

Untersuchungen zur durch UVC-Bestrahlung,
Ochratoxin A und Cycloheximid induzierten Apoptose in
Leberzellen von Ratte und Mensch sowie zu deren
Beeinflussung durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

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

Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker

Martin Chopra

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
Kaiserslautern 2010

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24. Juni 2010

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Thiel

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 Toxikologie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk zwischen April 2007 und September 2008, und zwischen April 2009 und März 2010, sowie an der *School of Anatomy and Human Biology* der *University of Western Australia* in Crawley im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Dharmarajan zwischen Oktober 2008 und März 2009 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dieter Schrenk für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für seinen steten Willen zur Diskussion und für die Freiheiten, die ich in der Durchführung meiner Dissertation hatte. Nicht zuletzt möchte ich Herrn Schrenk dafür danken, dass ich einen Teil meiner Arbeit in Perth durchführen durfte.

All meinen Kollegen im Arbeitskreis, sowie den Studenten und Diplomanden, die ich betreut habe, danke ich für den Spaß und die Ablenkung während der letzten drei Jahre. Besonders hervorheben möchte ich dabei Carolin Wippel, Pascal Link, Maria Tsaneva und Bettina Kratz und natürlich Andreas Rau.

Dem Land Rheinland-Pfalz danke ich für die Gewährung des LGFG-Stipendiums für zwei Jahre, sowie dem DAAD für die Gewährung des Aufstockungsstipendiums für 6 Monate.

Dharma danke ich dafür, dass er mich so bereitwillig in seine Gruppe aufgenommen hat, und allen seinen Mitarbeitern sowie den Doktoranden aus den anderen Gruppen, mit denen ich ein Büro teilen durfte und die mich soviel über die australische Kultur gelehrt haben. Mein besonderer Dank nach Australien geht an Greg für seine Hilfe in allen organisatorischen Fragen, an Simon und an Kathy für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie.

George Yeoh danke ich für die Überlassung der Huh-7-Zellen.

Gregor Meiss danke ich für die Überlassung der CAD und Caspase 3 sowie für die Aufnahme in seiner Gruppe für zwei Tage, sowie Daniel und Steffi für die Hilfe beim CAD-Aktivitätstest.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich, weil sie immer für mich da waren, in guten wie in schlechten Zeiten.

Und vor allem möchte ich Christina danken, einfach für alles, aber vor allem dafür, dass die letzten drei Jahre ganz besondere Jahre waren.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Kanzerogenese	1
1.2	Apoptose	2
1.2.1	Caspasen-vermittelte Signaltransduktion während der Apoptose	4
1.2.1.1	Der intrinsische Signalweg	4
1.2.1.2	Der extrinsische Signalweg	5
1.2.2	Induktion von Apoptose durch ultraviolette (UV)-Strahlung	7
1.2.3	Induktion von Apoptose durch OTA	9
1.2.4	Induktion der Apoptose durch Cycloheximid	11
1.3	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	12
1.3.1	Kanzerogenität von TCDD	14
1.3.1.1	Genotoxizität	14
1.3.1.2	Langzeit-Kanzerogenitätsstudien	14
1.3.1.3	Initiations-Promotionsstudien	15
1.3.1.4	Kanzerogenität beim Menschen	16
1.3.2	TCDD und Apoptose in Leberzellen der Ratte	17
1.4	Der Arylhydrokarbon Rezeptor	18
1.5	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase (CYP) 1A1	21
2	<u>Aufgabenstellung</u>	23
3	<u>Material und Methoden</u>	24
3.1	Arbeiten mit primären Hepatozyten	24
3.1.1	Primärhepatozyten aus männlichen Wistar Ratten	24
3.1.1.1	Isolierung	24
3.1.1.2	Bestimmung der Gesamt- und der Lebendzellzahl	27
3.1.1.3	Kollagenieren von Multinapf-Platten und Petrischalen	27
3.1.1.4	Zellkultur und Inkubationen	29
3.1.2	Trypan-Blau Test	30
3.1.3	Resazurin-Reduktionstest	31
3.1.4	Proteinisolierung – Zelllysate	32
3.1.5	Isolierung von Zellfraktionen – Mitochondrien und Zytosol	33
3.1.6	Isolierung von Zellfraktionen – Zellkerne	34

3.1.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	35
3.1.8	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.1.9	Western blot und Immunoblot	38
3.1.10	Ribonukleinsäure (RNS)-Isolierung mit Trizol	43
3.1.11	RNS-Isolierung mit RNeasy Mini Kit	44
3.1.12	RNS Agarose-Gelelektrophorese	44
3.1.13	DNase-Verdau	46
3.1.14	cDNS-Synthese	47
3.1.15	<i>Quantitative Real-time reverse transcriptase PCR</i>	47
3.1.16	qRT-PCR-Arrays <i>rat apoptosis</i>	50
3.1.17	Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	54
3.1.18	DNS-Fragmentierungs-Analyse – „ <i>DNA-laddering</i> “	55
3.1.19	Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-Aktivität	57
3.1.20	<i>In vitro</i> CAD Aktivitätstest	59
3.1.21	Einbau von [4,5- ³ H]-L-Leucin	61
3.1.22	Bestimmung der Aktivität der humanen Topoisomerase II α	62
3.2	Arbeiten mit humanen Hepatomzellen Huh-7	63
3.2.1	Kultur der humanen Hepatomzelllinie Huh-7	63
3.2.2	JC-1 Assay	64
3.2.3	Durchflusszytometrische Bestimmung des DNS-Gehalts	65
3.2.4	Fluorimetrische Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3/7	66
3.2.5	DNS-Fragmentierungs-Analyse – „ <i>DNA-laddering</i> “	67
3.3	Statistik	68
4.	<u>Ergebnisse</u>	69
4.1	Primäre Hepatozyten	69
4.1.1	Expression von Bcl-x _L und CYP1A1	69
4.1.2	Zytotoxizität	74
4.1.3	Nukleäre Apoptose	79
4.1.4	Beteiligung des AhR an der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD	87
4.1.5	p53-Proteinmenge	90
4.1.6	qRT-PCR-Arrays <i>rat apoptosis</i>	95
4.1.7	p53-Zielproteine	107
4.1.8	Caspasen-Aktivitäten und proteolytische Aktivierung der Caspase-3	110
4.1.9	CAD und ICAD	122
4.1.10	Proteinbiosynthese	127
4.1.11	Einfluss von Cycloheximid auf die Hemmung der UVC-induzierten Apoptose durch TCDD	131

4.1.12	<i>Apoptosis inducing factor</i> (AIF) und Endonuklease G	133
4.1.13	<i>In vitro</i> CAD Aktivitätstest	138
4.1.14	Histon 2AX-Phosphorylierung	146
4.1.15	Einfluss von PARP-Inhibitoren auf die Hemmung der UVC-induzierten Apoptose durch TCDD	150
4.1.16	Beeinflussung der Topoisomerase II α -Aktivität durch OTA und TCDD	153
4.2	Humane Hepatomzellen Huh-7	154
4.2.1	DNS-Fragmentierung – „DNA-laddering“	155
4.2.2	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung und Apoptoserate	158
4.2.3	JC-1-Assay	161
4.2.4	Caspasen 3/7-Aktivität	162
4.2.5	Lokalisation und Expression von β -Catenin und NF- κ B p65	163
4.2.6	Histon 2AX-Phosphorylierung	167
4.2.7	Expression von sFRP-4	171
5.	<u>Diskussion</u>	173
5.1	TCDD und Apoptose – Stand der Forschung	174
5.2	Zytotoxizität	177
5.3	Nukleäre Apoptose	178
5.4	Beteiligung des AhR an der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD	180
5.5	p53-Akkumulation	182
5.6	Genexpression	185
5.7	Caspasen-abhängige Apoptosewege	198
5.8	Weitere anti-apoptotische Signalwege in Huh-7-Zellen	202
5.9	Apoptotische Nukleasen	205
5.9.1	Endonuklease G	205
5.9.2	AIF	207
5.9.3	CAD	207
5.9.3.1	<i>in vitro</i> CAD Aktivitätstest	208
5.9.3.2	Regulationsmechanismen für CAD	211
5.10	Proteinbiosynthese	218
5.11	Mitochondriales Membranpotential	219
5.12	Topoisomerase II α	220
5.13	Zusammenfassende Diskussion	221
6	<u>Zusammenfassung und Ausblick</u>	225

Anhänge

Literaturverzeichnis

Veröffentlichungen

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der Transformation	1
Abbildung 2: Wege des Zelltodes	3
Abbildung 3: Signalwege der Apoptose	5
Abbildung 4: Strukturformel von Ochratoxin A	9
Abbildung 5: Strukturformel von Cycloheximid	11
Abbildung 6: Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des AhR	19
Abbildung 8: Mechanismus der Geninduktion über den AhR	20
Abbildung 9: Primäre Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten	27
Abbildung 10: Strukturformeln von Resazurin und Resorufin	31
Abbildung 11: Aufbau des blotting-Stapels	39
Abbildung 12: qRT-PCR bcl-x _L und cyp1A1 (TCDD)	70
Abbildung 13: Western blot Bcl-x _L und CYP1A1 (TCDD)	71
Abbildung 14: Densitometrische Auswertung Western blot Bcl-x _L und CYP1A1 (TCDD)	73
Abbildung 15: Zytotoxizität (UV und TCDD)	75
Abbildung 16: Zytotoxizität (UV, TCDD und CH-223191, Trypan-Blau Test)	76
Abbildung 17: Zytotoxizität (OTA und TCDD)	77
Abbildung 18: Zytotoxizität (CHX und TCDD)	78
Abbildung 19: DAPI-angefärbte Kerne unbehandelter Zellen	80
Abbildung 20: DAPI-angefärbte Zellkerne nach UV-Bestrahlung	80
Abbildung 21: Nukleäre Apoptose (UV, TCDD und zVAD-fmk)	82
Abbildung 22: Nukleäre Apoptose (UV und TCDD, 24 h/24 h)	84
Abbildung 23: Nukleäre Apoptose (OTA und TCDD)	85
Abbildung 24: Nukleäre Apoptose (CHX und TCDD)	86
Abbildung 25: DAPI-Färbeexperimente (UV, OTA, CHX und TCDD, Caspasen-Abhängigkeit)	87
Abbildung 26: Western blot CYP1A1 (TCDD und AhR-Antagonisten)	88
Abbildung 27: Nukleäre Apoptose (UV, TCDD und AhR-Antagonisten)	89
Abbildung 28: Bestrahlte Zellen (UV und TCDD)	91
Abbildung 29: Western blot CYP1A1, p53 (UV und TCDD)	92
Abbildung 30: Densitometrische Auswertung CYP1A1 (UV und TCDD)	93
Abbildung 31: Western blot p53 (UV, OTA, CHX und TCDD)	94
Abbildung 32: Western blot p53 (UV, TCDD, CH-223191, zVAD-fmk)	95
Abbildung 33: Scatter Plot DMSO vs. TCDD 24 h	98
Abbildung 34: Scatter Plot DMSO vs. TCDD 48 h	98
Abbildung 35: qRT-PCR cyp1A1 (Proben für qRT-PCR-Arrays) 24/48 h	99
Abbildung 36: Scatter Plot DMSO vs. UV 10 J/m ² 24 h	103
Abbildung 37: Scatter Plot DMSO vs. UV 10 J/m ² + 1 nM TCDD 24 h	103
Abbildung 38: Scatter Plot DMSO vs. UV 50 J/m ² 24 h	104
Abbildung 39: Scatter Plot DMSO vs. UV 50 J/m ² + 1 nM TCDD 24 h	104

Abbildung 40: Scatter Plot DMSO vs. 1 μ M OTA 24 h	105
Abbildung 41: Scatter Plot DMSO vs. 1 μ M OTA + 1 nM TCDD 24 h	105
Abbildung 42: qRT-PCR cyp1A1 (Proben für qRT-PCR-Arrays, Apoptose, 24 h)	106
Abbildung 43: Western blot Apaf-1, Bax (UV und TCDD)	108
Abbildung 44: Western blot Apaf-1, Bad, Bax (OTA)	109
Abbildung 45: Caspasen-Aktivitäten (UV, TCDD und zVAD-fmk)	112
Abbildung 46: Caspasen-Aktivitäten (OTA und TCDD)	113
Abbildung 47: Caspasen-Aktivitäten (CHX und TCDD)	114
Abbildung 48: Western blot PARP, Caspase 3 (UV und TCDD)	116
Abbildung 49: Densitometrische Auswertung PARP (UV und TCDD)	118
Abbildung 50: Western blot Caspase 3 (UV, TCDD und zVAD-fmk)	119
Abbildung 51: Western blot Caspase 3 (UV, OTA, CHX und TCDD)	121
Abbildung 52: Western blot CAD und ICAD (UV, OTA und TCDD)	124
Abbildung 53: Western blot CAD und ICAD (OTA und TCDD)	125
Abbildung 54: Western blot CAD und ICAD (CHX und TCDD)	126
Abbildung 55: Hemmung der Proteinbiosynthese durch OTA	128
Abbildung 56: Hemmung der Proteinbiosynthese durch CHX	130
Abbildung 57: Einfluss von CHX auf TCDD-abhängige Apoptosehemmung	132
Abbildung 58: Western blot AIF und Endonuklease G in unbehandelten primären Hepatozyten	133
Abbildung 59: Western blot AIF (Mitochondrien und Zytosol, UV und TCDD)	134
Abbildung 60: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, UV und TCDD)	136
Abbildung 61: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, OTA und TCDD)	137
Abbildung 62: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, CHX und TCDD)	138
Abbildung 63: Western blot des DFF-Komplexes vor und nach Aktivierung durch Caspase 3	139
Abbildung 64: CAD Aktivitätstest (genomische DNS und TCDD)	140
Abbildung 65: CAD Aktivitätstest (Zellkerne DMSO/TCDD 24 h)	141
Abbildung 66: CAD Aktivitätstest (Zellkerne UV, TCDD, CH-223191 1 h)	142
Abbildung 67: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 1 h, ohne CAD, Mg^{2+} , Ca^{2+})	143
Abbildung 68: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO und zVAD-fmk)	144
Abbildung 69: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 1 h, ohne CAD, UV, DMSO, TCDD, CH-223191)	144
Abbildung 70: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO, TCDD, CH-223191)	145
Abbildung 71: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO, TCDD, Antikörper)	146
Abbildung 72: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV und TCDD, 1 h und 24 h)	148
Abbildung 73: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV, TCDD und CH-223191)	149
Abbildung 74: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV, TCDD und zVAD-fmk)	150
Abbildung 75: Einfluss von PARP-Inhibitoren auf die TCDD-abhängige Apoptosehemmung	152
Abbildung 76: Topoisomerase II α -Aktivität OTA	154
Abbildung 77: Topoisomerase II α -Aktivität TCDD	154
Abbildung 78: DNS-Fragmentierungsanalyse (Huh-7-Zellen, UV und TCDD)	155
Abbildung 79: Huh-7-Zellen (UV und TCDD)	156
Abbildung 80: Huh-7-Zellen 0 bis 24 h nach Bestrahlung mit UV-Licht (10 J/m ²)	157

Abbildung 81: DNS-Fragmentierungsanalyse (Huh-7, Zeitverlauf UV)	158
Abbildung 82: Graphische Darstellung der Zellzyklusverteilung (Huh-7, UV und 10 nM TCDD)	159
Abbildung 83: Zellzyklus-Verteilung (Huh-7, UV und 10 nM TCDD)	160
Abbildung 84: Prozentualer Anteil an G ₂ /M-Zellen (Huh-7, UV und 10 nM TCDD)	160
Abbildung 85: Prozentualer Anteil an sub G ₁ -Zellen (Huh-7, UV und 10 nM TCDD)	161
Abbildung 86: JC-1-Assay (Huh-7, UV und TCDD)	162
Abbildung 87: Caspasen 3/7-Aktivität (DEVDase) (Huh-7, UV und TCDD)	163
Abbildung 88: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, TCDD, Zytosol, Zellkerne)	165
Abbildung 89: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, UV, TCDD, Zytosol)	166
Abbildung 90: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, UV, TCDD, Zellkerne)	167
Abbildung 91: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. Zeitverlauf)	168
Abbildung 92: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. 24 h)	169
Abbildung 93: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. 1 h)	170
Abbildung 94: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. Konzentrationsabhängigkeit)	171
Abbildung 95: Western blot sFRP-4 (Huh-7, UV und TCDD)	172

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der für die Perfusion verwendeten Puffer	26
Tabelle 2: Herstellung der Kollagenlösung	28
Tabelle 3: Zusammensetzung von PBS	30
Tabelle 4: Zusammensetzung der Resazurin-Stammlösung	32
Tabelle 5: Zusammensetzung der Resazurin-Arbeitslösung	32
Tabelle 6: Zusammensetzung des Lysis-Puffer	33
Tabelle 7: Zusammensetzung des 1x Ladepuffer	33
Tabelle 8: Zusammensetzung des hypotonen Lysis Puffer	34
Tabelle 9: Zusammensetzung des Kernisolierungspuffer	34
Tabelle 10: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE	37
Tabelle 11: Zusammensetzung des 3x Ladepuffer für die SDS-PAGE	37
Tabelle 12: Zusammensetzung des 10x Elektrophorese-Puffer	38
Tabelle 13: Zusammensetzung der Blotting-Puffer	39
Tabelle 14: Zusammensetzung des Transferpuffer	40
Tabelle 15: Zusammensetzung der Amidoschwarz-Färbelösung	40
Tabelle 16: Zusammensetzung des Blocking-Puffer	40
Tabelle 17: Zusammensetzung von TBS und TBS-T	41
Tabelle 18: Inkubationen mit den Primärantikörpern	42
Tabelle 19: Zusammensetzung des Chemilumineszenz-Detektionsreagenz	43
Tabelle 20: Zusammensetzung des Stripping-Puffer	43
Tabelle 21: Zusammensetzung des RNS-Auftragspuffer	45
Tabelle 22: Zusammensetzung des 1,5% MOPS-Formaldehyd-Agarosegel	45
Tabelle 23: Zusammensetzung des 10x MOPS-Puffer	46
Tabelle 24: Ansatz für DNase-Verdau	46
Tabelle 25: Ansatz für RT-Reaktion (BioRad)	47
Tabelle 26: Sequenzen der verwendeten Primer für cyp1A1, bcl-x _L und β-actin	49
Tabelle 27: Ansatz für qRT-PCR	49
Tabelle 28: Temperaturprogramm für die qRT-PCR	50
Tabelle 29: <i>Gene table Rat Apoptosis RT² Profiler PCR Array</i>	50
Tabelle 30: Ansatz für RT-Reaktion (SuperArray)	53
Tabelle 31: Temperaturprogramm für die qRT-PCR (PCR-Arrays)	54
Tabelle 32: Zusammensetzung der DAPI-Färbelösung	55
Tabelle 33: Zusammensetzung des TTE Puffer	56
Tabelle 34: Zusammensetzung des TE Puffer	56
Tabelle 35: Zusammensetzung des TAE-Puffer	57
Tabelle 36: Zusammensetzung des Caspase Lysispuffer	58
Tabelle 37: Zusammensetzung des 10x Caspase Reaktionspuffer	59
Tabelle 38: Zusammensetzung des DFF-Dialysepuffer	60
Tabelle 39: Zusammensetzung des 5x CAD Puffer	60

Tabelle 40: Ansatz für <i>in vitro</i> CAD Aktivitätstest	61
Tabelle 41: Zusammensetzung des Master Mixes für den Topoisomerase II α Assay Kit	63
Tabelle 42: Zusammensetzung des PI-Färbepuffer	66
Tabelle 43: Ergebnisse qRT-PCR-Arrays <i>rat apoptosis</i> (TCDD (24/48 h))	96
Tabelle 44: Ergebnisse qRT-PCR-Arrays <i>rat apoptosis</i> (UV, OTA und TCDD)	100
Tabelle 45: Anzahl regulierter Gene qRT-PCR-Arrays <i>rat apoptosis</i> 24 h	106

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
AFC	7-Amido-4-trifluormethylcoumarin
AhR	Arylhydrokarbon Rezeptor
AhRR	AhR-Repressor
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
ANOVA	<i>one-way analysis of variance</i>
Apaf-1	<i>apoptosis protease activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	<i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad-3 related</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CCCP	Carbonylcyanid-3- chlorphenylhydrazon
cFlip	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
CHX	Cycloheximid
CIIA	<i>caspase-activated DNase inhibitor that interacts with apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
CRUK	<i>Charles River United Kingdom</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
CYP1A1	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase 1A1
DAD1	<i>defender against cell death</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNS-Bindungsdomäne
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEN	Diethylnitrosamin
DEX	Dexamethason
DFF	<i>DNA fragmentation factor</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i>
DRE	<i>dioxin-responsive element</i>

EGTA	Ethylenglykol-bis(β)-Aminoethylether-N,N,N',N'-Tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FADD	<i>fas-associated death domain</i>
FKS	Fötales Kälberserum
GSK-3	Glycogensynthasekinase-3
GTF	<i>general transcription factor</i>
H2AX	Histon 2AX
γ H2AX	an ser139 phosphoyliertes H2AX
HMGB	<i>high mobility group box-containing chromatin protein</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSP	<i>heatshock protein</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAD	Inhibitor der CAD
Il10	Interleukin 10
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
Mcl1	<i>myeloid cell leukemia-1</i>
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MNF	3'-Methoxy-4'-Nitroflavon
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NES	Kernexport-Sequenz
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	Kernlokalisierungs-Sequenz
NTP	<i>United States National Toxicology Program</i>
OTA	Ochratoxin A

PAK	polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PAS	bHLH/Per-ARNT-Sim
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pTWI	<i>provisional tolerable weekly intake</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pycard	<i>Pyrin domain and caspase recruitment domain containing</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-time reverse transcriptase PCR</i>
ratio	relative Expression
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sFRP-4	<i>secreted frizzled-related protein 4</i>
Smac	<i>second mitochondrial activator of caspases</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TDI	<i>tolerable daily intake</i>
TEF	<i>toxic equivalency factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEQ	<i>toxic equivalent</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TiPARP	TCDD- <i>inducible</i> PARP
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TRADD	TNFR- <i>associated death domain</i>
TRAF	TNFR- <i>associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
UV	Ultraviolette Strahlung

WHO

World Health Organization

XRE

xenobiotic-responsive element

1 Einleitung

1.1 Kanzerogenese

Der Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle wird als Transformation bezeichnet. Hierbei handelt es sich nach weitläufiger Meinung um einen mehrstufigen Prozess bestehend aus Tumorigenese, Tumorpromotion und Tumordifferenzierung (Abbildung 1).

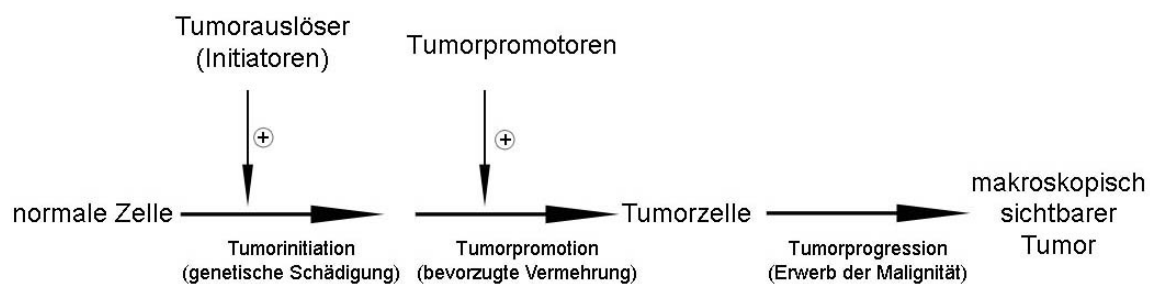


Abbildung 1: Prozess der Transformation (nach Koolmann und Röhm, 2003).

Praktisch jeder Tumor beginnt mit einer Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNS), einer Initiation der betroffenen Zelle. In der Mehrzahl der Fälle wird ein solcher DNS-Schaden von Reparaturenzymen erkannt und behoben. Ist dies nicht der Fall, kann sich eine Mutation in der betroffenen Zelle manifestieren, die als ein verändertes Merkmal bei der Zellteilung weitergegeben wird. Hierbei besonders relevant sind Defekte von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen. Als Tumorpromotion bezeichnet man die bevorzugte Vermehrung einer initiierten Zelle. Die so entstandene Tumorzelle ist zumeist dedifferenziert, sie proliferiert unkontrolliert und weist morphologische und biochemische Veränderungen auf, die sie vom umliegenden Gewebe unterscheiden. Die Tumordifferenzierung bezeichnet das Wachstum der Tumorzelle zu einem makroskopisch sichtbaren Tumor (Dragan et al., 2001; Koolman und Röhm, 2003).

Hanahan und Weinberg präzisieren dieses Mehrstufenmodell: die Tumorigenese beim Menschen ist sehr wahrscheinlich ein vielstufiger Prozess, und all diese Stufen reflektieren (epi-)genetische Veränderungen, die eine normale Zelle progressiv in eine maligne Form transformieren. Aus statistischer Sichtweise betrachtet ergibt sich aus der Altersabhängigkeit vieler Krebsarten die Forderung nach vier bis sieben nötigen Ereignissen für diese Transformation. Folgende sechs Bedingungen, die eine Zelle erfahren muss, um bis zu einem bösartigen Tumor fortzuschreiten, werden

genannt: die Zelle muss autonom für sie positive Wachstumssignale produzieren sowie insensitiv gegenüber anti-Wachstumssignalen sein. Des Weiteren muss sie resistent gegenüber Apoptose werden und immortalisieren, also ihre Telomerstabilität aufrechterhalten, um sich ungehindert teilen zu können. Um das Tumorwachstum zu gewährleisten, bedarf es der Angiogenese. Und in einem letzten Schritt hin zur Malignität des Krebses muss der Tumor in der Lage sein, in das umliegende Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden (Hanahan und Weinberg, 2000).

Chemische Kanzerogene können unterschieden werden in genotoxische und nicht-genotoxische Kanzerogene. Genotoxisch ist eine Substanz dann, wenn sie die DNS schädigt und somit zu Mutationen führt. Nicht-genotoxische Substanzen stören im Allgemeinen die Wachstumskontrolle und führen so zu unkontrollierter Proliferation (Dragan et al., 2001).

1.2 Apoptose

Der Niedergang von Zellen ist ein fundamentaler biologischer Prozess, er ist für das Überleben eines vielzelligen Organismus ebenso notwendig wie die Zellteilung. Im eukaryotischen Organismus spielt die Zerstörung eigener, infizierter Zellen eine wichtige Rolle, um die Vermehrung von Erregern zu stoppen und um auf diese Weise benachbarte Zellen zu schützen. Weitere Funktionen nimmt der programmierte Zelltod bei der Embryogenese sowie im Immunsystem ein. So müssen Zellen des Embryos, die vorübergehende Stütz- und andere Hilfsfunktionen ausüben, im Laufe der fortschreitenden Entwicklung wieder beseitigt werden. Im Immunsystem bedienen sich zytotoxische T-Lymphozyten des kontrollierten Zelltodes. Außerdem dient die Apoptose der Selektion von T-Lymphozyten-Vorläuferzellen, so dass diese keine Antikörper gegen körpereigene Strukturen bilden (Hug, 2000).

Zwei Kategorien, auf welche Weise eine Zelle zu Grunde gehen kann, werden grundsätzlich voneinander unterschieden: Apoptose und Nekrose. Bei der Apoptose handelt es sich im Gegensatz zur Nekrose um einen aktiven metabolischen Prozess. Die Tatsache, dass die Apoptose einen genetisch determinierten Verlauf nimmt, lässt die Vermutung zu, dass sie wie alle übrigen Stoffwechsel- oder Entwicklungswege auch durch Mutationen gestört werden kann. Defekte in den apoptotischen Signalwegen werden mit einer Reihe von menschlichen Erkrankungen in Verbindung

gebracht, etwa neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs (Lowe und Lin, 2000). In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass die Hemmung der Apoptose einen wesentlichen Vorgang im Rahmen der Karzinogenese darstellt. In Tumorstadien und Tumoren steht einer erhöhten Zellproliferation häufig eine zu niedrige Apoptoserate gegenüber. Dies führt zu einer selektiven Vermehrung der (prä-)malignen Zellen (Jackel, 1998; Hanahan und Weinberg, 2000; Hattis et al., 2009).

Eine grundlegende Unterscheidung zwischen diesen beiden Prozessen des Zelltodes erfolgt über morphologische Merkmale der sterbenden Zelle (Abbildung 2) (Dragan et al., 2001; Elmore, 2007). Die Nekrose ist gekennzeichnet durch einen Verlust der Membranintegrität. Hierbei kommt es zunächst zu einem Ausfall von Ionenpumpen, so dass Kalzium und Natrium in die Zelle einströmen und die Zelle in Folge der Osmose zum Platzen bringen. Der Zellinhalt läuft in die Umgebung aus und lockt Zellen des Immunsystems an, was eine Entzündungsreaktion bewirkt (Hug, 2000).

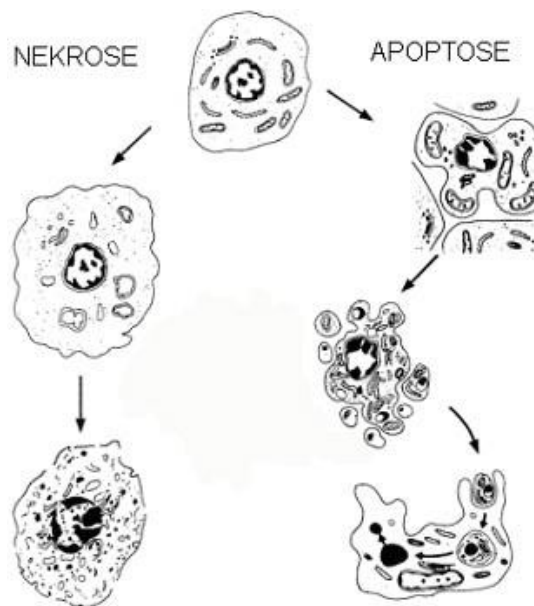


Abbildung 2: Wege des Zelltodes (nach edoc.hu-berlin.de).

Ein frühes charakteristisches Merkmal der Apoptose ist ein Wasserverlust der Zelle, und eine damit einhergehende Kondensation des Zytoplasmas. Daneben kommt es zur Kondensation des Chromatins, zunächst in der Peripherie des Kerns. Das kondensierte Chromatin besitzt eine einheitliche Struktur und zeigt keine Textur, wie das Eu- und Heterochromatin intakter Zellen. Im nächsten Schritt löst sich die Kernhülle auf und es kommt zu einer Fragmentierung des Chromatins, das sich tropfenförmig im Zytoplasma verteilt. Die Zytoplasmamembran bildet Ausstülpungen,

die einen Teil des Zellinhalts vom Rest der Zelle abschnüren. Diese apoptotischen Körperchen werden ohne Entzündungsreaktion von Makrophagen aufgenommen. Erkannt werden apoptotische Zellen von Makrophagen z.B. daran, dass Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Darzynkiewicz et al., 1997; Elmore, 2007).

Ein sehr wichtiger Aspekt bei beiden Formen des Zelltodes ist die Antwort des Gewebes, in dem der Prozess stattfindet. Es kann passieren, dass die sterbenden Zellen nicht durch neue ersetzt werden. Dies führt zu einer Atrophie des betroffenen Gewebes. Die andere Möglichkeit ist eine Regeneration der Zellen. Zelltod führt meistens zu einer Regeneration der betroffenen Gewebe, was im Extremfall mit der Entwicklung von Hyperplasien verbunden ist (Dragan et al., 2001).

1.2.1 Caspasen-vermittelte Signaltransduktion während der Apoptose

An den meisten Apoptosewegen (Abbildung 3) sind bestimmte Cystein-Proteinasen, welche spezifisch nach Aspartat-Resten spalten, so genannte Caspasen beteiligt. Zwei Caspase-abhängige Hauptwege in der Apoptose werden unterschieden: der intrinsische (Mitochondrien-vermittelte) und der extrinsische (Rezeptor-vermittelte) Signalweg. Beide Wege führen zu einer Aktivierung jeweils spezifischer Initiator-Caspasen und konvergieren auf der Ebene der Effektor-Caspasen. Diese beiden Signalwege stehen sich nicht alleine gegenüber, sie besitzen gemeinsame Schnittpunkte (Budihardjo et al., 1999; van Loo et al., 2002).

1.2.1.1 Der intrinsische Signalweg

Die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran wird maßgeblich durch die pro- und anti-apoptischen Vertreter der Bcl-2 Proteinfamilie reguliert. Diese Proteine bilden Dimere und heben sich so in ihrer jeweiligen Wirkung auf. Verschiedene Apoptosestimuli führen zu einer Verlagerung des Gleichgewichtes der Bcl-2 Proteine auf die Seite der pro-apoptischen Vertreter hin. Diese Proteine regulieren vermutlich die Aktivität von Membrankanälen der äußeren Mitochondrienmembran, durch die pro-apoptische Faktoren, wie etwa Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt werden können (Reed, 1998).

Im nächsten Schritt bildet sich im Zytosol ein Komplex aus Cytochrom c, Adenosintriphosphat (ATP), Procaspase 9 und dem *apoptosis protease activating factor-1* (Apaf-1). Dieser Proteinkomplex wird als Apoptosom bezeichnet. Im Apoptosom wird die Caspase 9 proteolytisch aktiviert, welche im nächsten Schritt die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktiviert (Höffeler, 2004).

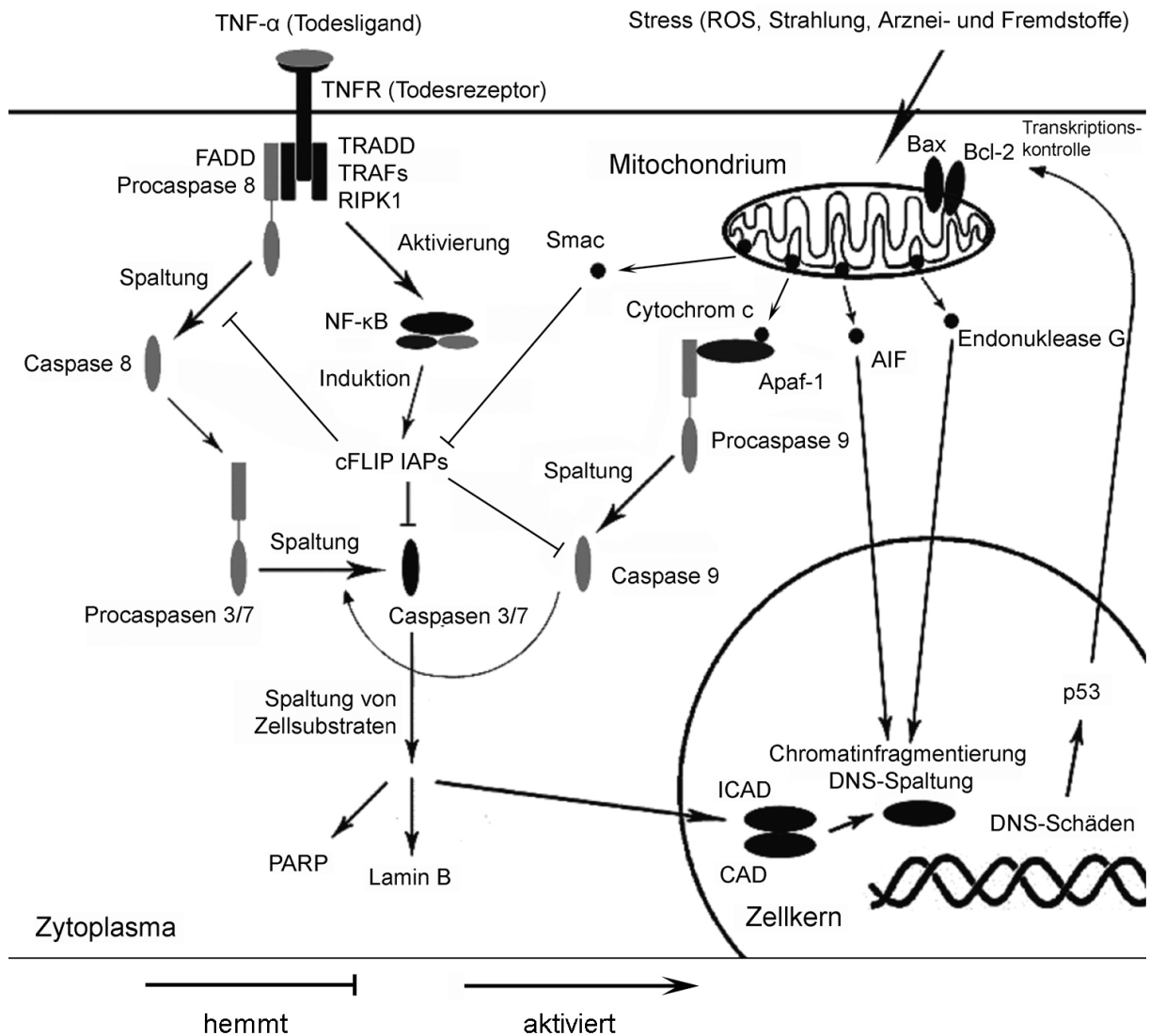


Abbildung 3: Signalwege der Apoptose. Der extrinsische Weg verläuft über eine Aktivierung von Todesrezeptoren. Der intrinsische Weg geht von einer Störung der mitochondrialen Membranintegrität aus. Beide Wege konvergieren in der Caspasen-Kaskade.

1.2.1.2 Der extrinsische Signalweg

Im extrinsischen Apoptosesignalweg, dem *tumor necrosis factor* (TNF)/Fas Signaltransduktionsweg aktivieren Todesfaktoren ihre entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren. Der Fas-Ligand bindet an den Fas-Rezeptor (FAS,

CD 95) und aktiviert über das Vermittlerprotein *fas-associated death domain* (FADD) die Caspase 8, welche die Signalkaskade zu den Effektor-Caspasen in Gang setzt. Die Aktivierung einer anderen Gruppe von Todesrezeptoren führt zur Aktivierung eines weiteren Signalweges: die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, CD 120a) führt auf der einen Seite über FADD zur Aktivierung der Caspase 8. Auf der anderen Seite können durch Aktivierung des TNFR1 über das Vermittlerprotein *TNFR-associated death domain* (TRADD) sowie *TNFR-associated factors* (TRAFs) die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und AP-1 aktiviert werden. Diese Signalwege besitzen anti-apoptotische Wirkungen. So induziert die Aktivierung von NF- κ B die Expression anti-apoptotischer Proteine wie das *FLICE-like inhibitory protein* (c-Flip, Cflar), welches die Aktivierung der Caspase 8 inhibiert, oder der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), welche aktivierte Caspasen 9 und 3 hemmen (Hug, 2000; Andera, 2009).

Die aktivierten Effektor-Caspasen katalysieren die proteolytische Spaltung von Zellsubstraten (z.B. Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), Lamin B, Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD)) und führen damit zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose (Höffeler, 2004). Eine Caspase-abhängige Spaltung von cap-abhängigen Translationsproteinen führt zu einem Translationsstop. Bestimmte, für die Apoptoseregulation wichtige Proteine, wie Apaf-1, p53, sowie die IAPs können weiterhin synthetisiert werden, da ihre Translation cap-unabhängig verläuft (Clemens et al., 2000; Baird et al., 2006).

Eine wichtige Komponente der Caspase-abhängigen Apoptose ist der an der apoptotischen Chromatin-Spaltung beteiligte *DNA fragmentation factor* (DFF). Dieser besteht aus zwei Proteinen, der Caspase-aktivierten DNase (CAD, DFF-40) und dem Inhibitor dieser DNase (ICAD, DFF-45). ICAD dient sowohl als Inhibitor als auch als Chaperon von CAD. Der Komplex aus beiden Proteinen liegt im Zellkern vor. Im Zuge der Apoptose wird ICAD durch die ausführenden Caspasen 3 und 7 proteolytisch in mehrere Fragmente gespalten, dadurch wird CAD freigegeben und spaltet das Chromatin, zunächst in Abständen von 50-300 kbp, dann internukleosomal. Es entstehen letztendlich Fragmente von 200 bp Länge und entsprechenden Vielfachen (Widlak, 2000).

Neben Cytochrom c und dem *second mitochondrial activator of caspases* (Smac), welche beide an der Regulation der Caspasen-Aktivitäten beteiligt sind, gibt es zwei

weitere pro-apoptotische Moleküle, die durch den Porenkomplex der äußeren Mitochondrienmembran in das Zytoplasma gelangen. Diese sind die Endonuklease G und der *apoptosis inducing factor* (AIF). Beide Proteine sind an der Kondensation und Fragmentierung des Chromatins beteiligt (Höffeler, 2004; Samejima und Earnshaw, 2005).

In Zellen, die sich zwischen Leben und Tod bewegen, kann es sein, dass die Hemmung eines einzelnen apoptotischen Subprogramms ausreichend ist, um das Überleben der Zelle zu sichern (Hengartner, 2001).

Es wird diskutiert, ob Zellen, in denen das apoptotische Programm initiiert worden ist, sich wieder erholen können. Verschiedene Anhaltspunkte geben Hinweise dafür, dass selbst nach einer anfänglichen Aktivierung der ausführenden Caspasen diese wieder durch die IAPs gehemmt werden können, so dass die Zelle wieder ihren ursprünglichen Phänotyp annehmen kann. Ferner scheinen sich Zellen selbst nach der apoptotischen DNS-Fragmentierung wieder erholen zu können, was in manchen Fällen zu Translokationen führen kann. So werden Formen von Chemotherapiebedingten Leukämien mit Caspase-abhängigen Translokationsereignissen in Verbindung gebracht (Vaughan et al., 2002).

1.2.2 Induktion von Apoptose durch ultraviolette (UV)-Strahlung

UV-Licht macht etwa 45% der von der Sonne ausgestrahlten Strahlung aus. Es wird je nach Wellenlänge in drei Arten unterteilt: UVA (320-400 nm), UVB (295-320 nm) und UVC (100-295 nm). Durch die Ozonschicht der Atmosphäre werden UVC komplett und UVB zum großen Teil absorbiert und erreichen nicht die Erdoberfläche. Die Tatsache, dass das Absorptionsmaximum der DNS mit 260 nm im Bereich der UVC-Strahlung liegt, macht diese Strahlung zu einem viel genutzten Instrument bei der Untersuchung von zellulären Antworten auf DNS-Schäden (Batista et al., 2009).

UV-Strahlung induziert in verschiedenen Zelltypen Dosis-abhängig Apoptose über verschiedene Signalwege. UV-Bestrahlung verursacht die Bildung spezifischer DNA-Schäden, nämlich Cyclobutan-Pyrimidin Dimere und (6-4)-Photoprodukte. Daneben werden oxidative Schäden, DNS Einzelstrangbrüche und intra-Strang *cross links* erzeugt. Durch diese Schäden wird der Tumorsuppressor p53 aktiviert, der einen Zellzyklusarrest induziert. Die DNS-Schäden werden über die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) beseitigt. Gelingt dies nicht, so treibt p53 die Zelle in die

Apoptose, zum Beispiel über die Induktion des pro-apoptotischen Bax. Dies führt zur Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges. Neben dem p53-abhängigen Signalweg sind zu einem geringeren Anteil auch die beiden klassischen Apoptosewege, der extrinsische und der intrinsische Weg direkt an der UV-Licht-induzierten Apoptose beteiligt: UV-Strahlung bewirkt eine direkte Aktivierung von Todesrezeptoren (FAS, TNFR). Der intrinsische Weg wird über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aktiviert. Diese reagieren mit Lipiden und schädigen intrazelluläre Membranen, einschließlich der äußeren Mitochondrienmembran. Dadurch wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt und die Caspase-Kaskade über die Caspase 9 in Gang gesetzt (Kulms und Schwarz, 2002; Roos und Kaina, 2006; Batista et al., 2009).

Darüber hinaus wird eine weitere Möglichkeit zur Auslösung von Apoptose durch UV-Strahlung diskutiert: die Bildung vieler verschiedener DNS-Schäden bewirkt einen Transkriptionsstopp und führt somit zur verringerten Expression von anti-apoptotischen Proteinen (Roos und Kaina, 2006).

Normale CHO-Zellen und NER-defiziente CHO-Zellen untergehen beide UVC-abhängige Apoptose, wobei NER-defiziente Zellen sensibler auf die Bestrahlung reagieren. Im Gegensatz zu den Wildtyp Zellen benötigen die NER-defizienten Zellen die Zellzyklusprogression um apoptotisch zu werden. In diesen Zellen werden die induzierten DNS-Schäden nicht repariert, sondern resultieren in Doppelstrangbrüchen und Chromosomenaberrationen. Auch wurde in dieser Studie gezeigt, dass weder ein funktioneller FAS-Rezeptor noch p53 essentiell für UVC-induzierte Apoptose sind (Dunkern und Kaina, 2002).

An der humanen Lymphom-Zelllinie Jurkat, welche ein funktionsunfähiges p53-Gen trägt, wurde gezeigt, dass nach UVC-Bestrahlung sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg aktiviert werden. Durch die Hemmung der Caspase-Aktivitäten mit Hilfe spezifischer und pan-Caspase-Inhibitoren zeigten die Autoren der Studie, dass womöglich auch noch andere Caspase-unabhängige Mechanismen bei der UVC-induzierten Apoptose in diesen Zellen eine Rolle zu spielen scheinen. Trotz vollständiger Caspase-Hemmung wiesen noch immer ein statistisch signifikant erhöhter Prozentsatz der Zellen Zeichen für Apoptose auf (Scoltock und Cidlowski, 2004).

1.2.3 Induktion von Apoptose durch OTA

Ochratoxin A (OTA) (Abbildung 4) wurde 1965 als ein Stoffwechselprodukt von *Aspergillus ochraceus* isoliert und kurz darauf als ein potentes Nephrotoxin identifiziert. Dieses Mykotoxin wird in Gebieten mit warmem und tropischem Klima von verschiedenen Arten der Gattung *Aspergillus*, und in den gemäßigten Breiten von *Penicillium verrucosum* und *P. nordicum* gebildet (Bennett und Klich, 2003; DGE, 2004; Ringot et al., 2006).

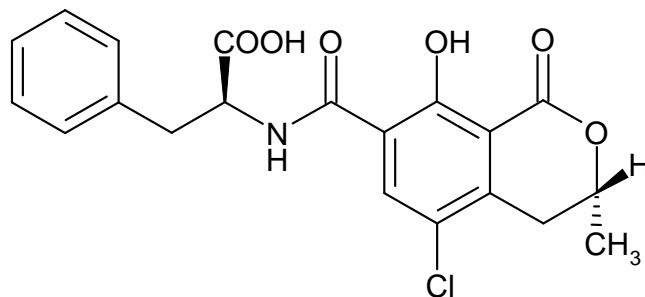


Abbildung 4: Strukturformel von Ochratoxin A

Der Großteil des über die Nahrung aufgenommenen OTA wird intakt oder hydrolysiert mit den Fäzes und dem Urin ausgeschieden, wobei die renale Ausscheidung die mengenmäßig größere Rolle spielt (Gekle et al., 2005; Turesky, 2005).

Das primäre Zielorgan in allen untersuchten Spezies ist die Niere. Durch die Toxikokinetik des Mykotoxins lässt sich, zumindest zum Teil, erklären weshalb die Niere am stärksten geschädigt wird: die Nieren bekommen über den hohen renalen Blutfluss ständig OTA angeliefert. Dieses wird in den proximalen Tubulus sezerniert. Durch die Aufkonzentrierung des Harns steigt die OTA-Konzentration im Lumen des proximalen Tubulus stark an bevor das Toxin im weiteren Verlauf des Nephrons wieder aktiv reabsorbiert wird. Auf diese Weise reichert sich OTA im Gewebe der Niere an (Gekle et al., 2005). Neben seiner Nephrotoxizität wirkt OTA hepatotoxisch, neurotoxisch, immunsuppressiv und teratogen. OTA induziert die Bildung von Tumoren, sowohl in der Niere als auch der Leber (Bennett und Klich, 2003; *United States National Toxicology Program (NTP)*, 2005c; Gagliano et al., 2006). OTA ist wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen und wurde von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* in die Klasse der 2B Karzinogene eingestuft ("*Ochratoxin A is possibly carcinogenic to humans*") (IARC, 1993).

Von der *World Health Organization* (WHO) wurde ein provisorischer Wert für die tolerierbare wöchentliche Aufnahme (*provisional tolerable weekly intake* (pTWI)) von 100 ng OTA/kg bw/Woche festgelegt (EFSA, 2006). Für OTA wurden erstmals 2002 Höchstmengen in Deutschland erlassen. Diese betragen je nach Lebensmittel zwischen 2 und 10 µg OTA/kg (BGBl I, 1999). In Europa wird die mittlere Plasmakonzentration an OTA beim Menschen mit etwa 0,875 nM angegeben (0,53-2,75 nM). Die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge liegt mit etwa 1 ng OTA/kg bw/Tag (0,168-1,71 ng/kg bw/Tag) unterhalb des pTWI von 100 ng/kg bw/Woche (Gekle et al., 2005).

Da OTA eine Phenylalanin-Gruppe enthält, stellt es ein Strukturanalogon zu dieser Aminosäure dar und kann daher potentiell alle Stoffwechselsysteme, die diese Aminosäure betreffen, stören. OTA hemmt kompetitiv die Phenylalanin-transferRibonukleinsäure-Synthase, wodurch die Aminoacylierungs-Reaktion und die Peptidelongation verhindert werden. Ein weiteres Enzym, das durch OTA gehemmt wird, ist die Phenylalanin-Hydroxylase. Dieses Enzym hydroxyliert Phenylalanin irreversibel zu Tyrosin. Gleichzeitig stellt OTA auch ein Substrat für dieses Enzym dar, was daran gezeigt worden ist, dass Tyrosin-OTA in vergifteten Labortieren nachgewiesen werden konnte. Die Störung des Phenylalanin-Stoffwechsels und der Proteinbiosynthese scheint einen Großteil der toxischen Wirkungen von OTA auszumachen, jedoch kann sie nicht alleine die Vielfalt der durch das Mykotoxin bewirkten Effekte erklären (Ringot et al., 2006).

Die Behandlung von immortalisierten humanen Nierenepithelzellen mit OTA ab einer Konzentration von 10 µM führte zu Zeit- und Dosis-abhängiger Zunahme an Zellen mit kondensiertem Chromatin und fragmentierter DNS (charakteristischen morphologischen Merkmalen für Apoptose) (Rached et al., 2006).

In menschlichen T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass OTA ab einer Konzentration von 0,5 µM Apoptose induzierte, was sowohl durch eine Fragmentierung der DNS als auch durch eine Aktivierung der Caspasen 3 und 9 nachgewiesen wurde. Außerdem wurde gezeigt, dass das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran durch OTA gestört worden war. Assaf et al. nahmen daher an, dass OTA in diesen Zellen Apoptose induziert, indem es die Mitochondrien als primäres Ziel beeinflusst (Assaf et al., 2004).

In der Niere männlicher Wistar Ratten konnte nach Gabe von jeweils 120 µg OTA/kg bw/Tag für 10 bis 60 Tage eine Zunahme der Anzahl apoptotischer

Zellen beobachtet werden. Apoptose wurde hier durch morphologische Färbung sowie mittels *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL) gezeigt. Durch Gelelektrophorese konnte in dieser Studie keine DNS-Fragmentierung nachgewiesen werden (Petraik et al., 2003).

An perfundierten Lebern von männlichen Wistar Ratten wurde gezeigt, dass OTA schon in einer Konzentration von 0,5 µM zur Freisetzung von TNF-α führte, was eventuell für eine Beteiligung des TNF/Fas-Signaltransduktionsweges sprechen könnte (AL-Anati et al., 2005).

In einer Studie an primären Rattenhepatozyten (Sprague-Dawley Ratten) konnte gezeigt werden, dass OTA in diesen Zellen zu einer Aktivierung von NF-κB führte (Cavin et al., 2009).

1.2.4 Induktion von Apoptose durch Cycloheximid

Cycloheximid (CHX) (Abbildung 5), ein von *Streptomyces griseus* produziertes Glutarimid-Antibiotikum, ist ein bekannter Inhibitor der Proteinbiosynthese in Säugerzellen. Es greift an den 80S-Ribosomen an und hemmt dort sowohl die Initiation als auch die Elongation der Proteinsynthese (Obrig et al., 1971).

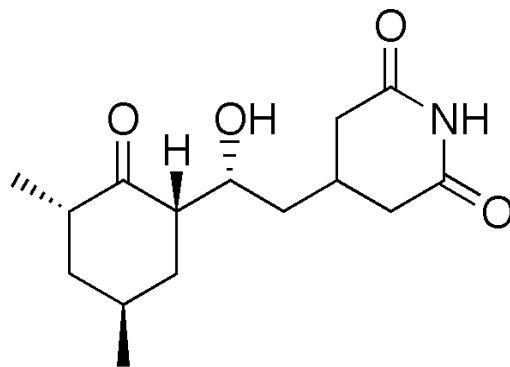


Abbildung 5: Strukturformel von Cycloheximid

In verschiedenen Zellsystemen kann CHX entweder pro- oder anti-apoptotisch wirken. In Leberzellen von Nagern wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass CHX pro-apoptotisch wirkt. In der Leber von Wistar-Ratten lässt sich durch die Gabe von CHX in einer Dosis von 3 mg/kg bw nach wenigen Stunden verstärkt Apoptose nachweisen, was mittels DNS-Fragmentierung gezeigt worden war. Dies ging mit einer Hemmung der Proteinbiosynthese in der Leber der Tiere und einem Anstieg der Genexpression von c-myc, c-jun, c-fos und p53 einher. Die Autoren der Studie folgerten darüber hinaus, dass CHX in der Leber die Neusynthese kurzlebiger

anti-apoptotischer Proteine inhibierte, was zur spontanen Induktion von Apoptose führte (Alessenko et al., 1997).

