg TEQ-WHO_{98} pro Tag. Für TCDD wird eine täglich Aufnahme von 5 pg TEQ angenommen. Individuelle Ernährungsgewohnheiten sowie die Nähe zu bestimmten Expositionsquellen können die Körperlast bestimmter Bevölkerungsgruppen ansteigen lassen. Generell sind die Expositionslevels in den westlichen Industriestaaten mit denen der USA vergleichbar. Der Durchschnittswert für PCDDs, PCDFs und dioxinartige PCBs im Fettgewebe beträgt 68 pg TEQ/g Fett, der TCDD-Anteil darin wurde mit 5.5 pg TEQ/g Fett bestimmt [USEPA 2000b].

5.4.3.3 Toxikokinetik

Die Absorption von TCDD über den Gastrointestinaltrakt (GIT) wurde in zahlreichen Studien untersucht. Bei Ratten beträgt die Absorptionsrate über den GIT einer einzelnen Dosis TCDD von 1 µg/kg Körpergewicht ca. 8 %. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei wiederholter Gabe von TCDD (0.1 bis 1 µg/kg pro Tag) beobachtet [Piper *et al.* 1973; Rose *et al.* 1976].
Ist die Absorption erfolgt, wird TCDD vorrangig über das lymphatische System von Chylomikronen transportiert und verteilt sich so im gesamten Körper. Die Hauptansammlung in Ratten innerhalb der ersten Tage nach Exposition findet man in der Leber und im Fettgewebe, kleinere Mengen auch in der Haut und der Schilddrüse [Pohjanvirta *et al.* 1990]. Im Blut ist TCDD hauptsächlich mit Lipoproteinen, Serumlipiden, Albumin sowie mit zellulären Komponenten assoziiert. Dieses Verteilungsschema beruht einerseits auf der Lipohilie von TCDD aber auch auf der Tatsache, dass TCDD an Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) bindet [Gillner *et al.* 1987; Diliberto *et al.* 1997] und zudem auch gut durch TCDD induzierbar ist. Da CYP1A2 nur in der Leber und nicht in anderen Organen der

Ratte gut induzierbar ist, sondert sich TCDD in der Leber in solch hohen Mengen ab, die durch seine Lipophilie alleine nicht erreicht werden könnte [Goldstein und Linko 1984]. Diese hepatische Absonderung von TCDD konnte in CYP1A2 Knockout Mäusen nicht beobachtet werden, was auf die Beteiligung von CYP1A2 an diesem Prozess schließen lässt [Diliberto *et al.* 1999].

Die Abschätzung der Halbwertzeit von TCDD in Ratten erfolgt organ- und dosisabhängig. Die Gesamtkörper-Eliminations-Halbwertzeit in der Ratte liegt zwischen 12 und 31 Tagen [USEPA 2000c]. Im Fettgewebe von Ratten folgt die Elimination von TCDD einer Kinetik erster Ordnung mit einer Eliminations-Halbwertzeit von ca. 25 Tagen. Die Elimination in der Leber von Ratten verläuft nicht linear. Dabei verringern sich die Halbwertzeiten, wenn die aufgenommene Menge an TCDD die Dosis von 1000 ppt Nettogewicht übersteigt. Bleibt die Dosis unter 1000 ppt, ergibt sich eine Halbwertzeit von ca. 33 Tagen. Steigt die Dosis über 1000 ppt an, verringert sie sich auf ca. 17 Tage [Walker *et al.* 2000]. In der Lunge von Ratten wurde eine Halbwertzeit von TCDD 39.7 Tagen, im Serum von 44.6 Tagen bestimmt [Tritscher *et al.* 2000].

Die Absorption von TCDD wurde von Poiger und Schlatter auch am Menschen untersucht. Dabei wurde einem männlichen 42 jährigen Probanden eine einmalige Dosis von 105 ng ^{3}H-2,3,7,8-TCDD (1.14 ng/kg Körpergewicht) verabreicht. Die Absorptionsrate über den GIT betrug >87 %. Während der 135 Tage andauernden Studie konnte eine erhöhte Radioaktivität im Blut nur für 2 Tage nachgewiesen werden. Ca. 90 % der TCDD Körperlast war im Körperfett deponiert worden [Poiger 1986]. Die Gesamtkörper-Eliminations-Halbwertzeit von TCDD beim Menschen wird auf 7 bis 9 Jahre geschätzt [Poiger 1986; Aylward *et al.* 2005a; Aylward *et al.* 2005b].

5.4.3.4 Metabolismus und Ausscheidung

Obwohl frühe *in-vitro* und *in-vivo* Studien den Metabolismus von TCDD nicht belegen konnten [Vinopal und Casida 1973; Van Miller *et al.* 1976], gibt es inzwischen Hinweise darauf, dass verschiedene Spezies TCDD zu polaren Metaboliten biotransformieren können.

Untersuchungen mit radioaktiv markiertem TCDD an Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Hamstern ergaben, dass mehr als 90 % des radioaktiv markierten Materials über Urin und Galle als polare Metabolite ausgeschieden werden [Poiger und Schlatter 1979; Ramsey *et al.* 1979; Olson *et al.* 1980; Poiger *et al.* 1982; Gasiewicz *et al.* 1983; Kleeman *et al.* 1986a; Kleeman *et al.* 1986b; Olson 1986; Kleeman *et al.* 1988; Sijm 1990]. In Experimenten mit primären Rattenhepatozyten konnten die TCDD-Metabolite 1-Hydroxy-2,3,7,8-

TCDD, sowie 8-Hydroxy-2,3,7-trichlordibenzo-*p*-dioxin identifiziert werden [Sawahata *et al.* 1982]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der direkten Ausscheidung des unmetabolisierten TCDD über die Fäces. Da es sich bei dioxinartigen Verbindungen in der Regel um eine sehr lipophile Substanzen handelt, reichern sich diese nicht nur im Körperfett, sondern auch ggf. in der Muttermilch an. Die Ausscheidung dieser Stoffe über die Muttermilch ist demnach auch eine effiziente Methode, die Körperlast zu reduzieren [Schecter und Gasiewicz 1987; Schecter A 1987; Fürst *et al.* 1989].
Bislang sind noch keine TCDD-Metabolite direkt im Menschen nachgewiesen worden. Allerdings gibt es aus Feces-Proben, die aus einem Selbstdosierungs-Experiment stammen, Hinweise darauf, dass auch der Mensch TCDD metabolisieren kann [Wendling *et al.* 1990].

5.4.3.5 Toxizität

TCDD zählt zu den toxischsten Substanzen die bislang identifiziert wurden und verursacht ein breites Spektrum an toxischen Effekten. Die Sensitivität eines Organismus bzgl. des toxischen Potenzials von TCDD ist eng mit dem Ah-Rezeptor verbunden. Die toxische Potenz weiterer Kongenere korreliert weitgehend mit deren Fähigkeit, an den Ah-Rezeptor binden zu können. Sind die lateralen 2, 3, 7 und 8 Positionen des Dioxinmoleküls halogeniert, wird die größtmögliche Toxizität induziert. Weitere Halogensubstitution am Molekül vermindert die toxische Wirkung [USEPA 2000a].

Versuchstier

akute Toxizität

Der Großteil an verfügbaren TCDD Toxizitätsdaten stammt aus tierexperimentellen Studien. Verschiedene Spezies reagieren mit sehr unterschiedlicher Sensitivität auf akute TCDD Dosen. So reagiert das männliche Meerschweinchen mit einer LD_{50} von 0.6 µg/kg Körpergewicht am sensitivsten [Schwetz *et al.* 1973], der männliche Hamster dagegen reagiert mit einer LD_{50} von 5.051 mg/kg Körpergewicht am wenigsten empfindlich [Henck *et al.* 1981]. Der Nerz reagiert mit einer LD_{50} von 4.2 bzw. 0.26 µg/kg Körpergewicht für männliche bzw. weibliche Tiere ebenfalls sehr empfindlich [Hochstein *et al.* 1988]. Die LD_{50} bei der männlichen Ratte beträgt 22 µg/kg Körpergewicht [Schwetz *et al.* 1973] und beim Kaninchen 115 µg/kg Körpergewicht [Schwetz *et al.* 1973]. Die LD_{50} Daten für TCDD in verschiedenen Spezies sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 LD_{50} Daten für TCDD nach akuter Gabe in verschiedenen Spezies

Spezies	LD_{50} (µg/kg Körpergewicht)
Meerschweinchen	♂ 0.6
Nerz	♂ 4.2; ♀ 0.26
Ratte	♂ 22
Kaninchen	♂ 115
Hamster	♂ 5051

Entgegen des toxischen Potenzials vieler anderer Stoffe, tritt bei akuter TCDD Intoxikation der Tod nicht unmittelbar, sondern, abhängig von Spezies und Stamm, mit deutlicher Verzögerung erst zwischen 7 und 50 Tagen ein. Ein unmittelbar nach akuter Exposition auftretendes Symptom ist das so genannte Wasting-Syndrom. Es äußert sich in rapidem Gewichtsverlust der Tiere von bis zu 50 % des ursprünglichen Körpergewichts [Peterson *et al.* 1984; Seefeld *et al.* 1984]. Zahlreiche Studien versuchten bislang die molekularen Mechanismen des Wasting-Syndroms aufzuklären, allerdings konnte bislang keine einzelne Begründung gefunden werden [USEPA 1985; WHO/IPCS 1989]. Der Tod tritt letztlich ohne deutlich identifizierbare pathologische Schäden ein. Ein weiterer Effekt, der mit dem Wasting-Syndrom assoziiert ist, ist die Abnahme des Vitamin A Gehaltes in den Sternzellen der Leber [Thunberg *et al.* 1979; Hakansson *et al.* 1989; Hakansson *et al.* 1991]. Der Vitamin A Mangel kann aber nicht das Wasting-Syndrom erklären, denn Vitamin A defiziente Tiere nehmen Nahrung auf und wachsen, auch wenn ihr Körpergewicht gegenüber Kontrolltieren geringer ist [Hayes 1971]. Weitere Anzeichen akuter Toxizität durch TCDD sind Thymus-, Testes-, Ovarien oder Milzatrophie, Hyperplasie, Knochenmarkdepletion, sowie systemische Blutungen [USEPA 2000a].

subchronische und chronische Toxizität

Studien, die sich mit subchronischer Toxizität von TCDD beschäftigen, wurden von der US EPA und der WHO begutachtet. Insgesamt wurden Anzeichen und Symptomatik nach subchronischer Exposition in Übereinstimmung mit der Gabe einer einzelnen Dosis gewertet. Der NOAEL der Ratte liegt bei 1 ng/kg Körpergewicht pro Tag, bei der Maus bei 100 ng/kg Körpergewicht pro Tag und beim Meerschweinchen bei 0.6 ng/kg Körpergewicht pro Tag [USEPA 1985; WHO/IPCS 1989].

Aus Langzeitstudien wurde der NOAEL der Ratte mit 1 ng/kg Körpergewicht pro Tag bestimmt, korrespondierend mit einem Körperfett NOAEL von 540 ppt [van Miller *et al.* 1977; Kociba *et al.* 1979]. Für männliche und weibliche Mäuse wurde ein NOAEL von 1.4 bzw. 6 ng/kg Körpergewicht pro Tag ermittelt [Toth *et al.* 1979; NTP 1982a].

Unabhängig von Expositionsdauer und Spezies reagiert die Leber sehr empfindlich auf Dioxin-Toxizität. Toxische Effekte äußern sich in der Änderung des Lebergewichts, dem Auftreten einer Fettleber, sowie einer generell beeinträchtigten Leberfunktion. Diese ist charakterisiert durch eine gesteigerte mikrosomale Monooxygenaseaktivität, gesteigerte Serum Glutamat-Oxalacetat- bzw. Glutamat-Pyruvat Transaminase-Aktivität (SGOT bzw. SGPT), Porphyrin Akkumulation, eine beeinträchtigte Membranfunktion, Hyperbilirubinämie, Hypercholesterinämie, sowie Hyperproteinämie [Goldstein *et al.* 1973; Goldstein *et al.* 1982; USEPA 1985; WHO/IPCS 1989; Shen *et al.* 1991].

TCDD stört auch den Hormonhaushalt. So wird durch chronische bzw. subchronische Gabe von TCDD die Schilddrüsenfunktion beeinflusst. In TCDD-exponierten Tieren konnte eine dosisabhängige Reduktion des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T4) gezeigt werden. Dieser Effekt resultiert aus der Induktion einer Ah-Rezeptor abhängigen UDP-Glucuronosyltransferase (UGT), welche T4 glucuronidiert. Im Gegenzug zur T4 Reduktion, wird die Sekretion des Thyroid-stimulierenden Hormons (TSH) stimuliert [Bastomsky 1977b; McKinney *et al.* 1985; Pazdernik und Rozman 1985; Sewall *et al.* 1995; Van Birgelen *et al.* 1995a; Van Birgelen *et al.* 1995b]. TCDD interagiert auch mit dem Estrogen-Rezeptor. Studien an AhR-responsiven, bzw. nicht responsiven Mausstämmen konnten zeigen, dass der Ah-Rezeptor für Effekte von TCDD am hepatischen Estrogen-Rezeptor verantwortlich ist [Lin *et al.* 1991a; Lin *et al.* 1991b]. Nach Behandlung mit TCDD konnten sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eine Vielzahl an antiestrogenen Effekten gezeigt werden [Safe *et al.* 1991]. Der Einfluss von TCDD auf Level und Aktivität von Testosteron wurde ebenfalls in mehreren Studien untersucht [Neal *et al.* 1979; Nienstedt *et al.* 1979; Mittler *et al.* 1984; Keys *et al.* 1985].

Eine Vielzahl an Studien belegt die immuntoxische Wirkung von TCDD. Sowohl die zellvermittelte, als auch die humorale Immunantwort wird nach TCDD-Exposition

unterdrückt. Dabei wird vermutet, dass mehrere zelluläre Targets innerhalb des Immunsystems von TCDD beeinflusst werden [Vos *et al.* 1973; Holsapple *et al.* 1991; USEPA 2000a].
Reproduktionstoxizität konnte ebenfalls nach TCDD-Exposition an verschiedenen Wirbeltieren beobachtet werden. Erhöhte pränatale Mortalitätsraten, funktionelle Veränderungen in Lern- und Sexualverhalten sowie in der Entwicklung des Reproduktionssystems wurden beschrieben [Peterson *et al.* 1993; USEPA 2000a]. Der primäre Effekt von TCDD auf die weibliche Reproduktion äußert sich in verminderter Fertilität und Frühgeburten [Kociba *et al.* 1976; Allen *et al.* 1979; Li *et al.* 1995]. Außerdem wurde eine TCDD assoziierte Endometriose beim Affen, Maus und Ratte beschrieben [Rier *et al.* 1993; Cummings *et al.* 1996]. Bei männlichen Tieren verkleinert die Exposition mit TCDD die Sexualorgane, verändert die Testesmorphologie und vermindert in hohen Dosen die Spermatogenese und Fertilität in erwachsenen Ratten [McConnell *et al.* 1978; Chahoud *et al.* 1989].

Mensch

Chlorakne und damit assoziierte Veränderungen der Haut sind typische Symptome einer TCDD Exposition beim Menschen [Crow 1978; Caramaschi *et al.* 1981]. Ähnliche Symptome wurden auch bei Rindern [McConnell *et al.* 1980], Rhesusaffen [Norback und Allen 1973], Kaninchen [Schwetz *et al.* 1973] und Nacktmäusen [Puhvel *et al.* 1982] beobachtet. Zusammenfassend lässt sich für den Menschen folgendes festhalten: Als Langzeitkonsequenzen einer TCDD Exposition treten neben Chlorakne erhöhte GGT Levels, sowie veränderte Testosteronspiegel auf. Als akute Effekte konnten Leberzirrhose, Lebervergrößerungen, erhöhte Lipid-, Cholesterol- und Triglycerid-Werte, sowie Veränderungen hepatischer Enzymlevels festgestellt werden. Des weiteren wurden Porphyrien, veränderte Schilddrüsenfunktionen, aber auch renale, neurologische und pulmonale Störungen diagnostiziert. Ein direkter Zusammenhang mit einer TCDD-Exposition kann für Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes, Reproduktions- und Entwicklungsstörungen sowie immunologischen Störungen nach wie vor nicht definitiv belegt werden [USEPA 2000a].

5.4.3.6 Kanzerogenität

Versuchstier

Die Kanzerogenität von TCDD am Nager konnte in einer Vielzahl von experimentellen Tierstudien belegt werden. Die Applikation erfolgte dermal, über die Nahrung oder über Schlundsondierung [van Miller *et al.* 1977; Kociba *et al.* 1978; Toth *et al.* 1979; NTP 1982a; Della Porta *et al.* 1987; Rao *et al.* 1988; IARC 1997; USEPA 2000c; NTP 2006].

Kanzerogenitäts-Langzeitstudien

Ratte

Van Miller et al. verabreichten 1, 5, 50, 500 ppt sowie 1, 5, 50, 500, 1000 ppb TCDD für 78 Wochen über das Futter an männliche Sprague-Dawley Ratten. Alle Tiere der höchstdosierten Gruppen (50, 500 and 1000 ppb) starben innerhalb von vier Wochen. Nach 95 Wochen wurden verschiedene Formen von Neoplasien festgestellt. Es handelte sich um squamöse Tumore der Lunge, sowie Neoplasien und Cholangiokarzinome in der Leber der Tiere [van Miller *et al.* 1977].

In einer Studie von Kociba et al. wurden 22, 210 und 2200 ppt TCDD an männliche und weibliche Sprague-Dawley Ratten für zwei Jahre über das Futter verabreicht. Es wurden dosisabhängige pathologische Veränderungen vor allem der Leber, hepatozellulare Nekrosen und entzündungsbedingte Veränderungen beobachtet. In weiblichen Ratten war die Inzidenz an hepatozellularen Hyperplasien und Karzinomen erhöht, ebenso squamöse Tumore des Gaumens, der Lunge, Zunge und Nase [Kociba *et al.* 1978].

In einer Studie des United States National Toxicology Programms (NTP) wurde an männliche und weibliche Osborne-Mendel Ratten über Schlundsonde 0.01, 0.05 oder 0.5 µg/kg Körpergewicht TCDD zweimal pro Woche über einen Zeitraum von 104 Wochen verabreicht. Dosisabhängige, erhöhte Inzidenzen an Adenomen der Schilddrüse und Leberneoplasien konnten in männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden [NTP 1982a].

In einer zweiten Studie des NTP wurde weiblichen Sprague-Dawley Ratten 3, 10, 22, 46 und 100 ng/kg Körpergewicht TCDD fünf Tage in der Woche für 104 Wochen verabreicht. Es wurden klare Hinweise auf kanzerogene Aktivität von TCDD erhalten. Die Inzidenzen für Cholangiokarzinome und hepatozelluläre Karzinome, Epitheilome der Lunge sowie für squamöse Zellkarzinome der Mundschleimhaut und des Uterus waren deutlich erhöht [NTP 2006].

Maus

In einer dritten Studie des NTP wurde männlichen und weiblichen Swiss-Webster Mäusen Dosen von 0.001 oder 0.005 µg TCDD pro Tier an drei Tagen pro Woche für 99 bzw. 104 Wochen auf den rasierten Rücken appliziert. Bei weiblichen Tieren war die Inzidenz an Fibrosarkomen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Bei den Männchen war der Effekt vorhanden, allerdings nicht statistisch signifikant [NTP 1982b].

Männlichen Swiss/H/Riop Mäusen wurden einmal pro Woche TCDD Dosen von 0.007, 0.7 oder 7.0 µg/kg Körpergewicht per Schlundsonde über den Zeitraum von einem Jahr verabreicht. Die Behandlung verursachte erhöhte Lebertumorinzidenzen (hepatozelluläre Adenome und Karzinome). Es wurden keine erhöhten Inzidenzen für Lungentumore oder Lymphome gefunden [Toth *et al.* 1979].

Männlichen und weiblichen B6C3F1 Mäusen wurden über den Zeitraum von 104 Wochen TCDD Dosen von 0.01, 0.05 oder 0.5 µg/kg Körpergewicht per Schlundsonde zweimal pro Woche verabreicht. Es konnten dosisabhängige Inzidenzen für hepatozelluläre Karzinome und Adenome der Schilddrüse bei weiblichen Tieren festgestellt werden. Außerdem waren die Inzidenzen für Lymphome und subkutane Fibrosarkome signifikant erhöht [NTP 1982a].

In einer Studie von Della Porta et al. wurde männlichen und weiblichen C57/B6 Mäusen einmal pro Woche Dosen von 2.5 oder 5.0 µg/kg Körpergewicht TCDD über Schlundsonde für 52 Wochen verabreicht. Die Inzidenzen an Nicht-Neoplasien (Lebernekrose, Amyloidose verschiedener Gewebe sowie Nephrosklerose) war in den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ebenso konnte ein signifikant erhöhter, dosisabhängiger Anstieg für hepatozelluläre Adenome und Karzinome belegt werden. In derselben Studie wurden 10 Tage alten C57/B6 Mäusen fünf i.p. Dosen von 1, 30 oder 60 µg/kg Körpergewicht TCDD verabreicht. Die Tiere erhielten keine weitere Verabreichung und wurden für 78 Wochen beobachtet. Es konnten dosisabhängige Lymphome des Thymus in männlichen und weiblichen Tieren beobachtet werden. Hepatozelluläre Karzinome wurden ausschließlich in männlichen Tieren beobachtet [Della Porta *et al.* 1987].

Hamster

In einer Studie von Rao et al. wurde männlichen syrischen Hamstern 6 i.p. oder s.c. Injektionen von 50 oder 100 µg/kg Körpergewicht TCDD in Vierwochen-Intervalllen verabreicht. Eine zweite Gruppe erhielt i.p. Injektionen von 100 µg/kg Körpergewicht TCDD. Die Tiere wurden bis zu einem Lebensalter von 13 Monaten beobachtet. Es konnten squamöse Zellkarzinome im Gesichsbereich in der Gruppe der hochdosierten Tiere beobachtet werden, in den anderen Dosisgruppen wurden keinerlei Tumore festgestellt [Rao *et al.* 1988]. Tabelle 6 stellt eine Übersicht der vorhandenen TCDD Langzeitkanzerogenitätsstudien am Nager dar.

Tabelle 6 Übersicht der vorhandenen TCDD Langzeitkanzerogenitätsstudien am Nager, verändert nach [IARC 1997]

Spezies	M/W	Dosis	Ziel-organ	Tumor	kleinste effektive Dosis	Referenz
Ratte	M	1, 5, 50, 500 ppt und 1, 5, 50, 500, 1000 ppb über 78 Wochen im Futter	Lunge	Squamöses Zellkarzinom	5 ppb	[van Miller *et al.* 1977]
			Leber	Neoplasie	5 ppb	
				Cholangio-karzinom	1 ppb	
	M	22, 210, 2200 ppt über 2 Jahre im Futter	Gaumen	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	[Kociba *et al.* 1978]
			Nase	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	
			Zunge	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	
	W	22, 210, 2200 ppt über 2 Jahre im Futter	Leber	Hyperplasie	0.01 µg/kg KG	[Kociba *et al.* 1978]
			Leber	Hepato-zelluläres Karzinom	0.1 µg/kg KG	
			Gaumen	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	
			Nase	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	
			Lunge	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	
			Zunge	Squamöses Zellkarzinom	0.1 µg/kg KG	

	M	0.01, 0.05, 0.5 µg/kg KG für 104 Wochen, per oral	Schild-drüse	Follikuläres Zelladenom	dosis-abhängig	[NTP 1982a]
			Leber	Neoplasie	dosis-abhängig	
	W	0.01, 0.05, 0.5 µg/kg KG für 104 Wochen per oral	Schild-drüse	Follikuläres Zelladenom	0.5 µg/kg KG	[NTP 1982a]
			Leber	Neoplasie	0.5 µg/kg KG	
	W	3, 10, 22, 46, 100 ng/kg KG 5 Tage pro Woche für 104 Wochen	Leber	Cholangio-karzinom	22 ng/kg KG	[NTP 2006]
				Hepato-zelluläres Adenom	100 ng/kg KG	
			Lunge	Epitheliom	100 ng/kg KG	
			Mund-schleim-haut	Squamöses Zellkarzinom	100 ng/kg KG	
			Uterus	Squamöses Zellkarzinom	46 ng/kg KG	
Maus	M	0.007, 0.7, 7.0 µg/kg KG für 1 Jahr, per oral, einmal pro Woche	Leber	Hepato-zelluläres Adenom und Karzinom	0.7 µg/kg KG	[Toth *et al.* 1979]
	M	0.01, 0.05, 0.5 µg/kg KG für 104 Wochen, per oral, zweimal pro Woche	Leber	Hepato-zelluläres Karzinom	dosis-abhängig	[NTP 1982a]
			Lunge	Alveolare und bronchiolare Adenome und Karzinomae	dosis-abhängig	
	W	0.04, 0.2, 2.0 µg/kg KG für 104 Wochen, per oral, zweimal pro Woche	Leber	Hepato-zelluläres Karzinom	dosis-abhängig	[NTP 1982a]
			Schild-drüse	Follikuläres Zelladenom	dosis-abhängig	
			Hemato-poieti-sches System	Lymphome	dosis-abhängig	
			Haut	Subcutane Fibrosarkome	dosis-abhängig	
	W	0.005 µg pro Tier, auf die Haut, 3 mal pro Woche für 104 Wochen	Integu-mentales System	Fibrosarkome	0.001 µg	[NTP 1982b]
	M	2.5, 5.0 µg/kg KG für 52 Wochen, p.o., 1x pro Woche 104 Wochen	Leber	Hepato-zelluläres Karzinom	2.5 µg/kg KG	[Della Porta *et al.* 1987]

	W	2.5, 5.0 µg/kg KG für 52 Wochen, per oral, einmal pro Woche für 104 Wochen	Leber	Hepato-zelluläres karzinom	2.5 µg/kg KG	[Della Porta *et al.* 1987]
	M	1, 30, 60 µg/kg KG i.p. einmal pro Woche für 5 Wochen, beobachtet bis zum Alter von 78 Wochen	Thymus	Lymphom	dosis-abhängig	[Della Porta *et al.* 1987]
			Leber	Hepato-zelluläre Adenome und karzinome	dosis-abhängig	
	W	1, 30, 60 µg/kg KG i.p. einmal pro Woche für 5 Wochen, beobachtet bis zum Alter von 78 Wochen	Thymus	Lymphom	dosis-abhängig	[Della Porta *et al.* 1987]
			Leber	Hepato-zelluläre Adenome und Karzinome	dosis-abhängig	
Hamster	M	50, 100 µg/kg KG i.p. oder s.c. 6 mal in 4-Wochen Intervallen; beobachtet für 1 Jahr	Haut	Squamöses Zellkarzinom	100 µg/kg KG	[Rao *et al.* 1988]

Abkürzungen: KG = Körpergewicht; M = männlich; W = weiblich; s.c. = subkutan; i.p. = intraperitoneal

Tumorpromotions-Studien

Das TCDD-vermittelte Auftreten von Leberpräneoplasien in einem zweistufigen Initiations-Promotions Modell wurde ebenfalls in zahlreichen Studien untersucht [Dragan und Schrenk 2000]. In der Leber führt die klonale Expansion genetisch veränderter Zellen zur Bildung präneoplastischer Herde, welche durch Veränderungen in Histomorphologie oder Gen-expression identifiziert werden können. Es wird vermutet, dass diese Läsionen Vorstufen in der Entwicklung von Lebertumoren darstellen [Pitot *et al.* 1991]. In den Studien konnte belegt werden, dass es sich bei TCDD um einen starken Tumorpromotor handelt, dessen Effekt abhängig von Dosis und Expositionsdauer ist.

Ratte

In einer Studie von Clark et al. wurde die Lunge als Zielorgan identifiziert. Weibliche Sprague-Dawley Ratten wurden ovariektomiert und durch i.p. Injektion mit 200 mg/kg Körpergewicht mit Diethyl-*N*-nitrosamin (DEN) initiiert. Nach 10 Tagen wurde alle 2 Wochen 1.4 µg/kg Körpergewicht TCDD über einen Zeitraum von 60 Wochen verabreicht. Adenokarzinome und ein squamöses Zellkarzinom der Lunge wurden in ovariektomierten Tieren gefunden [Clark *et al.* 1991b].

Alle weiteren Studien an Ratten beschäftigen sich mit der Leber als Zielorgan. In einigen Studien wurde DEN nach partieller Hepatektomie bzw. Ovariektomie verabreicht, gefolgt von der Behandlung mit TCDD. Detaillierte Informationen bzgl. Dosis und Verabreichungsform kann Tabelle 7 entnommen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in allen Tumorporomotions-Experimenten mit vorausgegangener partieller Hepatektomie erhöhte Levels an präneoplastischen Herden der Leber nachgewiesen werden konnten. In den Studien wurden verschiedene Marker verwendet, um die hepatischen Foci zu detektieren, nämlich γ-Glutamyl-Transpeptidase (γ-GGT), Adenosintriphosphatase (ATPase), Glucose-6-phosphatase (G6Pase) oder Glutathion-S-Transferase P (GSTP) [Pitot *et al.* 1980; Pitot *et al.* 1987; Flodstrom und Ahlborg 1989b; Dragan *et al.* 1991; Flodstrom *et al.* 1991; Waern *et al.* 1991; Dragan *et al.* 1992].

Ein zweites Studiendesign verwendete ebenfalls die Initiation mit DEN und verabreichte danach TCDD, ohne zuvor eine partielle Hepatektomie durchzuführen. Auch für dieses Modell können detaillierte Informationen bzgl. Dosis und Verabreichungsform Tabelle 7 entnommen werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der partiell hepatektomierten Tiere. Es konnten ebenfalls erhöhte Levels an hepatischen Foci nachgewiesen werden [Maronpot *et al.* 1993; Buchmann *et al.* 1994; Schrenk *et al.* 1994; Sills *et al.* 1994; Hemming *et al.* 1995; Stinchcombe *et al.* 1995; Tritscher *et al.* 1995].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass TCDD in Tumorpromotionsexperimenten mehr Tumore in der Leber weiblicher Ratten verursacht. Es wurde versucht, dieses Phänomen durch den verstärkenden Effekt von Estrogenen auf die Bildung von Präneoplasien zu erklären [Lucier *et al.* 1991; Wyde *et al.* 2001a; Wyde *et al.* 2002].

Maus

Tumorpromotions-Experimente an der Haut wurden bislang nur an Mäusen durchgeführt. Detaillierte Informationen bzgl. Initiator, Verabreichungsform und Dosis können ebenfalls Tabelle 7 entnommen werden [Berry *et al.* 1978; Poland *et al.* 1982; Hebert *et al.* 1990].

Tumorpromotions-Experimente an der Lunge wurden in zwei Studien von Beebe et al. untersucht. Männlichen Swiss Mäusen wurde eine einmalige Dosis an Dimethyl-*N*-nitrosamin (DMN) verabreicht, gefolgt von entweder einer einmaligen i.p. Injektion von 1.6, 16 oder 48 µg/kg Körpergewicht TCDD oder wöchentlichen Dosen von 0.05 µg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 20 Wochen. Alveolare Zelladenome und –Karzinome wurden in allen Behandlungsgruppen gefunden [Beebe *et al*. 1995a].
In der zweiten Studie wurden männliche C57/B6, DBA/2 und B6D2F1 Mäuse mit einer einzelnen Dosis von 90 mg/kg Körpergewicht DEN initiiert. Es folgten wöchentliche i.p. Injektionen von 0.05 µg/kg Körpergewicht TCDD für 20 Wochen und weitere Beobachtung bis zur Woche 52. In der B6D2F1 Mauslinie konnte eine erhöhte Lebertumorinzidenz beobachtet werden. Dieser Effekt trat in den Linien C57/B6 and DBA/2 nicht auf [Beebe *et al*. 1995b].

Tabelle 7 Studien mit TCDD und bekannten Tumorpromotoren am Nager, verändert nach [IARC 1997]

Spezies	Stamm	Initiation Dosis	Verab-reichung	TCDD Dosis	Verab-reichung	Promotion	Referenz
Haut							
Maus	W; CD1	200 nM DMBA	Haut; 1 Woche Intervall	0.1 µg TCDD; 2x pro Woche; 30 Wochen	Haut	-	[Berry *et al*. 1978]
	W; HRS/J be-haart	200 nM DMBA	Haut; kein Intervall	20 ng TCDD; 2x pro Woche; 8 Wochen, dann 50 ng; 17 Wochen	Haut	-	[Poland *et al*. 1982]
	W; HRS/J haarlos	200 nM DMBA	Haut; kein Intervall	20 ng TCDD; 2x pro Woche; 8 Wochen, dann 50 ng; 17 Wochen	Haut	+	[Poland *et al*. 1982]
	W; HRS/J haarlos	5 µmol MNNG	Haut; kein Intervall	3.75, 7.5, 15, 30 ng TCDD; 2x pro Woche; 20 Wochen	Haut	+	[Poland *et al*. 1982]
	W; HRS/J haarlos	5 µmol MNNG	Haut; kein Intervall	50 ng TCDD; 5 Wochen; dann 20 ng; 15 Wochen	Haut	+	[Poland *et al*. 1982]
	W; HRS/J haarlos	5 µmol MNNG	Haut; 1 Woche Intervall	2.5, 5, 10 ng TCDD; 2x pro Woche; 20 Wochen	Haut	+	[Hebert *et al*. 1990]

Lunge							
Maus	M; Swiss	25 mg/kg KG DMN	i.p.; 3 Wochen Intervall	1.6 µg/kg KG TCDD	i.p.	+	[Beebe et al. 1995a]
				16, 48 µg/kg KG TCDD		- (toxisch)	
				20x 0.05 µg/kg KG TCDD		-	
	M; C57/B6 B6D2F1 DBA/2	90 mg/kg KG DEN	i.p.; 3 Wochen Intervall	0.05 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen	i.p.	-	[Beebe et al. 1995b]
Ratte	W; Sprague-Dawley	200 mg/kg KG DEN	i.p.; 10 Tage Intervall	1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 60 Wochen	oral	-	[Clark et al. 1991b]
						+ (ovariektomiert)	
Leber							
Maus	C57/B6	90 mg/kg KG DEN	i.p.; 3 Wochen Intervall	0.05 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen	i.p.	-	[Beebe et al. 1995b]
	B6D2F1					+	
	DBA/2					-	
Ratte	W; Sprague-Dawley	PH; 10 mg/kg KG DEN	oral; 7 Tage Intervall	0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 7 Monate	i.m.	-	[Pitot et al. 1980]
				1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 7 Monate		+	
	W; Fisher F344	PH; 10 mg/kg KG DEN	oral; 14 Tage Intervall	0.0014, 0.014, 0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 6 Monate	i.m.	-	[Pitot et al. 1987]
				1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 6 Monate		+	
	W; Sprague-Dawley	PH; 30 mg/kg KG DEN	i.p.; 7 Tage Intervall	0.7 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 14 Wochen	s.c.	-	[Flodstrom und Ahlborg 1989b]

			0.7 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 26 Wochen		+	
W; Sprague-Dawley	PH; 30 mg/kg KG DEN	i.p.; 35 Tage Intervall	3.5 dann 0.7 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 9 Wochen	s.c.	+	[Flodstrom et al. 1991]
			3.5 dann 0.7 µg/kg KG TCDD;wöchentlich; 21 Wochen		+	
			0.35 dann 0.07 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 15 Wochen (normal Vit A)		-	
			0.35 dann 0.07 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 15 Wochen (marginal oder gering Vit A)		+	
			3.5 dann 0.07 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 15 Wochen (marginal oder gering Vit A)		+	
W; Fisher F344	PH; 10 mg/kg KG DEN	oral; 2 Wochen Intervall	0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 6 Monate	s.c.	+	[Dragan et al. 1991]
W; Sprague-Dawley	PH; 30 mg/kg KG DEN	i.p.; 35 Tage Intervall	0.22 dann 0.044 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen	s.c.	+	[Waern et al. 1991]
			0.88 dann 0.175 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen			
			3.5 dann 0.7 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen			

W; Sprague-Dawley	200 mg/kg KG DEN	i.p.; 7 Tage Intervall	1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen	oral	+ + (ovariektomiert)	
W; Sprague-Dawley	PH; 10 mg/kg KG DEN	oral; 7 Tage Intervall	0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 1 Monate	i.p.	+	[Dragan *et al.* 1992]
			0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 3 Monate			
			0.14 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 5 Monate			
W; Sprague-Dawley	175 mg/kg KG DEN	i.p.; 14 Tage Intervall	3.5 ng/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen	oral	-	[Maronpot *et al.* 1993]
			10.7 ng/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen		-	
			35.7 ng/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen		-	
			125 ng/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen		+	
W; Wistar	5x10 mg/kg KG DEN	oral; 14 Tage Intervall	1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 9 Wochen	s.c.	+	[Buchmann *et al.* 1994]
			1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 13 Wochen			
			1.4 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 17 Wochen			

W; Wistar	80 mg/l *N*-Nitrosomorpholin im Trinkwasser für 25 Tage	oral; 14 Tage Intervall	2, 20, 200 ng/kg KG TCDD; täglich; 13 Wochen	s.c.	+	[Schrenk *et al.* 1994]
W; Sprague-Dawley	10 mg/kg KG DEN	i.p.; 30 Tage Intervall	0.007 µg/kg KG TCDD/Tag (150 ppt im Futter) bis Tag 450	oral	+	[Sills *et al.* 1994]
		i.p.; 170 Tage Intervall	0.007 µg/kg KG TCDD/Tag (150 ppt im Futter) bis Tag 450		+	
		i.p.; 240 Tage Intervall	0.007 µg/kg KG TCDD/Tag (150 ppt im Futter) bis Tag 450		+	
W; Sprague-Dawley	PH; 30 mg/kg KG DEN	i.p.; 35 Tage Intervall	0.5 dann 0.1 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen	s.c.	-	[Hemming *et al.* 1995]
			1.58 dann 0.316 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen		-	
			5 dann 1 µg/kg KG TCDD; wöchentlich; 20 Wochen		+	
W; Wistar	10x10 mg/kg KG DEN	oral; 56 Tage Intervall	1.4 µg/kg KG TCDD einmalig	s.c.	-	[Stinchcombe *et al.* 1995]
			1.4 µg/kg KG TCDD zweiwöchentlich; 16 Wochen		+	
W; Sprague-Dawley	175 mg/kg KG DEN	i.p.; 14 Tage Intervall	1.75 µg/kg KG TCDD; zweiwöchentlich; 30 Wochen	oral	+	[Tritscher *et al.* 1995]

Abkürzungen: DEN = Diethyl-*N*-nitrosamin; DMBA = 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen; DMN = Dimethyl-*N*-nitrosamin; i.m. = intramuskular; i.p. = intraperitoneal; KG = Körpergewicht; M = männlich; MNNG = *N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin; PH = partielle Hepatektomie; s.c. = subkutan; W = weiblich

Mensch

Die Tumorinzidenzen beim Menschen wurden an verschiedenen Populationen untersucht, die mit hohen TCDD Dosen exponiert wurden. Die besten Hinweise darauf, dass eine Exposition mit TCDD beim Menschen mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden ist, stammen aus unabhängigen Kohorten-Studien [Zober *et al.* 1990; Fingerhut *et al.* 1991; Manz *et al.* 1991; Bueno de Mesquita *et al.* 1993; Flesch-Janys *et al.* 1995; Becher *et al.* 1996; Ott und Zober 1996; Flesch-Janys *et al.* 1998; Hooiveld *et al.* 1998; Steenland *et al.* 1999] sowie aus der Datenanalyse von Betroffenen des Seveso-Unfalls im Jahr 1976 [Caramaschi *et al.* 1981; Bertazzi *et al.* 1989a; Bertazzi *et al.* 1989b; Bertazzi *et al.* 1992; Bertazzi *et al.* 1993; Pesatori *et al.* 1993; Bertazzi *et al.* 1997; Bertazzi *et al.* 1998; Landi *et al.* 1998; Pesatori *et al.* 1999; Bertazzi *et al.* 2001]. In diesen Studien wurde ein positiver Zusammenhang zwischen TCDD Exposition am Menschen, nachgewiesen als erhöhte TCDD-Levels im Serum, und einem erhöhten individuellen Krebsrisiko gefunden. Da die Betroffenen jedoch auch mit anderen Chemikalien in Kontakt kamen, ist ein konkreter Zusammenhang zwischen Exposition und Kanzerogenität für TCDD jedoch nicht unmittelbar ableitbar [Calvert *et al.* 1992]. Bei dem Vorfall in Seveso, Italien, im Jahr 1976 wurde die Population durch einen Unfall in einer Chemiefabrik, bei dem TCDD explosionsartig austrat, stark exponiert. Die gesamte Kohorte wurde, abhängig von der Distanz zur Expositionsquelle in 3 Zonen (A, mit der höchsten; B mit einer mittleren; und R, mit der niedrigsten Exposition) eingeteilt. 1986 und 1996 stellte ein internationaler wissenschaftlicher Beirat, abgesehen von der Chlorakne, keine Gesundheitsschäden fest. Die medizinische Überwachung wurde allerdings im Hinblick auf etwaige Langzeitwirkungen fortgesetzt [IARC 1997]. Neuere Erkenntnisse aus der Seveso Kohorte weisen jedoch auf einen Kausalzusammenhang zwischen der Exposition des Menschen gegenüber TCDD und der Entstehung von bestimmter Tumorarten (Tumoren des Rektums und der Lunge, Hodgkin- und Non-Hodgkin Lymphom, sowie myeloide Leukämie) hin [Bertazzi *et al.* 2001; Steenland *et al.* 2004].

Tabelle 8 fasst die epidemiologische Datenlage bzgl. Standardmortalitätsraten und relativem Krebsrisiko von TCDD-exponierten Kohorten zusammen.

Tabelle 8 Standardmortalitätsraten und relatives Krebsrisiko von TCDD-exponierten Kohorten; verändert nach [ATSDR 1998]

Population / Industrie	Anzahl	Exposition	Effekte (95% CI)	Referenz
12 Fabriken, die mit TCDD kontaminierte Chemikalien produzieren	5172	Serum TCDD-level (Lipid basiert) Mittelwert = 253 Median = 233 ppt	Gesamt-Krebs SMR = 115 (102-130) unspezifizierte Organe SMR = 162 (104-241)	[Fingerhut *et al.* 1991]
	1520	>1 Jahr exponiert und >20 Jahre Latenzzeit 95 Proben = 462 ppt	Gesamt-Krebs SMR = 146 (121-176) Respirationssystem SMR = 142 (103-192)	[Steenland *et al.* 1999]
Deutsche Fabrikarbeiter; Phenoxyherbizid-produktion	1189 Männer 399 Frauen	Fettgewebe TCDD-level benutzt, um die Kumulation über die Jahre zu berücksichtigen	Gesamt-Krebs SMR = 1.41 (1.2-1.7) Lungenkrebs SMR = 1.51 (1.1-2.1)	[Manz *et al.* 1991; Becher *et al.* 1996; Flesch-Janys *et al.* 1998]
	689 Männer	mittel und niedrig exponiert 11 Proben Mittelwert = 83 Median = 60 ppt	nichtsignifikante Exposition >20 Jahre SMR = 1.54 (0.8-2.7)	
	459 Männer	hoch exponiert 37 Proben Mittelwert = 296 ppt Median = 137 ppt	Gesamt-Krebs Expositionsdauer >20 Jahre SMR = 2.54 (1.1-5.0)	
	Blutfett: 275 Arbeiter	höchste TCDD Quartile > 2,503 ng/kg Jahre	Gesamt-Krebs SMR 1.73 (1.2-2.4)	
		höchste TEQ Quartile >5217.7 ng/kg Jahre	Gesamt-Krebs SMR = 1.64 (1.2-2.3)	
unkontrollierte Zersetzungsreaktion in der Trichlor-phenolproduktion unter Freisezung von TCDD im Jahr 1953	243	Messung des Blutfett TCDD-Gehaltes und Expositionsdauer	Gesamt-Krebs SMR = 1.2 (0.8-1.7)	[Zober *et al.* 1990; Ott und Zober 1996]

	108	<0.1 µg/kg Körpergewicht	SMR = 0.8 (0.4-1.6)	
	66	<1.00 0.1 bis 0.99 ng/kg Körpergewicht	SMR = 1.2 (0.5-2.3)	
	69	>1.00 µg/kg Körpergewicht	SMR = 1.6 (0.9-2.6)	
	<69	>1.00 µg/kg Körpergewicht + Körpergewicht >20 Jahre Latenzzeit	SMR = 1.97 (1.05-3.36) Lungenkrebs = 3.06 (1.12-6.66)	
	127 mit Chlorakne	>20 Jahre Latenzzeit	SMR = 2.01 (1.22-3.15)	
Phenoxyherbizidproduktion; Unfall im Jahr 1963	140 exponierte Arbeiter, die am Unfall beteiligt waren	Mittelwert = 96.3 ppt Serum TCDD, extrapoliert auf 1841.8 ppt Serum TCDD max zum Zeitpunkt des Unfalls, n =14	Maligne Neoplasien RR = 1.7 (1.1-2.7)	[Bueno de Mesquita *et al.* 1993; Hooiveld *et al.* 1998]
	259 Exponierte, verglichen mit 482 Nichtexponierten	mittel exponiert extrapolierte Range (7.7 bis 124.1 ppt) zum Zeitpunkt des Unfalls (Lipid basiert)	Maligne Neoplasien RR = 5.0 (2.2-11.5)	
	242 Exponierte verglichen mit 482 Nichtexponierten	hoch exponiert, extrapolierte Range (124.2 bis 7307.5 ppt) zum Zeitpunkt des Unfalls (Lipid basiert)	Maligne Neoplasien RR = 5.6 (2.5 - 12.7)	
	549 Exponierte vgl. mit 482 Nichtexponierten	Exponiert, aber nicht in Unfall verwickelt, 244.1 ppt extrapoliert, n = 17	RR = 4.1 (1.8-9.0) angeglichen	

Explosion einer Phenoxyherbizid-fabrik in Seveso, Italien im Jahr 1976	Zonen A, B, und R	Exposition im Serum bestimmt höchste TCDD Konzentration: 56000 ppt in einem Kind gemessen	signifikant erhöhtes Risiko bei Männern ohne Beachtung der Latenzzeit	[Caramaschi *et al.* 1981; Bertazzi *et al.* 1989a; Bertazzi *et al.* 1989b; Bertazzi *et al.* 1992; Bertazzi *et al.* 1993; Pesatori *et al.* 1993; Bertazzi *et al.* 1997; Bertazzi *et al.* 1998; Landi *et al.* 1998; Bhagwat *et al.* 1999; Pesatori *et al.* 1999; Bertazzi *et al.* 2001]
	A-Zone N=862	53.2 ppt (N=7) Plasma TCDD Konzentration, 230.0 ppt extrapoliert zum Zeitpunkt des Unfalls	keine signifikanten Funde	
	B-Zone N=6647	11.0 ppt (N=51) Plasma TCDD Konzentration, 47.5 ppt extrapoliert zum Zeitpunkt des Unfalls	*Zone A und B* Totales Krebs RR = 1.10 (0.9–1.2) *Männer* Totales Krebs RR=1.1 (1.0-1.3) Krebs des Respirationstraktes RR=1.3 (1.0-1.6) Lymphohemato-poietisch RR=1.7 (1.0–2.8) Leukämie RR=2.1 (1.1-4.1) *Frauen* Myelom RR=3.2 (1.2–8.8)	
	R-Zone N=42831	4.9 ppt (N=52) Plasma TCDD Konzentration 200 Fälle von Chlorakne	*Zone R* *Männer* Speiseröhre RR=1.6 (1.1-2.3) *Frauen* Knochen - RR=2.5 (1.0-4.9)	

Abkürzungen: RR = relatives Risiko; SMR = Standardmortalitätsrate; 95% CI = 95% Konfidenzintervall

1997 stufte die International Agency for Research on Cancer (IARC) TCDD als ein Gruppe 1(b) Kanzerogen ein, d.h. es ist mit hinreichender Wahrscheinlichkeit von einer kanzerogenen Potenz von TCDD beim Menschen auszugehen [IARC 1997].

5.4.3.7 Mechanistische Aspekte

Der Mechanismus der Kanzerogenität von TCDD konnte bislang noch nicht gänzlich aufgeklärt werden. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass TCDD nicht direkt gentoxisch wirkt, denn es verursacht keine direkte Schäden an DNA durch Adduktbildung [Randerath *et al.* 1988; Turteltaub *et al.* 1990]. Ebenso wurde TCDD im Ames-Test (mit oder ohne metabolische Aktivierung) negativ getestet [Wassom *et al.* 1977; Giri 1986].

TCDD ist ein starker Tumorpromotor, aber ein schwacher Initiator im Zweistufen-Kanzerogenitätsmodell der Leber [Pitot *et al.* 1980; Flodstrom und Ahlborg 1989a; Lucier *et al.* 1991]. Effekte von TCDD wurden *in-vitro* und *in-vivo* in Bezug auf Apoptose beschrieben. In präneoplastischem Lebergewebe der Ratte führt die Behandlung mit TCDD zu einer Abnahme der Apoptoseinzidenz, wie es auch für andere Tumorpromotoren beschrieben wurde [Schulte-Hermann *et al.* 1999]. Auch in primären Hepatozyten der Ratte und in humanen Zelllinien bewirkt die Behandlung mit TCDD eine Verminderung der UV-induzierten Apoptose [Wörner und Schrenk 1996; Park und Matsumura 2006]. Eine weitere Eigenschaft von Tumorpromotoren ist die hemmende Wirkung auf die Zellkommunikation über intrazelluläre Gap Junctions. Dieser Effekt konnte an primären Hepatozyten nach TCDD-Inkubation beobachtet werden [Baker *et al.* 1995].

Die Rolle des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptors in der TCDD induzierten Kanzerogenese wurde ebenfalls untersucht. Beim EGF handelt es sich um ein Mitogen, es stimuliert die Entstehung mitotischer Signale in der Zelle. Der Rezeptor des EGF (EGFR) ist an einer Vielzahl von Zelltransformations- und Tumorentstehungsprozessen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass TCDD die Bindungskapazität des auf der Plasmamembran lokalisierten EGFR reduziert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch nicht gänzlich aufgeklärt worden, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass TCDD keinen Einfluss auf Bildung der mRNA des EGFR nimmt [Madhukar *et al.* 1984; Hudson *et al.* 1985; Abbott 1990; Lin *et al.* 1991a]. Es ist wahrscheinlich, dass die Herunterregulierung des EGFR durch Aktivierung des AhR vermittelt wird [Lin *et al.* 1991a]. Interessanterweise konnte die

verminderte EGFR Bindung in ovariektomierten Ratten nicht beobachtet werden, was zur Annahme führte, dass die Wachstums-Regulation in Abhängigkeit von Ovarialhormonen verändert wird [Sewall *et al.* 1993]. In der Tat steigert TCDD die durch EGF und Estradiol stimulierte DNA-Synthese in Rattenhepatozyten in Primärkultur [Schrenk *et al.* 1992]. Eine Interaktion von TCDD und EGF wurde auch in humanen epidermalen Zellen beobachtet [Rea *et al.* 1998].

Es bestehen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem kanzerogenen Effekt von TCDD und dem Estrogen-Rezeptor bzw. Metabolismus. Der Effekt scheint gewebespezifisch aufzutreten, denn die Verabreichung von TCDD erhöht die Lebertumorinzidenz, vermindert aber die Tumorinzidenz in Brustdrüse, Uterus und Hypophyse [Kociba *et al.* 1978]. Bei der Ratte verminderte sowohl eine einzelne Dosis TCDD als auch die wiederholte Gabe in einer 30-Wochen Studie die Bindekapazität des hepatischen Estrogenrezeptors für Estrogene [Astroff *et al.* 1988; Romkes und Safe 1988; Clark *et al.* 1991a; Zacharewski *et al.* 1991]. Dieser Effekt scheint Ah-Rezeptor abhängig zu sein, denn der Effekt war in AhR responsiven C57/BL6 Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt als in Mäusen mit einem Ah-Rezeptor mit geringer Affinität [Lin *et al.* 1991b]. Die ED_{50} zur Reduktion der hepatischen Estrogenrezeptorbindung ist vergleichbar mit der ED_{50} zur CYP1A1 und UDP Induktion bzw. Verlust der Plasmamembran EGFR Bindung [Lucier *et al.* 1993]. In Geweben des Reproduktionssystems vermindert TCDD die Tumorinzidenzen vermutlich durch erhöhten Estrogenmetabolismus als Konsequenz der UDP Induktion. In der Tumorzelllinie MCF-7 konnte auch ein erhöhter Estrogenabbau nach Inkubation mit TCDD beobachtet werden [Gierthy *et al.* 1988].

Ein Zusammenhang zwischen verändertem Fremdstoffmetabolismus und Kanzerogenität von TCDD besteht möglicherweise in Bezug auf die Schilddrüse. Es wurden verminderte Gehalte an Thyroxin (T4) im Serum TCDD-behandelter Ratten beobachtet [Bastomsky 1977a; McKinney *et al.* 1985; Pazdernik und Rozman 1985; Sewall *et al.* 1995]. Dieser Effekt ist vermutlich mit einer erhöhten T4 Glucuronidierung verbunden, verursacht durch eine AhR-regulierte UDP-Glucuronosyltransferase (UGT). Es wird vermutet, dass die gesteigerte Glucuronidierung von Schilddrüsenhormonen [McClain *et al.* 1989; Semler *et al.* 1989; Kohn *et al.* 1996] und/oder die induzierte Exkretion von Glucuroniden über die Galle [Vansell und Klaassen 2002] hauptverantwortlich für die verminderten Schilddrüsenhormon-gehalte im Blut sind. Als Antwort auf diese Verminderung wird eine Feedback-Hemmung der Hypophyse gestoppt, was die Stimulierung des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) zur Folge hat. Die Wachstumsstimulierung der Schilddrüse als Konsequenz der

erhöhten TSH-Gehalte kann möglicherweise die Bildung von Schilddrüsentumoren fördern. Ein solcher Mechanismus wird auch nach Gabe des UGT-Induktors Phenobarbital in Zwei-Stufen Kanzerogenitätsmodellen beobachtet [Hiasa *et al.* 1982; McClain *et al.* 1988].

Während man von AhR-regulierten CYPs sehr genau weiß, dass sie eine zentrale Rolle bei der metabolischen Aktivierung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen spielen, ist nach wie vor ungeklärt, ob und wie die Induktion des Phase I Fremstoffmetabolismus zur kanzerogenen Wirkung von TCDD beiträgt. Es wurde vorgeschlagen, dass TCDD durch Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP1A1 und CYP1A2 die DNA indirekt schädigen kann. Eine Theorie geht davon aus, dass die TCDD vermittelte Induktion von CYP1A Enzymen zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie oxidativen DNA Schäden führt, welche Mutationen und Krebs auslösen könnten [Park *et al.* 1996; Knerr *et al.* 2006]. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung von Ratten mit TCDD zur Erhöhung des 8-oxo-2´-desoxyguanosin (8-oxo-dG) Gehaltes, eines Markers für oxidative DNA-Schäden, in genomischer Leber-DNA der Tiere führt. Interessanterweise ist dieser Effekt in den Lebern weiblicher Ratten wesentlich stärker ausgeprägt. Zudem entwickeln weibliche Ratten mehr Lebertumore und diese auch schon bei niedrigeren Dosen verglichen mit männlichen Tieren. Daher wurde eine Korrelation zwischen 8-oxo dG Bildung und TCDD-induzierten Lebertumoren postuliert [Wyde *et al.* 2001b]. Da eine Ovariektomie weiblicher Ratten einen starken Rückgang der 8-oxo dG Bildung zur Folge hatte, wird eine zentrale Rolle von Estrogenen an diesem Prozess diskutiert. Es wurde z.B. vorgeschlagen, dass 4-Hydroxyestradiol, ein Estrogen-metabolit, einem Redox-Cycling unterliegt. Grundlage ist die Vermutung, dass ein korrespondierendes Catechol-Semichinon Zwischenprodukt entsteht, welches eine Quelle für die Bildung von ROS darstellt. Eine wichtige Rolle von CYP1A2 wird diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert, denn die Bildung des Catechols aus 17ß-Estradiol wird durch CYP1A2 katalysiert. Die Vermutung der Beteiligung von CYP1A2 an der Hepatokanzerogenese der Ratte ist stimmig mit der Tatsache, dass CYP1A2 nur in der Leber, aber nicht in extrahepatischen Geweben induzierbar ist [Lucier *et al.* 1993]. Dies erklärt allerdings noch nicht den stark fördernden Einfluss intakter Ovarien auf die 8-oxo dG Gehalte in der Leber TCDD-behandelter, weiblicher Ratten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Verteidigung der Zelle gegenüber ROS bzw. die Reparatur oxidativ geschädigter DNA durch die Anwesenheit von Estrogenen beeinflusst werden könnte.

5.5 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

In jeder Zelle eines aeroben Organismus werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Als ROS werden radikalische und nichtradikalische Sauerstoffderivate bezeichnet. Beispiele für Radikale sind das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), das Peroxidradikal ($OOH^{\cdot}$) und das Hydroxylradikal ($OH^{\cdot}$). Zu den nichtradikalischen Spezies zählen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon, hypochlorige Säure (HOCl) und Singulett-Sauerstoff. Sie können leicht in Radikale überführt werden. ROS entstehen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff, wobei die Reduktion in Ein- oder Zweielektronenschritten erfolgen kann [Heine 2005].

Ein Beispiel für endogene Generierung von ROS als Nebenprodukte physiologischer Prozesse ist die mitochondriale Atmungskette. Das Sauerstoffmolekül ist in seinem Grundzustand (Triplettzustand) mit zwei ungepaarten Elektronen als freies Radikal anzusehen, deswegen reagiert es auch hauptsächlich mit Radikalen. Dabei entstehen in zwei aufeinander folgenden Einelektronenübergängen auf molekularen Sauerstoff verschiedene ROS, nämlich das Superoxidradikalanion (1), H_2O_2 (2) sowie das Hydroxylradikal (3) [Berg *et al.* 2001] (Abbildung 8).

$$O_2 \xrightarrow{e^-} \underset{(1)}{O_2^{\cdot-}} \xrightarrow{e^- + 2H^+} \underset{(2)}{H_2O_2} \xrightarrow[-\,OH^-]{e^-} \underset{(3)}{OH^{\cdot}} \xrightarrow{e^- + H^+} H_2O$$

Abbildung 8 Sequenzielle Reduktion von molekularem Sauerstoff

ROS unterscheiden sich stark bzgl. Reaktivität und Lebensdauer. Das Superoxidradikalanion wird bei der Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff gebildet. Zwar ist es von begrenzter Reaktivität, allerdings kann es leicht durch Superoxiddismutase in H_2O_2 umgewandelt werden. Dies wird in Gegenwart von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer zum Hydroxylradikal reduziert (Fenton-Reaktion, Abbildung 9).
Das Hydroxylradikal mit einer Halbwertzeit von 10^{-9} Sekunden ist die reaktivste Sauerstoffspezies [Sies 1991] und wirkt stark oxidierend. $OH^{\cdot}$ kann auch durch die schwermetallionenkatalysierte (z.B. Kupfer, Eisen) Haber-Weiss-Reaktion aus $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 entstehen (Abbildung 10). Ebenso kann durch UV induzierte homolytische Spaltung von

H_2O_2 oder durch ionisierende Strahlung, welche Wasser zersetzt, $OH^{\cdot}$ gebildet werden [Halliwell und Gutteridge 1999].

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

Abbildung 9 Fenton-Reaktion

$$O_2^{-\cdot} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

$$O_2^{-\cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

Abbildung 10 Haber-Weiss-Reaktion

Das Superoxidradikalanion wird *in-vivo* durch verschiedene enzymatische Vorgänge gebildet, bei denen molekularer Sauerstoff reduziert wird [Halliwell und Gutteridge 1999]. Substanzen, die die strukturellen Eigenschaften zum so genannten „Redox-Cycling“ erfüllen, können ebenfalls $O_2^{-\cdot}$ bilden. Dabei nimmt ein Chinon von einer Reduktase ein Elektron auf, das dann auf Sauerstoff übertragen wird. Dieser Prozess ist für die Toxizität einer Vielzahl von Stoffen verantwortlich (Abbildung 11) [Eisenbrand und Metzler 2002].

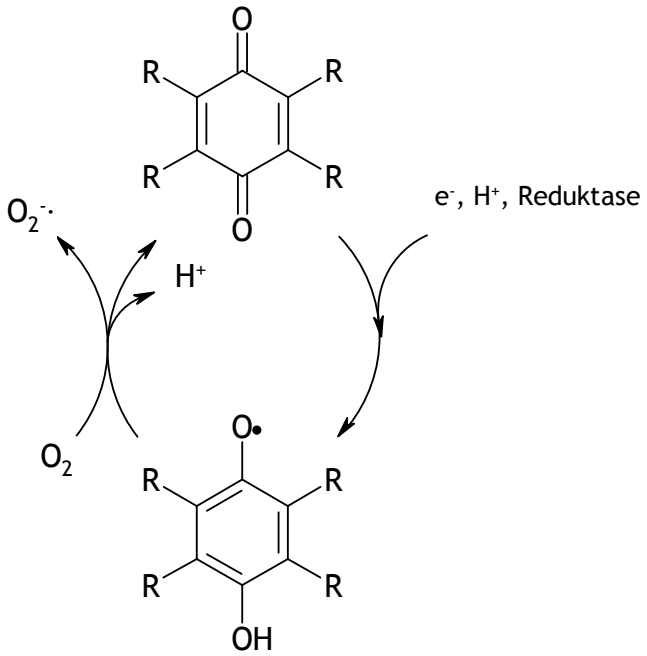


Abbildung 11 Redox-Cycling eines Chinons

H_2O_2 entsteht wie das Superoxidradikalanion in vielen enzymabhängigen Prozessen. Guanyl-Cyclase, Glucose-Oxidase, Monoamin-Oxidase oder die Superoxiddismutase (SOD) generieren H_2O_2, das lediglich schwach reaktiv ist. Es ist nicht in der Lage, direkt DNA, Lipide oder Proteine (mit Ausnahme von Thiol-Gruppen mancher Proteine) zu oxidieren, die dadurch modifiziert werden [Sies 1991; Kelly *et al.* 1998; Halliwell und Gutteridge 1999].
Da ROS Zellbestandteile schädigen können, verfügen aerobe Organismen zum Abfangen der ROS über antioxidativ wirksame Abwehrsysteme und Schutzmechanismen. Zu diesem Abwehrsystem zählen Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) sowie Glutathionperoxidase (GPx).
Für die Superoxiddismutase existieren in Eukaryonten drei Isoformen dieses Enzyms: Mangan-SOD, Kupfer/Zink-SOD und extrazelluläre SOD. Alle drei Formen dismutieren $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und O_2 [Kelly *et al.* 1998] (Abbildung 12):

$$2\ O_2^{\cdot-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Abbildung 12 Katalytische Reaktion der Superoxiddismutase

Die Katalase enthält Mangan oder eine Häm-Gruppe im katalytischen Zentrum und kommt hauptsächlich in Peroxisomen vor. Sie kann das u.a. von der SOD gebildete H_2O_2 schnell und effektiv zu Wasser und O_2 umsetzen [Halliwell und Gutteridge 1999] (Abbildung 13):

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Abbildung 13 Katalytische Reaktion der Katalase

Durch Glutathionperoxidasen werden H_2O_2 sowie organische Peroxide (ROOH) reduziert. Die Reduktionsäquivalente werden von dem nichtenzymatischen Antioxidans Glutathion (GSH) bereitgestellt [Kelly *et al.* 1998] (Abbildung 14):

$$2\ GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

Abbildung 14 Katalytische Reaktion der Glutathionperoxidase

Das ubiquitär verbreitete Tripeptid GSH (L-γ-Glutamyl-L-Cysteinylglycin) wird in der Leber durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und darauffolgender Kondensation mit Glycin synthetisiert. Es trägt als reaktive Gruppe eine Thiol-Gruppe [Meister und Anderson 1983]. Diese reduziert zahlreiche ROS (z.B. $^1O_2$, $OH^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$) und wird

dabei zu GSSG oxidiert. Glutathion kann intrazellulär proteingebunden, in reduzierter (GSH) oder in oxidierter (GSSG) Form vorliegen. Wichtig für die Funktionalität der GPx ist die Glutathion-Reduktase (GSR), die mittels Kofaktor NADPH oxidiertes Glutathion (GSSG) wieder zu GSH reduziert (Abbildung 15). Neben der Bildung wasserlöslicher Metabolite werden durch GSH auch elektrophile Substanzen gebunden, die ansonsten mit zellulären Makromolekülen reagieren könnten und dadurch Schäden verursachen. Die meisten Elektrophile reagieren bereits nicht-enzymatisch mit GSH, allerdings wird die Reaktion häufig durch Glutathion-S-Transferasen (GST) beschleunigt [Eisenbrand und Metzler 2002].

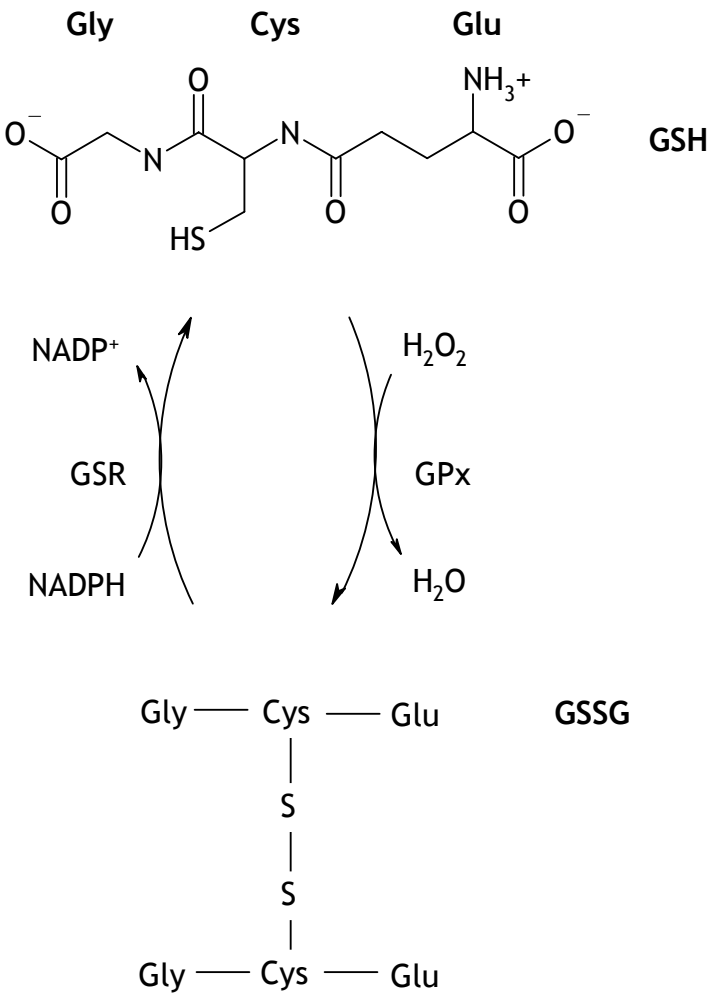


Abbildung 15 Oxidation und Reduktion von Glutathion durch GPx bzw. GSR

Weitere protektiv wirksame Substanzen werden offenbar mit der Nahrung aufgenommen. Zu diesen niedermolekularen, antioxidativ wirksamen Substanzen gehören die Vitamine C

und E, Carotinoide, einige Mineralstoffe wie Zink, Selen und Mangan, sowie polyphenolische Substanzen, z.B. Flavonoide. Das ROS-abfangende Potenzial dieser Moleküle beruht zumeist auf deren Eigenschaft, resonanzstabilisierte Radikale bilden zu können, die wenig reaktiv und somit nicht zu Wasserstoffabstraktionen oder Elektronentransfers fähig sind. Als endogen gebildete Substanz ist Bilirubin zu nennen, das Endprodukt des Hämabbaus. *In-vitro* konnte gezeigt werden, dass Bilirubin Peroxyl-Radikale und Singulett-Sauerstoff abfangen kann. Die Bedeutung *in-vivo* ist bislang allerdings noch unklar [Halliwell und Gutteridge 1999; Berg *et al.* 2001].
Bildung und Beseitigung von ROS bilden in gesunden Zellen ein Gleichgewicht. Oxidativer Stress wird in Lebewesen erst dann hervorgerufen, wenn der Organismus mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert, als durch die antioxidative Abwehr eliminiert werden kann [Halliwell 1994; Kelly *et al.* 1998].

5.5.1 Endogene Entstehung von ROS im Fremdstoffmetabolismus

Im eukaryontischen Cytochrom P450 Monooxygenase-System wird zumeist ein nicht unerheblicher Anteil des aktivierten Sauerstoffs vom Enzym freigesetzt, ohne dass das Substrat dabei modifiziert wird [Kuthan und Ullrich 1982; Gorsky *et al.* 1984]. Es sind drei Stellen im katalytischen Monooxygenierungs-Zyklus bekannt, an denen ROS freigesetzt werden können (Abbildung 16). Diese sind mit blauen Pfeilen in der Abbildung gekennzeichnet: Die erste Möglichkeit ist die Freisetzung von Superoxidanion-Radikalen als Folge des Abbaus des durch ein Elektron reduzierten Komplexes (d→b). Der zweite ROS produzierende Weg beruht auf der Protonierung des Peroxicytochrom P450 (e→b) und der damit verbundenen Bildung von Wasserstoffperoxid. Eine dritte Variante benötigt zunächst die Aufnahme zweier weiterer Elektronen (f→g→b). Das Resultat ist die Freisetzung des zweiten Sauerstoffatoms in Form eines Wassermoleküls. Der katalytische Zyklus für den Idealfall der Monooxygenierung ist in Abbildung 16 mit schwarzen Pfeilen dargestellt [Zangar *et al.* 2004].

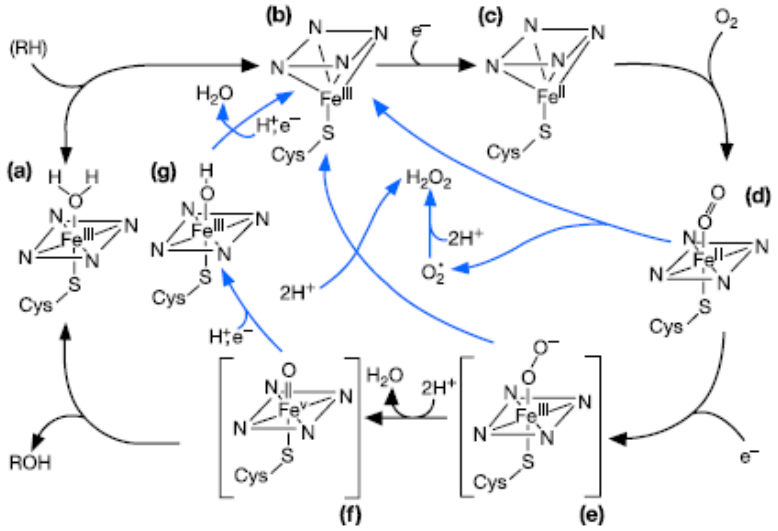


Abbildung 16 Möglichkeiten der ROS Entstehung während der CYP katalysierten Monooxygenierung [Zangar *et al.* 2004]

Die kontinuierliche ROS Produktion ist eine unvermeidbare Konsequenz des NADPH Verbrauchs durch Cytochrom P450 Monooxygenasen, sowohl in Beteiligung, als auch in Abwesenheit eines Substrates. Die Effizienz des Elektronentransfers von NADPH auf Cytochrom P450 über Elektronentransferketten bestimmt dabei den Anteil der Entkopplung. Von einem entkoppelten Elektronentransfer spricht man, wenn innerhalb des Monooxygenierungszyklus kein zweites Elektron auf Sauerstoff übertragen wird, sondern dieser, nach Übertragung von nur einem Elektron, als Superoxidradikalanion aus dem katalytischen Zyklus entlassen wird. Dabei ist die Entkopplungsrate bei eukaryontischen membrangebundenen, mikrosomalen Monooxygenasen hoch, die Umsatzrate dabei ist, verglichen mit mikrobiellen Monooxygenasen, verhältnismäßig ineffizient [Kuthan und Ullrich 1982; Zhukov und Archakov 1982; Gorsky *et al.* 1984; Zhukov und Archakov 1985]. Das Ausmaß der Entkopplung des P450-Systems scheint vom einzelnen Isoenzym und vom Substrat abhängig zu sein [Schenkman und Jansson 2003]. Welcher Weg letztlich zur Freisetzung der ROS eingeschlagen wird, bzw. welchen Anteil jeder einzelne an der gesamten ROS-Freisetzung trägt, ist zudem von Faktoren wie Substrattyp, pH-Wert, Ionenstärke oder der Sauerstoffkonzentration abhängig [Zhukov und Archakov 1982; Gorsky *et al.* 1984; Zhukov und Archakov 1985; Blanck *et al.* 1991].

Berücksichtigt man die hohe Ausstattung an fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in bestimmten eukaryontischen Zellen bzw. Geweben, so liegt es nahe, dass die mikro-

somalen Elektronentransferketten des Fremdstoffmetabolismus eine Hauptquelle für ROS Produktion darstellen können. Die im entkoppelten Fremdstoffmetabolismus entstandenen ROS sind in der Lage, die Zelle über oxidative DNA-Modifikationen, Proteinoxidation oder Lipidperoxidation langfristig zu schädigen. Es wird deswegen vermutet, dass Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen als ROS-Quelle eine wichtige Rolle bei Hepatotoxizität sowie der Kanzerogenese einnehmen [Ishii 1996; Shields *et al.* 1996; Weltman *et al.* 1998].

5.6 Oxidative DNA-Modifikationen und Reparatur

ROS können die DNA auf unterschiedliche Art und Weise schädigen. Bislang konnten mehr als 100 verschiedene Modifikationen identifiziert werden, wobei sowohl DNA-Basen oxidiert werden, als auch das Zucker-Phosphatrückgrat geschädigt werden kann, was zu Strangbrüchen führt [Dizdaroglu 2003]. Zu den verschiedenen Modifikationen der DNA zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, basenfreie Stellen (apurinische/apyrimidinische, AP, Läsionen) und oxidierte Basen. Oxidierte AP-Läsionen werden durch einen radikalischen Angriff an Position 1, 2 oder 4 des Zuckers generiert [Epe 1996]. Bei der nächsten DNA-Replikation kann dies zu Fehlpaarungen und Mutationen führen. Das Hydroxylradikal ist von den ROS für die meisten Schäden verantwortlich, Peroxyradikale und H_2O_2 reagieren dagegen nicht direkt mit der DNA. Oxidative Basenmodifikationen verfügen über ein hohes mutagenes Potenzial. Die Veränderung von Guanin durch ROS ist die am häufigsten beobachtete Basenmodifikation, denn Guanin besitzt im Vergleich zu den anderen Basen das niedrigste Oxidationspotenzial [Huttermann 1982]. Das 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxo dG) ist die meistgefundene oxidative Modifikation. Es entsteht durch Addition eines OH-Radikals an das C8-Atom des Guanins (Abbildung 17).

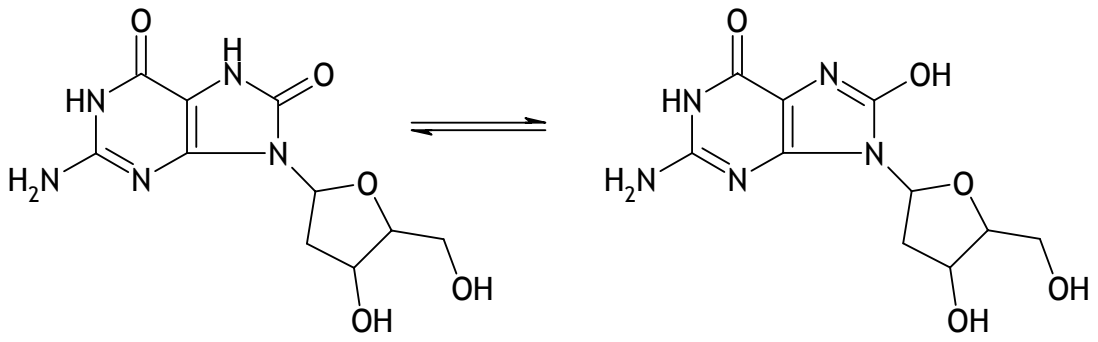


Abbildung 17 Keto-Enolgleichgewicht von 8-Oxoguanin

Durch diese Oxidationsmodifikation können Transversionsmutationen ausgelöst werden. Alternativ ist es auch möglich, dass aus dem primär gebildeten Radikal durch Öffnung des Imidazolrings 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy-Guanin) gebildet wird (Abbildung 18) [Cadet *et al.* 2000].

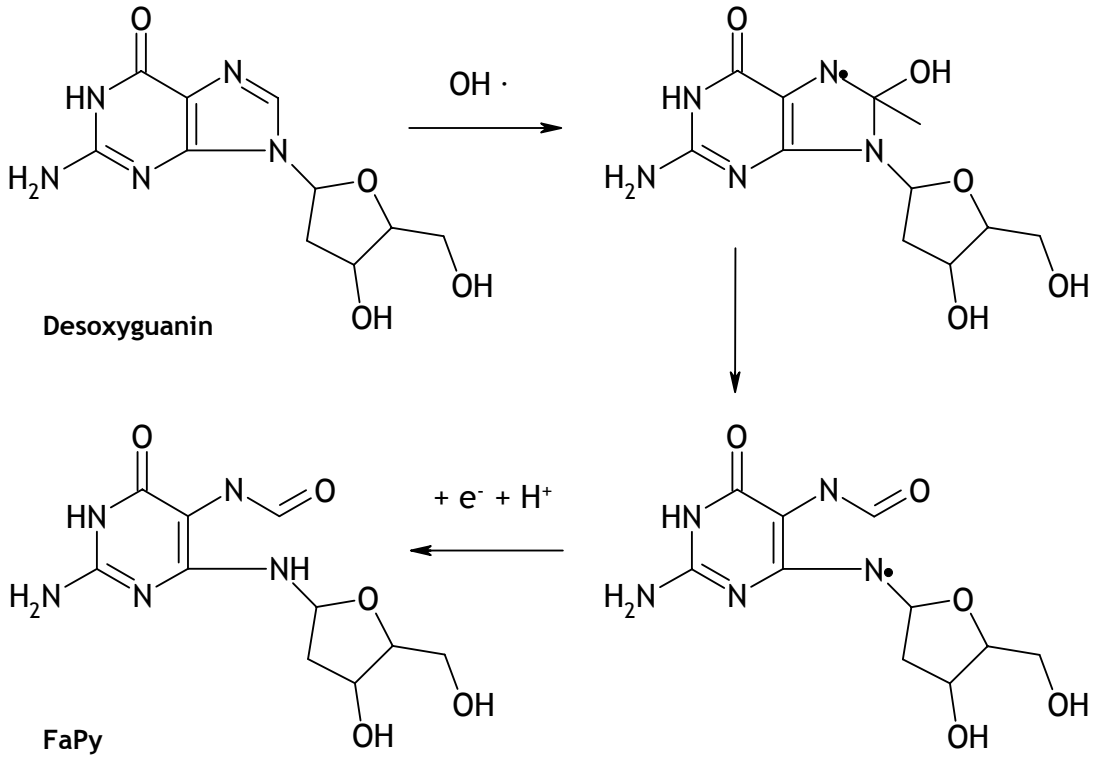


Abbildung 18 Entstehung von FaPy durch Modifikation von Desoxyguanin

Unreparierte oxidative Schäden an der DNA werden in Verbindung mit Krebs und anderen degenerativen Krankheiten gebracht. In den meisten Organismen stellen DNA Schäden Substrate für Reparatur-Enzyme dar, die strukturell modifizierte Basen aus der Erbinformation entfernen. Diese Enzyme sind in den „base excision repair“ (BER) Weg eingebunden. Eine Zelle reagiert auf Schädigung mit der Initiation einer Reparaturkaskade. Beim BER spaltet eine N-DNA-Glycosylase die N-glycosylische Bindung zwischen der geschädigten Base und der Desoxyribose. Sie hinterlässt eine abasic (AP) site in der DNA, welche eliminiert wird, indem das DNA Rückgrat neben der AP site durch eine AP-Endonuklease geöffnet und die AP site aufgefüllt wird. Dabei sind die Schritte im Einzelnen: (1) Erkennung des Schadens, (2) Ausschneiden eines Oligomers, das den Schaden beinhaltet, (3) Resynthese von DNA (als Template dient der unbeschädigte Strang) und (4) Ligation der neu synthetisierten DNA (Abbildung 19) [Laval 1996].

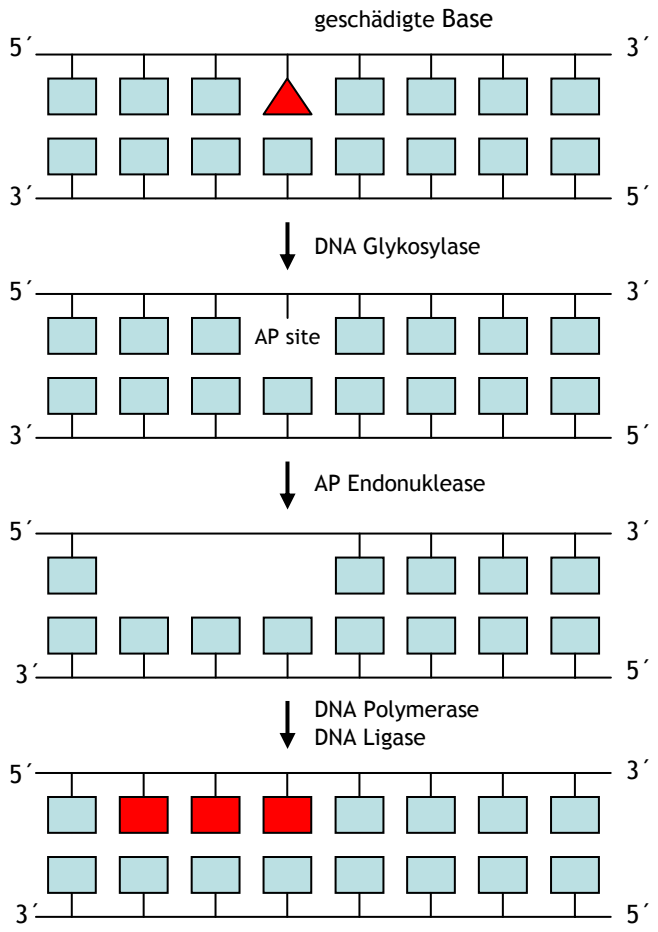


Abbildung 19 schematische Darstellung der Exzisions-Reparatur

Die Nukleotidexzisions-Reparatur („Nucleotid Excision Repair“, NER) funktioniert nach dem gleichen Prinzip, ist aber aufwendiger, da das herausgeschnittene DNA-Stück über mehrere Basen herausgeschnitten wird [Hoeijmakers 2001b; Hoeijmakers 2001a].

5.7 Transgene Mäuse

Die Maus als Modellorganismus spielt in Wissenschaft und Forschung eine zentrale Rolle, denn sie ist genetisch betrachtet neben dem Menschen der am besten charakterisierte Säuger [Beck *et al.* 2000]. So konnte das Mausgenom Sequenzierungs Konsortium im Jahr 2002 das komplette sequenzierte Genom des Mausstammes C57BL/6J zusammenfassend publizieren [Waterston *et al.* 2002].

Mit einer geschätzten Anzahl von 27000 bis 30500 Genen kommt die Maus auf eine ähnliche Zahl an Erbinformationen wie der Mensch. Bei 99 % dieser DNA-Abschnitte existiert eine entsprechende Sequenz im menschlichen Erbgut, 96 % liegen dabei in ähnlichen Nachbarschaften vor [Waterston *et al.* 2002]. Die Maus ist in ihrer Entwicklung und ihrem Stoffwechsel dem Menschen ähnlich. An der Maus lassen sich physiologische Vorgänge oder auch Krankheiten gut untersuchen, sie hat eine rasche Generationsfolge, ist klein und einfach zu halten.

Transgene Mäuse, die ein humanes Gen exprimieren, bieten neue Möglichkeiten bei der Bewertung von toxikologischen Aspekten oder von Pharmaka, die therapeutischen Zwecken dienen. In einem Tiermodell können darüber hinaus weitaus mehr Parameter betrachtet werden als jedes *in-vitro* Modell bieten kann, denn die Komplexität eines gesamten Organismus kann bislang *in-vitro* nicht simuliert und untersucht werden.

Fortschritte in der Molekularbiologie und der experimentellen Embryonenforschung haben das Spektrum an möglichen Manipulationen des Mausgenoms in den letzten Jahren enorm erweitert. So wurde eine grosse Anzahl von Mausmutanten etabliert [Nagy und Mar 2001]. Der Ausdruck „transgen“ wurde 1981 von Gordon und Ruddle geprägt. Er bezeichnet Organismen, die eine *in-vitro* zusammengefügte DNA-Sequenz stabil in ihr Genom integriert tragen [Gordon und Ruddle 1981].

Es existieren mehrere Verfahren zur Genmanipulation *in-vivo*: Zum einen die Erzeugung transgener Tiere durch ungerichtete Integration der Transgen-DNA durch Pronukleusinjektion [Gordon *et al.* 1980; Gordon und Ruddle 1983] oder durch Transfektion von rekominanten Retroviren in frühe Embryonen. Eine andere Strategie ist die zielgerichtete Genentfernung in embryonalen Stammzellen entweder durch Verlust der Funktion („knock-out“) bzw. durch Einfügung eines Gens an den Genort des Interesses („knock-in“) [Thomas und Capecchi 1987; Gorman und Bullock 2000; Bockamp *et al.* 2002; van der Weyden *et al.* 2002; Denning und Priddle 2003].

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode ist die weit verbreitete und mittlerweile gut etablierte Technik der Pronukleusinjektion. Dabei werden in jede einzelne

Zygote DNA-Moleküle injiziert, die vor der zufälligen chromosomalen Integration rekombinieren [Bishop und Smith 1989].
Der einfachste Aufbau eines Transgens besteht aus einem Promotor, der die Expression des „Genes of Interest“, kloniert als cDNA, vorantreibt und einer Polyadenylierungssignal-Sequenz, die für Termination der Transkription und Polyadenylierung der mRNA sorgt. Diese Minimalkonfiguration garantiert häufig aber nur eine geringe Expression des Transgens.

5.8 Das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression humaner Gene unter der Kontrolle von nicht-induzierbaren Promotoren oftmals relativ geringe Expressionsraten nach erfolgter Induktion liefert. Das Tetrazyklin (Tet)-regulierte Promotersystem dagegen liefert meist eine hohe Transgen-Expression, denn es bietet eine selektive, quantitative Regulation des Transgens, welche sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* Anwendung findet. In Vergleich zu anderen, regulierbaren Systemen bietet das Tet-System viele Vorteile: Da die kritischen, regulatorischen Elemente prokaryotischen Ursprungs sind, wird dadurch das Zielgen nicht beeinflusst. Zudem kann das Auftreten eines toxischen Effektes, resultierend aus der Gabe von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin (Dox) in den Dosen, wie sie im System angewandt werden, ausgeschlossen werden. Da Tetrazykline antibiotisch wirksam sind, werden sie auch als Antibiotikum an Menschen verabreicht. Mitunter auch deswegen sind diese Stoffe bzgl. Sicherheit am Menschen extensiv untersucht worden, so dass die Gruppe der Tetrazykline einen geeigneten Kandidaten für die Genregulation darstellt. Bujard und Hillen demonstrierten als erste die Effizienz dieses Systems in Säugerzellen. Das Tet-off System funktioniert nach folgendem Prinzip, das in Abbildung 20 schematisch dagerstellt ist:

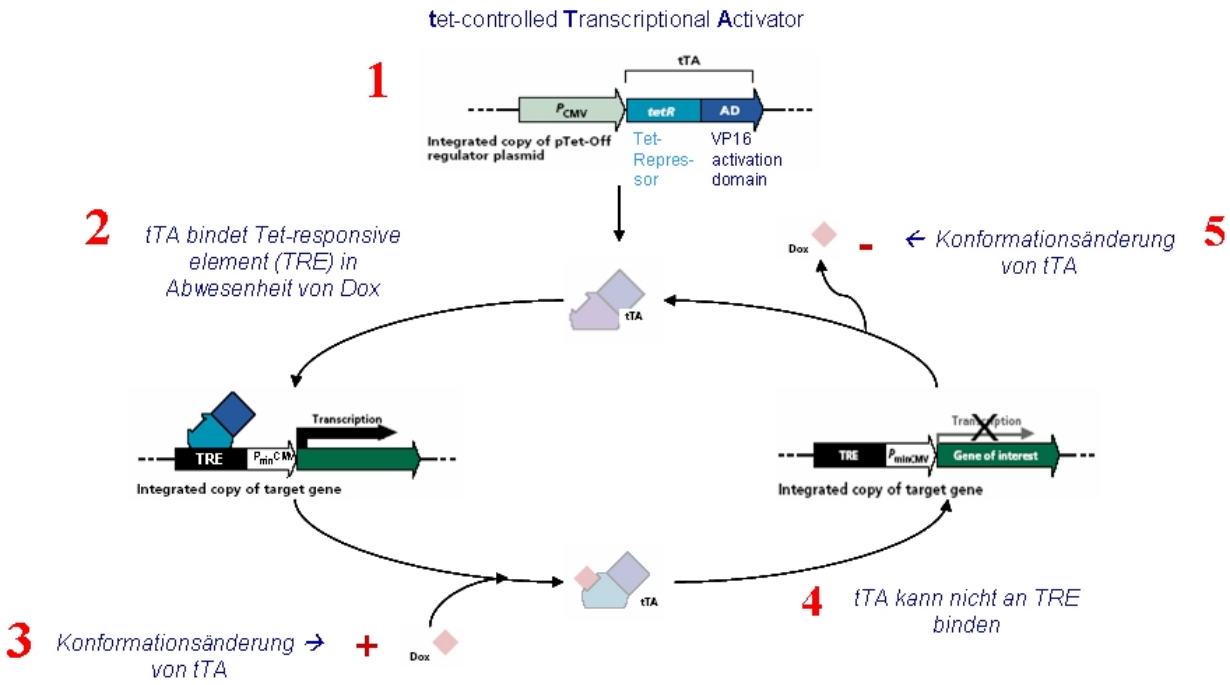


Abbildung 20 Schematische Darstellung des Tet-off Prinzips

Das Entfernen von Tetrazyklin in der Zelle bzw. im Organismus (5) veranlasst einen bakteriellen Tetrazyklin Repressor (TetR), welcher an einen viralen VP16 Transaktivator gekoppelt ist (zusammen als Tet-transcriptional activator, tTA, bezeichnet) zur Induktion der Genexpression (1). Dies geschieht über die Bindung an sieben Tandemkopien einer Tet-Operator-DNA Bindungsstelle (auch bezeichnet als Tetrazyklin responsives Element, TRE), welche unmittelbar neben einem minimalen Promoter lokalisiert ist: In Abwesenheit eines Liganden (Tet/Dox) bindet das Tetrazyklin-Rezeptor-Transaktivator Protein (tTA) an die TRE-Sequenz, welche oberhalb des minimal Promoters lokalisiert ist. Als Folge dessen wird die Genexpression induziert (2). Wird ein Ligand zum System gegeben (3), verliert tTA durch Konformationsänderung seine Affinität zu TRE und die Genexpression wird verhindert (4). Genau umgekehrt funktioniert das so genannte Tet-on Prinzip. Hier führt die Gabe von Liganden zur Induktion der Genexpression, ein reverses tTA (rtTA) bindet TRE in Anwesenheit von Tet/Dox [Gossen und Bujard 1992; Gossen *et al.* 1995; Iida *et al.* 1996; Kistner *et al.* 1996; Blau und Rossi 1999; Jaisser 2000; Lewandoski 2001; Yamamoto *et al.* 2001; Albanese *et al.* 2002; Rennel und Gerwins 2002; Zhu *et al.* 2002].

6 Problemstellung

Die Kanzerogenität von Dioxinen ist bisher am besten an der „Prototyp“-Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) untersucht worden. TCDD wurde im Jahr 1997 von der International Agency for Reasearch on Cancer (IARC) als Klasse I Kanzerogen eingestuft, obwohl bislang die Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD noch nicht hinreichend geklärt werden konnten.
Ein Hauptzielorgan der kanzerogenen Wirkung von TCDD beim Nager ist die Leber. Da TCDD in vielen Testsystemen keine gentoxische Wirksamkeit aufweist, wird es allgemein als nicht-gentoxischer Tumorpromotor angesehen.
Während man von AhR-regulierten CYPs sehr genau weiß, dass sie eine zentrale Rolle bei der metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen spielen, ist nach wie vor ungeklärt, ob und wie die Induktion des Phase I Fremstoff-metabolismus zur kanzerogenen Wirkung von TCDD beiträgt. Es wurde vorgeschlagen, dass TCDD durch Induktion von fremdstoffmetabolisierenden CYP Enzymen die DNA indirekt schädigen kann. Die Theorie geht dabei davon aus, dass die TCDD vermittelte Induktion von CYP1A Enzymen zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie oxidativen DNA Schäden führt, welche Mutationen und Krebs auslösen könnten. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine TCDD Exposition weiblicher Ratten in deren Leber DNA-Schäden verursachen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wird daher von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass TCDD über die durch den AhR massiv vermittelte Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzymen, vor allem von CYP1A1, zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche die DNA schädigen können und potenziell mutagen sind.

Die Induktion von Phase I Enzymen über den AhR (z.B. mit dem Liganden TCDD) ist meist mit der vermehrten Expression einer Reihe anderer, AhR regulierter Gene verbunden. Induziert man nicht mit einem AhR-Liganden, ergibt sich die Schwierigkeit bei den Unter-suchungen, dass lediglich eine sehr geringe konstitutive Expression von CYP1A1 in gesundem, unbehandeltem Gewebe stattfindet. Somit ist es schwierig vorauszusagen, welchen Anteil die katalytisch aktiven CYP Enzyme an der ROS-Bildung nach AhR-vermittelter Genexpression (in Abwesenheit eines induzierenden Liganden) tragen.

Deswegen sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein System entwickelt werden, das ausreichend große Mengen an CYP1A1 exprimiert ohne dass zuvor eine das Studienergebnis möglicherweise verfälschende Behandlung mit einem AhR-Agonisten (z.B. TCDD) stattgefunden hat. Ziel war die Etablierung eines geeigneten *in-vivo* Systems, nämlich die Erzeugung einer transgenen, humanes CYP1A1 überexprimierenden, Maus.
Diese sollte nach organspezifischer Charakterisierung der Transgen-Expression dazu verwen-det werden, den Gesamtorganismus, bzw. einzelne Organe, in denen eine (vom Promotor des Expressionsvektors abhängige) CYP1A1 Überexpression stattfindet, hinsicht-lich oxidativem Stress und DNA-Schädigung als erwartete Auswirkungen der Überexpression zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten analoge Untersuchungen *in vivo* an TCDD behandelten C57B6 Mäusen und Sprague-Dawley Ratten bzw. an deren entsprechenden Kontrollen, sowie an transgenen Mäusen mit konstitutiv aktivem AhR (mittels der transgenen Mauslinie CA-AhR) durchgeführt werden. Die CA-AhR Linie bietet eine weitere Möglichkeit, die Auswirkungen der AhR-vermittelten Genexpression ohne Verwendung eines AhR-Liganden *in-vivo* zu untersuchen.

Als Messparameter für oxidativen Stress sollte der auf Fluoreszenz basierende H_2DCFDA Assay im 96 Well Format etabliert werden. Als Marker für oxidative DNA-Schäden sollte der Gehalt an 8-oxo dG in genomischer DNA individueller Proben quantifiziert werden.
Eine weitere Fragestellung, die sich unmittelbar anschließt und im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war, ob evtl. erhöhte ROS Gehalte bzw. DNA Schäden nach TCDD Expostition in einen direkten Zusammenhang mit AhR-regulierten CYP1A Induktion stehen. Die Analyse der katalytischen CYP1A Aktivität mittels EROD-Assay sollte darüber Auskunft geben.

Isolierte RNA aus den Lebern der oben genannten Mäuse sollte mit Hilfe von Microarrays auf Veränderungen der Genexpressionsmuster untersucht werden, die Hinweise auf gentoxischen/oxidativen Stress und andere prokarzinogene Veränderungen als Konsequenz der TCDD Exposition bzw. der konstitutiven Aktivität des AhR geben sollten.

Schließlich sollte an Mikrosomen (Supersomes™) aus stabil transfizierten Insektenzellen, die verschiedene CYP Enzyme des Menschen und der Ratte rekombinant exprimieren, das individuelle ROS-Bildungspotenzial einzelner, AhR-regulierter CYP-Enzyme untersucht werden.

Es wurden grundlegende Erkenntnisse zu den Mechanismen der indirekt gentoxischen Wirkung von TCDD in der Nagerleber sowie zu ihrer möglichen Bedeutung für den Menschen erwartet.

7 Material und Methoden

7.1 Geräteliste

Gerät	Firma	Ort
API3000 Massenspektrometer	Applied Biosystems	Darmstadt
Autoklav Varioklav® Typ500	Lacher GmbH	München
Autosampler: Agilent 110	Agilent	Waldbronn
Bakterienbrutschrank Köttermann® 2737	Köttermann Labortechnik	Uetze
Bakterienfilter Celluloseacetat	Satorius	Göttingen
Bakterienschüttler TH 30/SM 30	Johanna Otto GmbH	Hechingen
Bioanalyzer	Agilent Technologies	Waldbronn
Biofreezer MDF-U6086S	Sanyo	München
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus	Hanau
Dampfdrucktopf	H+P Labortechnik GmbH	Darmstadt
EAGLE EYE™ II	Stratagene	Heidelberg
ELISA Reader Model 450	BioRad	München
Geltrockner Maxidry D64	Biometra	Göttingen
Gewebehomogenisator	Heidolph RZR 2100	Kelheim
HPLC Agilent 1100 LC Binary Pump	Agilent	Waldbronn
HPLC-Säule AQ 12S051502 QT	YMC	Dinslaken
Hybridisierungsofen	Techne Hybridiser HB 1D	Wertheim
iCycler Real-time Thermocycler	BioRad	München
LAS 3000 CCD Kamera	Raytest	Straubenhardt
Lumi Imager™ CCD Kamera	Roche	Mannheim
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold	Bad Wildbad

Mikroskope		
Axiovert 25	Zeiss	Jena
Leica DM IRB	Leica	Wetzlar
NanoDrop	PeqLab	Erlangen
Netzgerät ST 606 T	Gibco BRL	Heidelberg
pH Meter Φ 300	Beckman	München
Photometer Beckman UV-DU 640	Beckman	München
Plattenreader Fluoroskan Ascent FL	Thermo Electron GmbH	Dreieich
Schüttelapparatur Shaker S4	Elmi	Latvia
Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL	Burgwedel
SDS-PAGE Kammern Mini Protean III	BioRad	München
Semi-Dry-Blotter Hoefer TE 77	Hoefer Inc.	San Francisco
Spectrophotometer Kontron Uvikon 930	Kontron Instruments	München
Sterilbank Gelaire BSB 4A	Flow Laboratories	Meckenheim
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer	Rodgau - Jügesheim
Ultraschallbad Transsonic T 460H	Bender und Hobein	Singen
Ultraschallsonde Labsonic 2000 mit Nadelsonde	Braun	Reutlingen
Waagen		
BP 2105	Sartorius	Göttingen
BP 410S	Sartorius	Göttingen
EP 400	Bosch	Jungingen
Zentrifugen		
Microfuge® R Centrifuge	Beckman	München
Beckman GS-6R Centrifuge	Beckman	München
Beckman J2-21	Beckman	München
OptimaTM TL Ultracentrifuge	Beckman	München
Sorvall Discovery 90SE	Kendro	Langenselbold

7.2 Material

Chemikalien

Standard-Laborchemikalien die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von handelsüblichen Firmen wie Roche, Penzberg; Carl Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; BD Falcon, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Riedel de Haen, Hannover; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; BioRad, München, und Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

Enzyme

Restriktionsenzyme, High Fidelity DNA Polymerase, Taq DNA Polymerase sowie T4 DNA-Ligase wurden von Fermentas bezogen und mit den mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet.

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial das nicht gesondert aufgeführt ist, wurde bei handelsüblichen Firmen wie Eppendorf, Hamburg; Greiner-Nunc, Nürtingen; sowie BD Falcon, Heidelberg bestellt.

Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte im Dampfdruckautoklaven für 30 min bei 120°C und 10^5 Pascal. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße: 0.2 µm).

7.3 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden orientieren sich soweit nicht anders angegeben nach Sambrook [Sambrook 2000] und nach den Angaben des Herstellers.

7.4 Generierung der transgenen, hCYP1A1 überexprimierenden Maus

7.4.1 Generierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1

7.4.1.1 Umklonierung des humanen CYP1A1 cDNA Klons IRAKp961N1042 aus dem Vektor pCMV•SPORT6 in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet

Die coding sequence des humanen CYP1A1 soll aus dem Konstrukt pCMV•SPORT6/ IRAKp961N1042 (Abbildung 22) mittels PCR und spezifischen Oligonucleotidprimern amplifiziert werden. Der Vorwärtsprimer 1A1-for-MluI (5´ GC **ACG CGT** CTA CAC TGA TCA TGC TT 3´) enthält zusätzlich eine **Mlu I** Restriktionsschnittstelle, der Rückwärtsprimer 1A1-rev-NheI (5´ GC **GCT AGC** GCA CCT AAG AGC GCA 3´) eine zusätzliche **Nhe I** Restriktionsschnittstelle, um eine passende Insertion in den Vektor pBiEGFP-Tet (Abbildung 23) zu gewährleisten. Dieser wird ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Mlu I und Nhe I geschnitten, so dass Insert und Vektor über diese Restriktionsschnittstellen ligiert werden können. Abbildung 21 zeigt als Ausschnitt der humanen CYP1A1 mRNA Sequenz die coding sequence des Gens. In roter Farbe hervorgehoben sind Start- bzw. Stopcodon, in blauer Farbe die Primerbindungsstellen für die PCR.

Mit Hilfe des Plasmids pBiEGFP-Tet kann neben dem „gene of interest" (hier die humane CYP1A1 cDNA) das „enhanced green fluorescent Protein (EGFP)" unter der Kontrolle des bidirektionalen Tetrazyklin-responsiven Promoters (Pbi-1) coexprimiert werden. Der bidirektionale Promoter Pbi-1 ist responsiv zum regulatorischen tTA Protein des Tet-off Systems. Pbi-1 beinhaltet das Tetrazyklin-responsive Element (TRE), welches sich aus sieben Kopien der 42 bp langen Tetrazyklin-Operator Sequenz (tetO) zusammensetzt. Das TRE-Element befindet sich zwischen zwei identischen minimalen CMV Promotoren (P_{min} CMV), denen der Enhancer fehlt, welcher Bestandteil des kompletten CMV Promotors ist. Als Folge dessen ist Pbi-1 in Abwesenheit von tTA inaktiv.

61 agagtccacc cttcccagct cagctcagta cctcagccac ctccaagatc cctacactga
121 tcatgctttt cccaatctcc atgtcggcca cggagtttct tctggcctct gtcatcttct
181 gtctggtatt ctgggtaatc agggcctcaa gacctcaggt ccccaaaggc ctgaagaatc
241 caccagggcc atggggctgg cctctgattg ggcacatgct gaccctggga aagaacccgc
301 acctggcact gtcaaggatg agccagcagt atggggacgt gctgcagatc cgaattggct
361 ccacacccgt ggtggtgctg agcggcctgg acaccatccg gcaggccctg gtgcggcagg
421 gcgatgattt caagggccgg cccgacctct acaccttcac cctcatcagt aatggtcaga
481 gcatgtcctt cagcccagac tctggaccag tgtgggctgc ccgccggcgc ctggcccaga
541 atggcctgaa aagtttctcc attgcctctg acccagcctc ctcaacctcc tgctacctgg
601 aagagcatgt gagcaaggag gctgaggtcc tgataagcac gttgcaggag ctgatggcag
661 ggcctgggca ctttaacccc tacaggtatg tggtggtatc agtgaccaat gtcatctgtg
721 ccatttgctt tggccggcgc tatgaccaca accaccaaga actgcttagc ctagtcaacc
781 tgaataataa tttcggggag gtggttggct ctggaaaccc agctgacttc atccctattc
841 ttcgctacct acccaaccct tccctgaatg ccttcaagga cctgaatgag aagttctaca
901 gcttcatgca gaagatggtc aaggagcact acaaaaccctt tgagaagggc cacatccggg
961 acatcacaga cagcctgatt gagcactgtc aggagaagca gctggatgag aacgccaatg
1021 tccagctgtc agatgagaag atcattaaca tcgtcttgga cctctttgga gctgggtttg
1081 acacagtcac aactgctatc tcctggagcc tcatgtattt ggtgatgaac cccagggtac
1141 agagaaagat ccaagaggag ctagacacag tgattggcag gtcacggcgg ccccggctct
1201 ctgacagatc ccatctgccc tatatggagg ccttcatcct ggagaccttc cgacactctt
1261 ccttcgtccc cttcaccatc ccccacagca caacaagaga cacaagtttg aaaggctttt
1321 acatccccaa ggggcgttgt gtctttgtaa accagtggca gatcaaccat gaccagaagc
1381 tatgggtcaa cccatctgag ttcctacctg aacggtttct cacccctgat ggtgctatcg
1441 acaaggtgtt aagtgagaag gtgattatct ttggcatggg caagcggaag tgtatcggtg
1501 agaccattgc ccgctgggag gtctttctct tcctggctat cctgctgcaa cgggtggaat
1561 tcagcgtgcc actgggcgtg aaggtggaca tgacccccat ctatgggcta accatgaagc
1621 atgcctgctg tgagcacttc caaatgcagc tgcgctctta ggtgcttgag agccctgagg

= Start-/Stopcodon

= Primerbindungsstellen

Abbildung 21 Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1), mRNA. Accession number NM_000499. Gene 2602 bp; CDS 123 … 1661

7.4.1.2 Insert

Das Plasmid pCMV•SPORT6/IRAKp961N1042 wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) erworben. Es wurde in LB-Agar geliefert, in welchen das in E. coli transformierte Plasmid beimpft worden war.

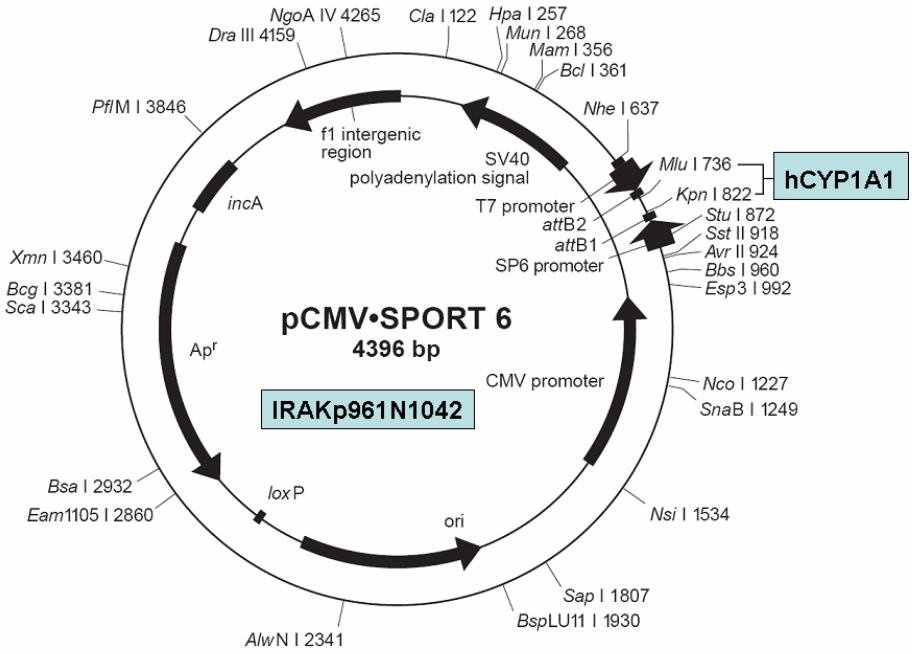


Abbildung 22 Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site (MCS) von pCMV•SPORT6/ IRAKp961N1042

Verdünnungsausstrich

Mit Hilfe einer sterilen Impföse wird eine geringe Menge der transformierten E. coli aus dem Agar entnommen und auf eine sterile, ampicillinhaltige (100 µg/ml) LB-Agar Platte (Tabelle 10) als Verdünnungsausstrich ausgestrichen. Die Platte wird kopfüber über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

Gewinnung des Plasmids

Einzelne Kolonien werden jeweils mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 2 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium (Tabelle 9) überführt. Nach Inkubation im Bakterienschüttler bei 37°C und ca. 200 rpm über Nacht erfolgt die Plasmidisolierung als sogenannte „Plasmid-Miniprep“. Dazu wird der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers.

Tabelle 9 Zusammensetzung von LB-Amp-Medium

LB-Medium	Endkonzentration	Reagenz
	1 % (w/v)	Bacto-Trypton
	1 % (w/v)	NaCl
	0,5 % (w/v)	Yeast-Extrakt
	ad H_2O bidest. 1 l autoklavieren	
	vor Verwendung Ampicillin-Lösung 100 µg/ml Endkonzentration zugeben	

Tabelle 10 Zusammensetzung von LB-Amp-Agar

LB-Agar-Platten	Endkonzentration	Reagenz
	2 % (w/v)	Bacto-Agar in LB-Medium
	nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe von Ampicillin-Lösung (Endkonzentration 100 µg/ml)	

PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Zwei Oligonucleotide werden jeweils komplementär zu einer kurzen Sequenz in einem Strang des gewünschten DNA-Fragments synthetisiert und hinter dem Ende der zu amplifizierenden Sequenz positioniert. Sie stellen die Primer für die *in-vitro* Replikation des DNA-Segmentes dar. Die eigentliche PCR gliedert sich in drei Schritte: Isolierte DNA wird kurz auf 95°C erhitzt (Denaturierung) und in Gegenwart der Oligonucleotidprimer abgekühlt. Diese lagern sich bei 50°C komplementär an die DNA-Stränge an (Anlagerung) und die Polymerase kann bei 72°C Desoxynucleotide hinzufügen (Elongation), so dass das mit einem Primer versehene DNA-Fragment selektiv repliziert wird. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt. Dadurch wird das DNA-Fragment stark amplifiziert, so dass es sich leicht isolieren und klonieren lässt.
Der Reaktionsansatz wird wie folgt pipettiert:

Tabelle 11 PCR-Ansatz zur Amplifikation der humanen CYP1A1 cDNA

Reaktions-Mix	**µl**
PCR H_2O	35
dNTP-Mix, je 2 mM	5
PCR-Reaktionspuffer (10x)	5
Plasmid DNA	1
Primer 1A1-for-MluI, 10 mM	2
Primer 1A1-rev-NheI, 10 mM	2
High Fidelity Polymerase, 5u/µl	0.5

Als Polymerase für die Amplifikation des Konstruktes IRAKp961N1042 wird die High Fidelity Polymerase gewählt. Die High Fidelity Polymerase ist eine sogenannte „proof reading“ Polymerase zur Reduktion von Ablesefehlern. Das Programm für die PCR wird folgendermaßen gewählt:

Tabelle 12 PCR-Programm zur Amplifikation der humanen CYP1A1 cDNA

Zyklus	Schritt	Temp.	Zeit
1 Zyklus	Denaturierung	95 °C	5 min
40 Zyklen	Denaturierung	94 °C	1 min
	Anlagerung	50 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
1 Zyklus	Elongation	72 °C	10 min

Das PCR-Produkt wird mit dem „QIAquick Purification Kit“ (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Durch eine Säulentechnik werden die PCR-Transkripte aufgereinigt und von nicht umgesetzten Primern, Polymerasen und Salzen befreit.

7.4.1.3 Vektor

Herstellung chemisch kompetenter E. coli mittels Kalziumchlorid

Zur Gewinnung Kalziumchlorid-kompetenter Bakterien wird der E. coli Stamm TOP10F´ (Invitrogen) verwendet. 150 µl der E. coli enthaltenden Zellsuspension wird in 5 ml LB-Medium bei 37°C und ca. 160 rpm im Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. Danach wird 1 ml dieser Vorkultur in 500 ml frisches LB-Medium überführt und unter denselben Bedingungen inkubiert. Es werden so lange Proben gezogen und im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt, bis eine Extinktion von ca. 0.5 erreicht ist. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 1200 g für 5 min. Der Überstand wird abdekantiert, das Pellet in einigen Millilitern kalter 0.1 M $CaCl_2$ Lösung resuspendiert, und mit 0.1 M $CaCl_2$-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Die gemischte Lösung wird 20 min auf Eis inkubiert und erneut wie bereits oben beschrieben zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden 5 ml kalte 0.1 M $CaCl_2$-Lösung sowie 6 ml 40 %iges Glyzerin zugefügt und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgt aliquotiert bei –80°C.

Transformation des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet in chemisch kompetente E. coli TOP10F´

1 µl des Vektors pBiEGFP-Tet (Clontech) wird mit 100 µl kompetenen E. coli TOP10F´ versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird für 30 sec. bei 42°C hitzegeschockt und dann 2 min auf Eis stehen gelassen. 300 µl LB-Medium (Tabelle 9) wird zugegeben und auf Eis resuspendiert. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C und 200 rpm im Bakterienschüttler werden die Zellen mit einem sterilen Drygalski-Spatel unter der Sterilbank auf Ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten inkubieren umgedreht über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank. Es wachsen hierbei im Idealfall nur Kolonien auf dem Nährboden, die das Antibiotikaresistenz-vermittelnde Plasmid enthalten.

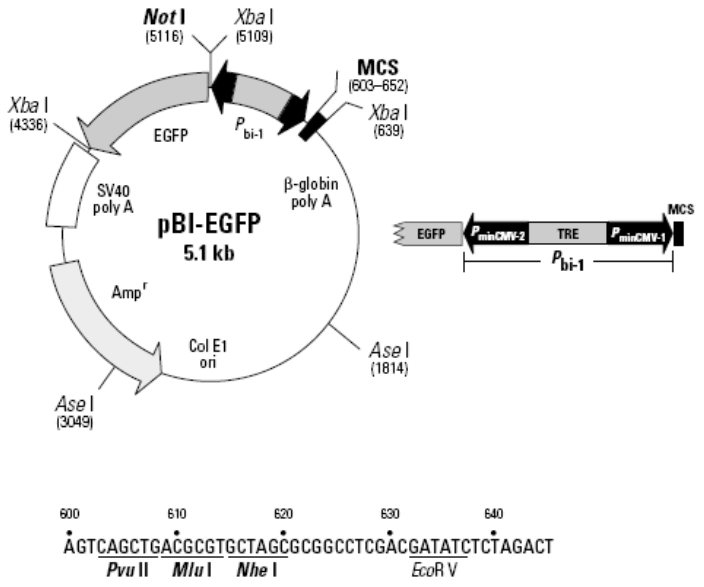


Abbildung 23 Restriktionsmappe und Multiple Cloning Site (MCS) von pBiEGFP-Tet

Gewinnung des Plasmids

Einzelne Kolonien werden jeweils mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 2 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium (Tabelle 9) überführt. Nach Inkubation im Bakterienschüttler bei 37°C und ca. 200 rpm über Nacht erfolgt die Plasmidisolierung als sogenannte „Plasmid-Miniprep“. Dazu wird der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers.

7.4.1.4 Klonierung

Restriktionsverdau MluI/NheI

Sowohl mit dem Vektor, als auch mit dem Insert wird ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen MluI/NheI durchgeführt. Dadurch soll die Ligation des Inserts in den Expressionsvektor über eben diese Restriktionsschnittstellen ermöglicht werden. Es werden 20 µl PCR-Produkt bzw 20 µl Vektor pBiEGFP-Tet, 1 µl MluI, 1 µl NheI und 2.5 µl 10x Reaktionspuffer G^+ (Fermentas) zusammenpipettiert. Die Inkubation bei 37 °C beträgt zwei Stunden. Der komplette Ansatz der verdauten Probe wird mit 6 µl 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt.

DNA Agarose Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten z.B. aus PCR- und Restriktionsanalysen sowie aus Plasmiden. Agarosegele werden durch Schmelzen von Agarose in einem Laufpuffer und Ausgießen in geeignete Apparaturen hergestellt (hier 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer). Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf 50-60 °C erfolgt die Zugabe von 4.5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Die Lösung wird in eine horizontale Gelkammer gegossen. In die Agaroselösung getauchte Kämme erzeugen beim Erhärten der Agarose Taschen, in welche die DNA-Proben später eingefüllt werden. Nach Erstarren des Gels wird die Kammer mit 1x TAE-Puffer befüllt, der Kamm entfernt und die Proben (hier das mit MluI/NheI verdaute PCR-Produkt bzw. der ebenso verdaute Vektor), versetzt mit je nach Probenvolumen entsprechender Menge an 6-fach konzentriertem Ladepuffer, in die Geltaschen pipettiert. Wird an das Gel eine elektrische Spannung angelegt, wandert die DNA, die durch den pH-Wert des Laufpuffers negativ geladen ist, mit größenabhängiger Geschwindigkeit zur Anode. Durch Interkalation fluoreszierender Ethidiumbromid-Moleküle kann die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Im Anschluss wird die aufgetrennte DNA im Gel mittels Geldokumentationsgerät „Stratagene Eagle Eye II“ detektiert.

Tabelle 13 Zusammensetzung von 50x TAE-Puffer

TAE-Puffer (50x)	Einwaage	Reagenz
	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0
	H_2O bidest ad 1 l	

Isolierung der verdauten DNA aus dem Agarosegel

Nach Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel wird die Bande der amplifizierten CYP1A1-cDNA bei einer Größe von ca. 1600 bp und die Bande des geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet bei einer Größe von ca. 5100 bp unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)“ nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Das ausgeschnittene Gel wird in einem Eppendorf-Gefäß bei einer Temperatur von 50 °C verflüssigt. Die Lösung wird nach Zugabe von Isopropanol, das die DNA-Ausbeute erhöhen soll, auf eine Säule gegeben an welcher die DNA adsorbiert. Die restliche Flüssigkeit wird durch Zentrifugation von der Säule abgetrennt. Nach einem Waschschritt eluiert die gereinigte DNA durch Zugabe von 30 µl Aqua bidest (pH 8.0) mittels Zentrifugation.

Ligation und Transformation des Ligationsansatzes in E. coli TOP10F´

Durch das Enzym T4-Ligase wird das vorbereitete DNA-Fragment in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet ligiert.
Für die Ligation werden 10 µl DNA-Fragment (ca. 200 ng DNA), 7 µl Vektor (50 ng/µl), beides geschnitten mit MluI und NheI, 2 µl 10x-Ligasepuffer (Fermentas) sowie 1 µl T4-Ligase (5 units/µl) (Fermentas) 1 Stunde bei 22 °C inkubiert. Danach wird für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die Lagerung des Ansatzes bis zur Transformation in E. coli erfolgt bei 4 °C.

Die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente E. coli TOP10F´ sowie die Gewinnung des Plasmids erfolgt analog wie oben bereits beschrieben.
Anschließend wird mit dem isolierten Plasmid ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen MluI und NheI durchgeführt um zu prüfen, ob die Insertion der CYP1A1 cDNA in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet stattgefunden hat. Um weitere charakteristische DNA-Fragmente zu erhalten, die den korrekten Einbau des Inserts in den Vektor bestätigen, wird ein weiterer Verdau des Plasmids mit dem Restriktionsenzym EcoRI vorgenommen. Die Ansätze werden wie bereits beschrieben in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und danach mit einem Geldokumentationssystem detektiert.

7.4.1.5 Lagerung von Plasmiden

Zur langfristigen Aufbewahrung der Plasmide werden je 800 µl Flüssigkultur einer in LB-Medium angeimpften und über Nacht inkubierten Einzelkolonie mit 200 µl sterilem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

7.4.2 Sequenzierung des Plasmids

Die Sequenzierung des Plasmids soll klären, ob sich die rekombinante humane CYP1A1 cDNA nach der Klonierung in den Expressionsvektor z.B. durch eine oder mehrere Punktmutationen verändert hat, oder ob die ursprüngliche Sequenz erhalten geblieben ist.
Die Sequenzierung der full length cDNA des rekombinanten humanen CYP1A1 aus pBiEGFP-Tet wird im Auftrag von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt nur an einem Strang. Dazu wird die gesamte Sequenz in zwei Abschnitte unterteilt und sequenziert. Die DNA-Sequenz des rekombinanten CYP1A1 stammt aus dem Plasmid pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 einer Plasmidpräparation mit einer Konzentration von 100 ng/µl.

7.4.3 Generierung der transgenen Maus mittels Pronucleusinjektion

Die Experimente zur Generierung der transgenen Maus wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Murinus GmbH (mittlerweile gen-O-way Germany GmbH) in Hamburg durchgeführt.
Das Transgen-Konstrukt eGFP-TRE-CYP1A1, welches eine „enhanced green fluorescent protein“ (GFP) Kassette und eine CYP1A1 cDNA Kassette unter der Kontrolle des Tetrazyklin Response Elements (TRE) in Kombination mit CMV minimal Promotoren beinhaltet, wird in den männlichen Pronucleus befruchteter Eizellen injiziert. Die nach einer Nacht Inkubation im Brutschrank überlebenden Embryonen im Zweizell-Stadium werden in scheinträchtige Weibchen implantiert. Nach ca. 18 bis 19 Tagen werden Jungtiere geboren. Die transgenen Foundertiere werden mittels PCR identifiziert.
Abbildung 24 stellt eine schematische Übersicht der Pronucleusinjektion zur Erzeugung transgener Nachkommen dar.

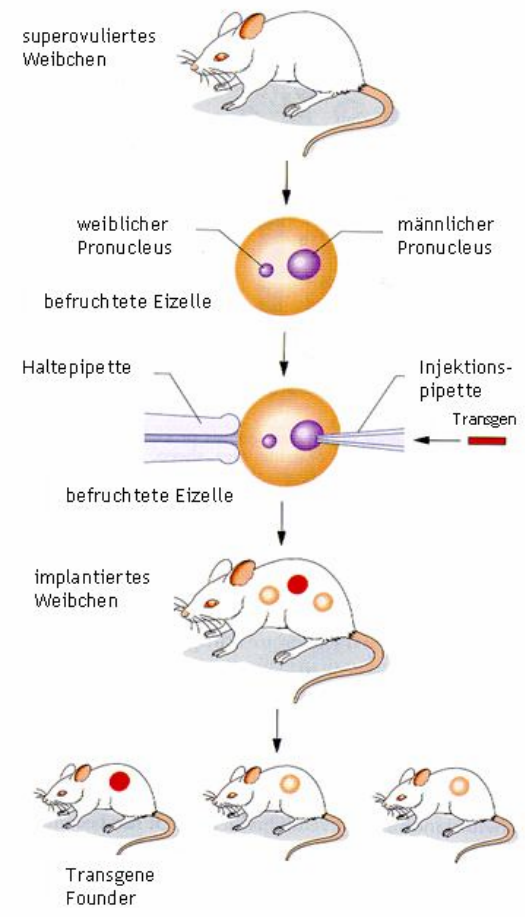


Abbildung 24 schematische Darstellung der Pronucleusinjektion zur Erzeugung transgener Nachkommen

7.4.3.1 Aufreinigung des Transgen-Konstruktes

Das Transgen-Konstrukt eGFP-TRE-CYP1A1 wird mittels VspI und AatII Restriktionsverdau aus dem Plasmid pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 isoliert. Das resultierende ~4.6 kb große Konstrukt-Fragment wird nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert, und mit Hilfe von Mikro-Spin-Säulen (Ultrafree-MC, Millipore) gereinigt. Die DNA wird in einem Mikroinjektionspuffer von der Säule eluiert und auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Die Reinheit und Konzentration des Konstruktes wird mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

7.4.3.2 Pronucleus Mikroinjektion

Drei Wochen alte weibliche NMRI Mäuse werden superovuliert und mit männlichen NMRI Mäusen verpaart. Zur Embryonengewinnung werden Vaginalpfropf-positive Tiere getötet. Die Eileiter werden präpariert und die Eileiterampulle unter mikroskopischer Kontrolle ruptiert. Nach enzymatischer Abtrennung der Kumuluszellen mit Hyaluronidaselösung werden die Embryonen im Brutschrank kultiviert. Sie werden so lange in Kultur gehalten, bis zwei Vorkerne (Pronuclei) unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen sind. Lebende Embryonen werden dann mit der Haltekapillare fixiert. Die Mikroinjektion erfolgt in den männlichen Pronukleus der 0.5 Tage alten murinen Zygoten im Einzellstadium. Mit der Mikroinjektionskapillare wird die Zona pellucida, die Zytoplasmamembran und die Pronukleusmembran durchstochen und etwa 1-2 Picoliter der DNA-Lösung in den größeren männlichen Vorkern injiziert (Abbildung 25).

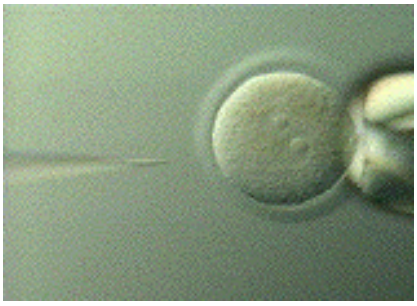


Abbildung 25 Injektion des Transgen-Konstrukts in den männlichen Vorkern

Die injizierten Embryonen werden über Nacht im Brutschrank in Kultur gehalten, bis sie das Zweizell-Stadium erreichen. Die Zweizell-Embryonen werden am nächsten Tag scheinträchtigen Weibchen 0.5 Tage post coitum in deren Oviduct implantiert. Nach 18 bis 19 Tagen werden Nachkommen geboren.

7.4.3.3 Screening nach transgenen Foundern (F0-Generation)

Von den Jungtieren der F0-Generation werden Schwanzspitzenbiopsien genommen. Mit einem „DNA tissue extraction kit" (Qiagen) wird die genomische DNA nach Anleitung des Herstellers aus dem Gewebe extrahiert. Die individuellen DNAs werden im Anschluss mittels PCR genotypisiert. Die hierfür verwendeten Primer, der Reaktionsansatz sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 14 abgebildet. Es werden zwei unabhängige Transgen-spezifische PCR Reaktionen durchgeführt: Die Primer GFPF1/GFP-R1 amplifizieren einen Abschnitt innerhalb der eGFP-Kassette mit einer erwarteten Größe von 420 bp für den Fall, dass das Transgen in das Zielgenom integriert worden ist. In einer zweiten PCR werden die Primer SVpA-F und bGpA-F verwendet. SVpA-F bindet an die SV40 pA Sequenz der eGFP Expressionskassette, bGpA-F an die Beta Globulin pA Sequenz der CYP1A1 Kassette. Mit dieser Reaktion kann zusätzlich das häufig auftretende Phänomen der so genannten "Head-to-tail" Integration des transgenen Konstruktes nachgewiesen werden was bedeutet, dass ein PCR-Produkt nur dann gebildet wird, wenn mehr als eine Kopie des Transgen-Konstruktes sich „tandemartig", also hintereinander, ins Genom integriert hat. Die erwartete Größe des PCR-Produktes liegt bei 470 bp. Die PCR-Produkte werden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Die DNA-Qualität wird überprüft, indem eine zusätzliche PCR-Reaktion für jede Probe mitgeführt wird, die ein Kontroll-Gen amplifiziert.

Tabelle 14 PCR Genotypisierungsprotokoll zur Identifizierung transgener Founder (F0-Generation)

PCR Typ	Primer	Sequenz
eGFP	GFP-F1	5'- GACCTACGGCGTGCAGTGCTT -3'
	GFP-R1	5'- TGGGTGCTCAGGTAGTGGTT -3'
Head-to-tail	SVpA-F	5'- CGGACCACGCTATCTGTGCAA -3'
	bGpA-F	5'- CCCCTGCTGTCCATTCCTT -3'

Reaktions-Mix		Reaktionsbedingungen			
genomische DNA	~100 ng	**Schritt**	**Temp.**	**Zeit**	**Zyklus**
Primerpaar	10 pmol	Denaturierung	96 °C	7 min	1x
dNTP-Mix	0.2 mM	Denaturierung	96 °C	1 min	
Reaktionspuffer/15mM $MgCl_2$	0.1 Vol	Anlagerung	59.2 °C	1min	35x
Taq Polymerase (Qiagen)	1.5 U	Elongation	72 °C	1 min	
Reaktionsvolumen	25 µl	Elongation	72 °C	5 min	1x

7.4.3.4 Weiterzucht der F0-Founder

Die transgenen F0-Founder NMRI-Tg(GFP-TRE-CYP1A1) werden mit transgenen Mausstämmen verpaart, die das tet-Transcriptional-Activator (tTA) Protein exprimieren. Doppelt transgene Nachkommen, die beide Komponenten des Tet-off Expressionssystems exprimieren, werden mittels PCR identifiziert.