In primären Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten konnten Blom et al. zeigen, dass CHX in Konzentrationen von 1-300 μM innerhalb von drei bis vier Stunden Apoptose auslöste. Dies wurde mit Hilfe apoptosespezifischer Ereignisse wie Phosphatidylserin-Externalisierung sowie Chromatinkondensation und -fragmentierung gezeigt. Die CHX-induzierte Apoptose wurde begleitet von einer Depolarisation der Mitochondrienmembran und einer Erhöhung der Caspase 3-Aktivität. Inkubation der Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk führte zu einer vollständigen Hemmung der Apoptose (Blom et al., 1999).

Daneben kann CHX auch die Apoptose hemmen. Bai und Cederbaum zeigten, dass die Behandlung von HepG2-Zellen mit 10 μM CHX der durch Serumentzug induzierten Apoptose entgegenwirkte. Sie führten dies darauf zurück, dass das p53-Level in diesen Zellen auf Grund der Hemmung der Proteinbiosynthese durch CHX stark verringert war (Bai und Cederbaum, 2006). Auch in anderen Zellsystemen vermag CHX der Apoptose entgegenzuwirken, auch in solchen Konzentrationen, in denen es die Proteinbiosynthese noch nicht hemmt. Aus diesem Grund wird diskutiert, ob CHX eventuell aktiv anti-apoptotische Signalwege aktiviert (Mattson und Furukawa, 1997).

1.3 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

Die polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), Azo(xy)benzene, Naphthalene, Biphenyle sowie die polybromierten Biphenyle werden zusammengenommen als halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe bezeichnet. Auf Grund ihrer hohen Lipophilie reichern sich diese Verbindungen in der Nahrungskette an und werden insbesondere im Fettgewebe und der Leber akkumuliert. Einige dieser Verbindungen wurden industriell hergestellt, während andere nur als Verunreinigungen in industriellen Produkten vorkommen oder bei der Verbrennung organischer Substanzen in Anwesenheit organischer und anorganischer Chlorverbindungen entstehen. Diese Verbindungen teilen ein ähnliches, charakteristisches Muster an toxischen Wirkungen, wenn auch in sehr unterschiedlichen Intensitäten (Poland und Knutson, 1982). Zur Risikobewertung der verschiedenen halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe wurde das System

der *toxic equivalency factors* (TEFs) entwickelt, mit denen die *toxic equivalents* (TEQs) der aufgenommenen Substanzen berechnet werden können. Der TEQ ist ein Maß für die Wirksamkeit von Substanzgemischen im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) mit Chlorsubstituenten an den lateralen 2,3,7,8-Positionen (Abbildung 6) ist die bekannteste und gleichzeitig die potenteste Verbindung dieser Substanzklasse und bekommt einen TEF von 1,0 zugewiesen. Alle anderen Verbindungen erhalten abhängig von ihrem toxischen Potential einen niedrigeren Wert. Folgende Voraussetzungen müssen vorliegen, damit Substanzen in das TEF-Konzept aufgenommen werden: a) strukturelle Ähnlichkeit zu den PCDDs; b) Bindung an den Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) (siehe Kapitel 1.4); c) AhR-vermittelte biochemische und toxische Wirkungen, ähnlich denen des TCDD; d) Persistenz und Anreicherung in der Nahrungskette (van den Berg et al., 2000).

TCDD wurde nie großtechnisch hergestellt, es kommt nur als eine Verunreinigung in technisch hergestellten Produkten vor, z.B. in Chlorphenolen, die als Insektizide, Fungizide oder als Desinfektionsmittel eingesetzt wurden. Des Weiteren wird es im Zuge von Verbrennungsprozessen, etwa bei Waldbränden oder der Müllverbrennung gebildet (Poland und Knutson, 1982; NTP, 2005b).

Es reichert sich vor allem in der Leber und im Fettgewebe an. Der mittlere Gehalt an TCDD beim Menschen beträgt etwa 2-3 ng/kg Fettgewebe (20-30 ng gesamt TEQ/kg Fettgewebe) (IARC, 1997). Die durchschnittliche tägliche Aufnahme nimmt seit den 1980er Jahren stetig ab und beträgt heute weniger als 1 pg/kg bw. Der *tolerable daily intake* (TDI) wurde 1998 von der WHO auf 1-4 pg TEQ/kg bw/Tag festgesetzt (WHO, 1998).

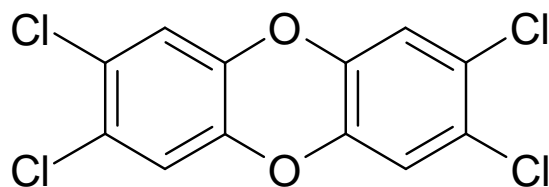


Abbildung 6: Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

TCDD führt im Körper zu verschiedensten toxikologischen Effekten. Exposition gegenüber TCDD wurde beim Menschen mit Chlorakne, Störungen des Immunsystems und des Glucosemetabolismus in Verbindung gebracht. In toxikologischen Untersuchungen an Versuchstieren ist gezeigt worden, dass TCDD

verschiedene Phase I- und Phase II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus induziert und die Genexpression zahlreicher anderer Proteine moduliert. TCDD wirkt hepatotoxisch, immunotoxisch, teratogen und stört hormonelle Regelkreise. Es erhöht die Inzidenz für Lebertumore sowie für zahlreiche andere Tumorarten, ist aber selbst nicht genotoxisch, obwohl es zu den stärksten Karzinogenen zählt, die an Versuchstieren getestet wurden (IARC, 1997).

Es wird angenommen, dass die meisten, wenn nicht sogar alle der toxischen Wirkungen dieses chlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffs über den AhR vermittelt werden (Safe, 2001; Matsumura, 2009).

1.3.1 Kanzerogenität von TCDD

Eine Vielzahl von Tierstudien zeigte, dass TCDD eine kanzerogene Wirkung besitzt. Daher besteht die Vermutung, dass die Exposition gegenüber dioxinartigen Verbindungen auch für den Menschen einen Beitrag für das Krebsrisiko ausmachen könnte.

1.3.1.1 Genotoxizität

Trotz anfänglich widersprüchlicher Ergebnisse bezüglich der Mutagenität und Genotoxizität von TCDD in verschiedenen *in vitro* Testsystemen herrscht heute überwiegend die Meinung, dass diese Substanz nicht direkt genotoxisch wirkt (IARC, 1997). Auch in einem modernen Mutationstestsystem, der BigBlue transgenen Ratte konnte dies bestätigt werden. So führte die Behandlung mit 2 µg TCDD/kg bw zweimal pro Woche über sechs Wochen weder zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz noch zu einer Änderung des Mutationsspektrums (Thornton et al., 2001).

1.3.1.2 Langzeit-Kanzerogenitätsstudien

Es wurden eine Vielzahl von Langzeit-Kanzerogenitätsstudien mit TCDD an Versuchstieren unternommen. Wird Nagern TCDD alleine verabreicht, verursacht es in zahlreichen Organen und Geweben Tumore (Knerr und Schrenk, 2006).

In männlichen Sprague Dawley Ratten bewirkte TCDD ab einer Dosis von 15 ng TCDD/kg bw/Woche über 78 Wochen eine Erhöhung der Tumorraten in der Lunge und der Leber der Tiere (van Miller et al., 1977). Auch Kociba et al. führten ihre Kanzerogenitätsstudie an Sprague Dawley Ratten durch. Eine Dosis von 10 ng TCDD/kg bw/Tag führte zu einer erhöhten Inzidenz von hepatozellulären Karzinomen (nur in weiblichen, nicht aber in männlichen Ratten) und von squamösen Karzinomen der Lunge, des Gaumens, der Nasenmuschel sowie der Zunge. Bei Tumoren der Hypophyse, des Uterus, der Brustdrüsen, der Nebennieren und der Bauchspeicheldrüse war die Inzidenz in dieser Studie im Vergleich zu Kontrolltieren erniedrigt (Kociba et al., 1978). Auch zwei Studien des NTP über jeweils 104 Wochen zeigten, dass verschiedene Organe und Gewebe von einer kanzerogenen Wirkung von TCDD betroffen sind. Bei Osborne Mendel Ratten beider Geschlechter kam es zu einer erhöhten Inzidenz für Tumore der Leber und der Schilddrüse (NTP, 1982). In der zweiten Studie an weiblichen Sprague Dawley Ratten wurden Tumore in Leber, Lunge, Mundschleimhaut und Uterus beobachtet (NTP, 2005a).

Auch für Mäuse und Hamster wirkt TCDD als ein Kanzerogen in verschiedenen Geweben, wobei Hamster generell unempfindlicher auf TCDD reagieren, als Ratten und Mäuse (Knerr und Schrenk, 2006).

1.3.1.3 Initiations-Promotionsstudien

In Tumorpromotionsstudien, also Studien, in denen den Versuchstieren zunächst bekannte Kanzerogene verabreicht bekamen, bevor sie TCDD ausgesetzt wurden, zeigten die Tiere eine erhöhte Inzidenz von Tumoren sowie eine kürzere Zeitspanne bis zur Tumorentstehung (Knerr und Schrenk, 2006).

Pitot et al. untersuchten die tumorpromovierende Wirkung von TCDD an weiblichen Charles River Ratten nach partieller Hepatektomie. Die Tiere wurden einen Tag nach der Operation mit einer Einzeldosis von 10 mg Diethylnitrosamin (DEN)/kg bw initiiert und erhielten für 7 Monate alle zwei Wochen Dosen von 0,14 oder 1,4 µg TCDD/kg bw s.c. Im Gegensatz zu den Tieren, die nur DEN erhalten hatten, entwickelten die Tiere der Hochdosis-Gruppe hepatozelluläre Karzinome und beide TCDD-Gruppen wiesen eine erhöhte Anzahl enzymveränderter hepatischer Foci auf (Pitot et al., 1980). Ovarienhormone scheinen eine Rolle bei der Tumorpromotion durch TCDD zu spielen. Dies zeigten 1991 Lucier et al. an weiblichen Sprague Dawley Ratten.

Sowohl intakte als auch ovariectomisierte Ratten wurden mit DEN initiiert und erhielten 100 ng TCDD/kg bw einmal pro Woche für 30 Wochen. Die intakten Tiere wiesen am Ende der Studie eine zu den ovariectomisierten Tieren statistisch signifikant erhöhte Anzahl hepatischer Foci auf. Beide Gruppen zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl an Foci im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren (Lucier et al., 1991). Auch an weiblichen Wistar Ratten konnte eine Zeit-abhängige Tumorpromotion durch TCDD anhand einer erhöhten Anzahl Glutathion-S-Transferase-positiver Foci gezeigt werden (Buchmann et al., 1994). Von Schrenk et al. wurden 1994 ebenfalls weibliche Wistar Ratten untersucht. Diese erhielten als initiiertes Agens N-Nitrosomorpholin 25 Tage lang über das Trinkwasser (80 mg/l). Danach wurden sie subkutan mit jeweils 2, 20 und 200 ng TCDD/kg bw/Tag für 13 Wochen behandelt. Es zeigte sich eine Dosis-abhängige Zunahme an hepatischen Foci (Schrenk et al., 1994).

Beebe et al. untersuchten 1995, ob ein funktioneller AhR für die tumorpromovierende Wirkung von TCDD nötig sei. Männliche Mäuse der Stämme C57BL/6 (Ah-responsiv) und DBA/2 (nicht Ah-responsiv) wurden mit DEN initiiert und erhielten im Anschluss wöchentlich 0,05 µg TCDD/kg bw i.p. für 20 Wochen. Ebenso wurde auch eine Kreuzung der beiden Stämme (C57BL/6 x DBA/2 (B6D2F1)) untersucht. Die Kreuzung ist Ah-responsiv, trägt aber weitere Merkmale des nicht Ah-responsiven DBA/2-Stamms. Nur der Kreuzungsstamm zeigte eine tumorpromovierende Wirkung durch TCDD, was auf der einen Seite für eine Beteiligung des AhR spricht, auf der anderen Seite müssen jedoch weitere genetische Faktoren beteiligt sein (Beebe et al., 1995). Auch auf der Haut haarloser HRS/J *hr/hr* Mäuse wirkte TCDD tumorpromovierend. Weibliche Mäuse dieses Stamms wurden dermal mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) initiiert, woraufhin sie über 20 Wochen hinweg wöchentlich TCDD in Dosen von 2,5, 5 und 10 ng auf die Haut appliziert bekamen. In allen drei Dosisgruppen entwickelten die Tiere vermehrt proliferative Läsionen der Haut (Hebert et al., 1990).

1.3.1.4 Kanzerogenität beim Menschen

Mehrere Kohorten, die auf Grund industrieller Unfälle in den USA, in Deutschland, in Holland und in Italien (Seveso) gegenüber hohen Mengen an TCDD exponiert waren, sind von der IARC zusammenfassend untersucht worden. Es gab zahlreiche Anhaltspunkte für ein erhöhtes Risiko bei speziellen Tumoren, so etwa Lungenkrebs,

Weichteilkrebs und Non-Hodgkins Lymphomen in diesen Kohorten. Die Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen waren jedoch gering und häufig nicht statistisch signifikant. Der größte Unterschied ergab sich bei der Betrachtung des kombinierten Risikos für alle Tumorarten. Dieses lag bei 1,4 und war statistisch signifikant. Die normale Bevölkerung ist weit geringeren Dosen an TCDD ausgesetzt als die untersuchten Gruppen. Im Jahr 1997 wurde TCDD von der IARC als Gruppe 1 Kanzerogen und damit als „krebserzeugend für den Menschen“ eingestuft, obwohl die molekularen Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD bislang nicht vollständig geklärt werden konnten (IARC, 1997; Knerr und Schrenk, 2006).

Neuere Daten zum Seveso-Unfall zeigen ein erhöhtes Risiko für lymphatische und hematopoetische Neoplasien sowie für Brustkrebs, während keine Erhöhung des Gesamtkrebsrisikos beobachtet werden konnte (Pesatori et al., 2009).

1.3.2 TCDD und Apoptose in Leberzellen der Ratte

TCDD zeigte im Tierversuch ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential an weiblichen Ratten (Kociba et al., 1978). Im Initiations-Promotions-Modell in der Rattenleber konnte TCDD eine tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben werden, die durch eine Zunahme von enzymveränderten, präneoplastischen Hepatozyten-Foci und von Hepatomen charakterisiert war. Verglichen mit anderen tumorpromovierenden Substanzen zeigte TCDD in der Nagerleber das stärkste tumorpromovierende Potential (Pitot et al., 1980; Schrenk et al., 1994).

In der normalen Leber führte TCDD nur zu einer geringfügig gesteigerten Proliferation, was auch für Hepatozyten *in vitro* gilt (Schrenk et al., 1992). Stinchcombe et al. konnten im Initiations-Promotions-Experiment ebenfalls nur eine geringfügig angestiegene Mitoserate in Präneoplasien der Rattenleber nachweisen. Die Apoptoserate war dagegen im präneoplastischen Lebergewebe unter dem Einfluss von TCDD deutlich erniedrigt. Das umliegende normale Gewebe zeigte keine Veränderungen. Die Autoren der Studie schlossen daraus, dass die Tumorpromotion durch TCDD nicht durch eine gesteigerte Proliferation, sondern vielmehr durch eine gehemmte Apoptose beding war (Stinchcombe et al., 1995).

In vitro-Experimente in primären Rattenhepatozyten in Kultur zeigten eine Hemmung der durch UVC-Licht oder 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) induzierten Apoptose unter Zugabe von TCDD (Wörner und Schrenk, 1996). In Untersuchungen zur Hemmung

der UV-Licht-induzierten Apoptose durch TCDD in primären Rattenhepatozyten in Kollagengel-Sandwichkultur konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die hemmende Wirkung von TCDD auf die UV-induzierte Apoptose konnte morphologisch und auch biochemisch durch eine Inhibierung der DNS-Fragmentierung und auf Proteinebene durch Verhinderung eines Anstiegs des proapoptotischen Tumorsuppressors p53 gezeigt werden (Wörner und Schrenk, 1998). *In vivo* in der Rattenleber konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Apoptose durch TCDD sowohl mit einer Verringerung des Anstieges an p53 sowie mit einer Hemmung der Phosphorylierung dieses Proteins an der Position ser15 einherging (Päärjärvi et al, 2005).

1.4 Der Arylhydrocarbon Rezeptor

TCDD induziert zahlreiche Gene, hierunter ist insbesondere die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase 1A1 (CYP1A1) detailliert untersucht worden. Da neben TCDD auch weitere PCDD und PCDF stereospezifisch diese Enzymaktivität induzierten, vermuteten Poland und Glover 1976 das Vorhandensein eines Liganden-abhängigen Rezeptors, der nach Bindung von z.B. TCDD schlussendlich zur Expression von CYP1A1 führt. Die Autoren der Studie bestätigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an C57BL/6J Mäusen mittels radioaktiv markiertem TCDD, dass es eine hochspezifische Bindungsstelle für TCDD im hepatischen Zytosol gibt (Poland und Glover, 1976). Später wurde dieser Rezeptor als AhR bezeichnet und charakterisiert. Als Bedingungen für eine Bindung von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen an den AhR müssen diese planar sein und Halogensubstituenten in den lateralen Ringpositionen aufweisen (Poland und Knutson, 1982).

Der AhR ist ein Mitglied der *basic helix-loop-helix* (bHLH)/*Per-arylhydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT)-Sim (PAS)-Familie von Transkriptionsregulatoren und dieses Protein wurde in nahezu allen Zellen und Geweben des Menschen nachgewiesen. In Abwesenheit seiner Liganden liegt der AhR im Zytoplasma an einen Proteinkomplex bestehend aus *heatshock protein 90* (HSP90), p23 und *AhR associated protein-9* (auch *hepatitis B virus X-associated protein 2* oder *Ahr-interacting protein*) assoziiert vor (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007; Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010).

Aufgebaut ist das AhR-Protein aus einer N-terminalen Domäne, welche für die DNA-Bindung (DBD), die Ligandenbindung (LBD) und die Dimerisierung mit ARNT verantwortlich ist, sowie einer C-terminalen Transaktivierungs-Domäne (Abbildung 7). In seiner bHLH-Region trägt der AhR eine Kernlokalisierungs-Sequenz (NLS). Es wird vermutet, dass HSP90 diese NLS maskiert und dadurch bewirkt, dass der Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden im Zytoplasma verbleibt. Die NLS kann Proteinkinase-C-abhängig phosphoryliert werden, was den ligandengesteuerten Import des Rezeptors in den Zellkern verhindert. Des Weiteren trägt der AhR Kern-Export-Sequenzen (NES) in der bHLH- sowie der PAS-Domäne. Eine weitere Region, die vermutlich an der zytoplasmatischen Lokalisierung des Rezeptors beteiligt ist, ist das LxxLL-Motiv in der NR-Box, welche bei Kernrezeptoren für Protein-Protein Wechselwirkungen mit transkriptionellen Kofaktoren verantwortlich ist (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

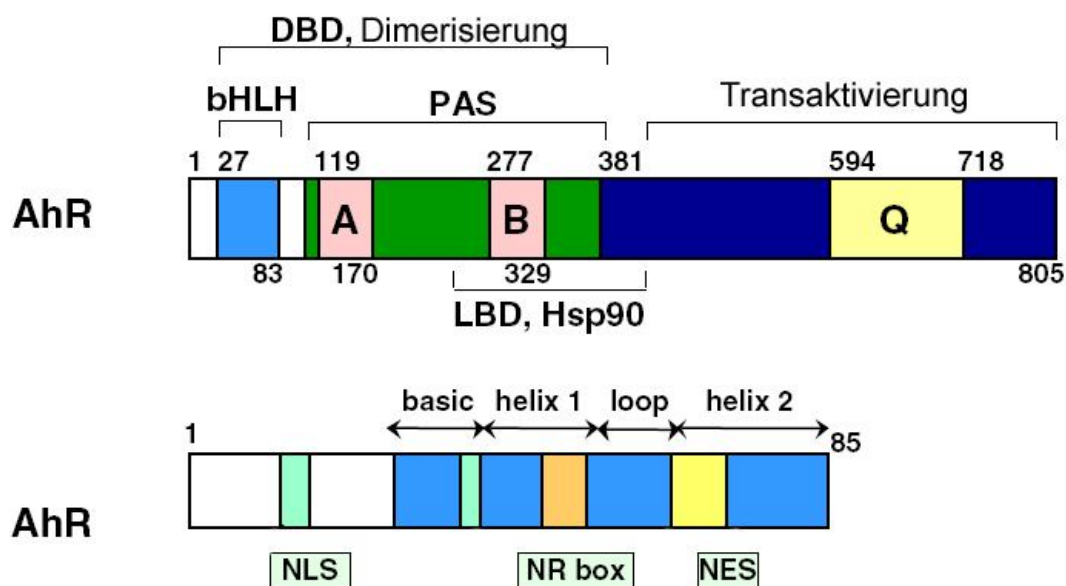


Abbildung 7: Schematische Darstellung des AhR. Oben: funktionelle Domänen des AhR. Unten: N-terminale bHLH-Region mit Kern-Import- und Export-Sequenzen. A, B: schwach homologe repetitive Regionen. Q: Glutamin-reiche Transaktivierungs-Domäne (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

Während der Ligandenbindung dissoziieren die Chaperone vom AhR ab, und daraufhin gelangt der Rezeptor-Ligand-Komplex in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit ARNT, einem weiteren Mitglied der bHLH/PAS-Familie. Der AhR/ARNT-Heterodimer bindet an bestimmte Sequenzen in der DNS. Diese als *dioxin-responsive elements* (DREs) (auch *xenobiotic-responsive elements* (XRE)) bezeichneten Sequenzen enthalten das Motiv 5'-TNGCGTG-3'. Die DREs befinden

sich nicht in der Promotorregion der modulierten Gene, sondern in so genannten Enhancer-Regionen (Safe, 2001; Whitlock et al., 1996). Durch die Bindung des AhR/ARNT-Dimers an die DNS kommt es zunächst zu einer Auflockerung des Chromatins. Zusammen mit *general transcription factors* (GTFs) wirkt der Dimer über Koaktivator-Proteine wie CPB/p300, SCR-1, NCoA-2, p/CIP und dem Koaktivator/Korepressor Protein RIP140 transaktivierend. Um die Transkription des CYP1A1-Gens zu ermöglichen, muss ebenfalls der TRAP/DRIP/ARC-Mediator-Komplex an den Promotor binden (Abbildung 8) (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007, Fujii-Kuriyama und Kawajiri, 2010). Die Bindung des AhR an die DNS scheint aber auch unabhängig von vollständigen DREs zu funktionieren. Und es konnte ferner gezeigt werden, dass der AhR auch innerhalb von codierenden Genabschnitten binden kann (Kinehara et al., 2008).

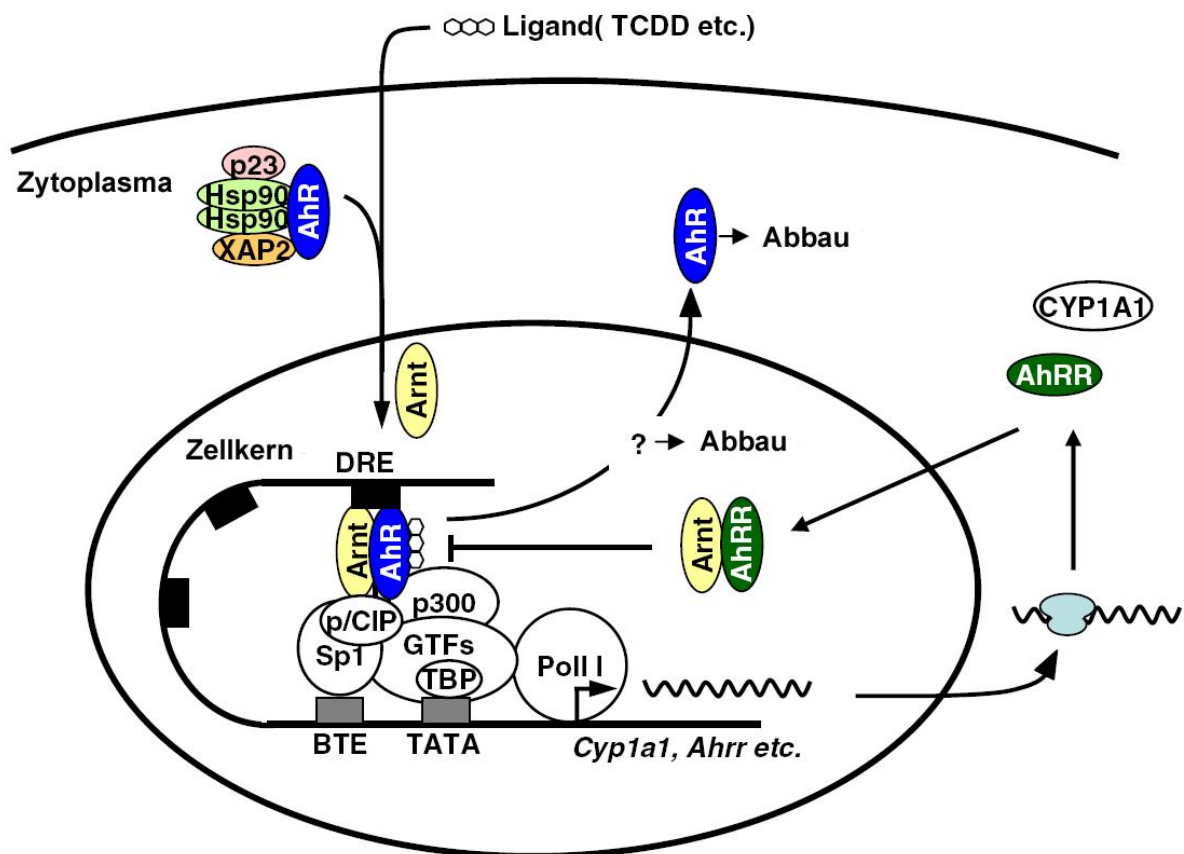


Abbildung 8: Mechanismus der Geninduktion über den AhR. Der aktivierte Rezeptor tritt in den Zellkern ein und dimerisiert dort mit ARNT. Der AhR/ARNT-Komplex bindet an DREs in den Enhancer-Regionen der Zielgene und ermöglicht so die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promoter (nach Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

Der AhR-Repressor (AhRR) fungiert als negativer Regulator der AhR-Aktivität, jedoch liegt er im Gegensatz zum AhR konstitutiv im Zellkern vor. Dort bildet er mit ARNT einen Heterodimer, welcher ebenfalls an DREs bindet, was jedoch nicht zur Transkriptionssteigerung der betreffenden Gene führt. Des Weiteren wird die Expression des AhRR AhR-abhängig reguliert, und stellt somit einen negativen Kontrollmechanismus dar (Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007).

Neben Genen des Fremdstoffmetabolismus induziert TCDD über den AhR eine ganze Reihe weiterer Gene, jedoch ist dies stark Spezies- und Gewebe-abhängig, so dass sich kein einheitliches Bild zeigt, das die toxischen Wirkungen von TCDD und anderen AhR-Liganden durch die Expression bestimmter Zielgene erklären kann (Matsumura et al., 2009). Das speziesspezifische Expressionsmuster liegt vermutlich weniger an unterschiedlichen AhR-Charakteristiken als mehr an der Tatsache, dass DREs in den verschiedenen Säugergenomen wenig konserviert vorliegen (Sun et al., 2004). Trotzdem wird der AhR für die meisten, wenn nicht sogar alle toxischen Wirkungen von TCDD verantwortlich gemacht (Adachi et al., 2004; Oesch-Bartlomowicz et al., 2005; Tritscher et al., 1996).

Der AhR scheint an der Entwicklung der Leber, an der Nephrogenese, der Funktion des Immunsystems, Zellproliferation und -differenzierung, sowie am Retinsäure-Metabolismus beteiligt zu sein (Gonzalez und Fernandez-Salguero, 1998). Daher ist es wahrscheinlich, dass der AhR auch in Abwesenheit eines exogenen Liganden in den Zellkern transloziert werden kann. Dies kann etwa über die Beteiligung von zyklischem Adenosinmonophosphat verlaufen (Oesch-Bartlomowicz et al., 2005). Auch wurden natürliche Liganden des AhR entdeckt, so etwa das Indirubin (Adachi et al., 2004). Neben dem klassischen, genomischen Signalweg des AhR, also seine Dimerisierung mit ARNT und die daraus resultierende Expression seiner Zielgene, beeinflusst der AhR eine ganze Reihe anderer Signalwege. Dazu zählen verschiedene Proteinkinasen, darunter insbesondere die mit dem AhR assoziierte src, intrazelluläre Calciumlevel, sowie die Funktion verschiedener intra- und extrazellulärer Rezeptoren (Matsumura, 2009).

1.5 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase (CYP) 1A1

Die wichtigsten Enzyme der Phase I des Fremdstoffmetabolismus, die eine Funktionalisierung ihrer Substratmoleküle bewirken, stellt die CYP-Isoenzymfamilie

dar. Diese Häm-Proteine katalysieren die Einführung funktioneller Gruppen in lipophile Substrate und ermöglichen so eine anschließende Konjugation der Substrate mit polaren Bausteinen und im letzten Schritt den aktiven Transport aus der Zelle hinaus. In Eukaryoten sind die CYPs membranständige Enzyme, die am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Marquardt und Schäfer, 2004).

18 verschiedene CYP Genfamilien sind bei Säugern bekannt, vier von diesen (1, 2, 3 und 4) sind hauptsächlich am Metabolismus von Fremdstoffen einschließlich Arzneimitteln, Lebensmittel-Zusatzstoffen und Umweltschadstoffen beteiligt. Mitglieder dieser Enzymfamilien werden häufig als Antwort auf spezifische Fremdstoffe induziert. Der molekulare Mechanismus dieser Induktion ist weiträumig untersucht worden und es sind eine Reihe verschiedener Induktoren, cis-ständiger DNS-Elemente, Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren bekannt. Die Expression der CYP-Familien 2, 3 und 4 wird von den Kernrezeptoren CAR, PXR und PPAR reguliert. Der Heterodimer aus AhR und ARNT steuert die Induktion der CYP-Familie 1 (Laudet und Gronemeyer, 2004; Marquardt und Schäfer, 2004).

CYP1A1 hat eine Größe von 59 kDa und kommt konstitutiv in vielen Organen vor, etwa in Lunge, Gehirn, Gastrointestinaltrakt oder im Herzen. Die basalen Expressionsraten sind sehr gering, sie können jedoch nach Induktion durch halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) stark ansteigen. Nach der Exposition gegenüber AhR-Aktivatoren wird CYP1A1 vor allem in der Leber exprimiert, wo es konstitutiv praktisch nicht vorkommt. Dieses Enzym katalysiert z.B. die metabolische Aktivierung der PAKs zu ultimalen Kanzerogenen. PAKs stellen Liganden des AhR dar, solche Substanzen induzieren demnach ihren eigenen Metabolismus. Im Gegensatz hierzu bindet das überaus stabile TCDD praktisch irreversibel an den AhR. Es stellt kein Substrat für CYP1A1 oder sonstige Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme dar. Aus diesem Grund kommt es durch TCDD zu einer lang anhaltenden AhR-Aktivierung und CYP1A1-Induktion (Anzenbacher und Anzenbacherova, 2001; Inouye et al., 2002).

Von den Genen, die durch den AhR induziert werden, ist CYP1A1 die sensitivste und früheste biologische Antwort auf eine Exposition gegenüber AhR-Liganden und wird daher als Marker für solche verwendet (Marquardt und Schäfer, 2004).

2 Aufgabenstellung

TCDD ist der toxischste Vertreter der Familie der polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe. Über den AhR vermittelt es eine Reihe toxischer Effekte in Labortieren und im Menschen. In unterschiedlichen Spezies verursacht TCDD Tumore in verschiedenen Geweben, vor allem in der Leber. Auch für den Menschen ist TCDD als kanzerogen klassifiziert worden. Der Mechanismus der kanzerogenen Wirkung von TCDD ist bis heute nicht abschließend geklärt. Studien *in vivo* an Ratten sowie *in vitro* mit verschiedenen Zellsystemen konnten zeigen, dass TCDD die durch genotoxische Behandlungen ausgelöste Apoptose hemmt. Es ist diskutiert worden, ob TCDD kanzerogen wirkt, indem es die Apoptose von genetisch aberranten Zellen hemmt und ihnen somit das Fortschreiten in die Malignität ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, über welche molekularen Mechanismen TCDD in primären Rattenhepatozyten anti-apoptotisch wirkt. Als apoptogene Behandlungen wurden UVC-Strahlung sowie OTA und CHX eingesetzt. Nach Inkubation der Zellen mit TCDD wurden verschiedene Ereignisse entlang von Apoptosesignalwegen in den Zellen untersucht, um die Zielstrukturen von TCDD zu finden, über die die Substanz der Apoptose entgegenwirkt.

Darüber hinaus ist untersucht worden, ob der beschriebene anti-apoptotische Mechanismus in primären Rattenhepatozyten über eine Aktivierung des AhR vermittelt wird. Auch wurde getestet, ob TCDD anti-apoptotisch in humanen Hepatomzellen und damit einem humanen Leberzellsystem wirkt, um letztendlich die Wirkungen von TCDD aus dem *in vitro*-Modell der Ratte auf humane Zellen übertragen zu können.

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, über die TCDD die Apoptose von geschädigten Zellen unterdrückt, könnte im Wesentlichen dazu beitragen, die Risikobewertung für eine Exposition des Menschen gegenüber TCDD und verwandten Verbindungen auf eine solidere Basis zu stellen.

3 Material und Methoden

3.1 Arbeiten mit primären Hepatozyten

Alle Chemikalien und Reagenzien werden von Sigma (Schnelldorf), alle Verbrauchsmaterialien von Greiner (Frickenhausen), und alle Medien und Zusätze für die Zellkultur werden von PAA (Cölbe) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

3.1.1 Primärhepatozyten aus männlichen Wistar-Ratten

Bei der Wistar-Linie handelt es sich um einen Auszucht-Rattenstamm, der vom Wistar-Institut in Philadelphia, USA 1947 an die Scientific Products Farm (Vorgänger von *Charles River United Kingdom* (CRUK)) abgegeben worden war. 1975 kam die Rattenlinie dann von CRUK zu Charles River. Die offizielle Bezeichnung lautet Crl:WI.

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 150 und 250 g verwendet (Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg).

3.1.1.1 Isolierung

Die Isolierung von Parenchymzellen der Leber (Primärhepatozyten) erfolgt modifiziert nach der Perfusionsmethode nach Seglen (Seglen, 1972; Schrenk et al., 1992). Alle verwendeten Geräte und das Operationsbesteck werden autoklaviert und die für die Perfusion verwendeten Puffer steril filtriert, um steriles Arbeiten zu gewährleisten.

Die Tiere werden durch eine Injektion mit wässriger Pentobarbitallösung (100 mg/kg, i.p.) betäubt und rücklings auf einer Unterlage mit Klebestreifen an den Gliedmaßen fixiert. Um die Vollständigkeit der Narkose zu überprüfen, wird der Bauchmuskelreflextest durchgeführt, wobei der Ratte mit einer Pinzette der obere Bereich des Schwanzes zusammengedrückt wird. Zucken die Bauchmuskeln zusammen, ist das Tier noch nicht ausreichend betäubt.

Die Bauchdecke wird bis zum *Sternum* geöffnet und durch Beiseitelegen des Magen-Darm-Traktes wird die Leber mit dem dazugehörigen Gefäßsystem freigelegt. Nahe der Eintrittsstelle der Pfortader (*vena portae*) in die Leber wird eine Ligatur um diese Vene gelegt. In die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) erfolgt eine Injektion mit

0,1 ml Heparinlösung (1000 U/ml in 0,9% NaCl). Nun wird in die Pfortader eine Infusionskanüle geführt, die durch das Festziehen der Ligatur fixiert wird. Die Infusionsnadel ist über eine Blasenfalle mit einer Peristaltikpumpe verbunden, welche luftblasenfrei Ethylenglykol-bis(β)-Aminoethylether-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)-Puffer (Tabelle 1) (37°C) durch das Tier pumpt (etwa 10 min, max. 10 ml/min). Dieser Puffer entzieht dem Gewebe Kalziumionen, so dass sich die Desmosomen, welche die einzelnen Leberzellen miteinander verbinden, lösen. Dem Tier wird die Hohlvene durchtrennt, so dass es ausblutet. Die Leber wird mit dem Puffer blutleer gespült.

Im Anschluss daran wird der Brustraum des Tieres geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Hierdurch kommt es zum Kollabieren der Lunge und zum Tod des Tieres. Nun wird die Leber mit kalziumhaltigem Kollagenase-Puffer (Tabelle 1) (37°C) für 30 min bei 10 ml/min perfundiert. Es wird eine Kanüle in die von der Leber kommende Hohlvene gesetzt, damit der Kollagenase-Puffer zirkulierend durch die Leber gepumpt werden kann. Das Kalzium im Puffer aktiviert die Kollagenase, welche die extrazelluläre Matrix auflöst, so dass sich die einzelnen Hepatozyten aus ihrem Zellverband lösen und nur noch durch die Leberkapsel zusammengehalten werden. Die weiche Leber wird danach vorsichtig aus dem Tier präpariert.

Die Leberkapsel wird mit einer Pinzette geöffnet und die Zellen werden zusammen mit 200 ml Waschpuffer (Tabelle 1) durch ein Nylonnetz (250 μ m Netzstärke) filtriert. Die erhaltene Zellsuspension wird nochmals durch ein feineres Nylonnetz (100 μ m Netzstärke) filtriert und auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Im Anschluss wird die Suspension bei Raumtemperatur (RT) und 300 rpm für 3 min zentrifugiert, um tote Zellen zu entfernen. Das erhaltene Zellpellet wird nach Entfernen des Überstandes erneut mit Waschpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wird das Zellsediment in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und die erhaltenen vier Suspensionen werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die erhaltene Zellsuspension wird zur Aussaat eingesetzt (Abbildung 9).

Tabelle 1: Zusammensetzung der für die Perfusion verwendeten Puffer

	Endkonzentration	Reagenz	
EGTA-Puffer	0,1 M (31,5 g)	NaCl	
	4 mM (1,6 g)	KCl	
	1 mM (1,35 g)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	
	1 mM (0,75 g)	KH ₂ PO ₄	
	20 mM (9,05 g)	NaHCO ₃	
	15 mM (17,9 g)	HEPES	
	8 mM (7,5 g)	Glucose	
	0,1 mM (0,19 g)	EGTA	
	ad 5 l mit bidestilliertem Wasser (ddH ₂ O); pH 7,4; sterilfiltrieren		
	1 M HEPES	23,83 g	HEPES
ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4; sterilfiltrieren			
Kollagenase-Puffer	10 mM HEPES	5 ml einer 1 M Lösung	
	100 U Penicillin/	5 ml einer 10 000 U Penicillin/	
	0,1 mg/l Streptomycin	10 mg/l Streptomycin Lösung	
	ad 500 ml mit DMEM/Ham's F12 (1:1)		
	kurz vor Verwendung 100 CDU/ml Collagenase in Puffer lösen		
Waschpuffer	10 mM HEPES	5 ml einer 1 M Lösung	
	100 U Penicillin/	5 ml einer 10000 U Penicillin/	
	0,1 mg/l Streptomycin	10 mg/l Streptomycin Lösung	
	20% (100 ml)	Fötales Kälberserum (FKS)	
	ad 500 ml mit DMEM/Ham's F12 (1:1)		

3.1.1.2 Bestimmung der Gesamt- und der Lebendzellzahl

Die Gesamt- und die Lebendzellzahl der Zellsuspension der Primärhepatozyten werden mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Hierzu werden 150 µl Waschpuffer mit 150 µl Trypan-Blau-Lösung und 10 µl Zellsuspension gemischt und auf die Zählkammer gegeben. Es werden sowohl blau angefärbte, tote Zellen sowie nicht angefärbte, lebende Zellen ausgezählt. Der Vitalitätsfaktor bestimmt sich über das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl. Die Zahl vitaler Zellen in der Zellsuspension je ml ergibt sich aus dem Produkt der Gesamtzellzahl je ml und dem Vitalitätsfaktor.

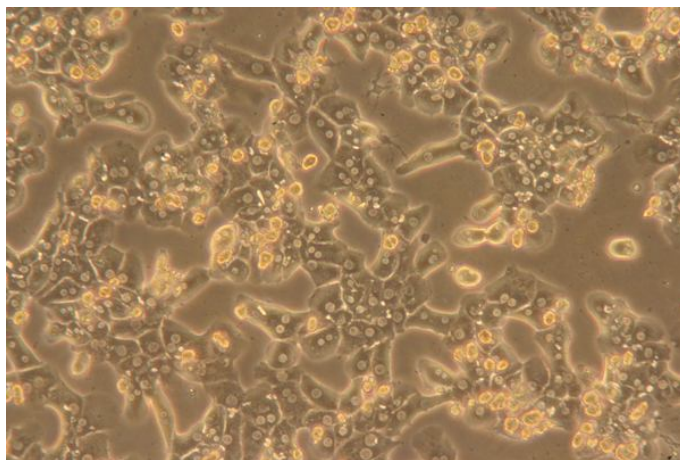


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahme von primären Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten (Vergrößerung 100x)

3.1.1.3 Kollagenieren von Multinapf-Platten und Petrischalen

Da die Primärhepatozyten nur schlecht auf unbehandelten Kunststoffoberflächen anwachsen, werden die verwendeten Kulturgefäße mit einer Kollagenschicht überzogen.

In jeden Napf der Multinapf-Platten wird ein Aliquot einer sterilen Kollagen-Lösung (Tabelle 2) pipettiert und danach wieder abgesaugt, so dass nur ein dünner Flüssigkeitsfilm im Napf verbleibt. Die so präparierte Platte wird über Nacht in der Sterilbank unter UV-Licht zum Trocknen und Sterilisieren belassen.

Um die Zellkulturschalen zu kollagenieren wird ein Aliquot der Kollagen-Lösung in die Schale pipettiert und wieder abgesaugt. Es wird analog der Multinapf-Platten verfahren und die Schalen im UV-Licht getrocknet.

Tabelle 2: Herstellung der Kollagenlösung

Kollagenlösung

Rattenschwänze werden von ihrer Haut befreit und die Gelenke gebrochen. Mit den Gelenken zusammen werden die Kollagenfasern aus dem Gewebe herausgezogen und für drei Stunden in der Sterilbank getrocknet. Die Fasern werden von den anhaftenden Gelenken und Blutgefäßen befreit, in etwa 3 cm lange Stücke geschnitten und durch Zerreiben zwischen den Fingern vereinzelt. Die Fasern werden für 24 h in der Sterilbank unter UV-Licht sterilisiert und im Anschluss bei -20°C gelagert.

2 g der Fasern werden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit ddH₂O aufgefüllt und 1 h bei RT gerührt. Der Überstand wird verworfen und die Fasern werden erneut für 30 min in ddH₂O gewaschen. Die sauberen Fasern werden in eine 500 ml Flasche überführt und mit 500 ml steriler 0,1% Essigsäure aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird bei RT für 24 h gerührt und anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Die Aliquots werden für 3 h bei 3700 rpm, RT zentrifugiert und die Überstände in einer 500 ml Flasche vereinigt.

Nach Bestimmen der Proteinkonzentration wird eine Lösung mit einem Proteingehalt von 1,6 mg/ml hergestellt. Diese kann bei 4°C für 6 Monate gelagert werden. Aus dieser Stammlösung wird durch Verdünnen mit steriler 0,1% Essigsäure eine Kollagen-Arbeitslösung mit 0,5 mg Protein/ml hergestellt.

3.1.1.4 Zellkultur und Inkubationen

Die isolierten Hepatozyten werden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *Low Glucose* mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung ausgesät.

Für die jeweiligen Kulturgefäße gelten folgende Zelldichten:

24-Napfplatten: 200 000 Zellen in 1 ml Medium pro Napf

60 mm Zellkulturschalen: 2 000 000 Zellen in 4 ml Medium

90 mm Zellkulturschalen: 6 000 000 Zellen in 8 ml Medium

Für die DAPI-Färbeexperimente werden 1 000 000 Zellen in 4 ml Medium in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät.

Nach drei Stunden Anwachszeit im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wird das Kulturmedium gewechselt und damit tote Zellen aus dem Kulturgefäß entfernt. Dann werden die Zellen entsprechend behandelt: für die UVC-Bestrahlung (254 nm) werden die Zellen mit definierten Dosen in einer UV-Kammer (FLX-20M, Biometra, Göttingen) bestrahlt. Für die Inkubationen werden die Zellen mit den in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelösten Testsubstanzen behandelt. Die DMSO-Konzentration in allen Behandlungen beträgt 0,5%.

Als Testsubstanzen werden eingesetzt:

TCDD (Promochem, Wesel), OTA, CHX, zVAD-fmk (Peptanova, Sandhausen), CH-223191 (Calbiochem, Darmstadt), PJ34 (Calbiochem, Darmstadt), DPQ (Calbiochem, Darmstadt)

Bis zur Aufbereitung der Proben zu den jeweiligen Erntezeitpunkten verbleiben die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

Für alle Experimente außer den DAPI-Färbeexperimenten, dem Trypan-Blau Test, dem Resazurin-Reduktionstest, sowie der Messung der Proteinbiosynthese wird bei der Zellernte wie folgt vorgegangen:

Im Anschluss an die Inkubation werden die Zellen zusammen mit dem Inkubationsmedium mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C für 5 min bei 800 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml eiskaltem *phosphate buffered saline* (PBS) (Tabelle 3) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter

Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wird bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung von PBS

PBS	Endkonzentration	Reagenz
	137 mM (8,006 g)	NaCl
	2,7 mM (0,201 g)	KCl
	6,5 mM (0,923 g)	NaH ₂ PO ₄
	1,5 mM (0,204 g)	KH ₂ PO ₄
	ad 1 l mit ddH ₂ O; pH 7,4	

3.1.2 Trypan-Blau Test

Tote Zellen können den Farbstoff Trypan-Blau nicht aus ihrem Zytoplasma ausschleusen, er reichert sich in den Zellen an. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop farblos, tote Zellen erscheinen blau.

Für diesen Versuch werden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und behandelt. Im Anschluss an die Inkubation wird das Inkubationsmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Zellrasen wird mit 500 µl 37°C warmem PBS gewaschen und das PBS wird ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nun werden die in der Zellkulturschale angewachsenen Zellen mit 500 µl Trypsin-Lösung im Brutschrank für 15 min abgelöst. Die trypsinisierten Zellen werden ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt.

Ein 20 µl Aliquot der Zellsuspension wird mit 10 µl Trypan-Blau Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Über das Verhältnis aus toten, blauen Zellen und farblosen, lebenden Zellen wird die Vitalität ermittelt.

3.1.3 Resazurin-Reduktionstest

Das blaue, nicht fluoreszierende Resazurin wird von lebenden Zellen zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert (Abbildung 10) (O'Brian et al., 2000). Es wird angenommen, dass Resazurin in den Mitochondrien reduziert wird, es ersetzt molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor von Oxidoreduktasen wie etwa der Cytochromoxidase, dem letzten Enzym der Atmungskette. Da Resazurin Elektronen von diesem Enzym aufnimmt, stört es nicht die Zellatmung und wirkt deshalb nicht toxisch auf die Zellen (McMillian et al., 2002).

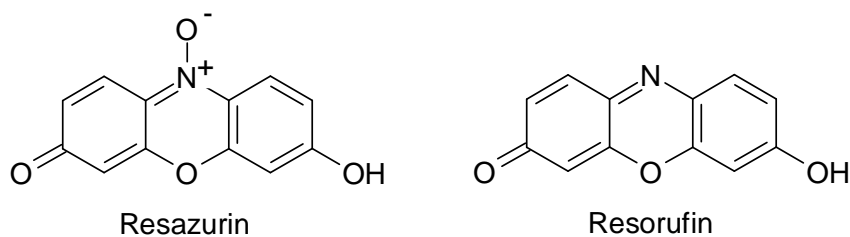


Abbildung 10: Strukturformeln von Resazurin und Resorufin.

Für diesen Versuch werden Primärhepatozyten in 24-Napfplatten ausgesät. Als Positivkontrolle für eine zytotoxische Wirkung dient eine Behandlung mit 0,1% Saponin.

Nach der Inkubation wird das Inkubationsmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 250 µl 37°C warmem PBS je Napf gewaschen. Ein Teil Resazurin-Arbeitslösung (Tabelle 5) (aus Resazurin-Stammlösung hergestellt (Tabelle 4)) wird mit neun Teilen DMEM *Low Glucose* gemischt. Nach dem Absaugen des PBS wird in jeden Napf 1 ml der Resazurin-Arbeitslösung/DMEM gegeben, und daraufhin wird die Platte für 90 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Platte im Plattenleser (Fluoroscan Ascent, Thermo Scientific, Karlsruhe) bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Resazurin-Stammlösung

Resazurin-Stammlösung	Endkonzentration	Reagenz
	110,5 mg In 1 ml Dimethylformamid lösen	Resazurin

Tabelle 5: Zusammensetzung der Resazurin-Arbeitslösung

Resazurin-Arbeitslösung	Endkonzentration	Reagenz
	100 µl	Resazurin-Stammlösung
	14,4 mg	KH ₂ PO ₄
	900 mg	NaCl
	52,8 mg	Na ₂ HPO ₄
	ad 100 ml mit ddH ₂ O	

3.1.4 Proteinisolierung - Zellysat

Zur Herstellung des Zellysats werden Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen werden in 200 µl Lysis-Puffer (Tabelle 6) mit 0,1% Protease-Inhibitor Cocktail resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und 10 s mit einer Ultraschall-Nadelsonde homogenisiert. Das Zellysat wird geklärt, indem es für 15 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert wird. Der Überstand wird abgenommen und kann zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt werden.

Für die Untersuchung der Phosphorylierung des Histons 2AX (γH2AX) wird das Zellpellet direkt in 150 µl 1x Ladepuffer (Tabelle 7) aufgenommen. Die Zellen werden 15 min lysiert, bevor die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert werden. Im Anschluss wird das denaturierte Lysat 15 min bei 12 000 g zentrifugiert.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Lysis-Puffer

Lysis-Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	50 mM (0,303 g)	Tris
	15 mM (0,279 g)	Na ₄ EDTA
	150 mM (0,438 g)	NaCl
	0,1% (50 µl)	Triton X-100
	ad 50 ml mit ddH ₂ O; pH 8,0	

Tabelle 7: Zusammensetzung des 1x Ladepuffer

1x Ladepuffer	Einwaage	Reagenz
	8 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)
	0,21 g	SDS
	7 ml	Glycerin
	0,3 g	Bromphenolblau
	0,8 ml	β-Mercaptoethanol
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; 4°C	

3.1.5 Isolierung von Zellfraktionen – Mitochondrien und Zytosol

Zur Isolierung verschiedener Zellfraktionen werden Zellen auf 90 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen werden in 200 µl hypotonem Lysis Puffer (mit 0,1% Protease-Inhibitor-Cocktail) (Tabelle 8) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert und hierbei alle 5 min gevortext.

Im Anschluss werden die Zellen mittels eines Glas-Potters mit fünf Zügen aufgebrochen und für 5 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wird für 15 min bei 12 000 g zentrifugiert um die Mitochondrien zu pelletieren. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und enthält die zytosolische Fraktion. Die Mitochondrien werden in 30 µl hypotonem Lysis Puffer mittels Ultraschall homogenisiert.

Tabelle 8: Zusammensetzung des hypotonen Lysis Puffer

Hypotoner Lysis Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	10 mM (121,1 mg)	Tris
	1 mM (7,5 mg)	KCl
	75 mM (0,438 g)	NaCl
	1,5 mM (14,3 mg)	MgCl ₂
	1 mM (15,4 mg)	DTT
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 8,0; 4°C	

3.1.6 Isolierung von Zellfraktionen – Zellkerne

Die Isolierung von Zellkernen aus Hepatozyten erfolgt nach der Methode von Scaffidi et al., 1998. Zur Isolierung der Zellkerne wird das Zellpellet in 500 µl Kernisolierungspuffer (Tabelle 9) mit 0,1% Proteaseinhibitor resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Kernisolierungspuffer

Kernisolierungspuffer	Endkonzentration	Reagenz
	10 mM (302,4 mg)	PIPES
	10 mM (70,6 mg)	KCl
	2 mM (40,6 mg)	MgCl ₂
	1 mM (15,4 mg)	DTT
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4; -20°C	

Die Zellen werden im Anschluss mit Hilfe eines Glas-Potters mit fünf Zügen homogenisiert. Das Homogenat wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorsichtig über 750 µl 30% Saccharose in Kernisolierungspuffer (mit 0,1% Proteaseinhibitor) geschichtet und für 10 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 300 µl PBS resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach

erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen und die Zellkerne werden und zu $2 \cdot 10^8$ Kerne/ml in PBS bei -80°C gelagert.

3.1.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau wird zum Nachweis von Proteinen verwendet. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm, da der Farbstoff durch Komplexbildung mit Proteinen stabilisiert wird. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und unpolare Seitenketten (Bradford, 1976).

Die Quantifizierung erfolgt über eine externe Kalibriergerade mit Rinder-Serum-Albumin (BSA). In einer 96-Napfplatte werden die Standardreihe mit 0 - 10 µg BSA/Napf sowie die Proben jeweils als Triplikat pipettiert. Die Proben werden zunächst 1:20 mit ddH₂O verdünnt. Pro Napf werden 200 µl (1:5 mit ddH₂O verdünnte) Protein Dye zupipettiert (Bio-Rad, München). Nach 10 min wird die Extinktion bei 595 nm photometrisch in einem Plattenleser vermessen. Aus der Geradengleichung für die Standardreihe lässt sich der Proteingehalt der Proben errechnen. Ebenfalls können die Proben bei 595 nm am NanoDrop 1000 Spektrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) vermessen werden.

3.1.8 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung geladener Teilchen (hier von Proteinen) in einem elektrischen Feld. Da der Ladebuffer den Thioalkohol β -Mercaptoethanol enthält, werden die Disulfidbindungen der Proteine reduktiv gespalten, und somit liegen multimere Proteine in monomerer Form vor. Durch die Anwesenheit des anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen der Proteine effektiv überdeckt. Jeweils drei Aminosäuren binden ein Molekül SDS, es bilden sich anionische Micellen mit konstantem Masse/Ladungsverhältnis aus. Auf diese Weise werden die Proteine ausschließlich nach ihrem Molekülradius aufgetrennt. Mittels Markerproteinen lassen sich im Anschluss an die Trennung die Molekulargewichte der Proteine bestimmen.