Folgende, tTA exprimierende Mausstämme werden zur Zucht verwendet:

STOCK Tg(tTAhCMV)3Bjd/J (Jax® mice), Stock Number: 003271

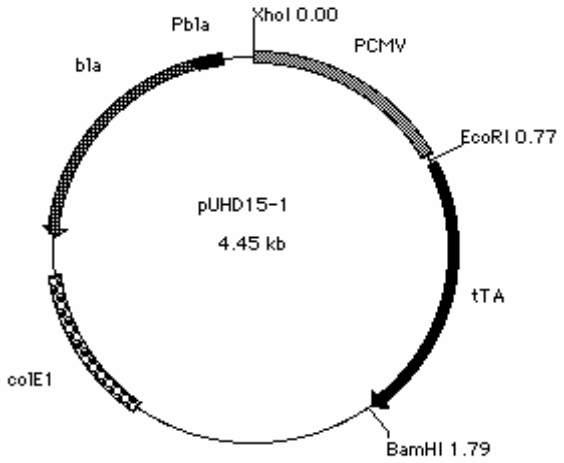


Abbildung 26 Plasmid pUHD15-1

Diese Mauslinie wurde kommerziell von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, USA) erworben. Ursprünglich wurde die Linie von Furth *et al.* generiert. Sie exprimiert das Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator Protein (tTA) unter der Kontrolle des humanen, early Cytomegalovirus Promoters (PhCMV) als Tet-off System. Dazu wurde das hCMV-tTA Gen aus dem Vektor pUHD15-1 (Abbildung 26) als 2.7-kb großes XhoI/PflmI Fragment isoliert und mittels Pronucleusinjektion in NMRI Mäuse injiziert [Furth *et al.* 1994; Kistner *et al.* 1996]. Laut Jackson Laboratory wird das „gene of interest” in vielen Organen und Geweben (z.B. Muskel, Niere, Thymus, Herz oder Pancreas) exprimiert, sofern die Linie mit einer weiteren Linie verpaart wird, die das Tetrazyklin-Responsive Promoterelement (TRE) trägt.

B6;C3-Tg(TettTALuc)1Dgs/J (Jax® mice), Stock Number: 002709

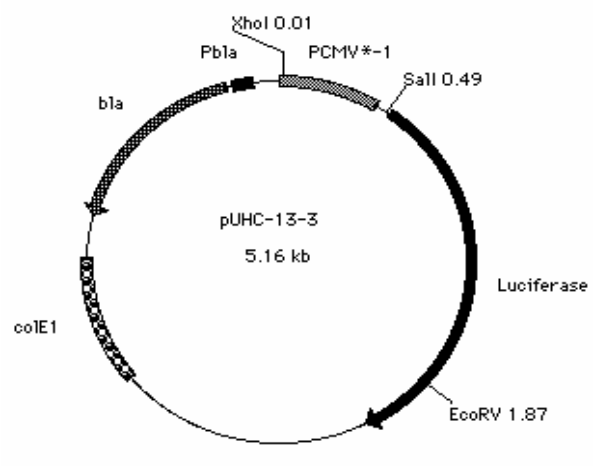


Abbildung 27 Plasmid pUHC13-3

Diese Mauslinie wurde ebenfalls kommerziell von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, USA) erworben. Ursprünglich wurde die Linie von Shockett *et al.* generiert. Sie exprimiert das Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator Protein (tTA) und ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des Tetrazyklin-Responsiven Promoterelements ($(Tet\text{-}op)_7$) als Tet-off System. Darum ist die tTA Expression sowohl induzierbar als auch autoregulatorisch. Die Expression der Transgene wird in Anwesenheit von Tetrazyklin unterdrückt, aber in dessen Abwesenheit stark stimuliert (Abbildung 28). Das Level der induzierten Transgen-Expression ist laut Jackson Laboratory bei diesem Mausstamm höher als bei Stämmen, die das tTA System konstitutiv exprimieren.

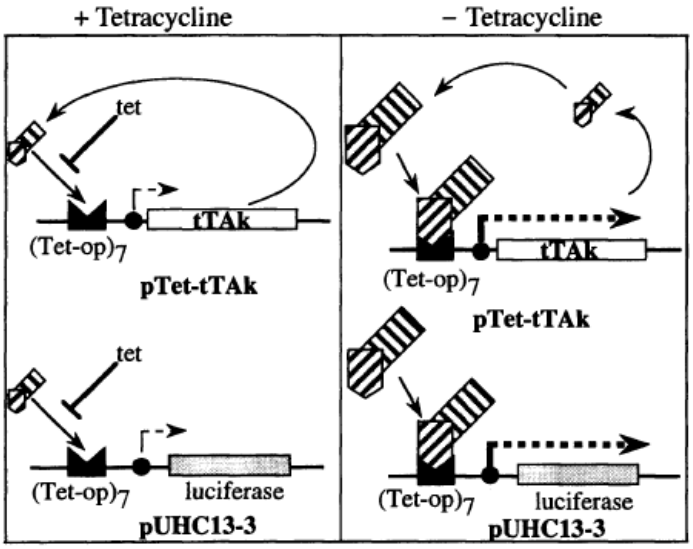


Abbildung 28 Autoregulatorische Strategie für induzierbare Genexpression. Das tTAk- bzw. Luciferase-Gen. wird unter der Kontrolle von tetP (bestehend aus Tet-operon und minimalem hCMV Promoter) exprimiert. In Anwesenheit von Tetrazyklin resultiert die basale Aktivität des minimalen hCMV Promoters in einer sehr geringen Expression von tTA, welches nicht an das Tet-operon binden kann. tTA und Luciferase werden daher kaum exprimiert. Wird Tetrazyklin entfernt, binden die geringen vorhandenen Mengen tTA an das Tet-Operon und stimulieren so die tTA-Expression. Je mehr tTA-Protein gebildet wird, umso höher ist auch die tTA- und Luciferase Expression [Shockett *et al.* 1995].

Dazu wurde das pUHC13-3 Fragment aus dem Vektor pUHC13-3 (Abbildung 27) nach Restriktionsverdau mit XhoI/AseI isoliert. Das tTAk Fragment wurde aus dem Vektor pcDNA-tTAk nach Restriktionsverdau mit XhoI/NotI isoliert. pcDNA-tTAk wurde durch Ligation eines EcoRI/BamHI Fragments aus pUHD15-1 (Abbildung 26) mit einer zusätzlichen 24 bp langen Oligonukleotidsequenz am 5´-Ende und dem Vektor pcDNAI/neo kloniert. Beide Fragmente (pTet-tTAk und pUHC13-3) wurden mittels Pronucleusinjektion in C57/B6xC3H Mäuse coinjiziert. Luciferase Expression wurde in allen untersuchten Organen in Abwesenheit von Tetrazyklin nachgewiesen [Shockett *et al.* 1995].

7.4.4 Luciferase-Reportergenassay zur Bestimmung der tTA-Expression

Das Gen, das das Protein Luciferase kodiert, ist ein viel verwendetes Reportergen. Ein Reportergen produziert bei Aktivierung ein leicht zu messendes, optisches Signal, im Fall der Luciferase in Form von Chemilumineszenz. Die Firefly-Luciferase ist ein 61 kDa großes Monomer, welches die Monooxygenierung des Substrates Beetle-Luciferin katalysiert. Beetle-Luciferin ist ein stabiles Molekül, das in Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) vorkommt.

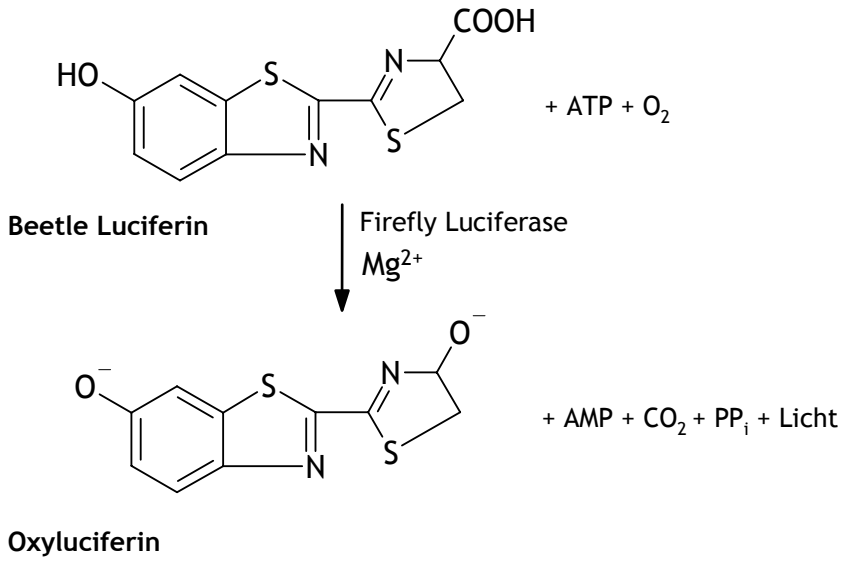


Abbildung 29 Die Luciferase-Reaktion: Die Monooxygenierung von Luciferin wird in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff durch die Firefly-Luciferase katalysiert.

Da die transgene Mauslinie B6;C3-Tg(TettTALuc)1Dgs/J sowohl das tTA- als auch das Luciferasegen unter der Kontrolle des Tetrazyklin-responsiven Promoterelements exprimiert, kann die organspezifische tTA-Expression in individuellen Mäusen mittels Luciferase-Assay kontrolliert werden.

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten erfolgt mittels „Bright-Glo™ Luciferase Assay System“ (Promega). Durch Zusatz von im Luciferase-Reagenz enthaltenen Luciferin wird dieses durch die Firefly-Luciferase in einer ATP, Mg^{2+} und O_2 abhängigen Reaktion unter Lichtemission oxidiert. Je 10 µl Gewebehomogenat aus verschiedenen Organen der transgenen Mäuse mit einer Proteinkonzentration von jeweils 5 µg/µl wird in einem 5 ml Luminometerröhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Die Lichtemission (Reportergen-Aktivität) wird durch Zugabe von je 50 µl Luciferase-Reagenz gestartet und die Proben umgehend mit einer Messzeit von 2 sec gemessen.

7.4.5 F1-Zucht

Die Foundertiere der transgenen Mauslinie NMRI-Tg(GFP-TRE-Cyp1A1) F0-5, F0-38 und F0-41 werden mit tTA-exprimierenden Mauslinien (STOCK Tg(tTAhCMV)3Bjd/J und B6;C3-Tg(TettTALuc)1Dgs/J) verpaart. Bei den trächtigen Weibchen und Jungtieren wird das Trinkwasser mit 200 µg/ml Doxyzyklin angereichert, um die transgene CYP1A1 Expression zu unterdrücken.

7.4.5.1 Genotypisierung der F1-Generation

Die Jungtiere werden drei Wochen nach der Geburt von der Mutter abgesetzt. Von den Tieren werden Schwanzspitzenbiopsien genommen. Mit einem „DNA tissue extraction kit" (Qiagen) wird die genomische DNA nach Anleitung des Herstellers aus dem Gewebe extrahiert. Die individuellen DNAs werden im Anschluss mittels PCR genotypisiert. Die hierfür verwendeten Primer, der Reaktionsansatz sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 15 abgebildet. Es werden zwei unabhängige Transgen-spezifische PCR Reaktionen durchgeführt: Die Primer GFPF1/GFP-R1 amplifizieren einen Abschnitt innerhalb der eGFP-Kassette mit einer erwarteten Größe von 420 bp. In einer zweiten PCR werden die Primer CamK2tTA-F und CamK2tTA-R verwendet. Sie amplifizieren einen Abschnitt innerhalb des tTA-Gens mit einer Größe von 450 bp. Die PCR-Produkte werden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Doppelt-transgene Nachkommen liefern sowohl für eGFP, als auch für das tTA-Gen eine Bande im Agarosegel.

Tabelle 15 PCR Genotypisierungsprotokoll zur Identifizierung transgener F1-Founder

PCR Typ	Primer	Sequenz	Erwartete Größe
eGFP	GFP-F1	5'- GACCTACGGCGTGCAGTGCTT -3'	420 bp
	GFP-R1	5'- TGGGTGCTCAGGTAGTGGTT -3'	
tTA	CamK2tTA-F	5'- CGCTGTGGGGCATTTTACTTTAG -3'	450 bp
	CamK2tTA-R	5'- CATGTCCAGATCGAAATCGTC -3'	

Reaktions-Mix		Reaktionsbedingungen			
genomische DNA	~100 ng	**Schritt**	**Temp.**	**Zeit**	**Zyklus**
Primerpaar	10 pmol	Denaturierung	96 °C	7 min	1x
dNTP-Mix	0.2 mM	Denaturierung	96 °C	1 min	
Reaktionspuffer/15 mM $MgCl_2$	0.1 Vol	Anlagerung	59.2 °C	1 min	35x
Taq Polymerase (Qiagen)	1.5 U	Elongation	72 °C	1 min	
Reaktionsvolumen	25 µl	Elongation	72 °C	5 min	1x

7.4.5.2 Organpräparation von doppelt-transgenen F1-Foundern

Bei doppelt-transgenen Mäusen, die nicht für die Weiterzucht benötigt werden, wird durch einwöchiges Absetzen des Doxyzyklin-haltigen Trinkwassers in den Linien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)- (TettTALuc)1Dgs/J und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J die Transgen-Expression eingeschaltet. Danach werden die Tiere mit CO_2 betäubt und mittels Dekapitation getötet. Es werden schnellstmöglich die Organe Leber, Lunge, Niere, Muskel, Magen, Milz, Herz und Gehirn aus den Tieren herauspräpariert, kurz mit 0.9 %iger Kochsalzlösung gespült und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgt bei –80 °C.

7.5 Versuchstierhaltung und weitere Versuchstiere

Die Haltung der Versuchstiere erfolgt im Tierhaus der Technischen Universität Kaiserslautern in Makrolonkäfigen unter künstlichen Tag-Nacht Lichtverhältnissen. Allen Tieren wird freier Zugang zu Trinkwasser und pelletiertem Standardfutter (Altromin, Lage) gewährt.

7.5.1 verwendete Mauslinien

7.5.1.1 Inzuchtstamm C57/B6

Als Inzuchtstamm wird ein Mausstamm bezeichnet, bei dem seit mindestens zwanzig Generationen Geschwisterverpaarungen beibehalten worden sind. Ausser dem Geschlechtsunterschied sind Mäuse eines Inzuchtstammes genetisch identisch, sie sind für praktisch alle genetischen Loci homozygot. Viele Eigenschaften variieren nicht von Generation zu Generation [Beck *et al.* 2000].
C57/B6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt, der auch zu den Stämmen C57BR und C57L führte. Die Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert.

7.5.1.2 Auszuchtstamm NMRI

Dieser Auszuchtstamm aus der Schweiz wurde bei Lynch entwickelt und 1937 von Pioley, NIH als Inzuchtstamm gezüchtet. Von dort ging die Linie 31 an das Naval Medical Research Institute, USA (NMRI), woher auch der Name stammt. Sie wurde daraufhin am Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover willkürlich verpaart und wird als Auszuchtbestand gehalten.

7.5.1.3 Die transgene CA-AhR Mauslinie

Im Rahmen dieser Arbeit wird zusätzlich die transgene CA-AhR Mauslinie verwendet. Sie wurde dem Arbeitskreis freundlicherweise von Herrn Prof. Poellinger vom Karolinska Institut in Stockholm, Schweden, zur Verfügung gestellt.
Diese Mauslinie exprimiert einen transgenen, konstitutiv aktiven Ah-Rezeptor (CA-AhR): Durch Deletion der Aminosäuren 287 bis 422 des Maus-AhR wird eine aktivierte Form des Rezeptors generiert. Dadurch ist der CA-AhR im Gegensatz zum Wildtyp konstitutiv aktiv, die Transkription der AhR-Genbatterie wird auch in Abwesenheit eines AhR-Liganden permanent stimuliert [McGuire *et al.* 2001; Andersson *et al.* 2002]. Da die transgene CA-AhR Komponente durch Pronucleusinjektion generiert wurde, exprimiert die Mauslinie nach wie vor auch den Wildtyp-AhR, denn sie basiert auf dem genetischen Hintergrund C57B6xCBA, die den Wildtyp-AhR exprimiert. Abbildung 30 zeigt eine schematische Darstellung des Wildtyp Maus AhR (mAhR) und des konstitutiv aktiven AhR (CA-AhR):

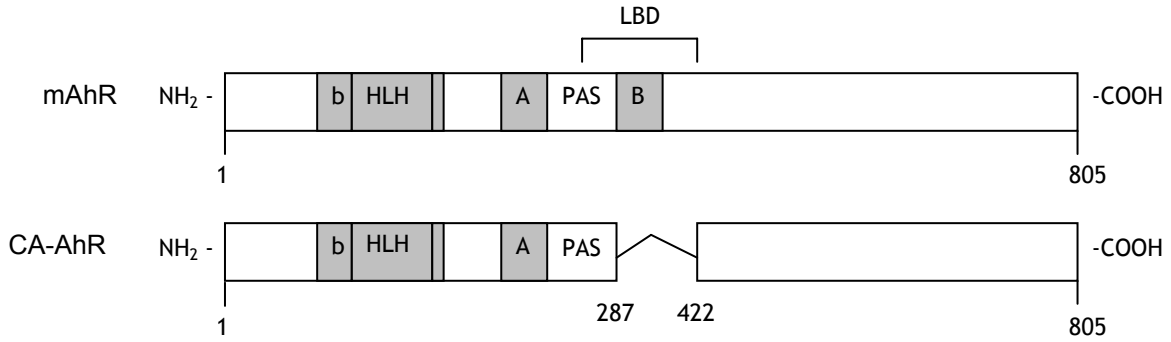


Abbildung 30 Schematische Darstellung des Wildtyp Maus AhR (mAhR) und des konstitutiv aktiven AhR (CA-AhR); bHLH = basic helix loop helix-Domäne; PAS = PAS-Domäne; LBD = Ligandenbindungs-Domäne [Andersson *et al.* 2002]

7.5.2 verwendete Rattenlinie

7.5.2.1 Sprague-Dawley Linie

Die Original Sprague-Dawley Linie wurde von Robert S. Dawley in den 1950er Jahren durch Verpaarung einer Wistar- mit einer Hybridlinie, entstanden aus Verpaarung von Labor- mit Wildlinien, generiert. Die Founder wurden daraufhin nach dem Zufallsprinzip in 23 unabhängigen Zuchtkolonien weltweit in 8 Ländern verpaart. Im Jahr 1992 wurde von Charles River eine Restrukturierung des Zuchtprogramms dieser Auszuchtstämme durchgeführt, was eine genetische Angleichung zur Folge hatte. Die offizielle Bezeichnung des Stammes seitdem lautet: Crl:CR®(SD)IGS BR [White und Lee 1998].

Männliche und weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von je 150 g, sowie männliche und weibliche C57/B6 Mäuse mit einem Gewicht von je 25 g stammen von Charles River Deutschland GmbH.

7.5.3 Tierbehandlung und Organentnahme

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche werden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in Behandlungsgruppen mit je 3 Tieren eingeteilt. Die Aufteilung der Tiere und die jeweilige Behandlung ist in Tabelle 16 dargestellt. Das zu verabreichende TCDD wird in in Mazola Maiskeimöl gelöst und den Tieren über intraperitoneale (i.p.) Injektion in Dosis pro kg Körpergewicht (KG) verabreicht. Als Kontrolle wird das entsprechende Volumen an Maiskeimöl (Vehicle) appliziert. Die transgene CA-AhR Mauslinie wird nicht behandelt, als Kontrolle für diese Linie dienen ebenfalls unbehandelte, männliche und weibliche C57/B6 Wildtyp-Mäuse.

Tabelle 16 schematische Darstellung der Tierversuchsgruppen und Behandlungen

Versuchstier	**Behandlung**		
Ratte	**Dosis**	**Dauer**	**Verabreichung**
Sprague-Dawley, männlich	1 µg/kg KG TCDD	96 h	i.p.
Sprague-Dawley, männlich	1 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	96 h	i.p.
Sprague-Dawley, weiblich	1 µg/kg KG TCDD	96 h	i.p.
Sprague-Dawley, weiblich	1 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	96 h	i.p.
Sprague-Dawley, männlich	10 µg/kg KG TCDD	2 Wochen	i.p.
Sprague-Dawley, männlich	10 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	2 Wochen	i.p.
Sprague-Dawley, weiblich	10 µg/kg KG TCDD	2 Wochen	i.p.
Sprague-Dawley, weiblich	10 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	2 Wochen	i.p.
Maus	**Dosis**	**Dauer**	**Verabreichung**
C57/BL6, männlich	unbehandelt	96 h	-
C57/BL6, männlich	1 µg/kg KG TCDD	96 h	i.p.
C57/BL6, männlich	1 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	96 h	i.p.
CA-AhR, männlich	unbehandelt	96 h	-
C57/BL6, weiblich	unbehandelt	96 h	-
C57/BL6, weiblich	1 µg/kg KG TCDD	96 h	i.p.
C57/BL6, weiblich	1 µg/kg KG Vehicle Kontrolle	96 h	i.p.
CA-AhR, weiblich	unbehandelt	96 h	-

Nach entsprechender Behandlungsdauer werden die Tiere mit CO_2 betäubt und mittels Dekapitation getötet. Danach wird schnellstmöglich die Leber aus den Tieren herauspräpariert, kurz mit 0.9 %iger Kochsalzlösung gespült und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebe erfolgt bei –80 °C.

7.6 Mikrosomenpräparation aus Gewebe

Die Präparation von Mikrosomen aus tierischem Gewebe erfolgt durch Homogenisierung der Proben mit einem Pistill in einem Glashomogenisator, gefolgt von differentieller Zentrifugation des Homogenats.

Die Zentrifugationsschritte beinhalten zunächst eine Low-Speed Zentrifugation (1.000 g), sowie eine Medium-Speed Zentrifugation (12.000 g). Diese ersten Zentrifugationsschritte entfernen Zellkerne, Zelltrümmer, Mitochondrien und Lipide. Der 12.000 g Überstand ist das Startmaterial für die eigentliche Mikrosomenpräparation. Die mikrosomale Fraktion wird durch Zentrifugation bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge erhalten.

Die Aufarbeitung wird bei 4°C durchgeführt. Alle Lösungen und Arbeitsmaterialien sind vorzukühlen. Ein Stück Gewebe wird in gefrorenem Zustand entnommen und in einem Glashomogenisator vorgelegt. Zum Gewebe werden 3.5 ml des 1x Isotonic Extraction Buffers (Tabelle 17) pro g vorgelegtem Gewebe gegeben und bei ca. 200 rpm mit einem Gewebehomogenisator homogenisiert. Danach wird das Homogenat in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.000 g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die dünne Lipidschicht wird durch Absaugen entfernt, der restliche Überstand in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pellet wird verworfen. Es folgt eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C für 15 Minuten. Falls sich noch eine dünne Lipidschicht auf dem Überstand befindet, wird diese erneut vorsichtig abgesaugt. Der Überstand wird in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 100.000 g in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C für 60 min zentrifugiert. Das Pellet stellt die mikrosomale Fraktion dar. Es wird mittels Ultraschallsonde in 0.3 ml NaPi Puffer (Tabelle 18) pro g Originalgewebe gelöst. Die Mikrosomen werden bei -80 °C gelagert.

Tabelle 17 Zusammensetzung von 1x Isotonic Extraction Buffer

1x Isotonic Extraction Buffer	Konzentration	Reagenz
	10 mM	HEPES, pH 7.8
	250 mM	Saccharose
	25 mM	KCl
	1 mM	EGTA
	steril filtrieren	
	kurz vor Gebrauch Protease Inhibitor Cocktail für Säugerzellen (Sigma) in einer Konzentration von 0.1 % (v/v) zugeben	

Tabelle 18 Zusammensetzung von 50 mM NaPi Puffer, pH 7.6

NaPi-Puffer	Einwaage	Reagenz
	7.52g	1M Na_2HPO_4*$2H_2O$
	1.07g	1M NaH_2PO_4* H_2O
	ad 1l H_2O pH 7.6	

7.7 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Mikrosomen wird nach der Methode nach Bradford bestimmt. Diese Methode basiert auf einer Farbreaktion. Der Farbstoff Coomassie-Blau reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm hin zu 595 nm. Durch Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekannten Proteinlösung einfach bestimmt werden, vorausgesetzt das für die Eichung verwendete und das unbekannte Protein haben einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren. Die Quantifizierung erfolgt über eine externe Kalibriergerade. Rinder-Serum-Albumin (BSA) hat sich als international anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt. In einer 96 Well Platte werden die einzelnen Proben als Triplikate

vorgelegt. Für die Proben werden jeweils 1 µl Mikrosomenlösung, verdünnt in 20 µl H_2O bidest, aufgetragen. Pro Well werden 200 µl zuvor 1:5 mit H_2O bidest. verdünntes BioRad Protein Dye (BioRad) zugegeben. Die Absorption der Proben wird photometrisch in einem Plate Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm erfasst.

7.8 RNA-Isolierung mit Trizol®

Die Gewebeproben der einzelnen Organe der Mäuse werden in 1 ml Trizol® (Invitrogen) pro 50-100 mg Gewebe homogenisiert, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 15-30 °C belassen. Es werden 0.2 ml Chloroform hinzugegeben, per Hand für 15 sec geschüttelt und wieder für 2-3 min bei Raumtemperatur belassen. Die Proben werden bei 12.000 g und 2-8 °C für 15 min zentrifugiert, so dass eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine farblose wässrige RNA-haltige Phase entstehen. Durch Mischen mit 500 µl Isopropanol wird die RNA gefällt und anschließend bei 12.000 g und 2 bis 8 °C für 10 min abzentrifugiert; sie wird als gelartiges Pellet sichtbar. Anschließend wird der Überstand entfernt, das RNA-Pellet einmal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen, gevortext und bei 7.500 x g und 2-8 °C für 5 min zentrifugiert. Nun wird das RNA-Pellet an der Luft für 5-10 min getrocknet, wobei darauf zu achten ist, dass das Pellet nicht vollständig austrocknet, da dies die anschließende Löslichkeit in 50 µl RNase-freiem Wasser stark herabsetzt. Die RNA-Lösung wird für 10 min auf 55-60 °C erhitzt und anschließend bei -80 °C gelagert.
Um RNase-Kontaminationen zu vermeiden, sollte unbedingt mit Handschuhen, RNase freien Pipettenspitzen und Reaktionsgefäßen gearbeitet werden. RNase kann bei jedem Schritt der Isolation durch unsauberes Arbeiten in die RNA-Präparation gelangen.
Die RNA-Konzentration wird mittels Nano-Drop bestimmt.

7.9 RNA Agarose Gelelektrophorese

Die RNA wird unter denaturierenden Bedingungen in einem Agarose-Gel aufgetrennt, um ein zu starkes Verknäulen der RNA zu verhindern. Zur Denaturierung des Gels wird Formaldehyd verwendet. Da die Phosphatgruppen der RNA negativ geladen sind, wandert sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Je höher der Agaroseanteil im Gel ist, desto

langsamer wandert die RNA und desto stärker werden die einzelnen Fragmente nach ihrer Länge aufgetrennt. Große Fragmente laufen aufgrund ihres höheren Molekulargewichts und ihrer größeren Unbeweglichkeit langsamer als kleine Fragmente. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist zusätzlich auch abhängig von der Spannung zwischen den beiden Polen. Je höher die Spannung, desto schneller läuft das Gel.
Die in Auftragspuffer (Tabelle 19) aufgenommene RNA (ca. 1 µg pro Probe) mit einem Gesamtvolumen von ca. 10 bis 15 µl wird 20 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert und danach bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Als Gel wird ein 1.5 %iges MOPS-Formaldehyd-Agarose-Gel (Tabelle 22) verwendet. Das Gel wird mit 1x MOPS-Puffer (Tabelle 20) als Laufpuffer überschichtet und die vorbereiteten Proben werden eingefüllt. Die Laufzeit beträgt ca. 1 Stunde bei 70 V konstanter Spannung. Anschließend wird das Gel mittels Geldokumentationssytem Eagle Eye II (Stratagene) fotografiert und abgespeichert.

Tabelle 19 Zusammensezung von RNA-Auftragspuffer

RNA-Auftragspuffer-Stammlösung	
Bromphenolblau	0.07 % (w/v)
Glycerin	33 % (w/v)
SDS	7 % (w/v)

RNA-Auftragspuffer-Gebrauchslösung	
10 x MOPS	3.6 µl
Formamid	18 µl
Formaldehyd (37 %)	6.4 µl
Auftragspuffer-Stammlösung	4 µl
Ethidiumbromid-Lösung	0.2 µl

Tabelle 20 Zusammensetzung von 10x MOPS

MOPS-Puffer (10x)	**Endkonzentration**	**Reagenz**
	200 mM	MOPS
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	Na_2EDTA
	steril filtrieren und autoklavieren; dunkel lagern	

Tabelle 21 Zusammensetzung von DEPC-Wasser

DEPC-Wasser	Endkonzentration	Reagenz
	0.1 %	DEPC in H_20 bidest
	über Nacht unter Abzug rühren, am nächsten Tag autoklavieren	

Tabelle 22 Zusammensetzung des MOPS-Formaldehyd-Agarosegels

MOPS-Formaldehyd-Agarosegel	Endkonzentration	Reagenz
	1.5 g	Agarose
	100 ml	1x MOPS
	10 ml	37 %iges Formaldehyd
	Formaldehyd nach Abkühlen auf ca. 50 °C zugeben, im Abzug gießen	

7.10 cDNA-Synthese

Die zu untersuchende RNA wird mit Hilfe eines Random-Primer Mixes in die korrespondierende cDNA umgeschrieben. Zur reversen Transkription wird dem Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit (ABGene) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Pro Ansatz werden 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt (Tabelle 23).

Tabelle 23 RT-Ansatz für die Real-time PCR

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
Random Decamer Primer (400 ng/µl)	1 µl	
RNA (100 ng/µl)	1 µl	
Nuclease-freies Wasser	10 µl	
		5 min, 70 °C
5 x Reaktions-Mix	4 µl	
dNTP-Mix, je 5mM	2 µl	
Reverse-iT™ RTase Blend	1 µl	
DTT 100 mM	1 µl	
		47 °C 50 min
		75 °C 10 min

7.11 Real-time PCR

Die Real-time quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion (PCR) beruht, aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt (daher der Name „Real time“ = „Echtzeit") und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von Farbstoffen, in dieser Arbeit SYBR® Green. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA ein, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was die Quantifizierung möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist nicht notwendig.

Wichtig bei der Real-time PCR ist, dass die Quantifizierung der PCR-Produkte am Anfang der exponentiellen Phase der Reaktion stattfindet. In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt. In der dritten Phase der Amplifikation dagegen steigt die Menge der Produkte derart an, dass es zur Hemmung durch diese kommt,

häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze langsam zerstört werden können. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus"-Wert) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.
Verschiedene Rechenmodelle werden für die Quantifizierung herangezogen. In dieser Arbeit wird die relative Quantifizierung angewendet, wobei ein Hauskeeping-Gen (hier ß-Actin) mitgemessen wird, um einen relativen Mengenvergleich zum „gene of interest“ durchführen zu können.

Für die Real-time PCR wird der ABsolute ™ QPCR SYBR® Green Mix (ABGene) nach Anleitung des Herstellers verwendet (Tabelle 24):

Tabelle 24 Reaktionsprotokoll zur Durchführung der Real-time PCR

Reaktions-Mix		**Reaktionsbedingungen**			
cDNA	1 µl	**Schritt**	**Temp.**	**Zeit**	**Zyklus**
Sense-Primer (10 µM)	0.5 µl	Denaturierung	95 °C	15 min	1x
Antisense-Primer (10 µM)	0.5 µl	Denaturierung	95 °C	1 min	
SYBR Green Supermix	12.5 µl	Anlagerung	59 °C	1min	35x
Nuclease-freies Wasser	10.5 µl	Elongation	72 °C	1 min	
		Elongation	72 °C	10 min	1x

Die für die Real-time PCR-Reaktion verwendeten Primerpaare (Tabelle 25) werden so gewählt, dass mindestens ein Primer über einer Intronbrücke liegt, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 25 Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die Real-time PCR

PCR Typ	Primer	Sequenz
Human CYP1A1	Sense Primer	5´- CACCATCCCCCACAGCAC– 3´
	Antisense Primer	5´- ACAAAGACACAACGCCCCTT– 3´
Maus CYP1A1	Sense Primer	5´- TCAAAGAGCACTACAGGACATTTG – 3´
	Antisense Primer	5´- GGGTTGGTTACCAGGTACATGAG – 3´
Maus AhRR:	Sense Primer	5´- GTTGGATCCTGTAGGGAGCA – 3´
	Antisense Primer	5´- AGTCCAGAGGCTCACGCTTA – 3´
Maus ß-Actin	Sense Primer	5´- AGCCATGTACGTAGCCATCCA – 3´
	Antisense Primer	5´- TCTCCGGAGTCCATCACAATG – 3´

Zur Validierung der Primer wird eine cDNA-Verdünnungsreihe verwendet. Für die Primerpaare Maus CYP1A1, Maus AhRR und Maus ß-Actin stammt die cDNA aus mit 1 µg/kg Körpergewicht für 96 Stunden mit TCDD behandelter Mausleber, für das Primerpaar Human CYP1A1 aus isolierter RNA der mit 1 nM mit TCDD für 48 Stunden behandelten Zelllinie HT-29 (gleichzeitig auch Positivkontrolle).
Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit Hilfe der Software „Gene Expression Analysis for iCycler iQ® Real-Time PCR Detection System“, Version 1.10 (BioRad).

7.12 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt eine Auftrennung geladener Proteine im elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt bei dieser Methode ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen, d.h. nach dem Molekulargewicht. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel ergibt sich eine Beziehung zwischen den Molekulargewichten und den Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen. Mittels Marker-Proteinen lassen sich neben der Trennung auch die Molekulargewichte der einzelnen unbekannten Proteine ermitteln.

Die Lösungen für zwei 10 %ige Polyacrylamidgele werden zusammengemischt (Tabelle 26), schnellst möglich zwischen zwei Glasplatten pipettiert und mit n-Butanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Das Gel wird für ca. 30 Minuten auspolymerisieren gelassen. Vor dem Auftragen des 4 %igen Sammelgels (Tabelle 26) wird das n-Butanol entfernt. Ein Probenkamm im Sammelgel formt die Geltaschen. Die Proben, die nach Zugabe von 6x Ladepuffer (Tabelle 28) bei 94°C 5 Minuten lang denaturiert wurden, werden abzentrifugiert und die Geltaschen beider Gele beschickt. Der Größenmarker Kaleidoscope (BioRad) wird zur Größenbestimmung benötigt. Das Gel wird in eine vertikale Gelkammer gestellt und mit 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 27) überschichtet. Die Dauer der Elektrophorese beträgt ca. 2 Stunden bei 140 Volt konstanter Spannung.

Tabelle 26 Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel in der SDS-PAGE

	Trenngel (10 % Acrylamid)	**Sammelgel (4 % Acrylamid)**
Acrylamid (30 %)	1.64 ml	0.25 ml
Aqua bidest	2.0 ml	1.2 ml
1.5 M Tris	1.23 ml	/
0.5 M Tris	/	0.5 ml
SDS (10 %)	49.2 µl	20 µl
APS (10 %)	24.6 µl	20 µl
TEMED	2.46 µl	2 µl

Tabelle 27 Zusammensetzung von 10xSDS-Laufpuffer

SDS-Laufpuffer (10x)	**Endkonzentration**	**Reagenz**
	2 M	Glycin
	250 mM	Tris/HCl, pH 8.3
	1 % (w/v)	SDS

Tabelle 28 Zusammensetzung von 6x Ladepuffer

Ladepuffer (6x)	Einwaage	Reagenz
	50 ml	0.5 M Tris/HCl pH 6.8
	1.24 g	SDS
	40 ml	Glycerin
	0.16 g	Bromphenolblau
	5 % (v/v)	ß-Mercaptoethanol
	Mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen	

7.13 Western-Blot

Im Anschluß an die SDS-PAGE folgt der Western-Blot. Die aufgetrennten Proteine werden vom Gel auf eine PVDF Trägermembran (Millipore) übertragen. Der Transfer der Proteine erfolgt elektrophoretisch (Elektro-Blotting) in einer Semi-Dry Blotting-Apparatur in Gegenwart von 1x Blotting-Puffer (Tabelle 29). Das Blotten erfolgt mit 50 mA pro Membran bei konstanter Stromstärke und dauert 90 Minuten. Die Membran und das Gel befinden sich während des Blottens zwischen zwei in Blottingpuffer getränkten Filterpapieren. Die PVDF-Membran wird nach dem Blotten in Blocking-Puffer (Tabelle 30) überführt und über Nacht bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag erfolgt die Detektion. Die Membran wird für zwei mal 5 Minuten in TBS-Tween (Tabelle 31) gewaschen und anschließend mit 1 ml des ersten Antikörpers Rabbit Anti-CYP1A1 in der Verdünnung 1:1000 in TBS (Santa Cruz) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einen Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut für 3 mal 5 Minuten in TBS-Tween gewaschen und dann mit 2 ml des zweiten Antikörpers Anti Rabbit IgG-HRP in der Verdünnung 1:2000 in TBS (Santa Cruz) ebenfalls für eine Stunde unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Membran wird im Anschluß 3 mal 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen, dann erfolgt die Inkubation der Membran mit Lumi-Glo, einer Lösung bestehend aus 500 µl Luminol Reagent A sowie 500 µl Peroxid Reagent B (Applichem). An den zweiten Antikörper ist eine Horseradish-Peroxidase gekoppelt. Sie katalysiert eine Reaktion des Peroxids mit dem Lumi-Glo-Reagenz. Das im Lumi-Glo enthaltene Reagenz Luminol wird in Anwesenheit von H_2O_2 zu 3-Aminophthalat umgesetzt. 3-Aminophthalat befindet sich in angeregtem Zustand und fällt unter

Aussenden von Licht in den Grundzustand zurück. Diese Chemilumineszenz wird von einer CCD Kamera registriert. Sämtliche Stellen auf der Membran die immunreaktive Banden enthalten können somit sichtbar gemacht werden. Das Bild wird dann mit dem Programm „Lumi Analyst“ von Roche digital dokumentiert.

Tabelle 29 Zusammensetzung von 1x Blotting-Puffer

Blotting-Puffer (1x)	**Endkonzentration**	**Reagenz**
	39 mM	Glycin
	48 mM	Tris/HCl
	0.037 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol

Tabelle 30 Zusammensetzung von Blocking-Puffer

Blocking-Puffer	**Endkonzentration**	**Reagenz**
	5 %	Milchpulver
	in 1x TBS-Tween	

Tabelle 31 Zusammensetzung von TBS und TBS-Tween

20x TBS	**Endkonzentration**	**Reagenz**
	2.6 M	NaCl
	0.4 M	Tris/HCl, pH 7.6
Waschlösung (TBS-Tween): 1xTBS mit 0.3 % Tween-20		

7.14 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität

Die Bestimmung der EROD-Aktivität dient zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von CYP1A und ist somit ein Maß für die CYP1A-Induktion. Die grundlegende Reaktion beruht auf der Umwandlung vom nichtfluoreszenten 7-Ethoxyresorufin (ER) zum fluoreszenten Resorufin über eine CYP1A-katalysierte oxidative Desalkylierung. Die Reduktionsäquivalente werden dabei von NADPH geliefert. Die Menge an gebildetem Resorufin pro Zeiteinheit gibt Aufschluss über die katalytische Aktivität der im Reaktionsansatz vorhandenen CYP1A Enzyme.

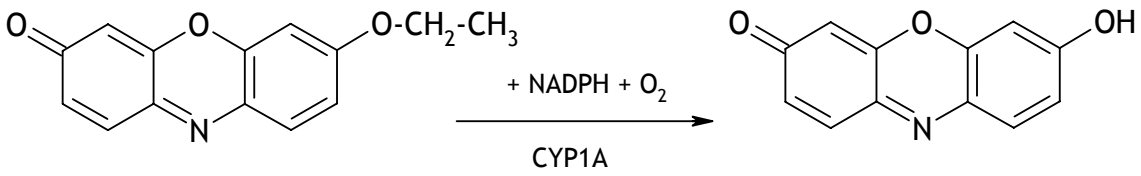


Abbildung 31 CYP1A-vermittelte Reaktion von Ethoxyresorufin zu Resorufin

Die von Kennedy *et al.* entwickelte Methode ermöglicht die simultane Bestimmung der EROD-Aktivität und des Proteingehalts (mittels Fluorescamin) im Well-Format an einem Fluoreszenz-Plattenreader [Kennedy und Jones 1994; Kennedy *et al.* 1995].

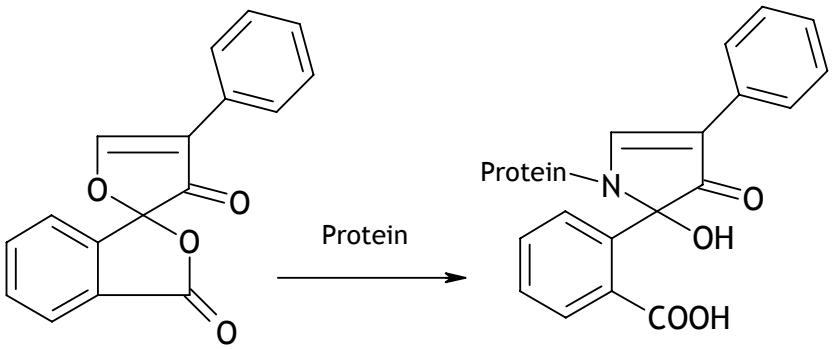


Abbildung 32 Reaktion von Fluorescamin mit Proteinen

Zur Durchführung des Assays wird folgendermaßen vorgegangen: NADPH-Lösung (13 mM in NaPi-Puffer) und ER-Stammlösung (1.05 mM ER in Methanol) werden aufgetaut und bis zur

Verwendung auf Eis gelagert. Der NaPi-Puffer (Tabelle 33) wird auf Raumtemperatur temperiert. Die benötigte Menge an Fluorescaminlösung wird durch 1:1-Verdünnung der Stammlösung (100 mg Fluorescamin in 333 ml Acetonitril) mit Acetonitril hergestellt und lichtgeschützt ebenfalls auf Raumtemperatur gebracht. Die ER-Stammlösung wird um das 3.9-fache mit NaPi-Puffer verdünnt und lichtgeschützt auf Eis gelagert.
Die Mikrosomen bzw. Homogenate werden aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Die Mikrosomen- bzw. Homogenatverdünnung besteht aus 1-10 µl Homogenat ad 70 µl NaPi-Puffer. Für ein Well einer 96 Well-Platte lautet der Ansatz wie folgt:

Tabelle 32 Reaktionsansatz für 1 Well im EROD-Assay

Reagenz	Volumen
Homogenatverdünnung	70 µl
ER-Lösung	30 µl
NADPH-Lösung	15 µl
Fluorescaminlösung	90 µl

70 µl Probe in NaPi-Puffer und 30 µl ER-Lösung werden pro Well dispensiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 15 µl NADPH-Lösung gestartet. Nach 10 min erfolgt das Abstoppen der Reaktion mittels 90 µl Fluorescaminlösung. Die fluorimetrische Messung wird nacheinander zunächst für Resorufin bei Ex 544 nm/Em 590 nm und danach zur Proteinbestimmung bei Ex 390 nm/Em 460 nm durchgeführt. Die Blankwerte, die auf jeder Platte mitgeführt werden, enthalten keine NADPH-Lösung und zeigen somit nur die durch die Reaktionsbedingungen ausgelösten und CYP1A unabhängigen Zerfälle von Ethoxyresorufin an. Die Berechnung der Resorufin- und Proteingehalte der einzelnen Proben erfolgt über Standard-Eichkurven mit Resorufin und BSA.

Tabelle 33 Zusammensetzung von NaPi-Puffer, pH 8.0

NaPi -Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	47.4 mM	Na_2HPO_4
	2.6 mM	NaH_2PO_4
	auf pH 8.0 einstellen	

7.15 Quantifizierung von 8-oxo dG

DNA-Schädigung durch oxidativen Stress ist ein wichtiger Mechanismus der chemischen Kanzerogenese. Die Quantifizierung von 8-Hydroxy-2´-desoxyguanosin (8-oxo dG) in DNA dient als Marker für oxidative DNA-Schäden. Als Probenmaterial dient aus Ratten- bzw. Mausleber isolierte DNA bekannter Konzentration.

7.15.1 Isolierung der genomischen DNA

Zunächst wird die genomische DNA aus der Leber der Tiere isoliert: Ein Gewebestückchen wird in gefrorenem Zustand in 5 ml NaPi Puffer (Tabelle 33) im Gewebehomogenisator auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wird in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend für 10 min bei 10 °C (1200 rpm) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wird das Pellet noch dreimal mit 5 ml NaPi Puffer gewaschen. Es werden 3 ml Nuclei Lysis Puffer (Tabelle 34), 100 µl Proteinase K (10 mg/ml) (Qiagen) und 400 µl 10 %ige SDS-Lösung hinzugefügt. Dieser Ansatz wird bei 45 °C über Nacht im Wasserbad geschüttelt. 1 ml 6 M NaCl werden zur nun klaren Lösung hinzugefügt und das Röhrchen per Hand für 15 sec. geschüttelt. Bei 3000 rpm wird für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und wieder bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Schritte 3 bis 4 werden wiederholt bis das Reaktionsgefäß frei von Natriumchlorid (weißer Niederschlag) ist (mindestens 3 bis 4 mal). Danach folgt die Fällung mit Isopropanol: Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt; dabei wird das Volumen gemessen, dann 1/10 des Volumens 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5–3x des Volumens kaltes 100 %iges Isopropanol hinzugegeben. Es wird vorsichtig geschüttelt, bis die DNA ausfällt. Die DNA wird mit Hilfe einer Eppendorf-Pipettenspitze in ein neues Gefäß, das 13 ml 70 %iges Ethanol enthält, transferiert und für zwei Stunden auf einem Inverting Rack belassen. Die DNA wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und in 50 µl H_2O bidest gelöst.
Die DNA-Konzentration wird mittels NanoDrop® ermittelt und auf 1 µg/µl mit H_2O bidest eingestellt. Die DNA-Ausbeute sollte pro Ansatz bei mindestens 100 µg liegen.

Tabelle 34 Zusammensetzung von Nuclei Lysis Puffer

Nuclei Lysis -Puffer	Reagenz	Volumen
	Tris EDTA; pH 8.0	1 ml
	5 M NaCl	8 ml
	0.5 M EDTA	0.4 ml
	ad 100 ml H_2O bidest	

Tabelle 35 Zusammensetzung von Tris EDTA, pH 8.0

Tris EDTA pH 8.0	Reagenz	Einwaage
	Tris Base	121.14 g
	EDTA-Na_2-Salz	37.22 g
	ad 1000 ml H_2O bidest.	

7.15.2 DNA-Hydrolyse

Die DNA wird mit Hilfe von Nuclease P1 und Alkalischer Phosphatase folgendermaßen hydrolysiert:

- 100 µl DNA (1 µg/µl)
- + 2.5 µl Puffer C
- + 10 µl (10 u) Nuclease P1 (0.1 u/µg DNA)
- im Wasserbad bei 40 °C 60 min inkubieren
- + 10 µl Puffer D
- + 10 µl alkalische Phosphatase (0.02 u/µl) (0.02u/µg DNA)
- im Wasserbad bei 40 °C 60 min inkubieren
- gesamtes Volumen auf Amicon-Filtersäule* geben
- bei 14000 rpm 15 min. zentrifugieren
- in HPLC-Vials füllen
- HPLC-MS-MS Messung (Injektionsvolumen 50 µl)

* Amicon Ultrafree-MC 5000 NMwL (Millipore; Cat-No UFC3LLC00)

Die DNA-Proben werden direkt nach der Hydrolyse vermessen, da sonst die 8-oxo dG Konzentration durch Oxidationsprozesse ansteigt.

Tabelle 36 Zusammensetzung der Puffer für die DNA-Hydrolyse

Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer D
25 mM NH_4Ac	100 mM NH_4HCO_3	1 M NH_4Ac	1.5 M NH_4HCO_3
1 mM $ZnCl_2$	pH 8.0	45 mM $ZnCl_2$	pH 8.0
pH 5.3		pH 5.3	
Alkalische Phosphatase (Roche): auf 0.02 u/µl einstellen; verdünnen in Puffer B			
Nuclease P1 (Sigma): auf 1 u/µl einstellen; lösen in Puffer A			

7.15.3 HPLC-MS

Die Quantifizierung des 8-oxo dG erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Toxikologie der Universität Würzburg und fand im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dekant und Dr. Mally statt. Pro Messung werden 50 µl DNA-Hydrolysat mittels Autosampler injiziert. Jede Probe wird zweimal vermessen. Zur Quantifizierung von 8-oxo dG wird eine Eichreihe mit externem Standard erstellt. Zwischen den Proben ist regelmäßig eine Eichlösung zu vermessen. Die Eichgerade wird am gleichen Tag erstellt.
Die Quantifizierung erfolgt über die Integration der Peakflächen (284.1/168.3 RT 18.6) mittels der Software „Analyst“ (Applied Biosystems). Der Übergang 284.1/140.2 dient als Qualifier.

MRM 268.1/152.1	entspricht	dG
MRM 284.1/168.3	entspricht	8-oxo dG
		(entsteht im Elektrospray aus dG)
MRM 284.1/140.2	entspricht	8-oxo dG

Durch Einsetzen der erhaltenen Werte in die Eichgerade erhält man pg 8-oxo dG absolut in 50 µl Hydrolysat. Dieser Wert wird auf 8-oxo dG pro 10^6 dG umgerechnet. Die graphische Darstellung erfolgt als relative Menge an 8-oxo dG (%) im Vergleich zur Kontrolle (100 %).

Eichlösungen: 1 mg 8-Hydroxy-2´-desoxyguanosin in 1 ml H_2O lösen

Die Stammlösung wird schrittweise auf folgende Konzentrationen verdünnt: 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.2 pg/µl

(entspricht bei einem Injektionsvolumen von 50 µl: 5, 10, 20, 30, 40, 100 pg absolut).

Eichlösungen bei –20 °C lagern.

Fließmittel:

Fließmittel A:	10 mM Ammoniumacetat (pH 4.3), entgast
Fließmittel B:	Methanol, entgast

Die detaillierten Geräteeinstellungen der HPLC-MS Anlage sind im Anhang aufgeführt.

7.16 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der Leber der Maus

Die Entwicklung in der Nukleinsäure-Arraytechnologie macht es möglich, die Expression einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment zu untersuchen. Der GEArrayTM Q Series gene expression Array „Stress and Toxicity“ (Superarray), der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wird, beinhaltet 96 Fragmente von Genen, die an Stress- und Toxifizierungsprozessen beteiligt sind, und zudem cDNA Fragmente von verschiedenen Hauskeeping-Genen. Die genspezifischen cDNA Fragmente sind auf eine Nylonmembran aufgespottet. In Abbildung 33 ist ein schematischer Ablauf der Microarray-Methode dargestellt, der im Folgenden näher beschrieben wird.

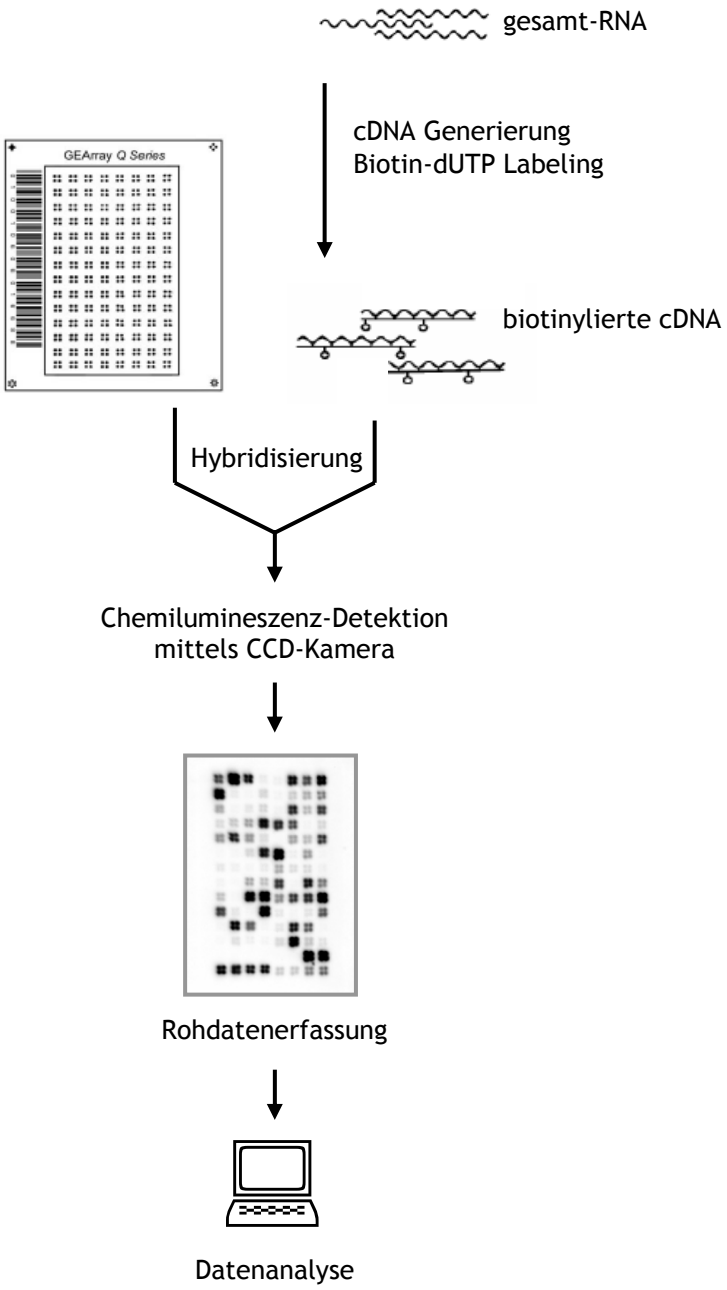


Abbildung 33 Schematischer Ablauf eines Microarray-Experiments

Folgende Kits und Reagenzien werden zur Durchführung verwendet:

Tabelle 37 Verwendete Kits und Reagenzien zur Durchführung des Arrayexperiments

RNeasy Mini Kit (Qiagen)
RNA 6000 Pico Kit (Agilent)
AmpoLabeling-LPR Kit (Superarray)
Biotin-16-dUTP (Roche)
GeAhyb-Hybridization-Solution (Superarray)
Blocking Solution (Superarray)
Chemiluminescent Detection Kit (Superarray)

7.16.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt aus Lebergewebe von Mäusen mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

7.16.2 RNA-Qualitätskontrolle

Mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) wird die Qualitätskontrolle isolierter Gesamt-RNA Proben durchgeführt. Die auf der Elektrophorese basierende LabChip™-Technologie fasst die Schritte der Längenseparation, die Aufnahme und Archivierung des Gelbildes und seine Auswertung in einem einzigen Prozess zusammen.
Die isolierte Gesamt-RNA wird auf eine Konzentration von 1 ng/µl mit H_2O bidest. verdünnt. Zur RNA-Qualitätskontrolle wird der RNA 6000 Pico Kit (Agilent) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

7.16.3 *In-vitro* Transkription und Dot-Blot

Die Transkription der RNA mit anschließender Biotin-Markierung erfolgt mit dem AmpoLabeling-LPR Kit. Dabei wird im ersten Schritt mit Hilfe von Random Primern und Reverser Transkriptase die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe von Gen-

spezifischen Primern erfolgt die Amplifizierung der Transkripte mit gleichzeitigem Biotin-Einbau. Zur Herstellung der cDNA-Sonden werden jeweils 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Vorgehensweise erfolgt nach der Anleitung des Herstellers. Danach wird die Qualität der cDNA-Sonden mittels Dot-Blot überprüft. Hierzu werden die Sonden fünf mal in 1:20-Schritten mit H_2O bidest. verdünnt, auf eine positiv geladene Nylonmembran (HyBond N^+, Amersham) gespottet und mittels Crosslinker (Stratagene) fixiert. Die Detektion des eingebauten Biotins erfolgt mittels Chemilumineszenz über einen Anti-Biotin-AP-Antikörper nach Anleitung des Herstellers.

7.16.4 Hybridisierung und Detektion

Nach einer Vorhybridisierung mit GeAprehyb-Hybridization-Solution erfolgt über Nacht die Hybridisierung der Membranen mit der in GeAhyb-Hybridization-Solution verdünnten Sonde bei 60 °C. Die Sonden werden zuvor 5 min bei 95 ºC denaturiert. Am nächsten Morgen werden die Membranen nach Anleitung des Herstellers mit Waschpuffern (Tabelle 38) behandelt, bevor eine 60 minütige Blockierung mit Blocking Solution erfolgt. Zum Nachweis des Biotins wird ein Anti-Biotin-AP-Antikörper in der Verdünnung von 1:10.000 für eine Dauer von 30 Minuten eingesetzt. Nach weiteren Waschschritten erfolgt die Detektion der Chemilumineszenz mittels CDP-Star Reagenz. Die Lumineszenz wird über eine CCD-Kamera (LAS 3000, Fuji) detektiert.

Tabelle 38 Zusammensetzung der Waschpuffer

Wash Solution I	Wash Solution II
2x SSC	0.1x SSC
1 % SDS	0.5 % SDS

Tabelle 39 Zusammensetzung von 20x SSC

Reagenz	Einwaage
NaCl	175.3 g
Na-Citrat-Dihydrat	88.2 g
ad 1000 ml H_2O bidest; pH 7.0	

7.16.5 Auswertung und Dokumentation

Die Analyse der Microarray Experimente erfolgt nach folgendem Schema:

1. Detektion des Microarrays, Bilderstellung und Speicherung
2. Analyse des Arraybildes und Generierung eines Rohdatenfiles
3. Enddatenberechnung aus Rohdatenfile nach Hintergrundabzug und Normalisierung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Die mittels CCD-Kamera erhaltenen Bilder werden mit der Software ScanAlyze (Eisen Lab) densitometrisch ausgewertet. Mit Hilfe dieser Software ist es möglich, ein Raster („grid“) über die Bilder zu legen, das die einzelnen Spots und deren individuelle Intensität erkennt, um somit die Rohdaten für jeden Array generieren zu können. Das Rohdatenfile wird als Microsoft Excel Arbeitsmappe abgespeichert.
Die weitere Analyse der Rohdaten erfolgt mittels GEArray Analyzer ™ 1.0 Software (Superarray). Mit Hilfe der GEArrayAnalyzer Software ist es möglich, den auf jedem Array individuell stark ausgeprägten Hintergrund abzuziehen und des weiteren, die gewonnenen Rohdaten zu normalisieren.

Die Negativkontrolle auf jedem Array (hier die PUC18 Plasmid-DNA) wird zum Abzug des Hintergrundes genutzt. Die Software berechnet den Hintergrund nach folgender Gleichung:

Signalstärke von Gen A in Experiment X - **Mittelwert des Signals der Negativkontrolle in Experiment X**

Die Normalisierung wird durchgeführt, um verschiedene Experimente miteinander vergleichbar zu machen. Dabei wird beabsichtigt, durch Bezug auf eine Basiseinheit die Variabilität in der Expressionsmenge zwischen einzelnen Experimenten zu entfernen. Die Normalisierung erfolgt in Bezug zur Positivkontrolle, in diesem Fall auf das Hauskeeping Gen ß-Actin. Die Software berechnet die Normalisierung nach folgender Gleichung:

$$\frac{\textbf{Mittelwert des Signals der Positivkontrolle in Experiment X}}{\textbf{Signalstärke von Gen A in Experiment X}}$$

Die Ergebnisse werden als Microsoft-Excel Arbeitsmappe ausgegeben. Die graphische Darstellung erfolgt als Scatter-Plot. Die Grafiken werden mittels Origin Software (Version 6) erstellt.

7.17 H_2DCFDA-Assay

Zum Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wird 2´,7´-Dihydrodichlorfluorescein-Diacetat (H_2DCFDA) verwendet.
Ursprünglich wurde diese Methode entwickelt, um Wasserstoffperoxid in wässrigen Lösungen quantitativ zu bestimmen [Keston und Brandt 1965; Cathcart *et al.* 1983]. Inzwischen wird mit dieser Methode die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen. Sie gilt als eine zuverlässige, sensitive und spezifische Methode [LeBel *et al.* 1992; Shen *et al.* 1996].
Der Assay arbeitet nach folgendem Prinzip: Chemisch reduzierte und acetylierte Formen des 2´,7´-Dichlorfluoresceins (DCF) sind so lange nicht fluoreszierend bis die Acetatgruppen des Moleküls durch intrazelluläre Esterasen entfernt werden und Oxidation auftritt. Dieser Prozess kann beobachtet werden, indem der Anstieg der Fluoreszenz in den Proben in einem Mikroplattenreader verfolgt wird:

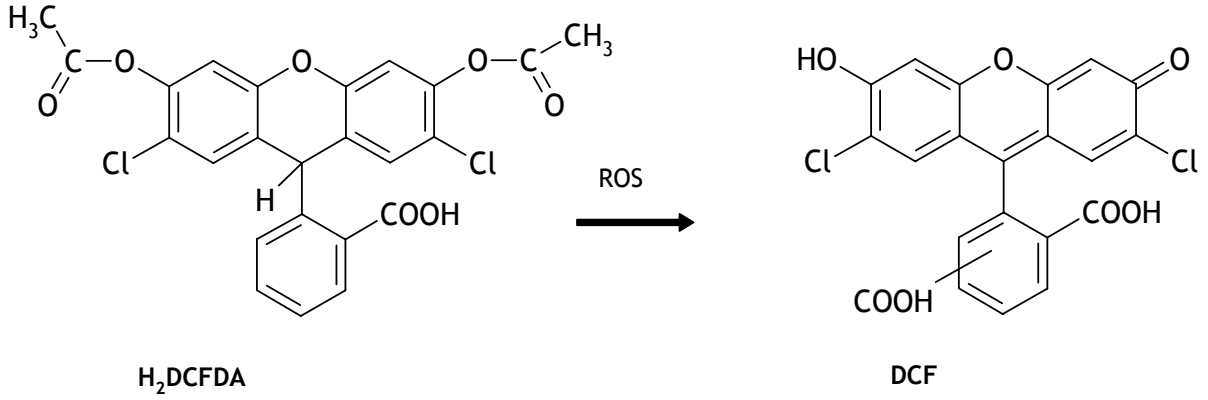


Abbildung 34 Mechanismus der Fluoreszenzbildung beim H_2DCFDA-Assay

Zur Durchführung des Assays werden NADPH-Lösung (13 mM) und H_2DCFDA -Stammlösung (80 mM in DMSO) aufgetaut, die NADPH Lösung wird bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Der Tris-Puffer (pH 8.0) wird auf Raumtemperatur temperiert. Die H_2DCFDA -Stammlösung wird um das 20-fache mit Tris-Puffer verdünnt und lichtgeschützt auf Eis gelagert. 16µl (beim Mikrosomenansatz) bzw. 24 µl (beim Supersomesansatz) der 4 mM H_2DCFDA Lösung werden als Arbeitslösung in 10 ml 0.05 M Tris verdünnt. Dies entspricht einer späteren H_2DCFDA -Endkonzentration von 5 µM pro Well

7.17.1 Lebermikrosomen-Ansatz

Die Mikrosomen werden aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Die Mikrosomenverdünnung besteht aus 1-2 µl Mikrosomen ad 20 µl Tris-Puffer. Für ein Well einer 96 Well-Platte lautet der Ansatz wie folgt:

Tabelle 40 Reaktionsansatz mit Mikrosomenproben im H_2DCFDA-Assay für 1 Well

Reagenz	Volumen
Mikrosomenverdünnung	20 µl
H_2DCFDA-Arbeitslösung	90 µl
NADPH-Lösung	5 µl

20 µl Probe in Tris-Puffer und 90 µl H_2DCFDA-Lösung werden pro Well vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl NADPH-Lösung gestartet. Die fluorimetrische Messung wird bei Ex 485 nm/Em 538 nm für 10 Minuten in Intervallen von je 30 sec im Mikroplattenreader durchgeführt. Die Blankwerte, die auf jeder Platte mitgeführt werden, enthalten keine NADPH-Lösung und zeigen somit die NADPH-unabhängige Bildung von DCF an. Die Berechnung der DCF-Gehalte der einzelnen Proben erfolgt über eine Standard-Eichkurve mit DCF (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 0 nM Endkonzentration im Well). Von jeder Probe wird der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Die ROS-vermittelte DCF Bildung wird in pmol/min*mg Protein (absolut) bzw. als prozentualer Anstieg der DCF-Bildung (relativ) angegeben.