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese ermöglicht eine höhere Bandenschärfe im Vergleich zu einer kontinuierlichen Elektrophorese. Die Diskontinuität bezieht sich

hier auf unterschiedliche pH-Werte sowie Porengrößen zwischen Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel liegt das enthaltene Glycin auf Grund des pH-Wertes von 6,8 als ungeladenes Zwitterion vor, weshalb es im Gegensatz zum ebenfalls vorhandenen Chlorid eine viel niedrigere Mobilität aufweist. Zwischen den beiden Lauffronten von Glycin und Chlorid bilden sich auf Grund der entstehenden Potentialdifferenz Proteinstapel aus, welche mit gleicher Geschwindigkeit wandern. Erreichen die Glycin-Moleküle das Trenngel, welches einen pH-Wert von 8,8 aufweist, führt dies zu einer negativen Ladung des Glycins, wodurch dieses schneller wandert. Die Potentialdifferenz hebt sich auf. Wegen der engeren Poren des Trenngels verdichten sich die Proteinstapel und werden nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt.

Die Lösung für das Trenngel (Tabelle 10) wird zusammenpipettiert und möglichst schnell zwischen zwei Glasplatten in einem vertikalen Gießstand pipettiert. Die Lösung wird mit einigen Tropfen n-Butanol überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Das Gel wird für etwa 30 min auspolymerisieren gelassen. Ist das Gel fest, wird das Butanol mit einem Streifen Filterpapier entfernt. Die zusammenpipettierte Lösung für das Sammelgel (Tabelle 10) wird auf das Trenngel pipettiert, ein Probenkamm im Sammelgel formt die Geltaschen. Erneut wird das Gel 30 min zum Auspolymerisieren belassen.

Die Proteinproben werden mit ddH₂O so verdünnt, dass alle den gleichen Proteingehalt besitzen. Zu 10 µl Probe werden 5 µl 3x Ladepuffer (Tabelle 11) pipettiert und die Proben werden für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und abzentrifugiert.

Das Gel wird in eine vertikale Gelkammer (Mini Protean III Apparatus, Bio-Rad, München) gestellt und mit 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 12) überschichtet. Der Probenkamm wird vorsichtig aus dem Gel gezogen und die Proben (jeweils 15 µl) sowie der Molekulargewichtsmarker (Bio-Rad, München) können in die Geltaschen pipettiert werden. Die Dauer der Elektrophorese beträgt etwa 2 h. Zunächst wird eine konstante Spannung von 80 V eingestellt bis die Lauffront in das Trenngel eingetreten ist, dann wird die Spannung auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat, jedoch bevor sie aus dem Gel austritt.

Tabelle 10: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel bei der SDS-PAGE

Trenngel (10% Acrylamid)			
	für 2 Gele	für 4 Gele	für 6 Gele
Acrylamid (30%)	3,3 ml	6,6 ml	9,9 ml
H ₂ O	4 ml	8 ml	12 ml
1,5 M Tris	2,5 ml	5 ml	7,5 ml
0,5 M Tris	-	-	-
SDS (10%)	100 µl	200 µl	300 µl
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10%)	100 µl	200 µl	300 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl	10 µl	15 µl

Sammelgel (4% Acrylamid)			
	für 2 Gele	für 4 Gele	für 6 Gele
Acrylamid (30%)	0,5 ml	1 ml	1,5 ml
H ₂ O	2,4 ml	4,8 ml	7,2 ml
1,5 M Tris	-	-	-
0,5 M Tris	1 ml	2 ml	3 ml
SDS (10%)	40 µl	80 µl	120 µl
APS (10%)	40 µl	80 µl	120 µl
TEMED	4 µl	8 µl	12 µl

Tabelle 11: Zusammensetzung des 3x Ladepuffer für die SDS-PAGE

3x Ladepuffer	Einwaage	Reagenz
	25 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)
	0,62 g	SDS
	20 ml	Glycerin
	0,8 g	Bromphenolblau
	2,5 ml	β-Mercaptoethanol
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; 4°C	

Tabelle 12: Zusammensetzung des 10x Elektrophorese-Puffer

10x Elektrophorese-Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	2 M (720 g)	Glycin
	250 mM (150 g)	Tris
	1% (v/v) (250 ml)	SDS (20%-Lösung)
	ad 5 l mit ddH ₂ O	

3.1.9 Western blot und Immunoblot

Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgt der Western blot. Die aufgetrennten Proteine werden in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- oder eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Die hydrophobe PVDF-Membran (Bio-Rad, München) (6,5 x 9 cm) wird für 10 s in Methanol aktiviert und zunächst in ddH₂O und danach in Anodenpuffer II (Tabelle 13) equilibriert. Die Polyacrylamid-Gele werden aus der Gelkammer genommen und für 15 min in Kathodenpuffer (Tabelle 13) equilibriert. Filterpapiere werden mit den entsprechenden Puffern (Tabelle 13) getränkt. Im Anschluss wird der Blottingstapel aus Filterpapieren, Gel und Membran zusammengesetzt (Abbildung 11). Der Transfer der Proteine erfolgt in einer *semi-dry-blotting*-Apparatur (Hoefler, San Francisco, CA, USA) bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² (45 mA pro Membran) (Bio-Rad Power Pack, Bio-Rad, München) für 75 min.

Alternativ wird ein kontinuierliches *wet-blotting* in Transferpuffer (Tabelle 14) durchgeführt. Hierzu werden alle Komponenten des Blotting-Stapels (Filterpapiere, Polyacrylamidgel und Nitrozellulose-Membran (Milipore, North Ryde, Australien) in Transferpuffer getränkt, in einen Rahmen eingespannt und in die Elektrophoresekammer gestellt (Bio-Rad, Gladesville, Australien). Der *wet-blot* wird bei konstanter Spannung von 100 V für 2 h bei 4°C durchgeführt.

Die geblotteten Gele werden mit Amidoschwarz-Färbelösung (Tabelle 15) für etwa 15 min gefärbt und solange mit Wasser entfärbt, bis der Hintergrund der Gele klar ist. Die Gele werden zur Überprüfung der Vollständigkeit des Blots am Geldokumentationssystem Eagle Eye II (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) fotografiert und gespeichert.

Die Membran wird nach dem Blot in Blocking Puffer (Tabelle 16) überführt und über Nacht bei 4°C oder alternativ 1 h bei Raumtemperatur geblockt um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu besetzen.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Blotting-Puffer

	Endkonzentration	Reagenz
Anodenpuffer I	300 mM (36,3 g)	Tris
	10% (100 ml)	Methanol
	ad 1 l mit ddH ₂ O; pH 10,4	
Anodenpuffer II	25 mM (3 g)	Tris
	10% (100 ml)	Methanol
	ad 1 l mit ddH ₂ O; pH 10,4	
Kathodenpuffer	40 mM (3 g)	Glycin
	25 mM (3 g)	Tris
	20% (200 ml)	Methanol
	0,005% (250 µl)	SDS (20%-Lösung)
	ad 1 l mit ddH ₂ O; pH 9,4	

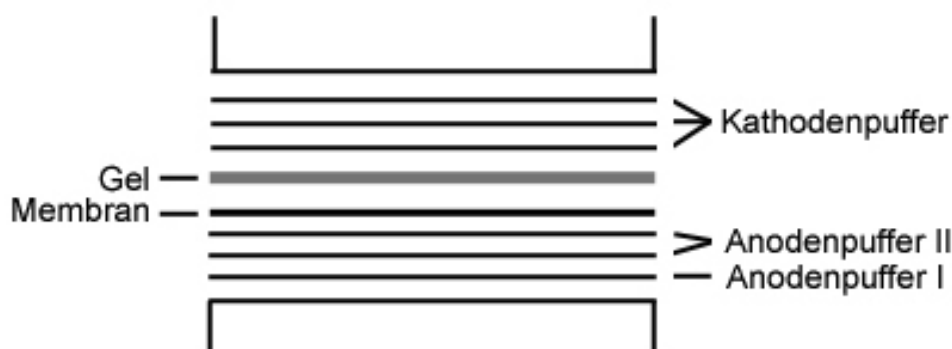


Abbildung 11: Aufbau des blotting-Stapels

Im Anschluss an den Block-Vorgang erfolgt der Immunoblot. Die Membran wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zwei mal 5 min mit *tris buffered saline* mit 0,1% Tween 20 (0,1% TBS-T) (Tabelle 17) gewaschen und mit 3-5 ml Primärantikörperlösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur oder alternativ über

Nacht bei 4°C inkubiert (Konzentrationen und Inkubationszeiten siehe Tabelle 18). Alternativ wird die Membran zusammen mit 1 ml Antikörperlösung in Plastikfolie eingeschweißt.

Die Membran wird im Anschluss erneut drei mal 5 min mit 0,1% TBS-T gewaschen und mit 3-5 ml des Sekundärantikörpers (goat-anti-rabbit-Meerrettich-Peroxidase (*horse radich peroxidase* (HRP))/goat-anti-mouse-HRP/donkey-anti-goat-HRP; 1:5000 in 0,1% TBS-T) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Membran drei mal 5 min mit 0,1% TBS-T und ein mal 5 min mit TBS (Tabelle 17) gewaschen und in TBS bis zur Chemilumineszenz-Detektion aufbewahrt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Transferpuffer

Transferpuffer	Einwaage	Reagenz
	3 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	ad 1 l mit ddH ₂ O	

Tabelle 15: Zusammensetzung der Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz-Färbelösung	Einwaage	Reagenz
	100 µg	Amidoschwarz
	25 ml (25%)	Isopropanol
	10 ml (10%)	Essigsäure
	ad 100 ml mit ddH ₂ O	

Tabelle 16: Zusammensetzung des Blocking-Puffer

Blocking-Puffer	Einwaage	Reagenz
	100 ml	TBS
	100 µl (0,1%)	Tween 20
	5g	Milchpulver

Der Primärantikörper erkennt das nachzuweisende Protein und bindet auf der Membran an dieses. Der Sekundärantikörper ist gegen diejenige Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper stammt. An den Sekundärantikörper ist eine HRP gekoppelt, welche die Chemilumineszenzdetektion ermöglicht. Die Zusammensetzung des Detektionsreagenzes ist Tabelle 19 zu entnehmen.

Die Membran wird in etwa 10 ml des Detektionsreagenzes für 1 min inkubiert. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym katalysiert eine Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid. Hierbei wird angeregtes 3-Aminophthalat gebildet, welches unter Aussenden von Licht in den Grundzustand zurückfällt. Dieses Licht wird von einer CCD-Kamera im Lumi-Imager (Roche, Mannheim) registriert. Idealerweise werden auf der Membran nur dort immunreaktive Banden detektiert, wo sich das zu untersuchende Protein befindet. Das Bild wird gespeichert und die Bandenintensitäten werden mit dem Programm „Lumi Analyst“ von Roche densitometrisch ausgewertet.

Alternativ werden die Membranen an der Kodak Image Station 4000MM (Kodak Molecular Imaging Systems, New Haven, CT, USA) detektiert und mit dem Programm „Scion Image“ von Scion Corporation (Frederick, MD, USA) densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 17: Zusammensetzung von TBS und TBS-T

	Endkonzentration	Reagenz
20x TBS	2,6 M (304 g)	NaCl
	0,4 M (97 g)	Tris
	ad 2 l mit ddH ₂ O; pH 7,4 (HCl)	
0,1% TBS-T	2 l	1x TBS
	0,1% (2 ml)	Tween-20

Tabelle 18: Inkubationen mit den Primärantikörpern (CST: Cell Signaling Technologies)

	Konzentration	Pufferzusammensetzung	Dauer
mouse-anti- β -Actin (Sigma)	1:5000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti- β -Actin (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-AIF (CST)	1:500	0,1% TBS-T	3 h
rabbit-anti-Apaf-1 (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-Bad (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-Bax (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-Bcl-x _L (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	3 h
rabbit-anti-CAD (Santa Cruz)	1:1000	0,1% TBS-T	2 h
rabbit-anti- β -Catenin (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-Caspase-3 (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-CYP1A1 (Santa Cruz)	1:1000	0,1% TBS-T	2 h
rabbit-anti-Endonuklease G (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 5% BSA	über Nacht
goat-anti-H2A (Santa Cruz)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-H2A (Millipore)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
mouse-anti- γ H2AX (Millipore)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti- γ H2AX (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-ICAD (Santa Cruz)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	2 h
mouse-anti-NF κ B p65 (Santa Cruz)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
mouse-anti-p53 (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti-PARP (CST)	1:500	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	2 h
rabbit-anti-sFRP-4 (Millipore)	1:750	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht
rabbit-anti- α / β -Tubulin (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	3 h
rabbit-anti-VDAC1 (CST)	1:1000	0,1% TBS-T, 2% Milchpulver	über Nacht

Im Anschluss an die Detektion werden die Membranen im Kühlschrank in TBS gelagert. Um mehrere Proteine auf derselben Membran nachweisen zu können, wird die Membran für 15 min bei 50°C in Stripping-Puffer (Tabelle 20) inkubiert. Danach wird die Membran sechs mal 5 min mit 0,1% TBS-T gewaschen und der Immunoblot erfolgt ab dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen in Milchpulver-Lösung.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Chemilumineszenz-Detektionsreagenz

	Endkonzentration	Reagenz
0,1 M Tris-HCl	0,1 M (2,428 g) ad 200 ml mit ddH ₂ O; pH 8,6	Tris
Solution A	50 mg in 200 ml 0,1 M Tris lösen; 4°C	Luminol
Solution B	22 mg in 20 ml DMSO lösen; RT, dunkel	p-Coumarinsäure

kurz vor der Detektion 10 ml Solution A mit 1 ml Solution B
mischen und 100 µl 1,5% H₂O₂ dazugeben

Tabelle 20: Zusammensetzung des Stripping-Puffer

	Endkonzentration	Reagenz
Stripping-Puffer	62,5 mM (757 mg) 2% (10 ml 20%ige-Lösung) 100 mM (700 µl) ad 100 ml mit ddH ₂ O	Tris SDS β-Mercaptoethanol

3.1.10 Ribonukleinsäure (RNS)-Isolierung mit Trizol

Für die Isolierung von RNS werden Zellen in 90 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen werden in 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) lysiert und für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Dem Homogenat werden im Anschluss 0,2 ml Chloroform zugegeben, für 15 s von Hand geschüttelt und erneut für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden die Proben bei 12 000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation liegen drei Phasen vor: eine untere rote organische Phase, eine Interphase sowie eine wässrige Phase, in der die RNS

enthalten ist. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Mischen mit 500 µl Isopropanol wird die RNS gefällt. Die Lösung wird bei 12 000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Pellet besteht aus RNS. Der Überstand wird entfernt und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, gevortext und bei 8500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird für 5-10 min an der Luft getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Im Anschluss wird die RNS-Lösung für 10 min auf 55-60°C erhitzt und bei -80°C gelagert.

Die RNS-Konzentration der Proben wird mit Hilfe des NanoDrop ermittelt und mit RNase-freiem Wasser auf 100 ng RNS/µl eingestellt.

3.1.11 RNS-Isolierung mit RNeasy Mini Kit

Um RNS für die qPCR-Arrays zu isolieren wird der RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) laut Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen werden in 600 µl RLT-Puffer lysiert, auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) gegeben und 2 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Hierbei wird die Probe homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wird mit 600 µl 70% Ethanol vermischt und 600 µl des Gemisches werden auf die RNeasy-Säule aufgegeben. Die Säule wird bei 12 000 rpm für 15 s zentrifugiert und das Eluat wird verworfen. Die Zentrifugation wird mit dem restlichen Gemisch wiederholt. Nun befindet sich die RNS an die Membran der Säule gebunden. Die Membran wird einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Hierzu wird der jeweilige Waschpuffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert und das Eluat verworfen. Im Anschluss werden 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben und mittels Zentrifugation wird die gebundene RNS eluiert und in einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen.

Die RNS-Konzentration der Proben wird mit Hilfe des NanoDrop ermittelt und mit RNase-freiem Wasser auf 100 ng RNS/µl eingestellt.

3.1.12 RNS Agarose-Gelelektrophorese

Um die Integrität der RNS in den isolierten Proben zu überprüfen, wird sie unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von Formaldehyd in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die RNS wandert im elektrischen Feld in Richtung der Anode, da die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren negative Ladungen tragen. Intakte RNS weist

zwei scharfe Banden im Agarose-Gel auf, eine für 28S rRNS und eine für 18S rRNS. Degradierete RNS-Proben weisen unscharfe Banden auf und werden für die weiteren Versuchsschritte verworfen.

1 µg RNS (10 µl) wird mit 5 µl Auftragspuffer (Tabelle 21) gemischt, für 20 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert.

Tabelle 21: Zusammensetzung des RNS-Auftragspuffer

RNS-Auftragspuffer-Stammlösung		RNS-Auftragspuffer-Gebrauchslösung	
Bromphenolblau	0,07% (w/v)	10x MOPS	3,6 µl
Glycerin	33% (w/v)	Formamid	18 µl
SDS	7% (w/v)	Formaldehyd (37%)	6,4 µl
		Auftragspuffer-Stammlösung	4 µl
		Ethidiumbromid-Lösung	0,2 µl

Für die Gelelektrophorese wird ein 1,5% 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure (MOPS)-Formaldehyd-Agarosegel (Tabelle 22) verwendet, welches mit 1x MOPS-Puffer (Tabelle 23) überschichtet wird. Die Proben werden in die Taschen pipettiert und elektrophoretisch für etwa 1 h bei 70 V aufgetrennt (ST305 Electrophoresis Power Supply, Gibco, Eggenstein). Das Gel wird im Anschluss an die Elektrophorese am Geldokumentationssystem Eagle Eye II fotografiert und gespeichert.

Tabelle 22: Zusammensetzung des 1,5% MOPS-Formaldehyd-Agarosegel

	Endkonzentration	Reagenz
MOPS-Formaldehyd-Agarosegel	1,5 g	Agarose
	100 ml	1x MOPS
	10 ml	Formaldehyd (37%)
	Formaldehyd erst zugeben, wenn das Gel auf etwa 50°C abgekühlt ist, Gel im Abzug gießen	

Tabelle 23: Zusammensetzung des 10x MOPS-Puffer

	Endkonzentration	Reagenz
10x MOPS-Puffer	200 mM (41,852 g)	MOPS
	50 mM (4,102 g)	Natriumacetat
	10 mM (3,362 g)	Na ₂ EDTA
	ad 1 l mit ddH ₂ O	
	steril filtrieren und autoklavieren;	
	dunkel lagern	

3.1.13 DNase-Verdau

Um zu verhindern, dass im Zuge der *polymerase chain reaction* (PCR) eventuell in den Proben vorkommende genomische DNS amplifiziert wird, werden die isolierten RNS-Proben einem DNase-Verdau unterworfen. Hierzu wird der DNase I Amplification Grade Kit von Invitrogen (Karlsruhe) laut Angaben des Herstellers verwendet (Tabelle 24). Im Anschluss an die DNase-Reaktion wird das Enzym durch Zugabe von EDTA-Lösung und Erhitzen inaktiviert.

Tabelle 24: Ansatz für DNase-Verdau

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
RNS-Probe (100 ng/μl)	8 μl	
10x Dnase Reaction Buffer	1 μl	
DNase I, Amp Grade, 1 U/μl	1 μl	
		15 min, RT
25 mM EDTA	1 μl	
		10 min, 65°C

3.1.14 cDNS-Synthese

Da RNS bei der PCR nicht amplifiziert werden kann, wird sie in die entsprechende cDNS mit Hilfe einer reversen Transkriptase umgeschrieben. Hierzu wird der iScript cDNS Synthesis Kit der Firma Bio-Rad (München) laut Angaben des Herstellers verwendet (Tabelle 25). Die Reaktion erfolgt im Anschluss an den DNase-Verdau im gleichen Reaktionsgefäß in einem Thermocycler (myCycler, Bio-Rad, München).

Tabelle 25: Ansatz für RT-Reaktion (BioRad)

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
RNS-Probe (100 ng/µl)	11 µl	
5x iScript Reaction Mix	4 µl	
Nuclease-free water	4 µl	
iScript Reverse Transcriptase	1 µl	
		5 min, 25°C
		30 min, 42°C
		5 min, 85°C

Im Anschluss an die RT-Reaktion werden dem Reaktionsansatz von 20 µl 44 µl Nuclease-freies Wasser zugegeben um auf ein Gesamtvolumen von 64 µl mit einem Gesamt-cDNS-Gehalt von 800 ng zu kommen. Hiervon werden für die PCR jeweils 4 µl eingesetzt, was einer cDNS-Menge von 50 ng entspricht. Die cDNS-Proben werden bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.1.15 Quantitative Real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR)

Die reverse Transkriptase-Reaktion mit anschließender *real-time* PCR dient zur Analyse der mRNS-Expression in Proben verschiedenster Herkunft. Die einfachste Methode zur *real-time* Untersuchung der während der PCR gebildeten Amplikons besteht in einer Färbung der DNS mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen. So bindet der Farbstoff SYBR Green I spezifisch an doppelsträngige DNS, was eine Fluoreszenzsteigerung des Farbstoffes bewirkt. Die Fluoreszenz der Probe ist direkt proportional zur enthaltenen DNS-Menge (Pfaffl, 2001).

Bei der qRT-PCR unterscheidet man verschiedene Phasen der Amplifizierung: während der ersten Phase lässt sich trotz stattfindender Amplifizierung kein nennenswerter Anstieg der Fluoreszenz feststellen (lineare Hintergrund Phase). In der zweiten Phase kommt es zu einem logarithmischen Anstieg der Fluoreszenz (log-lineare Phase). Im Laufe der PCR werden zunehmend die Substrate verbraucht und auch die Polymerase verliert durch die thermische Belastung an Aktivität. Aus diesen Gründen kommt es zu späteren Zeitpunkten in der PCR zu keinem Fluoreszenzanstieg mehr (Plateau Phase) (Pfaffl, 2004).

Die Quantifizierung der gebildeten Amplikons erfolgt in der frühen log-linearen Phase. Hierbei wird für alle Proben ein so genannter *threshold cycle* (c_T) ermittelt. Dieser Wert gibt denjenigen Zyklus an, bei dem erstmals ein signifikanter Fluoreszenzanstieg über dem Hintergrundlevel detektiert wird.

In dieser Arbeit werden die relativen Expressionslevel (*ratios*) der Proben im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle nach der Methode von Pfaffl, 2001 berechnet:

$$ratio = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta c_{T_{Zielgen}}(Kontrolle-Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta c_{T_{Referenzgen}}(Kontrolle-Behandlung)}}$$

Hierbei bedeutet E jeweils die PCR-Effizienz. Diese beträgt idealerweise 2,0 was bedeutet, dass sich die Amplikon-Menge der Probe mit jedem Zyklus verdoppelt. Die reale PCR-Effizienz wird aus einer Standardkurve von unterschiedlichen Verdünnungsstufen ermittelt, über deren Steigung die Effizienz berechnet werden kann (Ermittlung der PCR-Effizienzen siehe Anhang):

$$E = 10^{\frac{-1}{Steigung}}$$

Als Referenzgen dient in der vorliegenden Arbeit β -Actin. Es wird angenommen, dass dieses Gen nicht reguliert wird und daher als Referenzgen oder *housekeeping-gene* verwendet werden kann.

Das Design der für die PCR verwendeten Primer (Tabelle 26) erfolgt nach dem Gesichtspunkt, dass mindestens einer der Primer über einer Intronbrücke liegt, um auszuschließen, dass genomische DNS amplifiziert wird.

Für die qRT-PCR wird der Absolute QPCR SYBR Green Mix von ABGene (Hamburg) nach Angaben des Herstellers verwendet (Tabelle 26). Das Temperaturprogramm des Thermocyclers (iCycler, Bio-Rad, München) ist in Tabelle 27 wiedergegeben. Im Anschluss an die PCR werden die Proben schrittweise von 55°C auf 99,5°C erhitzt, nach jeweils 0,5°C Temperaturzunahme wird der Fluoreszenzwert der Probe ermittelt. Hierdurch wird eine Schmelzkurve der Probe aufgenommen und auf diese Weise die Spezifität der Primer untersucht. Idealerweise zeigt sich in der Schmelzkurve nur ein Maximum und damit nur ein amplifiziertes Produkt.

Tabelle 26: Sequenzen der verwendeten Primer für *cyp1A1*, *bcl-x_L* und β -actin

Gen	Primer	Sequenz
<i>cyp1A1</i>	forward	5'-CCT CTT TGG AGC TGG GTT TG-3'
	reverse	5'-CCT GTG GGG GAT GGT GAA-3'
<i>bcl-x_L</i>	forward	5'-GTG CGT GGA AAG CGT AGA CAA G-3'
	reverse	5'-GTC CCA GCC GCC GTT CTC-3'
β-actin	forward	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA-3'
	reverse	5'-TCT CCG GAG TCC ATC ACA ATG-3'

Tabelle 27: Ansatz für qRT-PCR

Volumen	Reagenz
12,5 μ l	SYBR Green Mix
6,5 μ l	Nuclease-free water
1 μ l	forward Primer (10 pmol/ μ l)
1 μ l	reverse Primer (10 pmol/ μ l)
4 μ l	cDNS (50 ng)

Tabelle 28: Temperaturprogramm für die qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase,			
Denaturierung	95,0°C	15:00 min	1x
Denaturierung	95°C	0:15 min	
Anlagerung	58°C	0:30 min	40x
Elongation	72°C	0:30 min	
Denaturierung	95°C	1:00 min	1x
Anlagerung	58°C	1:00 min	1x
Temperaturgradient	55-100°C		

3.1.16 qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis*

Der *rat apoptosis RT² Profiler PCR Array* der Firma SuperArray (Frederick, MD, USA) ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung der Expression von 84 Genen, die an der Apoptose beteiligt sind (Tabelle 29). Es handelt sich um eine 96-Napfplatte, bei der in jedem Napf unterschiedliche Primerpaare, jeweils für ein bestimmtes Gen, vorgelegt sind. Die Untersuchung von Kontrollproben und behandelten Proben ermöglicht so den Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen Gene.

Tabelle 29: *Gene table Rat Apoptosis RT² Profiler PCR Array*

Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf-1
Api5	Apoptosis inhibitor 5 (predicted)	N/A
Aven	Apoptosis, caspase activation inhibitor (predicted)	N/A
Bad	Bcl2-associated death promoter	Bad
Bag1	Bcl2-associated athanogene 1 (predicted)	Bag1
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	MGC108627
Bax	Bcl2-associated X protein	Bax
Bcl10	B-cell CLL/lymphoma 10	Bcl10
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl-2
Bcl2a1	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1	Bcl2a1
Bcl2l1	Bcl2-like 1	Bcl-xl/Bcl2l
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bim/BimL
Bcl2l2	Bcl2-like 2	BCL-W/BCL-WEL

Bclaf1	BCL2-associated transcription factor 1	Aa2-041
Bid	BH3 interacting domain death agonist	Bid
Bid3	BH3 interacting (with BCL2 family) domain, apoptosis agonist	Dp5/Hrk
Bik	Bcl2-interacting killer	Biklk/Bik
Birc1b	Baculoviral IAP repeat-containing 1b	Birc1/Birc1a
Birc3	Inhibitor of apoptosis protein 1	Birc2/IAP1
Birc4	Baculoviral IAP repeat-containing 4	Api3/Xiap
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	AP14
Bnip1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1	Bnip1
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 2 (predicted)	Bnip2
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3	MGC93043
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein	Bok
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10 (predicted)	LOC315120
Card6	Caspase recruitment domain family, member 6 (predicted)	Card6
Casp1	Caspase 1	Ice/Il1bc
Casp11	Caspase 11	Casp11
Casp12	Caspase 12	Casp12
Casp14	Caspase 14 (predicted)	CASP14
Casp2	Caspase 2	Casp2
Casp3	Caspase 3	Lice
Casp6	Caspase 6	Mch2
Casp7	Caspase 7	Casp7
Casp8	Caspase 8	Casp8
Casp8ap2	Caspase 8 associated protein 2 (predicted)	MDN1
Casp9	Caspase 9	Apaf3/Casp-9-CTD
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Flip
Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (predicted)	Cidea
Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B (predicted)	Cideb
Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain (predicted)	Cradd/RAIDD
Dad1	Defender against cell death 1	Dad1
Dapk1	Death associated protein kinase 1 (predicted)	LOC306722
Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit	ICAD-S
Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	CAD
Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Mort1
Faim	Fas apoptotic inhibitory molecule	Faim
Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Ddit1/Gadd45
Il10	Interleukin 10	IL10X
Lhx4	LIM homeobox protein 4 (predicted)	N/A

Lta	Lymphotoxin A	Tnfb
Ltbr	Lymphotoxin B receptor	MGC94657
Mapk8ip	Mitogen activated protein kinase 8 interacting protein	Jip-1/Mapk8ip1
Mcl1	Myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1
Nfkb1	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	NF-kB
Nol3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	Arc
Polb	Polymerase (DNA directed), beta	Polb
Prdx2	Peroxiredoxin 2	Tdpx1
Prlr	Prolactin receptor	RATPRLR
Prok2	Prokineticin 2	Bv8
Pycard	PYD and CARD domain containing	Asc
Ripk2	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	LOC362491
Sphk2	Sphingosine kinase 2	N/A
Tnf	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	RATTNF/TNF-alpha
Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (predicted)	LOC364420
Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	Opg
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	Tnfr1
Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	Tnfr2
Tnfrsf5	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Cd40
Tnfrsf6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	LOC365454
Tnfsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Trail
Tnfsf12	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12	TWEAK
Cd40lg	CD40 ligand	Tnfsf5
Faslg	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Apt1Lg1/FasL
Tp53	Tumor protein p53	Trp53/p53
Tradd	TNFRSF1A-associated via death domain	Tradd
Traf1	Transcribed locus, strongly similar to NP_033447.2 Tnf receptor-associated factor 1 [Mus musculus]	Traf
Traf2	Tnf receptor-associated factor 2 (predicted)	Traf2
Traf3	Tnf receptor-associated factor 3 (predicted)	LOC362788

RNS, welche mit dem RNeasy Mini Kit isoliert worden ist, wird zunächst am Agilent 2001 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn) untersucht. Hierbei wird die Qualität der eingesetzten RNS bestimmt. Die auf Elektrophorese basierende LabChip-Technologie trennt die RNS ihrer Länge nach auf und erzeugt sowohl ein Chromatogramm als auch ein Gelbild. Idealerweise zeigen sich nur zwei ausgeprägte

Peaks im Chromatogramm, einer für die 18S- und einer für die 28S rRNS. Diese beiden Peaks besitzen idealerweise ein Flächenverhältnis von 1:2.

Die isolierte Gesamt-RNS wird mit ddH₂O auf eine Konzentration von 1 ng/μl verdünnt. Zur RNS-Qualitätskontrolle wird der RNA Pico Kit (Agilent, Waldbronn) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die RNS wird mittels des RT² First Strand Kit (SuperArray, Frederick, MD, USA) laut Angaben des Herstellers in cDNS umgeschrieben. Hierbei werden 800 ng RNS in 8 μl mit 2 μl 5x gDNS Elimination Buffer versetzt und 5 min bei 42°C inkubiert um genomische DNA zu zersetzen.

Dem DNase-Ansatz werden nun die verschiedenen Puffer und Enzyme für die RT-Reaktion laut Tabelle 30 zugesetzt und für die angegebenen Zeiten und Temperaturen inkubiert.

Die cDNS-Proben werden mit 91 μl Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 111 μl gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 30: Ansatz für RT-Reaktion (SuperArray)

Reagenz	Volumen	Temperaturprogramm
RNS-Probe (80 ng/μl)	10 μl	
5x RT Buffer 3	4 μl	
Primer and External Control Mix	1 μl	
RT Enzyme Mix 3	2 μl	
Nuklease-freies Wasser	3 μl	
		15 min, 42°C
		5 min, 95°C

Für die PCR-Arrays werden 102 μl cDNS mit 1275 μl 2x SYBR Green Mix (ABgene, Hamburg) und 1173 μl Nuklease-freies Wasser gemischt und jeweils 25 μl dieses Ansatzes werden in jeden Napf des Arrays pipettiert. Die qRT-PCR erfolgt nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 31 und die erhaltenen c_T-Werte werden auf das Referenzgen β-Actin normalisiert. Die relativen Expressionwerte zwischen Behandlung und Kontrolle werden nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001)

ermittelt. Hierbei werden für die PCR-Effizienzen aller Gene ein Wert von 2 angenommen.

Tabelle 31: Temperaturprogramm für die qRT-PCR (PCR-Arrays)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung der Polymerase,			
Denaturierung	95,0°C	15:00 min	1x
Denaturierung	95°C	0:15 min	
Anlagerung	55°C	0:40 min	40x
Elongation	72°C	0:30 min	

3.1.17 Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI lagert sich in doppelsträngige DNS ein. In fixierten Zellen lassen sich mit diesem Farbstoff Zellkerne selektiv anfärben. Diese erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop hellblau leuchtend. Bei der Apoptose kondensiert das Chromatin und es wird fragmentiert. Apoptotische Zellkerne lassen sich durch DAPI-Färbung leicht von nicht-apoptotischen unterscheiden. Sie erscheinen 1) stark kondensiert, 2) halbmond-förmig oder 3) fragmentiert.

Das Inkubationsmedium wird von den kodierten Zellkulturschalen abgekippt und der Zellrasen wird zweimal mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 15 min bei RT in Methanol fixiert. Das Methanol wird abgekippt und die Zellen werden mit der DAPI-Färbelösung (Tabelle 32) für 5 min inkubiert. Das Triton X-100 in der Färbelösung dient der Permeabilisierung der Zellmembran, so dass der Farbstoff in die Zelle gelangen kann.

Im Anschluss an die Färbung wird die Färbelösung verworfen und der Zellrasen wird zweimal für je 5 Minuten mit Methanol gewaschen, an der Luft getrocknet und im Dunkeln gelagert, bis die Zellen ausgezählt werden. Pro Zellkulturschale werden unter dem Fluoreszenzmikroskop 1000 Kerne ausgezählt und der Prozentsatz apoptotischer Zellen als *apoptotic index* bestimmt.

Tabelle 32: Zusammensetzung der DAPI-Färbelösung

	Endkonzentration	Reagenz
DAPI-Färbelösung	50% (50 ml)	PBS
	50% (50 ml)	Methanol
	5 µg/ml	DAPI
	0,1% (100 µl)	Triton-X 100
	4°C	

3.1.18 DNS-Fragmentierungs-Analyse – „DNA-laddering“

Während der Apoptose kommt es zu einer Spaltung des Chromatins zwischen den Nukleosomen durch spezifische Nukleasen. Hierbei entstehen DNS-Bruchstücke von etwa 200 bp bzw. deren Vielfache. Wird die isolierte genomische DNS apoptotischer Zellen in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, entsteht ein charakteristisches Banden-Muster, eine so genannte DNS-Leiter mit Banden in Abständen von jeweils etwa 200 bp.

Zur DNS-Isolierung werden Zellen auf 90 mm Zellkulturschalen ausgesät. Das Zellpellet wird in 400 µl TTE Puffer (Tabelle 33) mit 8 µl RNase A-Lösung (50 mg/ml in TTE Puffer) und 8 µl Proteinase K-Lösung (50 mg/ml in TTE Puffer) aufgenommen und ausgiebig gevortext. Die Zellsuspension wird nun für mindestens 2 h im Wasserbad bei 55°C inkubiert um Proteine und RNS zu verdauen und die DNS vom Chromatin zu lösen.

Das nun klare Lysat wird im Anschluss einmal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Hierzu wird das Lysat mit 400 µl Extraktionslösung versetzt und 10 Sekunden gevortext. Dann wird die Probe bei Raumtemperatur für 10 min bei 12 000 g zentrifugiert und die obere, wässrige Phase wird ohne die Interphase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Der wässrigen Phase der letzten Extraktion wird 1 ml -20°C kaltes 100% Ethanol zugegeben und das Reaktionsgefäß wird vorsichtig über Kopf geschwenkt, bis die DNS ausfällt. Nach 10 min auf Eis wird die DNS für 15 min bei 12 000 g bei 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 12 000 g und 4 °C zentrifugiert. Nun wird der Überstand vollständig verworfen, und jeglicher Rest wird mit einer 10 µl Pipette abgesaugt, bevor das Reaktionsgefäß noch 5 min an der Luft offen stehen gelassen wird, damit Ethanol-Reste verdampfen können.

Tabelle 33: Zusammensetzung des TTE Puffer

TTE Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	10 mM (121,1 mg)	Tris
	10 mM (186 mg)	Na ₄ EDTA
	25 mM (73 mg)	NaCl
	0,2% (200 µl)	Triton X-100
	1% (5 ml)	20% SDS
	ad 100 ml mit ddH ₂ O, pH 8,0	

Die DNS wird in 30 µl TE Puffer (Tabelle 34) über Nacht bei 4°C gelöst. Mit Hilfe des NanoDrop wird der DNS-Gehalt der Lösung bestimmt und die DNS wird nun auf einen Gehalt von 500 ng/µl mit TE Puffer verdünnt. Zu je 10 µl der verdünnten DNS-Lösung werden als Ladepuffer 5 µl einer 30% Glycerol-Lösung in TE Puffer zugegeben. Die DNS-Lösung wird bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Jeweils 15 µl der Proben werden in einem 1,5% Agarose-Gel in TAE-Puffer (Tabelle 35) mit 0,02% Ethidiumbromid für etwa 2 h bei 90 V elektrophoretisch getrennt. Die DNS wird mit dem Detektionssystem Eagle Eye II unter UV-Licht im Gel sichtbar gemacht und fotografiert.

Tabelle 34: Zusammensetzung des TE Puffer

TE Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	10 mM (121,1 mg)	Tris
	10 mM (186 mg)	Na ₄ EDTA
	25 mM (73 mg)	NaCl
	ad 100 ml mit ddH ₂ O, pH 8,0	

Tabelle 35: Zusammensetzung des TAE-Puffer

TAE Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	40 mM (4,844 g)	Tris
	1 mM (186 mg)	Na ₄ EDTA
	20 mM (1,144 ml)	Essigsäure
	ad 1 l mit ddH ₂ O, pH 8,3	

3.1.19 Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-Aktivität

Die Aktivität von Caspasen lässt sich mittels der Spaltung spezifischer Tetrapeptid-Substrate in Multinapf-Platten bestimmen. Als Substrate dienen Peptide, an deren C-terminalen Aspartat-Rest ein Fluorophor gekoppelt ist. Für die Versuche mit den primären Hepatozyten ist dies 7-Amido-4-trifluormethylcoumarin (AFC). Die jeweiligen Caspasen spalten auf Grund ihrer Spezifität diesen Fluorophor ab, so dass die Fluoreszenz in der Probe abhängig von der Aktivität der untersuchten Caspasen ist. Dadurch, dass der Proteingehalt der Probe mittels der Methode von Bradford (1976) bestimmt wird, lässt sich die spezifische Caspase-Aktivität in pmol AFC/min*mg Protein bestimmen. Als Tetrapeptidsubstrate dienen:

- Ac-IETD-AFC (Caspase 8, extrinsischer Signalweg) (Biolmol, Hamburg)
- Ac-LEHD-AFC (Caspase 9, intrinsischer Signalweg) (Biomol, Hamburg)
- Ac-DEVD-AFC (Caspase 3/7, Effektor-Caspasen)

Zur Bestimmung der Caspasen-Aktivitäten in primären Hepatozyten werden Zellen auf 90 mm Zellkulturschalen ausgesät. Das Zellpellet wird in 300 µl Caspase Lysispuffer (Tabelle 36) aufgenommen und kurz gevortext. Nun werden die Zellen vier Gefrier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff und 37°C warmem Wasser unterworfen. Das Lysat wird im Anschluss für 30 min bei 14 000 g zentrifugiert, der Überstand wird aliquotiert (jeweils 70 µl) und bei -80°C gelagert. Mit den übrigen 20 µl des Lysats wird der Proteingehalt nach Bradford bestimmt.

Tabelle 36: Zusammensetzung des Caspase Lysispuffer

	Endkonzentration	Reagenz
Caspase Lysispuffer	10 mM (119,2 mg)	HEPES
	0,1% (50 mg)	CHAPS
	5 mM (29,2 mg)	EDTA
	ad 50 ml mit ddH ₂ O, pH 7,4 sterilfiltrieren und bei -20°C lagern	
Vor Gebrauch	0,1% Protease-Inhibitoren und 5 mM DTT (77 mg/100 ml) zugeben	

Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgt in Caspase Reaktionspuffer (Tabelle 37) mit Hilfe eines Fluoreszenz Plattenlesers (Fluoroscant Ascent) in einer 96-Napfplatte bei einer Emissionswellenlänge von 510 - 540 nm und einer Anregungswellenlänge von 390 - 400 nm bei 37°C in Anwesenheit der jeweiligen Substrate. Über einen Zeitraum von 90 min wird in Intervallen von 5 min jeweils die Fluoreszenz der Proben aufgenommen. Die Messung erfolgt gegen eine AFC-Kalibriergerade (0 - 25 µM).

Die Substratlösungen werden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die Zusammensetzungen für den Blank, die Kalibriergerade sowie für die untersuchten Proben sehen für eine 96-Napfplatte mit 200 µl Volumen pro Napf wie folgt aus:

Blank:	170 µl Wasser
	20 µl 10x Caspase Reaction buffer
	10 µl 1 mM Substrat in DMSO
Probe	140 µl Wasser
	20 µl 10x Caspase Reaction buffer
	10 µl 1 mM Substrat in DMSO
	30 µl Lysat
Eichreihe	170 µl Wasser
	20 µl 10x Caspase Reaction buffer
	10 µl AFC-Standard

Tabelle 37: Zusammensetzung des 10x Caspase Reaktionspuffer

	Endkonzentration	Reagenz
10x Caspase		
Reaktionspuffer	250 mM (1,512 g)	PIPES
	2,5% (500 mg)	CHAPS
	50 mM (292 mg)	EDTA
	ad 50 ml mit ddH ₂ O, pH 7,4	
	sterilfiltrieren und bei -20°C lagern	
Vor Gebrauch	50 mM DTT (770 mg/100 ml) zugeben	

3.1.20 In vitro CAD Aktivitätstest

Nach der Inkubation der Zellen werden die Zellkerne isoliert und zu $2 \cdot 10^8$ Kernen/ml in PBS bei -80°C gelagert.

Zum Aktivieren des DFF-Komplexes werden zehn Teile DFF-Komplex (1,8 mM) in DFF-Dialysepuffer (Tabelle 38) mit einem Teil Caspase 3 (0,2 mM) in DFF-Dialysepuffer für 30 min bei 37°C in einem 200 µl Reaktionsgefäß aktiviert. Entsprechend der gewünschten Endkonzentration des DFF-Komplexes im Reaktionsansatz wird der aktivierte Komplex bzw. der nicht aktivierte DFF-Komplex mit DFF-Dialysepuffer entsprechend verdünnt, so dass 1 µl DFF-Lösung für jeden Reaktionsansatz eingesetzt wird.

Im Anschluss wird je nach Probenanzahl ein Ansatz mit aktiviertem DFF-Komplex (DFF +) bzw. nicht aktiviertem Komplex (DFF -) mit 5x CAD Puffer (Tabelle 39), MgCl₂ und ddH₂O angesetzt (Tabelle 40).

Für die Versuche mit isolierten Zellkernen wird wie folgt vorgegangen:

20 µl Zellkernsuspension werden mit 10 µl des DFF-Ansatzes gemischt, kurz zentrifugiert und gevortext, so dass die Zellkerne sich nicht am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen. Der Reaktionsansatz wird nun für die entsprechende Zeit bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird dem Reaktionsansatz 20 µl TTE Puffer, 1 µl Proteinase K-Lösung (50 mg/ml) sowie 1 µl RNase A-Lösung (50 mg/ml) zugegeben und für 2 h bei 55°C inkubiert. Das Lysat wird zunächst mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und danach mit Chloroform/Isoamylalkohol

extrahiert. Das extrahierte Lysat wird am NanoDrop vermessen und die Proben werden mit TE Puffer auf den gleichen DNS-Gehalt verdünnt.

Für die Versuche mit isolierter DNS wird wie folgt vorgegangen:

10 µl DNS-Lösung (5 µg) in TE Puffer werden mit 5 µl 50 mM MgCl₂ sowie 5 µl ddH₂O gemischt. Der DNS-Lösung werden nun 10 µl des DFF-Ansatzes zugegeben und der Reaktionsansatz wird in Anwesenheit der jeweiligen Testsubstanzen für die entsprechende Zeit bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit werden den Proben 2 µl einer 200 mM EDTA-Lösung zugegeben um die CAD-Reaktion zu stoppen.

Tabelle 38: Zusammensetzung des DFF-Dialysepuffer

DFF Dialysepuffer	Endkonzentration	Reagenz
	20 mM (477 mg)	HEPES
	100 mM (584 mg)	NaCl
	1 mM (37 mg)	Na ₄ EDTA
	0,01 % (10 mg)	CHAPS
	10 % (10 ml)	Glycerin
	5 mM (77 mg)	DTT
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4; 4°C	

Tabelle 39: Zusammensetzung des 5x CAD Puffer

5x CAD Puffer	Endkonzentration	Reagenz
	100 mM (2,383 g)	HEPES
	500 mM (2,92 g)	NaCl
	10 mM (372 mg)	Na ₄ EDTA
	0,05 % (50 mg)	CHAPS
	50 % (50 ml)	Glycerin
	ad 100 ml mit ddH ₂ O; pH 7,4; 4°C	

Tabelle 40: Ansatz für *in vitro* CAD Aktivitätstest

Reagenz	Volumen	Volumen
	DFF -	DFF +
DFF-Komplex	1 µl	-
Aktivierter DFF-Komplex	-	1 µl
5x CAD Puffer	6 µl	6 µl
50 mM MgCl ₂	3 µl	3 µl

Zusätzlich zu den eigentlichen Proben wird jeweils ein Ansatz mit 300 ng pBSK-Plasmid bzw. pDrive-Plasmid mit nicht aktiviertem und mit aktiviertem DFF-Komplex mitgeführt, was als Kontrolle für die Aktivierung der CAD dient.

Jeweils 10 µl der Proben werden nun mit 5 µl 30% Glycerin-Lösung in Wasser gemischt. Alle Proben werden in einem 1,5% Agarosegel in TAE-Puffer mit 0,02 % Ethidiumbromid elektrophoretisch für 2 h bei 90 V getrennt und die DNS wird mit dem Eagle Eye II Geldokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.21 Messung der Proteinbiosynthese mittels Einbau von [4,5-³H]-L-Leucin

200 000 Hepatozyten je Napf werden in kollagenierten 24-Napfplatten ausgesät und für drei Stunden im Brutschrank anwachsen gelassen. Nach dem Anwachsen der Zellen wird das Medium gewechselt und die Inkubationssubstanzen zugegeben. Im Anschluss wird 1 µl [4,5-³H]-L-Leucin (1 µCi) (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) zu jedem Napf pipettiert und die Zellen für 24 h inkubiert.

Zu einem Napf wird erst im Anschluss an die Inkubation das markierte Leucin zugegeben. Diese Probe dient als Kontrolle für unspezifischen Einbau der Aminosäure und der erhaltene Wert bei der Szintillationszählung wird von den übrigen Proben abgezogen.

Jedem Napf werden im Anschluss an die Inkubation 100 µl 10% Triton X-100 in PBS zupipettiert und 30 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteine werden mit 200 µl 50% Trichloressigsäure gefällt. Nach 15 min auf Eis wird die Probe bei 10 000 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird zweimal mit je 500 µl

10% Trichloressigsäure gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 500 µl PBS resuspendiert.

100 µl der Suspension werden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus liquid scintillation cocktail (Roth, Karlsruhe)) gemischt und im Szintillationszähler (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) für 2 min vermessen.

Zusätzlich wird der Proteingehalt der Proben nach Bradford bestimmt und die cpm-Werte werden auf den Proteingehalt normiert.

3.1.22 Bestimmung der Aktivität der humanen Topoisomerase II α

Es wird das Topoisomerase II α Assay Kit der Firma Vaxxon benutzt, um den Einfluss von OTA und TCDD auf die Aktivität rekombinanter Topoisomerase II α zu bestimmen.

Alle Schritte werden, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Zunächst wird ein Master Mix für $x + 1$ Reaktionen von jeweils 10 µl angesetzt (Tabelle 41) und gevortext.

6 µl des Gemisches werden jeweils auf 200 µl Reaktionsgefäße verteilt und 3 µl der Substanzlösungen dazugegeben. Getestet werden OTA in Konzentrationen von 0,5 bis 50 µM und TCDD in Konzentrationen von 10^{-12} bis 10^{-8} M. Die Substanzen sind in DMSO gelöst und mit Wasser verdünnt, so dass die Endkonzentration an DMSO im Reaktionsansatz 0,5% beträgt. Den Ansätzen wird nun 1 U (1 µl) Topoisomerase II α zugegeben und für 15 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss werden jeweils 1 µl Proteinase K-Lösung und SDS-Lösung zugeben um die Reaktion zu stoppen. Nun werden die Proben für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Ladepuffer werden die Proben in einem 1% Agarosegel in Anwesenheit von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Topoisomere werden mit dem Eagle Eye II unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Als Positivkontrolle dient ein Reaktionsansatz ohne Testsubstanz, als Negativkontrolle ein Reaktionsansatz, bei dem der Reaktionspuffer kein ATP enthält. Als Positivkontrolle für eine Topoisomerasehemmung dienen 100 µM Etoposid.

Tabelle 41: Zusammensetzung des Master Mixes für den Topoisomerase II α Assay Kit

Master Mix	Menge	Reagenz
	1 x (x+1) μ l	10 x Reaction Buffer
	1 x (x+1) μ l	BSA Lösung
	1 x (x+1) μ l	Kinetoplast DNS Lösung
	3 x (x+1) μ l	ddH ₂ O

3.2 Arbeiten mit humanen Hepatomzellen Huh-7

Alle Chemikalien und Reagenzien werden von Sigma (Sydney, Australien), alle Verbrauchsmaterialien von Greiner (West Heidelberg, Australien), und alle Medien und Zusätze für die Zellkultur werden von Invitrogen (Mount Waverly, Australien) bezogen, sofern nicht anders angegeben.

Huh-7-Zellen besitzen einen funktionsfähigen AhR. Nach Exposition gegenüber TCDD wird die Expression von CYP1A1 in diesen Zellen stark induziert (Gouedard et al., 2004; Matthews et al., 2005; Anderson et al., 2006).

3.2.1 Kultur der humanen Hepatomzelllinie Huh-7

Kryokonservierte Huh-7-Zellen werden schnell aufgetaut und in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 15 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FKS und 1% Antibiotika-Lösung überführt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Im weiteren Verlauf wird das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt und die Zellen werden bei einer Konfluenz von 70-80% passagiert.

Zum Passagieren der Zellen wird das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml Trypsin-Lösung gewaschen. Die Lösung wird abgesaugt und es werden erneut 2 ml Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Im Anschluss werden die Zellen für 5 min im Brutschrank inkubiert, um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen. Dann wird 10 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben und die Zellen vom Flaschenboden gespült und suspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypan Blau-Lösung gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es werden vier große Quadrate, bestehend aus jeweils 16 kleinen Quadraten, ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Dieser Wert wird mit $2 \cdot 10^4$ multipliziert und ergibt die Zellzahl je ml.

Für die UV-Bestrahlung der Huh-7-Zellen wird ein Ultraviolet Crosslinker von Amersham (Piscataway, NJ, USA) verwendet.

3.2.2 JC-1 Assay

Der kationische Carbocyanin-Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) sammelt sich in intakten Mitochondrien als rote Aggregate an. Wird das Potenzial der Mitochondrienmembran gestört, kann der Farbstoff nicht in den Mitochondrien akkumulieren sondern liegt als grün fluoreszierende Monomere im Zytoplasma vor.

Für das JC-1 Assay werden 7500 Zellen in 100 µl Medium je Napf in 96-Napfplatten ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die Zellen werden entsprechend behandelt und für weitere 24 h inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wird das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen werden für eine Stunde in 50 µl serumfreiem Medium mit 10 µg/ml JC-1 (Invitrogen, Mount Waverly, Australien) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wird abgesaugt und die Zellen werden daraufhin mit 200 µl 5% BSA in PBS für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Absaugen der Lösung werden 100 µl PBS pro well auf die Zellen geben und die Platte wird bei 485/520 nm für grün (apoptotische Zellen) und bei 544/590 nm für rot (intakte Zellen) an einem Fluoreszenzplattenreader Fluostar Optima (BMG Laboratories, Mornington, Australia) vermessen. Das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz wird als Endpunkt angegeben. Je niedriger dieser Wert ist, desto mehr Zellen sind geschädigt.

Als Positivkontrolle wird eine Lösung von 1 mM Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon (CCCP) (Invitrogen, Mount Waverly, Australien), einem Entkuppeler der mitochondrialen Oxidation, in JC-1 Färbelösung verwendet, die während der einstündigen JC-1 Färbung auf einer unbestrahlten Kontrolle verbleibt.

3.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung des DNS-Gehalts

Während der Apoptose wird die DNS fragmentiert und löst sich aus dem Chromatinverbund. Dies ist die Grundlage für die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate nach Anfärbung des Chromatins mit Propidiumiodid. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNS, was eine Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs bewirkt. Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst mit einem präzipitierenden Fixativ (Ethanol) behandelt. Die Fixierung und eine Permeabilisierung der Zellen im Zuge der Färbung bewirkt, dass niedermolekulare DNS, also solche Fragmente, wie sie bei der Apoptose entstehen, aus der Zelle freigesetzt werden. Hieraus resultieren Zellen, die einen niedrigeren DNS-Gehalt als normale G₁-Zellen aufweisen. Diese Zellen zeigen sich im Zytogramm als „sub-G₁-Peak“. Daneben lässt sich mit dieser Methode gleichzeitig die Verteilung der Zellen in die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus untersuchen (Darzynkiewicz et al., 1997).

Huh-7-Zellen werden zu 300 000 Zellen in 3 ml Medium pro Napf in 6-Napfplatten ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die Zellen werden entsprechend behandelt und für weitere 24 h inkubiert.

Das Inkubationsmedium wird abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wird der Zellrasen mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wird ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die adhärennten Zellen auf der Platte werden mit Trypsin abgelöst und in 1 ml PBS suspendiert. Die Zellsuspension wird zu den übrigen Zellen in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden nun für 5 min bei 400 g und 4°C zentrifugiert und zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wird der Überstand nicht vollständig abgenommen, es wird ein Rest über dem Zellpellet belassen. Die Zellen werden auf mittlerer Geschwindigkeit gevortext und es wird tropfenweise 1 ml eiskaltes 70% Ethanol in PBS zugegeben. Die Zellen werden nun mindestens über Nacht zum Fixieren im Ethanol bei 4°C gelagert.

Vor der Messung am Durchflusszytometer werden die Zellen 5 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen (jeweils bei 400 g zentrifugieren). Dann wird das Zellpellet in 250 µl PI-Färbepuffer (Tabelle 42) resuspendiert, es wird 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Messung erfolgt am BD FACS Canto II Durchflusszytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) mit einem Argonlaser bei 488 nm und es werden *forward scatter* (FSC), *side scatter* (SSC) und die Propidiumiodidfluoreszenz vermessen.

Die Analyse der Daten wird mit dem Programm FlowJo 7 von Tree Star (Ashland, OR, USA) vorgenommen.

Tabelle 42: Zusammensetzung des PI-Färbepuffer

PI-Färbepuffer	Einwaage	Reagenz
	30 mg	Natriumcitrat
	2,3 mg	Na-EDTA
	9 µl	Triton X-100
	1,5 mg	Propidiumiodid
	600 µl	FKS
	ad 30 ml mit ddH ₂ O	

3.2.4 Fluorimetrische Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3/7

Zur Bestimmung der Caspasen 3/7-Aktivität wird ein kommerziell erhältlicher Kit (EnzChek Caspase-3 Assay Kit, Invitrogen, Mount Waverly, Australien) mit Rhodamin 110 als Fluorophor verwendet.

Hierzu werden 7500 Zellen in 100 µl Medium je Napf in schwarzen 96-Napfplatten ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die Zellen werden entsprechend behandelt und für weitere 24 h inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation werden folgende Kit-Bestandteile zum Inkubationsmedium in jedem Napf zugegeben:

0,5 µl 5 M Z-DEVD-R110

6 µl 20x Lysis Puffer

0,5 µl 1 M DTT

25 µl 5x Reaktionspuffer

Daraufhin wird die Platte 30 min auf Eis inkubiert und danach weitere 30 min bei Raumtemperatur.

Die Platte wird in einem Fluoreszenzplattenreader Fluostar Optima bei 496/520 nm vermessen.

3.2.5 DNS-Fragmentierungs-Analyse – „DNA-laddering“

Die Isolierung genomischer DNS erfolgt mit dem Gentra Puregene DNA isolation kit von Qiagen (Doncaster, Australien).

Hierzu werden 1 500 000 Zellen in 8 ml Medium je 94 mm Zellkulturschale ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die Zellen werden entsprechend behandelt und für weitere 24 h inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation werden die Zellen mit einem Zellschaber zusammen mit dem Inkubationsmedium geerntet und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden für 5 min bei 4°C und 800 g zentrifugiert, in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wird das Zellpellet in 500 µl Cell Lysis Solution mit 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Zellen zu lysieren und die RNS im Lysat abzubauen. Zu dem nun klaren Lysat werden 150 µl Protein Precipitation Solution zugegeben und das Reaktionsgefäß wird zwanzigmal invertiert. Die ausgefallenen Proteine werden bei 4°C pelletiert. Hierzu wird zunächst 1 min bei 1000 g zentrifugiert, dann 1 min bei 5000 g und 5 min bei 14 000 g. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl Isopropanol durch Invertieren gemischt bis die DNS ausfällt. Diese wird 5 min bei 14 000 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird bei Raumtemperatur 5 min trocknen gelassen und in 30 µl DNA Hydration Solution gelöst.

Der DNS-Gehalt der Proben wird am NanoDrop vermessen, die Proben werden entsprechend verdünnt und mit einem Drittel des Volumens an 30% Glycerol als Ladepuffer vermischt.

Die DNS wird bei 100 V für ca. 2 h in einem 2% Agarosegel mit 0,01% SYBR Safe (Invitrogen, Mount Waverly, Australien) elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der

DNS erfolgt an der Kodak Image Station 4000MM bei einer Anregungswellenlänge von 465 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm.

3.3 Statistik

Es werden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte bestimmt. Unabhängige Versuche bedeutet bei den primären Hepatozyten, dass Zellen aus drei unterschiedlichen Tieren verwendet werden, bei den Huh-7-Zellen werden drei unabhängige Passagen der Zelllinie verwendet.

Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen zwischen einer Kontrollgruppe und mindestens zwei Behandlungen wird eine *one-way analysis of variance* (ANOVA) mit *Dunnett's post test* durchgeführt. Die *one-way* ANOVA wird zur Ermittlung statistischer Signifikanzen zwischen drei und mehr Gruppen eingesetzt, um Konzentrations-abhängige Effekte zu untersuchen. Der *Dunnett's post test* wird verwendet, um eine Kontrollgruppe mit mehreren behandelten Gruppen zu vergleichen.

Zwei Gruppen wurden mit Hilfe eines *one-tailed unpaired student's t-test* verglichen. Statistische Tests wurden mit der Software InStat 3 von GraphPad Software, Inc., San Diego, USA durchgeführt.

*, # bedeutet statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). **, ## bedeutet statistisch hochsignifikant ($p \leq 0,01$).

4. Ergebnisse

4.1 Primäre Hepatozyten

TCDD bewirkt eine Hemmung der durch genotoxische Stimuli induzierten Apoptose in Leberzellen der Ratte sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Dies wird als ein möglicher Mechanismus für die starke tumorpromovierende Wirkung dieser Substanz diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, über welche molekularen Mechanismen TCDD der Apoptose durch UVC-Bestrahlung, OTA oder CHX in primären Rattenhepatozyten entgegenwirkt.

4.1.1 Expression von Bcl-x_L und CYP1A1

Primäre Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten wurden für verschiedene Zeitdauern mit unterschiedlichen Konzentrationen an TCDD inkubiert. Es wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene untersucht, ob TCDD einen Einfluss auf die Expression des anti-apoptotischen Bcl-x_L besitzt. Um die Gehalte an mRNA in den Proben zu quantifizieren wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Es wurden die relativen Expressionen (*ratios*) der Gene *bcl-x_L* und *cyp1A1* im Vergleich zur der des *house keeping*-Gens β -actin ermittelt. Auf Protein-Ebene wurde der Gehalt an Bcl-x_L und CYP1A1 in den Proben mittels Western blot ermittelt. Als Ladungskontrolle diente α/β -Tubulin. In beiden Versuchen wurde die Expression von CYP1A1 als Kontrolle für eine Aktivierung des AhR durch TCDD untersucht.

Als Positiv-Kontrolle für eine Induktion von Bcl-x_L auf beiden Ebenen diente eine Inkubation mit 50 μ M Dexamethason (DEX), welches in Primärhepatozyten eine Induktion dieses Proteins bewirkte (Bailly-Maitre et al., 2001).

Die qRT-PCR-Experimente zeigten für die Expression von *bcl-x_L* keine Zeit- oder Konzentrations-abhängige Beeinflussung durch TCDD in Konzentrationen von 10^{-13} M bis 10^{-8} M TCDD (Abbildung 12A). Die Positivkontrolle mit 50 μ M DEX bewirkte eine Induktion der Expression von *bcl-x_L* auf etwa den doppelten Wert der DMSO-Kontrolle ab einer Inkubationsdauer von 18 h.

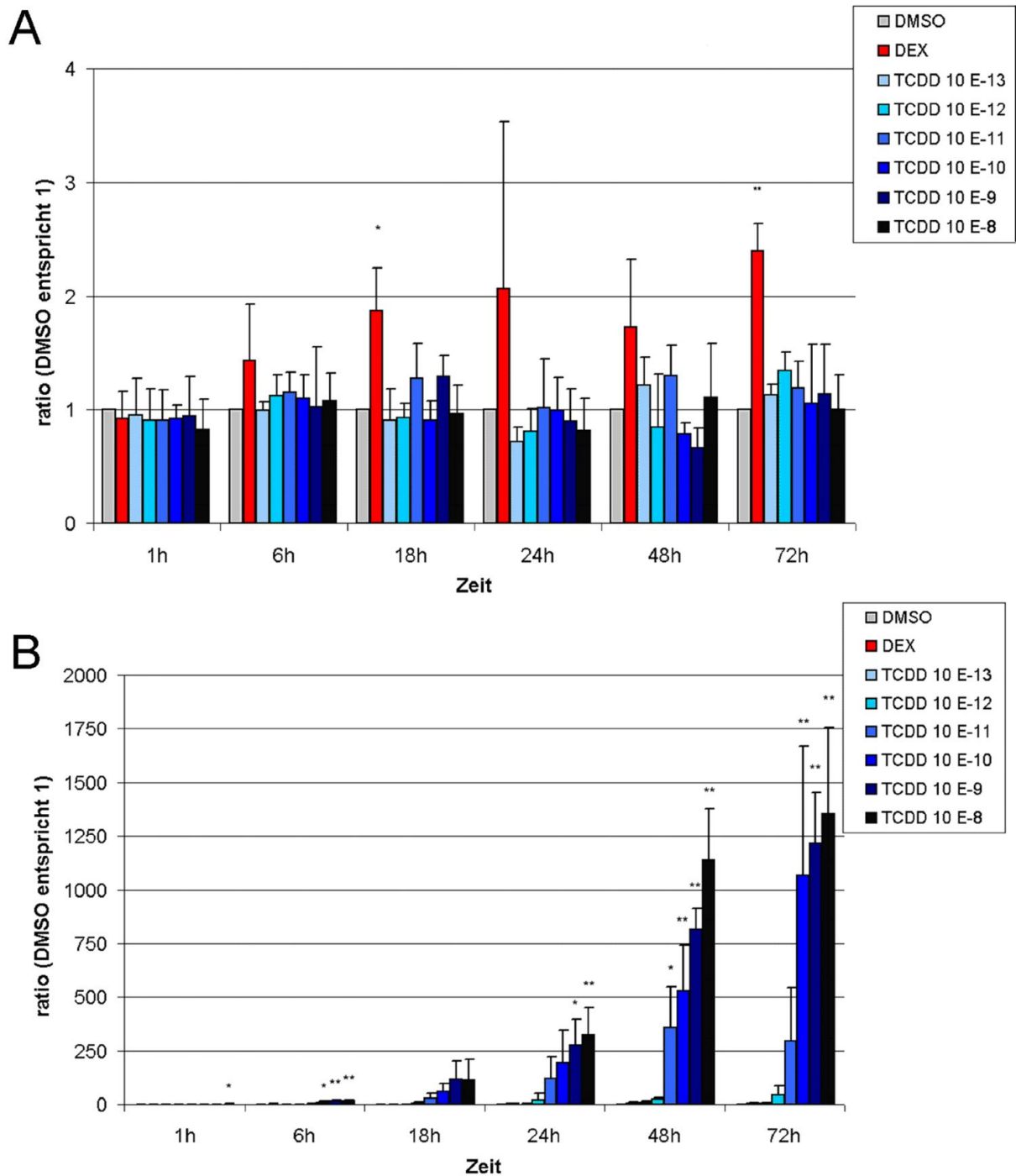


Abbildung 12: qRT-PCR *bcl-x_L* und *cyp1A1* (TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TCDD für unterschiedliche Zeitdauern inkubiert. 50 μ M DEX diente als Positivkontrolle für eine Induktion von *bcl-x_L*. n = 3. DMSO vs. TCDD: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. DMSO vs. DEX: *one-tailed unpaired student's t-test*, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. A: qRT-PCR *bcl-x_L*. B: qRT-PCR *cyp1A1*.

In den qRT-PCR-Experimenten wirkte TCDD stark induzierend auf die Expression von *cyp1A1* (Abbildung 12B). Eine Inkubation mit 10 nM TCDD für 1 h bewirkte einen statistisch signifikanten Anstieg der *cyp1A1*-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Nach 6 h wirkten Konzentrationen ab 10^{-10} M TCDD statistisch signifikant induzierend auf die *cyp1A1*-Expression. Insgesamt zeigte sich eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Induktion von *cyp1A1*, welche nach 72 h in den höchsten verwendeten Konzentrationen von TCDD *ratios* von über 1000 zeigte. Die niedrigste Konzentration, die einen statistisch signifikanten Effekt zur DMSO-Kontrolle zeigte, betrug 10^{-11} M TCDD über eine Inkubationsdauer von 48 h.

Die Western blot Experimente (Abbildung 13) zeigten keinen Zeit- oder Konzentrations-abhängigen Effekt durch TCDD auf den Gehalt an Bcl-x_L (etwa 30 kDa) in den Proben.

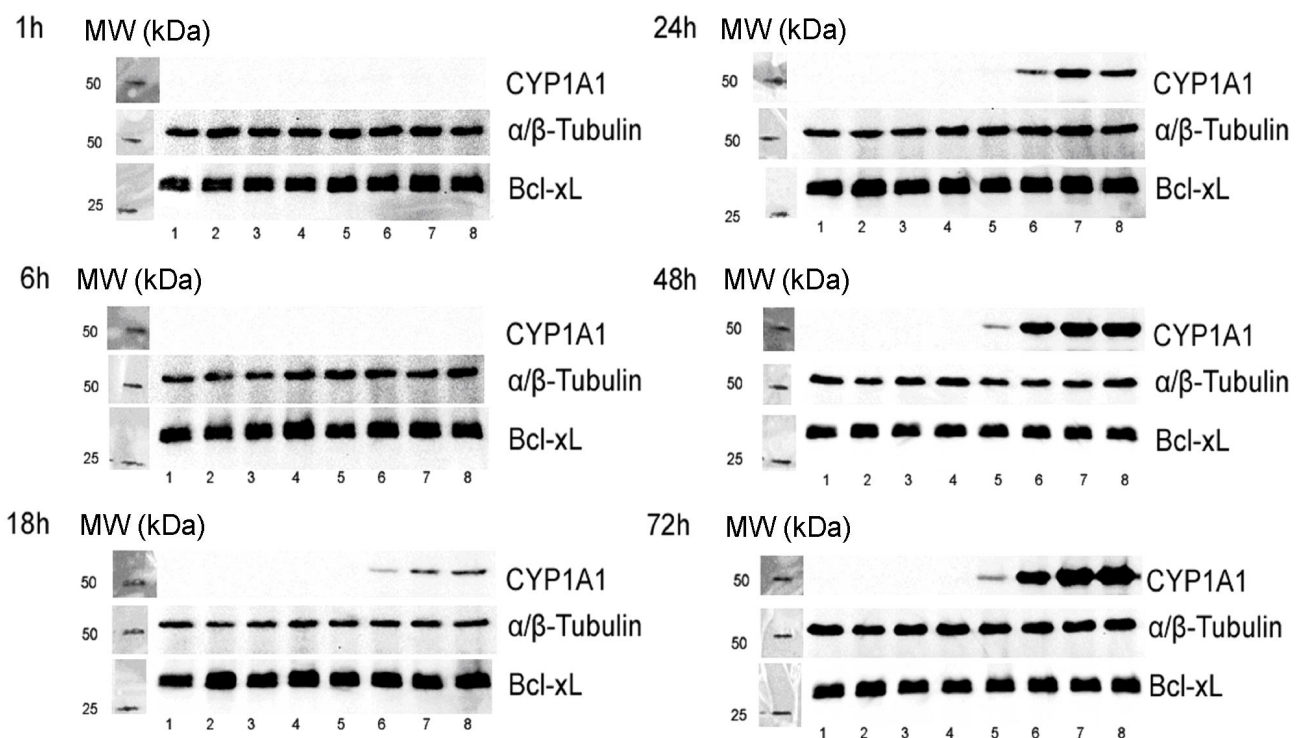


Abbildung 13: Western blot Bcl-x_L und CYP1A1 (TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TCDD für unterschiedliche Zeitdauern inkubiert. 50 μM DEX diente als Positivkontrolle für eine Induktion von Bcl-x_L. n = 3. Lanes: 1: DMSO, 2: Dexamethason 50 μM, 3: TCDD 10^{-13} M, 4: TCDD 10^{-12} M, 5: TCDD 10^{-11} M, 6: TCDD 10^{-10} M, 7: TCDD 10^{-9} M, 8: TCDD 10^{-8} M.

Die DEX-Inkubation zeigte eine Erhöhung der Bandenintensität für dieses Protein ab einer Inkubationsdauer von 18 h. Erwartungsgemäß zeigte die DMSO-Kontrolle für keinen Zeitpunkt eine Bande für CYP1A1. Dieses Protein wurde durch TCDD induziert. Ab einer Inkubationsdauer von 18 h ließen sich ab einer Konzentration von 10^{-10} M TCDD Banden für CYP1A1 (etwa 59 kD) erkennen. Ab einer Inkubationsdauer von 48 h zeigte auch die Inkubation mit 10^{-11} M TCDD einen induzierenden Effekt und damit deutliche Banden.

Die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 14) zeigte für die Menge an Bcl-x_L keine Konzentrations- oder Zeit-abhängigen Effekte durch TCDD (Abbildung 14A). Die DEX-Inkubation bewirkte erwartungsgemäß eine Zunahme an Bcl-x_L-Protein ab einer Inkubationsdauer von 18 h. Diese Zunahme war ab einer Inkubationsdauer von 24 h statistisch signifikant verschieden zur Kontrolle. Für die Expression von CYP1A1 zeigte die densitometrische Auswertung der Western blot-Experimente erwartungsgemäß eine Zeit- und Konzentrations-abhängige Induktion von CYP1A1 (Abbildung 14B). Ab einer Inkubationsdauer von 6 h bewirkten die höchsten verwendeten Konzentrationen von 10^{-9} und 10^{-8} M TCDD eine statistisch signifikante Zunahme an CYP1A1 im Vergleich zur Kontrolle. Weder Konzentrationen unterhalb von 10^{-11} M TCDD noch die Inkubation mit DEX bewirkten im Western blot statistisch signifikante Effekte auf die Expression von CYP1A1.

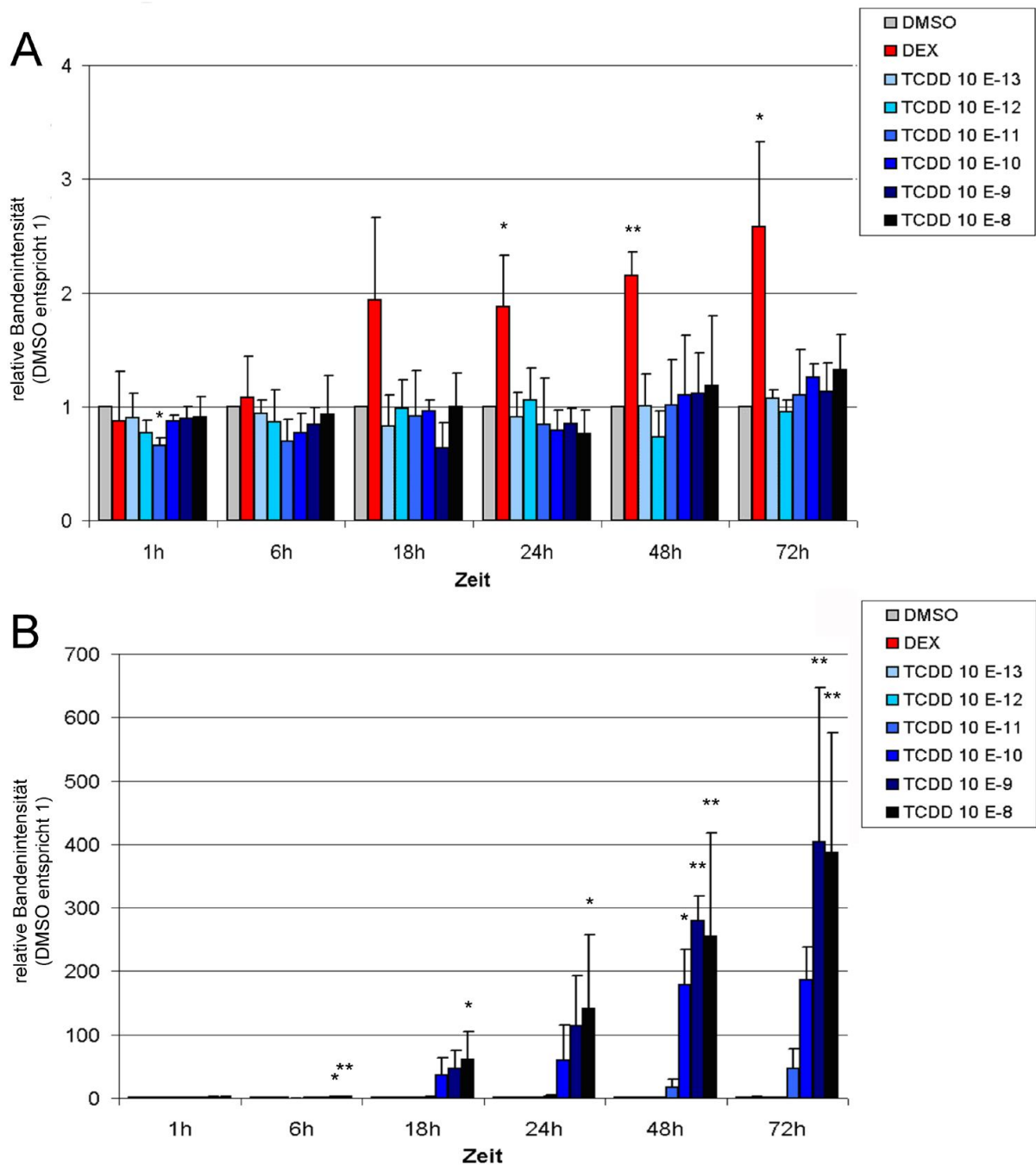


Abbildung 14: Densitometrische Auswertung Western blot Bcl-x_L und CYP1A1 (TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TCDD für unterschiedliche Zeitdauern inkubiert. 50 µM DEX diente als Positivkontrolle für eine Induktion von Bcl-x_L. n = 3. DMSO vs. TCDD: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. DMSO vs. DEX: *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. A: Bcl-x_L. B: CYP1A1.

4.1.2 Zytotoxizität

Mit Hilfe zweier Zytotoxizitätsassays wurde untersucht, in welchem Maße die drei pro-apoptotischen Stimuli UVC-Strahlung, OTA und CHX die Vitalität primärer Rattenhepatozyten beeinflussen und welchen Einfluss hierauf TCDD besitzt.

Die Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 und 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit oder ohne 1 nM TCDD inkubiert (Abbildung 15). Im Resazurin-Reduktionstest (Abbildung 15A) zeigten sich sowohl 1 nM TCDD als auch die Bestrahlung der Zellen mit der hohen UV-Dosis statistisch signifikant zytotoxisch im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei beiden UV-Dosen besaß TCDD keinen Einfluss auf die relative Vitalität der Zellen. Eine Inkubation mit 0,1% Saponin im Medium diente als Positivkontrolle für eine zytotoxische Wirkung. Im Trypan-Blau Test (Abbildung 15B) wirkte UVC-Bestrahlung Dosis-abhängig zytotoxisch und bei allen Behandlungen bewirkte die Koinkubation mit 1 nM TCDD eine zusätzliche, statistisch signifikante Abnahme der Vitalität.

Da TCDD im Trypan-Blau Test eine zusätzlich zytotoxische Wirkung zeigte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob dieser Effekt durch eine Hemmung des AhR mit Hilfe des AhR-Antagonisten CH-223191 beeinflusst wurde (Abbildung 16). Die Inkubation der Zellen mit 1 µM CH-223191 selbst bewirkte keine Abnahme der relativen Vitalität. Die statistisch signifikante Abnahme der Vitalität durch Koinkubation bestrahlter Zellen mit 1 nM TCDD wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit dem AhR-Antagonisten nicht beeinflusst.

OTA wirkte in beiden Testsystemen Konzentrations-abhängig zytotoxisch (Abbildung 17), im Resazurin-Reduktionstest (Abbildung 17A) in einer Konzentration von 10 µM statistisch signifikant zur Kontrolle und im Trypan-Blau Test (Abbildung 17B) ab einer Konzentration von 1 µM. Während 1 nM TCDD selbst in beiden Versuchen die relative Vitalität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikant verringerte, führten die Koinkubationen zusammen mit OTA zu keiner Änderung der Vitalität.

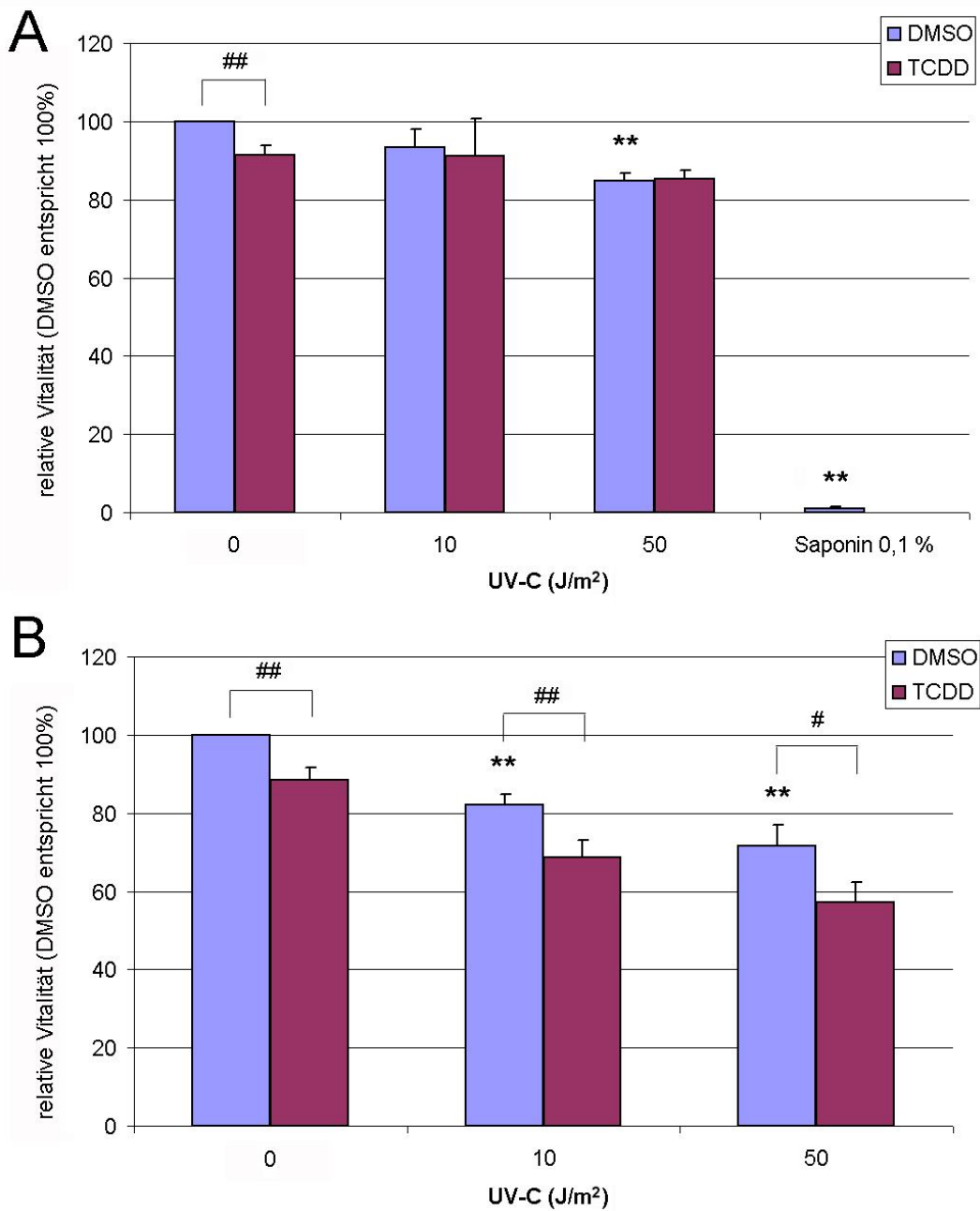


Abbildung 15: Zytotoxizität (UV und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und mit DMSO oder 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01. A: Resazurin-Reduktionstest. B: Trypan-Blau Test.

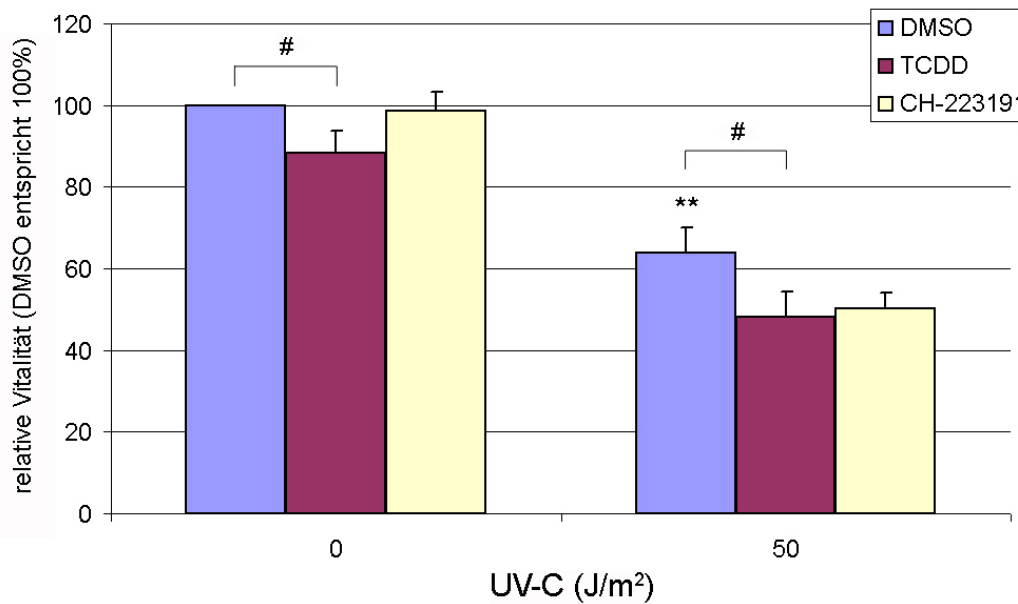


Abbildung 16: Zytotoxizität (UV, TCDD und CH-223191, Trypan-Blau Test). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und mit DMSO, 1 nM TCDD oder 1 µM CH-223191 für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05. In den unbestrahlten Zellen wurde nur CH-223191 alleine getestet, in den bestrahlten Zellen die Kombination aus CH-223191 mit TCDD.

Die Behandlung der Zellen mit CHX zeigte ein vergleichbares Ergebnis wie bei OTA (Abbildung 18). Es wirkte in beiden Versuchen Konzentrations-abhängig zytotoxisch, im Resazurin-Reduktionstest (Abbildung 18A) in einer Konzentration von 10 µg/ml statistisch signifikant zur Kontrolle, im Trypan-Blau Test (Abbildung 18B) ab einer Konzentration von 1 µg/ml. Während 1 nM TCDD alleine in beiden Versuchen die relative Vitalität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikant verringerte, führten die Koinkubationen zusammen mit CHX zu keiner Änderung der Vitalität.

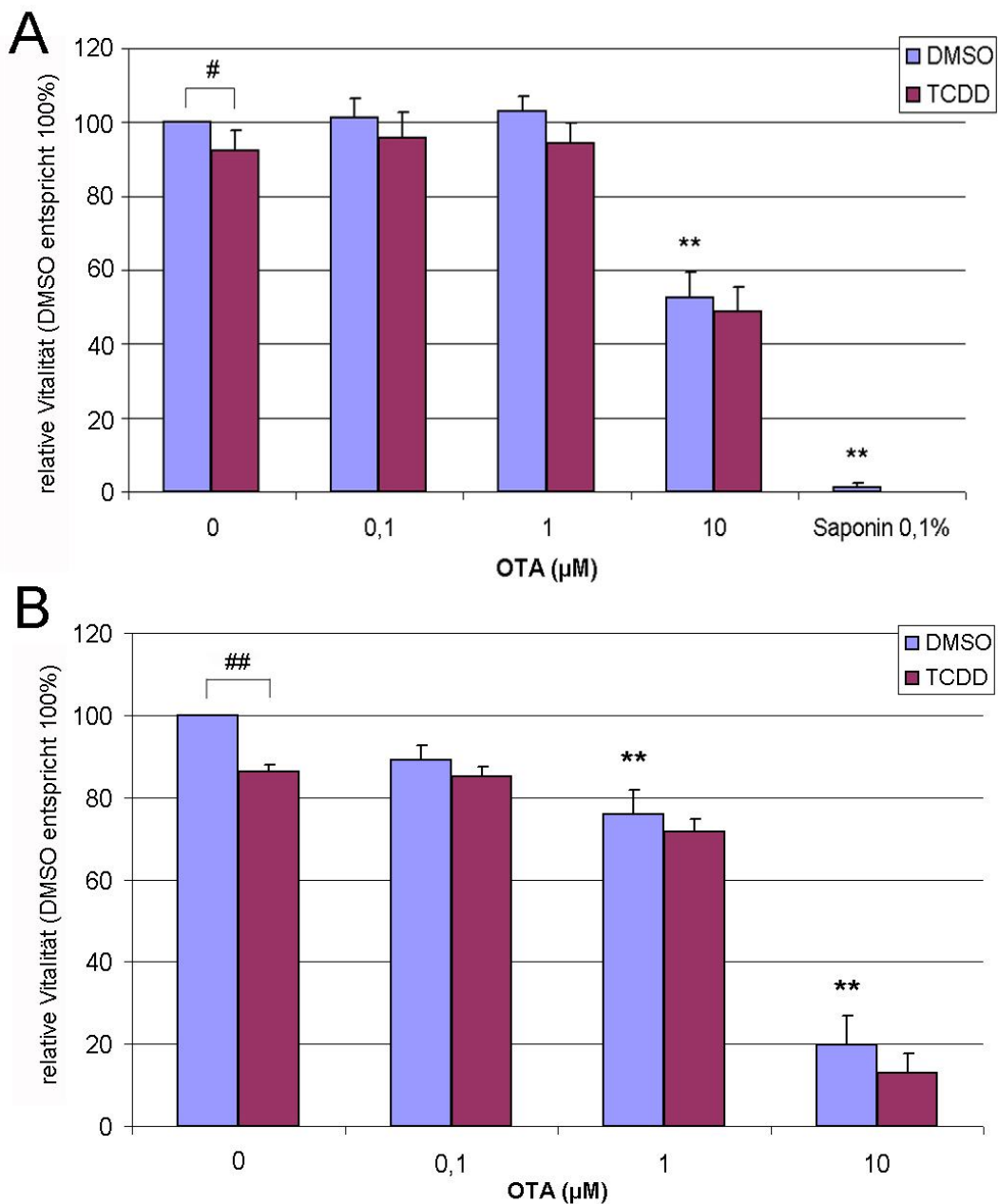


Abbildung 17: Zytotoxizität (OTA und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit OTA alleine oder in Anwesenheit von 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01. A: Resazurin-Reduktionstest. B: Trypan-Blau Test.

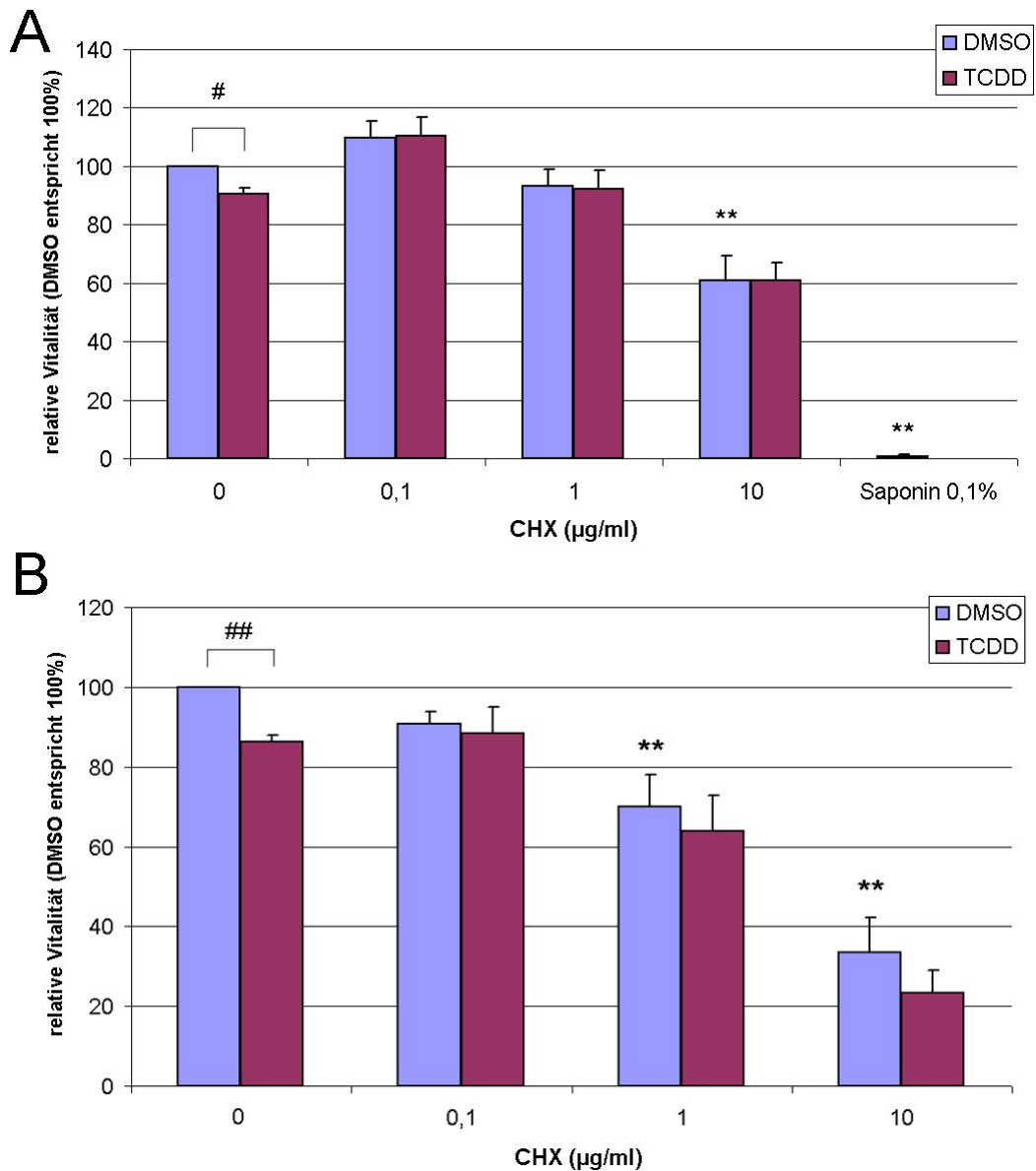


Abbildung 18: Zytotoxizität (CHX und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit CHX alleine oder in Anwesenheit von 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01. A: Resazurin-Reduktionstest. B: Trypan-Blau Test.

4.1.3 Nukleäre Apoptose

Während der Apoptose kommt es zur Aktivierung verschiedener Nukleasen, welche zunächst für eine Kondensation des Chromatins sorgen und in einem nächsten Schritt die genomische DNS spalten: zunächst in größere Fragmente im Bereich von 50-300 kbp, danach zwischen den Nukleosomen, was zur Bildung von mono- und oligonukleosomalen DNS-Fragmenten führt. Mononukleosomale Fragmente besitzen etwa eine Größe von 200 bp, oligonukleosomale entsprechend Vielfache (Samejima und Earnshaw, 2005).

Um das Ausmaß nukleärer Apoptose zu untersuchen, wurden zwei Versuche durchgeführt: zum Einen wurden DAPI-Färbeexperimente unternommen, um den Prozentsatz apoptotischer Zellkerne zu bestimmen. Kerne mit kondensiertem und fragmentiertem Chromatin wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt, um den Prozentsatz apoptotischer Zellkerne zu bestimmen. Als Apoptosen wurden gezählt: 1) stark kondensierte, 2) halbmond-förmige oder 3) fragmentierte Zellkerne. Als zweiter Versuch wurden DNS-Fragmentierungsanalysen durchgeführt. Wird die genomische DNS apoptotischer Zellen isoliert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt, so entsteht ein charakteristisches Bandenmuster, eine so genannte DNS-Leiter mit Banden in einem Abstand von jeweils etwa 200 bp, die Intensität der DNS-Fragmentierung spiegelt das Maß der Apoptose wieder.

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss TCDD auf die UVC-Licht induzierte Apoptose besitzt. Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Strahlung bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 1 nM TCDD inkubiert. In Abbildung 19 ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit DAPI angefärbten, unbehandelten Zellen dargestellt. Die Zellkerne weisen eine runde bis elliptische Form auf und es lassen sich Eu- und Heterochromatin erkennen. Abbildung 20 zeigt beispielhaft einen apoptotischen Zellkern (weißer Pfeil), wie er in den durchgeführten Experimenten auftrat, im Vergleich zu weiteren, normal gestalteten Kernen.

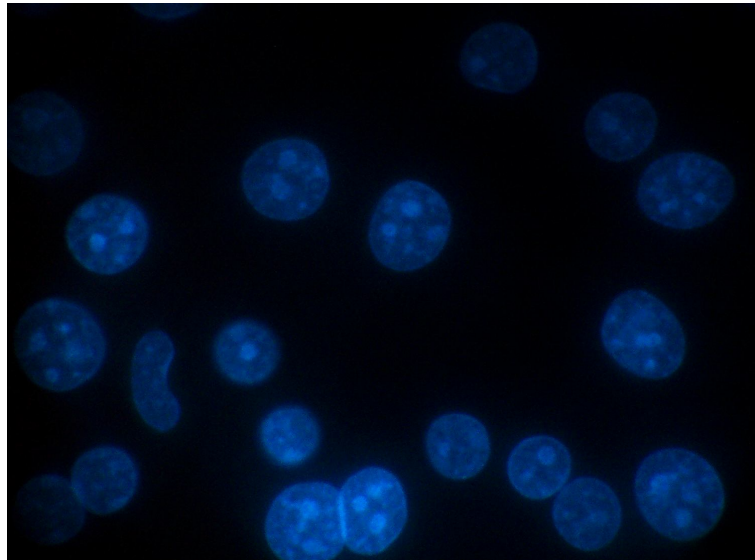


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme DAPI-angefärbter Kerne unbehandelter Zellen. (400x)

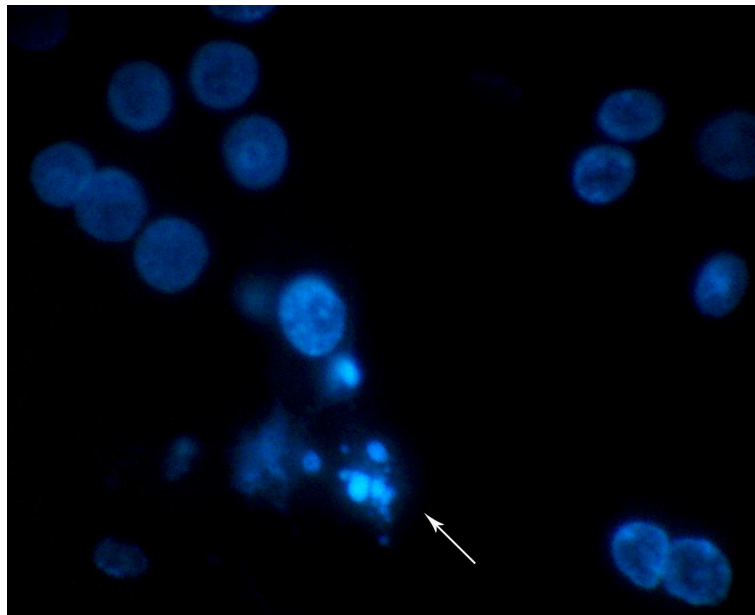


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme DAPI-angefärbter Zellkerne nach UV-Bestrahlung. Der weiße Pfeil zeigt einen apoptotischen Kern. (400x)

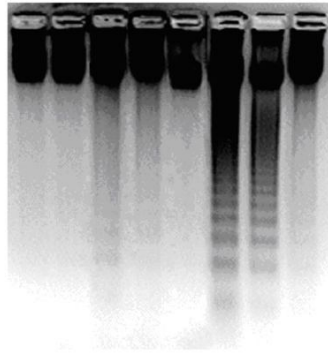
Die UVC-Bestrahlung löste in den primären Rattenhepatozyten Apoptosen aus (Abbildung 21). Die basale Apoptoserate lag in diesen Zellen zwischen 1 und 2%, die UVC-Bestrahlung bewirkte eine Dosis-abhängige Apoptose-Induktion (Abbildung 21B). Die Inkubation der Zellen mit 1 nM TCDD für 24 h bewirkte keine Änderung der Anzahl apoptotischer Zellkerne, die Inkubation der Zellen für 24 h im Anschluss an eine Bestrahlung mit UVC-Licht senkte den *apoptotic index* für beide UV-Dosen um etwa 30% im Vergleich zur Bestrahlung alleine. Um zu untersuchen, ob die UVC-induzierte Apoptose über einen Caspasen-abhängigen Mechanismus verläuft, wurden die Hepatozyten nach UV-Bestrahlung mit 25 μM des

pan-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass zVAD-fmk alleine keine Apoptose in den Zellen auslöste. Die Inkubation der Zellen mit dem Caspasen-Inhibitor nach UV-Bestrahlung reduzierte den *apoptotic index* auf das basale Niveau. Die Koinkubation mit TCDD führte zu keiner weiteren Reduktion der Apoptoserate (Daten nicht gezeigt).

Für die DNS-Fragmentierungsexperimente wurden 5 µg isolierte DNS in einem Agarose-Gel in Anwesenheit von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. In Abbildung 21A ist ein exemplarisches Agarose-Gel abgebildet. Es zeigte sich, dass weder die Behandlung mit DMSO noch mit 1 nM TCDD nach 24-stündiger Inkubation in diesen Zellen zu einer detektierbaren DNS-Fragmentierung führten. Die Bestrahlung der Zellen mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m² bewirkte eine schwache internukleosomale Fragmentierung der DNS, welche teilweise durch TCDD gehemmt wurde. Durch die Inkubation der bestrahlten Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor wurde der Effekt der Fragmentierung vollkommen aufgehoben. Durch die hohe UV-Dosis kam es zu einer stärkeren Fragmentierung, die durch TCDD teilweise, und durch zVAD-fmk komplett inhibiert wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob TCDD die Apoptose auch hemmt, wenn es vor der Bestrahlung der Zellen mit UVC-Licht dem Kulturmedium zugegeben wird. Hierzu wurden Primärhepatozyten zunächst mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert, vor der Bestrahlung wurde das TCDD-haltige Kulturmedium gegen TCDD-freies Medium ausgetauscht und die Zellen wurden erneut für 24 h inkubiert. Abbildung 22 zeigt, dass TCDD die Apoptose auch hemmte, wenn die Zellen mit TCDD vorinkubiert wurden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl auf Ebene der DNS-Fragmentierung (Abbildung 22A), als auch im DAPI-Färbexperiment (Abbildung 22B). Die Inkubation der Zellen mit TCDD für 24 h vor und 24 h nach der Bestrahlung bewirkte keine weitere Reduktion der Apoptose.

A



UV (J/m ²)	0	10	50
TCDD (1 nM)	- + - + - - + -		
zVAD-fmk (25 μM)	- - - - + - - +		

B

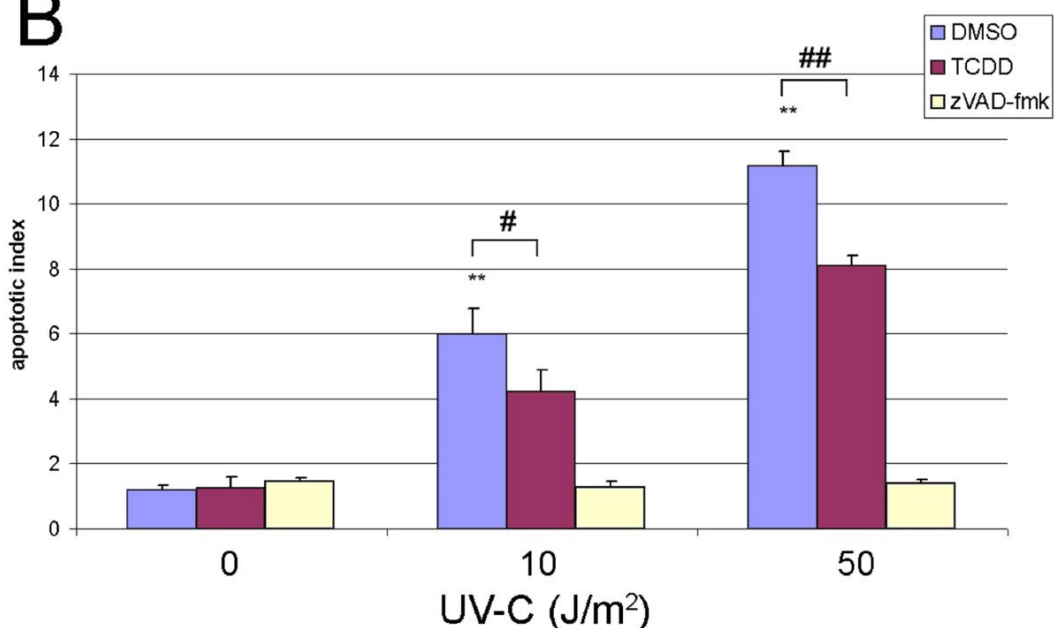


Abbildung 21: Nukleäre Apoptose (UV, TCDD und zVAD-fmk). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und mit DMSO, 1 nM TCDD oder 25 μM zVAD-fmk für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05, ## ≤ 0,01. A: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse. B: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*.

Um zu untersuchen, ob OTA Apoptose auslöst, und welchen Einfluss hierauf TCDD besitzt, wurden primäre Hepatozyten mit OTA in Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM alleine oder zusammen mit 1 nM TCDD für 24 h behandelt (Abbildung 23).

OTA bewirkte ab einer Konzentration von 1 μM eine leichte, statistisch nicht signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 23B). In höheren Konzentrationen war die Apoptoserate statistisch signifikant (5 μM) bzw. statistisch hochsignifikant (10 μM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

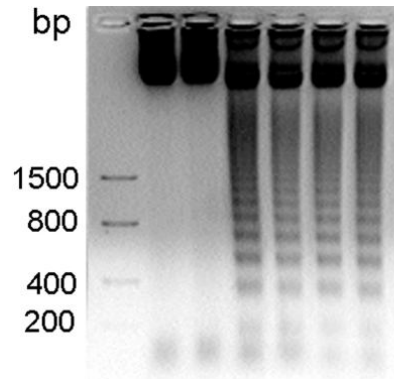
Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 1 nM TCDD beeinflusste die Anzahl apoptotischer Zellkerne für keine der OTA-Behandlungen statistisch signifikant. Bei den DNS-Fragmentierungsversuchen mit OTA und TCDD (Abbildung 23A) zeigte sich, dass OTA in einer Konzentration von 10 μ M zu einer sichtbaren DNS-Fragmentierung führte. Alle übrigen OTA-Konzentrationen bewirkten keine DNS-Leiter-Bildung. TCDD hatte keinen Einfluss auf die DNS-Fragmentierung durch OTA. Im nächsten Schritt wurden primäre Hepatozyten mit CHX behandelt (Abbildung 24). CHX alleine löste in Konzentrationen von 1 μ g/ml und 10 μ g/ml Apoptose in primären Rattenhepatozyten aus, während eine Konzentration von 0,1 μ g/ml CHX den *apoptotic index* im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusste (Abbildung 24B). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit TCDD beeinflusste die Apoptoserate bei keiner der CHX-Konzentrationen.

Durch CHX kam es ab einer Konzentration von 0,1 μ g/ml zur Ausbildung einer schwachen DNS-Leiter (Abbildung 24A). Dieses Phänomen wurde intensiver bei steigenden CHX-Konzentrationen. TCDD besaß in diesem Versuch keinen Einfluss auf die DNS-Leiter-Formierung durch CHX.

Auch wurde untersucht, ob die OTA- und CHX-induzierte Apoptose durch Koinkubation mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmbar, und damit Caspasen-abhängig war (Abbildung 25). Sowohl die UV-Bestrahlung, als auch die Behandlungen der Zellen mit 10 μ M OTA und 10 μ g/ml CHX lösten Apoptosen aus, jeweils mit einem *apoptotic index* von etwa 12%.

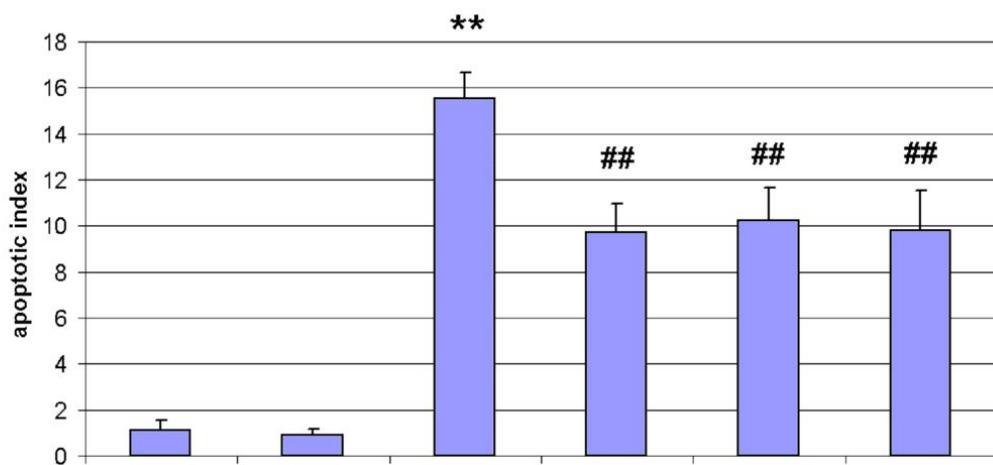
Die UVC-Licht induzierte Apoptose war durch die Koinkubation mit dem Caspasen-Inhibitor vollständig hemmbar, während bei Caspasen-Hemmung bei der OTA-induzierten Apoptose eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch hochsignifikant erhöhte Apoptose-Rate bestehen blieb. Die CHX-induzierte Apoptose wurde durch eine Hemmung der Caspasen-Aktivität nicht beeinflusst.