7.17.2 Supersomes™

Supersomes™ (BD Gentest) sind kommerziell erhältliche Mikrosomen, die aus Insektenzellen stammen. Sie sind mit einem Baculovirus infiziert und exprimieren dadurch eine rekombinante cDNA eines einzelnen Cytochrom P450 Enzyms.
Die folgenden Supersomes™ werden für den H_2DCFDA-Assay verwendet: Ratte CYP1A1, Ratte CYP1A2, Human CYP1A1, Human CYP1A2, Human CYP1B1 sowie Kontroll-Supersomes (von nicht Baculovirus-infizierten Insektenzellen). Mit Ausnahme der Kontrolle coexprimieren alle anderen Supersomes™ zusätzlich eine rekombinante P450 Oxidoreduktase.
Mit Hilfe der Supersomes™ soll zum einen die relative ROS-Bildungsfähigkeit einzelner CYP Enzyme festgestellt werden. Zusätzlich soll geklärt werden, ob ausgewählte Testsubstanzen die potenzielle ROS-Bildung einzelner CYP-Enzyme beeinflussen können.
Als Testsubstanzen werden folgende Stoffe verwendet: TCDD, Benzo[a]pyren, 8-Methoxypsoralen, 17ß-Estradiol sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Die verwendeten Endkonzentrationen der Testsubstanzen sind in Tabelle 42 aufgeführt.

Supersomes™-Ansatz

Die Supersomes™ werden aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gehalten. Die Verdünnung besteht aus 2.5 pmol Supersomes™ ad 50 µl Tris-Puffer. Für ein Well einer 96 Well-Platte lautet der Ansatz wie folgt:

Tabelle 41 Reaktionsansatz mit Supersomes™-Proben im H_2DCFDA -Assay für 1 Well

Reagenz	Volumen
Supersomes™-Verdünnung	50 µl
H_2DCFDA-Arbeitslösung	60 µl
NADPH-Lösung	5 µl
Testsubstanz	1 µl

2.5 pmol Supersomes™ in 50 µl Tris-Puffer und 60 µl H_2DCFDA-Lösung, sowie die jeweilige Testsubstanz (Tabelle 42) werden im Well vorgelegt. Alle Testsubstanzen sind in DMSO gelöst, die Endkonzentration an DMSO im Well beträgt 0.5 % (v/v). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl NADPH-Lösung

gestartet. Die fluorimetrische Messung wird bei Ex 485 nm / Em 538 nm für 10 Minuten in Intervallen von je 30 sec. im Mikroplattenreader durchgeführt. Die Blankwerte, die auf jeder Platte mitgeführt werden, enthalten keine NADPH-Lösung und zeigen somit die NADPH-unabhängige Bildung von DCF an. Die Berechnung der DCF-Gehalte der einzelnen Proben erfolgt über eine Standard-Eichkurve mit DCF (1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 0 nM Endkonzentration im Well). Die ROS-vermittelte DCF Bildung wird in pmol/min*pmol CYP (absolut) angegeben.

Tabelle 42 eingesetzte Testsubstanzen und Konzentrationen im H_2DCFDA-Assay mit Supersomes™

Testsubstanz	Endkonzentration
2,3,7,8-TCDD	1 nM
Benzo[a]pyren (B[a]P)	10 µM
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	100 µM
17ß-Estradiol (E2)	100 nM
DMSO	0.5 % (v/v)

7.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm „GraphPad InStat 3.0“ (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Ergebnisse werden als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt.

Die Signifikanzen werden mittels ungepaartem t-Test (one tail p-value) berechnet.

Ergebnisse die signifikant von der Kontrolle abweichen ($p < 0.05$), sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Eine hoch signifikante Abweichung ($p < 0.01$) wird mit zwei Sternen (**) markiert.

8 Ergebnisse

8.1 Generierung und Charakterisierung der CYP1A1 transgenen Maus

Die Induktion von Phase I Enzymen über den AhR (z.B. mit dem Liganden TCDD) ist meist mit der vermehrten Expression einer Reihe anderer, AhR regulierter Gene verbunden. Induziert man nicht mit einem AhR-Liganden, ergibt sich die Schwierigkeit, dass lediglich eine sehr geringe konstitutive Expression von CYP1A1 in gesundem, unbehandeltem Gewebe stattfindet. Somit ist es schwierig vorauszusagen, welchen Anteil die katalytisch aktiven CYP Enzyme an der ROS-Bildung nach AhR-vermittelter Genexpression (in Abwesenheit eines induzierenden Liganden) tragen.

Deswegen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein System entwickelt werden, das ausreichend große Mengen an CYP1A1 exprimiert ohne dass zuvor eine das Studienergebnis möglicherweise verfälschende Behandlung mit einem AhR-Agonisten (z.B. TCDD) stattgefunden hat. Ziel war die Etablierung eines geeigneten *in-vivo* Systems, nämlich die Erzeugung einer transgenen, humanes CYP1A1 überexprimierenden Maus.

Dazu wurde zunächst ein Expressionsvektor kloniert, der die coding sequence des humanen CYP1A1 beinhaltet. Die Expression des Transgens sollte induzierbar sein und wurde daher als Tet-off System generiert. Die codierende Information des Vektors wurde mittels Pronucleus-Injektionstechnik in NMRI Mäuse transferiert.
Die identifizierten, hCYP1A1 transgenen F0 Founder wurden mit zwei unabhängigen, tTA exprimierenden Mauslinien verpaart. Doppelt-transgene F1 Founder wurden zur Charakterisierung der Transgen-Expression verwendet.
In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Teilergebnisse zur Generierung und Charakterisierung der hCYP1A1 transgenen Maus detailliert dargestellt.

8.1.1 Generierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1

Die coding sequence (CDS) des humanen CYP1A1 wurde aus dem Konstrukt pCMV•SPORT6/ IRAKp961N1042 mittels PCR und spezifischen Oligonucleotidprimern amplifiziert. Der Vorwärtsprimer enthielt zusätzlich eine MluI Restriktionsschnittstelle, der Rückwärtsprimer eine zusätzliche NheI Restriktionsschnittstelle, um eine passende Insertion in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet zu gewährleisten. Sowohl mit dem Vektor pBiEGFP-Tet, als auch mit dem Insert hCYP1A1 wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen MluI/NheI durchgeführt. Dadurch sollte die Ligation des Inserts in den Vektor über diese Restriktionsschnittstellen ermöglicht werden.
Das geschnittene PCR Produkt des Inserts hCYP1A1 und des geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

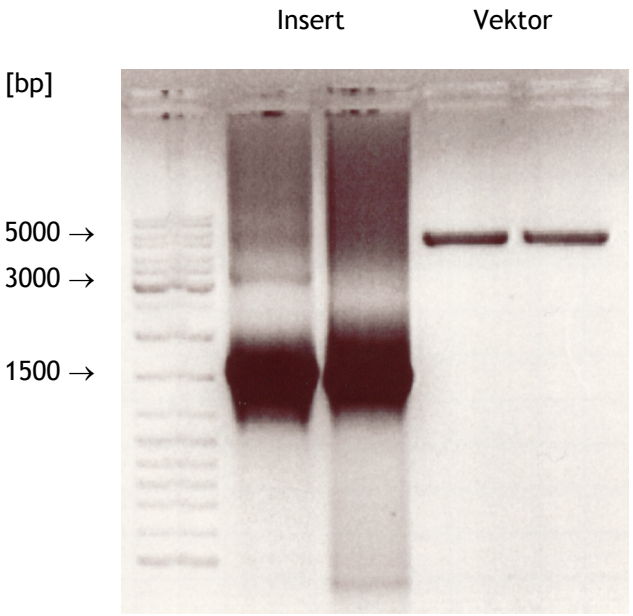


Abbildung 35 Elektrophoretische Auftrennung des jeweils mit MluI/NheI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet und des PCR-Produktes hCYP1A1 (Insert)

Abbildung 35 zeigt die Bande der amplifizierten, geschnittenen hCYP1A1 cDNA bei einer Größe von ca. 1600 bp und die Bande des geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet bei einer Größe von ca. 5100 bp. Sie wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert.
Durch das Enzym T4-Ligase wurde das vorbereitete DNA-Fragment (hCYP1A1 Insert) in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet ligiert.

Der Ligationsansatz wurde in kompetente E. coli TOP10F´ transformiert und das entstandene Plasmid mittels Plasmidpräparation isoliert.
Mit dem isolierten Plasmid wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen MluI und NheI durchgeführt um zu überprüfen, ob die Insertion der CYP1A1 cDNA in den Expressionsvektor pBiEGFP-Tet über die zuvor generierten Schnittstellen stattgefunden hat. Um weitere charakteristische DNA-Fragmente zu erhalten, die den korrekten Einbau des Inserts in den Vektor bestätigen, wurde ein weiterer Verdau des Plasmids mit dem Restriktionsenzym EcoRI vorgenommen. Die Ansätze wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und danach mit einem Geldokumentationssystem detektiert.

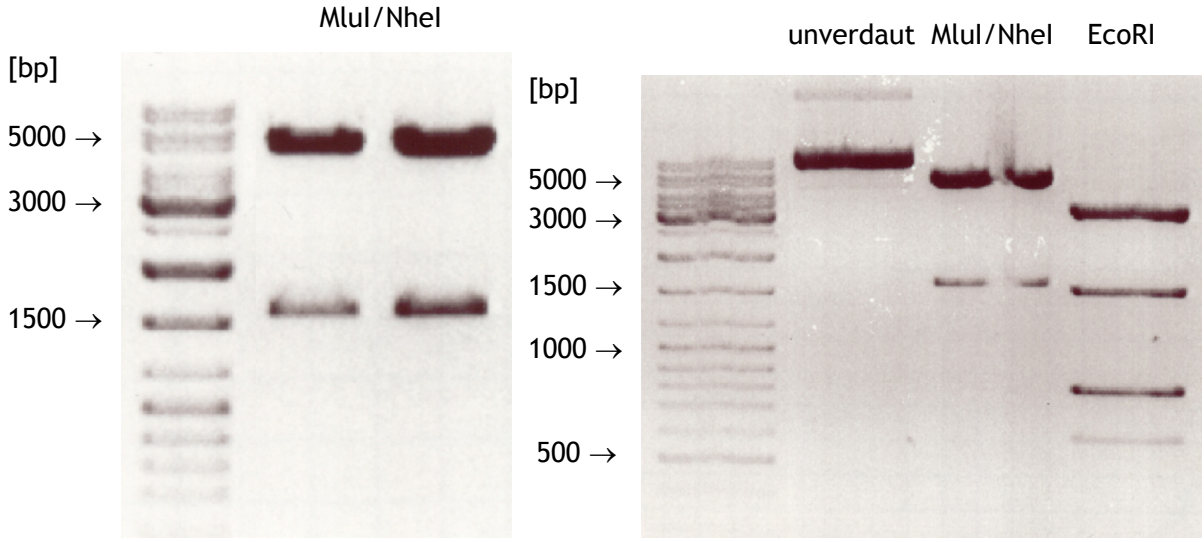


Abbildung 36 Elektrophoretische Auftrennung des unverdauten, mit MluI/NheI bzw. EcoRI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1

Abbildung 36 zeigt den Kontroll-Restriktionsverdau des Klons Nummer 7 von pBiEGFP-Tet/hCYP1A1. Der Verdau des Plasmids mit MluI/NheI lieferte zwei Banden bei ca. 1600 und ca. 5100 bp. Sie entsprachen Insert und Vektor. Der Verdau mit EcoRI lieferte fünf Banden. Sie entsprachen den zu erwartenden Größen von 563, 764, 773, 1490 und 3085 bp. Somit konnte festgehalten werden, dass das Insert in pBiEGFP-Tet/hCYP1A1, Klon 7, korrekt eingebaut wurde.

8.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 sollte zusätzlich Auskunft darüber erteilen, ob sich die rekombinante Sequenz im Vergleich zur nativen (z.B. durch eine oder mehrere Punktmutationen) verändert hat oder ob sie nach der Klonierung unverändert geblieben ist.

Die Sequenzierung des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 erfolgte in Auftrag durch die Firma MWG Biotech AG. Die Sequenz wurde in zwei Abschnitten sequenziert. Die erste Sequenz, bezeichnet als „forward-Sequenzierung“, wurde unter Verwendung des Primers 1A1-for-MluI, der zweite Abschnitt („reverse Sequenzierung“) unter Verwendung des Primers 1A1-rev-NheI sequenziert. Zur Vereinfachung der Darstellung sowie zur Verdeutlichung der Überlappung der beiden sequenzierten Abschnitte wurde die codierende Nukleotidsequenz des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 im Vergleich zur humanen CYP1A1 cDNA (Accession Number NM_000499) aus der Gendatenbank dargestellt:

```
forward-Sequenzierung
obere Zeile:  human CYP1A1, von 152 bis 991
untere Zeile: pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 von 16 bis 855

152   GGAGTTTCTTCTGGCCTCTGTCATCTTCTGTCTGGTATTCTGGGTAATCAGGGCCTCAAG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
16    GGAGTTTCTTCTGGCCTCTGTCATCTTCTGTCTGGTATTCTGGGTAATCAGGGCCTCAAG

212   ACCTCAGGTCCCCAAAGGCCTGAAGAATCCACCAGGGCCATGGGGCTGGCCTCTGATTGG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
76    ACCTCAGGTCCCCAAAGGCCTGAAGAATCCACCAGGGCCATGGGGCTGGCCTCTGATTGG

272   GCACATGCTGACCCTGGGAAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCAGTA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
136   GCACATGCTGACCCTGGGAAAGAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCAGTA

332   TGGGGACGTGCTGCAGATCCGAATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGCTGAGCGGCCTGGA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
196   TGGGGACGTGCTGCAGATCCGAATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGCTGAGCGGCCTGGA

392   CACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCGGCAGGGCGATGATTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
256   CACCATCCGGCAGGCCCTGGTGCGGCAGGGCGATGATTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTA

452   CACCTTCACCCTCATCAGTAATGGTCAGAGCATGTCCTTCAGCCCAGACTCTGGACCAGT
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
316   CACCTTCACCCTCATCAGTAATGGTCAGAGCATGTCCTTCAGCCCAGACTCTGGACCAGT
```

```
512   GTGGGCTGCCCGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGGCCTGAAAAGTTTCTCCATTGCCTCTGA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
376   GTGGGCTGCCCGCCGGCGCCTGGCCCAGAATGGCCTGAAAAGTTTCTCCATTGCCTCTGA

572   CCCAGCCTCCTCAACCTCCTGCTACCTGGAAGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTGAGGTCCT
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
436   CCCAGCCTCCTCAACCTCCTGCTACCTGGAAGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTGAGGTCCT

632   GATAAGCACGTTGCAGGAGCTGATGGCAGGGCCTGGGCACTTTAACCCCTACAGGTATGT
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
496   GATAAGCACGTTGCAGGAGCTGATGGCAGGGCCTGGGCACTTTAACCCCTACAGGTATGT

692   GGTGGTATCAGTGACCAATGTCATCTGTGCCATTTGCTTTGGCCGGCGCTATGACCACAA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
556   GGTGGTATCAGTGACCAATGTCATCTGTGCCATTTGCTTTGGCCGGCGCTATGACCACAA

752   CCACCAAGAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTGAATAATAATTTCGGGGAGGTGGTTGGCTC
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
616   CCACCAAGAACTGCTTAGCCTAGTCAACCTGAATAATAATTTCGGGGAGGTGGTTGGCTC

812   TGGAAACCCAGCTGACTTCATCCCTATTCTTCGCTACCTACCCAACCCTTCCCTGAATGC
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
676   TGGAAACCCAGCTGACTTCATCCCTATTCTTCGCTACCTACCCAACCCTTCCCTGAATGC

872   CTTCAAGGACCTGAATGAGAAGTTCTACAGCTTCATGCAGAAGATGGTCAAGGAGCACTA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
736   CTTCAAGGACCTGAATGAGAAGTTCTACAGCTTCATGCAGAAGATGGTCAAGGAGCACTA

932   CAAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATTGAGCACTGTCA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
796   CAAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATTGAGCACTGTCA
```

reverse-Sequenzierung
obere Zeile: pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 reverse complement, von 20 bis 740
untere Zeile: human CYP1A1, von 933 bis 1648

```
20    AAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATTGAAGCACTGTCA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
933   AAAACCTTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACAGCCTGATTGAAGCACTGTCA

80    GGAGAAAGCAAGCTGGATGAGAACGCCCAATGTCCAGCTGTCAGATGAGAAGATCATTAA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
992   GGAGAAAGCAAGCTGGATGAGAACGCCCAATGTCCAGCTGTCAGATGAGAAGATCATTAA

140   CATCGTCTTGGACCTCTTTGGAAGCTGGGTTTGACACAGTCACAACTGCTATCTCCTGGA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1049  CATCGTCTTGGACCTCTTTGGAAGCTGGGTTTGACACAGTCACAACTGCTATCTCCTGGA

200   GCCTCATGTATTTGGTGATGAACCCCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGAGCTAGACA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1108  GCCTCATGTATTTGGTGATGAACCCCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGAGCTAGACA
```

```
260   CAGTGATTGGCAGGTCACGGCGGCCCCGGCTCTCTGACAGATCCCATCTGCCCTATATGG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1168  CAGTGATTGGCAGGTCACGGCGGCCCCGGCTCTCTGACAGATCCCATCTGCCCTATATGG

320   AGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACACTCTTCCTTCGTCCCCTTCACCATCCCCCACA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1228  AGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACACTCTTCCTTCGTCCCCTTCACCATCCCCCACA

380   GCACAACAAGAGACACAAGTTTGAAAGGCTTTTACATCCCCAAGGGGCGTTGTGTCTTTG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1288  GCACAACAAGAGACACAAGTTTGAAAGGCTTTTACATCCCCAAGGGGCGTTGTGTCTTTG

440   TAAACCAGTGGCAGATCAACCATGACCAGAAGCTATGGGTCAACCCATCTGAGTTCCTAC
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1348  TAAACCAGTGGCAGATCAACCATGACCAGAAGCTATGGGTCAACCCATCTGAGTTCCTAC

500   CTGAACGGTTTCTCACCCCTGATGGTGCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGATTA
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1408  CTGAACGGTTTCTCACCCCTGATGGTGCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGGTGATTA

560   TCTTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGACCATTGCCCGCTGGGAGGTCTTTC
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1468  TCTTTGGCATGGGCAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGACCATTGCCCGCTGGGAGGTCTTTC

620   TCTTCCTGGCTATCCTGCTGCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTGG
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1528  TCTTCCTGGCTATCCTGCTGCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTGG

680   ACATGACCCCCATCTATGGGCTAACCATGAAGCATGCCTGCTGTGAGCACTTCCAAATGC
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1588  ACATGACCCCCATCTATGGGCTAACCATGAAGCATGCCTGCTGTGAGCACTTCCAAATGC

740   T

1648  A
```

Abbildung 37 Sequenz-Alignment des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 mit der humanen CYP1A1 cDNA

Bei bp 933 der humanen CYP1A1 cDNA Sequenz überlappten die beiden Sequenzen (in Abbildung 37 fett markiert). Das Start- und Stopcodon konnte nicht miterfasst werden, da es jeweils innerhalb der Sequenz der Primer lag. Es kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Sequenz Start- und Stopcodon enthält. Die beiden sequenzierten Abschnitte des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 stimmen mit der Vorlage der humanen CYP1A1 cDNA aus der Gendatenbank hundertprozentig überein. Die Original-Sequenzierungsdaten sind im Anhang aufgeführt.

8.1.3 Aufreinigung des Transgen-Konstruktes

Das aus der Klonierung resultierende Expressionsplasmid pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 ist in Abbildung 38 schematisch dargestellt.

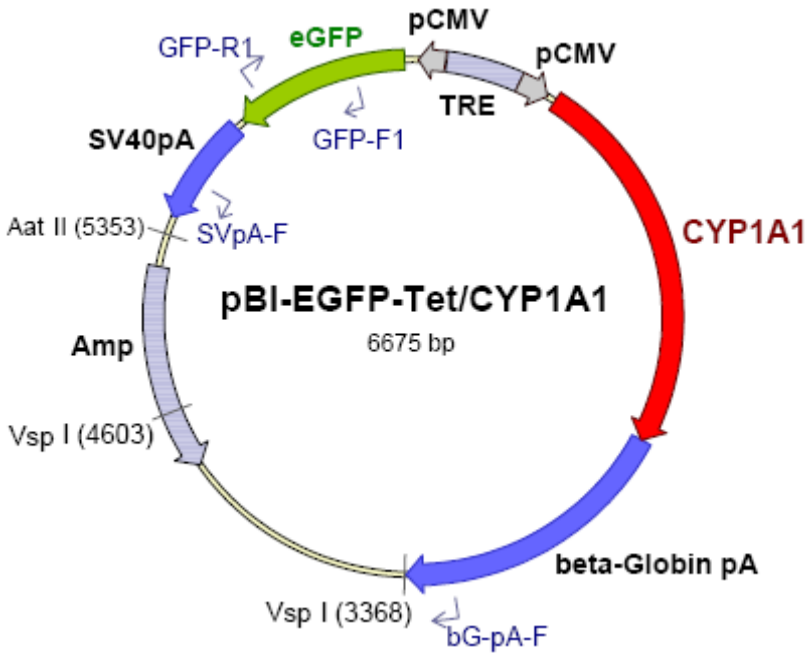


Abbildung 38 Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBi-EGFP-Tet/hCYP1A1 mit Markierung der Restriktionsschnittstellen AatII und VspI, sowie der Primerbindungsstellen für die Genotypisierung

Für die Pronucleusinjektion wurden als Konstrukt-Fragment lediglich die codierenden Sequenzen mit davor liegenden Promotoren, TRE und danach liegenden Polyadenylierungssignalen des Plasmids benötigt. Daher wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen AatII/VspI durchgeführt. Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, schneiden die Enzyme jeweils direkt hinter den beiden beta-Globin pA Sequenzen.

Das resultierende ~4.6 kb große Konstrukt-Fragment wurde nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel ausgeschnitten, isoliert und aufgereinigt. Abbildung 39 zeigt die ~4.6, 1.25 und 0.75 kb großen DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau des Expressionsplasmids pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 mit den Enzymen AatII/VspI, sowie die Kontrollbande des aufgereinigten ~4.6 kb großen Konstrukts, das zur Mikroinjektion verwendet wurde.

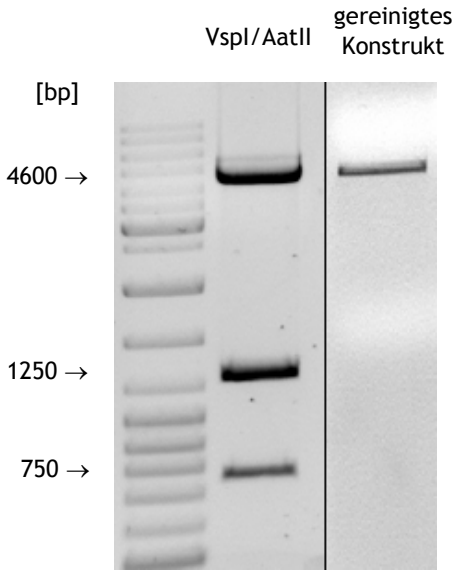


Abbildung 39 Elektrophoretische Auftrennung des mit AatII/VsplI geschnittenen Vektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1, sowie des aufgereinigten Transgen-Konstruktes

8.1.4 Pronucleusinjektion

Das Konstrukt wurde in den männlichen Pronucleus befruchteter Eizellen injiziert. Tabelle 43 fasst die durchgeführten Mikroinjektionen zusammen.

Tabelle 43 Übersicht über die durchgeführten Mikroinjektionen

Injektions-datum	implantierte Embryonen	weibliche Nachkommen	männliche Nachkommen
03.02.04	14	-	-
11.02.04	14	1	-
11.02.04	14	-	2
11.02.04	16	-	-
17.02.04	22	1	4
17.02.04	22	-	6
17.02.04	22	9	3
17.02.04	22	4	4
18.02.04	16	-	-
18.02.04	16	2	3
18.02.04	17	2	1

Innerhalb von elf Ansätzen wurden insgesamt 195 Embryonen implantiert. Daraus gingen insgesamt nach jeweils 21 Tagen 19 weibliche und 23 männliche Nachkommen hervor.

8.1.5 Screening nach transgenen Foundern (F0 Generation)

Insgesamt wurden innerhalb der F0-Generation 42 Nachkommen geboren. Zur Genotypisierung wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Primer GFPF1/GFP-R1 amplifizierten einen Abschnitt innerhalb des Transgens mit einer erwarteten Größe von 420 bp. Mit dem zweiten Primerpaar konnte zusätzlich das häufig auftretende Phänomen der so genannten „Head-to-tail" Integration des transgenen Konstruktes nachgewiesen werden. Die erwartete Größe des PCR-Produktes lag bei 470 bp. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse des F0-Genotypisierungs-Screenings.

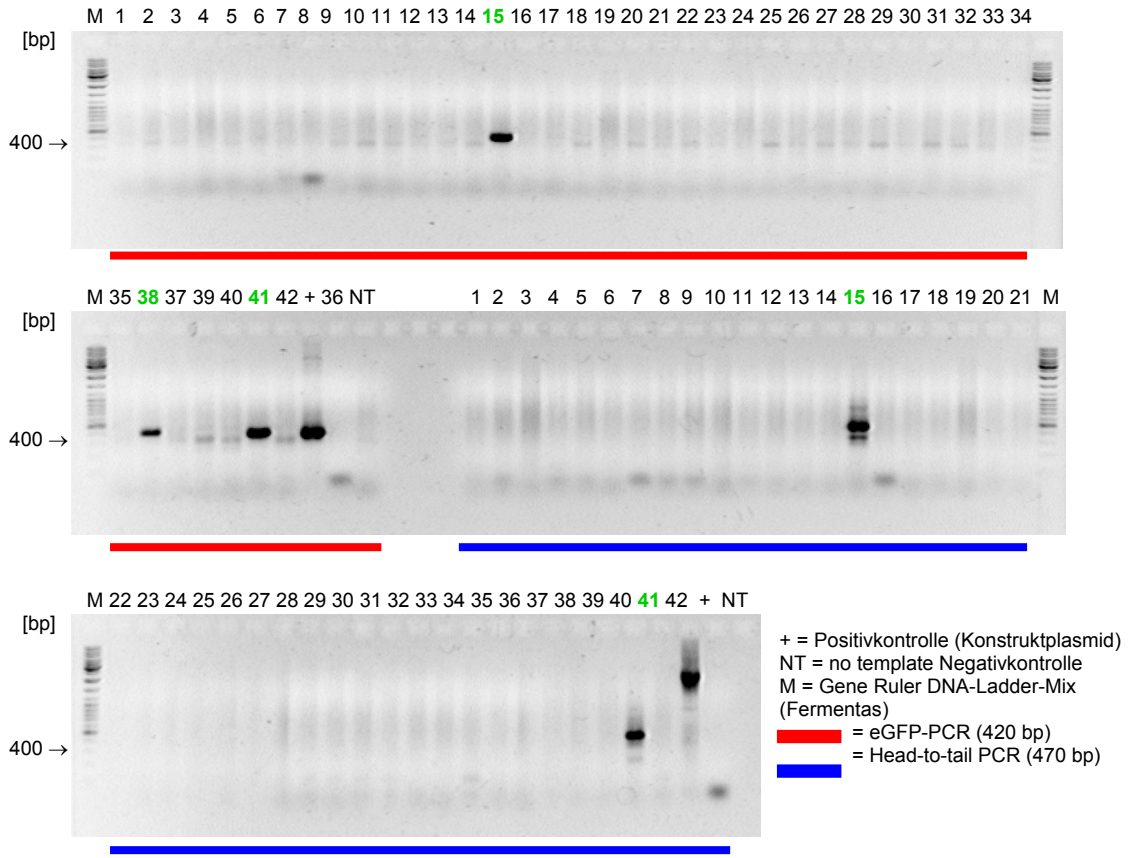


Abbildung 40 Screening nach hCYP1A1-GFP-TRE transgenen Foundern: PCR-Produkte von 42 Nachkommen; genomische DNA der F0-Generation; Primer: GFP-F1/GFP-F2 (eGFP-PCR) und SVpA-F/bGpA-R (Head-to-tail-PCR)

Wie in Abbildung 40 ersichtlich, konnten drei unabhängige F0-Founder (Nr. F0-15, F0-38, und F0-41) mittels PCR Reaktion identifiziert werden, bei denen das Transgen-Konstrukt pBiEGFP-Tet/hCYP1A1 ins Genom integriert wurde. Bei zwei der drei identifizierten Foundertiere (Nr. F0-15 und F0-41) war auch die Head-to-tail PCR positiv, d.h. das transgene Konstrukt wurde mehrfach (tandemartig) hintereinander ins Mausgenom integriert.

8.1.6 F1-Zucht

Die Foundertiere der transgenen Mauslinie NMRI-Tg(GFP-TRE-CYP1A1) F0-5, F0-38 und F0-41 wurden mit den tTA-exprimierenden Mauslinien STOCK Tg(tTAhCMV)3Bjd/J sowie B6;C3-Tg(TettTALuc)1Dgs/J verpaart. Abbildung 41 zeigt eine schematische Darstellung des Verpaarungsschemas.

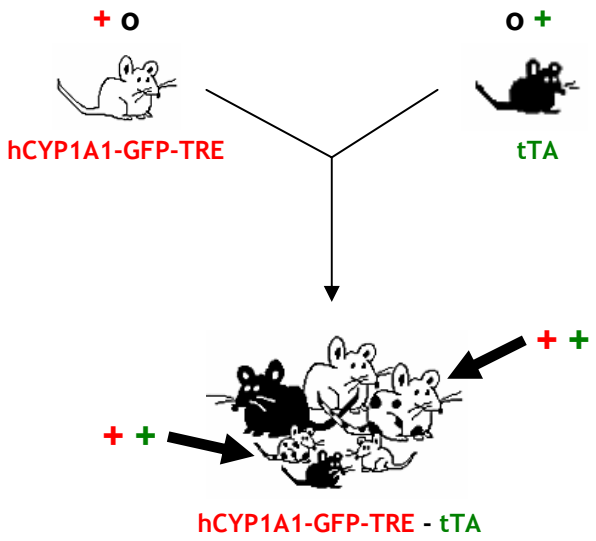


Abbildung 41 Schematische Darstellung des Verpaarungsschemas von NMRI-Tg(GFP-TRE-CYP1A1)- und tTA exprimierenden Mauslinien

Aus isolierter genomischer DNA der F1-Generation wurden zwei unabhängige Transgen-spezifische PCR Reaktionen durchgeführt: Wie bereits bei der F0-Zucht angewendet, amplifizierten die Primer GFP-F1 und GFP-R1 einen Abschnitt innerhalb der eGFP-Kassette des GFP-TRE-CYP1A1 Transgens mit einer erwarteten Größe von 420 bp. In einer zweiten

PCR wurden die Primer CamK2tTA-F und CamK2tTA-R verwendet. Sie amplifizierten einen Abschnitt innerhalb des tTA-Gens mit einer Größe von 450 bp. Doppelt-transgene Nachkommen lieferten sowohl für eGFP, als auch für das tTA-Gen eine Bande im Agarosegel. Abbildung 42 zeigt ein exemplarisches Agarosegel für ein Screening nach tTA positiven F1-Foundern.

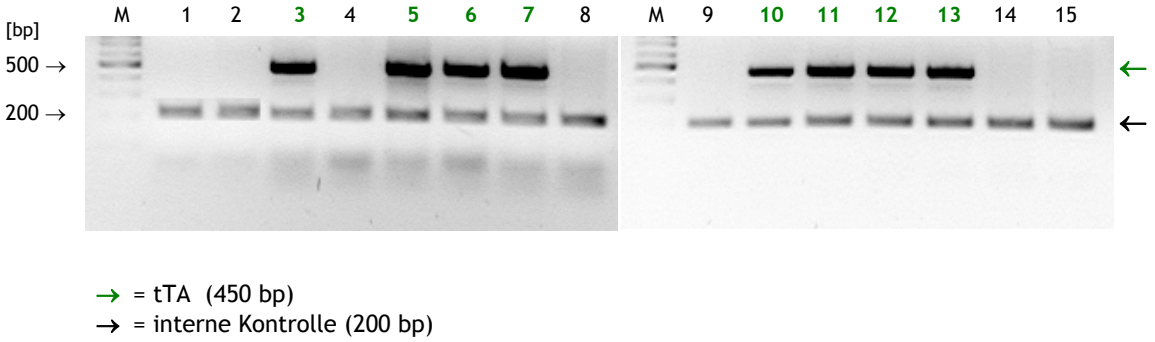


Abbildung 42 Screening nach tTA transgenen Foundern: PCR-Produkte von 15 Nachkommen; genomische DNA der F1-Generation; Primer: IMR856/IMR857 (tTA Transgen) und IMR0015/IMR0016 (interne Kontrolle)

Mäuse, die in beiden PCR Reaktionen eine positive Bande lieferten, wurden als doppelt-transgene F1-Founder identifiziert. Sie wurden entweder für die Weiterzucht oder zur Charakterisierung der Transgen-Expression verwendet.

Insgesamt wurden zwei verschiedene transgene Tet-induzierbare Mauslinien generiert, bei denen sowohl die humane CYP1A1 cDNA Kassette, als auch das Tet-transcriptional Aktivatorprotein (tTA) ins Genom integriert wurde, nämlich die Linien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc).

8.2 Charakterisierung der hCYP1A1 Expression in den transgenen Mauslinien

Die Charakterisierung der beiden transgenen Mauslinien sollte Auskunft über die Expression des transgenen, humanen CYP1A1 auf verschiedenen Ebenen geben. Sie erfolgte auf RNA-Ebene mittels quantitativer Real-time PCR sowie auf Proteinebene mittels Western-Blotting. Auf Aktivitätsebene wurde die spezifische, katalytische CYP1A Aktivität mittels EROD-Assay bestimmt.

8.2.1 Real-time PCR

8.2.1.1 Qualitätskontrolle der für die Real-time PCR präparierten RNA

Da isolierte RNA sehr leicht degradieren kann, wurde zur Qualitätsprüfung ein Aliquot der isolierten RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 43 zeigt ein exemplarisches Beispiel eines RNA-Gels.

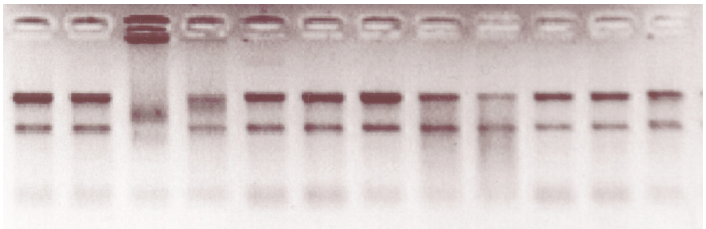


Abbildung 43 Exemplarisches Beispiel aufgetrennter RNA im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel

Für die reverse Transkription wurden ausschließlich Proben verwendet, die im Agarosegel zwei voneinander getrennte, scharfe Banden lieferten. Die obere Bande stellt die 28s, die untere Bande die 18s rRNA dar. Bei den meisten Proben ist, je nach Belichtungszeit, am unteren Bildende auch noch die 5s bzw. 5.8s rRNA schwach zu erkennen. Die dritte Bande von links in Abbildung 43 stellt ein typisches Beispiel für degradierte RNA dar. Solche Proben wurden für die RT-Reaktion verworfen und die Gesamt-RNA wurde aus einem Gewebestück erneut isoliert.

Die isolierte Gesamt-RNA der einzelnen Proben wurde in individuellen RT-Reaktionen zur korrespondierenden cDNA umgeschrieben und für die SYBR-Green Real-time PCR eingesetzt.
Die verwendeten Primer wurden zuvor validiert. Eine nach Beendigung der PCR durchgeführte Schmelzpunktanalyse der Produkte ermöglichte die Überprüfung der Spezifität. Die Schmelzpunktdiagramme für alle verwendeten Primer zeigten keine durch Nebenprodukte wie z.B. Primerdimere oder unspezifische Produkte verursachten Peaks, welche sich in einer Veränderung der Schmelztemperatur, bzw. Generierung zusätzlicher Peaks vor der eigentlichen Schmelztemperatur, äußern. Außerdem wurde bei der Validierungsreaktion die Effizienz der eingesetzten Primerpaare überprüft, welche im Idealfall bei 100 % liegen sollte. Dieser Wert muss bekannt sein, um nach durchgeführter PCR die generierten Rohdaten quantifizieren zu können. Die verwendeten Primerpaare zeigten jeweils eine Effizienz nahe 100 % und liegen damit im erwarteten Bereich. Des weiteren waren die Steigungen in der halblogarithmischen Darstellung der CT-Werte annährend parallel. Somit waren die Primer für eine quantitative Bestimmung der mRNA Expression geeignet.
Die Ergebnisse der Primervalidierung sind im Anhang aufgeführt.

Für die Real-time PCR zur Bestimmung der mRNA Expression des humanen CYP1A1 Transgens wurde aus je drei unterschiedlichen Versuchstieren die RNA aus den Organen Leber, Lunge, Herz, Milz, Magen, Gehirn, Niere und Muskel doppelt-transgenen Founder isoliert und einer RT-Reaktion unterworfen. Die erhaltene cDNA wurde zur Real-time PCR-Reaktion eingesetzt.
Die Real-time PCR wurde für beide Transgen-Linien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J durchgeführt. Für jedes Organ wurden zwei RT-PCR Reaktionen als Duplett durchgeführt: Zum einen zur Detektion der transgenen humanen CYP1A1 mRNA, zum anderen zur quantitativen Erfassung des im Organ endogen vorhandenen CYP1A1 der Maus. Die Expression beider Gene wurde dabei jeweils auf die Expression des Hauskeeping-Gens ß-Actin bezogen.
Von den Organen nicht transgener Wildtyp C57/B6 Tiere wurden ebenfalls Real-Time Reaktionen mit dem Primerpaar „Human CYP1A1“ durchgeführt, denn für die Berechnung der hCYP1A1 Expression in den Organen transgener Tiere muss auch die Expression des hCYP1A1 in den Wildtyp Organen bekannt sein. Da die transgene hCYP1A1 Expression im Vergleich zur Expression im Wildtyp dargestellt wurde, diente der für das jeweilige Wildtyp Organ ermittelte CT-Wert als Referenz (Kontrollwert). Da der humane Primer kein Maus CYP1A1 erkannte, konnte wie erwartet für keine Probe der Wildtyptiere ein CT-Wert für

hCYP1A1 ermittelt werden. Um die erhaltenen Daten der hCYP1A1 transgenen Tiere dennoch quantifizieren zu können, wurde ein CT-Wert für hCYP1A1 von 40.0 für alle Wildtyp Organe angenommen und die Expression in den Organen der transgenen Tiere auf jeweils diesen Kontrollwert bezogen.
Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über die Software „Gene Expression Analysis for iCycler iQ® Real-Time PCR Detection System“, Version 1.10 (BioRad).
Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurde die relative Expression (RE) in den unterschiedlichen Organen logarithmisch aufgetragen.

8.2.1.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

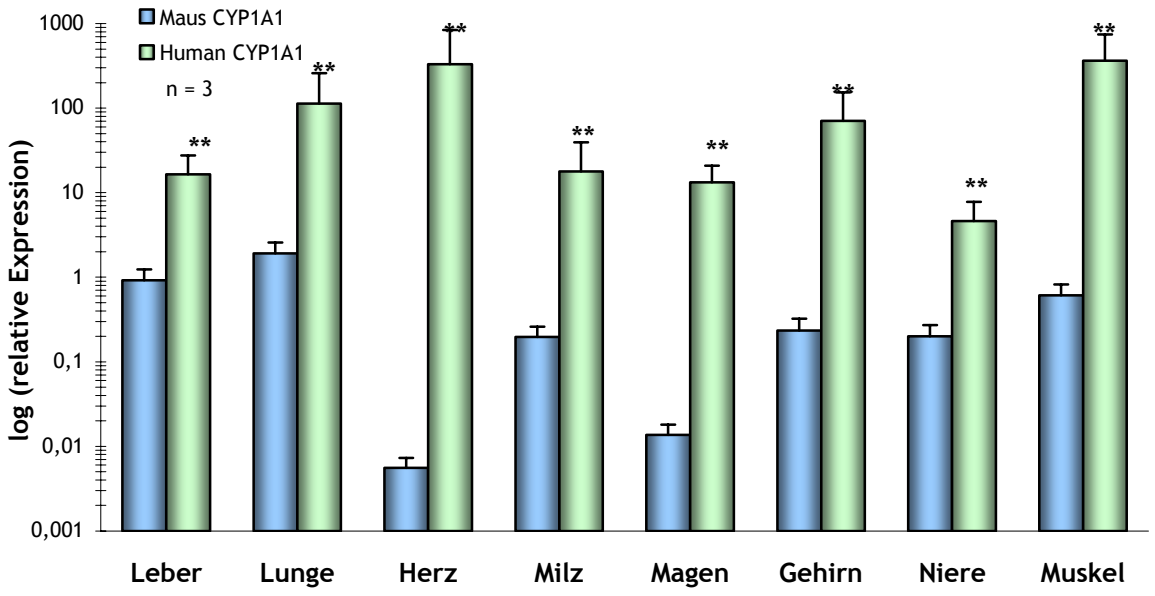


Abbildung 44 Real-time PCR: mRNA Expression von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J); (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

In Abbildung 44 ist die organspezifische mRNA Expression des transgenen, humanen CYP1A1 sowie des Maus CYP1A1 in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV) 3Bjd/J) dargestellt, die mittels quantitativer Real-time PCR erfasst wurde.

Das endogen exprimierte CYP1A1 der Maus wurde im Verhältnis zur Expression des Hauskeeping-Gens ß-Actin in Leber und Lunge in vergleichbarem Maß exprimiert (RE ~1-2). Auffällig ist eine geringe endogene CYP1A1 Expression in Milz, Gehirn, Niere und Muskel (RE ~0.2-0.5), sowie eine sehr geringe endogene Expression im Herz und im Magen (RE ~0.01-0.05).

In allen Organen der transgenen Tiere war die Expression humaner CYP1A1 mRNA im Vergleich zur Wildtyp CYP1A1 mRNA deutlich erhöht. Die geringste Expression wurde mit einer RE von ca. 20 in Niere, Milz, Magen und Leber festgestellt, eine deutlich höhere hCYP1A1 mRNA Expression konnte in Lunge, Herz, Gehirn und im Muskel mit REs zwischen ca. 100 und 600 detektiert werden.

8.2.1.3 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J

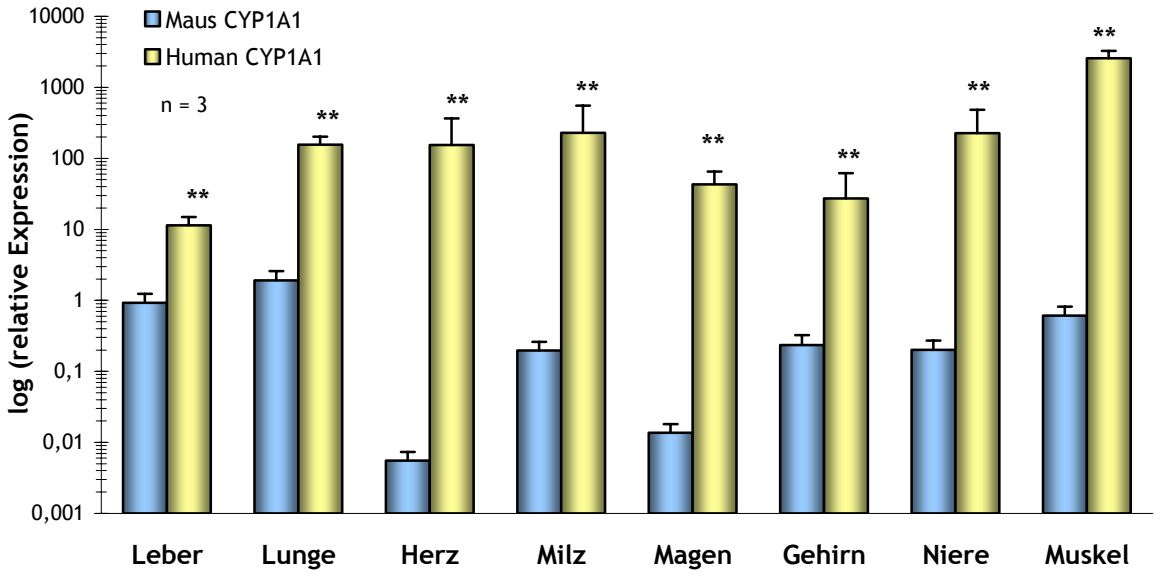


Abbildung 45 Real-time PCR: mRNA Expression von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J; (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Das Diagramm in Abbildung 45 stellt die mittels quantitativer Real-time PCR bestimmte, relative Expression des transgenen, humanen CYP1A1 sowie des Maus CYP1A1 in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J dar.

Die relative mRNA Expression des endogen exprimierten Maus CYP1A1 in diesem Diagramm entspricht der relativen Expression, wie bereits in Abbildung 44 erläutert.
Auch in dieser Mauslinie übersteigt die mRNA Expression des transgenen, humanen CYP1A1 die endogene Maus CYP1A1 Expression in allen untersuchten Organen um ein Vielfaches. Die niedrigste Expression fand sich in der Leber (RE ~10), im Magen und im Gehirn lag die RE bei ~50, in Lunge, Herz, Milz und Niere bei ~120 und im Muskelgewebe sogar bei > 1000.

8.2.1.4 CYP1A1 mRNA Expression in mit TCDD behandeltem Lebergewebe

Zur Ermittlung des maximalen AhR-vermittelten Induktionspotenzials von CYP1A1 wurde Leber RNA aus C57/B6 Mäusen, die zuvor mit 1 µg/kg KG TCDD bzw. DMSO (als Kontrolle), gelöst in Maiskeimöl, für 96 Stunden behandelt worden waren, als Vergleichskontrolle eingesetzt.

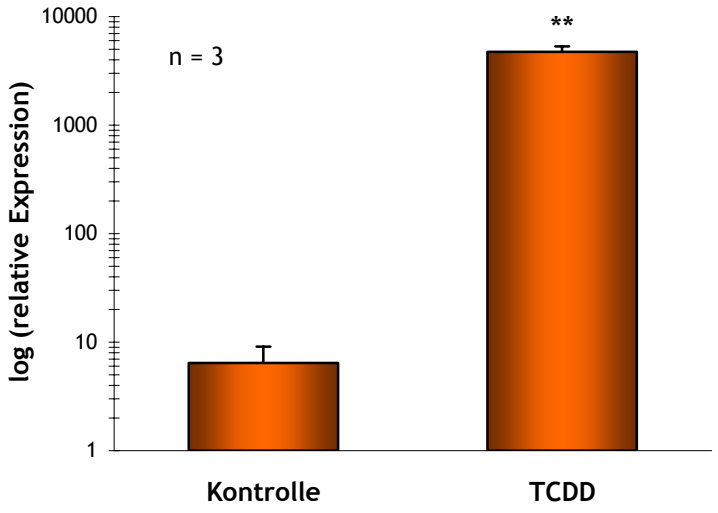


Abbildung 46 Real-time PCR: mRNA Expression von Maus CYP1A1 in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse bzw. in der Kontrolle (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 46 zeigt die mittels Real-time PCR ermittelte CYP1A1 mRNA Expression in der Leber von TCDD behandelten C57/B6 Mäusen, bzw. in der Kontrolle.
Wie zu erwarten war, wurde die CYP1A1 mRNA Expression durch die Behandlung mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden in der Leber der Tiere sehr stark induziert.

Die relative CYP1A1 Expression der behandelten Tiere lag bei ca. 4500, bezogen auf die Expression des Hauskeeping-Gens ß-Actin.

8.2.2 Luciferase-Reportergenassay in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J

Da die transgene Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J ein Luciferase-Reportergen beinhaltet, welches Auskunft über die organspezifische, transgene tTA Expression gibt, wurde in verschiedenen Organen von n = 4 doppelt-transgenen Mäusen deren tTA Reportergenaktivität luminometrisch bestimmt.
Zusätzlich wurde auch die Luciferase-Aktivität in der Leber von Wildtyp Mäusen ermittelt. Diese Proben wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden jeweils 50 µg Proteinhomogenat pro Ansatz eingesetzt.

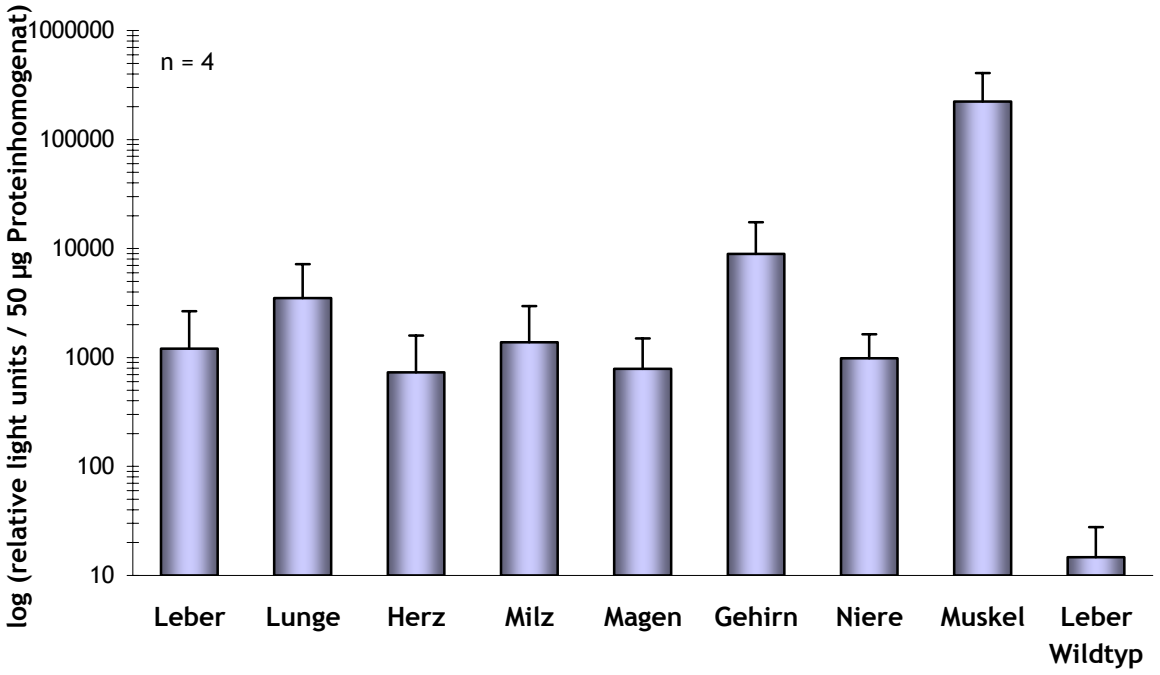


Abbildung 47 Luciferase-Reportergenassay: relative Expression von tTA in verschiedenen Organen der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J sowie in der Leber von Wildtyp C57/B6 Mäusen

In Abbildung 47 ist die relative tTA Expression pro 50 µg Proteinhomogenat in unterschiedlichen Organen der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet tTALuc)1Dgs/J und in der Leber von Wildtyp Mäusen dargestellt. Zur übersichtlicheren Darstellung der Ergebnisse wurden die relativen Lichteinheiten (light units) in den unterschiedlichen Organen logarithmisch aufgetragen.

Verglichen mit der Negativkontrolle (Leber Wildtyp), bei der keine nennenswerte Luciferase-Aktivität festgestellt wurde, konnte in allen Organen der doppelt-transgenen Tiere eine hohe Reportergenaktivität nachgewiesen werden. Sie war mindestens um ca. den Faktor 1000 in den Organen Leber, Herz, Milz, Magen und Niere erhöht. In der Lunge war die Luciferase-Aktivität ca. um Faktor 3000 erhöht. Im Gehirn wurde eine Erhöhung um den Faktor 9000, im Muskel sogar um den Faktor 22.000 gemessen.
Somit kann festgestellt werden, dass mittels Luciferase Reportergenassay die organ-spezifische tTA Expression in n = 4 Tieren der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J nachgewiesen werden konnte.

8.2.3 Western-Blot

Mittels Western-Blot Analyse sollte die Expression des transgenen hCYP1A1 auf Protein-ebene nachgewiesen werden.
Von je einem Teil der entnommenen Organe der doppelt transgenen Tiere wurden Mikrosomen hergestellt. Nach der Bestimmung des Proteingehalts wurden jeweils 50 µg eines Mikrosomenansatzes mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine PVDF Membran geblottet. Mit Hilfe eines spezifischen Anti-CYP1A1 Erstantikörpers und eines Meerrettichperoxidase Zweitantikörpers konnte das immunreaktive CYP1A1 auf der Membran als chemilumineszentes Signal detektiert werden.
Als Positivkontrolle auf jeder Membran dienten jeweils 5 µg Mikrosomen aus mit 1 µg/kg KG für 96 Stunden mit TCDD behandelter C57/B6 Mausleber.

8.2.3.1 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

In Abbildung 48 sind Western Blots von unterschiedlichen Organen verschiedener Tiere der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) dargestellt. Mitgeführt wurden außerdem eine Positiv- (TCDD-behandelte Wildtyp Mausleber), sowie eine Negativkontrolle (Wildtyp Mausleber).

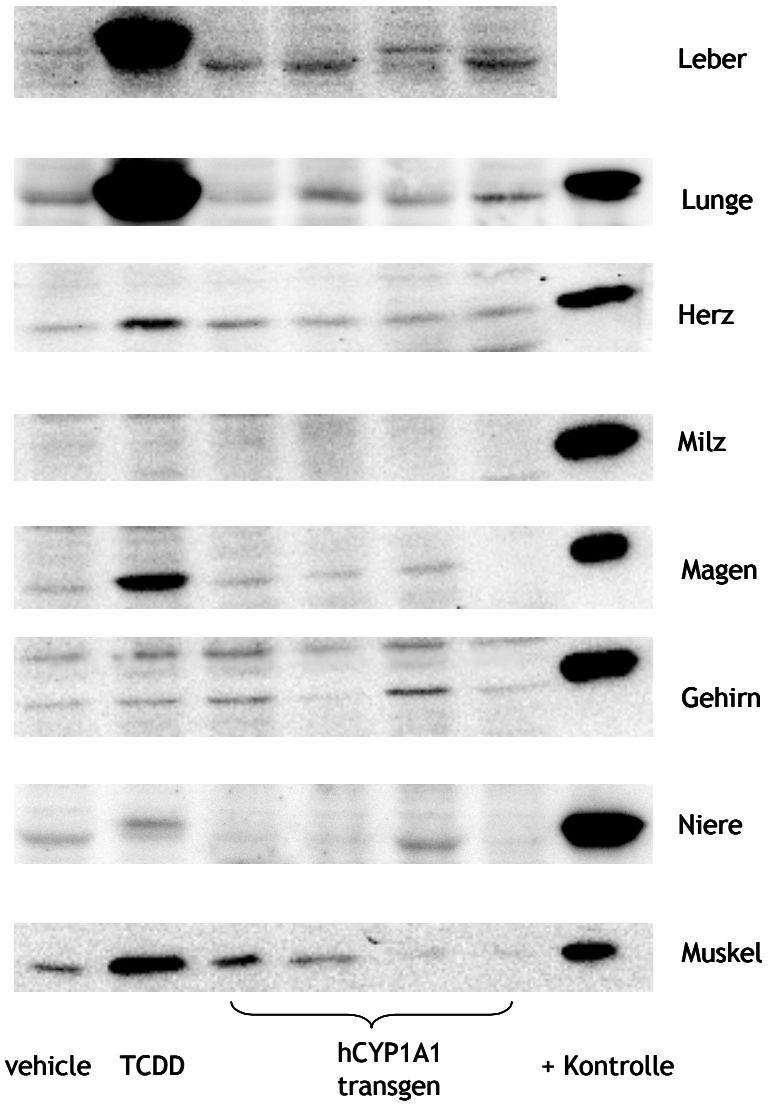


Abbildung 48 Repräsentative Western Blots der CYP1A1 Proteinexpression unterschiedlicher Organe in der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J); + Kontrolle = TCDD behandelte Leber

In Leber und Lunge konnte durch die TCDD Behandlung eine starke CYP1A1 Induktion herbeigeführt werden. Sie äußerte sich als immunreaktive Bande bei einer Größe von ca. 58 kDA auf der Membran. In einem geringen Ausmaß wurde CYP1A1 durch die TCDD Behandlung auch in Herz, Magen uns Muskel induziert.
In den Organen der transgenen Tiere konnten schwache CYP1A1 Banden detektiert werden. Allerdings war die Intensität der Banden verglichen mit der Negativkontrolle nicht nennenswert stärker ausgeprägt und entsprach somit vermutlich der basalen, endogenen Expression.

8.2.3.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J

Abbildung 49 zeigt Western-Blots von unterschiedlichen Organen verschiedener Tiere der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J. Auf jeder Membran wurde außerdem eine Positivkontrolle (TCDD-behandelte Wildtyp Mausleber) mitgeführt.
Wie erwartet, konnten auch bei diesen Blots starke immunreaktive Banden für CYP1A1 bei ca. 58 kDA bei den TCDD-behandelteten Positivkontrollen detektiert werden.
In der Leber der doppelt transgenen Tiere konnte für jede Probe eine schwache Bande nachgewiesen werden. In dieser Linie war auffällig, dass immunreaktive CYP1A1 Banden in einzelnen Organen individueller doppelt-transgener Tiere nachgewiesen werden konnten. Diese Banden wurden allerdings nicht in allen (n = 4) eingesetzten Tieren detektiert, sondern lediglich in einzelnen Fällen. So wurden z.B. CYP1A1 Banden, die sich deutlich von der basalen Expression (Hintergrund) abhoben bei einem Tier in der Niere, bei zwei Tieren im Magen, bei zwei Tieren im Gehirn sowie bei nahezu allen untersuchten Tieren im Herz detektiert.
In den Organen Muskel, Milz und Lunge aller untersuchten Tiere wurde keine transgene Proteinexpression nachgewiesen.

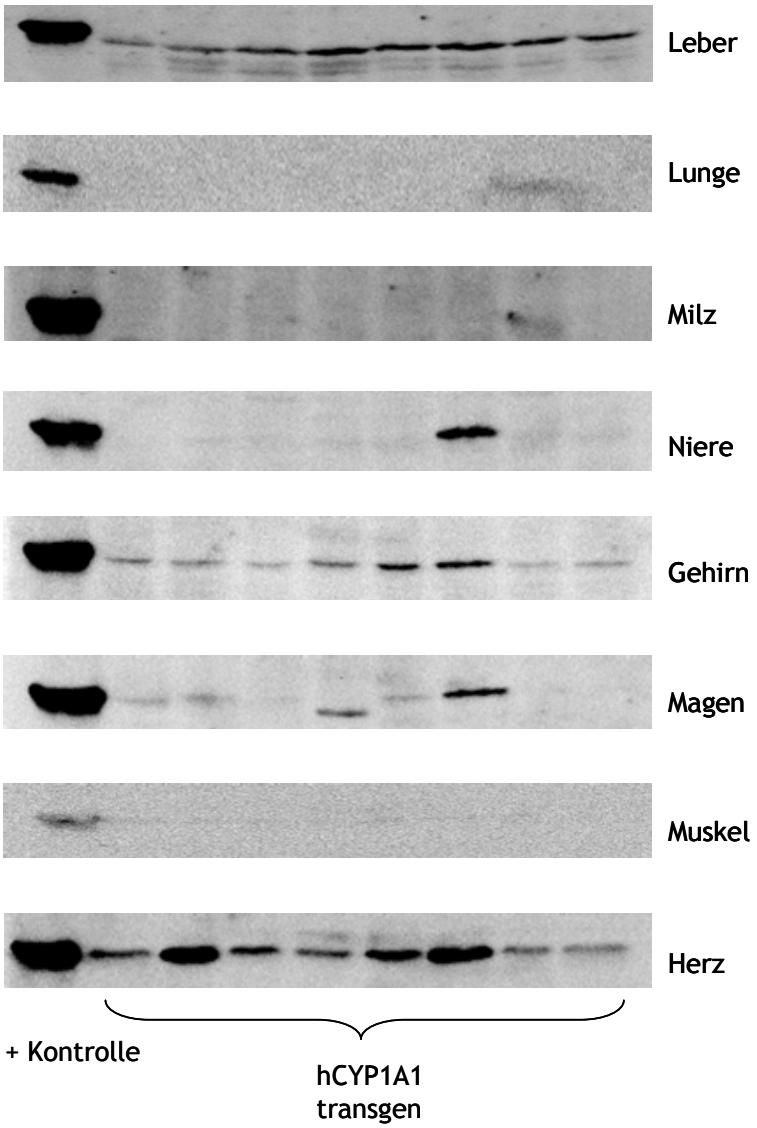


Abbildung 49 Repräsentative Western Blots der CYP1A1 Proteinexpression in unterschiedlichen Organen der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J); + Kontrolle = TCDD behandelte Leber

8.2.4 EROD Assay

Im EROD Assay wird die Metabolismusrate eines von außen zu einem metabolisch aktiven System zugefügten Substrates pro Zeiteinheit bestimmt, nämlich die Umwandlung von nicht-fluoreszierendem 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin. Diese wird spezifisch durch CYP1A Enzyme (als 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase) vermittelt. Insofern gibt dieser Assay Auskunft über die katalytische Aktivität von CYP1A Enzymen in individuellen Proben und ist ein Maß für die CYP1A-Induktion.
Die katalytische Aktivität des humanen CYP1A1 wurde in den doppelt-transgenen Mäusen bestimmt. Als Referenz (Positivkontrolle) zur Bestimmung der EROD Aktivität dienten Mikrosomen aus der Leber von TCDD behandelten C57/B6 Mäusen. Sie waren mit einer Dosis von 1 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden behandelt worden.
Die Durchführung des Assays erfolgte als modifizierte Variante der Methode nach Kennedy im 96 Well System.

8.2.4.1 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J)

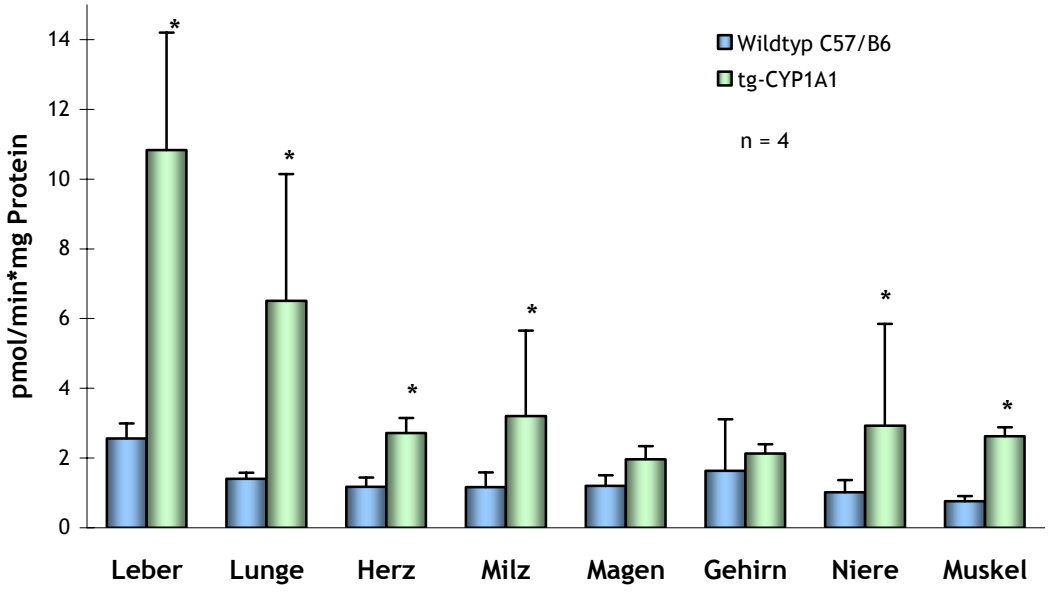


Abbildung 50 katalytische Aktivität von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) im EROD Assay; (* = statistisch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

In Abbildung 50 ist die mittels EROD Assay bestimmte katalytische Aktivität des transgenen, humanen CYP1A1 und von Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) dargestellt.
In allen Organen konnte keine nennenswerte EROD Aktivität nachgewiesen werden. Alle Proben unterschieden sich nur unwesentlich von der basalen Hintergrundaktivität, die in den Wildtyp Tiere bestimmt wurden.
Die EROD Aktivität in Leber und Lunge schien im Vergleich zum Wildtyp erhöht zu sein. Betrachtet man allerdings die spezifische EROD Aktivität nach TCDD Behandlung in der Leber (Abbildung 52), so ist die in Abbildung 50 gemessene Erhöhung vernachlässigbar.
In der untersuchten doppelt transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) wurde trotz der nachgewiesenen Integration des humanen CYP1A1 Transgens ins Mausgenom kein katalytisch aktives, humanes CYP1A1 exprimiert.