A



1 nM TCDD 1st 24 h	-	+	-	-	+	+
UV (50 J/m ²)	-	-	+	+	+	+
1 nM TCDD 2nd 24h	-	+	-	+	-	+

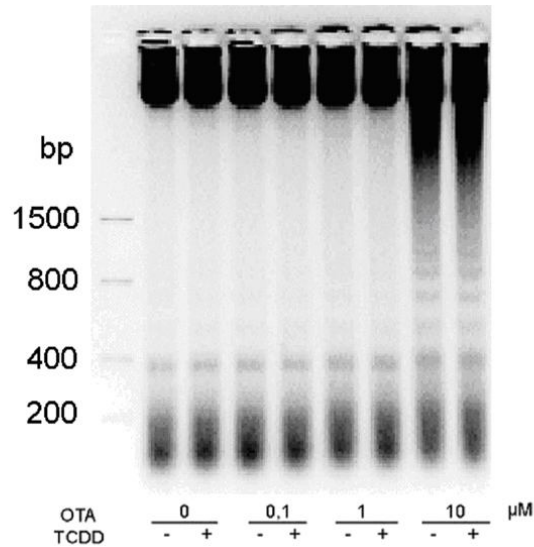
B



1 nM TCDD 1st 24 h	-	+	-	-	-	+
UV (50 J/m ²)	-	-	+	+	+	+
1 nM TCDD 2nd 24h	-	+	-	+	-	+

Abbildung 22: Nukleäre Apoptose (UV und TCDD, 24 h/24 h). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit 1 nM TCDD für jeweils 24 h vor bzw. nach der Bestrahlung der Zellen inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ** ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD, *one-tailed unpaired student's t-test*, ## ≤ 0,01. A: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse. B: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*.

A



B

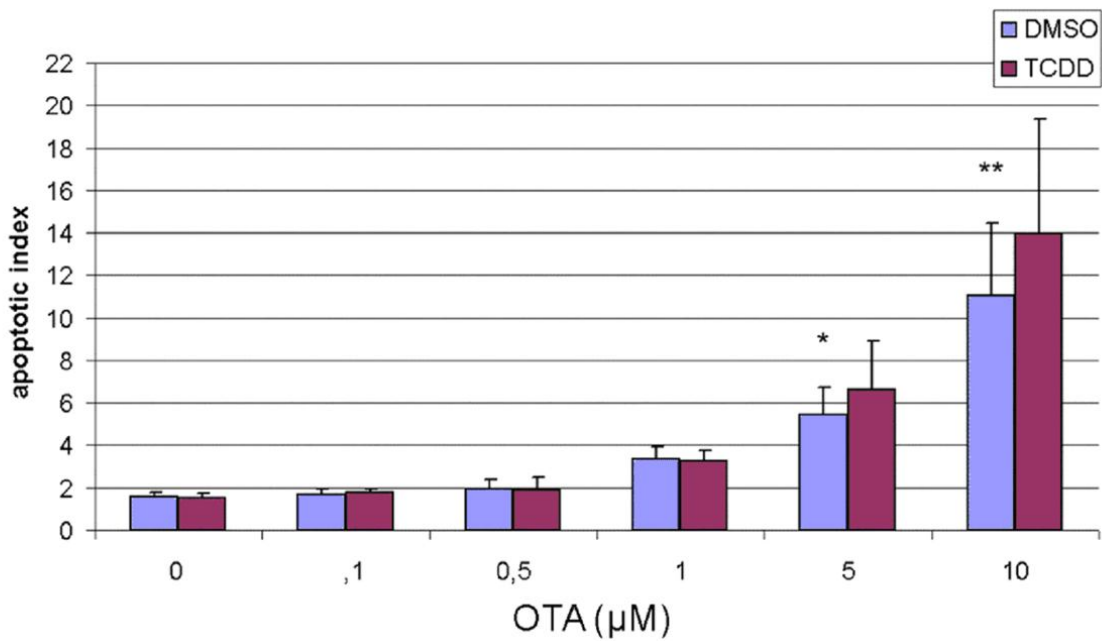
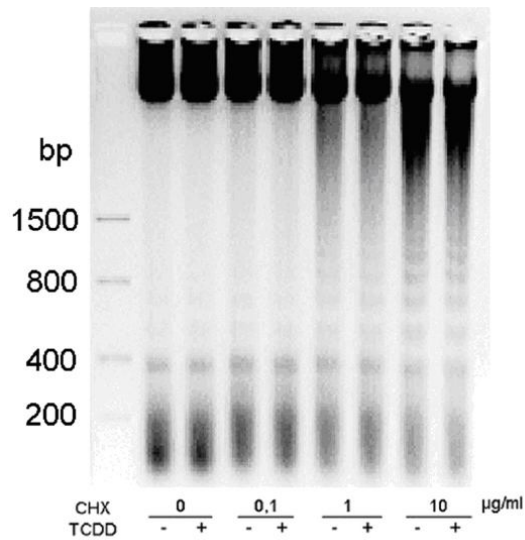


Abbildung 23: Nukleäre Apoptose (OTA und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit OTA alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$. A: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse. B: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*.

A



B

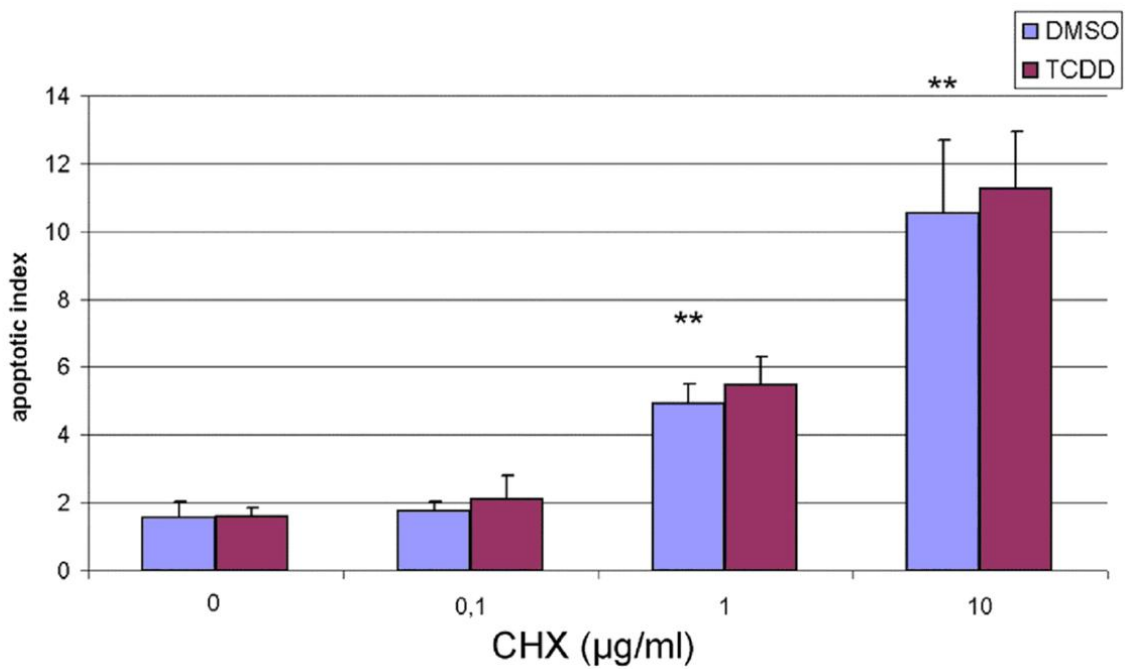


Abbildung 24: Nukleäre Apoptose (CHX und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit CHX alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, $** \leq 0,01$. A: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse. B: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*.

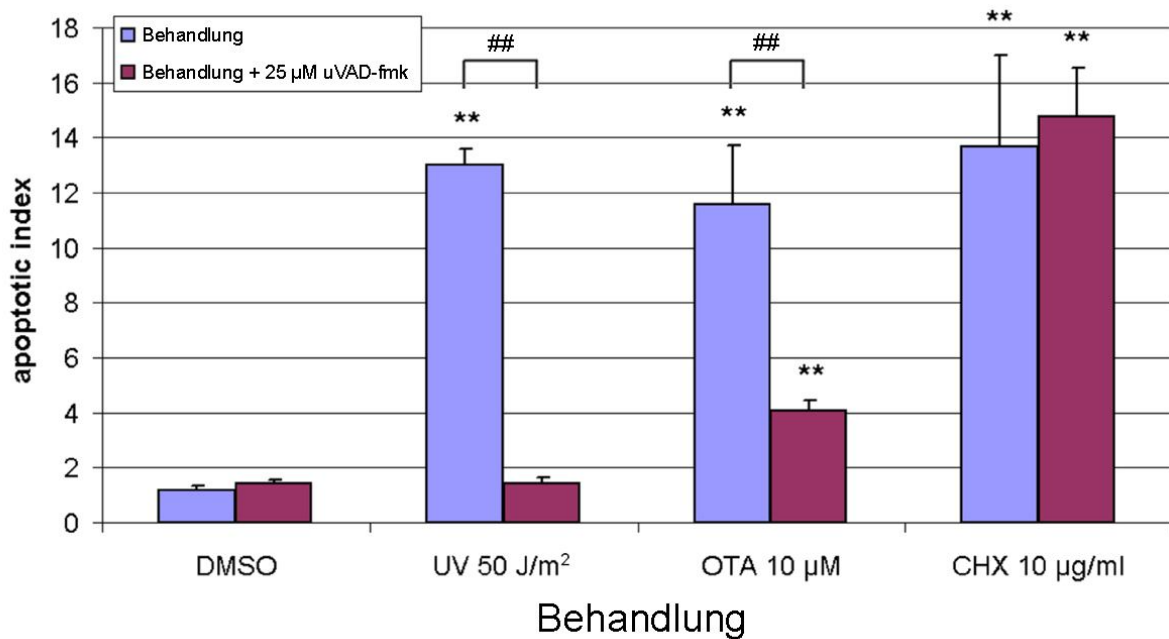


Abbildung 25: DAPI-Färbeexperimente (UV, OTA, CHX und TCDD, Caspasen-Abhängigkeit). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit den apoptotischen Stimuli UVC-Strahlung, OTA und CHX alleine oder in Kombination mit 25 µM zVAD-fmk für 24 h inkubiert. n = 3. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*. DMSO vs. Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + zVAD-fmk, *one-tailed unpaired student's t-test*, ## p ≤ 0,01.

4.1.4 Beteiligung des AhR an der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD

Um der Frage nachzugehen, ob der AhR an der Hemmung der Apoptose durch TCDD beteiligt ist, wurden Untersuchungen mit den beiden AhR-Antagonisten α -Naphthoflavon und CH-223191 (Kim et al., 2006a) durchgeführt. Um die Hemmung der Aktivierung des AhR zu überprüfen, wurden zusätzlich Western blot Experimente gegen CYP1A1 durchgeführt (Abbildung 26). Die Zellen wurden in allen Experimenten zunächst 3 h mit den jeweiligen Antagonisten vorinkubiert und im Anschluss für weitere 24 h alleine oder zusammen mit TCDD inkubiert.

Erwartungsgemäß zeigte sich für die Inkubation mit DMSO keine immunoreaktive Bande für CYP1A1. TCDD induzierte die Expression von CYP1A1 und auch die Behandlung der Zellen mit 10 µM α -Naphthoflavon führte zu einer leichten Erhöhung der Proteinmenge. Die Koinkubation von TCDD mit α -Naphthoflavon bewirkte eine Hemmung der Expression von CYP1A1 im Vergleich zur alleinigen TCDD-Inkubation. Der Inhibitor CH-223191 bewirkte in einer Konzentration von 1 µM alleine keine erhöhte Expression von CYP1A1, die Koinkubation mit TCDD führte zu einer Hemmung der Expression im Vergleich zu TCDD alleine.

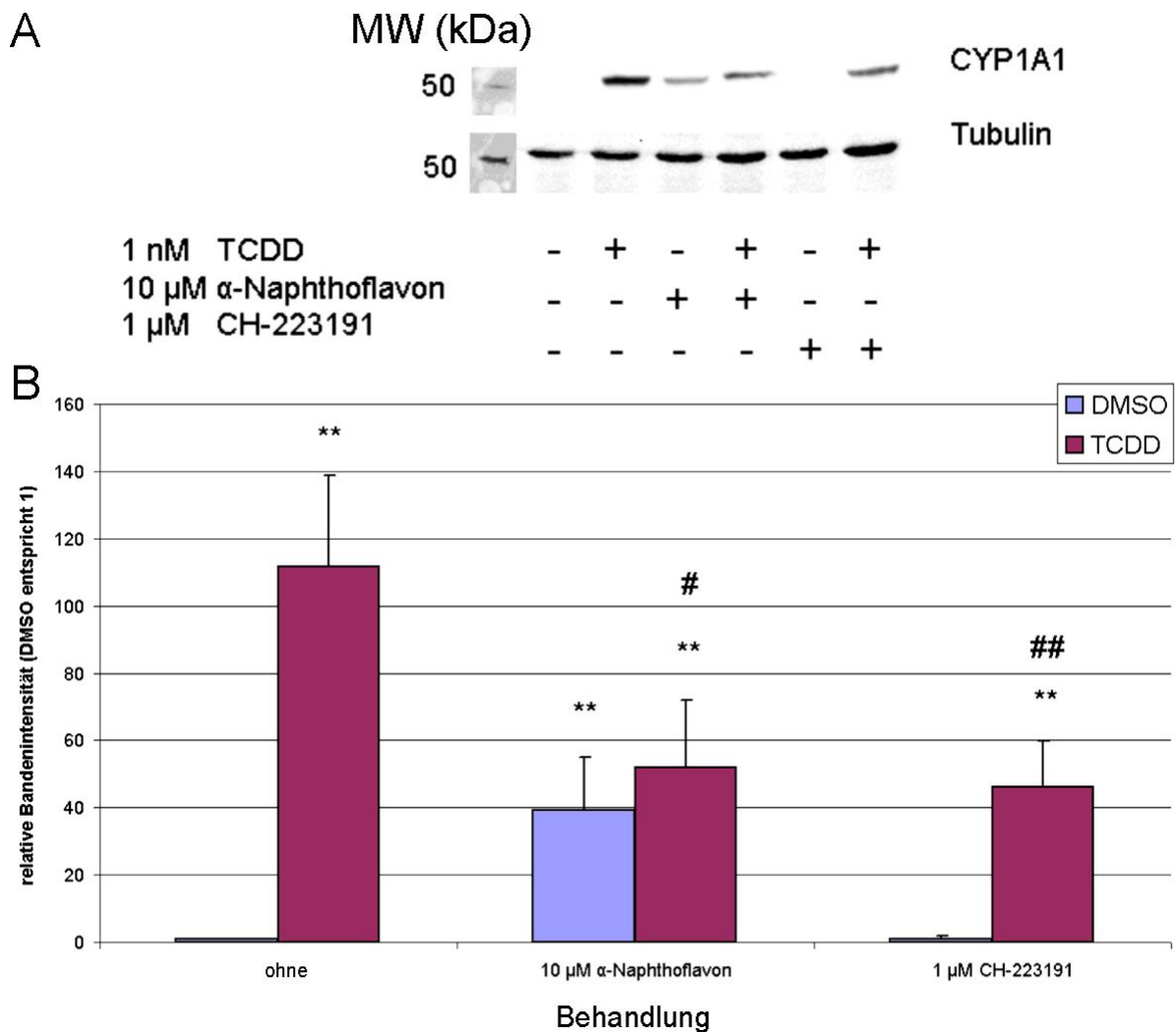


Abbildung 26: Western blot CYP1A1 (TCDD und AhR-Antagonisten). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit DMSO oder 1 nM TCDD in Kombination mit 10 μ M α -Naphthoflavon oder 1 μ M CH-223191 für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p \leq 0,01. TCDD vs. TCDD mit AhR-Antagonisten: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p \leq 0,05; ## p \leq 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung CYP1A1.

Die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 26B) spiegelt die Ergebnisse wieder. TCDD bewirkte eine mehr als hundertfache Erhöhung der Proteinmenge für CYP1A1 verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Auch α -Naphthoflavon induzierte die CYP1A1-Expression statistisch hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl α -Naphthoflavon als auch CH-223191 hemmten die TCDD-vermittelte CYP1A1-Expression statistisch signifikant im Vergleich zur TCDD-Inkubation.

Mit den Behandlungen wurden nun DAPI-Färbeexperimente und DNS-Fragmentierungsexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob der hemmende Effekt auf die Apoptose durch TCDD AhR-abhängig ist (Abbildung 27). In Abbildung 27A sind die Ergebnisse der DAPI-Färbeexperimente dargestellt. Die Inkubation bestrahlter Zellen mit TCDD bewirkte eine statistisch hochsignifikante Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zur Behandlung ohne TCDD. Die Inkubation bestrahlter Zellen mit α -Naphthoflavin verringerte die Apoptoserate leicht, so dass der Unterschied zur Koinkubation bestrahlter Zellen mit TCDD und dem Inhibitor nicht mehr statistisch signifikant war. Die Koinkubation bestrahlter Zellen mit TCDD und CH-223191 bewirkte, dass sich die Apoptoserate im Vergleich zur Inkubation bestrahlter Zellen alleine nicht statistisch signifikant unterschied. Der Effekt durch TCDD wurde aufgehoben.

Analog zu den DAPI-Färbeexperimenten zeigte sich auch bei der internukleosomalen DNS-Fragmentierung, dass der hemmende Effekt von TCDD durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit CH-223191 aufgehoben wurde, während der AhR-Inhibitor selber keine DNS-Fragmentierung verursachte (Abbildung 27B).

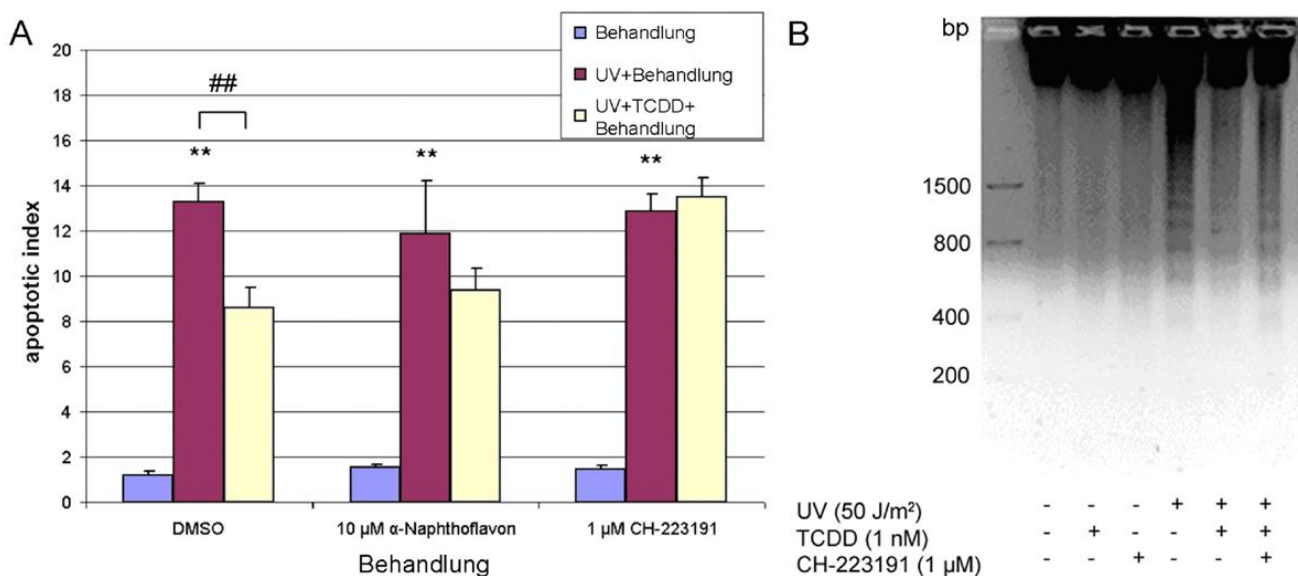


Abbildung 27: Nukleäre Apoptose (UV, TCDD und AhR-Antagonisten). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht (50 J/m²) bestrahlt und mit DMSO oder 1 nM TCDD in Kombination mit 10 µM α -Naphthoflavin oder 1 µM CH-223191 für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV + Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ** $\leq 0,01$; UV + Behandlung vs. UV + TCDD + Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ## $\leq 0,01$. A: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*. B: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse UV, TCDD und CH-223191.

4.1.5 p53-Proteinmenge

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine eminente Rolle im Schutz der Zellen vor DNS-Schäden und in der Apoptose (Oren et al., 2002; Haupt et al., 2003; Olsson et al., 2007). In verschiedenen Studien ist gezeigt worden, dass TCDD in Leberzellen der Ratte den Anstieg an p53-Protein als Antwort auf genotoxische Behandlungen unterdrückt (Wörner und Schrenk, 1998; Pääjärvi et al., 2005).

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Strahlung (10 bis 200 J/m²) bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 1 nM TCDD inkubiert. Mikroskopische Aufnahmen der Zellen zeigten, dass für die beiden hohen UV-Dosen von 100 und 200 J/m² nahezu keine intakten Zellen mehr vorzufinden waren (Abbildung 28). Die mit TCDD behandelten Zellen sahen mikroskopisch nicht anders aus als die jeweiligen DMSO-Kontrollen.

Für die Proben wurden im Anschluss Western blot Experimente gegen p53 und CYP1A1 durchgeführt (Abbildung 29). Die Detektion von VDAC1 diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen. In Abbildung 29A ist für p53 zu erkennen, dass TCDD alleine einen leichten, statistisch nicht signifikanten Anstieg der p53-Proteinmenge bewirkte. Ab einer UVC-Dosis von 50 J/m² kam zu einer Induktion der Proteinmenge. In den beiden höheren Dosen wurde der hier stärker ausgeprägte Anstieg an p53-Protein durch TCDD teilweise unterdrückt. Auch die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 29B) zeigte diesen hemmenden Effekt, der bei den beiden UVC-Dosen von 100 und 200 J/m² statistisch signifikant im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung war. Der Western blot für CYP1A1 (Abbildung 29A) zeigte erwartungsgemäß eine starke Induktion für die Behandlungen mit TCDD alleine sowie in Kombination mit 10 J/m² UVC. In höheren UV-Dosen kam es zunächst zu einem Abfall der CYP1A1-Induktion. Bei der höchsten Strahlendosis war keine immunoreaktive Bande für CYP1A1 zu erkennen.

Die densitometrische Auswertung (Abbildung 30) ergab, dass ab einer UVC-Dosis von 100 J/m² die CYP1A1-Menge im Vergleich zur Behandlung mit TCDD alleine ohne Bestrahlung statistisch signifikant verringert war. Für die höchste Strahlendosis gab es keinen statistischen Unterschied mehr zwischen der alleinigen Bestrahlung und der respektiven Bestrahlung mit TCDD.

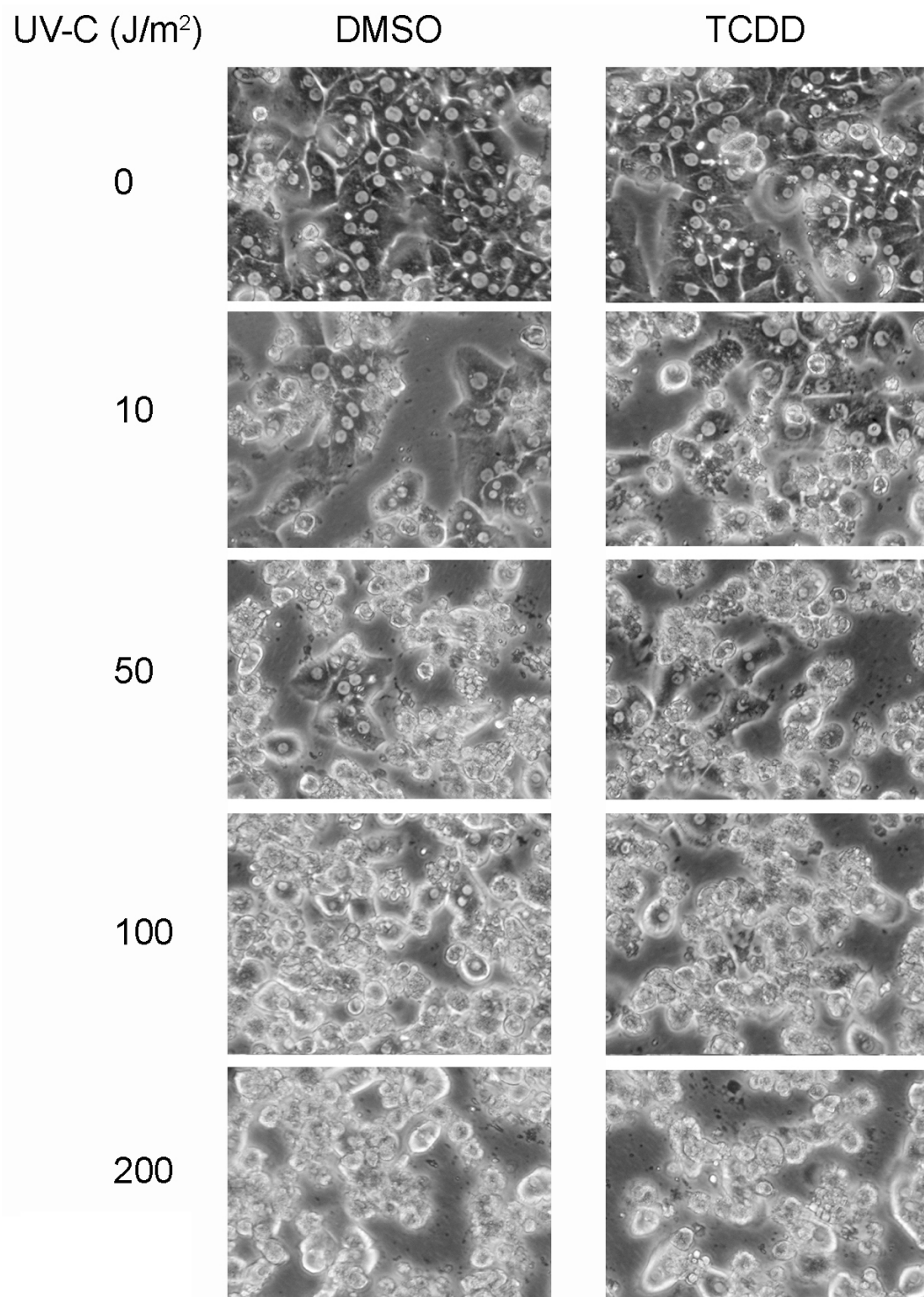


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Aufnahmen bestrahlter Zellen. Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 0 bis 200 J/m² bestrahlt und anschließend mit DMSO oder 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. (100x)

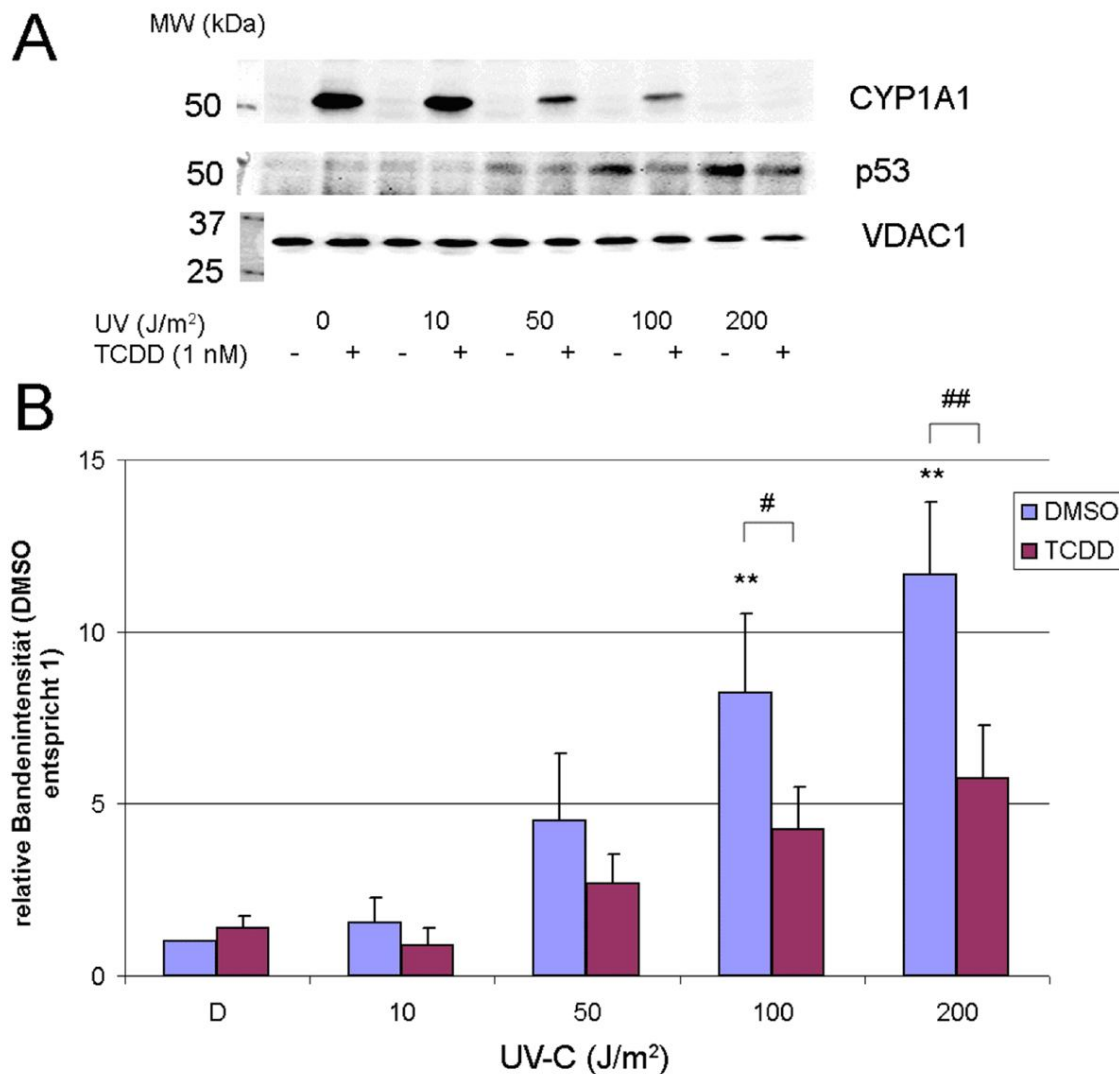


Abbildung 29: Western blot CYP1A1, p53 (UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 200 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01 A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung p53.

Im nächsten Schritt wurde untersucht in wie weit OTA und CHX im Vergleich zu UVC-Bestrahlung zu einer Induktion der p53-Proteinmenge führen und wie diese Effekte durch TCDD moduliert werden. Abbildung 31A zeigt einen exemplarischen Western blot für p53 nach Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit UVC (50 J/m²), OTA (10 µM) und CHX (10 µg/ml) alleine und jeweils in Kombination mit 1 nM TCDD. Während die UV-Bestrahlung zu einer starken Induktion der p53-Proteinmenge führte, zeigte sich durch die OTA-Inkubation nur ein geringer Anstieg an p53 und durch die CHX-Inkubation wurde die p53-Menge nicht erhöht. TCDD bewirkte für keine der Behandlungen eine Modulation der p53-Proteinlevel. Dies wird auch durch die densitometrische Auswertung der Banden deutlich (Abbildung 31B).

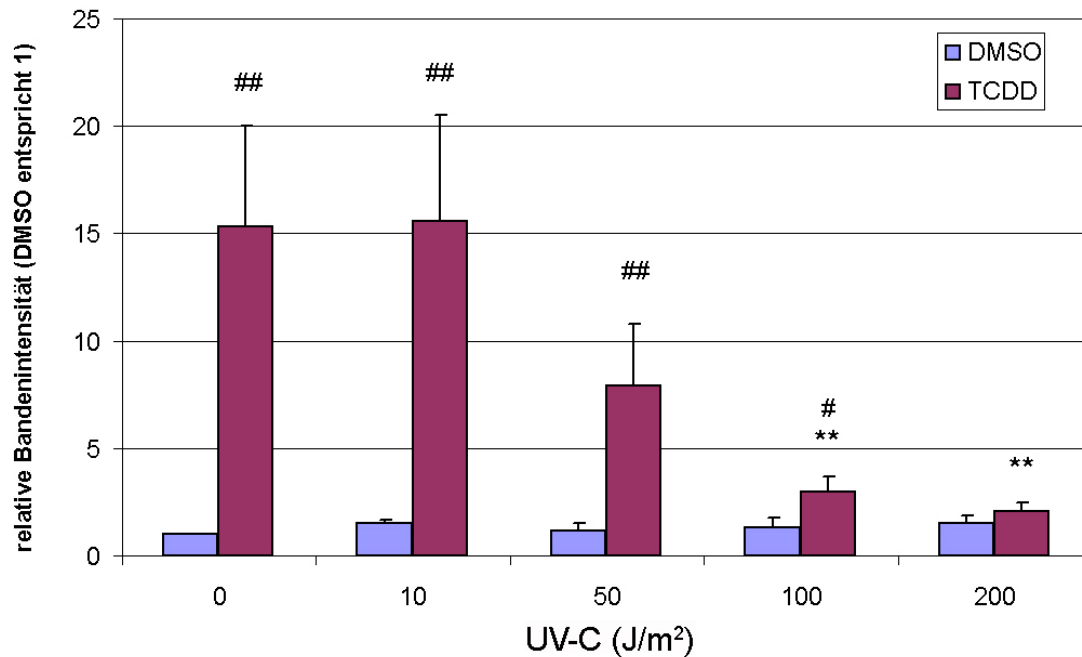


Abbildung 30: Densitometrische Auswertung CYP1A1 (UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 200 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. TCDD vs. Bestrahlung + TCDD: *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. Bestrahlung vs. Bestrahlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01.

Um zu ermitteln, ob die Hemmung der Induktion von p53 durch TCDD abhängig vom AhR ist, wurden Versuche mit dem AhR-Antagonisten CH-223191 durchgeführt (Abbildung 32A). Es zeigte sich, dass die Koinkubation der bestrahlten Zellen mit TCDD und CH-223191 zusammen in einer Induktion der p53-Proteinmenge resultierte, die der alleinigen Bestrahlung vergleichbar war. Der hemmende Effekt durch TCDD wurde aufgehoben. Dies zeigte auch die densitometrische Auswertung der detektierten Banden (Abbildung 32B). Als nächstes wurde untersucht, ob die UVC-induzierte Erhöhung der p53-Proteinmenge abhängig von einer Aktivierung der Caspasen ist. Hierzu wurden bestrahlte Zellen mit dem pan-Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk inkubiert. Der Western blot gegen p53 zeigte, dass eine Caspasen-Hemmung zu einer nahezu vollständigen Hemmung der p53-Akkumulation führte (Abbildung 32A). Im Vergleich zur unbestrahlten zVAD-fmk-Behandlung war der densitometrische Wert signifikant erhöht, nicht aber gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abbildung 32B).

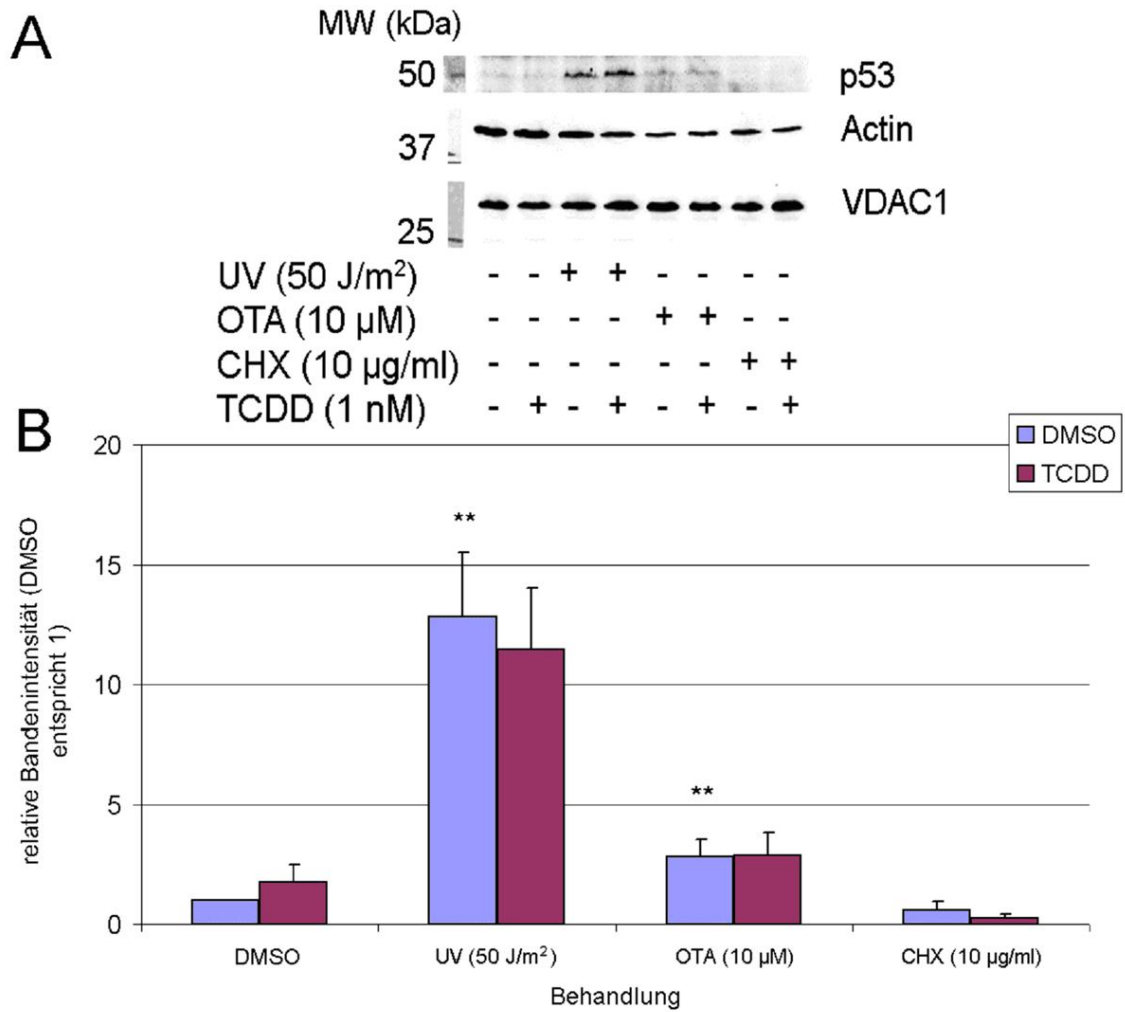


Abbildung 31: Western blot p53 (UV, OTA, CHX und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m² bestrahlt oder mit OTA oder CHX behandelt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung p53.

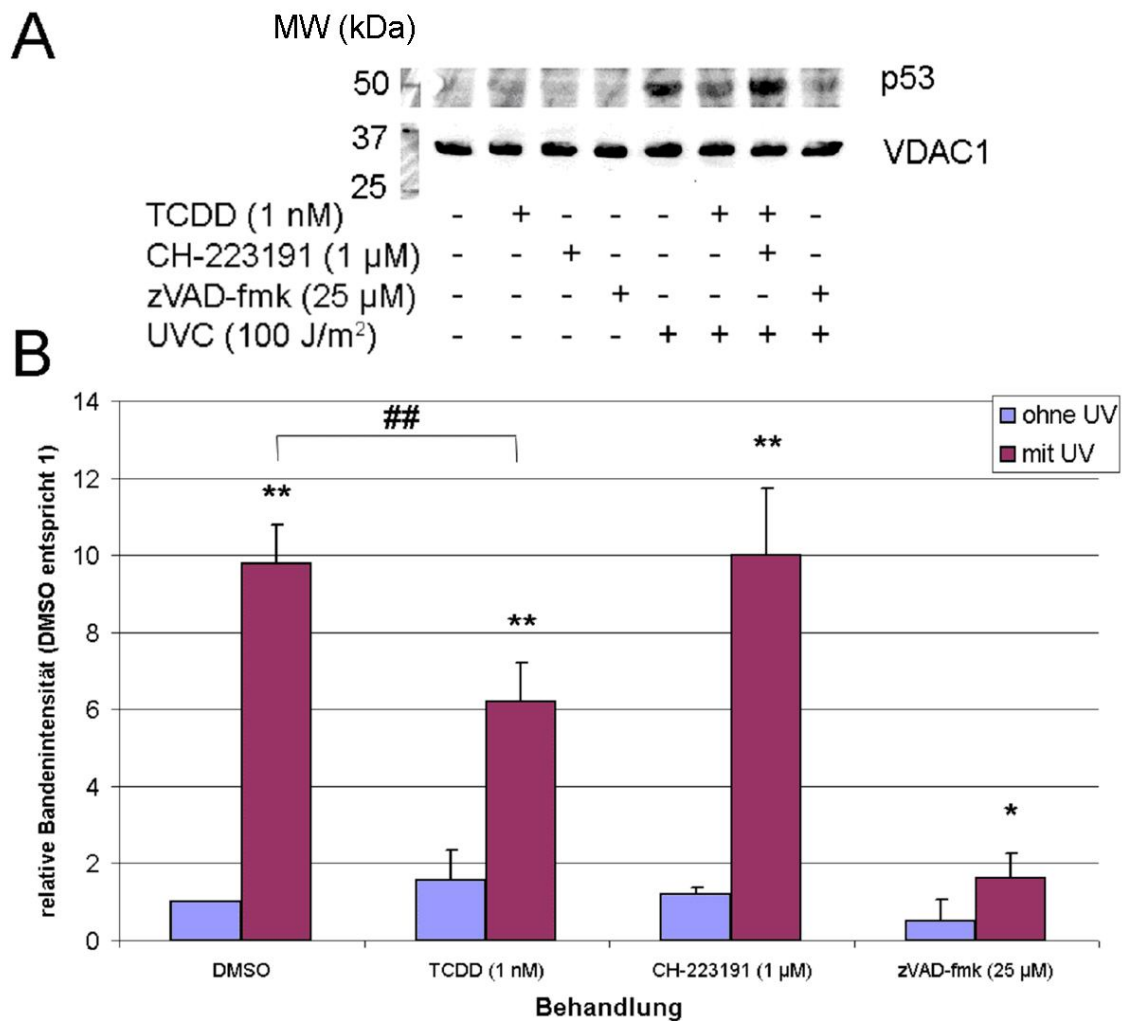


Abbildung 32: Western blot p53 (UV, TCDD, CH-223191, zVAD-fmk). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 100 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO, TCDD, CH-223191, oder zVAD-fmk inkubiert. n = 3. Ohne UV vs. mit UV: *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. UV vs. UV + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung p53.

4.1.6 qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis*

Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis*, welche die gleichzeitige Untersuchung der Expression von 84 an der Apoptose beteiligten Genen in Zellen der Ratte ermöglichen, wurde ermittelt, welche Gene durch die Bestrahlung mit UVC-Licht, bzw. durch die Behandlung mit OTA in primären Rattenhepatozyten beeinflusst werden und welchen Effekt hierauf TCDD besitzt.

Zunächst wurden die Zellen für 24 oder 48 h mit DMSO oder 1 nM TCDD inkubiert. Diese Proben wurden mit den qRT-PCR-Arrays untersucht. Abbildungen 33 und 34 zeigen die Scatter Plots für die Behandlungen für 24 bzw. 48 h. In Tabelle 43 sind die

Ergebnisse für die entsprechenden Versuche wiedergegeben. Dargestellt sind diejenigen Gene, deren Expression in einer der Behandlungen um mindestens Faktor 2 statistisch signifikant im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle reguliert worden waren.

Tabelle 43: Ergebnisse qRT-PCR Arrays *rat apoptosis* (TCDD (24/48 h)). Primäre Hepatozyten wurden mit 1 nM TCDD für 24 oder 48 h behandelt; *Fold expression* DMSO vs. TCDD; n = 3; *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01

	TCDD 1 nM 24 h	TCDD 1 nM 48 h	
bcl2l11	1,40 ± 0,56	2,38 ± 1,11	*
bik	2,38 ± 1,57	0,71 ± 0,06	**
birc1b	2,18 ± 0,63 *	1,89 ± 0,50	*
lhx4	1,65 ± 0,47 *	2,09 ± 1,53	
pycard	2,20 ± 0,64 *	6,41 ± 0,64	**
tnf-α	2,86 ± 0,45 **	2,41 ± 0,73	*
tnfrsf11b	1,22 ± 0,67	0,44 ± 0,01	**
faslg	2,88 ± 2,26	2,72 ± 1,04	*

Eine Reihe der untersuchten Gene zeigte eine im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle erhöhte Expression durch die Behandlung mit TCDD. Nur tnfrsf11b (osteoprotegerin) zeigte in der Behandlung für 48 h eine Verringerung der Expression um mehr als Faktor 2 gegenüber der DMSO-Kontrolle. Viele der regulierten Gene wurden nicht Zeit-abhängig reguliert und zeigten bei beiden Zeitpunkten vergleichbare Expressionswerte. Bcl2l11 (bim) und pycard wurden Zeit-abhängig reguliert. Cyp1A1, dessen Expression mittels qRT-PCR ermittelt worden war (Abbildung 35), wurde durch Inkubation mit 1 nM TCDD nach 24 und nach 48 h jeweils statistisch hochsignifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle induziert.

Im nächsten Schritt wurde in primären Hepatozyten durch verschiedene Stimuli Apoptose ausgelöst. Zum Einen wurden die Zellen mit UVC-Strahlung in zwei unterschiedlichen Dosen bestrahlt (10 und 50 J/m²) und danach 24 h lang inkubiert, zum Anderen wurden die Zellen für 24 h mit 1 µM OTA behandelt. Parallel dazu wurden die gleichen Behandlungen in Anwesenheit von 1 nM TCDD durchgeführt, um TCDD-induzierte Veränderungen am Expressionsmuster, das durch die Apoptose-auslösenden Behandlungen verursacht worden war, zu erfassen. Die entsprechenden Scatter Plots sind in Abbildungen 36 bis 41 dargestellt. Diejenigen

Gene, die in einer der Behandlungen um mindestens Faktor 2 statistisch signifikant reguliert wurden, sind in Tabelle 44 dargestellt. Es wurden sowohl anti- als auch pro-apoptotische Gene transkriptionell durch die Behandlungen beeinflusst. Die Mehrzahl der Gene wurde hochreguliert. Während die niedrige UV-Dosis nur geringe transkriptionelle Veränderungen in den untersuchten Genen hervorrief, wurde durch die hohe Dosis sowie durch die Inkubation mit OTA eine ganze Reihe von Genen reguliert. Diejenigen Gene, die durch TCDD alleine reguliert worden waren, wurden zum Großteil auch in Kombination mit den pro-apoptotischen Behandlungen gleichermaßen reguliert.

Durch die unterschiedlichen Behandlungen kam es zu einer Vielzahl von Änderungen im Expressionsmuster der untersuchten Gene in den primären Hepatozyten. In Tabelle 45 ist die Anzahl der Gene, die im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikant um mehr als den Faktor 2 reguliert wurden, für die einzelnen Behandlungen dargestellt.

Als Kontrolle für eine AhR-Aktivierung wurde mit den cDNS-Proben, die für die qRT-PCR-Arrays verwendet wurden, auch eine qRT-PCR für *cyp1A1* durchgeführt. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 42 dargestellt. Alle Proben, die mit TCDD behandelt worden waren, zeigten eine deutliche Induktion der *cyp1A1*-Expression. Diese war für alle TCDD-Inkubationen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch hochsignifikant erhöht.

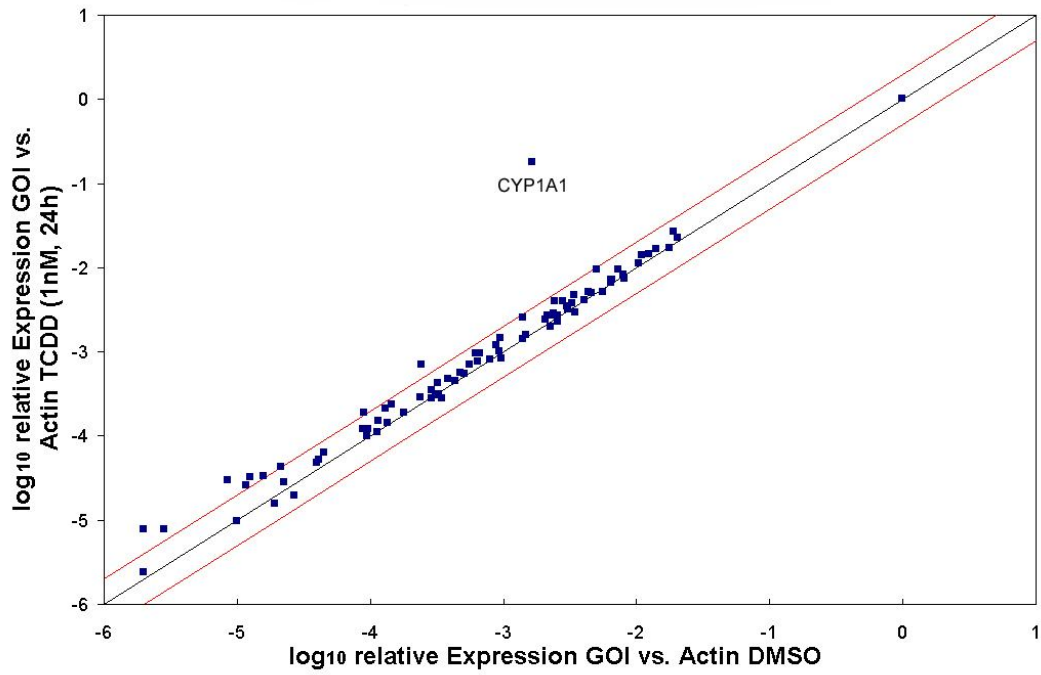


Abbildung 33: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. TCDD 24 h, n = 3.

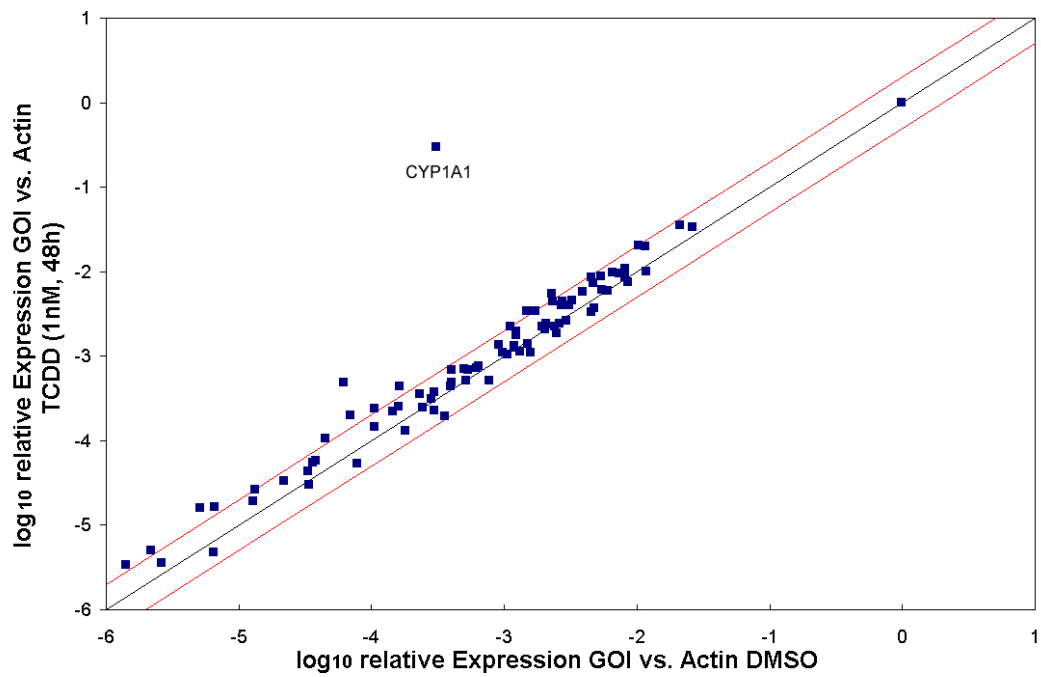


Abbildung 34: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. TCDD 48 h, n = 3.