8.2.4.2 Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J

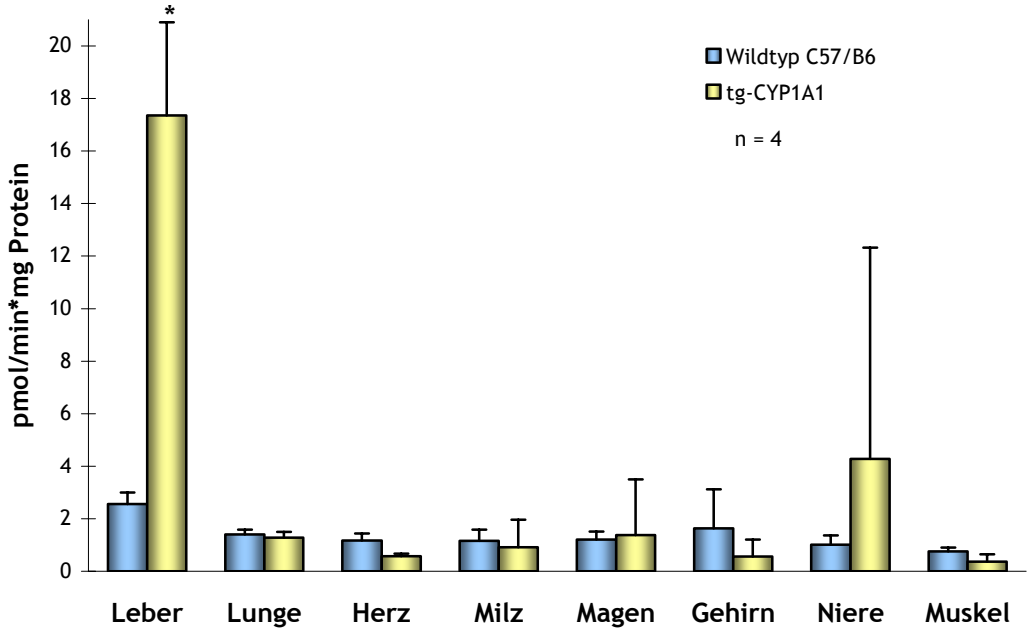


Abbildung 51 Katalytische Aktivität von Human CYP1A1 und Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der doppelt-transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J im EROD Assay; (* = statistisch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 51 zeigt die mittels EROD Assay bestimmte katalytische Aktivität des transgenen, humanen CYP1A1 und von Maus CYP1A1 in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J.
Wie auch bereits in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) beobachtet, unterschied sich die EROD Aktivität in den Organen der Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J nicht wesentlich von der Aktivität im Wildtyp.
Einzig auffällig war die deutlich erhöhte EROD Aktivität (ca. 8-fach) in der Leber der transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings war auch hier nach TCDD Behandlung die EROD Aktivität um mehr als den Faktor 100 erhöht (Abbildung 52). Deswegen kann auch in der doppelt transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet tTALuc)1Dgs/J nicht davon ausgegangen werden, dass nach der Integration des humanen CYP1A1 Transgens ins Mausgenom große Mengen an katalytisch aktivem, humanem CYP1A1 exprimiert werden.

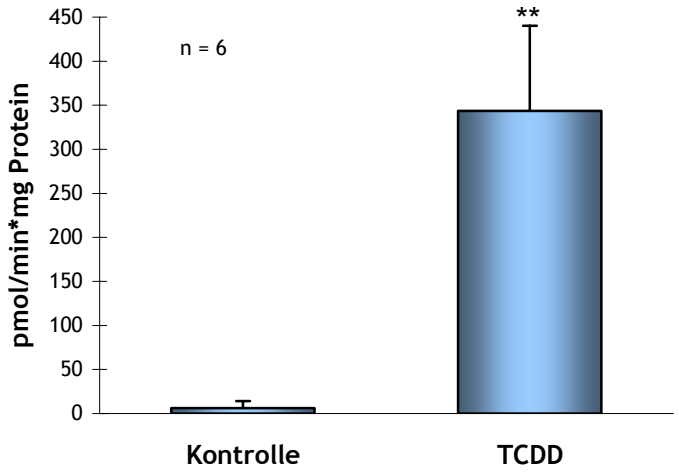


Abbildung 52 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle; (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

8.3 Expression des AhR Repressorproteins in verschiedenen Organen transgener- sowie TCDD behandelter Mäuse

Da bei den doppelt-transgenen hCYP1A1 Mäusen auf mRNA Ebene eine deutliche CYP1A1 Induktion festgestellt werden konnte, die sich allerdings nicht auf Protein- oder Aktivitätsebene widerspiegelte, wurde über eine Beteiligung des AhR Repressors bei der Expression des transgenen hCYP1A1 spekuliert. Um zu untersuchen, ob mit Induktion der CYP1A1 mRNA auch eine Induktion des AhRR korreliert, wurde mit der bereits auf CYP1A1 Expression hin untersuchten Maus RNA auch eine Real-time PCR zur Bestimmung der Maus AhRR Expression in den unterschiedlichen Geweben durchgeführt. Dabei wurde die Expression sowohl in Wildtyp-, als auch in doppelt-transgenen Organen der Tiere untersucht. Außerdem wurde die AhRR Expression auch in der Leber von TCDD behandelten Mäusen (1 µg/kg KG für 96 h), sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR, bzw. in den jeweils zugehörigen Kontrollen bestimmt.

8.3.1 AhRR mRNA Expression in der doppelt transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J und in Wildtyp C57/B6 Mäusen

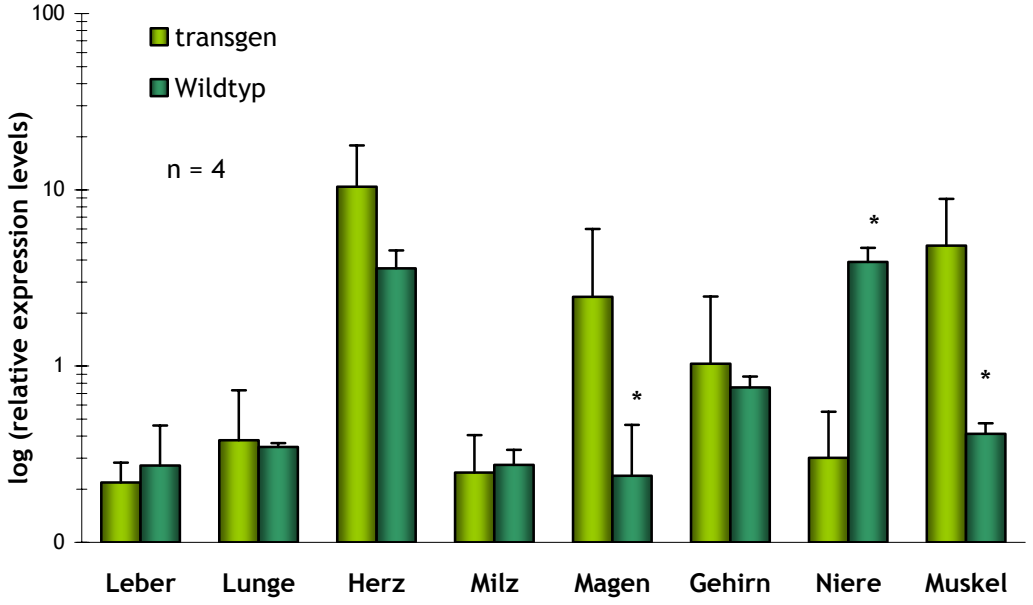


Abbildung 53 Real-time PCR: mRNA Expression von Maus AhRR in verschiedenen Geweben der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J sowie im Wildtyp C57/B6; (* = statistisch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der Real-time PCR zur Quantifizierung der AhRR Expression in unterschiedlichen Organen von Wildtyp C57/B6 Mäusen sowie in der transgenen Mauslinie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J abgebildet.
Mit Ausnahme von Magen, Niere und Muskel korrelierten die Ergebnisse von Wildtyp und transgenen Tieren bzgl. AhRR Expression sehr gut.
In Leber, Lunge und Milz wurde die niedrigste AhRR Expression festgestellt. Deutlich höhere Werte wurden für Magen, Gehirn sowie Muskel transgener Tiere festgestellt. Allerdings war in diesen Organen die AhRR Expression im Wildtyp weitaus schwächer ausgeprägt. Im Herz konnte die höchste AhRR Expression in den untersuchten Organen nachgewiesen werden, dies galt für Wildtyp- und transgene Tiere. Einzig in der Niere war die AhRR Expression in den Wildtyp Tieren im Vergleich mit den transgenen deutlich erhöht.

8.3.2 AhRR mRNA Expression in der transgenen Mauslinie CA-AhR sowie in TCDD behandelten Mäusen

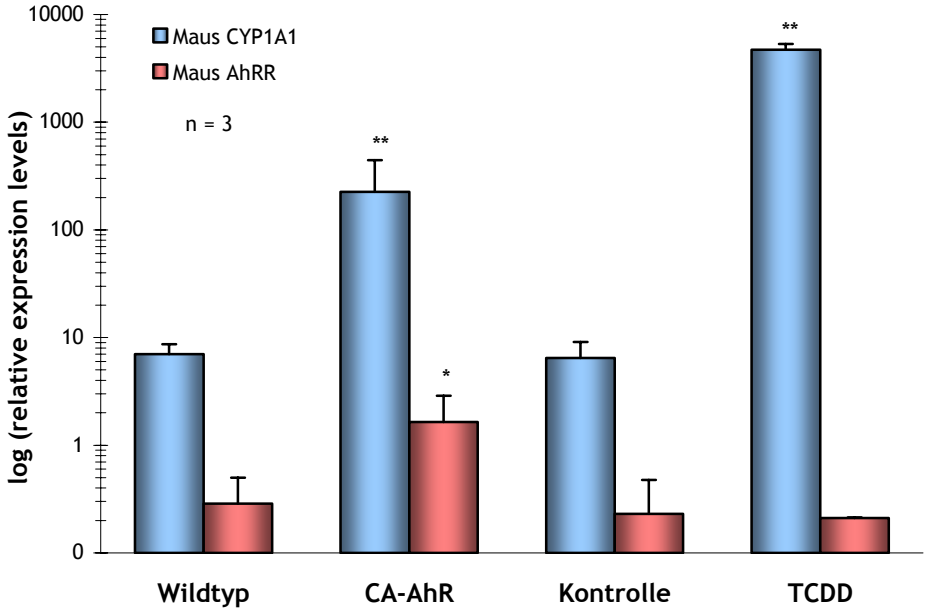


Abbildung 54 Real-time PCR der AhRR mRNA Expression in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR sowie in TCDD behandelten Mäusen (*, ** = statistisch (hoch) signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 54 zeigt die Ergebnisse der Real-time PCR zur Quantifizierung von Maus AhRR CYP1A1 in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR sowie in TCDD behandelten Mäusen.
Im Wildtyp und in der Kontrolle konnten, wie erwartet, lediglich geringe Mengen CYP1A1 (RE ~8) sowie AhRR (RE ~0.3) detektiert werden. In der transgenen CA-AhR Mauslinie wurde eine relative Expression von CYP1A1 von ca. 200 bestimmt, verglichen mit der Expression des Hauskeeping-Gens ß-Actin. Interessanterweise wurde in der Leber dieser Tiere der AhRR im Vergleich zur Kontrolle mehr als fünffach höher exprimiert (RE ~1.6).
Die Expression von CYP1A1 in der TCDD behandelten Probe war erwartungsgemäß um ca. den Faktor 4500 induziert. Erstaunlicherweise entsprach die AhRR Expression in den TCDD behandelten Proben exakt denen der Kontrollen, d.h. durch die TCDD Behandlung konnte nach 96 Stunden keine Induktion des AhRR in der Leber von C57/B6 Mäusen beobachtet werden.
Da in beiden generierten Mauslinien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(TettTALuc)1Dgs/J keine zufrieden stellende Expression bzw. Aktivität des humanen CYP1A1 Transgens nachgewiesen werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen dieser Mauslinien hinsichtlich oxidativem Stress und DNA-Schädigung als erwartete Auswirkungen der Überexpression verzichtet.

8.4 Zusammenhang zwischen TCDD vermittelter CYP1A Induktion und Bildung von ROS bzw. oxidativen DNA-Schäden

Die Kanzerogenität von Dioxinen ist bisher am besten an der „Prototyp“-Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) untersucht worden. Das Hauptzielorgan der kanzerogenen Wirkung von TCDD beim Nager ist die Leber. Da TCDD in vielen gentoxischen Testsystemen keine Wirksamkeit aufweist, wird es allgemein als nicht-gentoxischer Tumorpromotor angesehen. Neuere Ergebnisse zeigten jedoch, dass TCDD in der Leber weiblicher Ratten auch DNA-Schäden verursachen kann.
Während von AhR-regulierten CYPs bekannt ist, dass sie eine zentrale Rolle bei der metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen spielen, ist nach wie vor ungeklärt, ob und wie die Induktion des Fremdstoffmetabolismus zur kanzerogenen Wirkung von TCDD beiträgt.
Es sollte daher die Hypothese überprüft werden, ob TCDD über die durch den AhR vermittelte Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzymen (vor allem von

CYP1A1) *in vivo* im Zielorgan Leber zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt, welche potenziell mutagen sind und die DNA schädigen können.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Assays angewendet:

Zum Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde der 2´,7´-Dihydrodichlorfluoresceindiacetat (H_2DCFDA) Assay etabliert. Er funktioniert nach folgendem Prinzip: In Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies in einer Probe wird von außen zugegebenes, nicht fluoreszierendes H_2DCFDA zum fluoreszierenden DCF. Das gebildete DCF kann in einem Plattenreader nach externer Kalibrierung quantitativ erfasst werden und ist somit ein Maß für die ROS-Bildung.

Ob und in welchem Maße TCDD Schäden an der DNA verursacht, wurde durch Quantifizierung des vorhandenen 8-oxo Guanins in genomischer DNA bestimmt. Bei 8-oxo dG handelt es sich um eine oxidative DNA-Modifikation, die als Marker für oxidative DNA-Schäden verwendet wird. Die Quantifizierung von 8-oxo dG erfolgte mittels HPLC-MS nach vorausgehender enzymatischer Hydrolyse isolierter, genomischer DNA mittels Nuclease P1 und alkalischer Phosphatase.

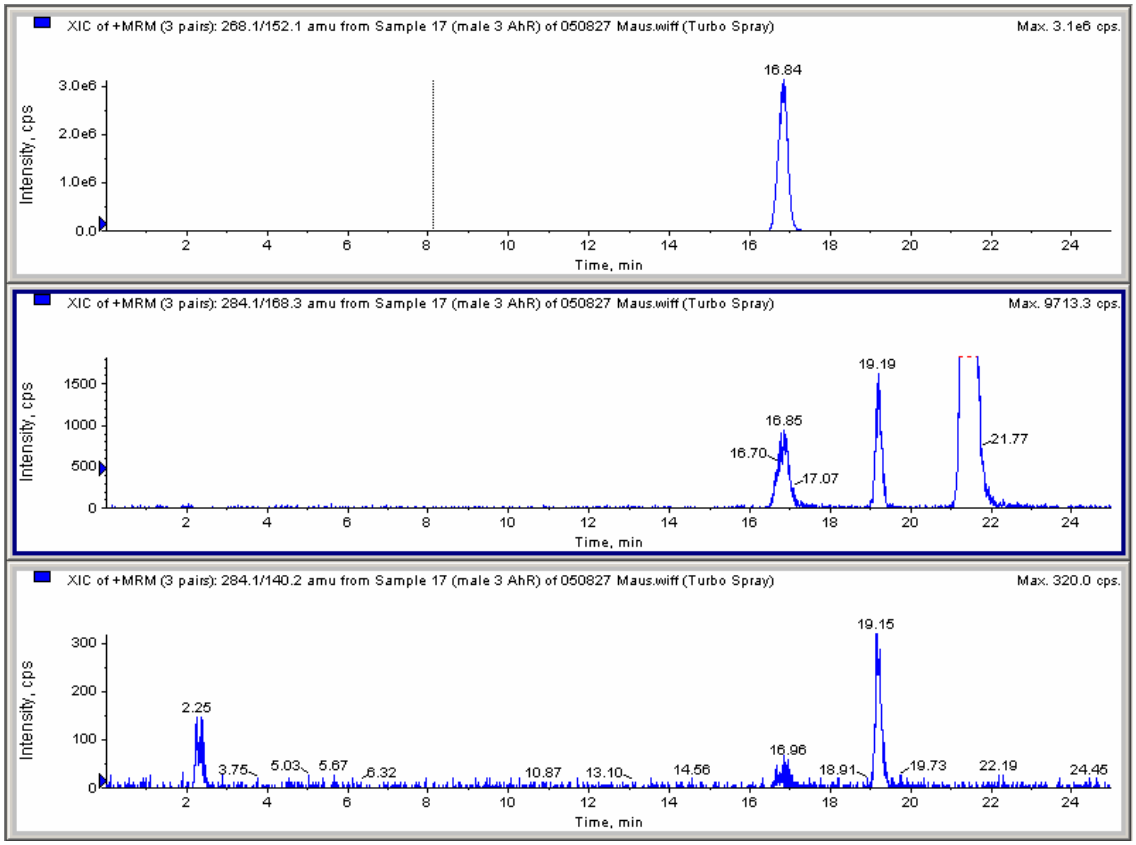


Abbildung 55 Exemplarische Darstellung der drei charakteristischen Massenübergänge bei der Quantifizierung von 8-oxo dG mittels HPLC-MS

Abbildung 55 stellt ein exemplarisches Beispiel der drei zur Quantifizierung von 8-oxo dG notwendigen charakteristischen Massenübergänge dar, welche nach Eintritt des zuvor mittels HPLC aufgetrennten Hydrolysats im Massenspektrometer generiert wurden. Der Peak bei 16.84 min innerhalb des oberen Massenübergangs 268.1/152.1 repräsentiert die Menge an nicht oxidiertem dG innerhalb der Probe. Der Peak bei 19.15 min im unteren Diagramm stellt den Übergang 284.1/140.2 dar, der Auskunft über die vorhandene Menge an 8-oxo dG innerhalb der Probe gibt. Der dritte, mittlere Übergang 284.1/168.3 bei 19.19 min entspricht ebenfalls 8-oxo dG, das allerdings innerhalb des Elektrosprays der HPLC-MS Anlage aus dG gebildet wird.

8.4.1 Maus

In verschiedenen Kanzerogenitätsstudien konnte bereits einen Zusammenhang zwischen Tumorentstehung in der Leber und TCDD Exposition bei der Maus belegt werden [Toth *et al.* 1979; NTP 1982b; Della Porta *et al.* 1987]. Die beobachteten Effekte wurden in beiden Geschlechtern beobachtet. Allerdings wurden in der Studie von Della Porta *et al.* hepatozelluläre Karzinome ausschließlich in männlichen Tieren beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob eine kurzzeitige TCDD Exposition *in vivo* bei männlichen bzw. weiblichen C57/B6 Mäusen im Zielorgan Leber zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt. Des weiteren wurde überprüft, ob als weitere Konsequenz der TCDD-Exposition auch oxidative DNA Schäden nachgewiesen werden können.

Anhand der zur Verfügung gestellten, transgenen Mauslinie CA-AhR, die einen konstitutiv aktiven AhR exprimiert, konnte außerdem die Fragestellung überprüft werden, ob eine aktivierte AhR Genexpressionsbatterie auch ohne die Zugabe von TCDD zum System mit ausschlaggebend für die beobachteten Effekte sein kann.

Zudem wurde von allen CA-AhR Proben die CYP1A1 Proteinexpression mittels Western-Blot Analyse, sowie die katalytische CYP1A Aktivität mittels EROD-Assay bestimmt. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Induktion bzw. die katalytische Aktivität von CYP1A Enzymen mit ROS-Bildung bzw. DNA-Schädigung in den untersuchten Zielorganen einhergeht.

8.4.1.1 H_2DCFDA-Assay

Der H_2DCFDA-Assay wurde mit Mikrosomen aus der Leber von C57/B6 Mäusen durchgeführt. Zum Einsatz kamen Mikrosomen aus TCDD behandelten Tieren (1 µg/kg KG für 96 h), aus der transgenen Mauslinie CA-AhR bzw. den entsprechenden Kontrollen. Der Proteingehalt der Proben war zuvor mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt worden. Die Ergebnisse wurden bei der Maus nach dem Geschlecht getrennt betrachtet.

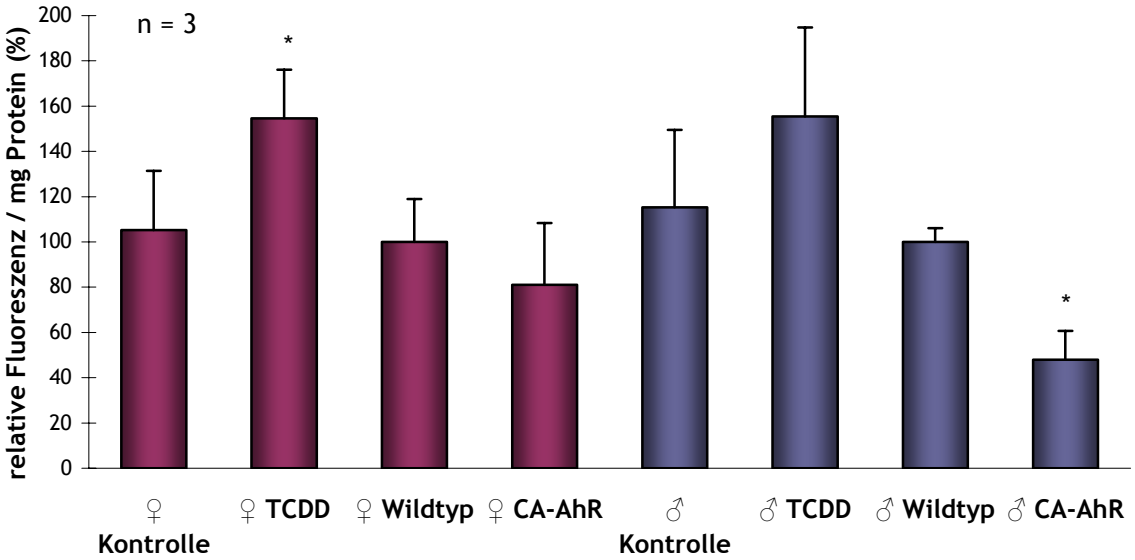


Abbildung 56 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Mikrosomen aus männlicher und weiblicher Mausleber (* = statistisch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse des H_2DCFDA-Assays zur Detektion von ROS in Mikrosomen männlicher und weiblicher Mausleber. Die Ergebnisse wurden in relativer Fluoreszenz pro mg Protein angegeben. Sie beziehen sich dabei auf die relative Fluoreszenz der Wildtyp-Probe, die auf 100 % festgelegt wurde.

Generell konnte in der Leber kein geschlechtsspezifischer Effekt bzgl. ROS Bildung beobachtet werden. Die ermittelten DCF-Werte für männliche bzw. weibliche Tiere unterschieden sich nur unwesentlich voneinander.

Die Kontrolle lag wie der Wildtyp nahe an 100 %. Die Behandlung mit TCDD verursachte sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren eine deutliche Erhöhung der relativen Fluoreszenz, d.h. in den TCDD behandelten Proben lag im Vergleich zur Kontrolle eine

erhöhte ROS Bildung vor. Die statistische Analyse der Daten ergab jedoch lediglich eine signifikante Erhöhung in den TCDD behandelten Proben der weiblichen Tiere.
Interessanterweise konnte dieser Effekt für die transgene Mauslinie CA-AhR nicht bestätigt werden. Die ROS Bildung in der Leber war in diesen Proben im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle erniedrigt, dies galt für männliche und weibliche Tiere. Bei den männlichen Proben war der beobachtete Effekt statistisch signifikant.

8.4.1.2 8-oxo dG

Die Quantifizierung von 8-oxo dG erfolgte aus zuvor isolierter Leber DNA von C57/B6 Mäusen. Zum Einsatz kam genomische DNA aus TCDD behandelten Tieren (1 µg/kg KG für 96 h), deren entsprechende Kontrollen, sowie aus der transgenen Mauslinie CA-AhR bzw. dem entsprechenden Wildtyp.
Wie auch beim H_2DCFDA Assay wurden die Ergebnisse bei der Maus nach Geschlecht getrennt betrachtet.

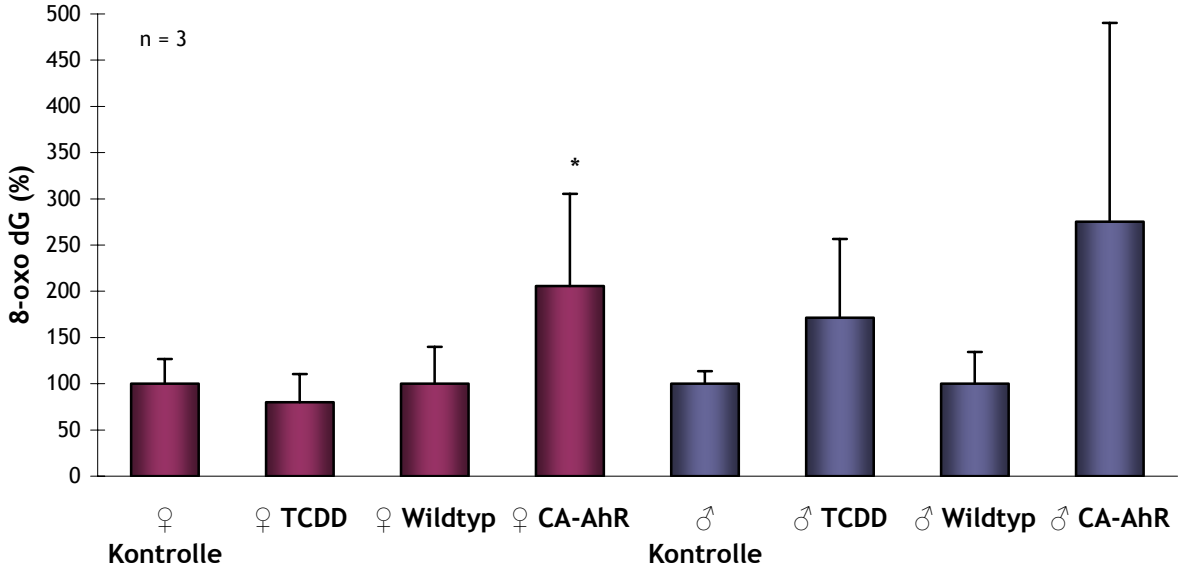


Abbildung 57 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber (* = statistisch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 57 zeigt die Ergebnisse zur Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber. Die Ergebnisse sind als relative Menge an 8-oxo dG im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Für diese Darstellung wurden die 8-oxo Daten zunächst als absolute Menge an vorhandenem 8-oxo dG pro 10^6 dG der DNA berechnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden diese Werte danach auf die basale Schädigung in der Wildtyp-Probe (Kontrolle) bezogen, die auf 100 % festgelegt wurde.

Bei den weiblichen Tieren führte eine Behandlung mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 h in der Leber zu keinem Anstieg des 8-oxo dG Gehaltes. Vielmehr konnte ein leichter, nicht signifikanter Rückgang der 8-oxo dG Menge beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war der 8-oxo dG Gehalt in der Leber weiblicher Tiere der transgenen Mauslinie CA-AhR statistisch signifikant erhöht.

Die TCDD Behandlung verursachte bei den männlichen Tieren einen erhöhten, allerdings nicht signifikanten Anstieg der 8-oxo dG Menge in deren DNA, verglichen mit der zugehörigen Kontrolle. Noch deutlicher erhöht als bei den Weibchen war der 8-oxo dG Gehalt in der Leber der männlichen CA-AhR Mäuse. Trotz der hohen Standardabweichung, bedingt durch die Individualität der verschiedenen Tiere, war der ermittelte Wert statistisch signifikant erhöht.

8.4.1.3 EROD

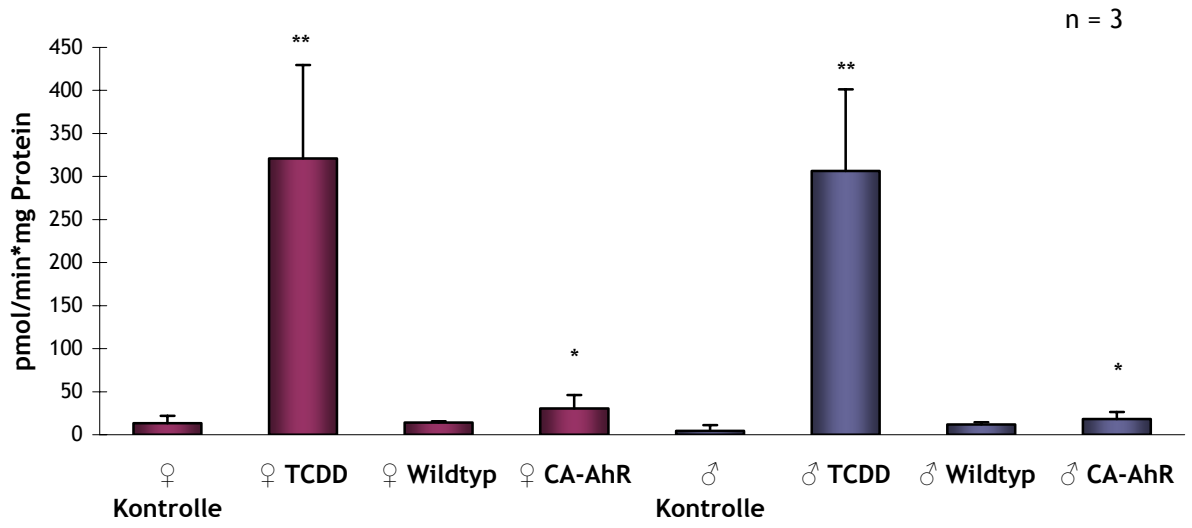


Abbildung 58 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR bzw. im Wildtyp; (*, ** = statistisch (hoch) signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Abbildung 58 zeigt die spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h), in der Kontrolle sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR und in der Wildtyp Kontrolle.
Wie erwartet wurde durch die Behandlung der Tiere mit TCDD eine sehr starke Induktion von CYP1A1 verursacht, die sich bei beiden Geschlechtern in einem hoch signifikanten Anstieg der EROD Aktivität im Bezug auf die Kontrolle äußerte.
In der transgenen Mauslinie CA-AhR war die EROD-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle auch signifikant erhöht, dennoch entsprach die absolute Aktivität mit einer gemessenen EROD von ~30 pmol/min*mg Protein bei den weiblichen Tieren nur etwa einem Zehntel des nach TCDD Behandlung in der Leber der Tiere erreichten Wertes. Bei den männlichen Tieren war die Aktivität mit einer gemessenen EROD von nur ~20 pmol/min*mg Protein noch geringer als bei den Weibchen.

8.4.1.4 Western-Blot

Abbildung 59 zeigt repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in den Kontrollen sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR.

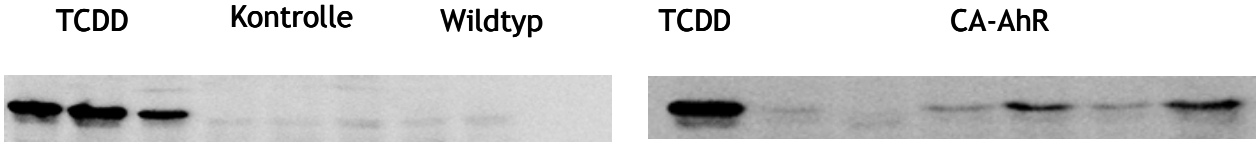


Abbildung 59 Repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber TCDD behandelter C57/B6 Mäuse (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle und im Wildtyp, sowie in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR

Wie erwartet, konnten auch auf Proteinebene starke immunreaktive Banden für CYP1A1 bei ca. 58 kDA bei den TCDD behandelteten Proben detektiert werden. In den Wildtyp Proben bzw. den Kontrollen wurde, ebenfalls erwartungsgemäß, kein immunreaktives CYP1A1 Protein nachgewiesen.

Die Ergebnisse für die transgene Mauslinie CA-AhR war nicht bei allen Proben eindeutig: Die CYP1A1 Proteinexpression erschien innerhalb verschiedener Individuen der Linie extrem variabel. So konnte bei einigen Tieren eine deutliche CYP1A1 immunreaktive Bande bei ca. 58 kDA detektiert werden. Allerdings waren deren detektierte Banden nicht vergleichbar mir denen der TCDD behandelten Tiere, die im Vergleich wesentlich stärkere Intensitäten lieferten. Bei anderen Tieren innerhalb der CA-AhR Line jedoch waren nur schwache bis sehr schwache CYP1A1 Banden zu erkennen.

8.4.2 Ratte

Wie bereits für die Maus geschildert, konnte auch für die Ratte in verschiedenen Kanzerogenitätsstudien ein Zusammenhang zwischen Tumorentstehung in der Leber und TCDD Exposition belegt werden [van Miller *et al*. 1977; Kociba *et al*. 1978; NTP 1982a; NTP 2006]. Die Tumorentstehung wurde generell in beiden Geschlechtern beobachtet. Es gibt allerdings gute Hinweise darauf, dass die 8-oxo dG Gehalte nach TCDD Exposition bei weiblichen Ratten höher sind als in den entsprechenden männlichen Tieren [Wyde *et al*. 2001b].

Es sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Kurzzeit-Exposition mit TCDD *in vivo* bei männlichen bzw. weiblichen Sprague-Dawley Ratten im Zielorgan Leber zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt. Des weiteren wurde überprüft, ob als weitere Konsequenz der kurzzeitigen TCDD-Exposition auch oxidative DNA Schäden nachgewiesen werden können.

Außerdem wurde, analog zu den Versuchen an der Maus, von allen Proben die CYP1A1 Proteinexpression mittels Western-Blot Analyse, sowie die katalytische CYP1A Aktivität mittels EROD-Assay bestimmt. Dadurch sollte auch für die Ratte geklärt werden, ob die Induktion bzw. die katalytische Aktivität von CYP1A Enzymen mit ROS-Bildung bzw. DNA-Schädigung in den untersuchten Zielorganen einhergeht.

8.4.2.1 H_2DCFDA-Assay

Der H_2DCFDA-Assay wurde mit Mikrosomen aus der Leber von Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Zum Einsatz kamen Mikrosomen aus TCDD behandelten Tieren. Sie waren entweder mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 h oder mit 10 µg/kg KG TCDD für 14 Tage behandelt worden. Neben den TCDD behandelten Proben wurden die entsprechenden Kontrollen mitgeführt. Der Proteingehalt der Proben war zuvor mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt worden. Die Ergebnisse wurden auch bei der Ratte nach dem Geschlecht getrennt betrachtet.

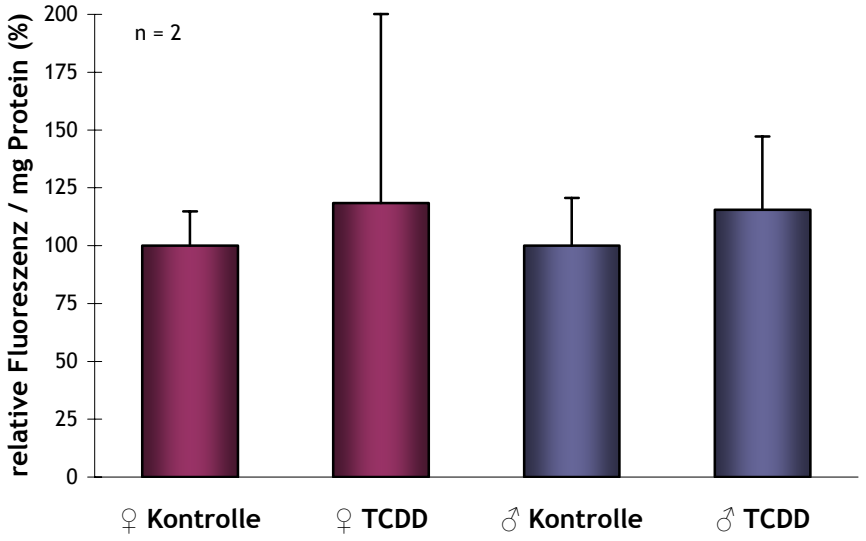


Abbildung 60 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten; TCDD Dosis = 1 µg/kg KG für 96 h

Abbildung 60 zeigt die Ergebnisse des H_2DCFDA-Assays zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten, die mit einer TCDD Dosis von 1 µg/kg KG für 96 h behandelt worden waren.

Die Ergebnisse wurden in relativer Fluoreszenz pro mg Protein angegeben. Sie beziehen sich dabei auf die relative Fluoreszenz der Kontrolle, die auf 100 % festgelegt wurde. Tendenziell wurde ein geringer Anstieg der Fluoreszenz und somit der ROS in den behandelten Tieren detektiert. Weder in den Proben der männlichen, noch in denen der weiblichen Ratten konnte die Behandlung mit 1 µg/kg KG TCDD einen signifikanten Anstieg der ROS hervorrufen.

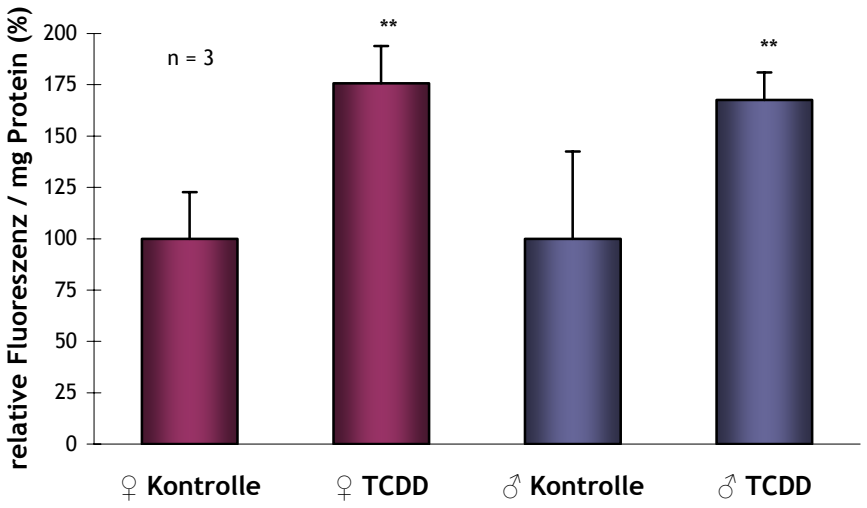


Abbildung 61 H_2DCFDA-Assay zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten; TCDD Dosis = 10 µg/kg KG für 14 Tage; (** = hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

In Abbildung 61 sind die Ergebnisse des H_2DCFDA-Assays zur Detektion von ROS in Lebermikrosomen männlicher und weiblicher Sprague-Dawley Ratten dargestellt, die mit einer TCDD Dosis von 10 µg/kg KG für 14 Tage behandelt worden waren.
Im Gegensatz zu Abbildung 60 zeigt sich bei einer eingesetzten Dosis von 10 µg/kg KG TCDD für 14 Tage ein hoch signifikanter Anstieg der ROS Bildung in den behandelten Tieren. Dies konnte sowohl für männliche als auch für weibliche Tiere beobachtet werden.

8.4.2.2 8-oxo dG

Die Quantifizierung von 8-oxo dG erfolgte aus zuvor isolierter Leber DNA von Sprague-Dawley Ratten. Zum Einsatz kam genomische DNA aus TCDD behandelten Tieren. Sie waren mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 h bzw. mit 10 µg/kg KG TCDD für 14 Tage behandelt worden. Neben den TCDD behandelten Proben wurden die entsprechenden Kontrollen mitgeführt. Wie auch beim H_2DCFDA Assay wurden die Ergebnisse bei der Ratte nach Geschlecht getrennt betrachtet.
Die Ergebnisse sind als relativ vorhandene Menge an 8-oxo dG in der Probe im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Für diese Darstellung wurden die 8-oxo Daten zunächst als absolute

Menge an vorhandenem 8-oxo dG pro 10^6 dG der DNA berechnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden diese Werte danach auf die basale Schädigung in der Wildtyp-Probe (Kontrolle) bezogen, die auf 100 % festgelegt wurde.

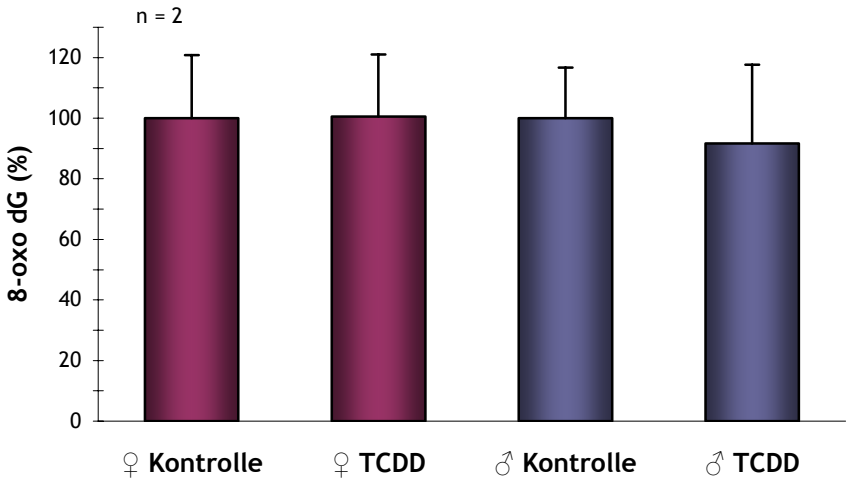


Abbildung 62 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber; TCDD Dosis = 1 µg/kg KG für 96 h

Abbildung 62 zeigt die Ergebnisse zur Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber, die mit einer TCDD Dosis von 1 µg/kg KG für 96 h behandelt worden war.

Weder in den männlichen, noch in den weiblichen Tieren verursachte die Behandlung mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 h einen Anstieg des 8-oxo dG Gehaltes in der DNA. Bei den männlichen Tieren konnte sogar in der Behandlungsgruppe ein leichter Rückgang der 8-oxo dG Menge festgestellt werden, welcher allerdings nicht signifikant war.

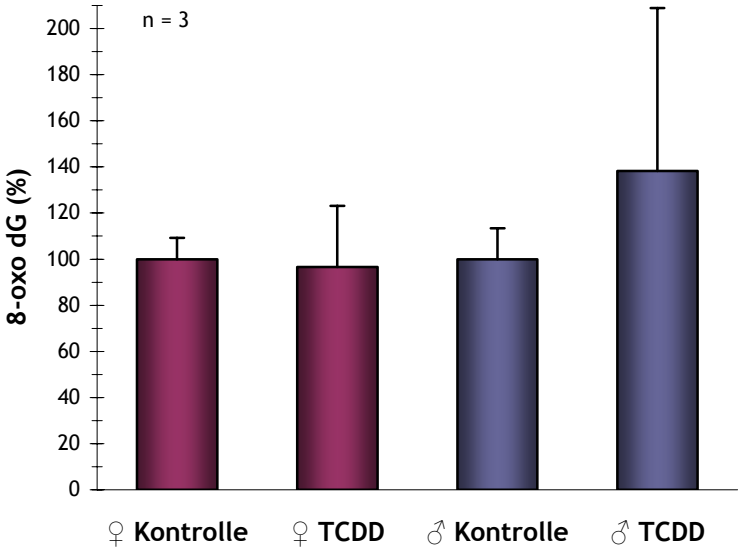


Abbildung 63 Quantifizierung von 8-oxo dG in genomischer DNA aus männlicher und weiblicher Mausleber; TCDD-Dosis = 10 µg/kg KG für 14 Tage

Auch die Behandlung mit 10 µg/kg KG TCDD für 14 Tage steigerte nicht den 8-oxo dG Anteil in der genomischen DNA der Tiere, wie in Abbildung 63 zu sehen ist. Bei den weiblichen Tieren blieb der 8-oxo dG Gehalt nach Behandlung auf nahezu gleichem Level, bei den Männchen wurde ein leichter Anstieg festgestellt, der allerdings, bedingt durch die hohe Standardabweichung, nicht signifikant war.

8.4.2.3 EROD

In Abbildung 64 und Abbildung 65 sind die spezifischen EROD Aktivitäten in der Leber der mit TCDD behandelten Sprague-Dawley Ratten bzw. in den zugehörigen Kontrollen dargestellt.

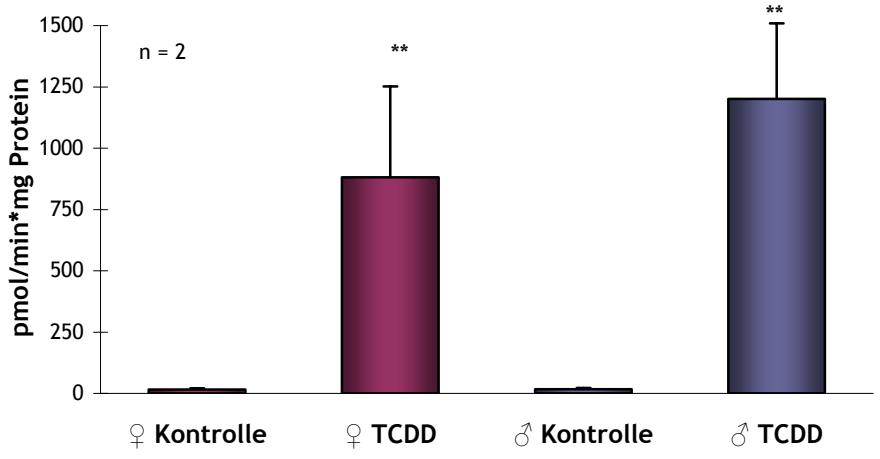


Abbildung 64 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten (1 µg/kg KG für 96 h) bzw. in der Kontrolle (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

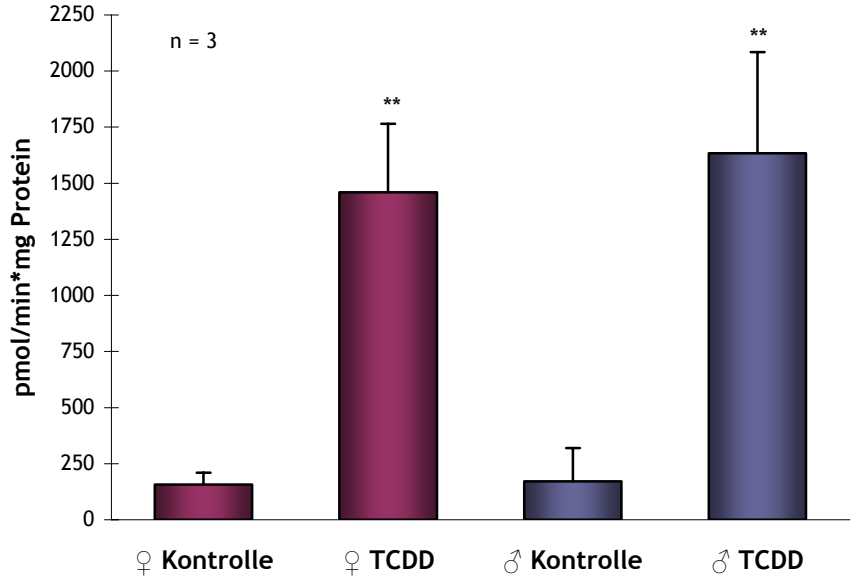


Abbildung 65 Spezifische EROD-Aktivität in der Leber TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten (10 µg/kg KG für 14 Tage) bzw. in der Kontrolle (** = statistisch hoch signifikant; ungepaarter t-Test; one-tail p-value)

Wie erwartet wurde sowohl durch die Behandlung mit 1 µg/kg KG TCDD für 96 h, als auch durch die Behandlung mit 10 µg/kg KG für 14 Tage eine sehr starke Induktion von CYP1A1 verursacht, die sich in beiden Dosisgruppen bei beiden Geschlechtern in einem hoch signifikanten Anstieg der EROD Aktivität im Bezug auf die Kontrolle äußerte.

8.4.2.4 Western-Blot

Abbildung 66 zeigt repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten und in den Kontrollen.

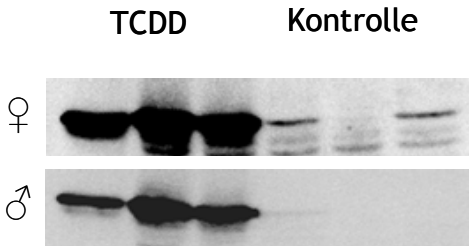


Abbildung 66 repräsentative Western-Blots der CYP1A1 Proteinexpression in der Leber männlicher und weiblicher, TCDD behandelter Sprague-Dawley Ratten bzw. in der Kontrolle

Auch auf Proteinebene konnten starke immunreaktive Banden für CYP1A1 bei ca. 58 kDA bei den TCDD-behandelteten Proben detektiert werden. In den Kontrollen wurden, ebenfalls erwartungsgemäß, nur sehr schwache immunreaktive CYP1A1 Banden nachgewiesen.
Die Intensität der Banden nach TCDD Behandlung war im Vergleich bei den weiblichen Proben bei gleicher eingesetzter Proteinmenge stärker ausgeprägt als bei den männlichen Tieren.

8.4.3 Analyse des ROS Bildungspotenzials individueller CYPs in Supersomes™

Supersomes™ sind kommerziell erhältliche Mikrosomen aus Baculovirus infizierten Insektenzellen. Die Infektion bewirkt die rekombinante Expression einer cDNA eines individuellen Cytochrom P450 Enzyms.
Es sollte mit Hilfe der Supersomes™ die Frage der relativen ROS-Bildungsfähigkeit einzelner CYP Enzyme mittels H_2DCFDA-Assay geklärt werden. Die Induktion von CYPs mittels AhR-Agonisten (z.B. TCDD) induziert stets alle CYPs der AhR Genbatterie. Durch Verwendung von Supersomes die individuelle CYPs exprimieren, konnte dieser Effekt ausgeschlossen und das Verhalten des einzelnen CYP Enzyms betrachtet werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob ausgewählte Testsubstanzen evtl. durch Entkopplungsmechanismen am aktiven Enzym, die ROS-Bildung einzelner CYP-Enzyme innerhalb des Supersomes-Systems beeinflussen. Als Testsubstanzen wurden folgende Stoffe eingesetzt:
1 nM TCDD , 10 µM Benzo[a]pyren, 100 µM 8-Methoxypsoralen, 100 nM 17ß-Estradiol sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle.
Im H_2DCFDA-Assay wurden die folgenden Supersomes™ untersucht: Ratte CYP1A1, Ratte CYP1A2, Human CYP1A1, Human CYP1A2, Human CYP1B1 sowie Kontroll-Supersomes (von nicht Baculovirus-infizierten Insektenzellen). Mit Ausnahme der Kontrolle coexprimieren alle anderen Supersomes™ zusätzlich eine rekombinante CYP Oxidoreduktase.

In Abbildung 67 ist das ROS Bildungspotenzial individueller, isolierter CYPs in Supersomes™, mit und ohne Zugabe ausgewählter Substanzen, als Balkendiagramm abgebildet. Die zugrunde liegende DCF-Bildung wurde in pmol/min*pmol CYP im Diagramm dargestellt. Die Beschriftung findet sich auf der linken y-Achse.
Zusätzlich zeigt Abbildung 67 auch die individuelle, ebenfalls rekombinant exprimierte CYP Reduktaseaktivität in den individuellen Supersomes™ als Punktdiagramm. Die CYP Reduktaseaktivität wurde in nmol/min*pmol CYP ausgedrückt und ist im Diagramm auf der rechten y-Achse dargestellt.

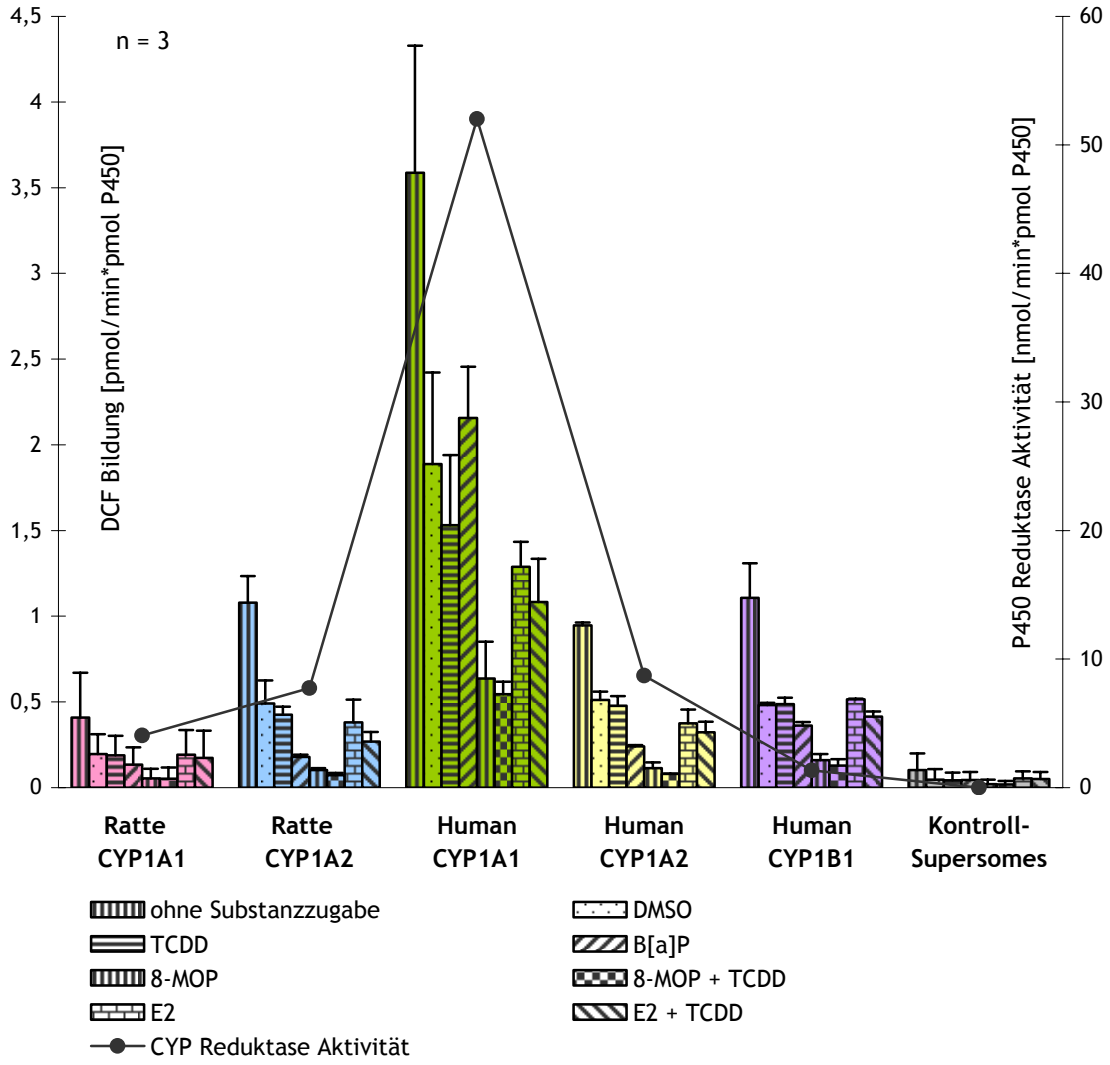


Abbildung 67 H_2DCFDA-Assay zur Bestimmung des ROS Bildungspotenzials individueller, isolierter CYPs in Supersomes™

Betrachtet man die absolute ROS Bildungsmenge pro eingesetztem pmol CYP ohne die Zugabe weiterer Substanzen, ergibt sich folgendes Ergebnis: Die höchste ROS vermittelte DCF Fluoreszenz wurde in den Human CYP1A1 Supersomes™ gemessen. Deutlich geringere DCF Werte wurden für Human CYP1A2, Human CYP1B1 sowie für Ratte CYP1A2 detektiert. Neben den Kontroll-Supersomes™, in denen nahezu keine Fluoreszenz nachgewiesen wurde, war die DCF Bildung in den Ratte CYP1A1 Supersomes am geringsten.

Das ROS Bildungspotenzial der einzelnen CYPs wurde durch die Zugabe von DMSO als Lösungsmittel geringer. Dies war für alle zum System zugefügten Substanzen (die alle in DMSO gelöst wurden) bei allen untersuchten CYPs der Fall.

Die Zugabe von 1 nM TCDD zum System verursachte bei keinem Reaktionsansatz eine Zunahme von ROS. Mit Ausnahme der human CYP1B1 Supersomes™, in denen die gebildete ROS Menge im Vergleich zur DMSO Kontrolle annähernd konstant blieb, konnte bei allen anderen CYPs ein leichter Rückgang der Fluoreszenz beobachtet werden.

Benzo[a]pyren ist sowohl ein Induktor, als auch ein Substrat für CYP1A1. Nach der Zugabe von 10 µM Benzo[a]pyren zu den Supersomes™ wurde eine Erhöhung des ROS Levels lediglich in den humanen CYP1A1 Supersomes™ festgestellt. In allen anderen untersuchten Proben war die Fluoreszenz in Bezug auf die DMSO Kontrolle zum Teil deutlich erniedrigt.

Der selektive CYP1A Inhibitor 8-Methoxypsoralen (8-MOP) wurde in einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben und bewirkte bei allen untersuchten CYP Enzymen eine sehr starke Verringerung der gemessen ROS-Levels. In Kombination mit zusätzlicher Zugabe von 1 nM TCDD bewirkte 8-MOP bei allen CYPs eine noch stärkere Verringerung der gemessenen Fluoreszenz.

Auch 17ß-Estradiol bewirkte in einer eingesetzten Endkonzentration von 100 nM eine leichte Reduktion der gemessenen ROS Levels in allen untersuchten Supersomes™. Auch hier konnte nach Kombination von 1 nM TCDD mit 17ß-Estradiol ein weiterer leichter Rückgang der ROS Bildung festgestellt werden.

Die detektierte ROS Bildung in den Kontroll-Supersomes™, die weder CYP noch CYP Reduktase rekombinant exprimieren, lagen alle nahe am Nullwert und unterschieden sich somit in Bezug auf ROS Bildung deutlich von den CYP-exprimierenden Supersomes.

Betrachtet man die CYP Reduktase Aktivität in den individuellen Supersomes™, so fällt auf, dass in den Human CYP1A1 Supersomes™, in denen die höchsten ROS Gehalte nachgewiesen wurden, auch mit Abstand die höchste CYP Reduktase-Aktivität pro eingesetztem pmol CYP vorhanden ist. Es scheint, mit Ausnahme bei den Human CYP1B1 Supersomes™, als ob die CYP Reduktase Aktivität in Korrelation mit der detektierten ROS Menge stehen könnte.

Mittels EROD-Assay sollte zudem geklärt werden, ob die katalytische Aktivität der rekombinant exprimierten CYP Enzyme mit der ROS-Bildung in den untersuchten Supersomes™ einhergeht.

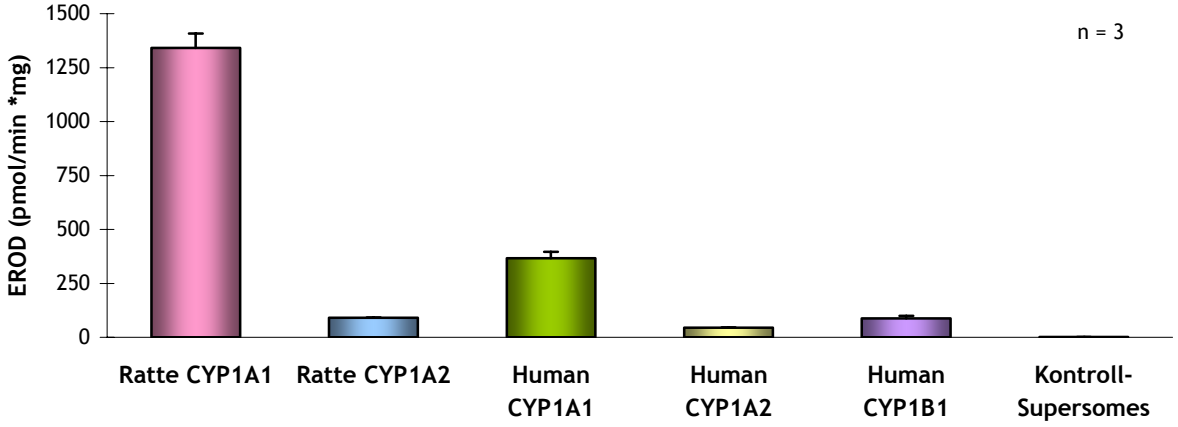


Abbildung 68 Spezifische EROD-Aktivität in Supersomes™

Interessanterweise wurde die mit Abstand höchste EROD-Aktivität in den Ratte CYP1A1 Supersomes™ gemessen. Sie war vergleichbar mit Aktivitäten, die nach TCDD Behandlung erzielt werden. Allerdings war das ROS Bildungspotenzial in genau diesen Supersomes™ am geringsten. Die katalytischen Aktivitäten der Ratte CYP1A2-, Human CYP1A1-, CYP1A2- und CYP1B1 Supersomes™ waren zwar deutlich geringer als die von Ratte CYP1A1, stimmten aber recht gut mit den ermittelten ROS Bildungsraten der einzelnen Enzyme überein.

8.4.4 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der Leber von TCDD behandelten- und transgenen CA-AhR Mäusen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse von kommerziell erhältlichen cDNA-Arrays, welche die Genexpression analysieren, durchgeführt. Der GEArray™ Q Series gene expression Array „Stress and Toxicity“ (Superarray), der in dieser Arbeit verwendet wurde, beinhaltet 96 Fragmente von Genen die an Stress- und Toxifizierungsprozessen beteiligt sind und zudem mehrfach vorhandene cDNA Fragmente von verschiedenen Hauskeeping-Genen. Die Anordnung der Gene auf der Membran ist im Anhang aufgeführt. Ebenfalls im Anhang befindet sich eine Liste aller Gene, die auf dem Array gespottet sind und die mit Hilfe des Arrays untersucht wurden.
Für die Arrays wurde qualitativ hochwertige Gesamt RNA aus der Leber von Mäusen eingesetzt. Zur Überprüfung der RNA Qualität wurden die einzelnen Proben mit Hilfe des Gerätes Bioanalyzer (Agilent) überprüft. Hierbei handelt es sich um eine auf der Elektrophorese basierende Technologie, die Auskunft über Verunreinigungen oder Degradierung der RNA gibt. Die Bioanalyzer Ergebnisse sind exemplarisch im Anhang aufgeführt.
Die Arrays wurden mit folgenden Proben durchgeführt: Eine Gruppe von C57/B6 Mäusen (n = 3) war mit 1 µg/kg KG TCDD für 48 Stunden behandelt worden. Die Genexpression wurde mit der zugehörigen Kontrolle verglichen. Dafür wurden Mäuse verwendet, die lediglich mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt worden waren. In der zweiten Gruppe wurde die Genexpression in der transgenen Mauslinie CA-AhR (n = 3), die einen konstitutiv aktiven AhR exprimiert, mit entsprechenden Wildtyp C57/B6 Mäusen verglichen.

In Abbildung 69 sind repräsentative cDNA Membranen des GEArray™ Q Series gene expression Arrays „Stress and Toxicity“ unterschiedlich behandelter Proben dargestellt. Sie zeigen die mittels Chemilumineszenz detektierten Spotintensitäten einer TCDD behandelten Probe und einer entsprechenden Kontrolle, sowie Arrays der transgenen Mauslinie CA-AhR und der entsprechenden Wildtyp Kontrolle. Auf den Membranen wurden jeweils die Spots von CYP1A1 und CYP1A2 als Markergene gekennzeichnet.

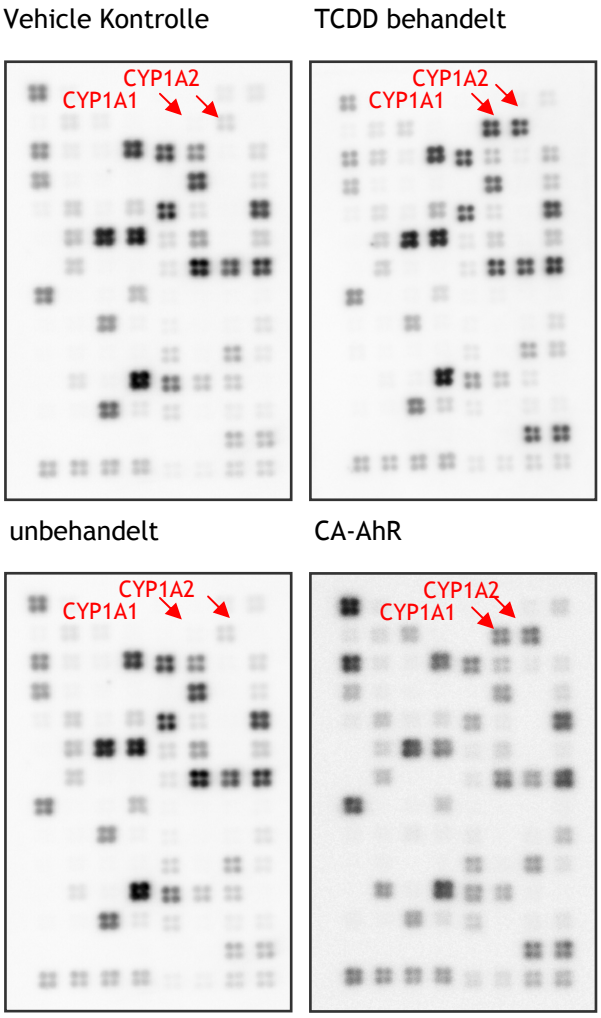


Abbildung 69 Repräsentative cDNA Membranen des GEArray™ Q Series gene expression Arrays „Stress and Toxicity“ unterschiedlich behandelter Proben

Die Bilder wurden mit der Software „ScanAlyze“ densitometrisch ausgewertet. Dazu wurde ein Raster („grid“) über die Bilder gelegt, das die einzelnen Spots und deren individuelle Intensität erkannte und somit die Rohdaten für jeden Array lieferte. Die weitere Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Software „GEArray Analyzer™ 1.0“. Diese normalisierte die gewonnenen Rohdaten auf die Expression des Hauskeeping-Gens ß-Actin. Nach der Normalisierung der Rohdaten wurden alle Daten der Einzelversuche gemittelt und mit zwei verschiedenen Methoden dargestellt.