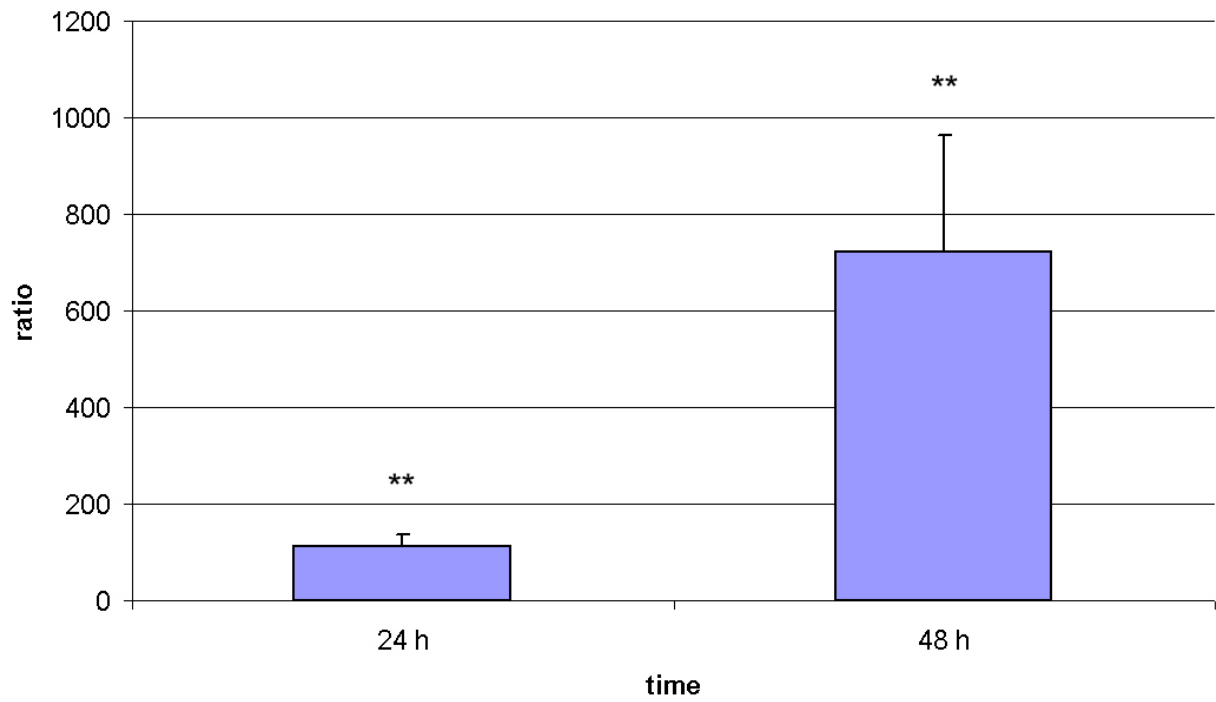


Abbildung 35: qRT-PCR cyp1A1 (Proben für qPCR arrays) 24/48 h. n = 3. TCDD vs. DMSO: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** $p \leq 0,01$.

Tabelle 44: Ergebnisse qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* (UV, OTA und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UV-Strahlung bestrahlt oder mit 1 µM OTA alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD behandelt. n = 3. *Fold expression* DMSO vs. Behandlung: *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01.

	UV 10 J/m ²	UV 10 J/m ² + TCDD		UV 50 J/m ²	UV 50 J/m ² + TCDD		OTA	OTA + TCDD	
apaf1	1,27 ± 0,14 *	1,03 ± 0,56		2,65 ± 0,62 **	3,33 ± 0,21 **		2,19 ± 0,45 **	2,11 ± 0,26 **	
api5	1,30 ± 0,16 *	1,44 ± 0,26 *		1,92 ± 0,22 **	2,38 ± 0,36 **		1,66 ± 0,61	1,97 ± 0,24 **	
aven	1,03 ± 0,12	1,59 ± 0,05 **	##	1,43 ± 0,20 *	1,81 ± 0,51 *		1,77 ± 0,32 **	2,25 ± 0,49 **	
bad	1,10 ± 0,04 *	0,88 ± 0,51		1,54 ± 0,28 *	1,30 ± 0,32		2,65 ± 0,62 **	1,56 ± 0,35 *	#
bak1	2,49 ± 0,88 *	3,02 ± 0,90 **		2,29 ± 1,88	3,74 ± 2,64		1,19 ± 0,49	1,69 ± 0,28 **	
bax	1,57 ± 0,23 **	2,13 ± 0,38 **	#	2,35 ± 0,08 **	2,25 ± 0,07 **		1,63 ± 0,09 **	2,06 ± 0,46 **	
bcl2	0,41 ± 0,13 **	0,77 ± 0,47		0,17 ± 0,01 **	0,13 ± 0,05 **		1,93 ± 0,26 **	1,40 ± 0,19 *	#
bcl2a1	0,98 ± 0,07	1,71 ± 0,15 **	##	2,11 ± 1,59	2,76 ± 2,13		2,55 ± 0,37 **	2,62 ± 0,46 **	
bcl2l11	2,12 ± 0,36 **	2,65 ± 0,77 *		4,12 ± 1,40 **	6,31 ± 1,63 **		1,73 ± 0,60	2,49 ± 0,35 **	
bclaf1	1,37 ± 0,38	1,70 ± 0,67		2,54 ± 0,29 **	3,16 ± 0,60 **		2,44 ± 1,14 *	2,26 ± 0,27 **	
bid3	1,35 ± 0,58	1,02 ± 0,51		1,58 ± 1,20	1,09 ± 0,76		2,17 ± 0,61 *	2,06 ± 0,54 *	
bik	0,91 ± 0,35	3,15 ± 1,84		1,57 ± 0,56	2,00 ± 0,55 *		2,30 ± 1,02 *	3,60 ± 0,88 **	
birc1b	1,66 ± 0,98	3,43 ± 1,36 *		1,68 ± 1,12	2,12 ± 1,53		21,6 ± 19,1	25,8 ± 27,2	
birc3	0,80 ± 0,38	2,44 ± 0,42 **	##	1,47 ± 0,24 *	3,01 ± 0,53 **	##	1,87 ± 0,63 *	2,85 ± 0,32 **	#
birc5	1,22 ± 0,17	1,55 ± 0,47		2,42 ± 0,59 **	1,81 ± 0,51 *		4,68 ± 1,35 **	4,60 ± 0,26 **	
bnip1	1,04 ± 0,21	1,58 ± 0,30 *	#	0,87 ± 0,00 **	2,43 ± 2,28		1,71 ± 0,55 *	1,63 ± 0,37 *	
bnip2	1,41 ± 0,27 *	1,62 ± 0,65		2,73 ± 0,73 **	2,83 ± 0,16 **		3,38 ± 0,94 **	2,06 ± 1,27	
bnip3	1,21 ± 0,08 **	1,06 ± 0,13		1,17 ± 0,23	0,96 ± 0,11		2,21 ± 0,49 **	1,76 ± 0,27 **	
bok	1,16 ± 0,18	1,36 ± 0,15 **		1,30 ± 0,30	1,46 ± 0,33 *		2,29 ± 0,68 *	1,95 ± 0,39 **	
card6	1,33 ± 0,47	1,59 ± 0,63		2,06 ± 0,46 **	2,74 ± 0,46 **		1,74 ± 0,66	1,96 ± 0,17 **	
casp1	1,52 ± 0,14 **	2,19 ± 0,46 **	#	3,37 ± 2,58	4,06 ± 2,58		1,80 ± 0,47 *	2,42 ± 0,29 **	
casp14	1,68 ± 0,96	4,56 ± 2,44 *		3,05 ± 1,73	3,84 ± 2,19 *		3,31 ± 1,50 *	5,67 ± 0,32 **	#

	<u>UV 10 J/m²</u>	<u>UV 10 J/m²</u> <u>+ TCDD</u>		<u>UV 50 J/m²</u>	<u>UV 50 J/m²</u> <u>+ TCDD</u>		<u>OTA</u>	<u>OTA +</u> <u>TCDD</u>	
casp3	1,62 ± 0,49 *	2,03 ± 0,54 *		2,10 ± 0,07 **	2,43 ± 0,30 **		1,47 ± 0,47	1,71 ± 0,21 **	
casp6	1,36 ± 0,20 *	1,59 ± 0,31 *		2,26 ± 0,27 **	2,41 ± 0,21 **		1,68 ± 0,41 *	1,90 ± 0,39 **	
casp7	1,96 ± 0,13 **	1,99 ± 0,34 **		4,48 ± 0,90 **	5,09 ± 1,24 **		3,25 ± 0,18 **	3,38 ± 0,94 **	
casp8	1,35 ± 0,09 **	2,06 ± 0,46 **	#	2,07 ± 0,74 *	2,37 ± 0,32 **		1,81 ± 0,35 **	1,78 ± 0,54 *	
casp8ap2	1,63 ± 0,51 *	1,75 ± 0,68		2,03 ± 0,54 *	2,60 ± 1,09 *		1,82 ± 1,06	1,76 ± 0,57 *	
casp9	1,25 ± 0,19	1,35 ± 0,26 *		2,19 ± 0,46 **	1,90 ± 0,37 **		1,63 ± 0,36 *	1,56 ± 0,14 **	
cflar	1,11 ± 0,30	1,54 ± 0,26 *		1,95 ± 0,39 **	2,82 ± 0,55 **	#	1,61 ± 0,60	1,52 ± 0,09 **	
cideb	1,46 ± 0,49	1,22 ± 0,21		1,77 ± 0,51 *	1,52 ± 0,15 **		2,05 ± 0,46 **	1,71 ± 0,15 **	
dad1	1,30 ± 0,16 *	1,92 ± 0,22 **	##	2,15 ± 0,12 **	2,47 ± 0,14 **	#	1,85 ± 0,32 **	1,99 ± 0,39 **	
dffa	1,49 ± 0,19 **	1,97 ± 0,24 **	#	3,53 ± 0,99 **	4,01 ± 0,94 **		1,33 ± 0,43	1,59 ± 0,39 *	
dffb	1,25 ± 0,35	1,49 ± 0,18 **		2,81 ± 0,48 **	2,93 ± 0,45 **		2,10 ± 0,46 **	2,00 ± 0,11 **	
fadd	1,08 ± 0,15	1,36 ± 0,15 **	#	2,37 ± 0,80 *	2,49 ± 0,70 *		1,11 ± 0,16	1,23 ± 0,38	
il10	2,30 ± 1,17	4,58 ± 2,24 *		7,03 ± 3,69 *	6,39 ± 2,87 *		2,67 ± 0,67 **	4,36 ± 1,17 **	#
lhx4	1,71 ± 0,37 *	2,72 ± 1,02 *		6,14 ± 1,72 **	7,19 ± 1,89 *		1,03 ± 0,42	1,29 ± 0,54	
lta	1,97 ± 0,58 *	9,21 ± 5,89 *		4,22 ± 2,91	4,41 ± 2,74 *		6,81 ± 4,44 *	12,6 ± 5,58 *	
mcl1	1,21 ± 0,10 *	2,17 ± 0,61 *	#	1,77 ± 0,30 **	2,42 ± 0,95 *		2,05 ± 0,13 **	2,39 ± 0,46 **	
nol3	1,56 ± 0,14 **	1,85 ± 0,33 **		1,66 ± 0,35 *	1,89 ± 0,53 *		1,59 ± 0,14 **	2,08 ± 0,58 *	
polb	1,59 ± 0,13 **	2,10 ± 0,46 **		4,52 ± 0,55 **	4,65 ± 0,72 **		6,32 ± 1,70 **	6,41 ± 0,89 **	
prlr	1,31 ± 0,26	1,03 ± 0,25		3,14 ± 1,79	3,23 ± 1,73 *		3,89 ± 1,50 *	2,36 ± 0,53 **	
prok2	1,54 ± 0,55	7,28 ± 5,45		1,98 ± 0,92	2,64 ± 1,87		1,93 ± 0,69 *	5,89 ± 1,64 **	##
pycard	0,75 ± 0,18 *	2,34 ± 0,45 **	##	1,05 ± 0,33	2,67 ± 1,87		1,14 ± 0,63	2,25 ± 0,49 **	#
ripk2	2,06 ± 0,84 *	2,30 ± 0,52 **		2,93 ± 1,16 *	4,22 ± 2,27 *		0,88 ± 0,31	0,87 ± 0,08 *	
sphk2	1,48 ± 0,29 *	1,56 ± 0,41 *		2,13 ± 0,38 **	2,31 ± 0,22 **		1,36 ± 0,30	1,43 ± 0,20 *	
tnf	1,78 ± 0,54 *	3,79 ± 1,36 *	#	1,91 ± 0,40 **	4,82 ± 1,53 **	#	0,69 ± 0,19 *	2,25 ± 0,49 **	##
tnfrsf10b	1,36 ± 0,15 **	1,65 ± 0,47 *		2,11 ± 0,26 **	2,28 ± 0,40 **		1,81 ± 0,51 *	1,54 ± 0,26 *	
tnfrsf11b	1,00 ± 0,22	1,27 ± 0,34		0,82 ± 0,57	1,07 ± 0,48		1,75 ± 0,18 **	2,29 ± 0,86 *	
tnfrsf1a	1,21 ± 0,15 *	1,25 ± 0,31		1,42 ± 0,33 *	1,40 ± 0,36		2,15 ± 0,47 **	2,10 ± 0,18 **	
tnfrsf1b	1,71 ± 0,21 **	1,83 ± 0,16 **		2,65 ± 0,82 *	2,83 ± 0,64 **		1,70 ± 0,50 *	1,72 ± 0,24 **	

	<u>UV 10 J/m²</u>	<u>UV 10 J/m²</u> <u>+ TCDD</u>		<u>UV 50 J/m²</u>	<u>UV 50 J/m²</u> <u>+ TCDD</u>		<u>OTA</u>	<u>OTA +</u> <u>TCDD</u>	
tnfrsf5	1,71 ± 0,42 *	2,77 ± 0,61 **	#	4,33 ± 1,71 *	5,96 ± 2,18 **		1,58 ± 0,42 *	2,09 ± 0,42 **	
tnfrsf6	1,58 ± 0,30 *	1,48 ± 0,33 *		2,58 ± 0,97 *	2,36 ± 0,53 **		2,94 ± 0,82 **	2,61 ± 0,45 **	
tnfsf10	1,41 ± 0,52	0,61 ± 0,12 **	#	2,02 ± 1,51	0,48 ± 0,21 **		1,46 ± 0,52	0,96 ± 0,21	
cd40lg	2,01 ± 0,23 **	4,47 ± 1,86 *	#	1,42 ± 0,33 *	1,87 ± 0,19 **		3,33 ± 2,24	12,1 ± 8,57 *	
faslg	1,65 ± 0,28 **	5,55 ± 5,27		1,52 ± 0,81	3,27 ± 1,26 *		3,34 ± 0,97 **	7,21 ± 1,93 **	#
tp53	1,50 ± 0,21 **	1,98 ± 0,34 **		2,70 ± 0,09 **	3,50 ± 0,40 **	#	2,17 ± 0,31 **	2,31 ± 0,22 **	
tradd	1,74 ± 0,10 **	1,89 ± 0,32 **		2,59 ± 1,02 *	2,77 ± 0,81 **		1,34 ± 0,36	1,59 ± 0,52	
traf1	1,03 ± 0,47	1,73 ± 0,70		1,39 ± 0,34	2,20 ± 0,74 *		0,63 ± 0,28 *	1,14 ± 0,61	
traf2	1,46 ± 0,21 *	1,51 ± 0,52		2,67 ± 0,42 **	3,13 ± 0,45 **		1,32 ± 0,29	1,60 ± 0,19 **	
traf3	1,36 ± 0,15 **	1,74 ± 0,36 *		6,13 ± 0,95 **	7,86 ± 1,94 **		3,23 ± 1,39 *	3,60 ± 0,52 **	

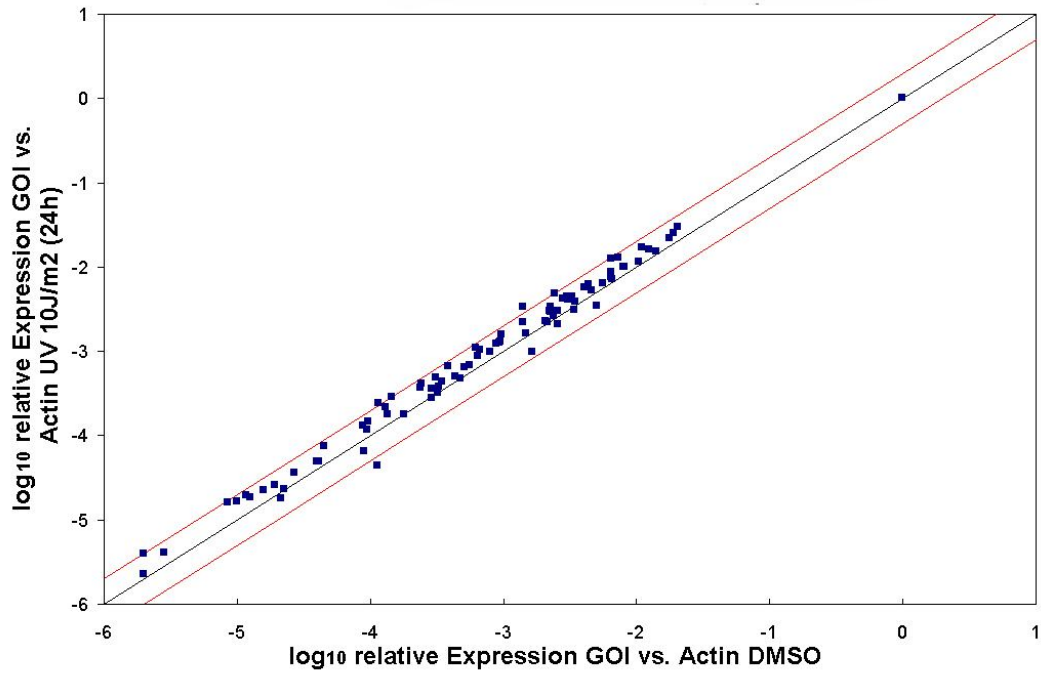


Abbildung 36: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. UV 10 J/m² 24 h, n = 3.

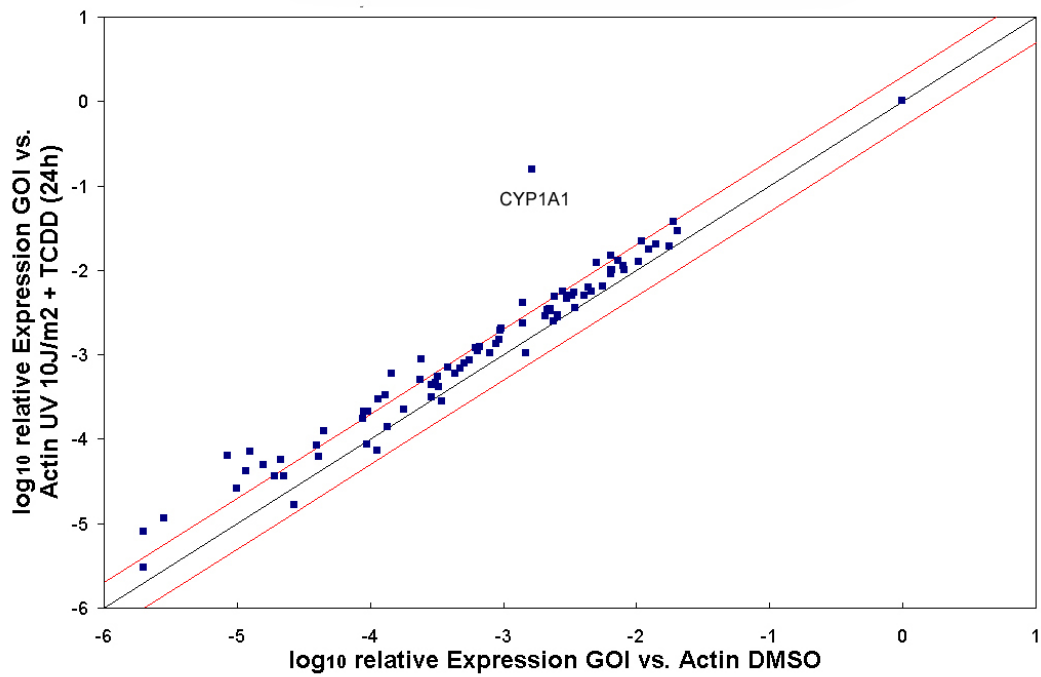


Abbildung 37: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. UV 10 J/m² + 1 nM TCDD 24 h, n = 3.

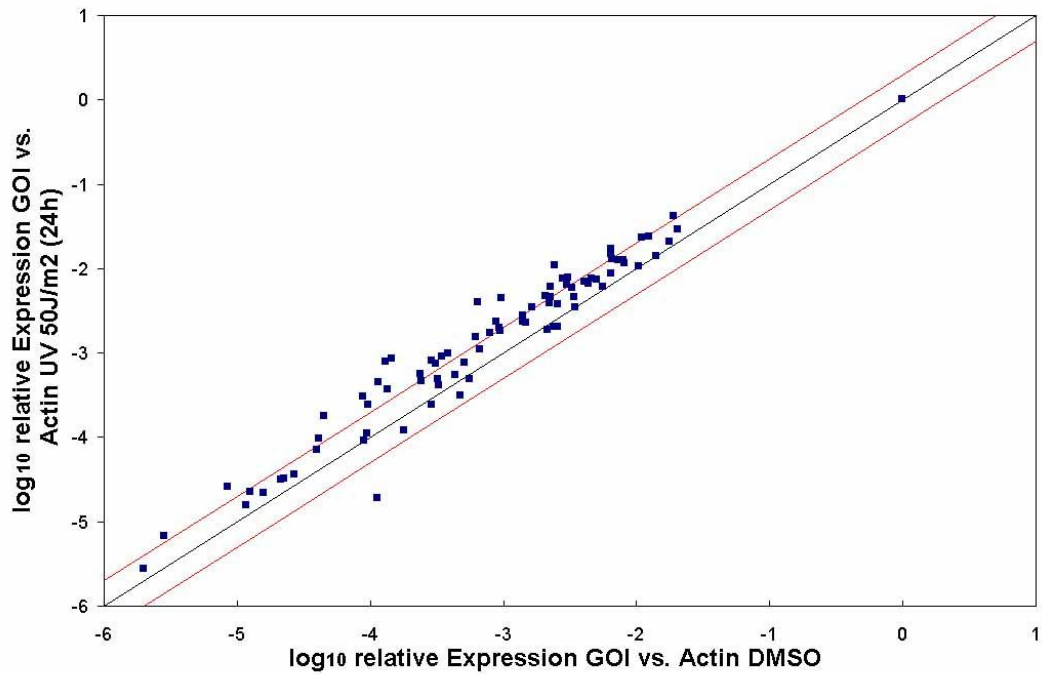


Abbildung 38: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. UV 50 J/m² 24 h, n = 3.

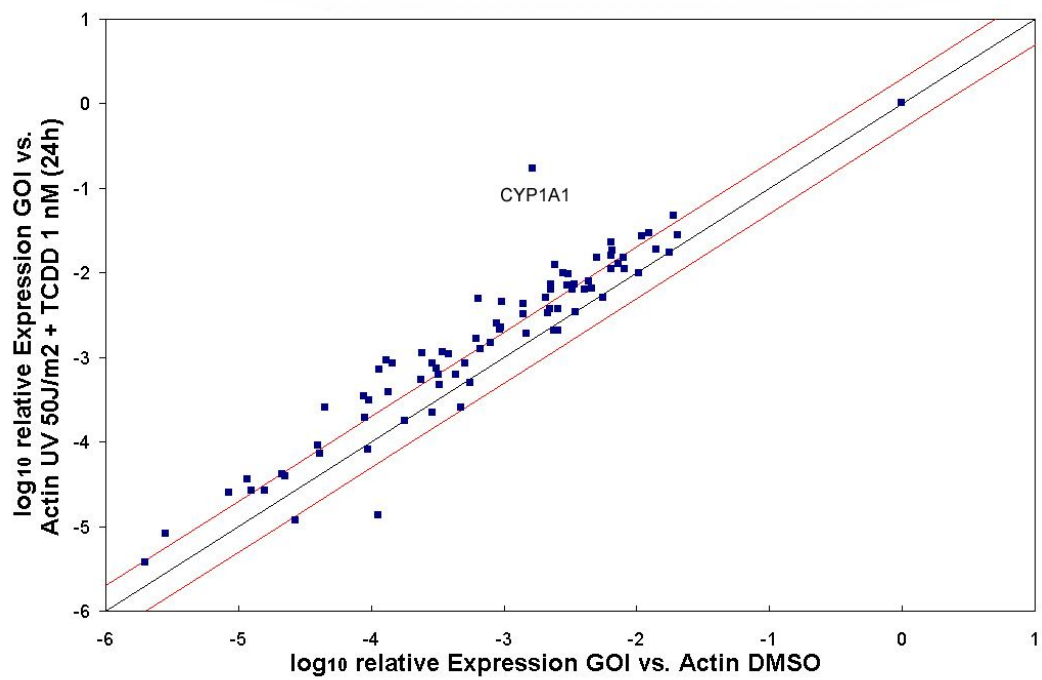


Abbildung 39: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. UV 50 J/m² + 1 nM TCDD 24 h, n = 3.

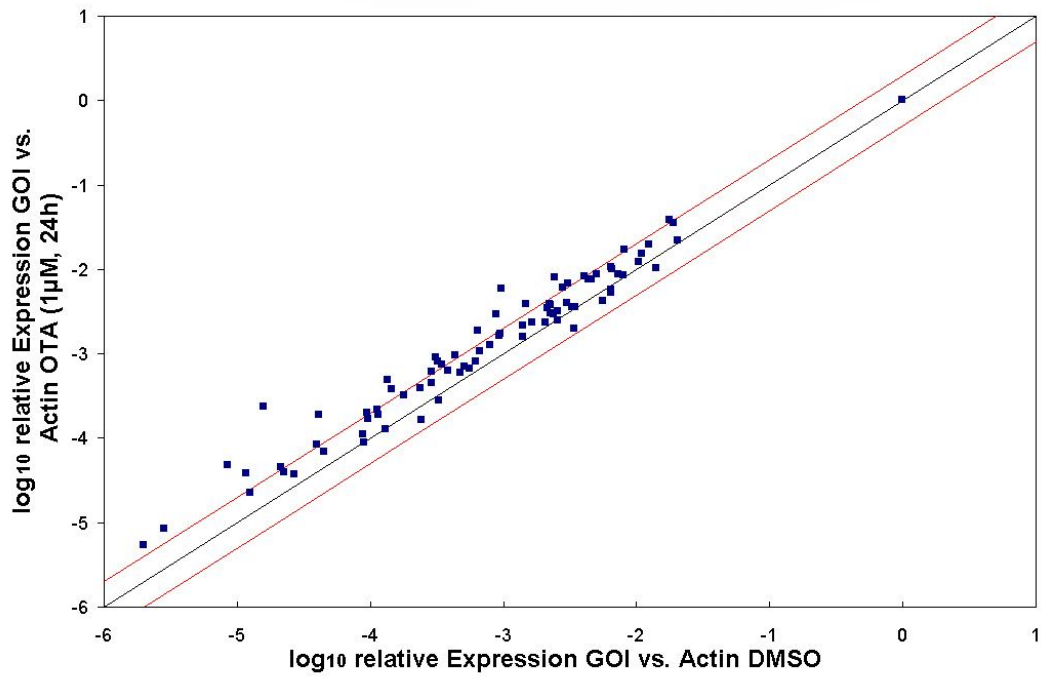


Abbildung 40: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. 1 μM OTA 24 h, $n = 3$.

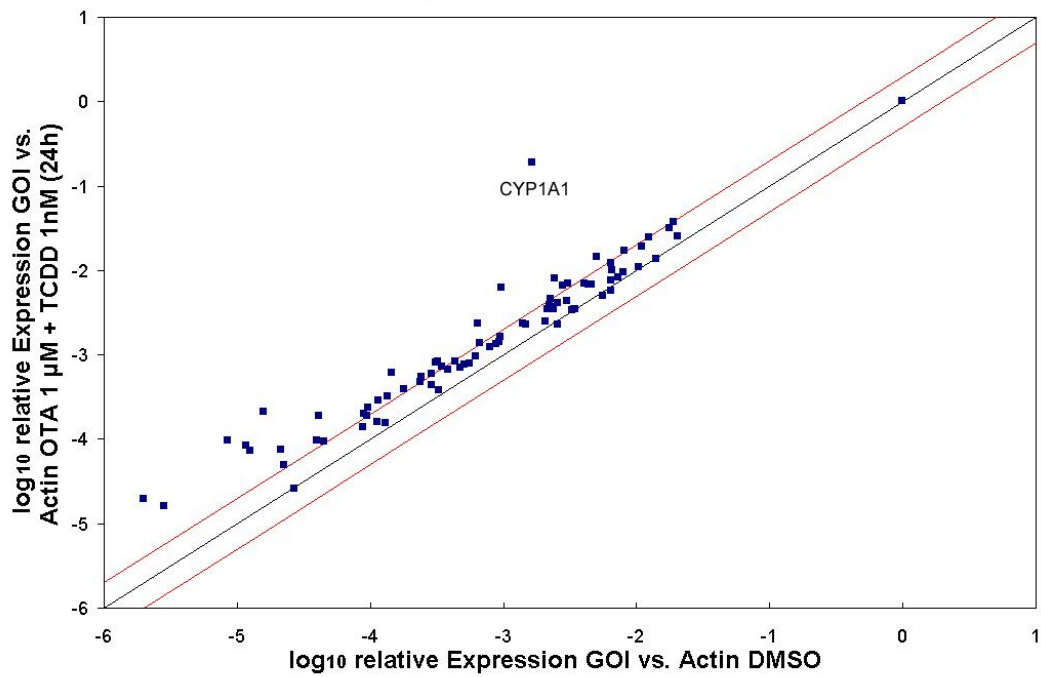


Abbildung 41: Scatter Plot qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* DMSO vs. 1 μM OTA + 1 nM TCDD 24 h, $n = 3$.

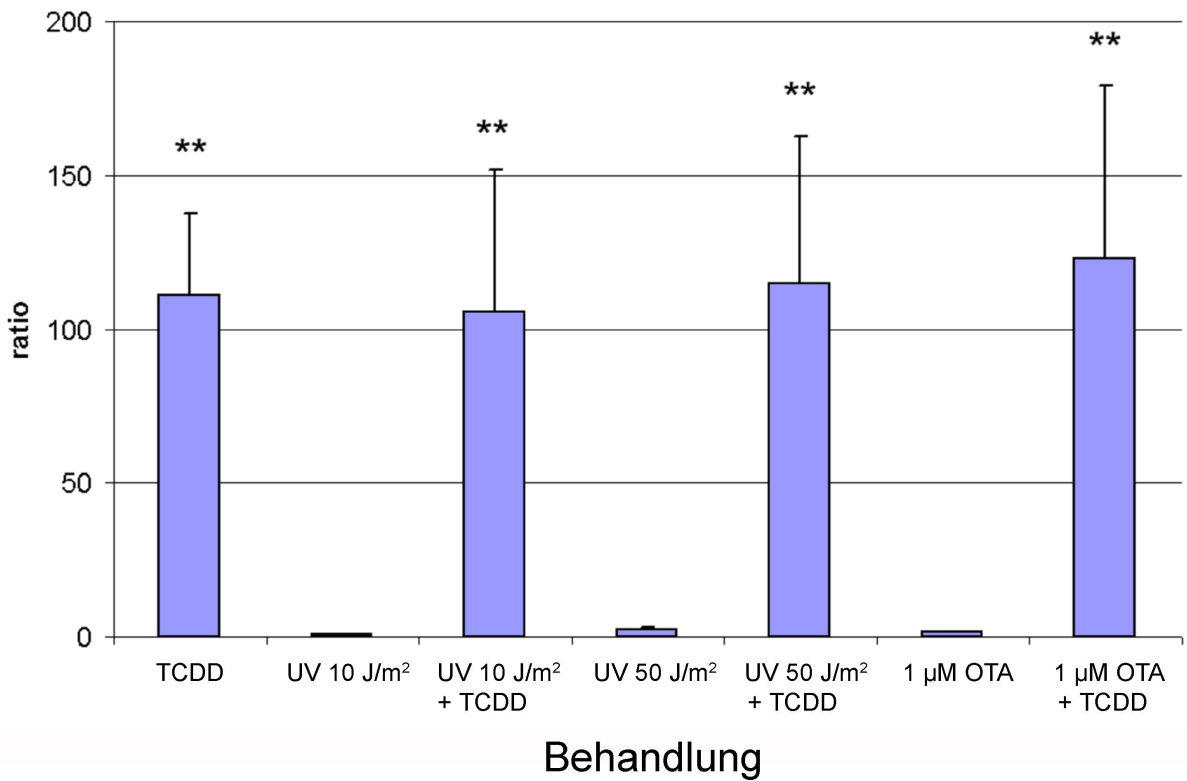


Abbildung 42: qRT-PCR cyp1A1 (Proben für qRT-PCR-Arrays, Apoptose, 24 h). n = 3. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01.

Tabelle 45: Anzahl regulierter Gene qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* 24 h.

Behandlung	↑	↓
1 nM TCDD	3	0
UV 10 J/m ²	4	1
UV 10 J/m ² + 1 nM TCDD	19	0
UV 50 J/m ²	30	1
UV 50 J/m ² + 1 nM TCDD	39	2
1 µM OTA	24	0
1 µM OTA + 1 nM TCDD	31	0

4.1.7 p53-Zielproteine

Um zu untersuchen, ob durch UVC-Licht Zielproteine von p53 auf Protein-Ebene induziert werden und welchen Einfluss hierauf TCDD bewirkt, wurden Western blot Experimente gegen die p53 Zielproteine Bax (Basu und Haldar, 1998) und Apaf-1 (Fortin et al., 2001) durchgeführt.

Abbildung 43A zeigt einen repräsentativen Western blot für dieses Experiment. Es zeigte sich, dass weder TCDD noch die geringe UV-Dosis von 10 J/m^2 zu einer Induktion von Apaf-1 oder Bax führten. Die hohe UV-Dosis bewirkte eine Induktion beider Proteine. Die Koinkubation mit TCDD hemmte diesen induzierenden Effekt nur für Apaf-1, nicht aber für Bax. Die densitometrische Auswertung der Experimente zeigte, dass UVC-Strahlung in einer Dosis von 50 J/m^2 zu einer statistisch hochsignifikant erhöhten Apaf-1 Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle führte (Abbildung 43B). Die Hemmung der Induktion durch 1 nM TCDD war statistisch signifikant. Bax wurde durch UVC-Strahlung nicht statistisch signifikant induziert (Abbildung 43C).

Ob OTA zu einer Induktion von p53-Zielproteinen führt, wurde ebenfalls mittels Western blot untersucht. Neben Apaf-1 und Bax wurde auch Bad (Jiang et al., 2006) untersucht, da bad in den qRT-PCR-Arrays durch $1 \mu\text{M}$ OTA nach 24 h auf mRNS-Ebene hochreguliert wurde.

Abbildung 44A zeigt einen repräsentativen Western blot für Zellen, die für 24 h mit OTA in Konzentrationen von $0,1$ bis $10 \mu\text{M}$ behandelt worden waren. Für Tubulin zeigte sich, dass die Bandenintensität mit steigender Konzentration von OTA abnahm. Sowohl Bad als auch Bax wurden durch die niedrigste OTA-Konzentration induziert, mit steigenden Konzentrationen nahm die Bandenintensität wieder auf die Intensität der Kontrolle ab. Apaf-1 wurde Konzentrations-abhängig induziert.

Die densitometrische Auswertung der Banden zeigte für Apaf-1 eine Konzentrations-abhängige Erhöhung der Proteinmenge (Abbildung 44B). Bad (Abbildung 44C) und Bax (Abbildung 44D) wurden in niedrigen OTA-Konzentrationen induziert. Die Inkubation mit OTA in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ bewirkte, dass die Proteinlevel nur leicht über dem Kontrollniveau lagen.

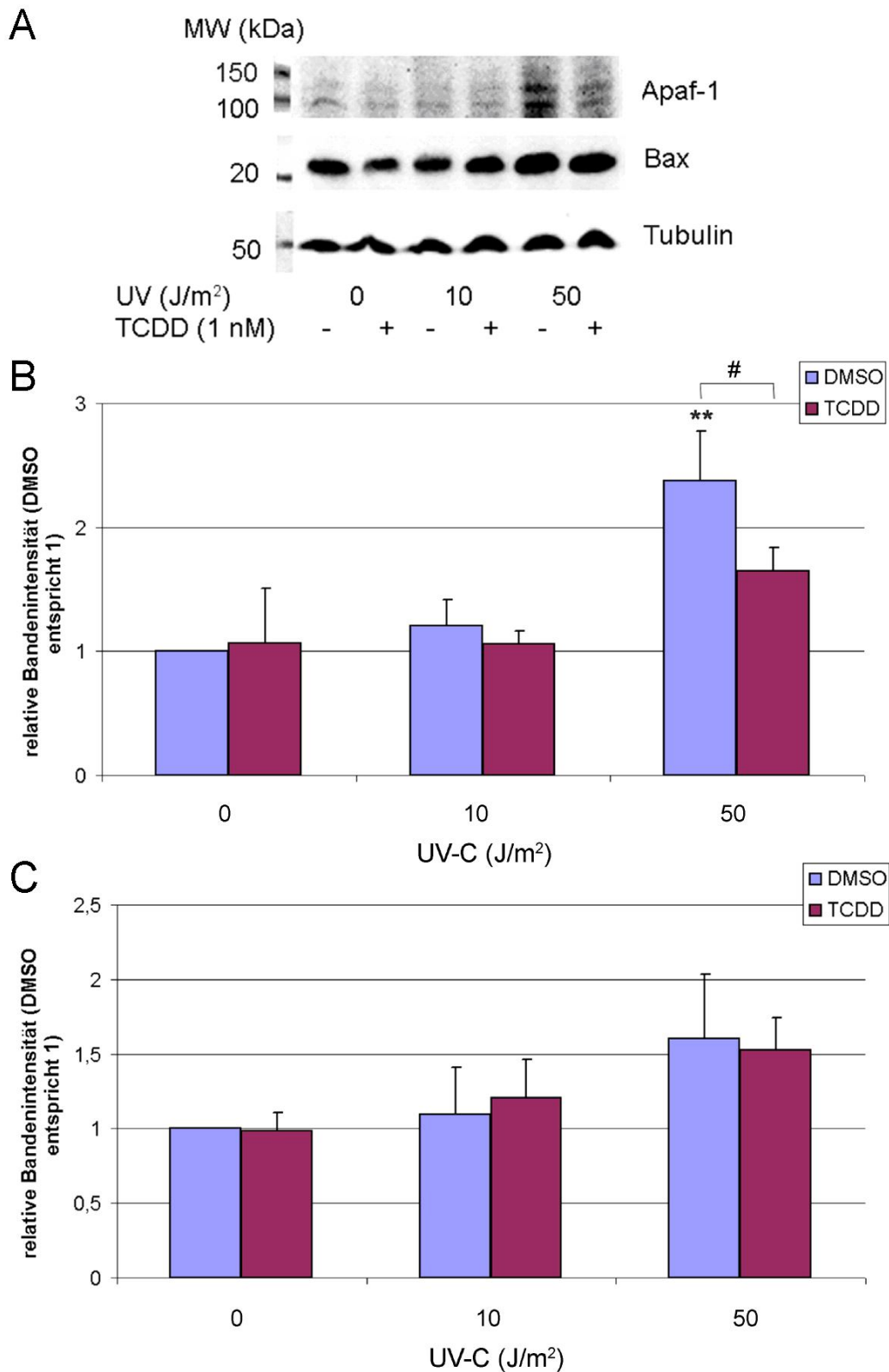


Abbildung 43: Western blot Apaf-1, Bax (UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 oder 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05 A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Apaf-1. C: Densitometrische Auswertung Bax.

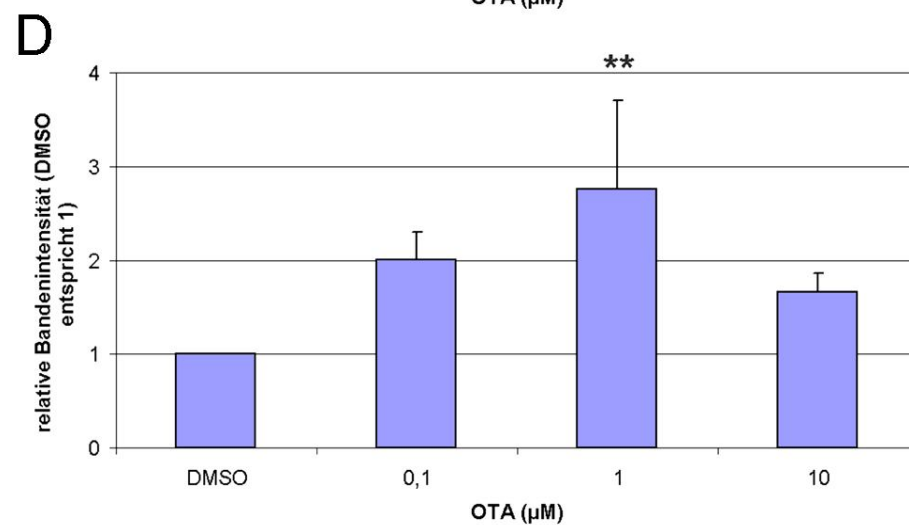
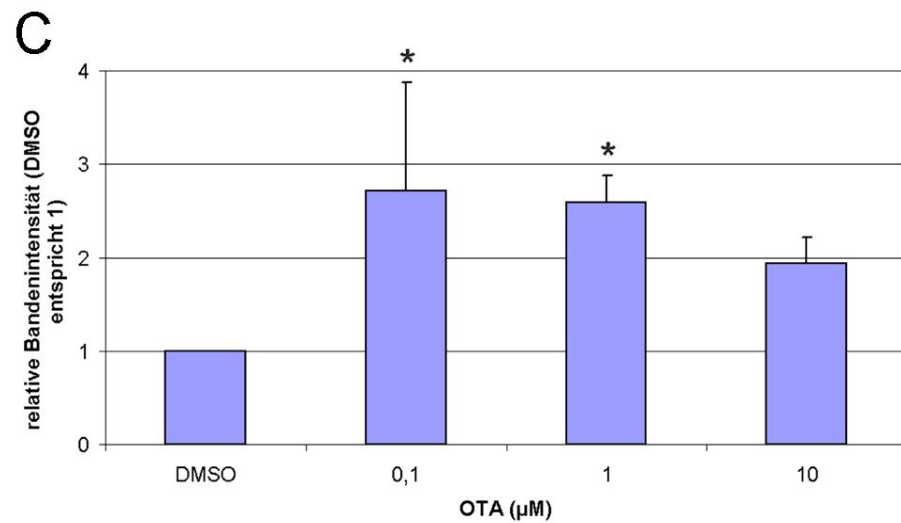
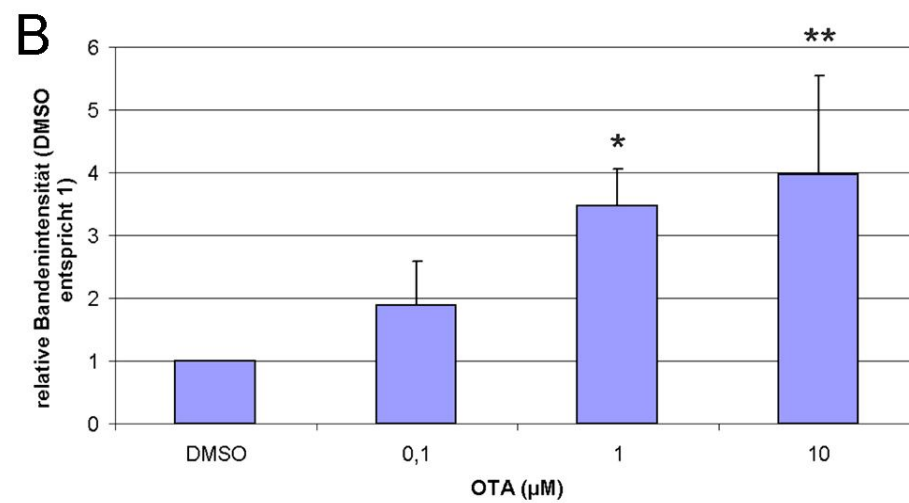
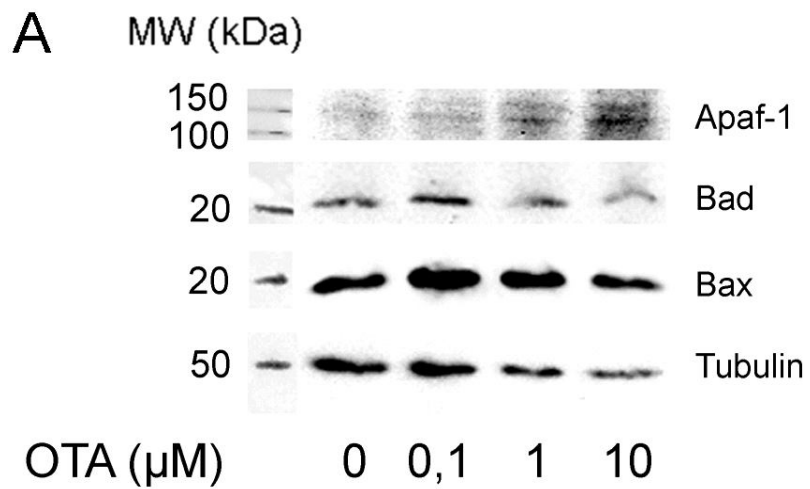


Abbildung 44: Western blot Apaf-1, Bad, Bax (OTA). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an OTA inkubiert. n = 3. Behandlung vs. DMSO: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Apaf-1. C: Densitometrische Auswertung Bad. D: Densitometrische Auswertung Bax.

4.1.8 Caspasen-Aktivitäten und proteolytische Aktivierung der Caspase-3

Im Laufe der Apoptose kommt es zur proteolytischen Aktivierung von bestimmten Cystein-abhängigen Proteasen, so genannten Caspasen. Diese Enzyme aktivieren sich in einer Kaskade gegenseitig und spalten letztendlich Proteinsubstrate, und bewirken somit den Untergang der Zelle. Es werden zwei Caspasen-Kaskaden unterschieden: eine Aktivierung von Todesrezeptoren führt zur Aktivierung der Caspase 8, während eine Störung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und eine damit verbundene Freisetzung von Cytochrom c zur Aktivierung der Caspase 9 führt. Diese beiden Initiator-Caspasen spalten und aktivieren wiederum die ausführenden Caspasen 3 und 7, welche letztendlich Proteinsubstrate wie etwa PARP und ICAD spalten (Budihardjo et al., 1999; Hug, 2000).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die unterschiedlichen Behandlungen in der vorliegenden Arbeit auf die Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 besitzen, wurden fluorimetrische Versuche zur Caspase-Aktivität durchgeführt. Hierbei wurden Zelllysate mit Tetrapeptid-Substraten inkubiert, die spezifisch für die unterschiedlichen Caspase-Klassen sind. An das jeweilige Tetrapeptid ist ein Fluorophor (AFC) gekoppelt, der proteolytisch durch aktivierte Caspasen abgespalten wird. Die Menge an freigesetztem Fluorophor ist ein Maß für die Aktivität der Caspasen. Für die Rezeptor-vermittelte Caspase-Kaskade wurde das Substrat Ac-IETD-AFC verwendet, für die mitochondrial vermittelte Kaskade Ac-LEHD-AFC und für die Aktivität der ausführenden Caspasen Ac-DEVD-AFC.

Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und im Anschluss für 24 h mit DMSO oder 1 nM TCDD behandelt, und mit OTA oder CHX alleine oder in Kombination mit TCDD für 24 h inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Aktivitäten der Caspasen fluorimetrisch bestimmt.

Es zeigte sich für alle drei untersuchten Caspasen-Klassen, dass UV-Bestrahlung zu einer Dosis-abhängigen Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle führte (Abbildung 45). Dies war für die hohe Dosis jeweils statistisch signifikant oder statistisch hochsignifikant verschieden zur Kontrolle. Bei den beiden Initiator-Caspasen Caspase 8 (Abbildung 45A) und Caspase 9 (Abbildung 45B) bewirkte die hohe UV-Dosis eine relative Erhöhung der Caspase-Aktivität um etwa das Vierfache, während diese Dosis auf Ebene der Caspasen 3 und 7 (Abbildung 45C) zu einer

Erhöhung der Aktivität um etwa das Siebenfache führte. Auch zeigte sich, dass bei den ausführenden Caspasen sowohl die basale Aktivität, als auch die Aktivität nach UV-Bestrahlung etwa zehnfach höher war als bei den initiierenden Caspasen. Die Inkubation der bestrahlten Zellen mit TCDD führte zu keiner Modulation der beobachteten Effekte.

Um zu untersuchen, ob die Caspase-Aktivität durch die gleichzeitige Inkubation mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmbar ist, wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und mit dem Inhibitor für 24 h inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass diese Behandlung für alle drei Caspasen-Klassen zu einer Hemmung der Aktivität auf das basale Niveau (Caspase 8) oder darunter (Caspase 9, Caspasen 3/7) führte.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Inkubation primärer Hepatozyten mit den pro-apoptischen Stimuli OTA und CHX mit einer Erhöhung der Caspasen-Aktivitäten einhergeht, und ob dies durch die Koinkubation mit TCDD beeinflusst wird. Die Aktivität der Caspase 8 wurde durch OTA in einer Konzentration von 10 μ M erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 46A). Bei der Aktivität der Caspase 9 zeigte sich durch OTA in der höchsten verwendeten Konzentration von 10 μ M eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikante Erhöhung (Abbildung 46B). OTA bewirkte in einer Konzentration von 10 μ M eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch hochsignifikante Erhöhung der Aktivität der ausführenden Caspasen 3 und 7 (DEVDase) (Abbildung 46C).

Die Koinkubationen mit TCDD führten bei keiner der Behandlungen zu einer Reduktion der Caspase-Aktivitäten. Für die gemeinsame Behandlung mit 1 μ M OTA und 1 nM TCDD zeigte sich bei den beiden Caspase Klassen LEHDase (Caspase 8) und DEVDase (Caspasen 3/7) eine statistisch signifikante Aktivitätserhöhung im Vergleich zu der jeweiligen Behandlung ohne TCDD.

CHX führte zu keiner Aktivierung der Caspase 8 (Abbildung 47A), Caspase 9 (Abbildung 47B) oder der ausführenden Caspasen 3 und 7 (Abbildung 47C). Bei keiner der Behandlungen kam es zu einer statistisch signifikanten Änderung der Caspasen-Aktivitäten durch die Koinkubation mit 1 nM TCDD.

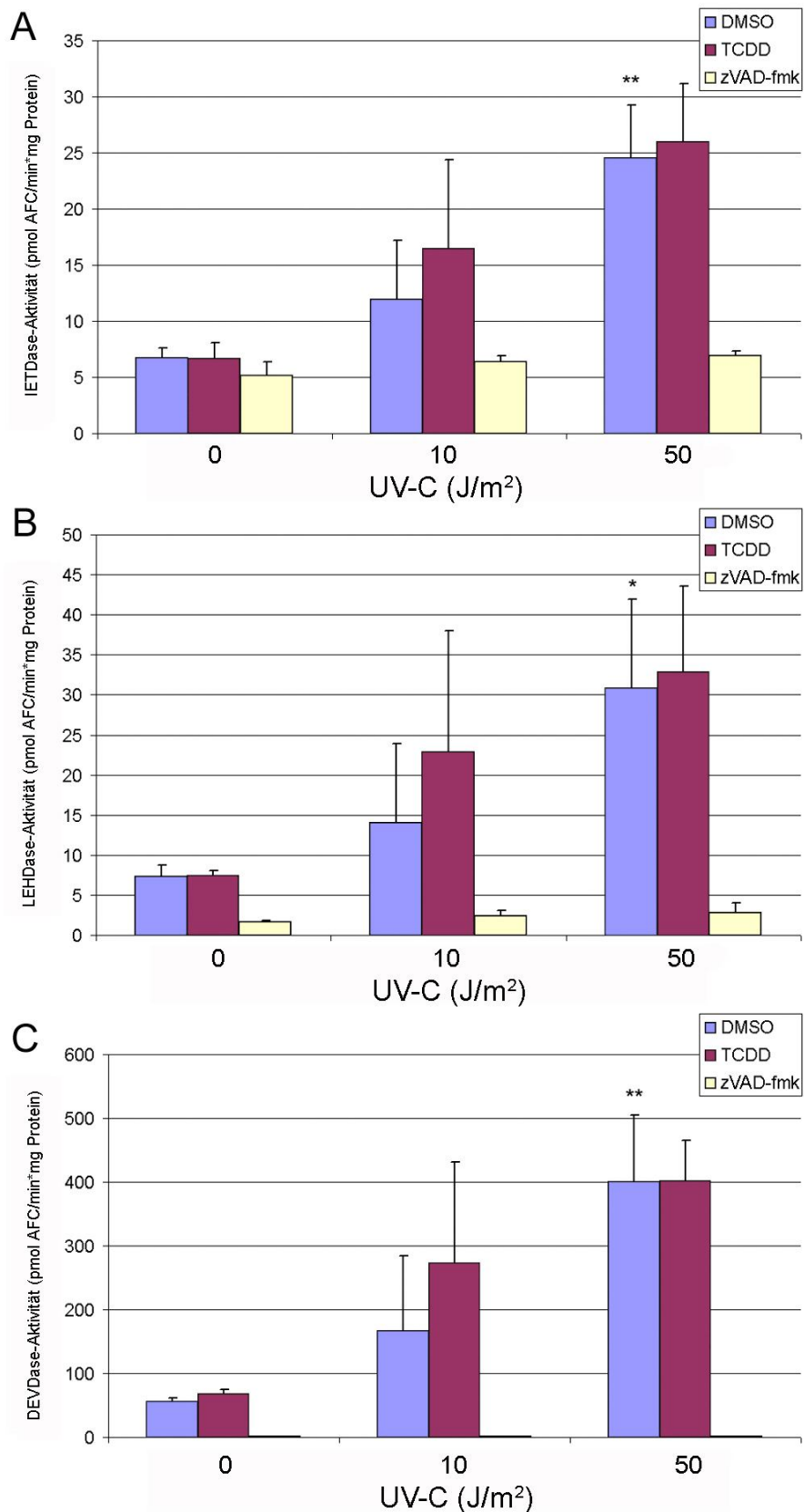


Abbildung 45: Caspasen-Aktivitäten (UV, TCDD und zVAD-fmk). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht (10 oder 50 J/m²) bestrahlt und mit DMSO, 1 nM TCDD oder 25 µM zVAD-fmk für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01. A: Caspase 8 (IETDase). B: Caspase 9 (LEHDase). C: Caspasen 3/7 (DEVDase).