Zum einen wurden die gewonnenen Daten als so genannter Scatterplot generiert. Hierzu wurde zunächst der Logarithmus zur Basis 2 (log_2) von allen normalisierten Daten berechnet. Auf der x-Achse wurden jeweils die log_2 Genexpressionsdaten der Kontrollen und auf der y-Achse die log_2 Genexpressionsdaten der behandelten bzw. transgenen Tiere, dargestellt als relative Pixelintensitäten, aufgetragen. Abbildung 70 zeigt die Scatterplots der Auswertung für TCDD-behandelte Tiere und deren entsprechende Kontrollen, in Abbildung 71 ist der Scatterplot der Auswertung der transgenen Mauslinie CA-AhR mit dem entsprechenden Wildtyp dargestellt. Die Gene oberhalb der eingezeichneten, roten Trendlinie sind durch die Behandlung induziert, die Gene unterhalb der Linie herunter-reguliert worden. Hätte die Behandlung bzw. die Expression des Transgens keine Auswirkung auf die Genexpression in der Leber der Tiere, würden alle Daten genau auf der Trendlinie liegen. Durch die gewählte logarithmische Darstellung der Daten zur Basis 2 entspricht die Abweichung um eine Einheit (nach oben oder unten) auf der y-Achse einer differentiellen Expression der Probe um den Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle, eine Abweichung um zwei Einheiten um den Faktor 4, usw.

In Abbildung 70 ist der Scatterplot der Auswertung für TCDD-behandelte Tiere und deren entsprechende Kontrollen dargestellt, in Abbildung 71 der Scatterplot der Auswertung für transgene CA-AhR Tiere und deren entsprechenden Wildtyp. Es fällt auf, dass bei der transgenen Mauslinie wesentlich mehr Gene herauf- bzw. herunterreguliert wurden, wenn man die Genexpression mit den TCDD behandelten Tieren vergleicht. Bei den TCDD behandelten Tieren fällt außerdem auf, dass die meisten regulierten Gene nach oben, aber nicht nach unten reguliert wurden. Bei den CA-AhR Mäusen fand eine Regulierung sowohl nach unten, als auch nach oben hin statt.

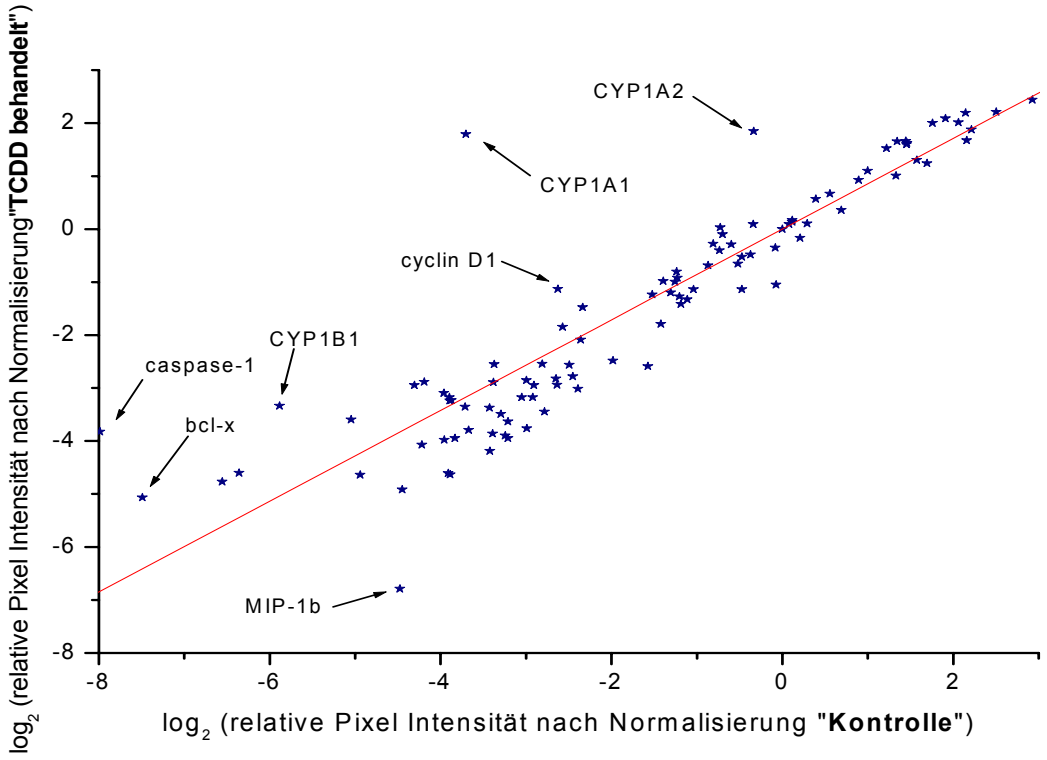


Abbildung 70 Scatterplot der Auswertung für TCDD-behandelte Tiere und deren entsprechende Kontrollen

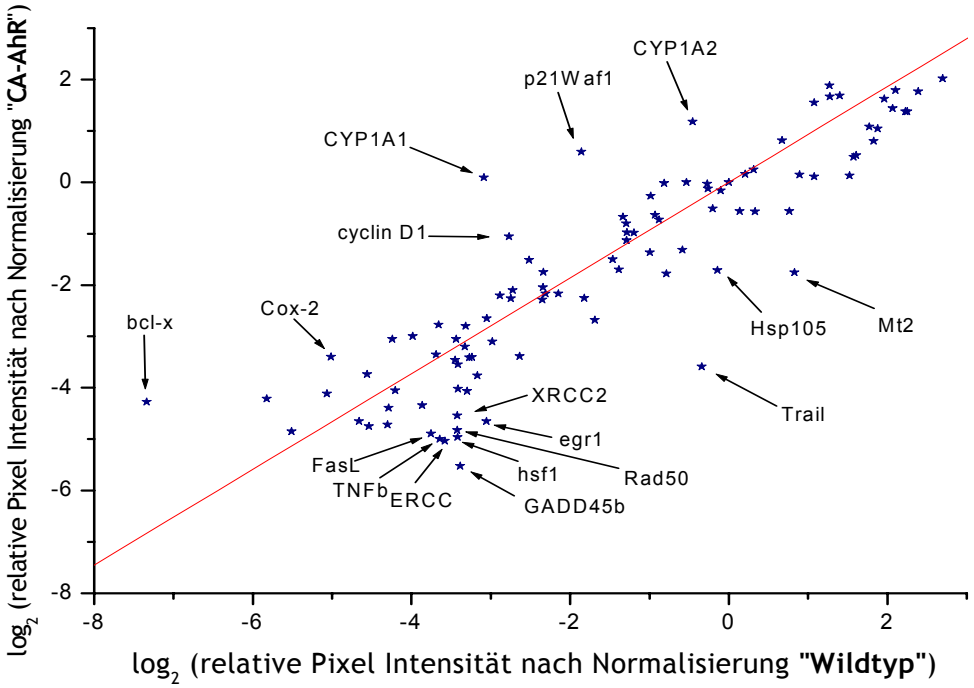


Abbildung 71 Scatterplot der Auswertung für transgene CA-AhR Tiere und deren entsprechende Wildtyp Tiere

Außer den Scatterplot Darstellungen wurden alle Gene, deren Expression nach der Behandlung mehr als zweifach von der Kontrolle abwichen, in separaten Balkendiagrammen abgebildet.
Abbildung 72 zeigt das Diagramm für TCDD behandelte Tiere, Abbildung 73 das Diagramm für die transgene Mauslinie CA-AhR.

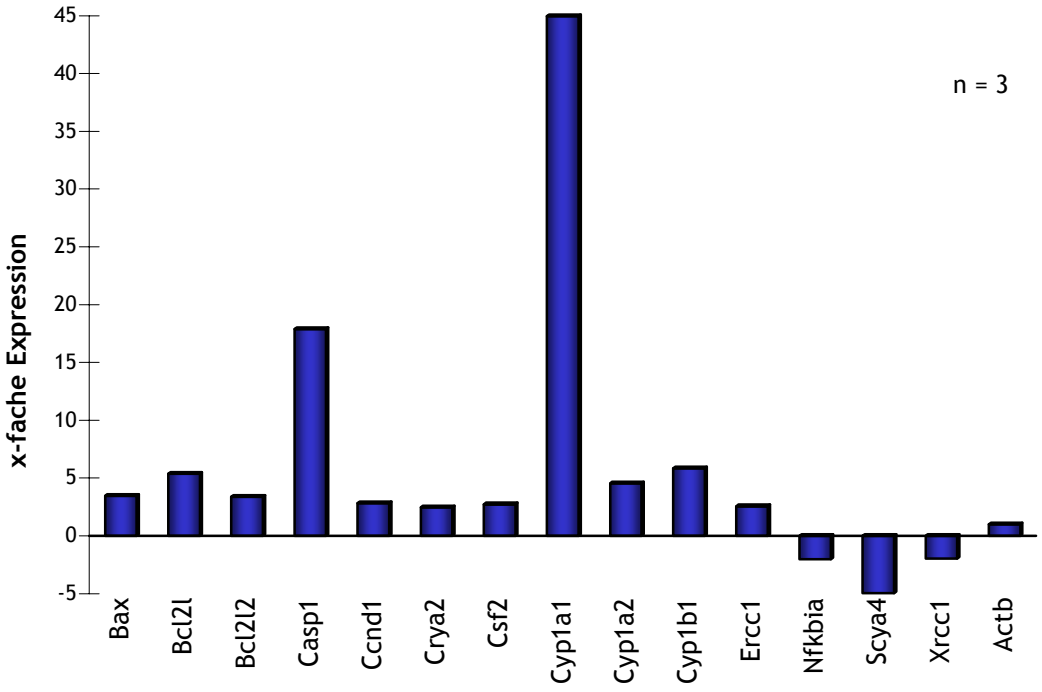


Abbildung 72 Darstellung der x-fachen Veränderung der Genexpression in TCDD behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle in Bezug auf das normalisierte Hauskeeping-Gen ß-Actin

Wie bereits erwähnt fällt bei den TCDD behandelten Tieren als erstes auf, dass der mehrheitliche Anteil der regulierten Gene nach oben hin reguliert wurde. Es kann festgestellt werden, dass bei CYP1A1, wie erwartet, mit einem Faktor von über 40-fach, die höchste Regulierung nach oben hin stattgefunden hat. Die Expression von CYP1A2 und CYP1B1 nach TCDD Behandlung hingegen war deutlich geringer. Ebenfalls stark induziert wurde die Caspase 1, mit einem Faktor > 15-fach. Alle anderen dargestellten Gene waren, wie Abbildung 72 entnommen werden kann, zwischen zwei- und fünffach reguliert.

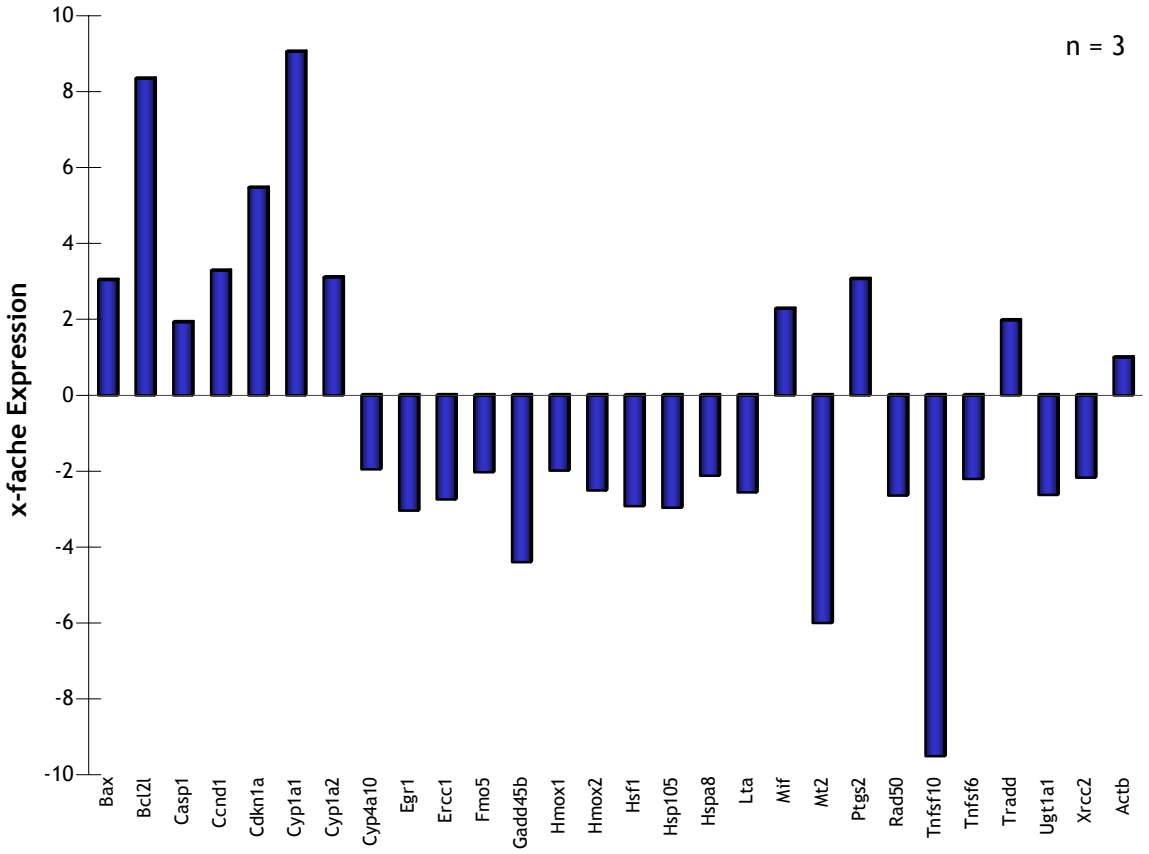


Abbildung 73 Darstellung der x-fachen Veränderung der Genexpression in CA-AhR Mäusen im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle in Bezug auf das normalisierte Hauskeeping-Gen ß-Actin

In der CA-AhR Linie wurden im Vergleich zur TCDD Behandlung wesentlich mehr Gene reguliert. Alle betrachteten Gene waren aber höchstens zehnfach reguliert. Die Expression von CYP1A1 war nur ca. zehnfach höher als im Wildtyp, diese Tatsache ist stimmig mit den oben bereits beschriebenen Ergebnissen der Real-time PCR.

Eine Auflistung aller Gene in der Leber von C57/B6 Mäusen, die entweder durch TCDD Behandlung oder in der transgenen CA-AhR Linie um mindestens den Faktor zwei reguliert wurden, fasst Tabelle 44 zusammen. Die Gene, die sowohl in den TCDD behandelten Tieren, als auch in der CA-AhR Linie reguliert wurden, sind fett markiert.

Tabelle 44 Auflistung der Gene, die bei TCDD behandelten bzw. CA-AhR transgenen Mäusen um mindestens den Faktor 2 reguliert wurden (**fett** gedruckt sind all die Gene, die in beiden Systemen reguliert wurden)

Symbol	Name	Genbank	Beschreibung	TCDD	CA-AhR
Actb	beta-actin	M12481	Cytoplasmic beta-actin	-	-
Bax	**bax**	L22472	**Bcl2-associated X protein**	↑	↑
Bcl2l	**bcl-x**	L35049	**Bcl2-like**	↑↑	↑↑
Bcl2l2	bcl-w	AF030769	Bcl2-like 2	↑	
Casp1	**caspase-1**	L03799	**Interleukin-1 beta convertase (IL-1bc)**	↑↑	↑
Ccnd1	**cyclin D1**	M64403	**Cyclin D1**	↑	↑
Cdkn1a	CAP20/CDKI	NM_007669	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	↑↑	
Crya2	cryab	M63170	Alpha crystallin B	↑	
Csf2	GM-CSF	X03020	Colony stimulating factor, granulocyte macrophage	↑	
Cyp1a1	**Cyp1a1**	K02588	**Cytochrome P450, 1a1, aromatic compound inducible**	↑↑	↑↑
Cyp1a2	**Cyp1a2**	X00479	**Cytochrome P450, 1a2, aromatic compound inducible**	↑	↑
Cyp1b1	Cyp1b1	NM_009994	Cytochrome P450, 1b1, benz[a]anthracene inducible	↑↑	
Cyp4a10	Cyp4a10	X69296	cytochrome P450, 4a10		↓
Egr1	egr-1	M20157	Early growth response 1		↓
Ercc	**ERCC**	**NM_007948**	**Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1**	↑	↓
Fmo5	FMO5	NM_010232	Mus musculus flavin containing monooxygenase 5 (Fmo5),		↓
Gadd45b	GADD45 b	NM_008655	Growth arrest and DNA-damage inducible 45beta		↓
Hmox1	HMOX1	NM_010442	Mus musculus heme oxygenase (decycling) 1		↓
Hmox2	HMOX2	NM_010443	Mus musculus heme oxygenase (decycling) 2		↓
Hsf1	hsf1 (tcf5)	X61753	M.musculus mRNA for heat shock transcription factor 1		↓
Hsp105	Hsp105	NM_013559	Heat shock protein, 105 kDa		↓

Hspa8	hsc73	NM_031165	Heat shock 70kD protein 8		↓
Lta	TNF b	M16819	Mouse tumor necrosis factor-beta mRNA		↓
Mif	MIF	L10613	Mus musculus migration inhibitory factor (10K protein)		↑
Mt2	Mt2	AK002567	Metallothionein 2		↓↓
Nfkbia	ikBa (Mad3)	U36277	Mus musculus I-kappa B alpha chain	↓	
Ptgs2	Cox-2	NM_011198	Mus musculus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)		↑
Rad50	RAD50	U66887	Mus musculus DNA repair protein RAD50 mRNA		↓
Scya4	MIP-1b	AF128219	M.musculus MIP-1b gene for macrophage inflammatory protein 1b	↓	
Tnfsf10	Trail	U37522	TNF-related apoptosis inducing ligand		↓↓
Tnfsf6	FasL	U06948	Fas ligand		↓
Tradd	TRADD	AK018592	ESTs, Weakly similar to tumor necrosis factor receptor type 1 associated protein		↑
Ugt1a1	UGTBr/p	L27122	Mus musculus (A-1) bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase (UGTBr/p)		↓
Xrcc1	XRCC1	NM_009532	Mus musculus X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	↓	
Xrcc2	XRCC2	NM_020570	Mus musculus X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2		↓

↑ = hochreguliert ≤ 5 fach; ↑↑ = hochreguliert ≥ 5fach

↓ = herunterreguliert ≤ 5 fach; ↓↓ = herunterreguliert ≥ 5 fach

Die regulierten Gene wurden nach ihrer Funktion in definierten Kategorien gruppiert. Die in beiden Experimenten regulierten Gene wurden in grün dargestellt, die durch TCDD regulierten Gene in orange. Die in der transgenen Mauslinie CA-AhR regulierten Gene wurden in blau dargestellt:

Proliferation/Karzerogenese:
Ccnd1, Egr1
Wachstumsarrest/Alterung:
Cdkn1a, Gadd45b
Entzündung:
Csf2, Lta, Mif, Scya4
Nekrose/Apoptose:

Oxidativer & Metabolischer Stress:
Crya2, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp4a10, Fmo5, Hmox1, Hmox2, Mt2, Ptgs2
Heating Stress:
Hsf1, Hsp105, Hspa8
DNA Schäden & Reparatur:
Ercc1, Rad50, Ugt1a1, Xrcc1, Xrcc2
Apoptose Signalling:
Bax, Bcl2l, Bcl2l2, Casp1, Nfkbia, Tnfsf6, Tnfsf10, Tradd

Die meisten Gene wurden offensichtlich in der Kategorie „oxidativer und metabolischer Stress“ reguliert. Aber auch im Bereich „Apoptose Signalling“ wurden etliche Gene in ihrer Expression verändert. Weder die TCDD Behandlung, noch die konstitutive Expression des AhR lässt einen eindeutigen Trend erkennen, wonach vermehrt Gene einer bestimmten Kategorie aufgrund der Behandlung bzw. der Transgen Expression differentiell exprimiert wurden. Vielmehr scheint es so, als ob in beiden Experimenten Gene aus allen kategorisierten Gruppen reguliert wurden.

9 Diskussion

Die Kanzerogenität von Dioxinen ist bisher am besten an der „Prototyp“-Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) untersucht worden. TCDD wurde im Jahr 1997 von der International Agency for Reasearch on Cancer (IARC) als Klasse I Kanzerogen eingestuft, obwohl bislang die Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD noch nicht eindeutig geklärt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass TCDD über die durch den AhR massiv vermittelte Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzymen, vor allem von CYP1A1, zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche die DNA schädigen können und potenziell mutagen sind.
Die Induktion von Phase I Enzymen über den AhR (z.B. mit dem Liganden TCDD) ist meist mit der vermehrten Expression einer Reihe anderer, AhR regulierter Gene verbunden. Induziert man nicht mit einem AhR-Liganden, ergibt sich die Schwierigkeit bei den Untersuchungen, dass lediglich eine sehr geringe konstitutive Expression von CYP1A1 in gesundem, unbehandeltem Gewebe stattfindet. Somit ist es schwierig vorauszusagen, welchen Anteil die katalytisch aktiven CYP Enzyme an der ROS-Bildung nach AhR-vermittelter Genexpression (in Abwesenheit von TCDD) tragen.

9.1 Generierung und Charakterisierung der hCYP1A1 transgenen Maus

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene Mauslinie entwickelt und charakterisiert. Ziel war die Überexpression des humanen Cytochrom P450 1A1 Enzyms. Es sollten ausreichend große Mengen an CYP1A1 exprimiert werden, ohne dass zuvor eine das Studienergebnis möglicherweise verfälschende Behandlung mit einem AhR-Agonisten (z.B. TCDD) stattgefunden hat.

Dazu wurde das CYP1A1 Transgen innerhalb eines Tet-off Expressionssystems generiert. Es ermöglicht das gezielte An- und Abschalten des Transgens durch Gabe von Doxyzyklin.

Zur Realisierung des Tet-off Systems musste die hCYP1A1-transgene Maus NMRI-Tg(GFP-TRE-CYP1A1) mit einer zweiten transgenen Mauslinie verpaart werden, die das Tetrazyklin Transaktivator Protein (tTA) exprimiert. Es wurden zwei unabhängige Linien generiert. Die tTA exprimierenden Mauslinien STOCK Tg(tTAhCMV)3Bjd/J sowie B6;C3-Tg(TettTALuc) 1Dgs/J waren kommerziell erworben worden. tTA bindet an spezifische DNA-Bindungsstellen (auch bezeichnet als Tetrazyklin responsive Elemente, TRE), welche unmittelbar neben dem minimalen Promotor des CYP1A1 Gens liegen. Erst durch Kombination von tTA Protein und TRE (d.h. durch Verpaarung von zwei transgenen Mauslinien) konnte die Genexpression von hCYP1A1 zustande kommen. Durch Verpaarung der hCYP1A1 exprimierenden- mit der jeweiligen tTA exprimierenden Linie wurden zwei doppelt-transgene Mauslinien entwickelt, nämlich die Linien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc). Das Tet-off-System wurde benutzt, um eine evtl. auftretende Toxizität in Folge der Überexpression des Transgens im Entwicklungsstadium des Tieres zu erfassen bzw. zu verhindern.

Mit der genomischen DNA der transgenen Nachkommen wurden Transgen-spezifische PCR Reaktionen durchgeführt, wodurch die Tiere eindeutig genotypisiert werden konnten. Doppelt-transgenen Tieren wurde zur Induktion der Genexpression das zuvor über das Trinkwasser verabreichte Doxyzyklin entzogen. Danach wurden diese Tiere zur Charakterisierung des hCYP1A1 Transgens in verschiedenen Organen verwendet.

Grundlage für die Charakterisierung der Transgen-Expression in den beiden generierten Linien war die RNA- und Proteinexpression des Transgens, sowie dessen katalytische Aktivität. Diese Parameter wurden mittels Real-time PCR, Western Blot sowie EROD Assay überprüft.

Die Genexpressionsdaten in den transgenen Mauslinien Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTA hCMV)3Bjd/J) und Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc) zeigen keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnte eine Induktion von hCYP1A1 in verschiedenen Organen der Mäuse auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, allerdings wurde im Vergleich zu Wildtyp Tieren weder eine Steigerung der CYP1A1 Proteinmenge noch deren katalytischer Aktivität erzielt.
Es stellt sich daher die Frage, weshalb das humane CYP1A1 Transgen in dieser Mauslinie nicht wie erwartet exprimiert wird.
Da die Integration des humanen CYP1A1 Transgens ins Mausgenom mittels Genotypisierung sowohl in der F0-, als auch in späteren Generationen eindeutig nachgewiesen wurde, muss davon ausgegangen werden, dass alle verwendeten Tiere theoretisch das Transgen promotorabhängig exprimieren sollten.
Man könnte darüber spekulieren, dass die schwach- bis gar nicht vorhandene Expression von CYP1A1 Folge einer lediglich schwach vorhandenen tTA Expression sein könnte. Da eine starke Expression von tTA Voraussetzung für eine optimale Expression des „Genes of Interest“ ist, könnte eine schwache tTA Expression den Sachverhalt erklären.
In der Tat wurde erst vor kurzem auf der Internetseite von Jackson Lab, bei der die tTA exprimierende Mauslinie STOCK Tg(tTAhCMV)3Bjd/J kommerziell erworben worden war, folgender Kommentar veröffentlicht: „Die Mäuse wurden im Jahr 1998 ins Jackson Lab importiert. Wir haben erst kürzlich durch interne Tests in unserem Haus bestätigen können, dass diese Mauslinie wenig Tetrazyklin-kontrolliertes Transaktivatorprotein (tTA) unter den vorgegebenen Bedingungen exprimiert. Dies konnte auch in einer kürzlich erschienenen Publikation [Frugier *et al.* 2005] bestätigt werden“ (http://jaxmice.jax.org/strain/003271.html).
Dieser Sachverhalt könnte mit ein Grund für eine schwache Expression von CYP1A1 in der Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J) sein, erklärt aber nicht das völlige Ausbleiben der Transgen-Proteinexpression.
In der Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc) kann eine schwache Expression von tTA allerdings ausgeschlossen werden. Diese Linie exprimiert zusätzlich zur tTA Expression ein Luciferase-Reportergen, das Auskunft über die vorhandene organspezifische tTA Expression gibt. Mittels Reportergenassay konnte in nahezu allen untersuchten Organen der transgenen Tiere eine hohe bis sehr hohe Reportergenaktivität festgestellt werden. Das bedeutet, dass tTA in dieser Mauslinie exprimiert wird und die nicht vorhandene hCYP1A1 Proteinexpression nicht auf mangelnde tTA Expression zurückgeführt werden kann.

Es stellt sich generell die Frage, weshalb es immer wieder vorkommt, dass die Expression eines Transgens im Tier nicht bzw. kaum vorhanden ist. Dies betrifft im vorliegenden Fall sowohl die tTA-, als auch die hCYP1A1 Expression. Zur Erklärung dieses Phänomens wurden verschiedene Überlegungen angestellt: Die Übertragung und Integration eines Transgens wird in hohem Maße von zufälligen Ereignissen auf molekularer Ebene begleitet. Dies betrifft zum einen die Struktur des transgenen Locus, zum anderen dessen Position im Genom des Wirtes, da der Einbau mittels Pronucleusinjektionstechnik in einer nicht zu kontrollierenden Weise an einem nicht bestimmbaren Ort erfolgt. Ein solcher zufällig entstandener Locus unterliegt dem Einfluss verschiedener und in der Mehrheit bislang unverstandener Regulationsmechanismen, welche die Aktivität der übertragenen Gene bestimmen, ohne dass diese eliminiert oder auf Sequenzebene verändert werden. Dies bedeutet, der transgene Locus befindet sich in einem Netzwerk eines komplizierten Informationssystems, das offensichtlich Kontrollmechanismen besitzt, welche die nicht zum genetischen Kontext passenden, transgenen Loci erkennt und diese zu irgendeinem Zeitpunkt abzuschalten vermag [Matzke und Matzke 1998; Pickardt und de Kathen 2002].

Der spezifische genomische Kontext bewirkt, dass verschiedene Founder eines Transformationsexperimentes in ihrer Expressionshöhe erheblich variieren können. Dies kann sich in dauerhaft ausgeprägter schwacher Expression oder vollständiger Unterdrückung des Transgens äußern. Die mit dem genomischen Kontext in Zusammenhang stehenden Gen Silencing-Effekte verhindern die Expression des Gens auf Transkriptionsebene, d.h. es wird ein transkriptionales Gen Silencing verursacht [Peach und Velten 1991; Matzke und Matzke 1998; Pickardt und de Kathen 2002].

„Gesilencte“ Transgene weisen in der Regel einen erhöhten Grad an Cytosin-Methylierungen auf [Paszkowski und Whitham 2001; Vaucheret und Fagard 2001]. Die Hypermethylierung ist jedoch keine spezifische Eigenschaft inaktiver oder instabiler transgener DNA-Sequenzen, sondern stellt eine natürliche, reversible Form der DNA-Modifizierung dar. Es ist bislang unklar, ob es sich bei der Methylierung um Ursache oder Folge des Prozesses handelt, der zur Inaktivierung der Gene führt. Methylierungen im Promotorbereich eines Gens stehen häufig mit dem Verlust der Transkriptionsaktivität in Verbindung (transkriptionales Gen Silencing), während eine Hypermethylierung der transkribierten oder codierenden Bereiche bei Genen zu finden ist, die ein posttranskriptionales Gen Silencing aufweisen [Sijen und Kooter 2000; Pickardt und de Kathen 2002].

Da in beiden transgenen Mauslinien auf mRNA Ebene eine hCYP1A1 Induktion nachgewiesen werden konnte, kann ein transkriptionales Gen Silencing nahezu ausgeschlossen werden. Möglich wäre ein durch Hypermethylierung oder andere, unbekannte Effekte bedingtes posttranskriptionales Gen Silencing von hCYP1A1. Nicht erklärt werden kann in diesem Zusammenhang jedoch die Proteinexpression in einzelnen Organen (z.B. im Herz oder im Gehirn) der transgenen Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc), die mittels Western Blot detektiert werden konnte. Es bleibt ebenfalls unklar, weshalb das in den beschriebenen Einzelfällen offenbar exprimierte humane CYP1A1 katalytisch inaktiv ist.
Es muss generell festgehalten werden, dass weder die transgene Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(tTAhCMV)3Bjd/J), noch die transgene Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc) das humane CYP1A1 Transgen Protein in erwartetem Maße exprimiert.

Ähnliche Ergebnisse wie bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, hCYP1A1 transgenen Maus wurden ebenfalls *in-vivo* von Hwang *et al.* beschrieben. Diese Studie beschreibt die Generierung einer hCYP1B1 trangenen Maus, die ebenfalls als Tet-off System entwickelt wurde. In dieser Mauslinie konnte weder in Leber, noch in Niere und Lunge immunreaktives, transgenes CYP1B1 nachgewiesen werden. Ebenso unterschieden sich die katalytischen Aktivitäten nur unwesentlich von der Wildtyp Aktivität. Interessanterweise konnte analog zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Mauslinien eine deutliche Induktion des Transgens auf mRNA Ebene (vor allem im Gehirn und im Herz) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle mittels RT-PCR beobachtet werden [Hwang *et al.* 2001].
Vergleichbare Ergebnisse konnten allerdings auch in neueren Arbeiten *in-vitro* gezeigt werden: In einer Studie von Shiizaki *et al.* wurde die cDNA des humanen CYP1A1 Gens zur rekombinanten Expression in die humane Hepatomzelllinie SK-HEP1 transfiziert. Es konnte ein geringer Anstieg der katalytischen CYP1A1 Aktivität festgestellt werden. Die CYP1A1 Expression in SK-HEP1 ist nicht TCDD-induzierbar. Im Vergleich zur CYP1A1 Aktivität der mit TCDD behandelten humanen Hepatomzelllinie HepG2 war die rekombinante Expression von hCYP1A1 in SK-HEP1 allerdings vernachlässigbar [Shiizaki *et al.* 2005].

In der transgenen Mauslinie CA-AhR, die einen konstitutiv aktiven AhR exprimiert, werden ohne das Vorhandensein bzw. die Zugabe eines AhR Liganden hohe Mengen an CYP1A1 mRNA in der Leber der Tiere generiert. Die Induktion der CYP1A1 mRNA ist vergleichbar mit einer Induktion nach TCDD Behandlung. Es konnte gezeigt werden, dass der AhRR in der Leber der Tiere, verglichen mit Wildtyp Tieren, induziert ist. Diese Tatsache konnte bereits von Andersson *et al.* mittels semiquantitativer PCR gezeigt werden [Andersson *et*

al. 2002]. Die Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels quantitativer Real-time PCR bestätigt werden. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass in dieser Mauslinie, verglichen mit der nachgewiesenen mRNA Expression, unverhältnismäßig wenig katalytisch aktives CYP1A1 Protein exprimiert wird.

In anderen Expressionssystemen wurden jedoch bereits erfolgreich rekombinante CYPs stark exprimiert, z B. in E. coli, in Sf9 Insektenzellen sowie in Hefen [Buters *et al*. 1995; Iwata *et al*. 1998; Masimirembwa *et al*. 1999; Schwarz *et al*. 2001]. Es stellt sich daher die Frage, weshalb die rekombinanten CYP Proteine in diesen Systemen erfolgreich exprimiert werden, nicht aber in den transgenen Tieren bzw. Zelllinien.

Ein weiterer Ansatz für die Erklärung jenes Sachverhaltes ist die Tatsache, dass in all diesen Expressionssystemen kein Ah-Rezeptor bzw. keine AhR Genbatterie exprimiert wird [Chan *et al*. 1994; Hahn 2002; Kewley *et al*. 2004]. Es könnte also möglich sein, dass die rekombinante CYP1A1 Expression in Säugerzellen, z.B. in den Organen der transgenen Tiere, durch einen Repressionsmechanismus verhindert wird. Der Repressionsmechanismus stünde dann vermutlich in Zusammenhang mit der AhR Expression.
Die säugerspezifische Expression des AhR Repressors (AhRR) könnte mit ein Grund für diesen Effekt sein. Um die Frage an der Beteiligung des konstitutiv exprimierten AhRR an der nicht- bzw. nur schwach vorhandenen, rekombinanten Proteinexpression des humanen CYP1A1 in den transgenen Tieren zu beantworten, wurde die individuelle AhRR Expression sowohl in den Organen der transgenen Mäuse der Linie Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc) und den Organen von Wildtyp Tieren, als auch in den Lebern von TCDD behandelten- und transgenen CA-AhR Mäusen mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Mit Ausnahme von Magen, Niere und Muskel korrelierten die Ergebnisse von Wildtyp und transgenen Tg(GFP-TRE-CYP1A1)-(Tet-tTALuc) Tieren bzgl. AhRR Expression sehr gut. In Leber, Lunge und Milz wurde die niedrigste AhRR Expression festgestellt. Deutlich höhere Werte wurden für Magen, Gehirn sowie Muskel transgener Tiere festgestellt. Allerdings war in diesen Organen die AhRR Expression im Wildtyp weitaus schwächer ausgeprägt. Im Herz konnte die höchste AhRR Expression in den untersuchten Organen nachgewiesen werden, dies galt für Wildtyp- und transgene Tiere.
Vergleicht man diese Werte nun mit der organspezifischen, transgenen, humanen CYP1A1 mRNA Expression, so stellt man fest, dass die Ergebnisse recht gut miteinander korrelierten. In den Organen, in denen eine hohe CYP1A1 Induktion festgestellt wurde, wird auch der AhRR stark exprimiert, dies ist vor allem im Herz und im Gehirn der Fall. In

genau diesen Organen konnte auch in individuellen Tieren eine CYP1A1 immunreaktive Bande im Western Blot detektiert werden.
Bei den CA-AhR Tieren konnte ebenfalls in der Leber eine erhöhte AhRR Expression im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Auch hier konnten im Vergleich zum Wildtyp immunreaktive CYP1A1 Banden im Western-Blot gezeigt werden. Interessanterweise konnte durch die TCDD Behandlung nach 96 Stunden keine erhöhte AhRR mRNA Expression in der Leber nachgewiesen werden.
Diese Ergebnisse sind prinzipiell stimmig mit einer Studie von Bernshausen *et al.*, die die AhR- und AhRR Expression in verschiedenen Geweben von Wildtyp- sowie AhR Knockout Mäusen untersucht haben. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass der AhRR in Herz und Gehirn stark exprimiert wird. Die konstitutive AhRR Expression in den AhR Knockout Tieren war um mehrere Größenordnungen niedriger als in den Wildtyp Tieren. Da auch beim AhRR in der 5´-flankierenden Region des Gens XRE Sequenzen vorhanden sind, vermuteten sie, dass der AhR über AhR/ARNT Bindung an XREs die basale AhRR Expression kontrolliert. Wird kein AhR exprimiert, kann daher auch keine AhRR Expression induziert werden [Bernshausen *et al.* 2005].
Sowohl die Expression des transgenen humanen CYP1A1 als auch die Expression des konstitutiv aktiven AhR wird jedoch nicht über die Bindung eines Liganden am AhR vermittelt, sondern über die jeweiligen Promotoren des gewählten Transgenvektors zur rekombinanten Expression. Im Fall des humanen CYP1A1 wurde der CMV Promotor gewählt, bei der CA-AhR Linie der SV40 Promotor. Das bedeutet, dass in beiden transgenen Modellen der AhR in seiner inaktiven Form als Proteinmultikomplex im Zytosol vorliegen müsste.

Weshalb aber macht eine organspezifische, hohe konstitutiv vorhandene AhRR Expression die rekombinante CYP1A1 Expression, wie es im Herz der transgenen Tiere beobachtet werden konnte, scheinbar am ehesten möglich?
Man kann mit den momentan vorhandenen Wissensstand über die molekularen Vorgänge während der rekombinanten CYP1A1 Expression lediglich darüber spekulieren: Eine Möglichkeit wäre, dass durch eine hohe konstitutive AhRR Expression der AhR-Komplex gänzlich reprimiert wird. Dies wäre einem Expressionssystem ähnlich, in dem überhaupt kein AhR exprimiert wird. Da in Expressionssystemen, in denen kein AhR exprimiert wird, die erfolgreiche rekombinante Expression von CYP1A1 beschrieben wurde, könnte also in der Tat der (je nach Organ mehr oder weniger stark) reprimierte AhR-Komplex die rekombinante Proteinexpression von CYP1A1 (mehr oder weniger stark) blockieren. Wie dieser Prozess auf molekularer Ebene ablaufen könnte, kann allerdings im Rahmen dieser

Arbeit nicht beantwortet werden, da der Mechanismus, falls existent, bislang gänzlich ungeklärt ist und diese Theorie als hoch spekulativ anzusehen ist.
Im Fall der transgenen CA-AhR Mauslinie könnte man ähnlich spekulieren, dass durch die nicht allzu stark ausgeprägte Induktion das AhRR in der Leber der transgenen Tiere lediglich ein kleiner Anteil des natürlich vorhandenen AhR-Komplexes gehemmt wird. Dadurch würde der Großteil der CYP1A1 Proteinexpression gehemmt.

Ob diese theoretischen Überlegungen tatsächlich so in der Zelle ablaufen könnten, muss daher unbedingt in weiteren Experimenten untersucht werden. Es könnte z.B. untersucht werden, ob eine rekombinante Expression von CYP1A1 in einem AhR Knockout Modell (*in-vitro* bzw. *in-vivo*) möglich ist. Wäre dies der Fall, würde die Theorie des hemmenden Einflusses des AhR auf die rekombinante Expression bestärkt werden.

9.2 Zusammenhang zwischen TCDD vermittelter CYP1A Induktion und Bildung von ROS bzw. oxidativen DNA-Schäden

Das Hauptzielorgan der kanzerogenen Wirkung von TCDD beim Nager ist die Leber. Da TCDD in vielen gentoxischen Testsystemen keine Wirksamkeit aufweist, wird es allgemein als nicht-gentoxischer Tumorpromotor angesehen. Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass TCDD in der Leber weiblicher Ratten auch oxidative DNA-Schäden verursachen kann [Wyde *et al.* 2001b].
Nach wie vor ist nicht geklärt, ob und wie die Induktion des Fremdstoffmetabolismus zur kanzerogenen Wirkung von TCDD beiträgt. Es sollte daher die Hypothese überprüft werden, ob TCDD über die durch den AhR vermittelte Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzymen (vor allem von CYP1A1) *in vivo* im Zielorgan Leber zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt, welche potenziell mutagen sind und die DNA schädigen können.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Assays angewendet: Zum Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde der 2´,7´-Dihydrodichlorfluoresceindiacetat (H_2DCFDA) Assay verwendet. Ob und in welchem Maße durch TCDD Schäden an der DNA verursacht werden, wurde durch Quantifizierung des vorhandenen 8-oxo Guanins (8-oxo dG) mittels HPLC-MS in genomischer Leber DNA bestimmt.
Untersucht wurde die ROS Bildung bzw. der 8-oxo dG Status in der Leber von TCDD behandelten C57/B6 Mäusen (1 µg/kg KG für 96 Stunden) sowie in der Leber der transgenen CA-AhR Mauslinie im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Außerdem wurden zwei Dosisgruppen von Sprague-Dawley Ratten mit TCDD behandelt und ebenfalls die ROS Bildung und der 8-oxo dG Status im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Eine Gruppe war mit einer Dosis von 1 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden behandelt worden, die zweite Gruppe mit einer Dosis von 10 µg/kg KG für 14 Tage.
Verglichen wurde zudem, ob evtl. erhöhte ROS Werte bzw. erhöhte 8-oxo dG Gehalte nach TCDD Exposition mit der Induktion von CYP1A Enzymen in der Leber der Tiere korrelieren. Dazu wurde die Proteinexpression und –aktivität von CYP1A mittels Western-Blot und EROD-Assay untersucht.

In einer *in-vitro* Studie, die unmittelbar den Experimenten dieser Arbeit vorausging, wurde bereits der Zusammenhang zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie erhöhten 8-oxo dG Gehalte und einer TCDD Exposition in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten in Kultur untersucht [Knerr *et al.* 2006].

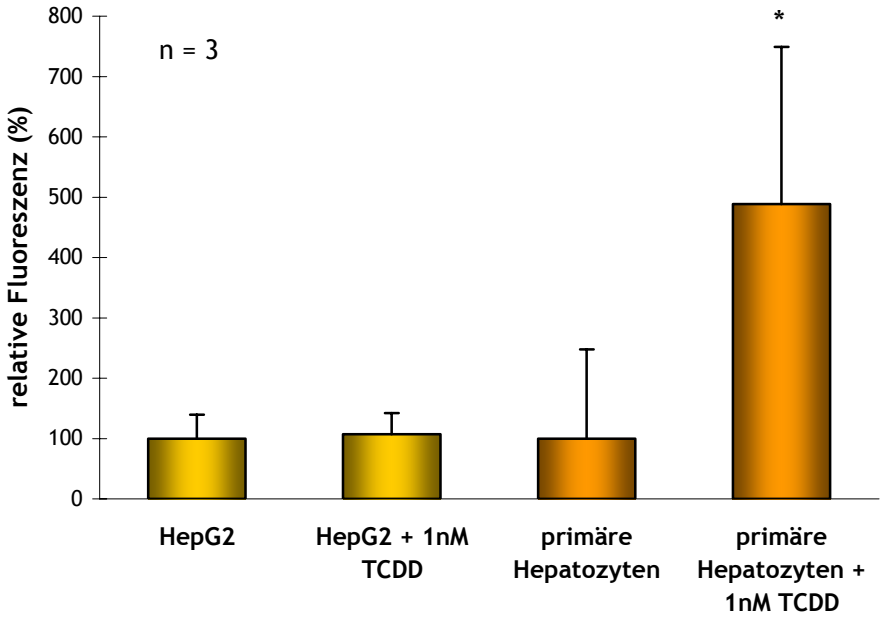


Abbildung 74 ROS Bildung in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden, gemessen mittels H_2DCFDA Assay (* = statistisch signifikant; gepaarter t-Test; one-tail p value) [Knerr *et al.* 2006]

In der Studie konnten statistisch signifikant erhöhte ROS-Levels in den für 48 Stunden mit 1 nM TCDD behandelten primären Rattenhepatozyten festgestellt werden. Ebenso waren die 8-oxo-dG Werte in den behandelten primären Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. In der HepG2 Zelllinie konnten diese Effekte nicht beobachtet werden, sowohl der H_2DCFDA Assay als auch die 8-oxo dG Levels der behandelten Zellen unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle. In Abbildung 74 und Abbildung 75 sind die ROS- und 8-oxo dG Daten aus dieser Studie graphisch dargestellt [Knerr *et al.* 2006].

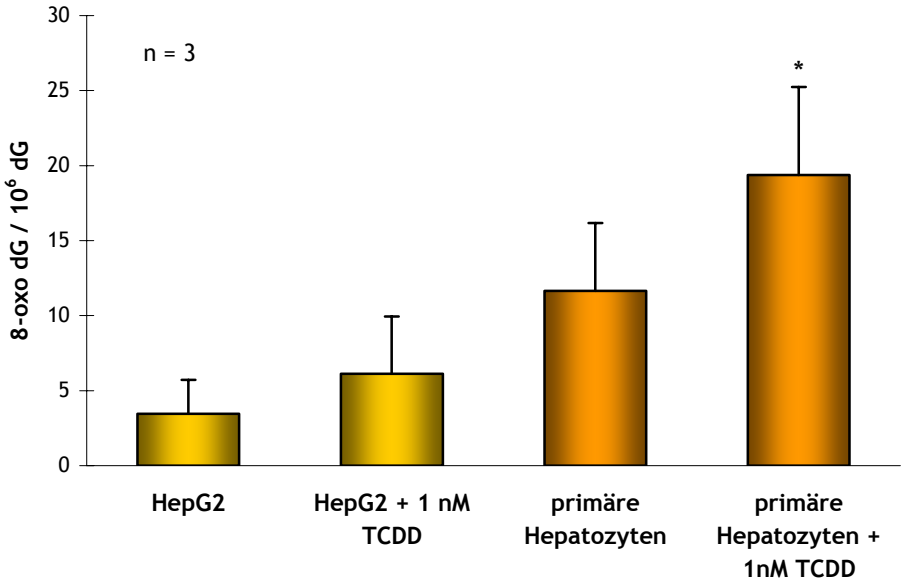


Abbildung 75 8-oxo dG Gehalte in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden, gemessen mittels HPLC-MS (* = statistisch signifikant; gepaarter t-Test; one-tail p value) [Knerr *et al.* 2006]

Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluss zu, dass das unterschiedliche Ausmaß der ROS- und 8-oxo-dG Bildung in den HepG2 Zellen im Vergleich zu primären Rattenhepatozyten, möglicherweise von der Tatsache abhängt, dass es sich bei TCDD um einen sehr starken CYP1A Induktor handelt, der in verschiedenen Systemen eine unterschiedlich hohe Induktionspotenz besitzt. Beide Effekte korrelierten sehr gut mit der gebildeten Menge, gemessen als immunreaktive Proteinmenge und katalytischen EROD Aktivität von CYP1A1, die in Abbildung 76 dargestellt ist. Zeiger *et al.* konnten durch Messungen der CYP1A vermittelten EROD Aktivität zeigen, dass sich primäre Rattenhepatozyten mehr als 20-fach sensitiver gegenüber TCDD verhalten als humane HepG2 Zellen [Zeiger *et al.* 2001].

Sicherlich würden primäre humane Hepatozyten einen noch besseren Vergleichsbezug liefern als die humane Zelllinie HepG2. In einer anderen Studie jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass die EROD Induktionseffizienz von TCDD in primären humanen Hepatozyten im Vergleich zu primären Rattenhepatozyten wesentlich schwächer ausgeprägt ist [Xu *et al.* 2000].

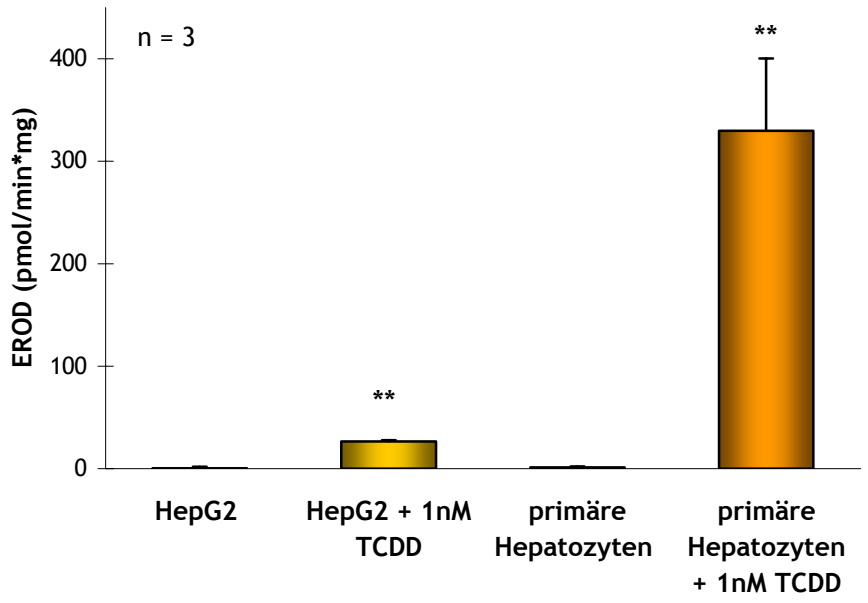


Abbildung 76 Spezifische EROD Aktivität in HepG2 Zellen und in primären Rattenhepatozyten nach der Behandlung mit 1 nM TCDD bzw. DMSO als Kontrolle für 48 Stunden (** = statistisch hoch signifikant; gepaarter t-Test; one-tail p value) [Knerr *et al.* 2006]

Es konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Induktion von CYP1A Enzymen eine Hauptquelle der ROS-Bildung in TCDD behandelten Hepatozyten darstellt. Außerdem konnte durch diese Beobachtungen die Hypothese bestätigt werden, dass erhöhte Lebertumorinzidenzen, welche in Ratten nach TCDD-Exposition beobachtet werden, eine Konsequenz der erhöhten ROS-Bildung und damit verbundenen DNA-Schäden sein könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Ergebnisse, die innerhalb der *in-vitro* Studie gezeigt werden konnten auch *in-vivo* Gültigkeit besitzen. Die Behandlung der C57/B6 Mäuse mit TCDD verursachte bei männlichen und weiblichen Tieren einen Anstieg der ROS Bildung in der Leber, der bei den weiblichen Tieren signifikant erhöht war. Die 8-oxo dG Menge in der genomischen DNA war allerdings in beiden Geschlechtern nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.
Bei den CA-AhR Tieren war die ROS Bildung im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt, bei den Männchen sogar statistisch signifikant. Dem entgegen stand ein starker Anstieg des 8-oxo dG Gehaltes in den Lebern der transgenen Tiere, der bei den weiblichen Tieren ebenfalls statistisch signifikant erhöht war.

Bei den Ratten wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des oxidativen Stresses lediglich in der Dosisgruppe 10 µg/kg KG TCDD für 14 Tage beobachtet, in der niedrig dosierten Gruppe wurde keine Erhöhung festgestellt. Ebenso wie bei den Mäusen konnte in keiner der beiden Dosisgruppen ein signifikant erhöhter Anstieg des 8-oxo dG Gehaltes in der DNA der Tiere nachgewiesen werden.

Dass die TCDD Behandlung der Mäuse und Ratten mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses einhergeht war anzunehmen, da verschiedene Studien in der Vergangenheit bereits einen positiven Zusammenhang zwischen TCDD Exposition und oxidativem Stress zeigen konnten. Bislang wurde allerdings bei keinem der bereits durchgeführten Experimente die ROS Bildung mittels H_2DCFDA Assay untersucht. Auch wurde in diesen Studien kein Zusammenhang zwischen ROS Bildung und CYP1A Induktion gezeigt. Frühere Arbeiten konnten einen Anstieg an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen sowie des Malondialdehyd-Gehaltes in der Leber der Tiere nachweisen. Vor allem ältere Studien zielten dabei allerdings weniger auf die Aufklärung des Mechanismus der Kanzerogenität von TCDD, sondern versuchten vielmehr die Toxizität von TCDD auf die Induktion von oxidativem Stress über den AhR zurückzuführen [Stohs 1990; Stohs *et al.* 1990; Alsharif *et al.* 1994; Shertzer *et al.* 1998; Slezak *et al.* 2000; Senft *et al.* 2002]. Außerdem konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass eine Exposition von Ratten mit TCDD dosis- und zeitabhängig DNA Einzelstrangbrüche verursacht [Wahba *et al.* 1988; Wahba *et al.* 1989].

Die Ergebnisse der *in-vivo* Studien bei Ratte und Maus zeigen deutlich, dass die hepatischen 8-oxo dG Levels in beiden Spezies durch eine akute TCDD Gabe nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse aus den *in-vitro* Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit TCDD in primären Hepatozyten der Ratte einen signifikanten Anstieg der 8-oxo dG Gehalte verursacht. Dies könnte damit verbunden sein, dass die DNA Reparaturmechanismen der *in-vitro* kultivierten, primären Zellen nicht mehr so effizient sind als die DNA Reparatur *in-vivo*. In weiterführenden Studien könnte daher die Expression der Gene untersucht werden, welche an der Reparatur der DNA beteiligt sind (z.B. des DNA Reparaturenzyms Ogg1, das 8-oxo dG spezifisch aus der DNA ausschneidet), und ob diese sich im *in-vitro* System im Vergleich zum *in-vivo* System nach TCDD Behandlung unterscheiden.

Allerdings kann festgehalten werden, dass eine TCDD vermittelte Steigerung der reaktiven Sauerstoffspezies in der Leber beobachtet werden konnte. Dies wurde für beide Geschlechter beobachtet.
Interessant bleibt das Ergebnis, das die transgenen CA-AhR Mäuse lieferten. Eine unmittelbare Erklärung für die erhöhten 8-oxo dG Werte bei offensichtlich nicht erhöhtem oxidativem Stress in der Leber der Tiere kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass diese Mauslinie in erster Linie spontane Magentumore entwickelt und nicht, wie man vermuten könnte, Tumore in der Leber. Möglicherweise liegt die Ursache sowohl hierfür, als auch für die stark erhöhten hepatischen 8-oxo dG Spiegel in der Transgen vermittelten, konstitutiven Expression des AhR. Um diesen Sachverhalt aufzuklären bedarf es allerdings weiterer Forschung.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Daten stimmen mit Daten eine älteren Studie sehr gut überein, in der ebenfalls die 8-oxo dG Bildung nach akuter Exposition in weiblichen Sprague-Dawley Ratten untersucht wurde [Wyde *et al.* 2001b]. Auch Wyde *et al.* konnten nach akuter Gabe von 1 oder 3 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden keine Erhöhung hepatischer 8-oxo dG Gehalte beobachten (Abbildung 77). In dieser Studie waren ausschließlich weibliche Tiere verwendet worden.

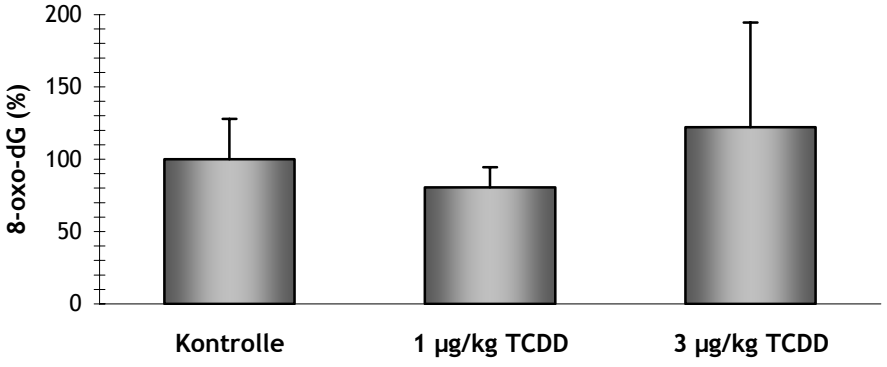


Abbildung 77 Effekte einer Einzeldosis TCDD (1 oder 3 µg/kg KG TCDD für 96 Stunden) auf die 8-oxo dG Bildung in weiblichen Sprague-Dawley Ratten [Wyde *et al.* 2001b]

Chronische TCDD Exposition (700 ng/kg KG TCDD wöchentlich für 30 Wochen) zwei Wochen nach einmaliger DEN-Initiation (175 mg/kg KG) verursachte allerdings einen deutlichen Anstieg der 8-oxo dG Levels nach 20 Wochen. Hoch signifikante 8-oxo dG Gehalte in der Leber der weiblichen Tiere konnten dagegen erst nach einer Expositionsdauer von 30

Wochen detektiert werden (Abbildung 78). Interessanterweise konnten keine erhöhten 8-oxo dG Werte in den Lebern von ovariektomierten Ratten gefunden werden. Wyde *et al.* vermuteten deswegen, dass die Bildung von 8-oxo dG nach TCDD Exposition im Langzeitexperiment bei Ratten geschlechtsspezifisch und estrogenabhängig ist [Wyde *et al.* 2001b].

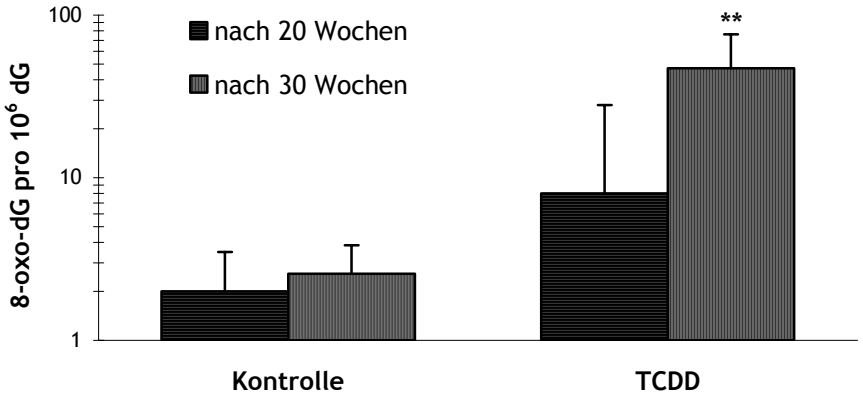


Abbildung 78 TCDD induzierte 8-oxo dG Bildung im Tumorpromotionsexperiment in weiblichen Sprague-Dawley Ratten (Initiation: 175 mg/kg KG DEN, Einzeldosis; Promotion: 700 ng/kg KG TCDD wöchentlich für 30 Wochen); (** = statistisch hoch signifikant, $p<0.01$) [Wyde *et al.* 2001b]

Möglicherweise hängt auch im *in-vivo* Experiment die ROS Bildung davon ab, wie stark TCDD als Induktor von CYP1A Enzymen wirkt. Die Daten korrelierten zwischen CYP1A vermittelter EROD Aktivität und ROS Bildungsvermögen nach akuter TCDD Kurzzeitbehandlung der Tiere (1 µg/kg KG bei der Maus bzw. 10 µg/kg KG bei der Ratte), was vermuten lässt, dass CYP1A Induktion auch hier eine Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies darstellt. Zumindest im Kurzzeitexperiment zeigte sich dabei kein offensichtlicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren.

Auf der anderen Seite zeigten die Daten aber auch, dass es sich *in-vivo* bei der TCDD vermittelten Induktion von 8-oxo dG in der DNA vermutlich um einen Langzeiteffekt handelt, der nicht ausschließlich von der TCDD Leberlast oder CYP1A Enzyminduktion abzuhängen scheint. Dies wird besonders deutlich wenn man Abbildung 78 betrachtet.

9.3 Analyse des ROS Bildungspotenzials individueller CYPs in Supersomes™

Mit Hilfe von Supersomes™ sollte die Frage der relativen ROS-Bildungsfähigkeit einzelner, rekombinant exprimierter CYP Enzyme im H_2DCFDA-Assay geklärt werden, da die Induktion von CYPs mittels AhR-Agonisten (z.B. TCDD) in einem zellulären System stets alle CYPs der AhR Genbatterie induziert. Durch Verwendung von Supersomes™, die individuelle CYPs exprimieren, sollte dieser Effekt ausgeschlossen werden und das Verhalten des einzelnen CYP Enzyms betrachtet werden. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob ausgewählte Testsubstanzen, evtl. durch Entkopplungsmechanismen am aktiven Enzym, die potenzielle ROS-Bildung einzelner CYP-Enzyme innerhalb des Supersomes™-Systems beeinflussen. Als Testsubstanzen wurden folgende Stoffe eingesetzt: 1 nM TCDD , 10 µM Benzo[a]pyren, 100 µM 8-Methoxypsoralen, 100 nM 17ß-Estradiol sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle.
Mittels EROD-Assay sollte zudem geklärt werden, ob – analog zu den Ergebnissen der *in-vivo* Untersuchungen - die katalytische Aktivität der rekombinant exprimierten CYP Enzyme mit der ROS-Bildung in den untersuchten Supersomes™ einhergeht.

Die Analyse des ROS Bildungsvermögens in Supersomes™ offenbarte große Unterschiede zwischen den individuellen CYP Enzymen. Das humane CYP1A1 produzierte mit Abstand am effektivsten reaktive Sauerstoffspezies. Dies verdeutlicht die kritische Rolle des Enzyms bei starker Induktion und Überexpression. Nicht geklärt werden konnte an dieser Stelle der Einfluss der CYP Reduktase in Bezug auf die freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies. Da bei den humanen CYP1A1 Supersomes™ auch mit Abstand die größte CYP Reduktase Aktivität exprimiert wird, könnte theoretisch die ROS Bildung auch von der Reduktase und nicht vom CYP Enzym vermittelt werden. Eine kritische Rolle der CYP Reduktase in Bezug auf Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wird ebenfalls in der Literatur diskutiert [Morehouse *et al.* 1984; Winston *et al.* 1984; Heine *et al.* 2006]. Diese Fragestellung müsste anhand weiterer Experimente geklärt werden.

Die Zugabe von TCDD und B[a]P, einem Substrat oder 8-MOP, einem Inhibitor bestimmter CYP Enzyme, wirkte jeweils antagonisierend auf die ROS Bildung. Auch die Zugabe von 17ß-Estradiol zu den Supersomes™ bewirkte eine Verminderung der ROS Bildung, obwohl in der Literatur postuliert wird, dass der 17ß-Estradiol Metabolit 4-Hydroxyestradiol durch Redoxcycling die ROS Bildung begünstigt [Shen *et al.* 1998; Barth *et al.* 1999; Badawi *et al.* 2001]. Auf der anderen Seite wird in der Literatur aber auch berichtet, dass Estrogene als

natürliche Antioxidantien wirksam sind, und somit die chemische Hepatokanzerogenese unterdrücken können [Taniguchi *et al.* 1994; Yagi 1997; Shimizu *et al.* 1998].
Die Zugabe von 17ß-Estradiol zu den verschiedenen Supersomes™ zeigte bei allen untersuchten Enzymen eine Verminderung des oxidativen Stresses. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch direkte Zugabe von 17ß-Estradiol zum Supersomes™ System vermutlich nicht unmittelbar bzw. nicht genügend 4-Hydroxyestradiol entsteht, das einem Redoxcycling unterliegt und somit ROS generieren könnte. Es könnte also sein, dass 4-Hydroxyestradiol und der damit verbundene oxidative Stress eher als Langzeitkonsequenz bei der TCDD vermittelten Hepatokanzerogenese der Ratte eine Rolle spielt.

Die individuelle CYP Aktivität korrelierte mit Ausnahme der Ratte CYP1A1 Supersomes™ gut mit der katalytischen Aktivität des Enzyms. Dies bestärkt die Hypothese, dass die ROS Bildung nach TCDD Exposition eine Konsequenz der AhR vermittelten CYP Induktion darstellt. Unklar bleibt die Divergenz zwischen ROS Bildung und EROD Aktivität in den CYP1A1 Supersomes™ der Ratte, zumal ein klarer Zusammenhang zwischen CYP1A Induktion und ROS Bildung in primären Rattenhepatozyten *in-vitro* gezeigt werden konnte [Knerr *et al.* 2006].