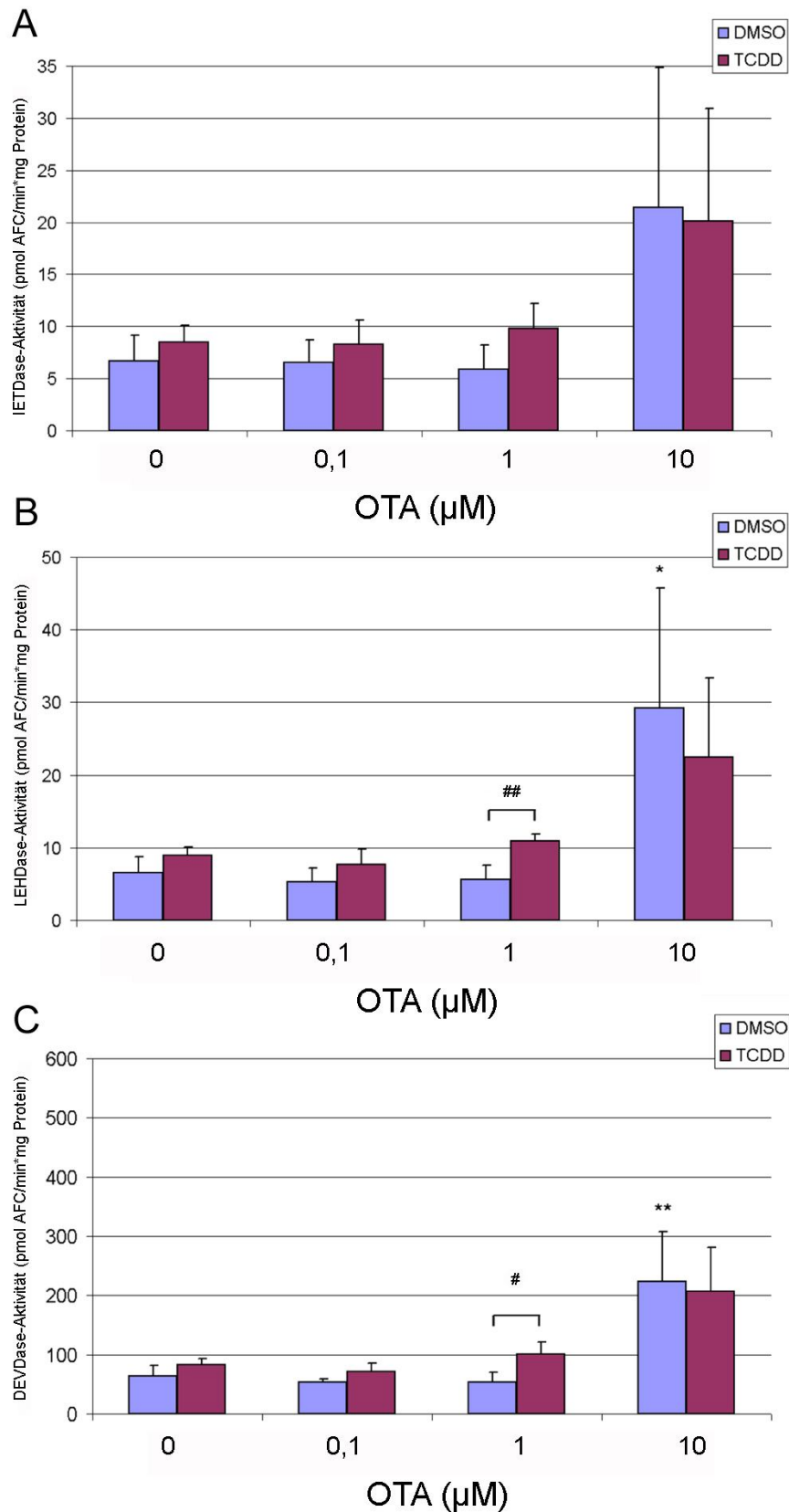


Abbildung 46: Caspasen-Aktivitäten (OTA und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit OTA alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05; ## p < 0,01. A: Caspase 8 (IETDase). B: Caspase 9 (LEHDase). C: Caspasen 3/7 (DEVDase).

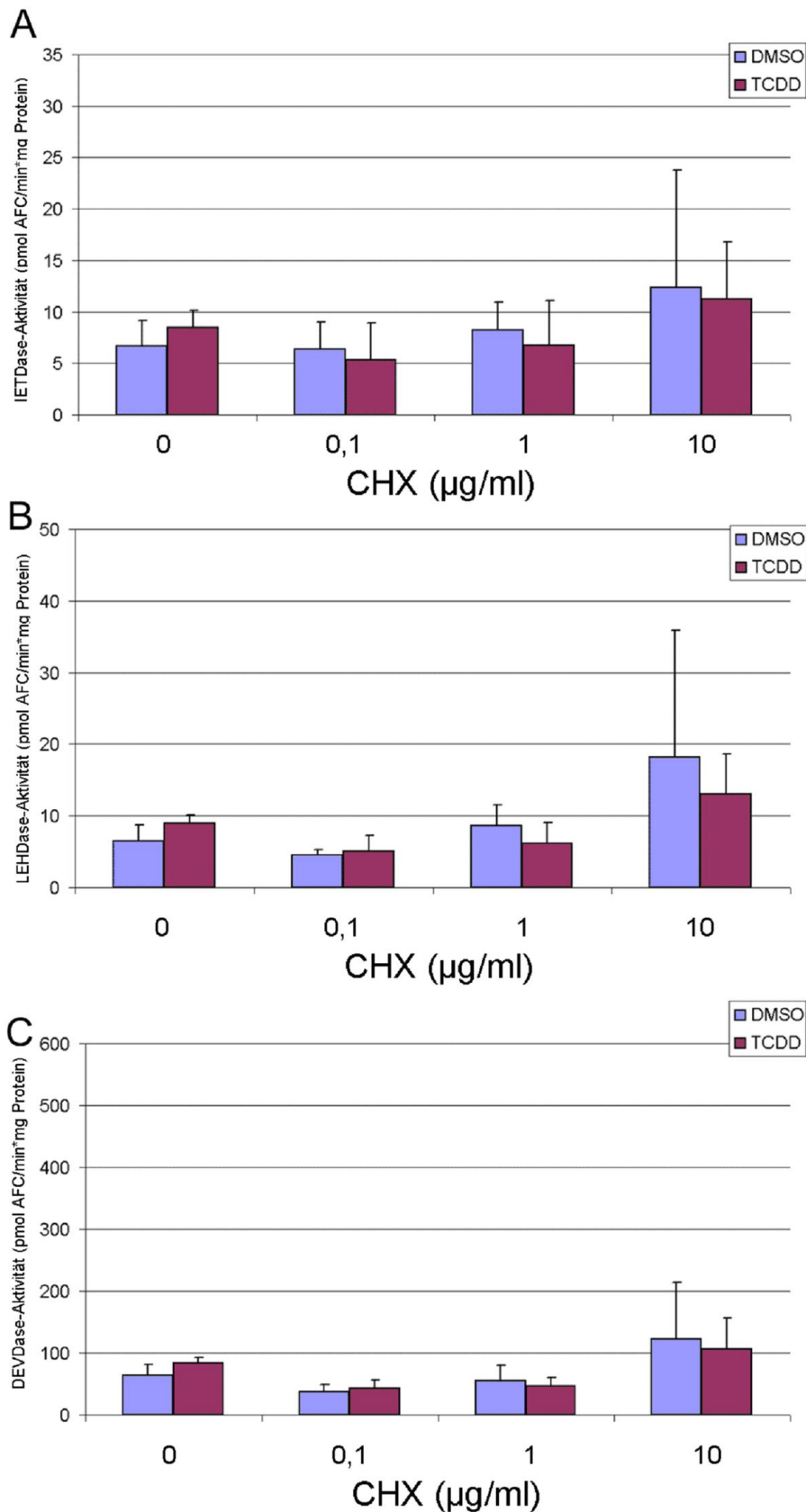


Abbildung 47: Caspasen-Aktivitäten (CHX und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit CHX alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. A: Caspase 8 (IETDase). B: Caspase 9 (LEHDase). C: Caspasen 3/7 (DEVDase).

Die ausführende Caspase 3 wird unter anderem durch die vorgeschalteten Caspasen 8 und 9 proteolytisch aktiviert. Diese Aktivierung lässt sich auch mittels eines Western blots untersuchen. Hierfür wird ein Antikörper benutzt, der sowohl die vollständige, als auch die gespaltene Form der Caspase 3 erkennt.

Außerdem wird im Verlauf der Apoptose das an der DNS-Reparatur beteiligte Enzym PARP durch die Effektorcaspasen 3 und 7 proteolytisch in zwei Fragmente p89 und p24 gespalten. Dies hat vermutlich den Hintergrund, dass die PARP für ihre Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) benötigt, von dem aus es ADP-Ribose auf Proteinsubstrate überträgt. Eine hohe PARP-Aktivität geht mit einer hohen Neusynthese von NAD^+ einher, die unter ATP-Verbrauch abläuft. Da jedoch die Zelle ATP für die Ausführung der Apoptose benötigt, macht es für die Zelle Sinn, PARP zu inaktivieren, sobald die Apoptose initiiert worden ist (Virag und Szabo, 2002).

Mittels Western blot Experimenten mit einem Antikörper, der gegen die N-terminale Domäne des Enzyms gerichtet ist, lassen sich sowohl intakte PARP als auch p89 detektieren. Auf diese Weise dient die Spaltung von PARP als ein viel verwendeter Marker für Apoptose.

Abbildung 48A zeigt einen exemplarischen Western blot gegen Caspase 3, PARP und VDAC1 als Beladungskontrolle für Zellen, die mit UVC-Licht bestrahlt worden waren. UVC-Licht bewirkte eine Dosis-abhängige Spaltung der Caspase 3, die Bandenintensität des Fragments bei etwa 17 kDa nahm zu. TCDD hatte auf die Spaltung der Caspase 3 keinen Einfluss. Dies wurde auch bei der densitometrischen Auswertung der Banden sichtbar (Abbildung 48C). UVC-Bestrahlung der Zellen führte ab einer UV-Dosis von 50 J/m^2 zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Bandenintensität von p17 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Keine der Behandlungen veränderte die Summe aus intakter und gespaltener Caspase 3 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 48B).

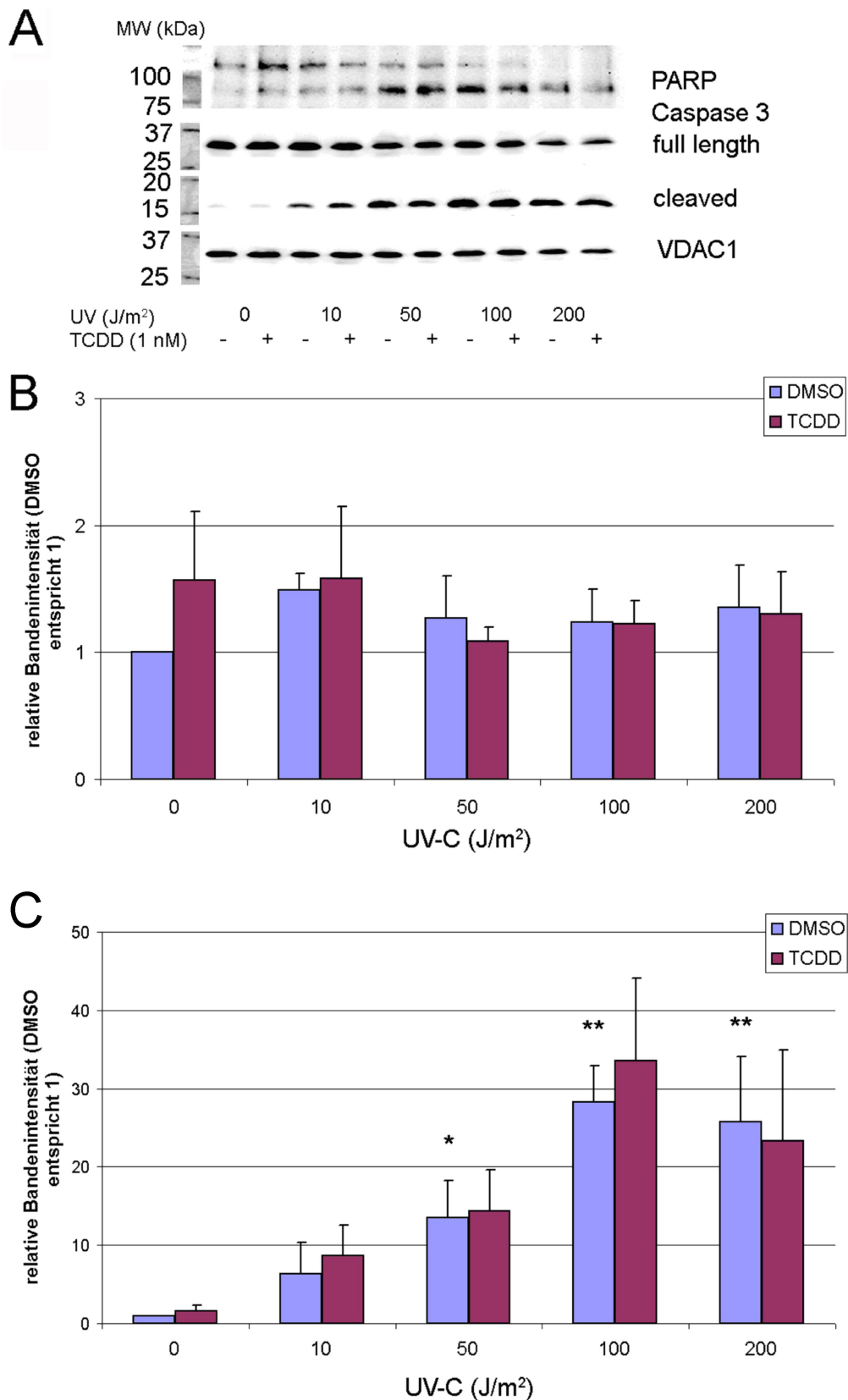


Abbildung 48: Western blot PARP, Caspase 3 (UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 200 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung gesamte Caspase 3. C: Densitometrische Auswertung Caspase 3 (gespalten, 17 kDa).

Die proteolytische Spaltung von PARP, einem Substrat der Effektorcaspasen zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Während in unbestrahlten Zellen dieses Protein hauptsächlich intakt vorlag, kam es durch UVC-Bestrahlung zu einer Dosis-abhängigen Spaltung. In der höchsten Dosis lag PARP nicht mehr in seiner intakten Form vor, sondern nur das Spaltprodukt bei etwa 89 kDa lies sich detektieren (Abbildung 48A). TCDD besaß auf die Spaltung von PARP keinen Einfluss. Dies wurde auch durch die densitometrische Auswertung bestätigt (Abbildung 49B). Keine der TCDD-Behandlungen zeigte einen Effekt auf die Summe von intaktem und gespaltenem PARP (Abbildung 49A).

Um zu untersuchen, ob die Behandlung bestrahlter Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk die proteolytische Aktivierung der Caspase 3 beeinflusst, wurden Zellen mit UVC-Licht bestrahlt und im Anschluss mit TCDD, zVAD-fmk oder einer Kombination der beiden Substanzen behandelt (Abbildung 50). Wie schon in den Experimenten mit UV-Licht und TCDD beobachtet, besaß TCDD keinen Einfluss auf die UV-Licht induzierte Caspase 3-Spaltung. Die Hemmung der Caspasen-Aktivität mittels zVAD-fmk bewirkte eine vollständige Hemmung der Caspase 3-Spaltung unter das Niveau der DMSO-Kontrolle, es ließ sich kein Bruchstück bei 17 kDa detektieren (Abbildung 50A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der densitometrischen Auswertung dieser Experimente (Abbildung 50B). UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 führte zu einer statistisch hochsignifikanten Zunahme der Bandenintensität für das Bruchstück bei 17 kDa. Im Vergleich zur Intensität der Bande für die Bestrahlung mit UV-Licht, war die Intensität für die Behandlung der bestrahlten Zellen mit zVAD-fmk statistisch signifikant verringert.

Bei der Betrachtung der Intensitäten für die Summe aus intakter und gespalteener Caspase 3 fiel auf, dass durch die Caspasen-Hemmung durch zVAD-fmk die Gesamtintensität der Banden für Caspase 3 im Vergleich zur Kontrolle zunahm (Abbildung 50C).

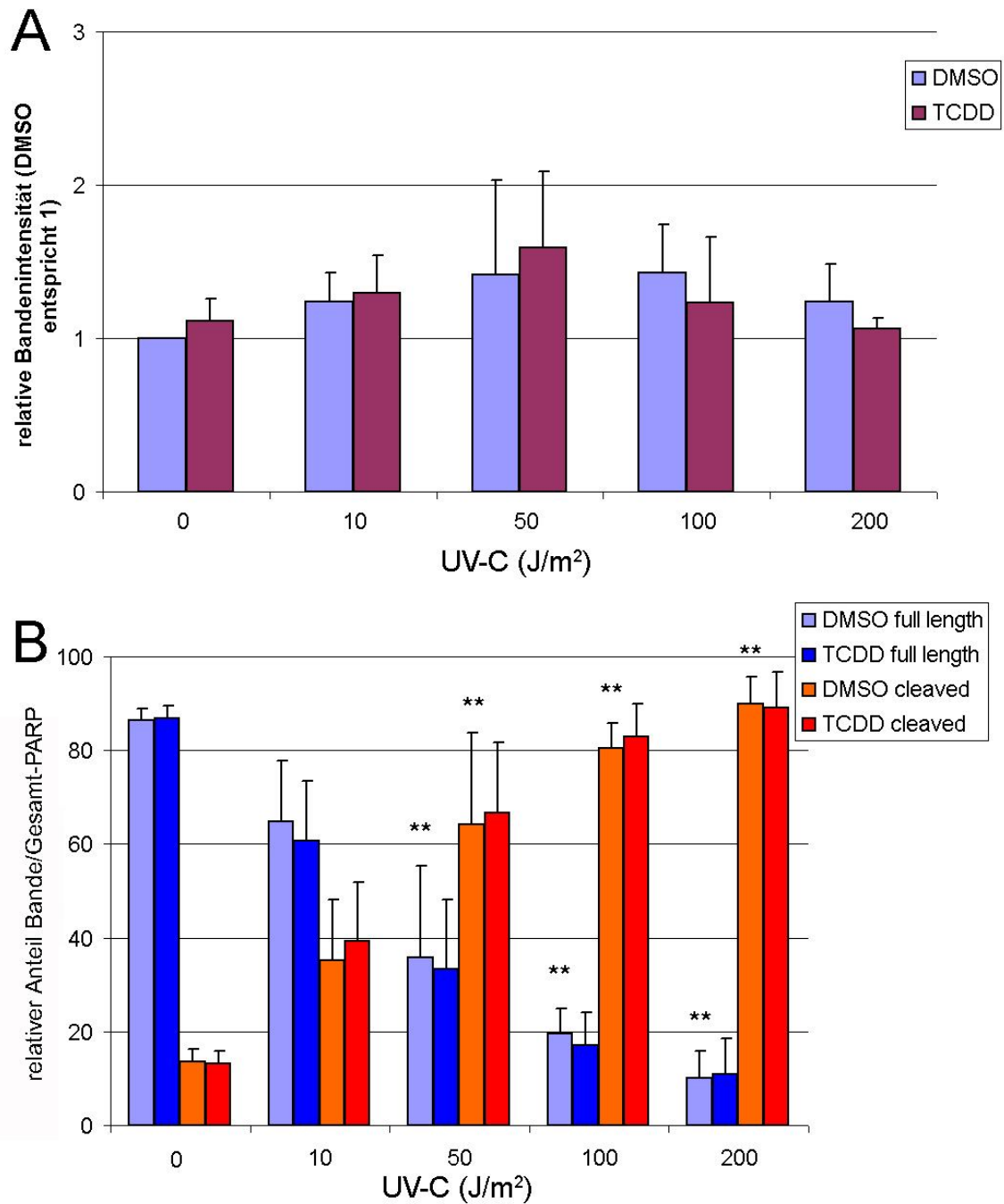


Abbildung 49: Densitometrische Auswertung PARP (UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 200 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. A: Densitometrische Auswertung Gesamt-PARP. B: Densitometrische Auswertung PARP-Spaltung.

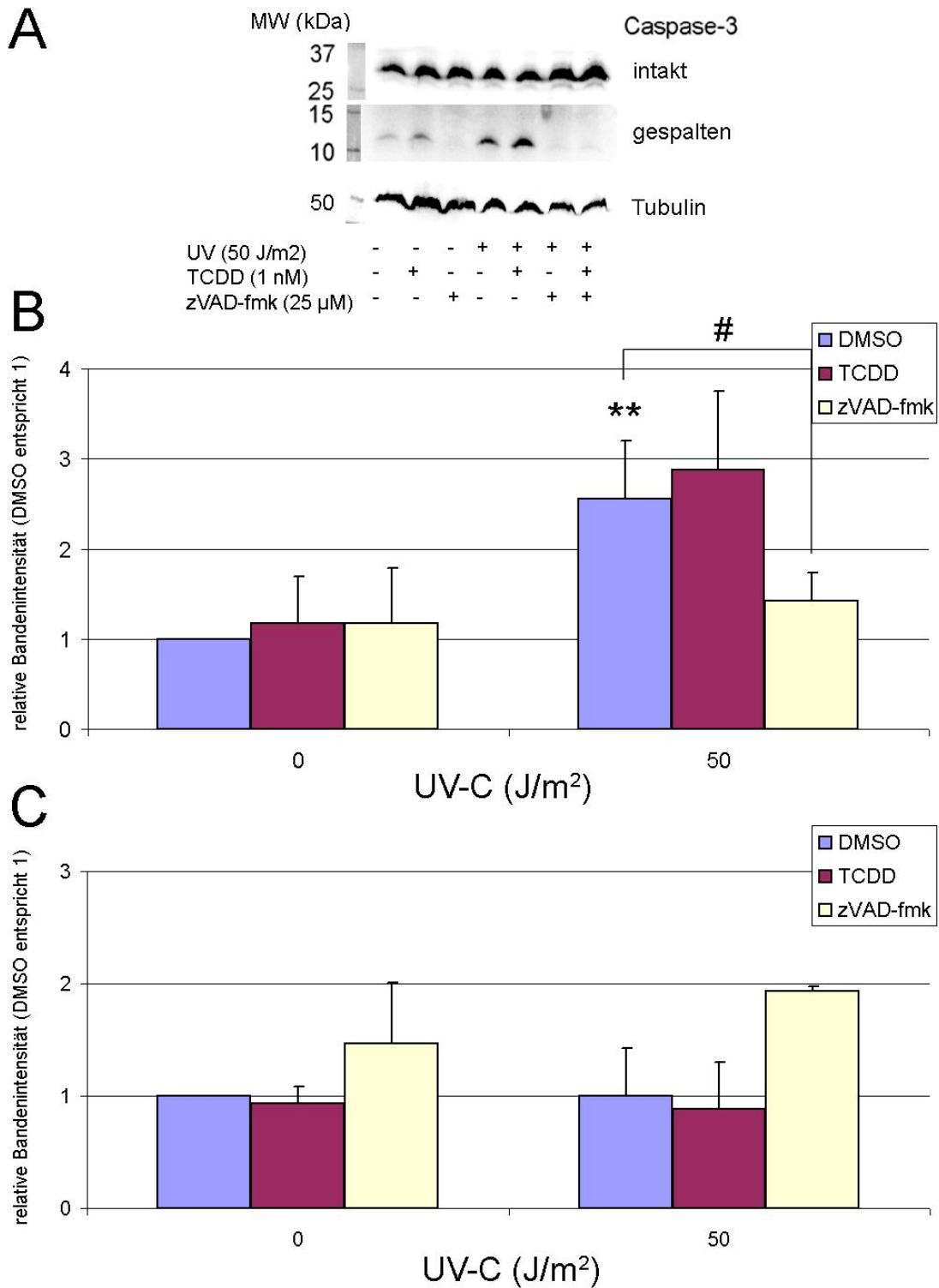


Abbildung 50: Western blot Caspase 3 (UV, TCDD und zVAD-fmk). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO, TCDD oder zVAD-fmk inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01; UV vs. UV + zVAD-fmk: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Caspase 3 (gespalten, 17 kDa). C: Densitometrische Auswertung gesamte Caspase 3.

Um der Frage nachzugehen, ob die proteolytische Spaltung der Caspase 3 mit der DEVDase-Aktivität der Proben für die Inkubationen mit UVC Bestrahlung, OTA- oder CHX-Behandlung, alleine und in Kombination mit TCDD korrelieren, wurde dies in einem weiteren Western blot Experiment untersucht. Abbildung 51A zeigt ein exemplarisches Experiment hierfür. UVC-Bestrahlung der Zellen bewirkte eine ausgeprägte Spaltung der untersuchten Caspase. Bei OTA war dies weniger ausgeprägt, für CHX nahezu auf Level der Kontrolle. Bei keiner der Behandlungen bewirkte die Koinkubation mit TCDD eine offensichtliche Hemmung der Caspase 3-Spaltung. Bei Betrachtung der Banden für intakte Caspase 3 zeigte sich, dass bei den Inkubationen mit OTA und CHX die Intensität der Banden im Vergleich zur Kontrolle abnahm. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten für das Fragment bei 17 kDa zeigte, dass sowohl UV-Strahlung, als auch OTA und CHX zu einer im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikanten Zunahme führten (Abbildung 51B). Bei der Auswertung für die Summe aus intakter und gespaltener Caspase 3 (Abbildung 51C) zeigte sich, dass die Intensität sowohl für die Behandlung mit OTA, als auch für die Behandlung mit CHX abnahm. Für CHX war dieser Effekt statistisch hochsignifikant im Vergleich zur Kontrolle.

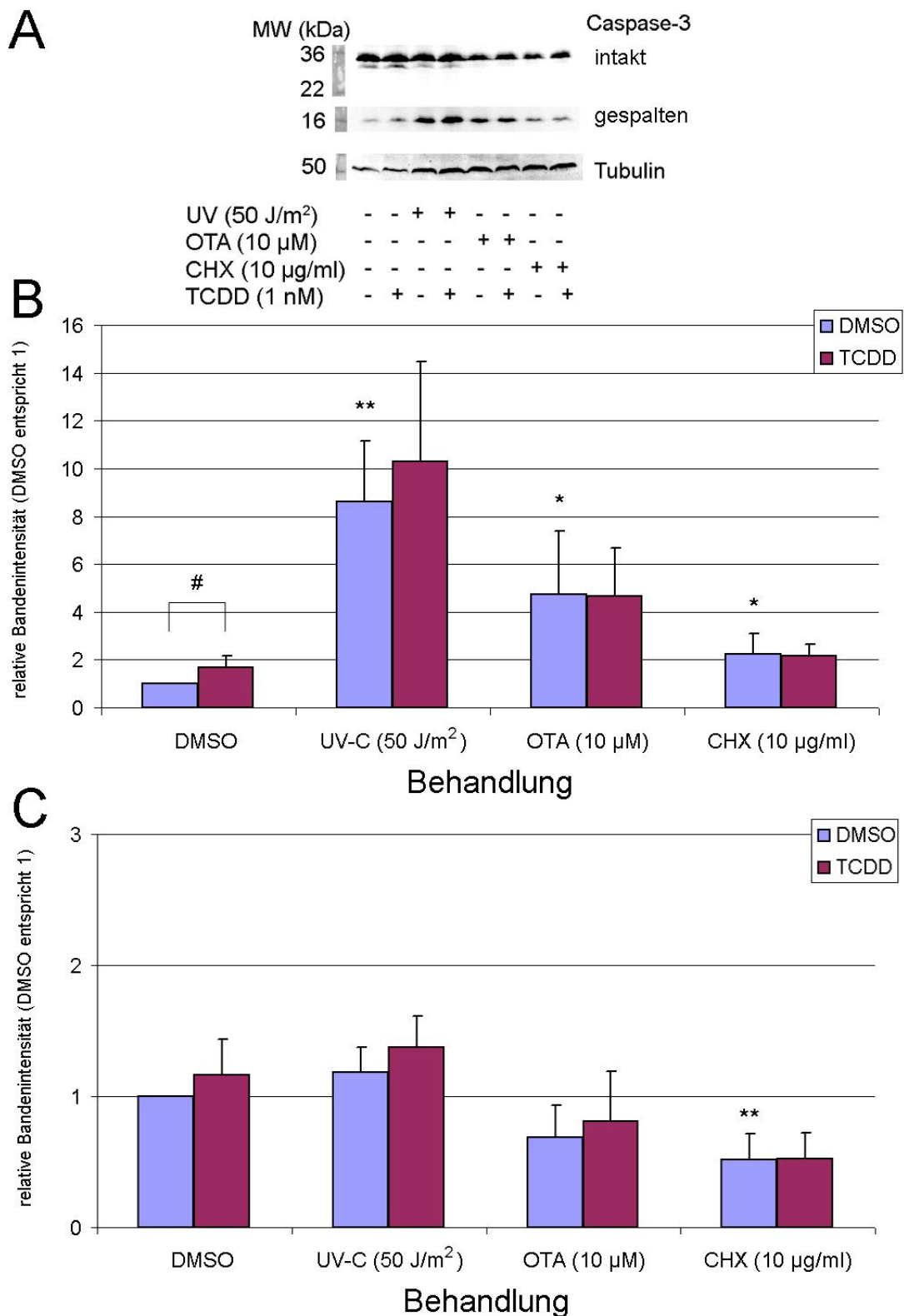


Abbildung 51: Western blot Caspase 3 (UV, OTA, CHX und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht (50 J/m²) bestrahlt oder mit OTA oder CHX behandelt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 4. DMSO vs. Behandlung: *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Caspase 3 (gespalten, 17 kDa). C: Densitometrische Auswertung gesamte Caspase 3.

4.1.9 CAD und ICAD

Ein wichtiger an der apoptotischen Chromatin-Spaltung beteiligter Proteinkomplex ist der DFF. Dieser besteht aus zwei Proteinen, CAD und ICAD. Es gibt zwei verschiedene splice-Varianten von ICAD: ICAD-S mit 35 kDa und ICAD-L mit 45 kDa (Sakahira et al., 1999). ICAD dient sowohl als Inhibitor als auch als Chaperon von CAD. Der Komplex aus beiden Proteinen liegt im Zellkern vor. Im Zuge der Apoptose wird ICAD durch die Caspasen 3 und 7 proteolytisch in mehrere Fragmente gespalten, dadurch wird CAD freigegeben und kann das Chromatin internukleosomal spalten (Widlak, 2000).

Primäre Hepatozyten wurden einerseits mit UVC-Strahlung bestrahlt, andererseits mit OTA oder CHX inkubiert, um Apoptose in den Zellen auszulösen. Die behandelten Hepatozyten wurden für 24 h wahlweise zusätzlich mit 1 nM TCDD inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und mittels Western blot gegen CAD und ICAD wurde untersucht, ob die apoptogenen Behandlungen die Level an diesen Proteinen beeinflussen, und ob es zu einer Spaltung von ICAD kommt. Durch die Koinkubationen mit TCDD sollte untersucht werden, ob dieses Dioxin einen Einfluss auf die Behandlungen besitzt.

Als Beladungskontrolle wurde zusätzlich Tubulin detektiert. Insbesondere für die Behandlungen mit OTA und CHX in den jeweils höchsten Konzentrationen zeigte sich, dass die Tubulin-Banden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle stark abnahmen (Abbildungen 53A und 54A).

In Abbildung 52A ist ein exemplarischer blot gegen CAD, ICAD und Tubulin nach UVC-Bestrahlung und nach Behandlung mit 1 μ M OTA abgebildet. Sowohl die UV-Bestrahlung, als auch die Inkubation mit OTA bewirkte eine leichte Zunahme der Intensität der CAD-Banden. Die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 52B) zeigte, dass es durch die UV-Bestrahlung zu einer nicht signifikanten Zunahme der relativen Bandenintensität kam, während dieser Effekt für die Inkubation mit 1 μ M OTA statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war. TCDD bewirkte für keine der Behandlungen einen modulierenden Effekt auf die Menge an CAD-Protein.

Abbildung 52A ist zu entnehmen, dass in primären Hepatozyten beide ICAD-Varianten durch den verwendeten ICAD-Antikörper detektierbar sind. Die Behandlung mit TCDD führte zu keiner Änderung der Bandenintensität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die UV-Bestrahlung führte bei beiden ICAD-Banden zu einer

Dosis-abhängigen Abnahme der Bandenintensität. Die densitometrische Auswertung ergab, dass sowohl für ICAD-L (Abbildung 52C) als auch für ICAD-S (Abbildung 52D) die Abnahme der Bandenintensität bei der hohen UV-Dosis statistisch hochsignifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle war. Die Inkubation mit 1 μ M OTA bewirkte keine Änderung der Bandenintensität für ICAD im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Bei keiner der Behandlungen besaß die Koinkubation mit TCDD einen modulierenden Effekt.

In Abbildung 53A ist ein exemplarischer Western blot gegen CAD, ICAD und Tubulin für die Behandlungen mit OTA in Konzentrationen von 0,1 bis 10 μ M dargestellt. Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Inkubation mit OTA in primären Hepatozyten zu keiner Änderung der CAD-Proteinmenge führte (Abbildung 53B). Auch war kein Effekt durch die Koinkubation mit 1 nM TCDD zu erkennen. ICAD-L wurde durch die Behandlung mit 10 μ M leicht induziert, dieser Effekt war nicht statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 53C). Die relative Menge an ICAD-S wurde durch OTA nicht reguliert (Abbildung 53D). Auch bewirkte bei keiner der Behandlungen die gleichzeitige Inkubation mit 1 nM TCDD eine Änderung in der relativen Proteinmenge der beiden ICAD-Varianten.

Abbildung 54A zeigt einen repräsentativen Western blot gegen CAD, ICAD und Tubulin für die Behandlung primärer Hepatozyten mit CHX und TCDD. Die relative Menge an CAD-Protein wurde durch keine der Behandlungen signifikant zur Kontrolle beeinflusst (Abbildung 54B). Bei den beiden ICAD-Proteinen zeigte sich eine Induktion bei Konzentrationen von 0,1 und 1 μ g/ml CHX, während die relative Proteinmenge in der höchsten CHX-Konzentration wieder auf Niveau der Lösungsmittelkontrolle lag. Für ICAD-L (Abbildung 54C) zeigten sich keine statistisch signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrolle und für ICAD-S (Abbildung 54D) bewirkte die Inkubation der Hepatozyten mit 1 μ g CHX/ml eine statistisch hochsignifikante Erhöhung der relativen Proteinmenge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Weder für ICAD-L noch für ICAD-S zeigten sich Effekte durch die Koinkubation mit TCDD.

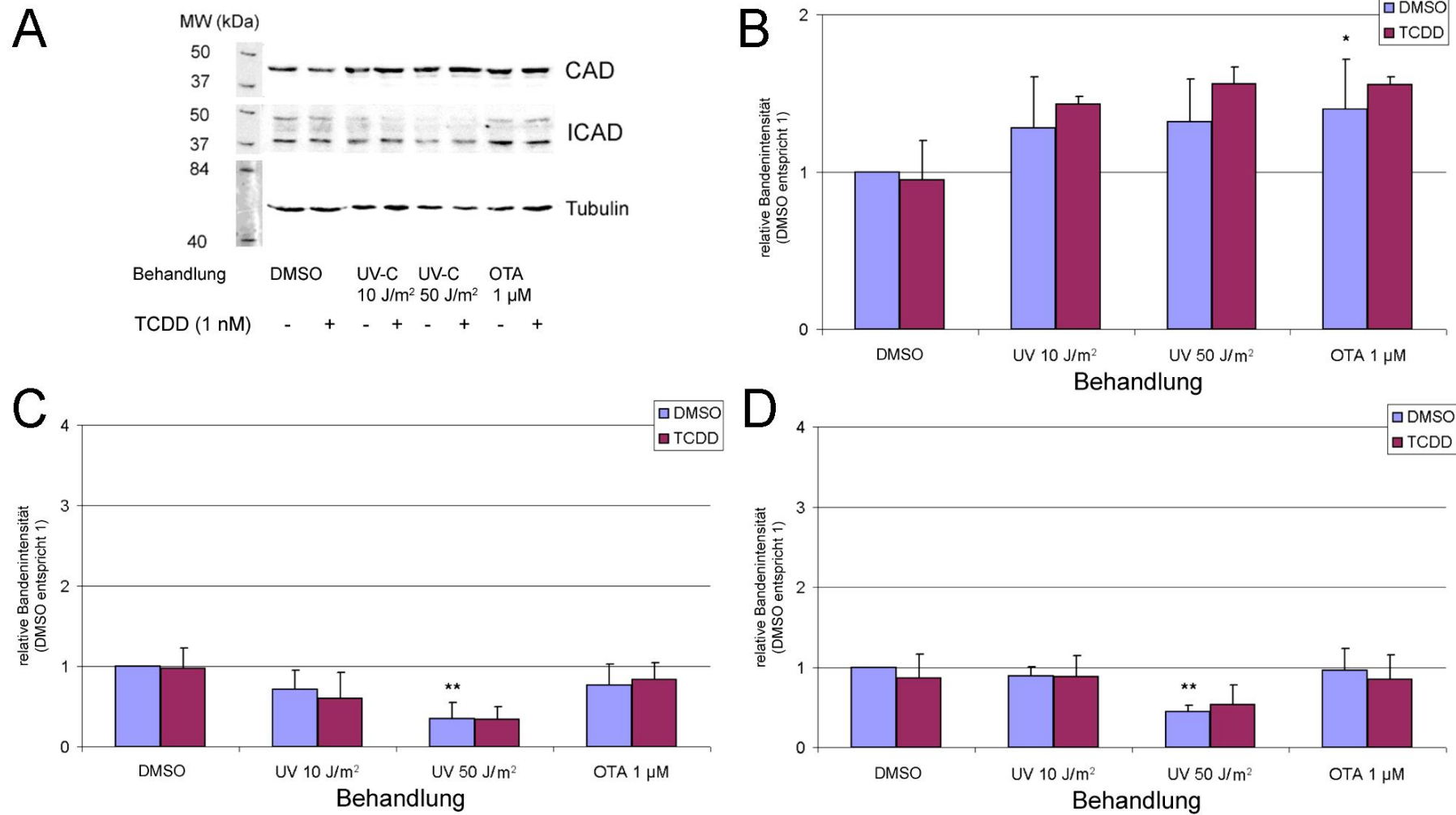


Abbildung 52: Western blot CAD und ICAD (UV, OTA und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 oder 50 J/m² bestrahlt oder mit 1 µM OTA behandelt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. DMSO vs. OTA: *one-tailed unpaired student's t-test*, * p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung CAD. C: Densitometrische Auswertung ICAD-L. D: Densitometrische Auswertung ICAD-S.

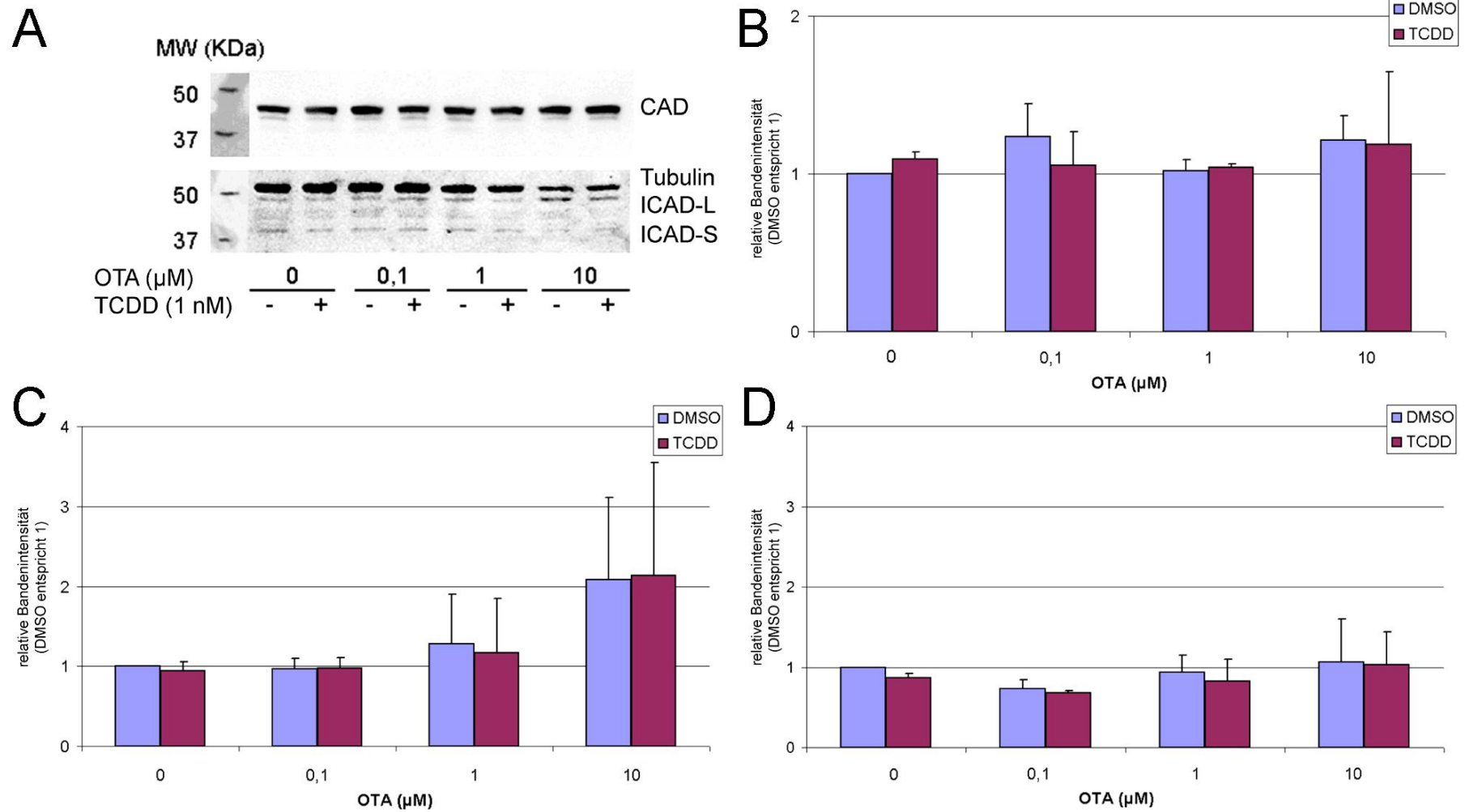


Abbildung 53: Western blot CAD und ICAD (OTA und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit OTA alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung CAD. C: Densitometrische Auswertung ICAD-L D: Densitometrische Auswertung ICAD-S.

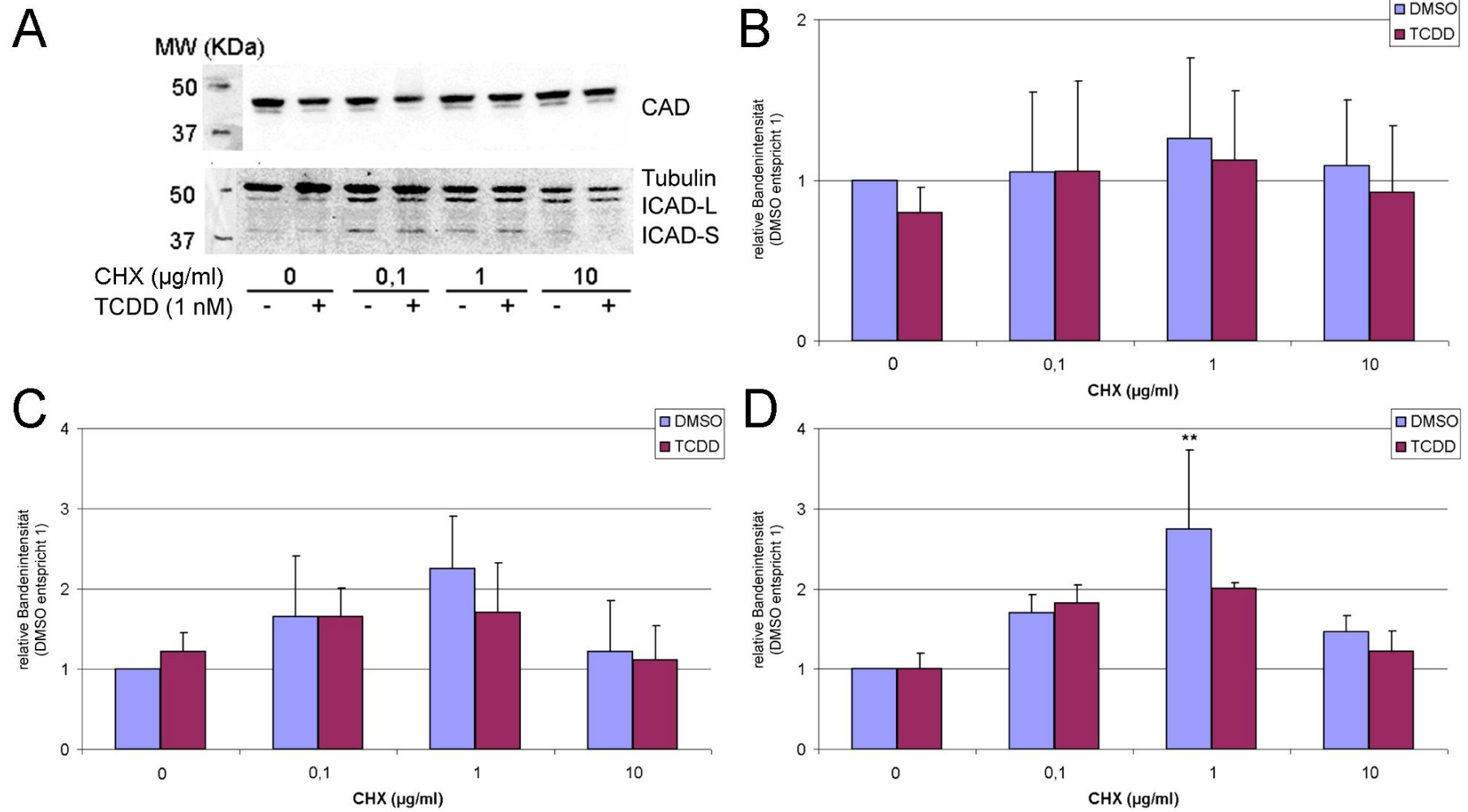


Abbildung 54: Western blot CAD und ICAD (CHX und TCDD). Primäre Rattenhepatozyten wurden mit CHX alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung CAD. C: Densitometrische Auswertung ICAD-L D: Densitometrische Auswertung ICAD-S.

4.1.10 Proteinbiosynthese

Cycloheximid ist ein bekannter Hemmstoff der eukaryotischen Protein-Biosynthese und auch für Ochratoxin A ist beschrieben, dass diese Substanz mit der Protein-Biosynthese interferiert (Obrig et al., 1971; Creppy et al., 1990; Bennett und Klich, 2003). Um zu untersuchen, ob diese beiden Substanzen in primären Hepatozyten die Proteinsynthese hemmen, wurden die Zellen mit den beiden Testsubstanzen alleine, sowie in Kombination mit 1 nM TCDD für 24 h inkubiert. Um die Proteinbiosynthese quantitativ bestimmen zu können, wurde der Einbau von [4,5-³H]-L-Leucin untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Leucin mit den Testsubstanzen inkubiert, die Proteine wurden gefällt und im Szintillationszähler vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der Proben normiert.

In einem zweiten Schritt wurden behandelte Zellen lysiert und mit dem Lysat wurden Western blot Experimente gegen CYP1A1 und Tubulin als Beladungskontrolle durchgeführt.

Die DMSO-Kontrolle zeigte einen Einbau der markierten Aminosäure von etwa 2500 cpm/mg Protein. OTA (Abbildung 55A) bewirkte eine Konzentrations-abhängige Abnahme des Einbaus, welcher bei 10 µM OTA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statistisch signifikant verringert war. Für keine der Behandlungen zeigte sich ein statistisch signifikanter Einfluss durch die Koinkubation mit TCDD in einer Konzentration von 1 nM.

Der Western blot für CYP1A1 zeigte erwartungsgemäß bei der DMSO-Kontrolle keine immunoreaktive Bande, die Behandlung der Zellen mit 1 nM TCDD bewirkte eine Induktion der CYP1A1-Proteinexpression. Dies wurde durch die Koinkubation mit OTA Konzentrations-abhängig gehemmt (Abbildung 55B). OTA in einer Konzentration von 1 µM bewirkte eine starke Abnahme der CYP1A1-Proteinmenge, während in höheren Konzentrationen keine CYP1A1-reaktiven Proteinbanden detektierbar waren. Die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 55C) spiegelte dieses Bild wider: die Inkubation der Zellen mit 1 µM OTA hemmte die Expression von CYP1A1 im Vergleich zur alleinigen TCDD-Inkubation statistisch hochsignifikant. Höhere OTA-Konzentrationen hemmten die CYP1A1-Expression auf der Protein-Ebene vollständig.

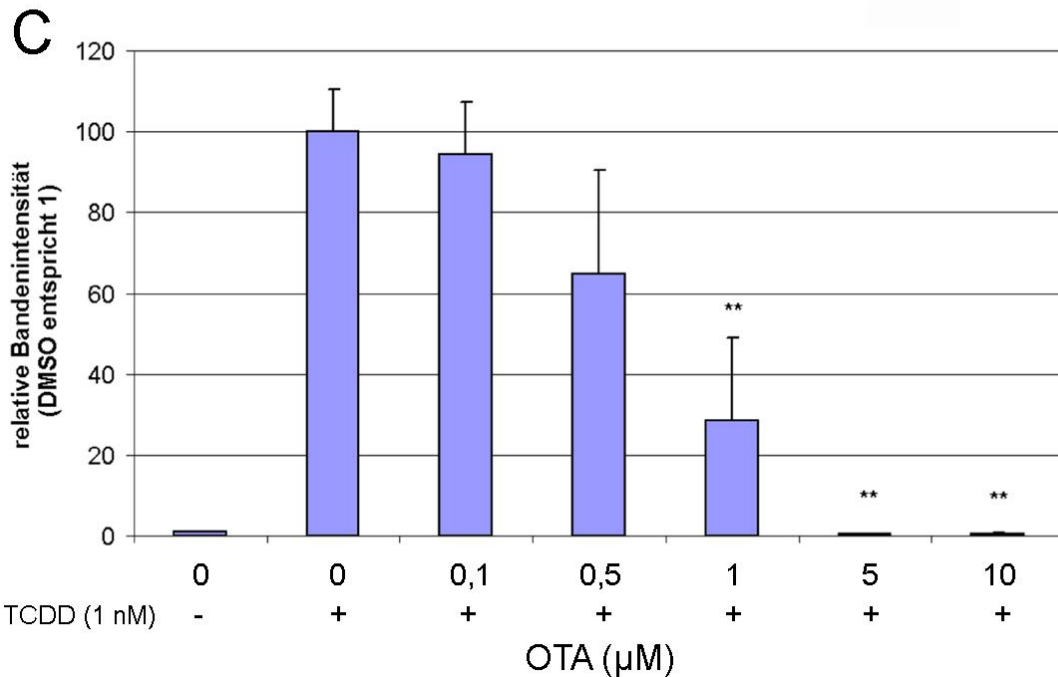
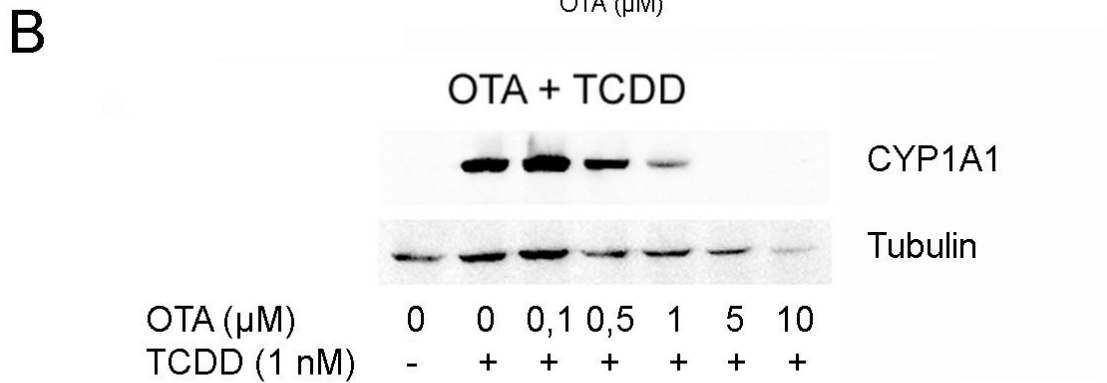
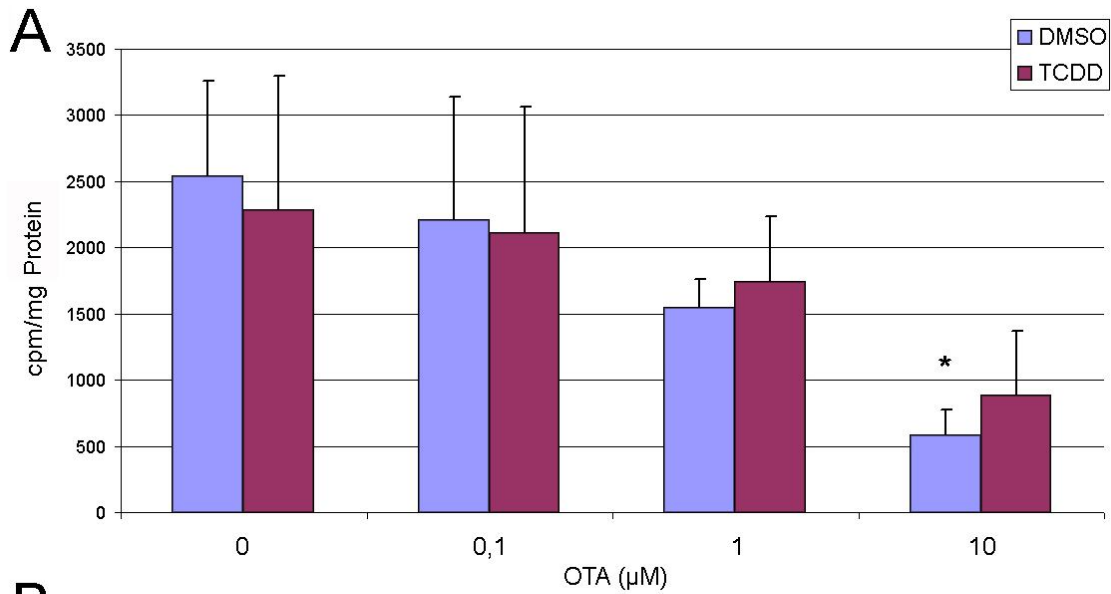


Abbildung 55: Hemmung der Proteinbiosynthese durch OTA. Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit OTA alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung/TCDD vs. TCDD+ OTA: *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. A: Einbau ³H-Leucin. B: Repräsentativer Western blot. C: Densitometrische Auswertung CYP1A1.