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der Supersomes™ Experimente bestätigten generell die Hypothese, dass TCDD induzierte CYPs eine potenzielle Quelle für ROS darstellen. Interessanterweise wurde die höchste, relative ROS Bildungseffizienz beim humanen CYP1A1 Enzym festgestellt. Dem entgegen steht die Tatsache, dass in den humanen HepG2 Zellen keine deutliche Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies nach TCDD Behandlung nachgewiesen werden konnte [Knerr *et al.* 2006]. Andererseits muss man bedenken, dass CYP1A1, im Gegensatz zum Nager, beim Menschen lediglich in extrahepatischen Geweben, z.B. in der Lunge stark induzierbar ist. In der Leber hingegen ist es beim gesunden Menschen kaum nachweisbar [Xu *et al.* 2000]. Generell bleibt zu betonen, dass die Induktionspotenz hepatischer, humaner CYP1A Enzyme, nach Exposition mit einem geeigneten Induktor, wesentlich schwächer ausgeprägt ist als die analoge Induktionspotenz hepatischer CYP1A Enzyme der Ratte [Xu *et al.* 2000; Zeiger *et al.* 2001; Silkworth *et al.* 2005]. Man könnte also darüber spekulieren, was die Konsequenz einer hohen TCDD Exposition beim Menschen wäre, wenn in der menschlichen Leber nicht nur CYP1A2, sondern auch CYP1A1 AhR-abhängig stark induziert werden würde. Vermutlich wäre das Ausmaß an oxidativem Stress noch viel stärker ausgeprägt als es unter den gegebenen Bedingungen der Fall ist. Falls es tatsächlich einen kausalen Zusammenhang zwischen TCDD Exposition, CYP1A Induktion und Kanzerogenität geben sollte, erscheint eine direkte

Extrapolation der gefundenen Ergebnisse bei der Ratte hinsichtlich einer Risikobewertung beim Menschen fragwürdig. Zur Klärung der TCDD abhängigen hepatischen DNA Schädigung und Kanzerogenese bedarf es daher unbedingt weiterer Forschung.

9.4 Microarraytechnik zum Nachweis der Genexpression in der Leber von TCDD behandelten- und transgenen CA-AhR Mäusen

Die Entwicklung in der Nukleinsäure-Arraytechnologie macht es inzwischen möglich, die Expression einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment zu untersuchen.
Isolierte RNA aus den Lebern von TCDD behandelten C57B6 Mäusen sowie aus der transgenen Mauslinie CA-AhR wurde mit Hilfe von cDNA Microarrays (GEArray™ Q Series Gene Expression Array „Stress and Toxicity“ der Firma Superarray) auf Veränderungen der Genexpressionsmuster im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen untersucht. Diese Arrays geben Auskunft über die Expression von Genen, die an Stress- und Toxifizierungsprozessen beteiligt sind. Die Analyse der Arrays sollte Hinweise auf gentoxischen bzw. oxidativen Stress und andere prokarzinogene Veränderungen in der Leber der Tiere als Konsequenz der TCDD Exposition bzw. der konstitutiven Expression des AhR geben.

Die meisten Gene wurden in der Kategorie „oxidativer und metabolischer Stress“ reguliert. Dass die Gene der CYP1 Familie durch TCDD bzw. konstitutive AhR Expression induziert werden, war vorauszusehen. Die Auswertung der Microarrays zeigte deutlich, dass die CYP1A1 Induktion in der Leber der transgenen Mauslinie CA-AhR weitaus weniger ausgeprägt ist als in den TCDD behandelten Mäusen. Dieser Sachverhalt konnte bereits mittels Real-time PCR, Western Blot und im EROD Assay gezeigt werden und wird durch die Microarray Daten bestätigt.

Bei den TCDD behandelten Tieren wurden 14 Gene in ihrer Expression verändert, bei den transgenen CA-AhR Mäusen waren es dagegen 27. Die TCDD Behandlung verursachte überwiegend eine Regulierung der Genexpression nach oben. Nur wenige Gene wurden herunter reguliert. Bei der CA-AhR Linie war genau das Gegenteil der Fall, von den 27 regulierten Genen waren nur 10 nach oben reguliert.
Die Scatterplots stellen eine graphische Übersicht der Genexpression aller Gene des Arrays dar. Diese Bilder verdeutlichen, dass die individuelle Genexpression der betrachteten Gene nach TCDD Behandlung, verglichen mit der Expression der CA-AhR in der Leber durchschnittlich viel näher an der eingezeichneten roten Trendlinie liegt. Dies bedeutet, dass sich die meisten Gene nach TCDD Behandlung in Ihrer Expression nicht von der zugehörigen Kontrolle unterschieden.

Es stellt sich in diesem Zusammenhang natürlich die Frage, weshalb die konstitutive Expression des AhR mit solch vielfältigen Veränderungen der Genexpression einhergeht, die

Liganden abhängige Induktion des AhR aber verhältnismäßig wenige Gene reguliert, die an Stress und Toxifizierungsprozessen in der Leber beteiligt sind.

Geht man von der Hypothese aus, dass die AhR vermittelte Induktion von CYP1A Enzymen *in vivo* im Zielorgan Leber zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, müssten die TCDD behandelten Tiere, bedingt durch die wesentlich höhere CYP1A1 Induktion, einem höheren oxidativen Stress ausgeliefert sein als die CA-AhR Tiere.
Die konstitutive Expression des AhR in der transgenen CA-AhR Linie ist allerdings ein Prozess der zeitlebens in diesen Mäusen stattgefunden hat. Die Verabreichung von TCDD hingegen erfolgte als einmalige Dosis, die Tiere wurden 96 Stunden danach getötet. Genau genommen dürfte man also die gefundenen Ergebnisse gar nicht direkt miteinander vergleichen. Der direkte Vergleich zeigte jedoch, dass die permanente, konstitutive Expression des AhR mit einer Reihe von Stressreaktionen verbunden ist, die im Kurzzeitexperiment (TCDD Behandlung) nicht beobachtet werden konnten. Der Langzeiteffekt, bedingt durch die konstitutive AhR Aktivität, könnte also wiederum für die hohen 8-oxo dG Gehalte mitverantwortlich sein, die in den Lebern der CA-AhR Mäuse nachgewiesen wurden. Dies wäre auch stimmig mit den bereits diskutierten Ergebnissen von Wyde *et al.*, die eine Erhöhung der hepatischen 8-oxo dG Levels bei weiblichen Ratten erst nach chronischer TCDD Behandlung im Langzeitexperiment nachweisen konnten. Auch bei diesem Experiment war der AhR in der Leber der Tiere, wenn auch über den klassischen, ligandvermittelten Mechanismus, permanent aktiviert.
Allerdings müsste man dann konsequenterweise für die CA-AhR Linie folgern, dass keine massive, akute CYP1A Induktion für eine hohe ROS Produktion bzw. 8-oxo dG Generierung notwendig ist, sondern vielmehr eine permanente, langfristige Induktion des AhR bzw. dessen induzierbarer „Genbatterie“.

Auch im Bereich „Apoptose Signalling“ wurden mehrere Gene in ihrer Expression verändert. Die Arraydaten zeigten, dass durch die Aktivierung des AhR eine Reihe von Genen reguliert werden, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, wie z.B. die antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bax, sowie die Caspase-1. Diese drei Gene waren sowohl in den Lebern der TCDD behandelten Tiere als auch in der CA-AhR Linie hochreguliert.
Effekte von TCDD auf apoptotische Prozessen wurden bereits *in-vitro* und *in-vivo* beschrieben [Schrenk *et al.* 2004]. In präneoplastischem Lebergewebe der Ratte führt die Behandlung mit TCDD zu einer Abnahme der Apoptoseinzidenz [Stinchcombe *et al.* 1995]. Auch in primären Hepatozyten der Ratte und in humanen Zelllinien bewirkt die Behandlung mit TCDD eine Verminderung der UV-induzierten Apoptose [Wörner und Schrenk 1996; Park

und Matsumura 2006]. In neueren Arbeiten konnte auch mittels Microarraytechnik ein Zusammenhang zwischen TCDD Exposition und apoptotischen Prozessen gezeigt werden [Zeytun *et al*. 2002; Boverhof *et al*. 2005].

Die Induktion von oxidativem Stress kann ebenfalls zur Auslösung apoptotischer Prozesse führen. Werden Zellen durch den Einfluss von ROS irreparabel geschädigt, kann p53 die Apoptose induzieren. Zur Zellzyklusarretierung induziert p53 die Bildung des CDK-Inhibitors p21 und das Retinoblastomprotein wird nicht hyperphosphoryliert. Dadurch wird die Replikation blockiert. Der G1-Arrest ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden oder die Einleitung des Zelltodes durch die Induktion von Bax. Sowohl bei den TCDD behandelten Tieren als auch bei den CA-AhR Mäusen konnte eine Hochregulierung von Bax gezeigt werden.

Dass ein Zusammenhang zwischen TCDD Expositition, Generierung von oxidativem Stress sowie Apoptose besteht, konnte anhand der Microarrays dokumentiert werden.

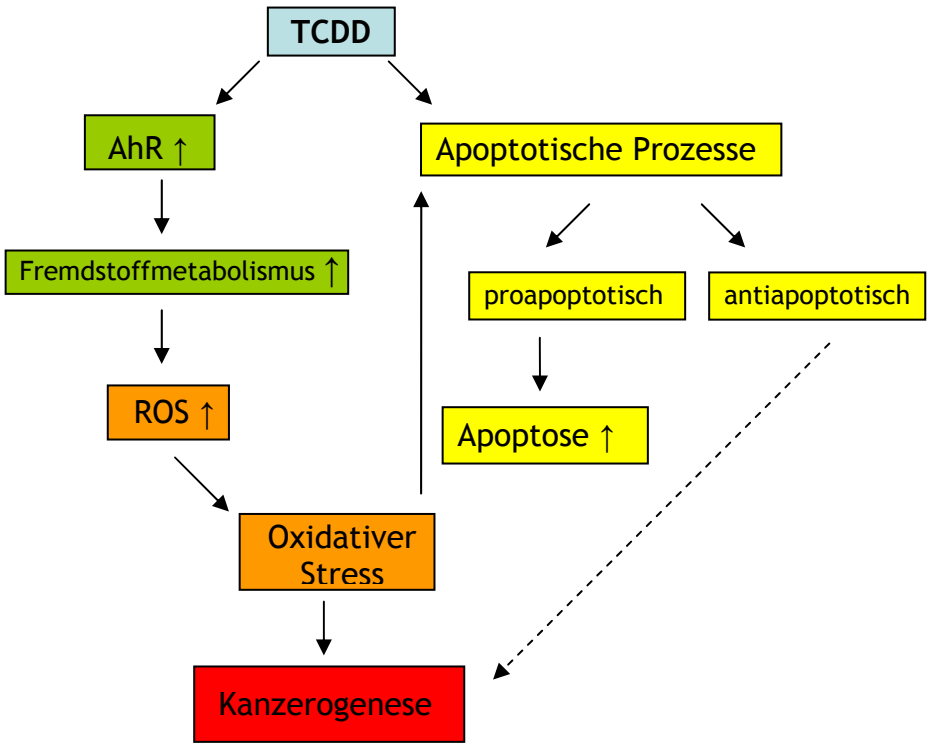


Abbildung 79 Schematische Darstellung von Prozessen, die an der kanzerogenen Wirkung von TCDD beteiligt sein könnten

Abbildung 79 zeigt eine zusammenfassende, schematische Darstellung von Prozessen, die zur kanzerogenen Wirkung von TCDD beitragen könnten und die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet wurden.

Zur Erhärtung dieser Ergebnisse müsste für alle Gene, bei denen eine Regulierung gezeigt werden konnte, nochmals die individuelle Expression mittels quantitativer Real-time PCR überprüft werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Zusammengefasst lässt sich für die Analyse der Microarraydaten folgendes festhalten: Eine (permanente) Aktivierung des AhR führt einerseits in der Leber von Mäusen zu einem erhöhten oxidativen Stress. Andererseits scheinen pro- und antiapoptotische Signalwege mit diesem Prozess assoziiert zu sein, möglicherweise als Konsequenz des induzierten oxidativen Stresses.

10 Zusammenfassung

Die Kanzerogenität von Dioxinen ist bisher am besten an der „Prototyp“-Verbindung 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) untersucht worden. TCDD wurde im Jahr 1997 von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Klasse I Kanzerogen eingestuft, obwohl bislang die Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD noch nicht hinreichend geklärt werden konnten.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass TCDD über die durch den AhR massiv vermittelte Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Phase I Enzymen, vor allem von CYP1A1, zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche die DNA schädigen können und potenziell mutagen sind.

Die Induktion von Phase I Enzymen über den AhR (z.B. mit dem Liganden TCDD) ist meist mit der vermehrten Expression einer Reihe anderer, AhR regulierter Gene verbunden. Induziert man nicht mit einem AhR-Liganden, ergibt sich die Schwierigkeit bei den Untersuchungen, dass lediglich eine sehr geringe konstitutive Expression von CYP1A1 in gesundem, unbehandeltem Gewebe stattfindet. Somit ist es schwierig vorauszusagen, welchen Anteil die katalytisch aktiven CYP Enzyme an der ROS-Bildung nach AhR-vermittelter Genexpression (in Abwesenheit eines induzierenden Liganden) tragen.

Deswegen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein System entwickelt, das ausreichend große Mengen an CYP1A1 exprimieren sollte ohne dass zuvor eine das Studienergebnis möglicherweise verfälschende Behandlung mit einem AhR-Agonisten (z.B. TCDD) stattgefunden hat. Ziel war die Etablierung eines geeigneten *in-vivo* Systems, nämlich die Erzeugung einer transgenen, humanes CYP1A1 überexprimierenden Maus.
Dazu wurde zunächst ein Expressionsvektor kloniert, der die coding sequence des humanen CYP1A1 beinhaltete. Die Expression des Transgens wurde als Tet-off System generiert. Die codierende Information des Vektors wurde mittels Pronucleus-Injektionstechnik in NMRI Mäuse transferiert. Die identifizierten, hCYP1A1 transgenen F0 Founder wurden mit zwei unabhängigen, tTA exprimierenden Mauslinien verpaart. Doppelt-transgene F1 Founder wurden zur Charakterisierung der Transgen-Expression verwendet.

Das humane CYP1A1 Transgen wurde in beiden transgenen Mauslinien nicht wie erwartet exprimiert, obwohl die Integration in das Genom der Mäuse zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Zwar konnte eine Induktion von hCYP1A1 in verschiedenen Organen der Mäuse auf mRNA Ebene nachgewiesen werden, allerdings wurde im Vergleich zu Wildtyp

Tieren weder eine Steigerung der CYP1A1 Proteinmenge noch deren katalytischer Aktivität erzielt.
Des weiteren wurde die Expression des AhR Repressors (AhRR) in verschiedenen Organen der transgenen Tiere untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die rekombinante CYP1A1 Expression in Säugerzellen durch einen Repressionsmechanismus verhindert wird, der in Zusammenhang mit der AhR Expression steht. Es konnten erste Hinweise darauf gefunden werden, allerdings konnte die Fragestellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *in vivo* Untersuchungen hinsichtlich oxidativem Stress und DNA-Schädigung an TCDD behandelten C57B6 Mäusen und Sprague-Dawley Ratten bzw. an deren entsprechenden Kontrollen, sowie an transgenen Mäusen mit konstitutiv aktivem AhR (mittels der transgenen Mauslinie CA-AhR) durchgeführt. Die CA-AhR Linie bot eine weitere Möglichkeit, die Auswirkungen der AhR-vermittelten Genexpression ohne Verwendung eines AhR-Liganden *in-vivo* zu untersuchen.
Als Messparameter für oxidativen Stress wurde der auf Fluoreszenz basierende H_2DCFDA Assay im 96 Well Format etabliert. Als Marker für oxidative DNA-Schäden wurde der Gehalt an 8-oxo dG in genomischer DNA individueller Proben quantifiziert.
Ob evtl. erhöhte ROS Gehalte bzw. DNA Schäden nach TCDD Expostition in einen direkten Zusammenhang mit AhR-regulierten CYP1A Induktion stehen wurde durch die Analyse der katalytischen CYP1A Aktivität mittels EROD-Assay überprüft.

Die gefundenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die ROS Bildung möglicherweise auch im *in-vivo* Experiment davon abhängt, wie stark TCDD als Induktor von CYP1A Enzymen wirkt. Die Daten korrelierten zwischen CYP1A vermittelter EROD Aktivität und ROS Bildungsvermögen nach akuter TCDD Kurzzeitbehandlung der Tiere (1 µg/kg KG bei der Maus bzw. 10 µg/kg KG bei der Ratte). Dies ließ vermuten, dass die Induktion von CYP1A auch hier eine Haupt-quelle für reaktive Sauerstoffspezies darstellt. Zumindest im Kurzzeitexperiment zeigte sich dabei kein offensichtlicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Auf der anderen Seite zeigten die Daten aber auch, dass es sich *in-vivo* bei der TCDD vermittelten Induktion von oxidativen DNA-Schäden vermutlich um einen chronischen Langzeiteffekt handelt, der nicht ausschließlich von TCDD Leberlast oder CYP1A Enzym-induktion abzuhängen scheint.

Mit Hilfe von Mikrosomen (Supersomes™) aus stabil transfizierten Insektenzellen, die verschiedene CYP Enzyme des Menschen und der Ratte rekombinant exprimieren, wurde

das individuelle ROS-Bildungspotenzial einzelner, AhR-regulierter CYP-Enzyme mittels H_2DCFDA Assay untersucht.
Die Supersomes™ Experimente bestätigten generell die Hypothese, dass TCDD induzierte CYPs eine potenzielle Quelle für ROS darstellen. Die Zugabe von TCDD, B[a]P, 8-MOP oder 17ß-Estradiol wirkte generell antagonisierend auf die ROS Bildung. Die individuelle CYP Aktivität korrelierte mit einer Ausnahme gut mit der katalytischen Aktivität des Enzyms. Die Analyse des ROS Bildungsvermögens offenbarte große Unterschiede zwischen den individuellen CYP Enzymen. Generell konnte die Hypothese bestärkt werden, dass die ROS Bildung nach TCDD Exposition eine Konsequenz der AhR vermittelten CYP Induktion darstellt.

Isolierte RNA aus den Lebern von Mäusen wurde mit Hilfe von Microarrays auf Veränderungen der Genexpressionsmuster untersucht, die Hinweise auf gentoxischen bzw. oxidativen Stress und andere prokarzinogene Veränderungen als Konsequenz einer TCDD Exposition bzw. der konstitutiven Aktivität des AhR geben sollten.
Die (permanente) Aktivierung des AhR führte einerseits in der Leber von Mäusen generell zu einem erhöhten oxidativen Stress. Andererseits konnte gezeigt werden, dass pro- und antiapoptotische Signalwege an diesem Prozess beteiligt zu sein scheinen, möglicherweise als Konsequenz des induzierten oxidativen Stresses.

11 Literaturverzeichnis

Abbott B.D., Perdew G.H. und Birnbaum L.S. (1994). Ah receptor in embryonic mouse palate and effects of TCDD on receptor expression. *Toxicol Appl Pharmacol* **126**, 16-25.

Abbott B.D.B., L. S. (1990). TCDD-induced altered expression of growth factors may have a role in producing cleft palate and enhancing the incidence of clefts after coadministration of retinoic acid and TCDD. *Toxicol Appl Pharmacol* **106**, 418-432.

Adams J.M. und Cory S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* **26**, 61-66.

Ahlborg V.G.B., G.C.; Birnbaum, L.S.; Brower, A.; Derks, H.J.G.M.; Feeley, M.; Golor, C.; Hanberg, A.; Larsen, J.C.; Liem, A.K.D.; Safe, S.H.; Schlatter, C.; Waern, F.; Younes, M.; Yrankeikki, E. (1994). Toxic Equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* **28**, 1049-1067.

Albanese C., Hulit J., Sakamaki T. und Pestell R.G. (2002). Recent advances in inducible expression in transgenic mice. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 129-141.

Allen J.R., Barsotti D.A., Lambrecht L.K. und Van Miller J.P. (1979). Reproductive effects of halogenated aromatic hydrocarbons on nonhuman primates. *Ann N Y Acad Sci* **320**, 419-425.

Alsharif N.Z., Lawson T. und Stohs S.J. (1994). Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. *Toxicology* **92**, 39-51.

Andersson P., McGuire J., Rubio C., Gradin K., Whitelaw M.L., Pettersson S., Hanberg A. und Poellinger L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9990-9995.

Angus W.G., Larsen M.C. und Jefcoate C.R. (1999). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* **20**, 947-955.

Anttila S., Tuominen P., Hirvonen A., Nurminen M., Karjalainen A., Hankinson O. und Elovaara E. (2001). CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics* **11**, 501-509.

Anzenbacher P. und Anzenbacherova E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* **58**, 737-747.

Astroff B., Zacharewski T., Safe S., Arlotto M.P., Parkinson A., Thomas P. und Levin W. (1988). 6-Methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin antagonist: inhibition of the induction of rat cytochrome P-450 isozymes and related monooxygenase activities. *Mol Pharmacol* **33**, 231-236.

ATSDR A.f.T.S.a.D.R. (1998). Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-dioxins. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Aylward L.L., Brunet R.C., Carrier G., Hays S.M., Cushing C.A., Needham L.L., Patterson D.G., Jr., Gerthoux P.M., Brambilla P. und Mocarelli P. (2005a). Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **15**, 51-65.

Aylward L.L., Brunet R.C., Starr T.B., Carrier G., Delzell E., Cheng H. und Beall C. (2005b). Exposure reconstruction for the TCDD-exposed NIOSH cohort using a concentration- and age-dependent model of elimination. *Risk Anal* **25**, 945-956.

Baba T., Mimura J., Gradin K., Kuroiwa A., Watanabe T., Matsuda Y., Inazawa J., Sogawa K. und Fujii-Kuriyama Y. (2001). Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* **276**, 33101-33110.

Backlund M. und Ingelman-Sundberg M. (2004). Different structural requirements of the ligand binding domain of the aryl hydrocarbon receptor for high- and low-affinity ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol* **65**, 416-425.

Backlund M., Johansson I., Mkrtchian S. und Ingelman-Sundberg M. (1997). Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J Biol Chem* **272**, 31755-31763.

Backlund M., Weidolf L. und Ingelman-Sundberg M. (1999). Structural and mechanistic aspects of transcriptional induction of cytochrome P450 1A1 by benzimidazole derivatives in rat hepatoma H4IIE cells. *Eur J Biochem* **261**, 66-71.

Badawi A.F., Cavalieri E.L. und Rogan E.G. (2001). Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism* **50**, 1001-1003.

Baker T.K., Kwiatkowski A.P., Madhukar B.V. und Klaunig J.E. (1995). Inhibition of gap junctional intercellular communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in rat hepatocytes. *Carcinogenesis* **16**, 2321-2326.

Barth A., Landmann G., Liepold K., Zapf H., Muller D., Karge E. und Klinger W. (1999). Influence of oestrogens on formation of reactive oxygen species in liver microsomes of differently aged male Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol* **51**, 282-288.

Bastomsky G. (1977a). Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiter in rats after single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology* **101**, 292-296.

Bastomsky G.H. (1977b). Enhanced thyroxine metabolism and high uptake goiter in rats after single dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Endocrinology* **101**, 292-296.

Becher H., Flesch-Janys D., Kauppinen T., Kogevinas M., Steindorf K., Manz A. und Wahrendorf J. (1996). Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* **7**, 312-321.

Beck J.A., Lloyd S., Hafezparast M., Lennon-Pierce M., Eppig J.T., Festing M.F. und Fisher E.M. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* **24**, 23-25.

Beebe L.E., Anver M.R., Riggs C.W., Fornwald L.W. und Anderson L.M. (1995a). Promotion of N-nitrosodimethylamine-initiated mouse lung tumors following single or multiple low dose exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Carcinogenesis* **16**, 1345-1349.

Beebe L.E., Fornwald L.W., Diwan B.A., Anver M.R. und Anderson L.M. (1995b). Promotion of N-nitrosodiethylamine-initiated hepatocellular tumors and hepatoblastomas by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or Aroclor 1254 in C57BL/6, DBA/2, and B6D2F1 mice. *Cancer Res* **55**, 4875-4880.

Bell D.R. und Poland A. (2000). Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J Biol Chem* **275**, 36407-36414.

Berg J.M., Tymoczko J.L. und Stryer L. (2001). *Biochemistry*. W.H. Freeman & Co, New York.

Bernshausen T., Jux B., Esser C., Abel J. und Fritsche E. (2005). Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch Toxicol*, 1-6.

Berry D.L., DiGiovanni J., Juchau M.R., Bracken W.M., Gleason G.L. und Slaga T.J. (1978). Lack of tumor-promoting ability of certain environmental chemicals in a two-stage mouse skin tumorigenesis assay. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **20**, 101-108.

Bertazzi P., Pesatori A. und Consonni D. (1993). Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin. *Epidemiology* **4**, 398-406.

Bertazzi P.A., Bernucci I., Brambilla G., Consonni D. und Pesatori A.C. (1998). The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 2**, 625-633.

Bertazzi P.A., Consonni D., Bachetti S., Rubagotti M., Baccarelli A., Zocchetti C. und Pesatori A.C. (2001). Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* **153**, 1031-1044.

Bertazzi P.A., Pesatori A.C., Zocchetti C. und Latocca R. (1989a). Mortality study of cancer risk among oil refinery workers. *Int Arch Occup Environ Health* **61**, 261-270.

Bertazzi P.A., Zocchetti C., Guercilena S., Consonni D., Tironi A., Landi M.T. und Pesatori A.C. (1997). Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident". *Epidemiology* **8**, 646-652.

Bertazzi P.A., Zocchetti C., Pesatori A.C., Guercilena S., Consonni D., Tironi A. und Landi M.T. (1992). Mortality of a young population after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin. *Int J Epidemiol* **21**, 118-123.

Bertazzi P.A., Zocchetti C., Pesatori A.C., Guercilena S., Sanarico M. und Radice L. (1989b). Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol* **129**, 1187-1200.

Bhagwat S.V., Biswas G., Anandatheerthavarada H.K., Addya S., Pandak W. und Avadhani N.G. (1999). Dual targeting property of the N-terminal signal sequence of P4501A1. Targeting of heterologous proteins to endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem* **274**, 24014-24022.

Bishop J.O. und Smith P. (1989). Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol Biol Med* **6**, 283-298.

Bjeldanes L.F., Kim J.Y., Grose K.R., Bartholomew J.C. und Bradfield C.A. (1991). Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9543-9547.

Blanck J., Ristau O., Zhukov A.A., Archakov A.I., Rein H. und Ruckpaul K. (1991). Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. *Xenobiotica* **21**, 121-135.

Blau H.M. und Rossi F.M. (1999). Tet B or not tet B: advances in tetracycline-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 797-799.

Blom W.M. (2000). Cell death in rat hepatocytes. Apoptosis-inducing and -protective mechanisms. In *Division of Toxicology, Leiden-Amsterdam Center for Drug-Research (LACDR)*. Leiden University, Leiden, The Netherlands.

Bock K.W. (1994). Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **125**, 1-42.

Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C., Fees S., Fraser S., Eshkind L., Oesch F. und Zabel B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* **11**, 115-132.

Bonnesen C., Eggleston I.M. und Hayes J.D. (2001). Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* **61**, 6120-6130.

Boucher P.D., Piechocki M.P. und Hines R.N. (1995). Partial characterization of the human CYP1A1 negatively acting transcription factor and mutational analysis of its cognate DNA recognition sequence. *Mol Cell Biol* **15**, 5144-5151.

Boucher P.D., Ruch R.J. und Hines R.N. (1993). Specific nuclear protein binding to a negative regulatory element on the human CYP1A1 gene. *J Biol Chem* **268**, 17384-17391.

Boverhof D.R., Burgoon L.D., Tashiro C., Chittim B., Harkema J.R., Jump D.B. und Zacharewski T.R. (2005). Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-Mediated hepatotoxicity. *Toxicol Sci* **85**, 1048-1063.

Bradfield C.A., Glover E. und Poland A. (1991). Purification and N-terminal amino acid sequence of the Ah receptor from the C57BL/6J mouse. *Mol Pharmacol* **39**, 13-19.

Bradshaw T.D., Trapani V., Vasselin D.A. und Westwell A.D. (2002). The aryl hydrocarbon receptor in anticancer drug discovery: friend or foe? *Curr Pharm Des* **8**, 2475-2490.

Brake P.B., Zhang L. und Jefcoate C.R. (1998). Aryl hydrocarbon receptor regulation of cytochrome P4501B1 in rat mammary fibroblasts: evidence for transcriptional repression by glucocorticoids. *Mol Pharmacol* **54**, 825-833.

Buchmann A., Stinchcombe S., Korner W., Hagenmaier H. und Bock K.W. (1994). Effects of 2,3,7,8-tetrachloro- and 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin on the proliferation of preneoplastic liver cells in the rat. *Carcinogenesis* **15**, 1143-1150.

Bueno de Mesquita H.B., Doornbos G., Van der Kuip D.A., Kogevinas M. und Winkelmann R. (1993). Occupational exposure to phenoxy herbicides and chlorophenols and cancer mortality in The Netherlands. *Am J Ind Med* **23**, 289-300.

Buters J.T., Shou M., Hardwick J.P., Korzekwa K.R. und Gonzalez F.J. (1995). cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP1A1 using baculovirus. Purification, dependency on NADPH-P450 oxidoreductase, and reconstitution of catalytic properties without purification. *Drug Metab Dispos* **23**, 696-701.

Cadet J., Bourdat A.G., D'Ham C., Duarte V., Gasparutto D., Romieu A. und Ravanat J.L. (2000). Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* **462**, 121-128.

Calvert G.M., Hornung R.W., Sweeney M.H., Fingerhut M.A. und Halperin W.E. (1992). Hepatic and gastrointestinal effects in an occupational cohort exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin. *Jama* **267**, 2209-2214.

Caramaschi F., del Corno G., Favaretti C., Giambelluca S.E., Montesarchio E. und Fara G.M. (1981). Chloracne following environmental contamination by TCDD in Seveso, Italy. *Int J Epidemiol* **10**, 135-143.

Carver L.A., Hogenesch J.B. und Bradfield C.A. (1994). Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Res* **22**, 3038-3044.

Cathcart R., Schwiers E. und Ames B.N. (1983). Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* **134**, 111-116.

Cauchi S., Stucker I., Solas C., Laurent-Puig P., Cenee S., Hemon D., Jacquet M., Kremers P., Beaune P. und Massaad-Massade L. (2001). Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Carcinogenesis* **22**, 1819-1824.

Cayama E., Tsuda H., Sarma D.S. und Farber E. (1978). Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. *Nature* **275**, 60-62.

Chahoud I., Krowke R., Schimmel A., Merker H.J. und Neubert D. (1989). Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects of high doses on the fertility of male rats. *Arch Toxicol* **63**, 432-439.

Chan W.K., Chu R., Jain S., Reddy J.K. und Bradfield C.A. (1994). Baculovirus expression of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocater. Evidence for additional dioxin responsive element-binding species and factors required for signaling. *J Biol Chem* **269**, 26464-26471.

Chang C.Y. und Puga A. (1998). Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol* **18**, 525-535.

Clark G.C., Taylor M.J., Tritscher A.M. und Lucier G.W. (1991a). Tumor necrosis factor involvement in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated endotoxin hypersensitivity in C57BL/6J mice congenic at the Ah locus. *Toxicol Appl Pharmacol* **111**, 422-431.

Clark G.C., Tritscher A., Maronpot R., Foley J. und Lucier G.W. (1991b). Tumor promotion by TCDD in female rats. In *Biological Basis for Risk Assessment of Dioxins and Related Compounds (Banbury Report 35, p. 389-404)*. (S. R. Gallo MA, van der Heijden KA, Ed.). CSH Press, NY.

Crow K.D. (1978). Chloracne--an up to date assessment. *Ann Occup Hyg* **21**, 297-298.

Cummings A.M., Metcalf J.L. und Birnbaum L. (1996). Promotion of endometriosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats and mice: time-dose dependence and species comparison. *Toxicol Appl Pharmacol* **138**, 131-139.

Curtin J.F. und Cotter T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* **15**, 983-992.

Dalton T.P., Puga A. und Shertzer H.G. (2002). Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact* **141**, 77-95.

Danielson P.B. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* **3**, 561-597.

Delescluse C., Lemaire G., de Sousa G. und Rahmani R. (2000). Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* **153**, 73-82.

Della Porta G., Dragani T.A. und Sozzi G. (1987). Carcinogenic effects of infantile and long-term 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treatment in the mouse. *Tumori* **73**, 99-107.

Denison M.S. und Heath-Pagliuso S. (1998). The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals. *Bull Environ Contam Toxicol* **61**, 557-568.

Denison M.S. und Nagy S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 309-334.

Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P. und Bonati L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* **141**, 3-24.

Denning C. und Priddle H. (2003). New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction* **126**, 1-11.

Diliberto J.J., Burgin D. und Birnbaum L.S. (1997). Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin: studies using CYP1A2 knock-out mice. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 431-433.

Diliberto J.J., Burgin D.E. und Birnbaum L.S. (1999). Effects of CYP1A2 on disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 2,2',4, 4',5,5'-hexachlorobiphenyl in CYP1A2 knockout and parental (C57BL/6N and 129/Sv) strains of mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **159**, 52-64.

Dizdaroglu M. (2003). Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* **531**, 109-126.

Dragan Y.P., Rizvi T., Xu Y.H., Hully J.R., Bawa N., Campbell H.A., Maronpot R.R. und Pitot H.C. (1991). An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. *Fundam Appl Toxicol* **16**, 525-547.

Dragan Y.P. und Schrenk D. (2000). Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit Contam* **17**, 289-302.

Dragan Y.P., Xu X.H., Goldsworthy T.L., Campbell H.A., Maronpot R.R. und Pitot H.C. (1992). Characterization of the promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the female rat. *Carcinogenesis* **13**, 1389-1395.

Eisenbrand G. und Metzler M. (2002). *Toxikologie für Naturwissenschaflter und Mediziner*. Wiley VCH, Weinheim.

Enan E. und Matsumura F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* **52**, 1599-1612.

Epe B. (1996). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **127**, 223-249.

Fingerhut M.A., Halperin W.E., Marlow D.A., Piacitelli L.A., Honchar P.A., Sweeney M.H., Greife A.L., Dill P.A., Steenland K. und Suruda A.J. (1991). Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *N Engl J Med* **324**, 212-218.

Flesch-Janys D., Berger J., Gurn P., Manz A., Nagel S., Waltsgott H. und Dwyer J.H. (1995). Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality in a cohort of workers from a herbicide-producing plant in Hamburg, Federal Republic of Germany. *Am J Epidemiol* **142**, 1165-1175.

Flesch-Janys D., Steindorf K., Gurn P. und Becher H. (1998). Estimation of the cumulated exposure to polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans and standardized mortality ratio analysis of cancer mortality by dose in an occupationally exposed cohort. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 2**, 655-662.

Flodstrom S. und Ahlborg U. (1989a). Tumour promoting effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): Effects of exposure duration, administration schedule and type of diet. *Chemosphere* **19**, 779-783.

Flodstrom S. und Ahlborg U.T. (1989b). Tumour promoting effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) – Effects of exposure duration, administration schedule and type of diet. *Chemosphere* **19**, 779-783.

Flodstrom S., Busk L., Kronevi T. und Ahlborg U.G. (1991). Modulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and phenobarbital-induced promotion of hepatocarcinogenesis in rats by the type of diet and vitamin A deficiency. *Fundam Appl Toxicol* **16**, 375-391.

Fontaine F., Delescluse C., de Sousa G., Lesca P. und Rahmani R. (1999). Cytochrome 1A1 induction by primaquine in human hepatocytes and HepG2 cells: absence of binding to the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol* **57**, 255-262.

Frugier T., Koishi K., Matthaei K.I. und McLennan I.S. (2005). Transgenic mice carrying a tetracycline-inducible, truncated transforming growth factor beta receptor (TbetaRII). *Genesis* **42**, 1-5.

Fürst P., Krüger C. und Meemken H. (1989). PCDD and PCDF levels in human milk - dependence on the period of lactation. *Chemosphere* **18**, 439-444.

Furth P.A., St Onge L., Boger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H. und Hennighausen L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9302-9306.

Gasiewicz T.A., Geiger L.E., Rucci G. und Neal R.A. (1983). Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. *Drug Metab Dispos* **11**, 397-403.

Gewies A. (2003). Introduction to Apoptosis. http://www.celldeath.de/encyclo/index.html

Gierthy J.F., Lincoln D.W., 2nd, Kampcik S.J., Dickerman H.W., Bradlow H.L., Niwa T. und Swaneck G.E. (1988). Enhancement of 2- and 16 alpha-estradiol hydroxylation in MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 515-520.

Gillner M., Bergman J., Cambillau C., Alexandersson M., Fernstrom B. und Gustafsson J.A. (1993). Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rat liver. *Mol Pharmacol* **44**, 336-345.

Gillner M., Brittebo E.B., Brandt I., Soderkvist P., Appelgren L.E. und Gustafsson J.A. (1987). Uptake and specific binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the olfactory mucosa of mice and rats. *Cancer Res* **47**, 4150-4159.

Giri A.K. (1986). Mutagenic and genotoxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, a review. *Mutat Res* **168**, 241-248.

Goldstein J.A., Hickman P., Bergman H. und Vos J.G. (1973). Hepatic porphyria induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the mouse. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **6**, 919-928.

Goldstein J.A. und Linko P. (1984). Differential induction of two 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible forms of cytochrome P-450 in extrahepatic versus hepatic tissues. *Mol Pharmacol* **25**, 185-191.

Goldstein J.A., Linko P. und Bergman H. (1982). Induction of porphyria in the rat by chronic versus acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem Pharmacol* **31**, 1607-1613.

Gordon J.W. und Ruddle F.H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214**, 1244-1246.

Gordon J.W. und Ruddle F.H. (1983). Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* **101**, 411-433.

Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A. und Ruddle F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7380-7384.

Gorman C. und Bullock C. (2000). Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 455-460.

Gorsky L.D., Koop D.R. und Coon M.J. (1984). On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J Biol Chem* **259**, 6812-6817.

Gossen M. und Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.

Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Muller G., Hillen W. und Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.

Hahn M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* **141**, 131-160.

Hakansson H., Johansson L. und Manzoor E. (1989). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced alterations in the vitamin A homeostasis and in the 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-activity in SD rats and Hartley guinea pigs. *Chemosphere* **18**, 299-305.

Hakansson H., Johansson L., Manzoor E. und Ahlborg U.G. (1991). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the vitamin A status of Hartley guinea pigs, Sprague-Dawley rats, C57Bl/6 mice, DBA/2 mice, and Golden Syrian hamsters. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **37**, 117-138.

Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**, 721-724.

Halliwell B. und Gutteridge J. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. University Press, Oxford.

Hankinson O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**, 307-340.

Hankinson O., Andersen R.D., Birren B.W., Sander F., Negishi M. und Nebert D.W. (1985). Mutations affecting the regulation of transcription of the cytochrome P1-450 gene in the mouse Hepa-1 cell line. *J Biol Chem* **260**, 1790-1795.

Harper P.A., Wong J.Y., Lam M.S. und Okey A.B. (2002). Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact* **141**, 161-187.

Hayashi S., Watanabe J., Nakachi K., Eguchi H., Gotoh O. und Kawajiri K. (1994). Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis* **15**, 801-806.

Hayes K.C. (1971). On the pathophysiology of vitamin A deficiency. *Nutr Rev* **29**, 3-6.

Hebert C.D., Harris M.W., Elwell M.R. und Birnbaum L.S. (1990). Relative toxicity and tumor-promoting ability of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PCDF), and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (HCDF) in hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **102**, 362-377.

Heid S.E., Pollenz R.S. und Swanson H.I. (2000). Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* **57**, 82-92.

Heine T. (2005). Endogene DNA-Schädigung als Ursache genetischer Instabilität. In *Fachbereich Chemie und Pharmazie*. Johannes-Gutenberg Universität Mainz, Mainz.

Heine T., Glatt H. und Epe B. (2006). Human cytochrome P450 reductase can act as a source of endogenous oxidative DNA damage and genetic instability. *Free Radic Biol Med* **40**, 801-807.

Hemming H., Bager Y., Flodstrom S., Nordgren I., Kronevi T., Ahlborg U.G. und Warngard L. (1995). Liver tumour promoting activity of 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and its interaction with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Eur J Pharmacol* **292**, 241-249.

Henck J.M., New M.A., Kociba R.J. und Rao K.S. (1981). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: acute oral toxicity in hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* **59**, 405-407.

Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.

Hiasa Y., Kitahori Y., Ohshima M., Fujita T., Yuasa T., Konishi N. und Miyashiro A. (1982). Promoting effects of phenobarbital and barbital on development of thyroid tumors in rats treated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Carcinogenesis* **3**, 1187-1190.

Hines R.N., Mathis J.M. und Jacob C.S. (1988). Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene. *Carcinogenesis* **9**, 1599-1605.

Hochstein J., Aulierich R. und Bursian S. (1988). Acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to mink. *Arch Environ Contam Toxicol* **17**, 23-27.

Hoeijmakers J.H. (2001a). DNA repair mechanisms. *Maturitas* **38**, 17-22; discussion 22-13.

Hoeijmakers J.H. (2001b). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374.

Holsapple M.P., Morris D.L., Wood S.C. und Snyder N.K. (1991). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **31**, 73-100.

Hooiveld M., Heederik D.J., Kogevinas M., Boffetta P., Needham L.L., Patterson D.G., Jr. und Bueno-de-Mesquita H.B. (1998). Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. *Am J Epidemiol* **147**, 891-901.

Hudson L.G., Toscano W.A., Jr. und Greenlee W.F. (1985). Regulation of epidermal growth factor binding in a human keratinocyte cell line by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **77**, 251-259.

Huttermann J. (1982). Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy* **10**, 25-40.

Hwang D.Y., Chae K.R., Shin D.H., Hwang J.H., Lim C.H., Kim Y.J., Kim B.J., Goo J.S., Shin Y.Y., Jang I.S., Cho J.S. und Kim Y.K. (2001). Xenobiotic response in humanized double transgenic mice expressing tetracycline-controlled transactivator and human CYP1B1. *Arch Biochem Biophys* **395**, 32-40.

IARC I.A.f.R.o.C. (1997). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, Vol. 69.

Iida A., Chen S.T., Friedmann T. und Yee J.K. (1996). Inducible gene expression by retrovirus-mediated transfer of a modified tetracycline-regulated system. *J Virol* **70**, 6054-6059.

Ishii H. (1996). Oxidative stress in alcoholic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 162A-167A.

Iwata H., Fujita K., Kushida H., Suzuki A., Konno Y., Nakamura K., Fujino A. und Kamataki T. (1998). High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in Escherichia coli. *Biochem Pharmacol* **55**, 1315-1325.

Jackel M.C. (1998). Genetic control of programmed cell death (apoptosis). Prospects for biological tumor staging?. *Hno* **46**, 614-625.

Jaisser F. (2000). Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* **11 Suppl 16**, S95-S100.

Jaiswal A.K., Gonzalez F.J. und Nebert D.W. (1985). Human dioxin-inducible cytochrome P1-450: complementary DNA and amino acid sequence. *Science* **228**, 80-83.

Karchner S.I., Franks D.G., Powell W.H. und Hahn M.E. (2002). Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem* **277**, 6949-6959.

Kelly K.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abramo K.H. und Levin E.D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect* **106**, 375-384.

Kennedy S.W. und Jones S.P. (1994). Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem* **222**, 217-223.

Kennedy S.W., Jones S.P. und Bastien L.J. (1995). Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. *Anal Biochem* **226**, 362-370.

Kerr J.F., Wyllie A.H. und Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.

Keston A.S. und Brandt R. (1965). The Fluorometric Analysis Of Ultramicro Quantities Of Hydrogen Peroxide. *Anal Biochem* **11**, 1-5.

Kewley R.J., Whitelaw M.L. und Chapman-Smith A. (2004). The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 189-204.

Keys B., Hlavinka M., Mason G. und Safe S. (1985). Modulation of rat hepatic microsomal testosterone hydroxylases by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related toxic isostereomers. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 1537-1542.

Kistner A., Gossen M., Zimmermann F., Jerecic J., Ullmer C., Lubbert H. und Bujard H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10933-10938.

Kleeman J.M., Olson J.R., Chen S.M. und Peterson R.E. (1986a). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin metabolism and disposition in yellow perch. *Toxicol Appl Pharmacol* **83**, 402-411.

Kleeman J.M., Olson J.R., Chen S.M. und Peterson R.E. (1986b). Metabolism and disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol* **83**, 391-401.

Kleeman J.M., Olson J.R. und Peterson R.E. (1988). Species differences in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity and biotransformation in fish. *Fundam Appl Toxicol* **10**, 206-213.

Kleman M.I., Poellinger L. und Gustafsson J.A. (1994). Regulation of human dioxin receptor function by indolocarbazoles, receptor ligands of dietary origin. *J Biol Chem* **269**, 5137-5144.

Knerr S., Schaefer J., Both S., Mally A., Dekant W. und Schrenk D. (2006). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells. *Mol Nutr Food Res* **50**, 378-384.

Kociba R.J., Keeler P.A., Park C.N. und Gehring P.J. (1976). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): results of a 13-week oral toxicity study in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **35**, 553-574.

Kociba R.J., Keyes D.G., Beyer J.E., Carreon R.M., Wade C.E., Dittenber D.A., Kalnins R.P., Frauson L.E., Park C.N., Barnard S.D., Hummel R.A. und Humiston C.G. (1978). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **46**, 279-303.

Kociba R.J., Keyes D.G., Lisowe R.W., Kalnins R.P., Dittenber D.D., Wade C.E., Gorzinski S.J., Mahle N.H. und Schwetz B.A. (1979). Results of a two-year chronic toxicity and oncogenic study of rats ingesting diets containing 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). *Food Cosmet Toxicol* **17**, 205-221.

Kohn M.C., Sewall C.H., Lucier G.W. und Portier C.J. (1996). A mechanistic model of effects of dioxin on thyroid hormones in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **136**, 29-48.

Kuthan H. und Ullrich V. (1982). Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur J Biochem* **126**, 583-588.

Landi M.T., Consonni D., Patterson D.G., Jr., Needham L.L., Lucier G., Brambilla P., Cazzaniga M.A., Mocarelli P., Pesatori A.C., Bertazzi P.A. und Caporaso N.E. (1998). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin plasma levels in Seveso 20 years after the accident. *Environ Health Perspect* **106**, 273-277.

Laval J. (1996). Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* **44**, 14-24.

Lawen A. (2003). Apoptosis-an introduction. *Bioessays* **25**, 888-896.

LeBel C.P., Ischiropoulos H. und Bondy S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* **5**, 227-231.

Ledirac N., Delescluse C., de Sousa G., Pralavorio M., Lesca P., Amichot M., Berge J.B. und Rahmani R. (1997). Carbaryl induces CYP1A1 gene expression in HepG2 and HaCaT cells but is not a ligand of the human hepatic Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**, 177-182.

Lee I.J., Jeong K.S., Roberts B.J., Kallarakal A.T., Fernandez-Salguero P., Gonzalez F.J. und Song B.J. (1996). Transcriptional induction of the cytochrome P4501A1 gene by a thiazolium compound, YH439. *Mol Pharmacol* **49**, 980-988.

Lees M.J., Peet D.J. und Whitelaw M.L. (2003). Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* **278**, 35878-35888.

Lewandoski M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* **2**, 743-755.

Lewis R.J., Sr. (1997). *Hazardous Chemicals Desk Reference*. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Lewis R.J., Sr., Ed. (1988). Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, Bi-monthly Update. **8**, 2-48.

Li X., Johnson D.C. und Rozman K.K. (1995). Reproductive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in female rats: ovulation, hormonal regulation, and possible mechanism(s). *Toxicol Appl Pharmacol* **133**, 321-327.

Lin F.H., Clark G., Birnbaum L.S., Lucier G.W. und Goldstein J.A. (1991a). Influence of the Ah locus on the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the hepatic epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol* **39**, 307-313.

Lin F.H., Stohs S.J., Birnbaum L.S., Clark G., Lucier G.W. und Goldstein J.A. (1991b). The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the hepatic estrogen and glucocorticoid receptors in congenic strains of Ah responsive and Ah nonresponsive C57BL/6J mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **108**, 129-139.

Lucier G., Clark G., Hiermath C., Tritscher A., Sewall C. und Huff J. (1993). Carcinogenicity of TCDD in laboratory animals: implications for risk assessment. *Toxicol Ind Health* **9**, 631-668.

Lucier G.W., Tritscher A., Goldsworthy T., Foley J., Clark G., Goldstein J. und Maronpot R. (1991). Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated increases in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* **51**, 1391-1397.

Lusska A., Wu L. und Whitlock J.P., Jr. (1992). Superinduction of CYP1A1 transcription by cycloheximide. Role of the DNA binding site for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem* **267**, 15146-15151.

Ma Q. und Whitlock J.P., Jr. (1996). The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol Cell Biol* **16**, 2144-2150.

Madhukar B.V., Brewster D.W. und Matsumura F. (1984). Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7407-7411.

Manz A., Berger J., Dwyer J.H., Flesch-Janys D., Nagel S. und Waltsgott H. (1991). Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* **338**, 959-964.

Maronpot R.R., Foley J.F., Takahashi K., Goldsworthy T., Clark G., Tritscher A., Portier C. und Lucier G. (1993). Dose response for TCDD promotion of hepatocarcinogenesis in rats initiated with DEN: histologic, biochemical, and cell proliferation endpoints. *Environ Health Perspect* **101**, 634-642.

Marquardt H. und Schaefer S. (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Masimirembwa C.M., Otter C., Berg M., Jonsson M., Leidvik B., Jonsson E., Johansson T., Backman A., Edlund A. und Andersson T.B. (1999). Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab Dispos* **27**, 1117-1122.

Matzke A.J. und Matzke M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 142-148.

McClain R.M., Levin A.A., Posch R. und Downing J.C. (1989). The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **99**, 216-228.

McClain R.M., Posch R.C., Bosakowski T. und Armstrong J.M. (1988). Studies on the mode of action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol* **94**, 254-265.

McConnell E.E., Moore J.A., Gupta B.N., Rakes A.H., Luster M.I., Goldstein J.A., Haseman J.K. und Parker C.E. (1980). The chronic toxicity of technical and analytical pentachlorophenol in cattle. I. Clinicopathology. *Toxicol Appl Pharmacol* **52**, 468-490.

McConnell E.E., Moore J.A., Haseman J.K. und Harris M.W. (1978). The comparative toxicity of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in mice and guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* **44**, 335-356.

McGuire J., Okamoto K., Whitelaw M.L., Tanaka H. und Poellinger L. (2001). Definition of a dioxin receptor mutant that is a constitutive activator of transcription: delineation of overlapping repression and ligand binding functions within the PAS domain. *J Biol Chem* **276**, 41841-41849.

McKinney J.D., Chae K., Oatley S.J. und Blake C.C. (1985). Molecular interactions of toxic chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans with thyroxine binding prealbumin. *J Med Chem* **28**, 375-381.

Meister A. und Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760.

Mimura J., Ema M., Sogawa K. und Fujii-Kuriyama Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* **13**, 20-25.

Mimura J. und Fujii-Kuriyama Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* **1619**, 263-268.

Mittler J.C., Ertel N.H., Peng R.X., Yang C.S. und Kiernan T. (1984). Changes in testosterone hydroxylase activity in rat testis following administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Ann N Y Acad Sci* **438**, 645-648.

Morehouse L.A., Thomas C.E. und Aust S.D. (1984). Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **232**, 366-377.

Nagy A. und Mar L. (2001). Creation and use of a Cre recombinase transgenic database. *Methods Mol Biol* **158**, 95-106.

Neal R.A., Beatty P.W. und Gasiewicz T.A. (1979). Studies of the mechanisms of toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Ann N Y Acad Sci* **320**, 204-213.

Nebert D.W., Dalton T.P., Okey A.B. und Gonzalez F.J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* **279**, 23847-23850.

Nelson D.R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**, 1-10.

Nie M., Blankenship A.L. und Giesy J.P. (2001). Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 17-27.

Nienstedt W., Parkki M., Uotila P. und Aitio A. (1979). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the hepatic metabolism of testosterone in the rat. *Toxicology* **13**, 233-236.

Norback D.H. und Allen J.R. (1973). Biological responses of the nonhuman primate, chicken, and rat to chlorinated dibenzo-*p*-dioxin ingestion. *Environ Health Perspect* **5**, 233-240.

NTP N.T.P. (1982a). Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel rat and B6C3F1 mice (gavage study). In *NTP Tech. Rept. Ser. 109*. DHHS, PHS, NIH, Research Triangle Park, NC.

NTP U.S.N.T.P. (1982b). Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Swiss Webster mice (dermal study). In *Tech. Rep. 1982b Series No. 201, DHEW publication No. (NIH) 82-1757*. NIH Research Triangle Park, NC.

NTP U.S.N.T.P. (2006). Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Sprague-Dawley rats (gavage study). *Tech. Rep. 2005, Series No. 521*.

Olson J.R. (1986). Metabolism and disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* **85**, 263-273.

Olson J.R., Gasiewicz T.A. und Neal R.A. (1980). Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the Golden Syrian hamster. *Toxicol Appl Pharmacol* **56**, 78-85.

Ott M.G. und Zober A. (1996). Cause specific mortality and cancer incidence among employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after a 1953 reactor accident. *Occup Environ Med* **53**, 606-612.

Park J.Y., Shigenaga M.K. und Ames B.N. (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2322-2327.

Park S. und Matsumura F. (2006). Characterization of anti-apoptotic action of TCDD as a defensive cellular stress response reaction against the cell damaging action of ultra-violet irradiation in an immortalized normal human mammary epithelial cell line, MCF10A. *Toxicology* **217**, 139-146.

Paszkowski J. und Whitham S.A. (2001). Gene silencing and DNA methylation processes. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 123-129.

Pazdernik T.L. und Rozman K.K. (1985). Effect of thyroidectomy and thyroxine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced immunotoxicity. *Life Sci* **36**, 695-703.

Peach C. und Velten J. (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* **17**, 49-60.

Pesatori A., Tironi A. und Consonni A. (1999). Cancer incidence in the Seveso population, 1977-1991. *Organohalogen Compounds* **44**, 411-412.

Pesatori A.C., Consonni D., Tironi A., Zocchetti C., Fini A. und Bertazzi P.A. (1993). Cancer in a young population in a dioxin-contaminated area. *Int J Epidemiol* **22**, 1010-1013.

Peterson R., Seefeld M. und Christian B. (1984). The wasting syndrome in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity: basic features and their interpretation. In *Banbury report: biological mechanisms of dioxin action, Vol. 18*. (A. Polandund R. Kimbrough, Eds.), pp. 291-308. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY.

Peterson R.E., Theobald H.M. und Kimmel G.L. (1993). Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* **23**, 283-335.

Petrulis J.R. und Perdew G.H. (2002). The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* **141**, 25-40.

Pickardt T. und de Kathen A. (2002). Literaturstudie zur Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölzarten und Stabilitätsgene. Im Auftrag des Umweltbundesamtes und des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein, Berlin.

Piechocki M.P. und Hines R.N. (1998). Functional characterization of the human CYP1A1 negative regulatory element: modulation of Ah receptor mediated transcriptional activity. *Carcinogenesis* **19**, 771-780.

Piper W.N., Rose J.Q. und Gehring P.J. (1973). Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *Environ Health Perspect* **5**, 241-244.

Pitot H.C. (1989). Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* **80**, 599-607.

Pitot H.C., Barsness L., Goldsworthy T. und Kitagawa T. (1978). Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature* **271**, 456-458.

Pitot H.C., Dragan Y., Sargent L. und Xu Y.H. (1991). Biochemical markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* **93**, 181-189.

Pitot H.C., Goldsworthy T., Campbell H.A. und Poland A. (1980). Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res* **40**, 3616-3620.

Pitot H.C., Goldsworthy T.L., Moran S., Kennan W., Glauert H.P., Maronpot R.R. und Campbell H.A. (1987). A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci. *Carcinogenesis* **8**, 1491-1499.

Pitot H.C. und Sirica A.E. (1980). The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* **605**, 191-215.

Pohjanvirta R., Vartiainen T., Uusi-Rauva A., Monkkonen J. und Tuomisto J. (1990). Tissue distribution, metabolism, and excretion of 14C-TCDD in a TCDD-susceptible and a TCDD-resistant rat strain. *Pharmacol Toxicol* **66**, 93-100.

Poiger H., Buser H.R., Weber H., Zweifel U. und Schlatter C. (1982). Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. *Experientia* **38**, 484-486.

Poiger H. und Schlatter C. (1979). Biological degradation of TCDD in rats. *Nature* **281**, 706-707.

Poiger H.S., C. (1986). Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man. *Chemosphere* **15**, 1489-1494.

Poland A. und Knutson J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **22**, 517-554.

Poland A., Palen D. und Glover E. (1982). Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice. *Nature* **300**, 271-273.

Puhvel S.M., Sakamoto M., Ertl D.C. und Reisner R.M. (1982). Hairless mice as models for chloracne: a study of cutaneous changes induced by topical application of established chloracnegens. *Toxicol Appl Pharmacol* **64**, 492-503.

Quattrochi L.C., Pendurthi U.R., Okino S.T., Potenza C. und Tukey R.H. (1986). Human cytochrome P-450 4 mRNA and gene: part of a multigene family that contains Alu sequences in its mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6731-6735.

Rabes H.M., Bucher T., Hartmann A., Linke I. und Dunnwald M. (1982). Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. *Cancer Res* **42**, 3220-3227.

Racky J., Schmitz H.J., Kauffmann H.M. und Schrenk D. (2004). Single nucleotide polymorphism analysis and functional characterization of the human Ah receptor (AhR) gene promoter. *Arch Biochem Biophys* **421**, 91-98.

Ramsey J., Hefner J., Karbowski R. und al. e. (1979). The in vivo biotransformation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **48**.

Randerath K., Putman K.L., Randerath E., Mason G., Kelley M. und Safe S. (1988). Organ-specific effects of long term feeding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-p-dioxin on I-compounds in hepatic and renal DNA of female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* **9**, 2285-2289.

Rao M.S., Subbarao V., Prasad J.D. und Scarpelli D.G. (1988). Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the Syrian golden hamster. *Carcinogenesis* **9**, 1677-1679.

RayChaudhuri B., Nebert D.W. und Puga A. (1990). The murine Cyp1a-1 gene negatively regulates its own transcription and that of other members of the aromatic hydrocarbon-responsive [Ah] gene battery. *Mol Endocrinol* **4**, 1773-1781.

Rea M.A., Phillips M.A., Degraffenried L.A., Qin Q. und Rice R.H. (1998). Modulation of human epidermal cell response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by epidermal growth factor. *Carcinogenesis* **19**, 479-483.

Rennel E. und Gerwins P. (2002). How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem* **309**, 79-84.

Renwick A.B., Mistry H., Barton P.T., Mallet F., Price R.J., Beamand J.A. und Lake B.G. (1999). Effect of some indole derivatives on xenobiotic metabolism and xenobiotic-induced toxicity in cultured rat liver slices. *Food Chem Toxicol* **37**, 609-618.

Reyes H., Reisz-Porszasz S. und Hankinson O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* **256**, 1193-1195.

Rier S.E., Martin D.C., Bowman R.E., Dmowski W.P. und Becker J.L. (1993). Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* **21**, 433-441.

Rifkind A.B. (2006). CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. *Drug Metab Rev* **38**, 291-335.

Rivera S.P., Saarikoski S.T. und Hankinson O. (2002). Identification of a novel dioxin-inducible cytochrome P450. *Mol Pharmacol* **61**, 255-259.

Romkes M. und Safe S. (1988). Comparative activities of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and progesterone as antiestrogens in the female rat uterus. *Toxicol Appl Pharmacol* **92**, 368-380.

Rose J.Q., Ramsey J.C., Wentzler T.H., Hummel R.A. und Gehring P.J. (1976). The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin following single and repeated oral doses to the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **36**, 209-226.

Rowlands J.C. und Gustafsson J.A. (1997). Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* **27**, 109-134.

Ryan D.E. und Levin W. (1990). Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol. Ther.* **45**, 153–159.

Saarikoski S.T., Rivera S.P., Hankinson O. und Husgafvel-Pursiainen K. (2005). CYP2S1: A short review. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 62-69.

Safe S. (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* **120**, 1-7.

Safe S., Astroff B., Harris M., Zacharewski T., Dickerson R., Romkes M. und Biegel L. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacol Toxicol* **69**, 400-409.

Safe S. und Krishnan V. (1995). Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression. *Arch Toxicol Suppl* **17**, 99-115.

Sambrook J. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.

Sawahata T., Olson J.R. und Neal R.A. (1982). Identification of metabolites of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) formed on incubation with isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 341-346.

Schecter A., Furst P., Furst C., Papke O., Ball M., Ryan J.J., Hoang D.C., Le C.D., Hoang T.Q., Cuong H.Q. und et al. (1994a). Chlorinated dioxins and dibenzofurans in human tissue from general populations: a selective review. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 1**, 159-171.

Schecter A. und Gasiewicz T. (1987). Health hazard assessment of chlorinated dioxins and dibenzofurans contained in human milk. *Chemosphere* **16**, 2147-2154.

Schecter A G.T. (1987). Health hazard assessment of chlorinated dioxins and dibenzofurans contained in human milk. *Chemosphere* **16**, 2147-2154.

Schecter A., Startin J., Wright C., Kelly M., Papke O., Lis A., Ball M. und Olson J.R. (1994b). Congener-specific levels of dioxins and dibenzofurans in U.S. food and estimated daily dioxin toxic equivalent intake. *Environ Health Perspect* **102**, 962-966.

Schenkman J.B. und Jansson I. (2003). The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* **97**, 139-152.

Schmidt J.V. und Bradfield C.A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 55-89.

Schrenk D., Buchmann A., Dietz K., Lipp H.P., Brunner H., Sirma H., Munzel P., Hagenmaier H., Gebhardt R. und Bock K.W. (1994). Promotion of preneoplastic foci in rat liver with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin and a defined mixture of 49 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Carcinogenesis* **15**, 509-515.

Schrenk D., Karger A., Lipp H.P. und Bock K.W. (1992). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and ethinylestradiol as co-mitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* **13**, 453-456.

Schrenk D., Schmitz H.J., Bohnenberger S., Wagner B. und Worner W. (2004). Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett* **149**, 43-50.

Schulte-Hermann R. (1985). Tumor promotion in the liver. *Arch Toxicol* **57**, 147-158.

Schulte-Hermann R., Bursch W., Marian B. und Grasl-Kraupp B. (1999). Active cell death (apoptosis) and cellular proliferation as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ*, 273-285.

Schwarz D., Kisselev P., Honeck H., Cascorbi I., Schunck W.H. und Roots I. (2001). Co-expression of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) variants and human NADPH-cytochrome P450 reductase in the baculovirus/insect cell system. *Xenobiotica* **31**, 345-356.

Schwetz B.A., Norris J.M., Sparschu G.L., Rowe U.K., Gehring P.J., Emerson J.L. und Gerbig C.G. (1973). Toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ Health Perspect* **5**, 87-99.

Seefeld M.D., Corbett S.W., Keesey R.E. und Peterson R.E. (1984). Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **73**, 311-322.

Semler D.E., Chengelis C.P. und Radzialowski F.M. (1989). The effects of chronic ingestion of spironolactone on serum thyrotropin and thyroid hormones in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **98**, 263-268.

Senft A.P., Dalton T.P., Nebert D.W., Genter M.B., Hutchinson R.J. und Shertzer H.G. (2002). Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* **178**, 15-21.

Sewall C.H., Flagler N., Vanden Heuvel J.P., Clark G.C., Tritscher A.M., Maronpot R.M. und Lucier G.W. (1995). Alterations in thyroid function in female Sprague-Dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **132**, 237-244.

Sewall C.H., Lucier G.W., Tritscher A.M. und Clark G.C. (1993). TCDD-mediated changes in hepatic epidermal growth factor receptor may be a critical event in the hepatocarcinogenic action of TCDD. *Carcinogenesis* **14**, 1885-1893.

Shen E.S., Gutman S.I. und Olson J.R. (1991). Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated hepatotoxicity in C57BL/6J and DBA/2J mice. *J Toxicol Environ Health* **32**, 367-381.

Shen H.M., Shi C.Y., Shen Y. und Ong C.N. (1996). Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radic Biol Med* **21**, 139-146.

Shen L., Qiu S., Chen Y., Zhang F., van Breemen R.B., Nikolic D. und Bolton J.L. (1998). Alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA by the Premarin metabolite 4-hydroxyequilenin semiquinone radical. *Chem Res Toxicol* **11**, 94-101.

Shertzer H.G., Nebert D.W., Puga A., Ary M., Sonntag D., Dixon K., Robinson L.J., Cianciolo E. und Dalton T.P. (1998). Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 44-48.

Shields P.G., Ambrosone C.B., Graham S., Bowman E.D., Harrington A.M., Gillenwater K.A., Marshall J.R., Vena J.E., Laughlin R., Nemoto T. und Freudenheim J.L. (1996). A cytochrome P4502E1 genetic polymorphism and tobacco smoking in breast cancer. *Mol Carcinog* **17**, 144-150.

Shiizaki K., Ohsako S., Koyama T., Nagata R., Yonemoto J. und Tohyama C. (2005). Lack of CYP1A1 expression is involved in unresponsiveness of the human hepatoma cell line SK-HEP-1 to dioxin. *Toxicol Lett* **160**, 22-33.

Shimizu I., Yasuda M., Mizobuchi Y., Ma Y.R., Liu F., Shiba M., Horie T. und Ito S. (1998). Suppressive effect of oestradiol on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Gut* **42**, 112-119.

Shockett P., Difilippantonio M., Hellman N. und Schatz D.G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6522-6526.

Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* **91**, 31S-38S.

Sijen T. und Kooter J.M. (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* **22**, 520-531.

Sijm D.Y., AL; Muir, DCG; et al. (1990). Biotransformation and tissue distribution of 1,2,3,7-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 1,2,3,4,7-pentachlorodibenzo-p-dioxin and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran in rainbow trout. *Chemosphere* **21**, 845-866.

Silkworth J.B., Koganti A., Illouz K., Possolo A., Zhao M. und Hamilton S.B. (2005). Comparison of TCDD and PCB CYP1A induction sensitivities in fresh hepatocytes from human donors, sprague-dawley rats, and rhesus monkeys and HepG2 cells. *Toxicol Sci* **87**, 508-519.

Sills R.C., Goldsworthy T.L. und Sleight S.D. (1994). Tumor-promoting effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and phenobarbital in initiated weanling Sprague-Dawley rats: a quantitative, phenotypic, and ras p21 protein study. *Toxicol Pathol* **22**, 270-281.

Sittig M. (1988). *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. Noyes Publications, Park Ridge, NJ.

Slezak B.P., Hatch G.E., DeVito M.J., Diliberto J.J., Slade R., Crissman K., Hassoun E. und Birnbaum L.S. (2000). Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicol Sci* **54**, 390-398.

Sogawa K. und Fujii-Kuriyama Y. (1997). Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem (Tokyo)* **122**, 1075-1079.

Song Z. und Pollenz R.S. (2002). Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol Pharmacol* **62**, 806-816.

Steenland K., Bertazzi P., Baccarelli A. und Kogevinas M. (2004). Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ Health Perspect* **112**, 1265-1268.

Steenland K., Piacitelli L., Deddens J., Fingerhut M. und Chang L.I. (1999). Cancer, heart disease, and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Natl Cancer Inst* **91**, 779-786.

Stennicke H.R. und Salvesen G.S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 299-306.

Stinchcombe S., Buchmann A., Bock K.W. und Schwarz M. (1995). Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* **16**, 1271-1275.

Stohs S.J. (1990). Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Free Radic Biol Med* **9**, 79-90.

Stohs S.J., Shara M.A., Alsharif N.Z., Wahba Z.Z. und al-Bayati Z.A. (1990). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **106**, 126-135.

Strasser A., O'Connor L. und Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-245.

Strom D.K., Postlind H. und Tukey R.H. (1992). Characterization of the rabbit CYP1A1 and CYP1A2 genes: developmental and dioxin-inducible expression of rabbit liver P4501A1 and P4501A2. *Arch Biochem Biophys* **294**, 707-716.

Swanson H.I. und Bradfield C.A. (1993). The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* **3**, 213-230.

Takahashi N., Dashwood R.H., Bjeldanes L.F., Bailey G.S. und Williams D.E. (1995). Regulation of hepatic cytochrome P4501A by indole-3-carbinol: transient induction with continuous feeding in rainbow trout. *Food Chem Toxicol* **33**, 111-120.

Taniguchi S., Yanase T., Kobayashi K., Takayanagi R., Haji M., Umeda F. und Nawata H. (1994). Catechol estrogens are more potent antioxidants than estrogens for the Cu(2+)-catalyzed oxidation of low or high density lipoprotein: antioxidative effects of steroids on lipoproteins. *Endocr J* **41**, 605-611.

Thomas K.R. und Capecchi M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.

Thunberg T., Ahlborg U.G. und Johnsson H. (1979). Vitamin A (retinol) status in the rat after a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch Toxicol* **42**, 265-274.

Toth K., Somfai-Relle S., Sugar J. und Bence J. (1979). Carcinogenicity testing of herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyethanol containing dioxin and of pure dioxin in Swiss mice. *Nature* **278**, 548-549.

Tritscher A.M., Clark G.C., Sewall C., Sills R.C., Maronpot R. und Lucier G.W. (1995). Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis* **16**, 2807-2811.

Tritscher A.M., Mahler J., Portier C.J., Lucier G.W. und Walker N.J. (2000). Induction of lung lesions in female rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Pathol* **28**, 761-769.

Turteltaub K.W., Felton J.S., Gledhill B.L., Vogel J.S., Southon J.R., Caffee M.W., Finkel R.C., Nelson D.E., Proctor I.D. und Davis J.C. (1990). Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5288-5292.

USEPA U.S.E.P.A. (1985). Health effects assessment for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, pp. EPA 600/608-684/0146. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC.

USEPA U.S.E.P.A. (1989). Interim procedures for estimating risks associated with exposures to mixtures of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and -dibenzofurans (CDDs and CDFs) and 1989 update; EPA/625/3-89/016. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC.

USEPA U.S.E.P.A. (2000a). Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodiobenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds (September 2000 Draft). Part I: Estimating Exposure to dioxin-like compounds. Volume 2: Sources of dioxin-like compounds in the United States. EPA/600/P-00/001 Bb. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

USEPA U.S.E.P.A. (2000b). Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodiobenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds (September 2000 Draft). Part I: Estimating Exposure to dioxin-like compounds. Volume 3: Properties, environmental levels and background exposures. EPA/600/P-00/001 Bc. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency., Washington, DC.

USEPA U.S.E.P.A. (2000c). Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodiobenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds (September 2000 Draft). Part II: Health assessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodiobenzo-*p*-dioxin (TCDD) and Related Compounds. EPA/600/P-00/001 Be. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Van Birgelen A.P., Smit E.A., Kampen I.M., Groeneveld C.N., Fase K.M., Van der Kolk J., Poiger H., Van den Berg M., Koeman J.H. und Brouwer A. (1995a). Subchronic effects of 2,3,7,8-TCDD or PCBs on thyroid hormone metabolism: use in risk assessment. *Eur J Pharmacol* **293**, 77-85.

Van Birgelen A.P., Van der Kolk J., Fase K.M., Bol I., Poiger H., Brouwer A. und Van den Berg M. (1995b). Subchronic dose-response study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **132**, 1-13.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X., Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F. und Zacharewski T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* **106**, 775-792.

van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N. und Peterson R.E. (2006). The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. *Toxicol Sci*.

van der Weyden L., Adams D.J. und Bradley A. (2002). Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol Genomics* **11**, 133-164.

van Miller J., Lalich J. und Allen J. (1977). Increased incidence of neoplasms in rats exposed to low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere* **61**, 625-632.

Van Miller J.P., Marlar R.J. und Allen J.R. (1976). Tissue distribution and excretion of tritiated tetrachlorodibenzo-*p*-doxin in non-human primates and rats. *Food Cosmet Toxicol* **14**, 31-34.

Vansell N.R. und Klaassen C.D. (2002). Effect of microsomal enzyme inducers on the biliary excretion of triiodothyronine (T(3)) and its metabolites. *Toxicol Sci* **65**, 184-191.

Vaucheret H. und Fagard M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**, 29-35.

Vecchini F., Lenoir-Viale M.C., Cathelineau C., Magdalou J., Bernard B.A. und Shroot B. (1994). Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 1205-1212.

Vinopal J.H. und Casida J.E. (1973). Metabolic stability of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in mammalian liver microsomal systems and in living mice. *Arch Environ Contam Toxicol* **1**, 122-132.

Vos J.G., Moore J.A. und Zinkl J.G. (1973). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ Health Perspect* **5**, 149-162.

Waern F., Flodstrom S., Busk L., Kronevi T., Nordgren I. und Ahlborg U.G. (1991). Relative liver tumour promoting activity and toxicity of some polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin- and dibenzofuran-congeners in female Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Toxicol* **69**, 450-458.

Wahba Z.Z., Lawson T.A. und Stohs S.J. (1988). Induction of hepatic DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Cancer Lett* **39**, 281-286.

Wahba Z.Z., Lawson T.W., Murray W.J. und Stohs S.J. (1989). Factors influencing the induction of DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicology* **58**, 57-69.

Walker N.J., Tritscher A.M., Sills R.C., Lucier G.W. und Portier C.J. (2000). Hepatocarcinogenesis in female Sprague-Dawley rats following discontinuous treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Sci* **54**, 330-337.

Wassom J.S., Huff J.E. und Loprieno N. (1977). A review of the genetic toxicology of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Mutat Res* **47**, 141-160.

Waterston R.H., Lindblad-Toh K., Birney E., Rogers J., Abril J.F., Agarwal P., Agarwala R., Ainscough R., Alexandersson M., An P., Antonarakis S.E., Attwood J., Baertsch R., Bailey J., Barlow K., Beck S., Berry E., Birren B., Bloom T., Bork P., Botcherby M., Bray N., Brent M.R., Brown D.G., Brown S.D., Bult C., Burton J., Butler J., Campbell R.D., Carninci P., Cawley S., Chiaromonte F., Chinwalla A.T., Church D.M., Clamp M., Clee C., Collins F.S., Cook L.L., Copley R.R., Coulson A., Couronne O., Cuff J., Curwen V., Cutts T., Daly M., David R., Davies J., Delehaunty K.D., Deri J., Dermitzakis E.T., Dewey C., Dickens N.J., Diekhans M., Dodge S., Dubchak I., Dunn D.M., Eddy S.R., Elnitski L., Emes R.D., Eswara P., Eyras E., Felsenfeld A., Fewell G.A., Flicek P., Foley K., Frankel W.N., Fulton L.A., Fulton R.S., Furey T.S., Gage D., Gibbs R.A., Glusman G., Gnerre S., Goldman N., Goodstadt L., Grafham D., Graves T.A., Green E.D., Gregory S., Guigo R., Guyer M., Hardison R.C., Haussler D., Hayashizaki Y., Hillier L.W., Hinrichs A., Hlavina W., Holzer T., Hsu F., Hua A., Hubbard T., Hunt A., Jackson I., Jaffe D.B., Johnson L.S., Jones M., Jones T.A., Joy A., Kamal M., Karlsson E.K., Karolchik D., Kasprzyk A., Kawai J., Keibler E., Kells C., Kent W.J., Kirby A., Kolbe D.L., Korf I., Kucherlapati R.S., Kulbokas E.J., Kulp D., Landers T., Leger J.P., Leonard S., Letunic I., Levine R., Li J., Li M., Lloyd C., Lucas S., Ma B., Maglott D.R., Mardis E.R., Matthews L., Mauceli E., Mayer J.H., McCarthy M., McCombie W.R., McLaren S., McLay K., McPherson J.D., Meldrim J., Meredith B., Mesirov J.P., Miller W., Miner T.L., Mongin E., Montgomery K.T., Morgan M., Mott R., Mullikin J.C., Muzny D.M., Nash W.E., Nelson J.O., Nhan M.N., Nicol R., Ning Z., Nusbaum C., O'Connor M.J., Okazaki Y., Oliver K., Overton-Larty E., Pachter L., Parra G., Pepin K.H., Peterson J., Pevzner P., Plumb R., Pohl C.S., Poliakov A., Ponce T.C., Ponting C.P., Potter S., Quail M., Reymond A., Roe B.A., Roskin K.M., Rubin E.M., Rust A.G., Santos R., Sapojnikov V., Schultz B., Schultz J., Schwartz M.S., Schwartz S., Scott C., Seaman S., Searle S., Sharpe T., Sheridan A., Shownkeen R., Sims S., Singer J.B., Slater G., Smit A., Smith D.R., Spencer B., Stabenau A., Stange-Thomann N., Sugnet C., Suyama M., Tesler G., Thompson J., Torrents D., Trevaskis E., Tromp J., Ucla C., Ureta-Vidal A., Vinson J.P., Von

Niederhausern A.C., Wade C.M., Wall M., Weber R.J., Weiss R.B., Wendl M.C., West A.P., Wetterstrand K., Wheeler R., Whelan S., Wierzbowski J., Willey D., Williams S., Wilson R.K., Winter E., Worley K.C., Wyman D., Yang S., Yang S.P., Zdobnov E.M., Zody M.C. und Lander E.S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.

Weltman M.D., Farrell G.C., Hall P., Ingelman-Sundberg M. und Liddle C. (1998). Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **27**, 128-133.

Wendling J.M., Orth R.G. und Poiger H. (1990). Determination of [3H]-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in human feces to ascertain its relative metabolism in man. *Anal Chem* **62**, 796-800.

Werck-Reichhart D. und Feyereisen R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**, REVIEWS3003.

Werlinder V., Backlund M., Zhukov A. und Ingelman-Sundberg M. (2001). Transcriptional and post-translational regulation of CYP1A1 by primaquine. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 206-214.

White W. und Lee C. (1998). The development and maintainance of the Crl:CR®(SD)IGS BR rat breeding system. *CD (SD) IGS-1998*, 8-14.

Whitlock J.P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 103-125.

WHO/IPCS W.H.O.I.P.o.C.S. (1989). Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. In *Environmental Health Criteria 88*.

Winston G.W., Feierman D.E. und Cederbaum A.I. (1984). The role of iron chelates in hydroxyl radical production by rat liver microsomes, NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys* **232**, 378-390.

Wörner W. und Schrenk D. (1996). Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* **56**, 1272-1278.

Wyde M.E., Cambre T., Lebetkin M., Eldridge S.R. und Walker N.J. (2002). Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 17beta-estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* **68**, 295-303.

Wyde M.E., Eldridge S.R., Lucier G.W. und Walker N.J. (2001a). Regulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced tumor promotion by 17 beta-estradiol in female Sprague--Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **173**, 7-17.

Wyde M.E., Wong V.A., Kim A.H., Lucier G.W., Walker N.J. und al. e. (2001b). Induction of hepatic 8-oxo-deoxyguanosine adducts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Sprague-Dawley rats is female-specific and estrogen-dependent. *Chem Res Toxicol* **14**, 849-855.

Xu L., Li A.P., Kaminski D.L. und Ruh M.F. (2000). 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **124**, 173-189.

Yagi K. (1997). Female hormones act as natural antioxidants--a survey of our research. *Acta Biochim Pol* **44**, 701-709.

Yamamoto A., Hen R. und Dauer W.T. (2001). The ons and offs of inducible transgenic technology: a review. *Neurobiol Dis* **8**, 923-932.

Zacharewski T., Harris M. und Safe S. (1991). Evidence for the mechanism of action of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated decrease of nuclear estrogen receptor levels in wild-type and mutant mouse Hepa 1c1c7 cells. *Biochem Pharmacol* **41**, 1931-1939.

Zangar R.C., Davydov D.R. und Verma S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 316-331.

Zeiger M., Haag R., Hockel J., Schrenk D. und Schmitz H.J. (2001). Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci* **63**, 65-73.

Zeytun A., McKallip R.J., Fisher M., Camacho I., Nagarkatti M. und Nagarkatti P.S. (2002). Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced gene expression profile in vivo using pathway-specific cDNA arrays. *Toxicology* **178**, 241-260.

Zhu Z., Zheng T., Lee C.G., Homer R.J. und Elias J.A. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 121-128.

Zhukov A.A. und Archakov A.I. (1982). Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **109**, 813-818.

Zhukov A.A. und Archakov A.I. (1985). Stoichiometry of microsomal oxidation reactions. Distribution of redox-equivalents in monooxygenase and oxidase reactions catalyzed by cytochrome P-450. *Biokhimiia* **50**, 1939-1952.

Zober A., Messerer P. und Huber P. (1990). Thirty-four-year mortality follow-up of BASF employees exposed to 2,3,7,8-TCDD after the 1953 accident. *Int Arch Occup Environ Health* **62**, 139-157.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stefanie Knerr
Geburtsdatum und –ort	23. Juni 1975 in Kusel
Anschrift	Gutenbergstraße 10
	67663 Kaiserslautern
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Schule	1981 – 1994	Abschluss Abitur am Staatlichen Gymnasium Kusel
Studium	WS 94/95 - SS 95	Studium Lehramt Gymnasium für die Fächer Englisch und Chemie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
	WS 95/96 - SS 01	Studium der Lebensmittelchemie an der TU Kaiserslautern
	WS 98/99	Staatliche Vorprüfung / Vordiplom
Promotion	seit SS 02	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
	07/02-06/04	Promotionsstipendium der Landesgraduiertenförderung Rheinland-Pfalz
	10/06	Abschluss der Promotion

Zusatzqualifikationen

Fremdsprachen:	sehr gutes Englisch in Wort und Schrift, Grundkenntnisse Französisch, Latinum
Führerschein:	Klasse 3
Strahlenschutz:	Fachkunde im Strahlenschutz gemäß StrlSchV
Fachtoxikologe:	seit 2003 Weiterbildung zur Fachtoxikologin DGPT

13 Publikationen

Originalarbeiten:

- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2006. TCDD induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells. Mol. Nutr. Food Res. 50 (4-5):378-84
- Knerr S, Schrenk D. 2006. Carcinogenicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Experimental Models. Review. Mol. Nutr. Food Res. *in Druck*
- Knerr S, Schrenk D. 2006. Carcinogenicity of „non-dioxinlike“ Polychlorinated Biphenyls. Review. Crit. Rev. Toxicol. 36:1-32
- Knerr S, Schrenk D. 2003. Carcinogenicity of „non-dioxinlike“ polychlorinated biphenyls. Background Document für die European Food Safety Authority (EFSA)
- Knerr S, Schrenk D. 2005. Non-cancer endpoints –ndl PCBs-; Background Document für die European Food Safety Authority (EFSA)

Kongressbeiträge:

- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2005. TCDD-induced CYP1A1 influences the formation of reactive oxygen species in liver cells. Organohalogen Compounds Vol. 67, 2351-2352. Vortrag beim Kongress “Dioxin 2005” in Toronto, Kanada
- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2005. Influence of TCDD-induced CYP1A1 on the formation of reactive oxygen species in liver cells. Toxicology Letters 158S, S1-S258, P308. Vortrag beim Kongress “Eurotox 2005” in Krakau, Polen
- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2006. Durch TCDD induzierte Cytochrom P450 Enzyme beeinflussen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Leberzellen. Vortrag beim “Lebensmittelchemikertag Reginalverband Südwest 2006“ in Karlsruhe

- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2006. An activated aryl hydrocarbon receptor causes DNA damage and stress response in mouse liver. Proc Amer Assoc Cancer Res Vol 47, 251. Posterbeitrag beim Kongress "AACR 2006" in Washington D.C., USA
- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2006. Formation of reactive oxygen species in TCDD treated Sprague-Dawley rats is altered by cytochrome P450s. Naunyn-Schmiedeberg´s Archives of Pharmacology Vol 372 Suppl. 7, 42 (A397). Posterbeitrag bei der "DGPT-Frühjahrstagung 2006" in Mainz
- Knerr S, Schaefer J, Mally A, Dekant W, Schrenk D. 2006. An activated aryl hydrocarbon receptor causes DNA damage and stress response in mouse liver. Organohalogen Compounds Vol. 68. Posterbeitrag beim Kongress "Dioxin 2006" in Oslo, Norwegen
- Goettel M, Knerr S, Schrenk D. 2006. Formation of reactive oxygen species (ROS) in TCDD- and estradiol treated hepatoma cells and rat primary hepatocytes. Organohalogen Compounds Vol. 68. Posterbeitrag beim Kongress "Dioxin 2006" in Oslo, Norwegen
- Schrenk D, Knerr S. 2006. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in experimental models. Organohalogen Compounds Vol. 68. Vortrag beim Kongress "Dioxin 2006" in Oslo, Norwegen

Sonstige:

- Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food; (Question No EFSA-Q-2003-114). 2005. The EFSA Journal 284, 1-137

  (http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1229.Par.0003.File.dat/contam_op_ej284_ndl-pcb_en1.pdf)

14 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk dafür, dass er mich für seine Forschung begeisterte und mir als Doktorvater die Möglichkeit gab, dieses interessante und für die Toxikologie hochrelevante Thema in seinem Arbeitskreis zu bearbeiten, sowie die Ergebnisse auf internationalen Fachtagungen zu präsentieren. Durch seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion und seine konstruktiven Anregungen und Ideen konnte ich mein toxikologisches Wissen enorm erweitern. Dies hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Ernst für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danke ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des AK Schrenk sowie den Tierpflegern der TU Kaiserslautern.

Bei Herrn Dr. Ben Davies von der genOway Deutschland GmbH bedanke ich mich für die immerzu freundliche und kompetente Beratung bei der Entwicklung des transgenen Mausmodells.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dekant und Frau Dr. Angela Mally vom Institut für Toxikologie der Universität Würzburg danke ich für die angenehme Kooperation im Rahmen der 8-oxo dG Experimente.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Lorenz Poellinger vom Karolinska Institut in Stockholm, Schweden für die Überlassung, sowie Herrn PD Dr. Peter Münzel vom Institut für Toxikologie der Universität Tübingen für die Bereitstellung der transgenen CA-AhR Mauslinie.

Bei Herrn und Frau Prof. Anke, Herrn Dr. Eckhard Thines und Frau Corinna Knapp vom Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung in Kaiserslautern bedanke ich mich für die freundliche Bereitstellung von Geräten und für die wertvollen Tipps zur Durchführung der Microarrays.

Herrn Dr. Patrick Lang und Herrn Christian Salzig vom Fraunhofer Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik in Kaiserslautern danke ich für die kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung der Microarrayexperimente.

Für die Bereitstellung der CCD-Kamera danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl vom Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg.

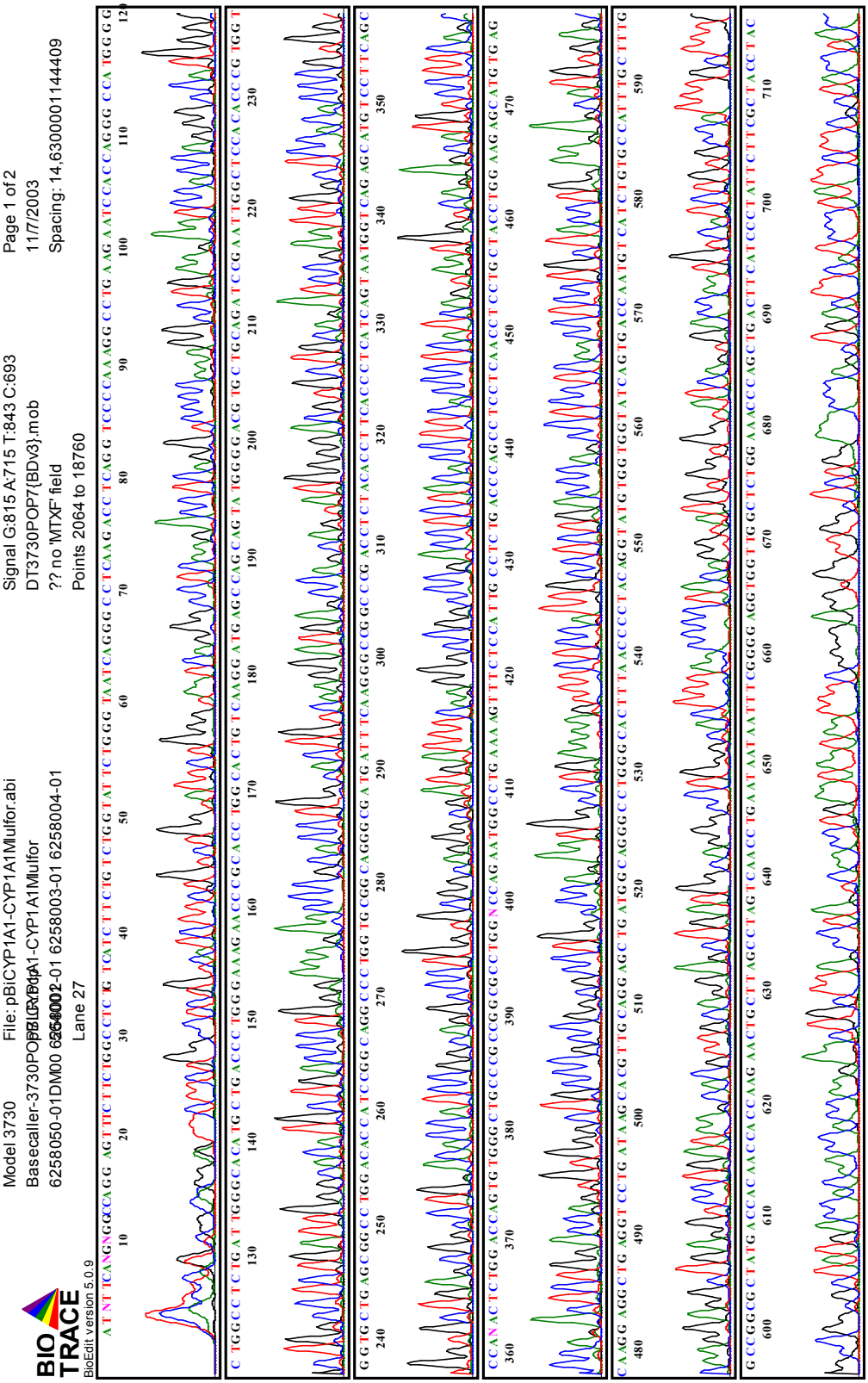
Der Ladesgraduiertenförderung Rheinland-Pfalz danke ich für die Finanzierung meiner Person während der Promotion über einen Zeitraum von zwei Jahren.

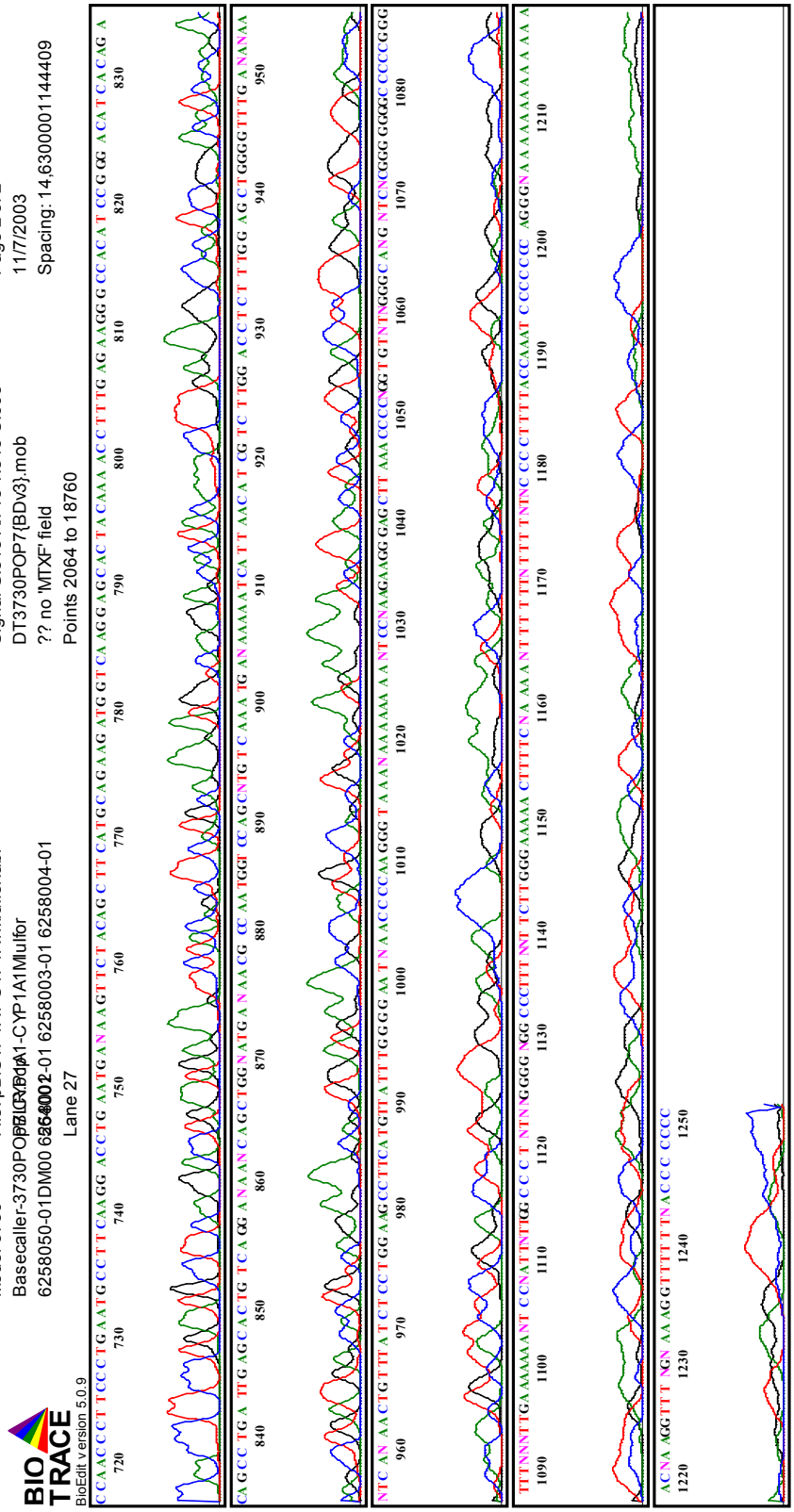
Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und bei allen Freunden die mir in den letzten Jahren zur Seite standen und mich während meiner Promotionszeit motiviert und unterstützt haben.

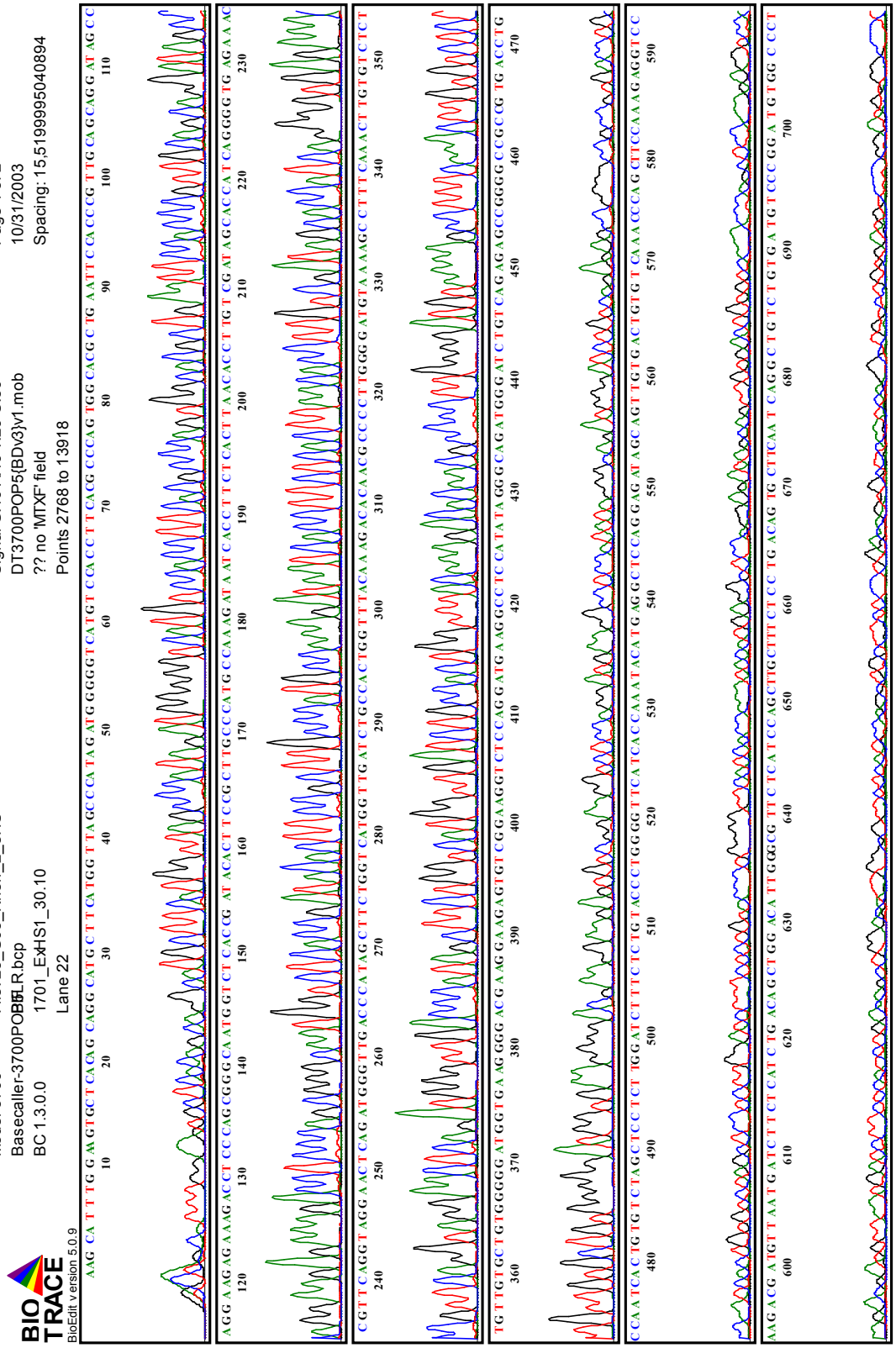
Zum Abschluss möchte ich einen ganz großes Dankeschön an Andreas aussprechen: Ohne dich hätte ich viele Dinge in meinem bisherigen Leben nicht so hinbekommen, wie ich sie mit deiner Unterstützung meistern konnte. Dafür danke ich dir von Herzen.

15 Anhang

Sequenzierungsdaten des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1



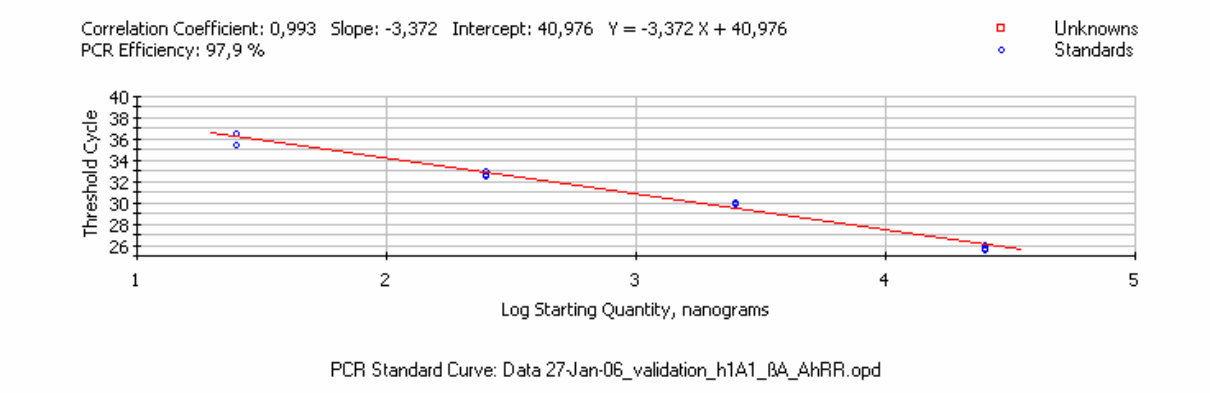

BIO TRACE
BioEdit version 5.0.9
Model 3730
Basecaller-3730POP7{BDv3}.mob
6258050-01DM00 6258002-01 6258003-01 6258004-01
File: pBiCYP1A1-CYP1A1Mulfor.abi
Lane 27
Signal G:815 A:715 T:843 C:693
DT3730POP7{BDv3}.mob
?? no 'MTXF' field
Points 2064 to 18760
Page 2 of 2
11/7/2003
Spacing: 14,6300001144409



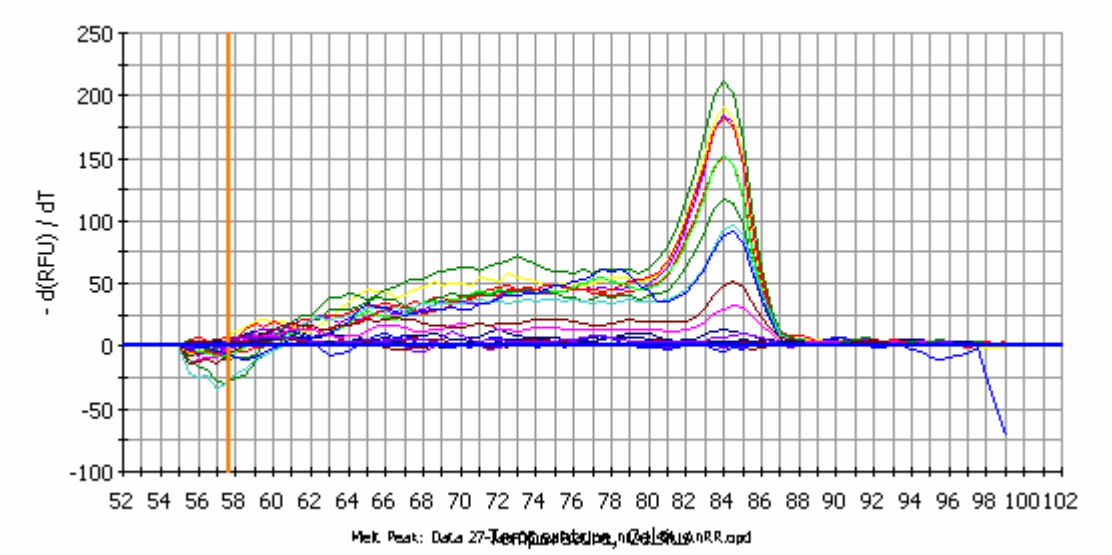
I Sequenzierungs-Rohdaten des Expressionsvektors pBiEGFP-Tet/hCYP1A1

Primervalidierung für die Real-time PCR

Maus ß-Actin

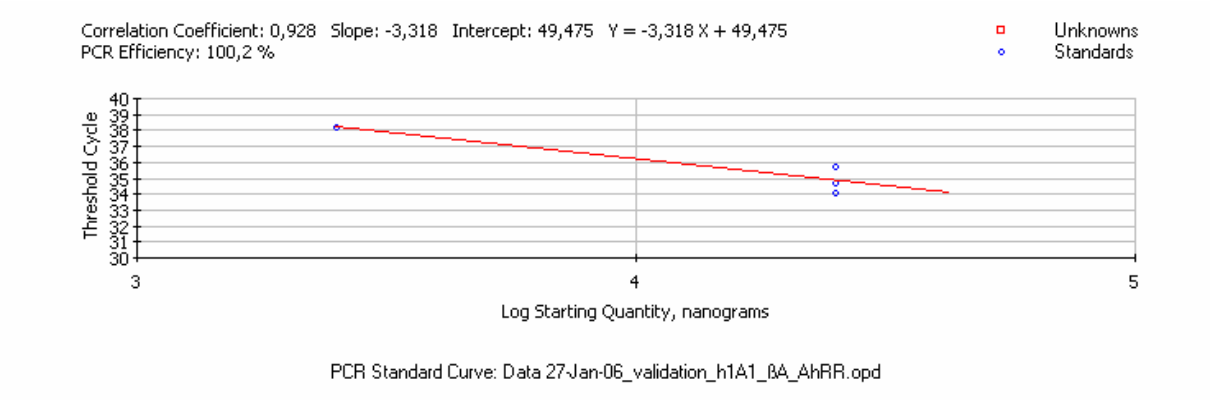


II PCR Standardkurve für Maus ß-Actin

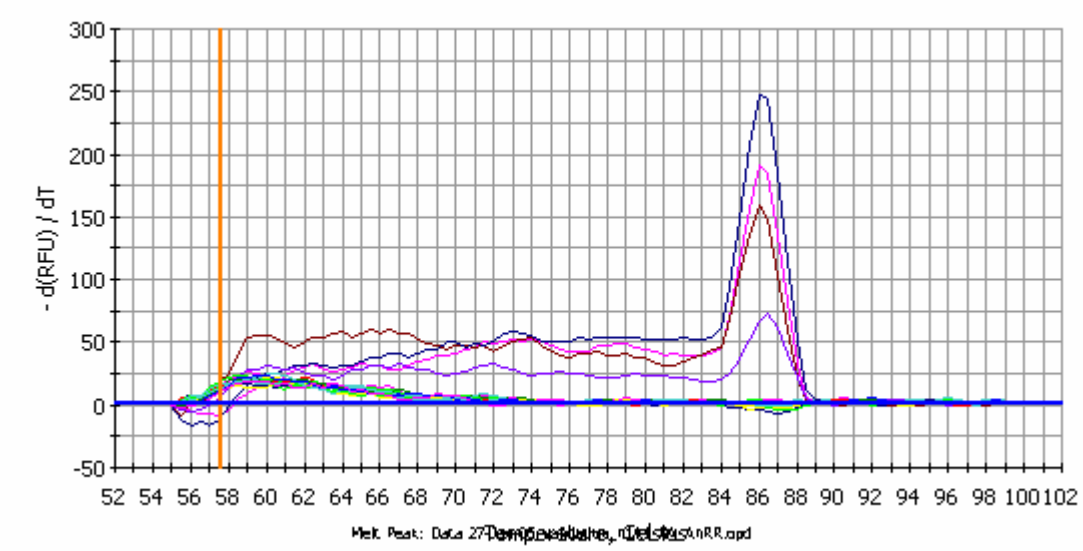


III Schmelzkurvenanalyse für Maus ß-Actin

Maus AhRR

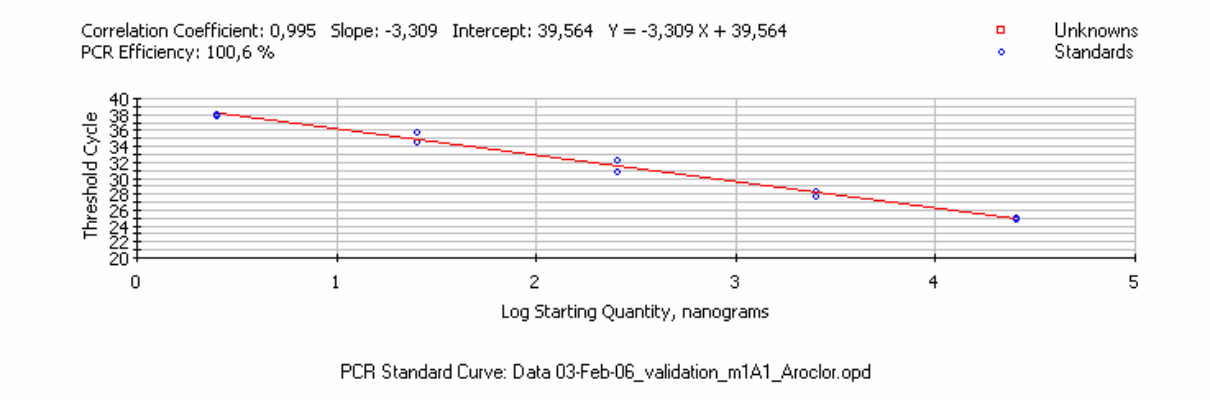


IV PCR Standardkurve für Maus AhRR

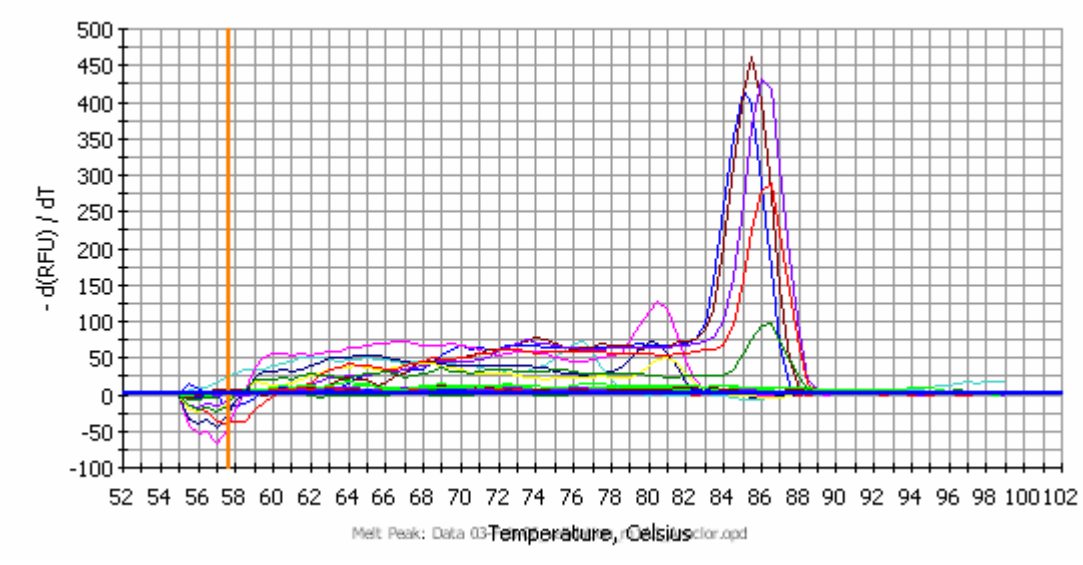


V Schmelzkurvenanalyse für Maus AhRR

Maus CYP1A1

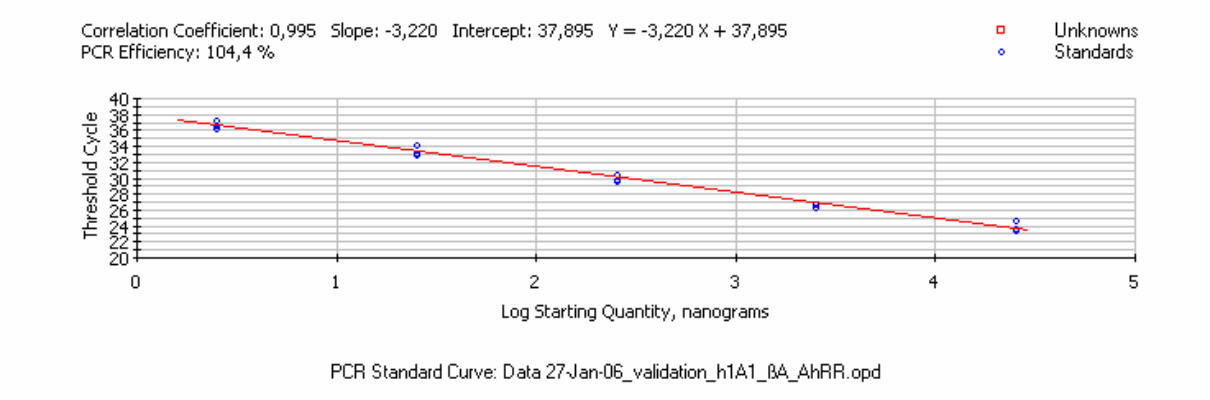


VI PCR Standardkurve für Maus CYP1A1

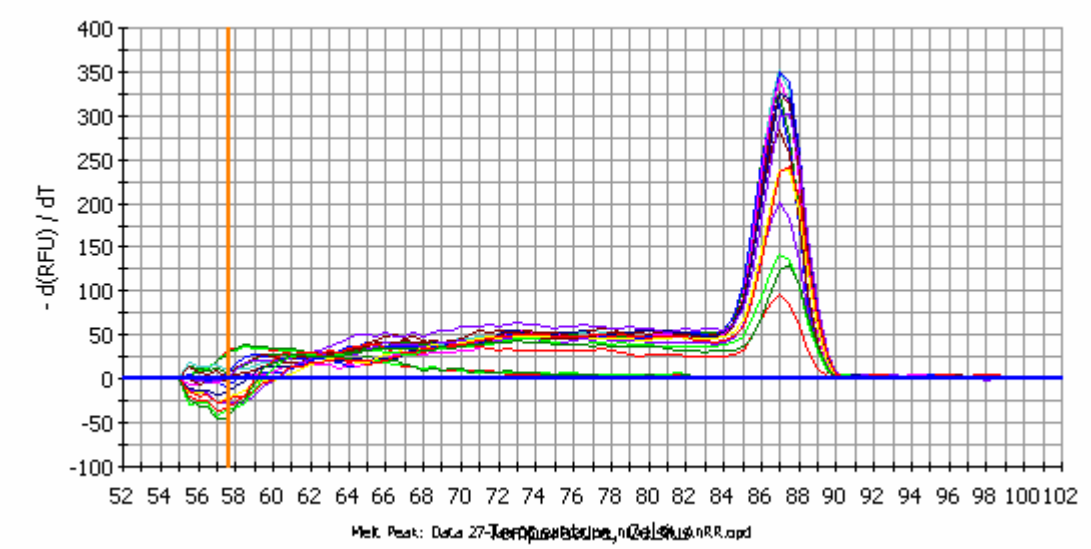


VII Schmelzkurvenanalyse für Maus CYP1A1

Human CYP1A1

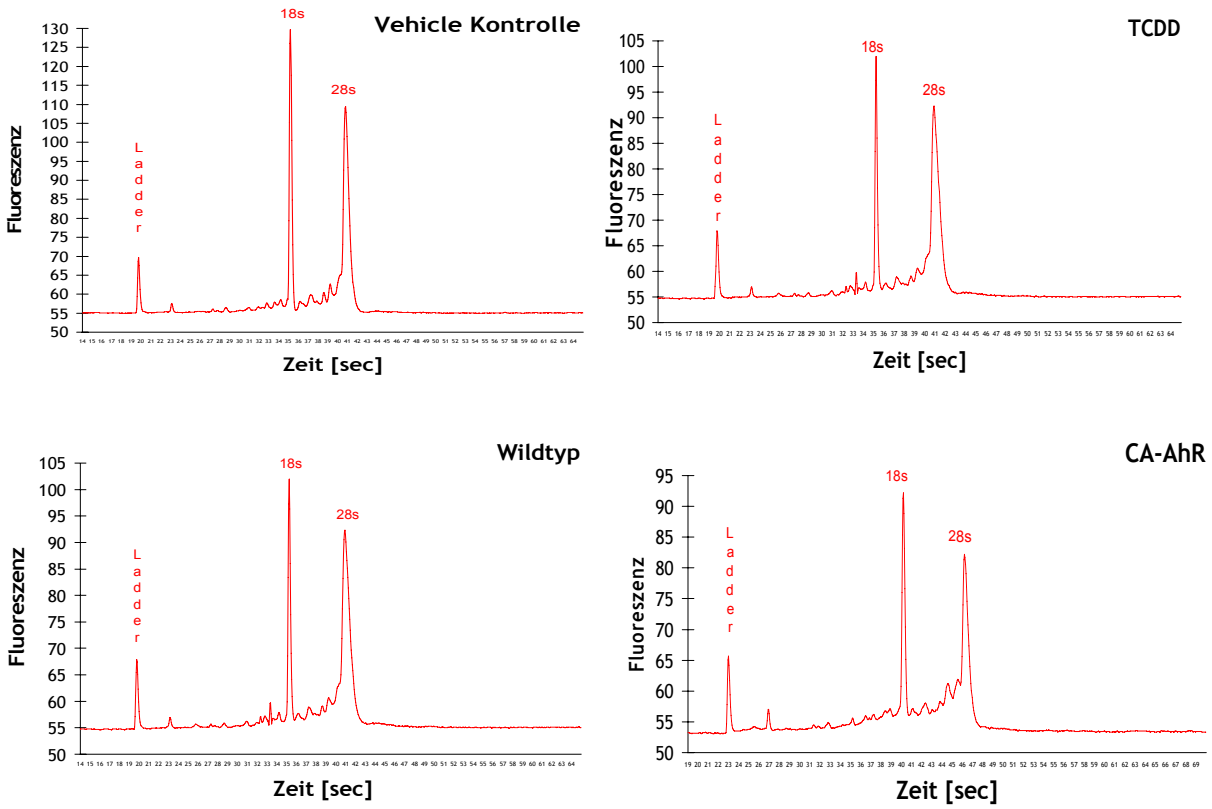


VIII PCR Standardkurve für Human CYP1A1



IX Schmelzkurvenanalyse für Human CYP1A1

Bioanalyzer Daten



X Exemplarische Beispiele für Bioanalyzer-Chromatogramme

Geräteeinstellungen der HPLC-MS zur Quantifizierung von 8-oxo dG

MS-Parameter

Period:	1
Duration:	25.002 min
Cycle Time:	0.465 sec
# Cycles:	3226
Period Delay:	0.00 sec

Period: 1	Experiment: 1
Scan Mode:	None
Scan Type :	positive MRM
Resolution Q1 :	UNIT
Resolution Q3 :	UNIT
Intesitiy Thres.:	0.00 cps
Smart Settling:	off
Settling Time:	0.00 ms
MR Pause:	5.00 ms
MCA:	No
NEB:	8.00
CUR:	14.00
IS	4000.00
TEM:	400.00
CAD:	4.00
Step Size:	0.00 amu

Q1 Mass (amu) 284.06 Q3 Mass 168.32 Time (msec) 150.00

Param		Start	Stop
	DP	26.00	26.00
	FP	130.00	130.00
	EP	-10.00	-10.00
	CE	19.00	19.00
	CXP	14.00	14.00

Q1 Mass (amu) 284.06 Q3 Mass 140.16 Time (msec) 150.00

Param		Start	Stop
	DP	26.00	26.00
	FP	130.00	130.00
	EP	-10.00	-10.00
	CE	45.00	45.00
	CXP	10.00	10.00

Q1 Mass (amu)268.10 Q3 Mass 152.10 Time (msec) 150.00

Param		Start	Stop
	DP	26.00	26.00
	FP	130.00	130.00
	EP	-10.00	-10.00
	CE	30.00	30.00
	CXP	15.00	15.00

Geräteeinstellung am Autosampler:

Syringe Size (µl):	100
Injection Volume (µl):	50
Draw Speed (µl/min):	200.0
Eject Speed (µl/min):	200.0

LC-Parameter:

Maximum Pressure (psi):		290.0	
Flussrate (µl/min):		300	
Gradient:	Total Time (min)	A (%)	B (%)
	0.00	98.0	2.0
	5.00	98.0	2.0
	15.00	85.0	15.0
	25.00	85.0	15.0
	26.0	98.0	2.0
	30.00	98.0	2.0

Superarray Genliste

1	2	3	4	5	6	7	8
Anxa5	Atm	Bax	Bcl2l1	Bcl2l2	Casp1	Casp8	Ccnc
9	10	11	12	13	14	15	16
Ccnd1	Ccng1	Cdkn1a	Cryab	Csf2	Cyp1a1	Cyp1a2	Cyp1b1
17	18	19	20	21	22	23	24
Cyp2a5	Cyp2b10	Cyp2b9	Cyp2c29	Cyp3a11	Cyp4a10	Cyp4a14	Cyp7a1
25	26	27	28	29	30	31	32
Cyp7b1	Ddit3	Dnaja1	E2f1	Egr1	Ephx2	Ercc1	Ercc2
33	34	35	36	37	38	39	40
Ercc4	Ercc5	Fmo1	Fmo4	Fmo5	Gadd45a	Gadd45b	Gpx1
41	42	43	44	45	46	47	48
Gpx2	Gsr	Gstm1	Gstm3	Hmox1	Hmox2	Hsf1	Hsp110
49	50	51	52	53	54	55	56
Hspb1	Hspd1	Hspa1b	Hspa1l	Hspa4	Hspa5	Hspa8	Hspa9a
57	58	59	60	61	62	63	64
Hspe1	Igfbp6	Il18	Il1a	Il1b	Il6	Lta	Mdm2
65	66	67	68	69	70	71	72
Mif	Polr2k	Mt2	Nfkb1	Nfkbia	Nos2	Pcna	Por
73	74	75	76	77	78	79	80
Ptgs2	Rad23a	Rad50	Chek2	Ccl21a	Ccl21b	Ccl21c	Ccl3
81	82	83	84	85	86	87	88
Ccl4	Cxcl10	Serpine1	Sod1	Sod2	Tnfrsf1a	Tnfsf10	Fasl
89	90	91	92	93	94	95	96
Tradd	Trp53	Ugt1a2	Ung	Xrcc1	Xrcc2	Xrcc4	Xrcc5
97	98	99	100	101	102	103	104
PUC18	PUC18	PUC18	Blank	Blank	Blank	Gapdh	Gapdh
105	106	107	108	109	110	111	112
Ppia	Ppia	Ppia	Ppia	Rpl13a	Rpl13a	Actb	Actb

XI Anordnung der einzelnen Gene auf der Membran des cDNA Arrays „Stress and Toxicity“ MM-012 (Superarray)

Symbol	Genbank	Unigene	Genname
Anxa5	NM_009673	Mm.1620	Anx5/R74653
Atm	NM_007499	Mm.5088	AI256621/C030026E19Rik
Bax	NM_007527	Mm.19904	BAX
Bcl2l1	NM_009743	Mm.238213	Bcl-XL/Bcl-Xs
Bcl2l2	NM_007537	Mm.6967	AW048834/Bcl-w
Casp1	NM_009807	Mm.1051	ICE/Il1bc
Casp8	NM_009812	Mm.336851	Caspase-8/FLICE
Ccnc	NM_016746	Mm.278584	AI451004/AU020987
Ccnd1	NM_007631	Mm.273049	AI327039/Cyl-1
Ccng1	NM_009831	Mm.2103	AI314029
Cdkn1a	NM_007669	Mm.195663	CAP20/CDKI
Cryab	NM_009964	Mm.178	Crya-2/Crya2
Csf2	NM_009969	Mm.4922	Csfgm/Gm-CSf
Cyp1a1	NM_009992	Mm.14089	AHH/AHRR
Cyp1a2	NM_009993	Mm.15537	CP12/P450-3
Cyp1b1	NM_009994	Mm.214016	CP1B/P4501b1
Cyp2a5	NM_007812	Mm.154643	Coh/Cyp15a2
Cyp2b10	NM_009998	Mm.218749	Cyp2b/Cyp2b20
Cyp2b9	NM_010000	Mm.14413	Cyp2b
Cyp2c29	NM_007815	Mm.20764	AHOH/AHOHase
Cyp3a11	NM_007818	Mm.332844	AI256190/Cyp3a
Cyp4a10	NM_010011	Mm.10742	AI647584/Cyp4a
Cyp4a14	NM_007822	Mm.250901	AI314743
Cyp7a1	NM_007824	Mm.57029	CYP7A1
Cyp7b1	NM_007825	Mm.316000	AW261589/D3Ertd552e
Ddit3	NM_007837	Mm.110220	CHOP-10/CHOP10
Dnaja1	NM_008298	Mm.27897	Hsj2/Nedd7
E2f1	NM_007891	Mm.18036	E2F-1/mKIAA4009
Egr1	NM_007913	Mm.181959	A530045N19Rik/ETR103
Ephx2	NM_007940	Mm.15295	AW106936/Eph2
Ercc1	NM_007948	Mm.280913	Ercc-1
Ercc2	NM_007949	Mm.36524	AA407812/AU020867
Ercc4	NM_015769	Mm.287837	AI606920/Xpf
Ercc5	NM_011729	Mm.2213	Xpg
Fmo1	NM_010231	Mm.976	FMO1
Fmo4	NM_144878	Mm.155164	D1Ertd532e

Fmo5	NM_010232	Mm.385180	5033418D19Rik/AI195026
Gadd45a	NM_007836	Mm.72235	AA545191/Ddit1
Gadd45b	NM_008655	Mm.1360	AI323528/Myd118
Gpx1	NM_008160	Mm.1090	AI195024/AL033363
Gpx2	NM_030677	Mm.371561	GPx-GI
Gsr	NM_010344	Mm.283573	AI325518/D8Ertd238e
Gstm1	NM_010358	Mm.37199	Gstb-1/Gstb1
Gstm3	NM_010359	Mm.347436	AI042769/Fsc2
Hmox1	NM_010442	Mm.276389	D8Wsu38e/HO-1
Hmox2	NM_010443	Mm.272866	HO-2
Hsf1	NM_008296	Mm.347444	AA960185
Hsp110	NM_013559	Mm.270681	105kDa/AI790491
Hspb1	NM_013560	Mm.13849	27kDa/Hsp25
Hspd1	NM_010477	Mm.1777	60kDa/Hsp60
Hspa1b	XM_286803	Mm.372314	70kDa/HSP70A1
Hspa1l	NM_013558	Mm.14287	70kDa/Hsc70t
Hspa4	NM_008300	Mm.239865	70kDa/AI317151
Hspa5	NM_022310	Mm.330160	78kDa/AL022860
Hspa8	NM_031165	Mm.336743	2410008N15Rik/70kDa
Hspa9a	NM_010481	Mm.209419	74kDa/GRP75
Hspe1	NM_008303	Mm.215667	10kDa/mt-cpn10
Igfbp6	NM_008344	Mm.358609	IGFBP-6
Il18	NM_008360	Mm.1410	Igif/Il-18
Il1a	NM_010554	Mm.15534	Il-1a
Il1b	NM_008361	Mm.222830	IL-1beta/Il-1b
Il6	NM_031168	Mm.1019	Il-6
Lta	NM_010735	Mm.87787	LT/LT-[a]
Mdm2	NM_010786	Mm.22670	1700007J15Rik/AA415488
Mif	NM_010798	Mm.2326	GIF/Glif
Polr2k	NM_023127	Mm.27375	MafY/Mt1a
Mt2	NM_008630	Mm.147226	AA409533/MT-II
Nfkb1	NM_008689	Mm.256765	NF-KB1/NF-kappaB
Nfkbia	NM_010907	Mm.170515	AI462015/Nfkbi
Nos2	NM_010927	Mm.2893	NOS-II/Nos-2
Pcna	NM_011045	Mm.7141	PCNA
Por	NM_008898	Mm.3863	CPR/CYPOR
Ptgs2	NM_011198	Mm.292547	COX2/Cox-2
Rad23a	NM_009010	Mm.255539	2310040P19Rik/AL024030

Rad50	NM_009012	Mm.4888	Mrell/Rad50l
Chek2	NM_016681	Mm.279308	CHK2/Cds1
Ccl21a	NM_011335	Mm.348219	6CKBAC1/6Ckine
Ccl21b	NM_011124	Mm.220853	6CKBAC2/6Ckine
Ccl21c	NM_023052	Mm.195508	CKb9/SLC
Ccl3	NM_011337	Mm.1282	AI323804/G0S19-1
Ccl4	NM_013652	Mm.244263	Act-2/MIP-1B
Cxcl10	NM_021274	Mm.877	C7/CRG-2
Serpine1	NM_008871	Mm.250422	PAI-1/PAI1
Sod1	NM_011434	Mm.276325	B430204E11Rik/Cu
Sod2	NM_013671	Mm.290876	MnSOD/Sod-2
Tnfrsf1a	NM_011609	Mm.1258	CD120a/FPF
Tnfsf10	NM_009425	Mm.1062	A330042I21Rik/AI448571
Fasl	NM_010177	Mm.3355	APT1LG1/CD178
Tradd	NM_001033161	Mm.264255	9130005N23Rik/AA930854
Trp53	NM_011640	Mm.222	bbl/bfy
Ugt1a2	NM_013701	Mm.300095	UGTBr/p
Ung	NM_011677	Mm.1393	UNG1/UNG2
Xrcc1	NM_009532	Mm.4347	Xrcc-1
Xrcc2	NM_020570	Mm.143767	4921524O04Rik/8030409M04Rik
Xrcc4	NM_028012	Mm.37531	2310057B22Rik/AW413319
Xrcc5	NM_009533	Mm.246952	AI314015/Ku80
PUC18	L08752	N/A	pUC18
PUC18	L08752	N/A	pUC18
PUC18	L08752	N/A	pUC18
Gapdh	NM_008084	Mm.343110	Gapd
Gapdh	NM_008084	Mm.343110	Gapd
Ppia	NM_008907	Mm.5246	2700098C05/Cphn
Ppia	NM_008907	Mm.5246	2700098C05/Cphn
Ppia	NM_008907	Mm.5246	2700098C05/Cphn
Ppia	NM_008907	Mm.5246	2700098C05/Cphn
Rpl13a	NM_009438	Mm.180458	1810026N22Rik/Tstap198-7
Rpl13a	NM_009438	Mm.180458	1810026N22Rik/Tstap198-7
Actb	NM_007393	Mm.297	Actx/E430023M04Rik
Actb	NM_007393	Mm.297	Actx/E430023M04Rik

XII Auflistung der auf dem Array „Stress and Toxicity“ MM-012 (Superarray) gespotteten Gene