CHX (Abbildung 56A) bewirkte in allen eingesetzten Konzentrationen eine statistisch signifikant oder hochsignifikant verringerte Radioaktivität in den Proben im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Für keine der Behandlungen zeigte sich ein statistisch signifikanter Einfluss durch die Koinkubation mit TCDD in einer Konzentration von 1 nM.

Im Western blot bewirkte schon die niedrigste eingesetzte CHX-Konzentration von 0,1 µg/ml eine Abnahme der Bandenintensität für CYP1A1 (Abbildung 56B). Die densitometrische Auswertung der Banden (Abbildung 56C) zeigte, dass die Inkubation der Zellen mit 0,1 µg CHX/ml die Expression von CYP1A1 im Vergleich zur alleinigen TCDD-Inkubation statistisch hochsignifikant auf etwa 15% verringerte. Höhere CHX-Konzentrationen hemmten die CYP1A1-Expression auf der Proteinebene vollständig.

Sowohl OTA als auch CHX führten in Konzentrationen, in denen die Proteinbiosynthese durch diese beiden Substanzen gehemmt war, zu einer Verringerung der Tubulin-Proteinlevel in den Proben.

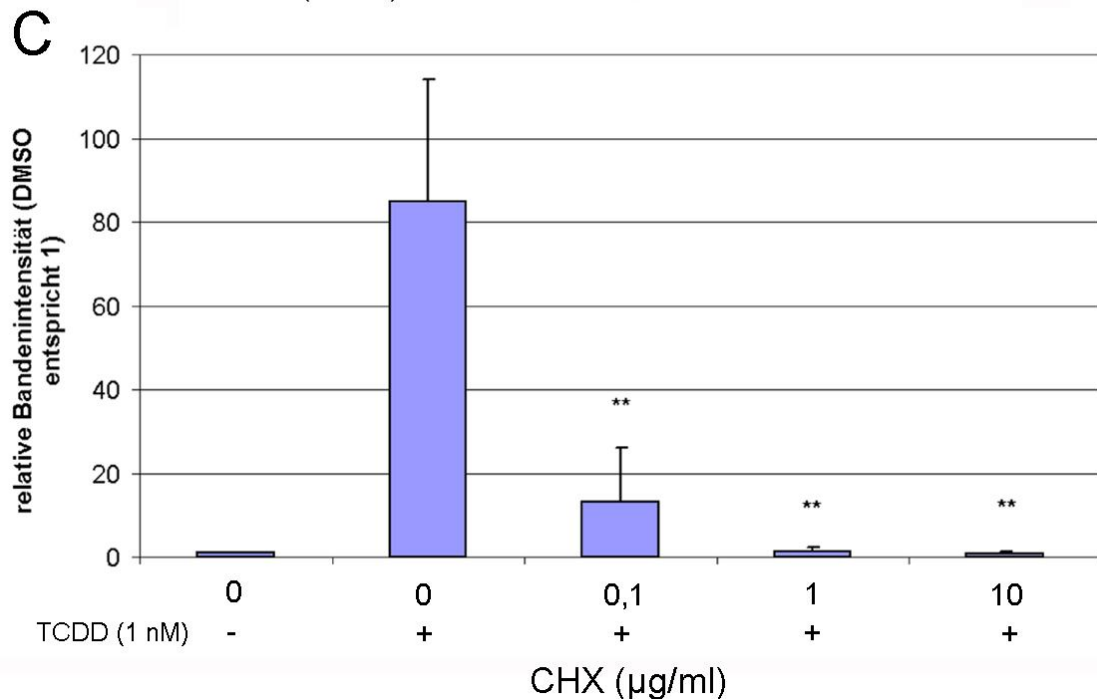
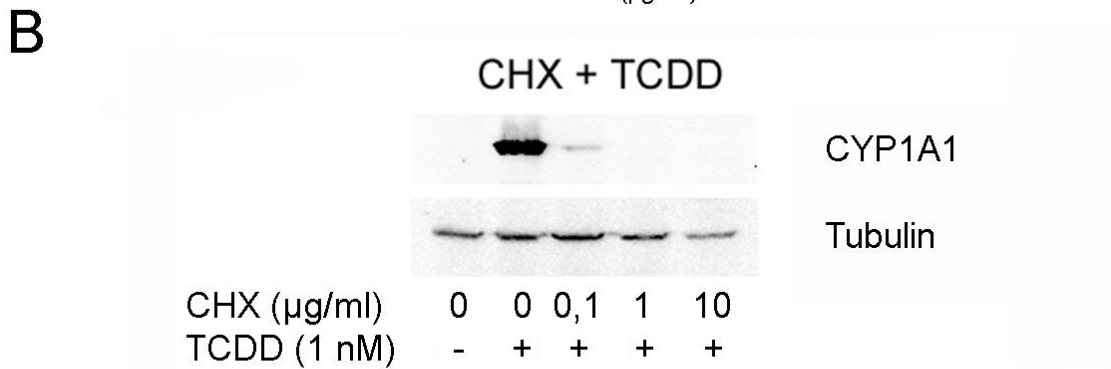
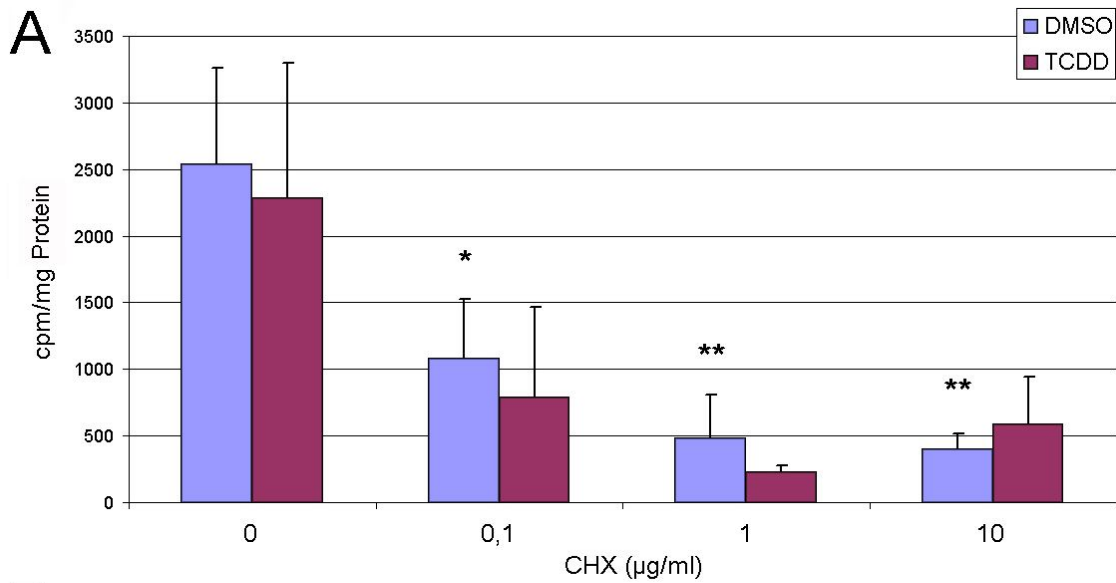


Abbildung 56: Hemmung der Proteinbiosynthese durch CHX. Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit CHX alleine oder in Kombination mit 1 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung/TCDD vs. TCDD + CHX: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. A: Einbau ³H-Leucin. B: Repräsentativer Western blot. C: Densitometrische Auswertung CYP1A1.

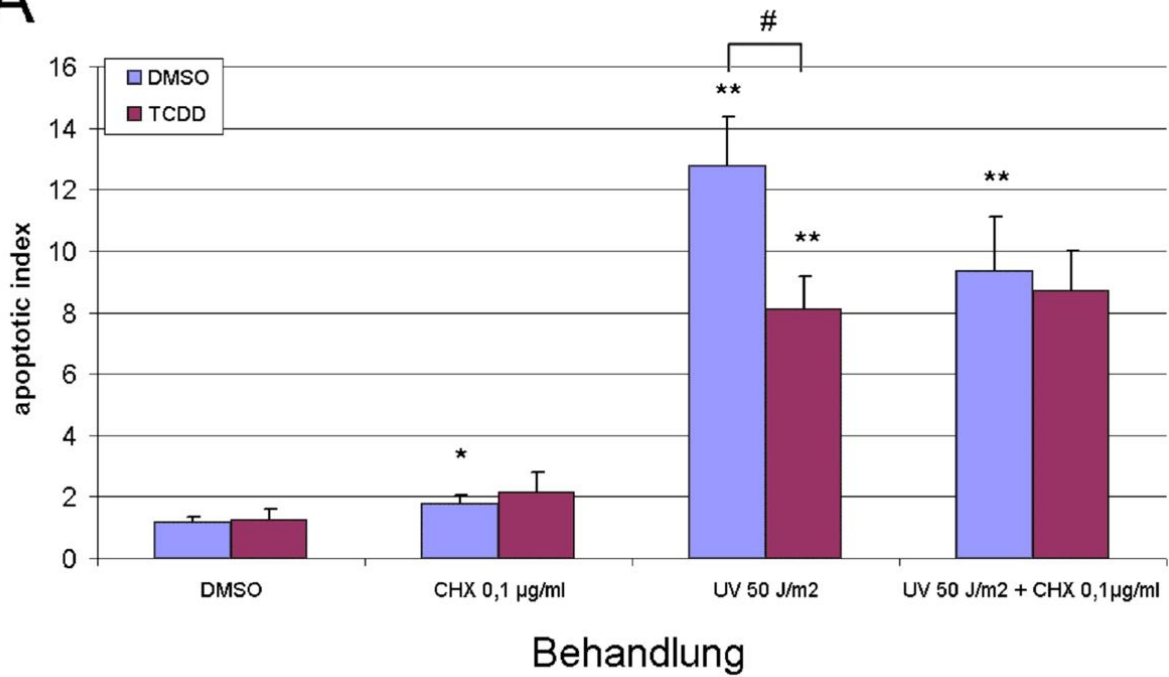
4.1.11 Einfluss von Cycloheximid auf die Hemmung der UVC-induzierten Apoptose durch TCDD

Um zu untersuchen, ob der Apoptose-hemmende Effekt von TCDD abhängig von einer Protein-Neusynthese ist, wurden Hepatozyten mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 bestrahlt und zusammen mit 1 nM TCDD und mit $0,1 \text{ } \mu\text{g CHX/ml}$ für 24 h inkubiert (Abbildung 57). Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, mit DAPI angefärbt und apoptotische Zellkerne wurden ausgezählt.

TCDD in einer Konzentration von 1 nM bewirkte keine Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu DMSO (Abbildung 57A). $0,1 \text{ } \mu\text{g CHX/ml}$ bewirkte eine geringe aber statistisch signifikante Induktion von Apoptose. TCDD hemmte die UVC-Licht induzierte Apoptose und auch die Inkubation bestrahlter Zellen mit CHX bewirkte eine Reduktion der apoptotischen Zellkerne im Vergleich zu Zellen, die nur bestrahlt worden waren. Die Koinkubation bestrahlter Zellen mit CHX und TCDD führte zu keiner additiven Reduktion der Apoptoserate.

Im nächsten Schritt wurde eine DNS-Fragmentierungsanalyse für die gleichen Behandlungen durchgeführt (Abbildung 57B). Die Behandlung der Zellen mit CHX alleine bewirkte eine leichte DNS-Leiter-Ausbildung. Während TCDD die UVC-Licht-induzierte DNA-Leiterbildung hemmte, bewirkte CHX alleine keinen solchen Effekt. Die Koinkubation bestrahlter Zellen mit TCDD und CHX bewirkte eine Reversion des Apoptose-inhibierenden Effektes durch TCDD.

A



B

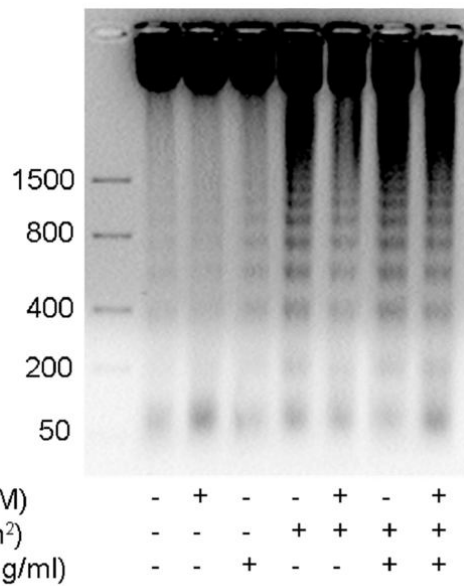


Abbildung 57: Einfluss von CHX auf TCDD-abhängige Apoptosehemmung. Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht (50 J/m²) bestrahlt und mit DMSO oder 1 nM TCDD in Kombination mit 0,1 µg CHX/ml für 24 h inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01; UV + Behandlung vs. UV + TCDD + Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, # ≤ 0,05. A: DAPI-Färbeexperimente. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*. B: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse UV, TCDD und CHX.

4.1.12 Apoptosis inducing factor (AIF) und Endonuklease G

Die Endonuklease G ist eine an der Apoptose beteiligte Nuklease. Dieses etwa 30 kDa große Protein liegt in intakten Zellen in den Mitochondrien vor. Apoptogene Stimuli führen zu einer Translokation der Nuklease in den Zellkern, wo sie chromosomale DNS internukleosomal fragmentiert (Samejima und Earnshaw, 2005; Ishihara und Shimamoto, 2006). Ursprünglich wurde für diese Nuklease beschrieben, dass sie im Kern lokalisiert ist (Ruiz-Carrillo und Renaud, 1987; Cote und Ruiz-Carrillo, 1993).

AIF ist eine im mitochondrialen Intermembranraum lokalisierte Oxidoreduktase. Im Zuge der Apoptose kann dieses 62 kDa große Protein proteolytisch in ein 57 kDa großes Fragment gespalten werden und die Mitochondrien verlassen (Lorenzo und Susin, 2007). Im Zellkern bewirkt AIF eine Caspase-unabhängige Grobkondensation des Chromatins mit einer Bildung von Fragmenten mit einer Größe von etwa 50 kbp. Es wird diskutiert, dass AIF die Funktion eines Kofaktors für apoptotische Nukleasen besitzt (Susin et al., 2000; Samejima und Earnshaw, 2005).

Zunächst wurde in einem Experiment geklärt, in welchen Kompartimenten die beiden Proteine AIF und Endonuklease G in unbehandelten primären Rattenhepatozyten lokalisiert sind (Abbildung 58). AIF ließ sich als eine Bande bei etwa 62 kDa in den Mitochondrien und als schwächere Bande bei etwa 57 kDa im Zytosol detektieren.

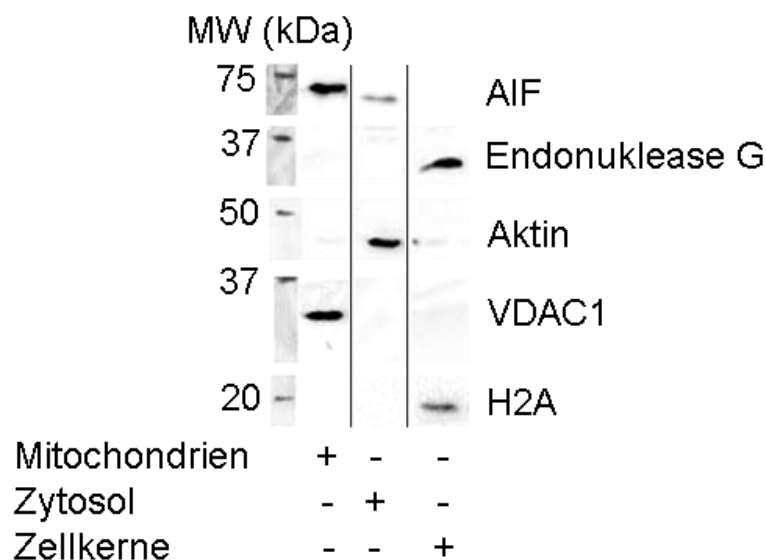


Abbildung 58: Western blot AIF und Endonuklease G in unbehandelten primären Hepatozyten.

Endonuklease G konnte nur im Zellkern detektiert werden, und zwar nur, wenn die isolierten Zellkerne mit Lysispuffer mit 1% SDS, nicht aber mit Lysispuffer mit 0,1% Triton X-100 lysiert worden waren. Als Kontrollen für die einzelnen Fraktionen dienten Aktin (Zytosol), VDAC1 (Mitochondrien) und Histon 2A (Zellkerne). In keiner der Fraktionen zeigten sich jeweils die anderen Banden.

Um zu klären, ob AIF im Zuge der UVC-Licht induzierten Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt wird und ob TCDD hierauf einen Einfluss besitzt, wurden primäre Hepatozyten bestrahlt und im Anschluss für 24 h mit 1 nM TCDD oder DMSO inkubiert. Nach der Inkubation wurden aus den Zellen die mitochondriale sowie die zytosolische Fraktion isoliert und mittels Western blot auf die Anwesenheit von AIF untersucht. In Abbildung 59A ist ein exemplarischer blot gegen AIF abgebildet.

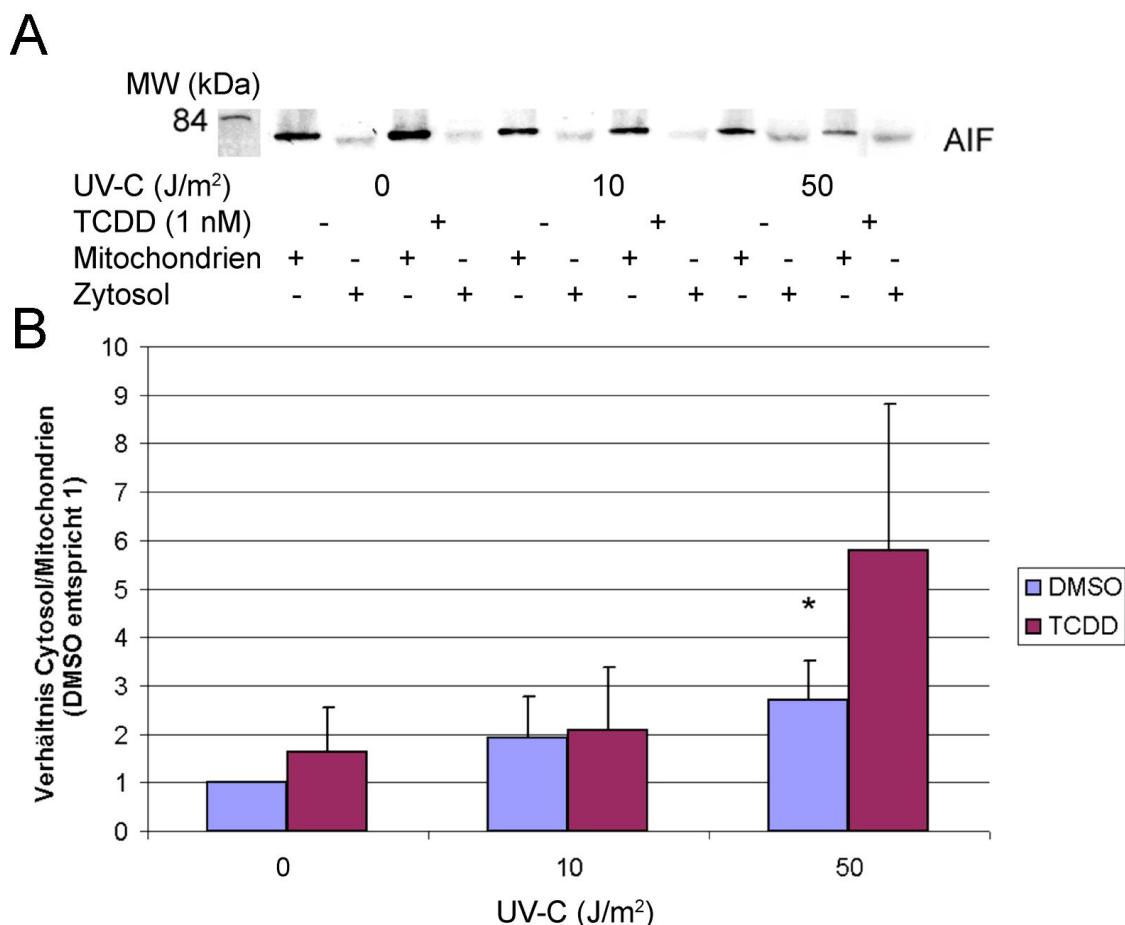


Abbildung 59: Western blot AIF (Mitochondrien und Zytosol, UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 oder 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung AIF.

Die UV-Bestrahlung bewirkte eine Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien und die Intensität der Bande bei 62 kDa nahm mit steigender UV-Dosis ab. Insbesondere für die hohe UV-Dosis lies sich eine Zunahme der Intensität der Banden im Zytosol beobachten. Abbildung 59B zeigt die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten. Es wurde jeweils das Verhältnis der Intensitäten zwischen den beiden Fraktionen ermittelt und auf das Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle bezogen. Die Bestrahlung mit der hohen UV-Dosis bewirkte eine statistisch signifikante Erhöhung des Verhältnisses der Bandenintensitäten und damit eine Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Koinkubation mit TCDD bewirkte keine signifikanten Effekte, erhöhte jedoch die Freisetzung dieses Proteins aus den Mitochondrien ins Zytosol in allen Behandlungen.

Es wurde als nächstes untersucht, ob die pro-apoptotischen Stimuli UVC-Strahlung, OTA und CHX einen Einfluss auf die Proteinlevel der Endonuklease G im Zellkern besitzen und ob TCDD einen modulierenden Einfluss hierauf besitzt. Hierzu wurden Zellkerne aus behandelten Zellen isoliert und im Western blot auf den Gehalt an Endonuklease G untersucht. Die Bestrahlung der Primärhepatozyten mit UVC-Licht bewirkte in der hohen Dosis eine Reduktion der Endonuklease G-Proteinlevel während die Koinkubation mit TCDD jeweils keinen Effekt bewirkte (Abbildung 60A). Dies war in den verschiedenen Tieren unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb die densitometrische Auswertung hohe Standardabweichungen zeigte (Abbildung 60B). Zum Teil zeigte sich eine Reduktion der Endonuklease G-Proteinlevel durch TCDD bei allen Behandlungen in einzelnen Tieren.

Bei den Behandlungen mit OTA zeigte sich, dass dieses Mykotoxin zu einer Konzentrations-abhängigen Verminderung der relativen Endonuklease G-Proteinmenge in den Zellkernen führte. TCDD modulierte diesen Effekt nicht konsistent, bewirkte aber generell eine Erhöhung der Endonuklease G-Proteinlevel (Abbildung 61A und B).

Die Experimente mit CHX zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit dieser Substanz ebenso wie mit OTA zu einer Konzentrations-abhängigen Abnahme der relativen Endonuklease G-Proteinmenge führte. TCDD besaß hier keinen modulierenden Einfluss (Abbildung 62A). Dies wurde auch durch die densitometrische Auswertung der Banden deutlich (Abbildung 62B).

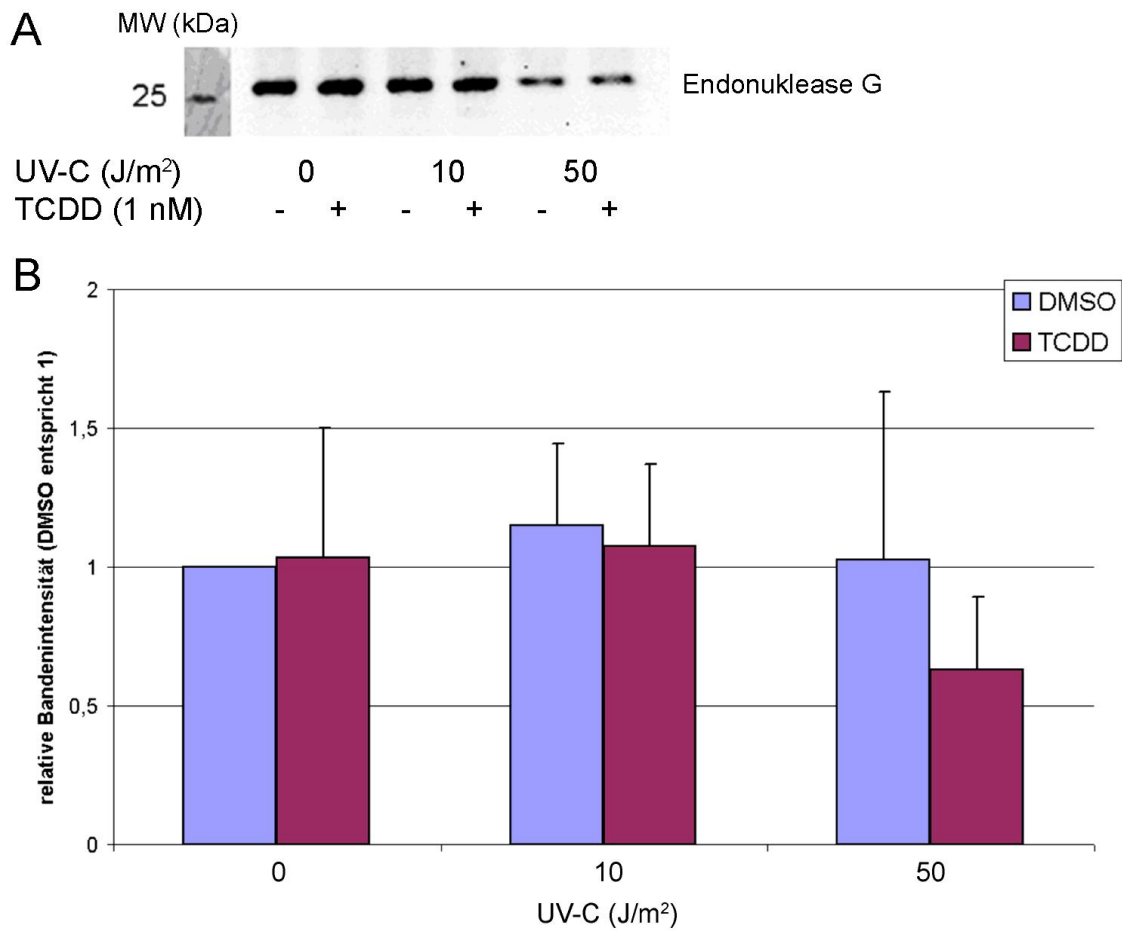


Abbildung 60: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, UV und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 oder 50 J/m^2 bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD inkubiert. n = 3. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Endonuklease G.

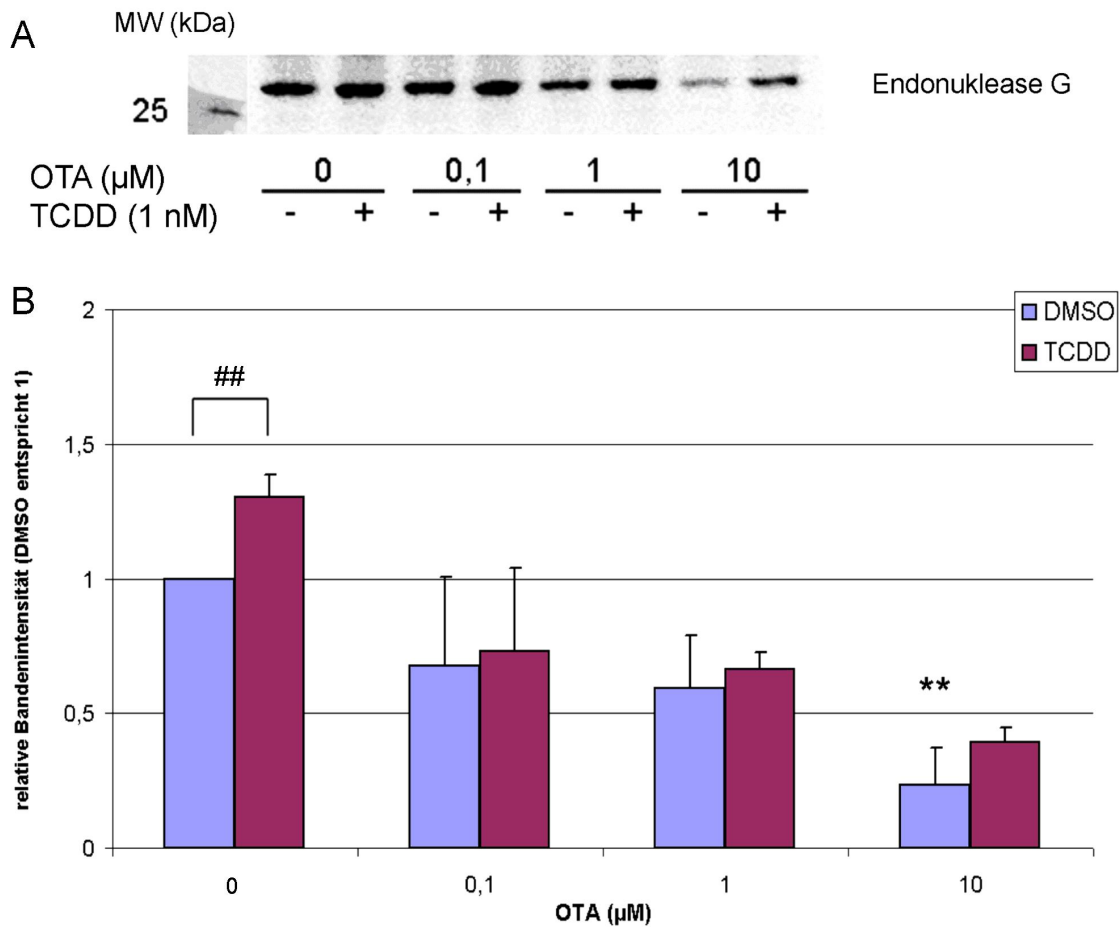


Abbildung 61: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, OTA und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit OTA alleine oder in Kombination mit TCDD inkubiert. $n = 3$. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** $p \leq 0,01$. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, ## $p \leq 0,01$. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Endonuklease G.

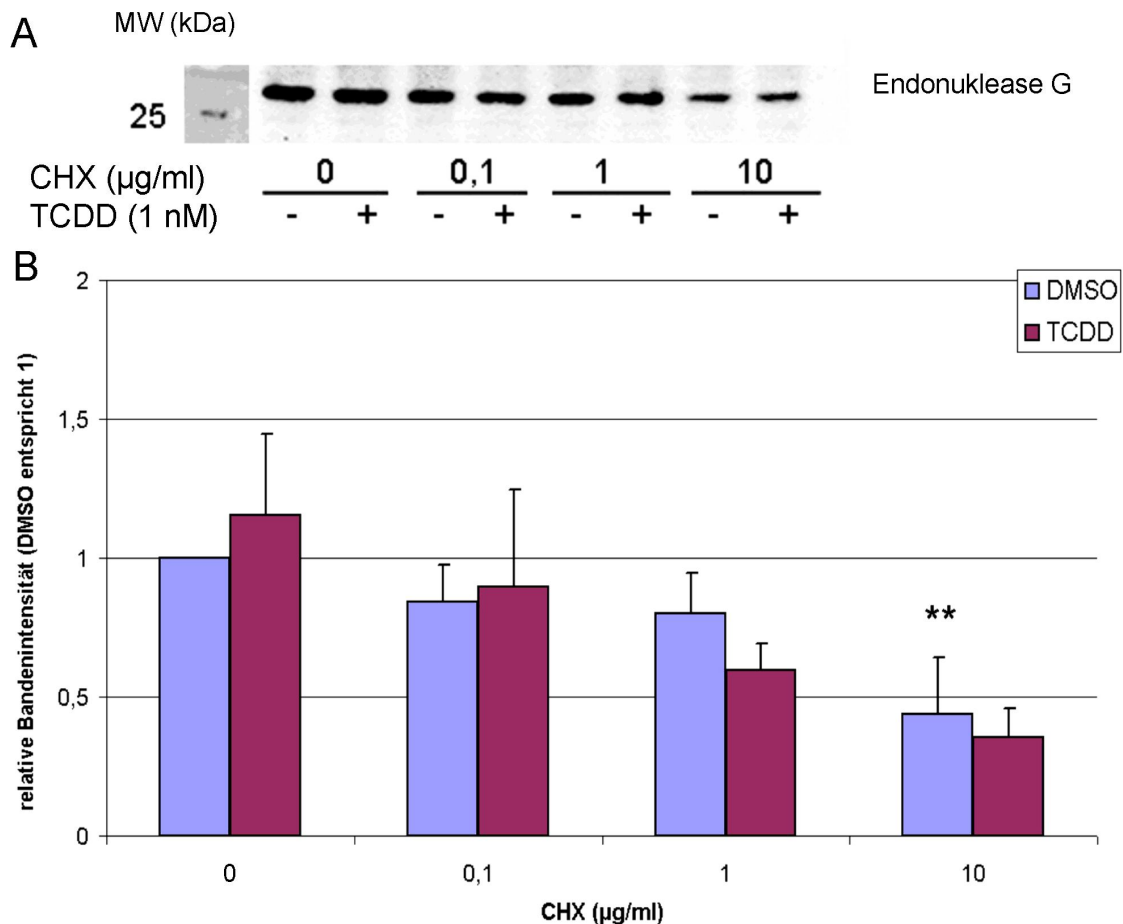


Abbildung 62: Western blot Endonuklease G (Zellkerne, CHX und TCDD). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit CHX alleine oder in Kombination mit TCDD inkubiert. $n = 3$. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, ** $p \leq 0,01$. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung Endonuklease G.

4.1.13 *In vitro* CAD Aktivitätstest

Um zu untersuchen, ob TCDD direkt oder indirekt die Aktivität der apoptotischen Nuklease CAD beeinflusst, wurde ein *in vitro* Aktivitätstest für CAD durchgeführt. Hierzu wurden isolierte Zellkerne unterschiedlich behandelter Hepatozyten sowie isolierte genomische DNS mit rekombinant exprimiertem DFF-Komplex (Meiss et al., 2001) inkubiert. Der DFF Komplex wurde hierzu zunächst mit rekombinanter Caspase 3 aktiviert und im Anschluss wurde die nun aktive CAD zu den Kernen bzw. zu der isolierten DNS gegeben. Nach Inkubation des Ansatzes bei 37°C wurde die fragmentierte DNS in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle für die CAD-Aktivität wurde zusätzlich der Verdau eines pBSK- oder eines pDrive Plasmids untersucht. Der DFF-Komplex ohne Aktivierung durch Caspase 3 diente jeweils als negative Kontrolle.

Abbildung 63 zeigt einen Western blot gegen CAD und ICAD vor und nach der Aktivierung des DFF-Komplexes durch Caspase 3. CAD zeigte sich als immunoreaktive Bande bei etwa 40 kDa bzw. als GST-Fusionsprotein bei etwa 66 kDa (das GST-tag hat eine Größe von 26 kDa). ICAD lag vor der Spaltung durch Caspase 3 als 45 kDa großes Protein vor, nach der Inkubation mit Caspase 3 wurde es in mindestens zwei Fragmente gespalten. Die Menge an intaktem ICAD nahm durch die Inkubation mit Caspase 3 stark ab.

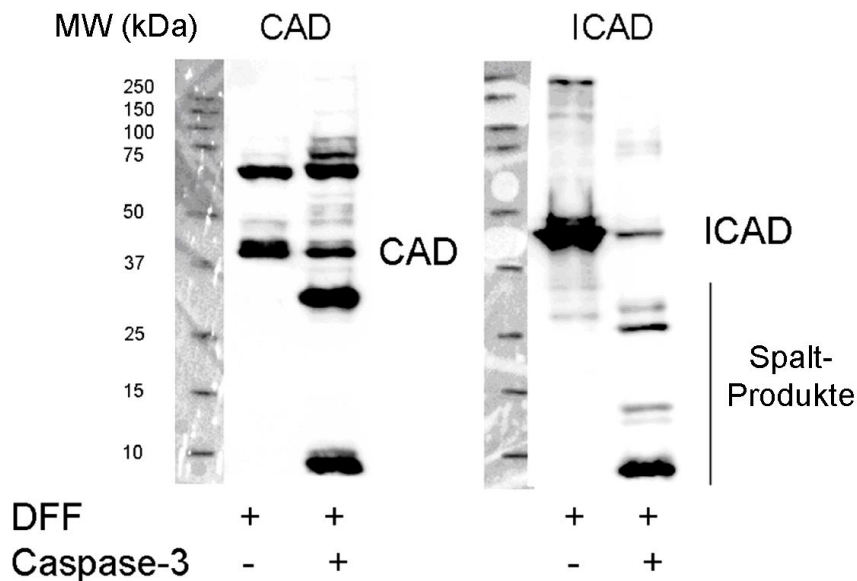


Abbildung 63: Western blot des DFF-Komplexes vor und nach Aktivierung durch Caspase 3. Immunodetektion von CAD und ICAD.

Abbildung 64 zeigt den Verdau isolierter genomischer DNS durch 15 nM DFF (Abbildung 64A) bzw. 50 nM DFF (Abbildung 64B) für 1 h. Dem Ansatz wurde TCDD in Konzentrationen von 0,1 bis 100 nM zugegeben, um zu untersuchen, ob TCDD direkt die Aktivität der CAD beeinflusst.

Zur Kontrolle der CAD-Aktivität wurde ein pBSK-Plasmid mit nicht aktiviertem bzw. aktiviertem DFF-Komplex inkubiert. Wie sich zeigte, waren 15 nM DFF im Gegensatz zu 50 nM DFF nicht ausreichend, um das Plasmid vollständig zu verdauen.

Ohne Aktivierung des DFF-Komplexes kam es zu keiner Fragmentierung der isolierten genomischen DNS. Es zeigte sich nur eine Bande, welche hochmolekulare DNS repräsentierte. Die Aktivierung des DFF-Komplexes bewirkte eine starke Fragmentierung der DNS ohne Ausbildung eines bestimmten Bandenmusters. Die niedrige DFF-Konzentration bewirkte einen weniger stark ausgeprägten Verdau der DNS als die hohe Konzentration. Keine der verwendeten TCDD-Konzentrationen modulierte die Aktivität der rekombinaten CAD.

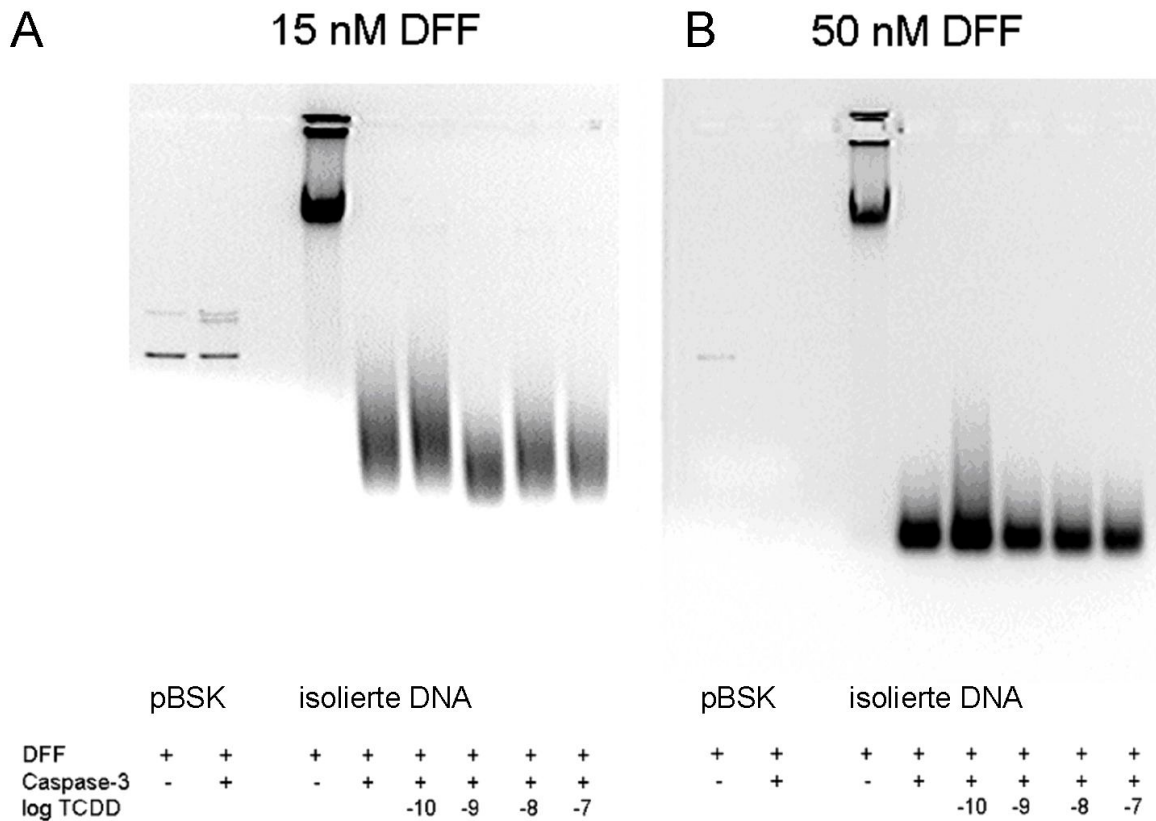


Abbildung 64: CAD Aktivitätstest (genomische DNS und TCDD). Die Verdauungen wurden in Anwesenheit von 0,1 bis 100 nM TCDD durchgeführt. Der Verdau eines pBSK-Plasmids diente als Kontrolle. A: Verdau für 1 h mit 15 nM DFF. B: Verdau für 1 h mit 50 nM DFF.

In Abbildung 65 ist ein Verdau isolierter Zellkerne mit 15 nM aktiviertem DFF-Komplex für 2 h (Abbildung 65A) sowie ein Verdau mit 250 nM DFF für 1 h (Abbildung 65B) dargestellt. Für das pBSK-Plasmid zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei dem Experiment mit isolierter genomischer DNS. Die niedrige DFF-Konzentration war im Gegensatz zu der hohen Konzentration nicht ausreichend, um das Plasmid komplett zu verdauen.

Die Inkubation der Zellkerne ohne Aktivierung des DFF-Komplexes durch Caspase 3 führte zu keiner DNS-Leiter-Bildung. Durch die hohe DFF-Konzentration kam es zur Ausbildung einer klar sichtbaren DNS-Leiter, die bei der niedrigeren DFF-Konzentration sichtbar, aber weniger ausgeprägt war. Die Behandlung der Zellen mit TCDD für 24 h vor der Isolierung der Zellkerne hatte keinen Einfluss auf die internukleosomale DNS-Fragmentierung durch exogene CAD.

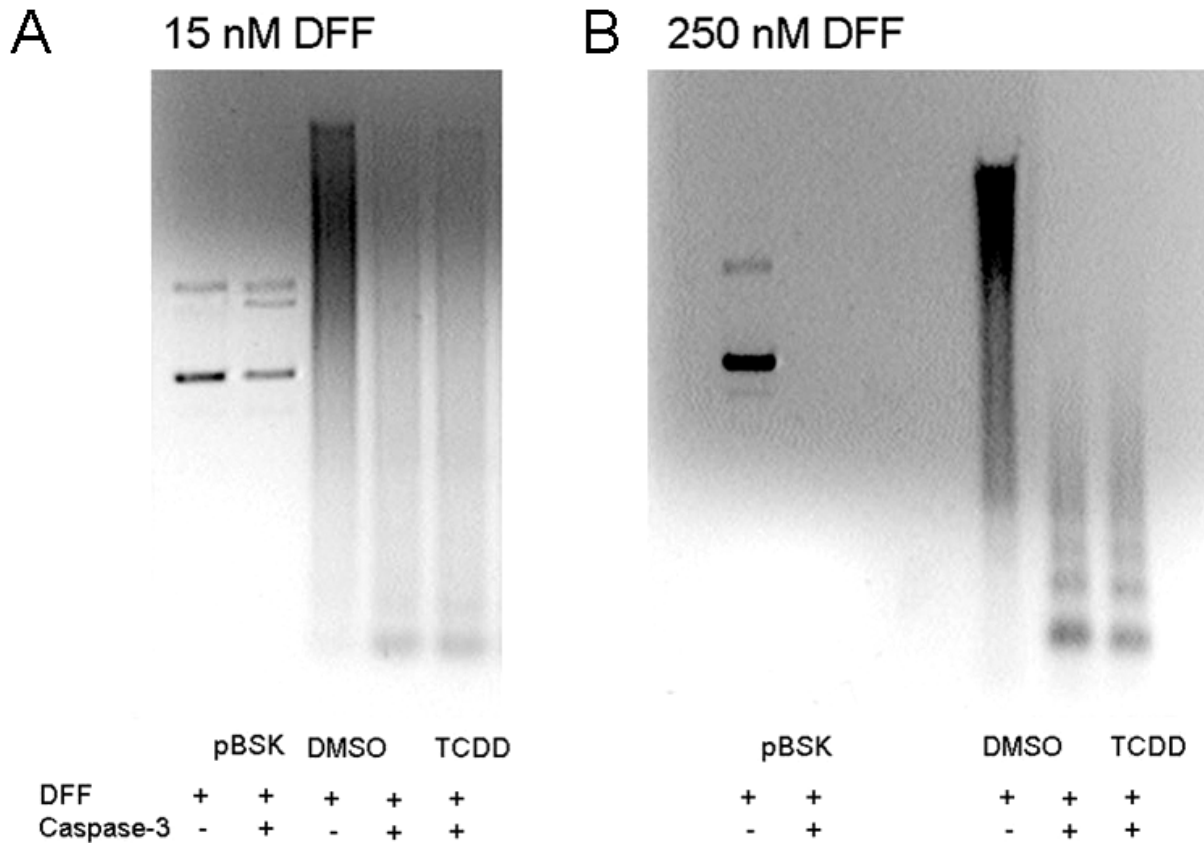


Abbildung 65: CAD Aktivitätstest (Zellkerne DMSO/TCDD 24 h). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit DMSO oder 1 nM TCDD behandelt. Der Verdau eines pBSK-Plasmids diente als Kontrolle. A: Verdau für 2 h mit 15 nM DFF. B: Verdau für 1 h mit 250 nM DFF.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, in wie weit die Induktion der Apoptose, vor der eigentlichen, durch die Behandlung induzierten Ausbildung einer DNS-Leiter, einen Einfluss auf die Aktivität exogener CAD besitzt. Hierzu wurden Kerne aus Zellen isoliert, die eine Stunde nach UVC-Bestrahlung in einer Dosis von 50 J/m^2 geerntet worden waren. Bestrahlte Zellen wurden mit DMSO, 1 nM TCDD bzw. einer Kombination aus TCDD und dem AhR-Antagonisten CH-223191 behandelt. Abbildung 66 zeigt exemplarische Gele für den Verdau von Zellkernen mit 50 nM DFF (Abbildung 66A) bzw. 250 nM DFF (Abbildung 66B) für jeweils 1 h. Als Plasmid-Kontrolle wurde ein pDrive Vektor mit aktiviertem DFF-Komplex inkubiert. Sowohl 50 nM als auch 250 nM DFF waren ausreichend, um das Plasmid vollständig zu verdauen.

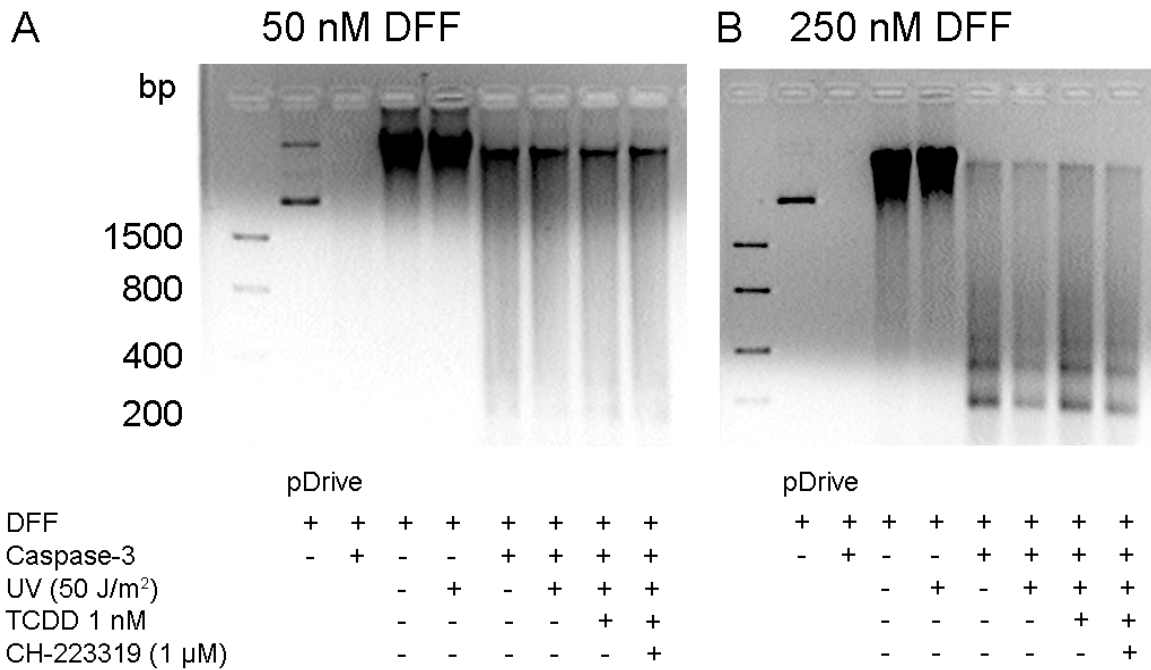


Abbildung 66: CAD Aktivitätstest (Zellkerne UV, TCDD, CH-223191 1 h). Primäre Hepatozyten wurden mit 50 J/m² UVC-Licht bestrahlt und für 1 h mit DMSO, 1 nM TCDD, 1 μM CH-223191 sowie Kombinationen der Substanzen behandelt. Der Verdau eines pDrive-Plasmids diente als Kontrolle. A: Verdau für 1 h mit 50 nM DFF. B: Verdau für 1 h mit 250 nM DFF.

Es zeigte sich, dass keiner der Verdaue mit nicht aktiviertem DFF-Komplex internukleosomale DNS-Spaltung bewirkte. Nach DFF-Aktivierung ließ sich für alle Behandlungen eine charakteristische DNS-Leiter-Formation zeigen. Dies war bei der Inkubation mit 50 nM DFF weniger stark ausgeprägt als mit 250 nM DFF. Keine der Behandlungen bewirkte eine Änderung des Chromatin-Fragmentierungsmusters.

Bei der Durchführung des CAD Aktivitätstests fiel auf, dass auch in Abwesenheit rekombinanter CAD durch Inkubation isolierter Zellkerne für 1 h bei 37°C internukleosomale DNS-Spaltung auftrat, wenn der Waschschrift bei der Isolierung der Zellkerne statt mit PBS mit Kernisolierungspuffer durchgeführt wurde. Diese Nukleaseaktivität wurde weiter charakterisiert: es zeigte sich, dass diese Nukleaseaktivität Calcium- und Magnesium-abhängig war (Abbildung 67). Die Nukleaseaktivität zeigte ein Maximum bei jeweils 5 mM Magnesium bzw. Calcium. In Abwesenheit von Magnesium (von 0,66 mM aus dem Kernisolierungspuffer abgesehen) oder Calcium zeigte sich keine DNS-Fragmentierung.

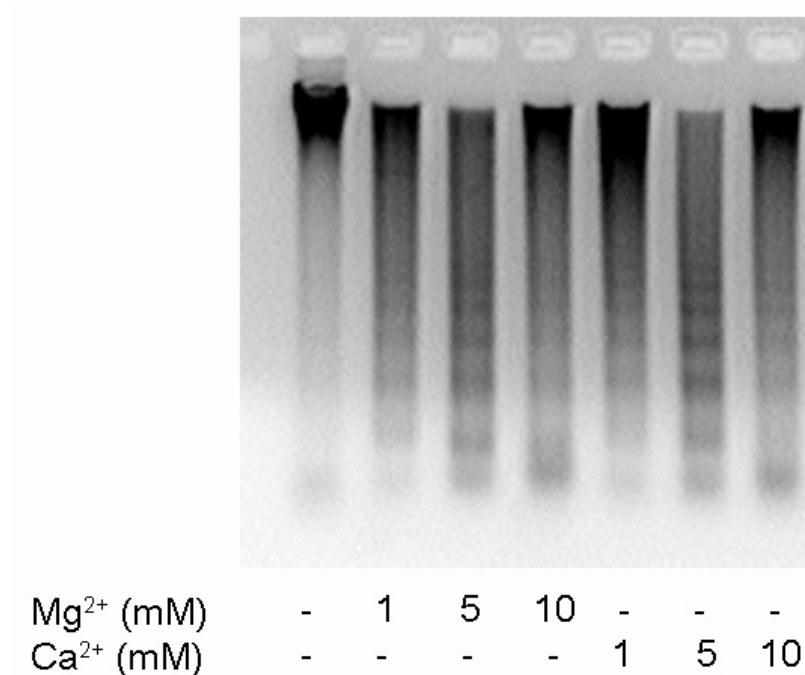


Abbildung 67: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 1 h, ohne CAD, Mg²⁺, Ca²⁺). Primäre Hepatozyten wurden für 1 h mit DMSO behandelt. Isolierte Zellkerne wurden für 1 h bei 37°C in Anwesenheit von Magnesiumchlorid oder Calciumchlorid inkubiert.

Wenn die Zellen für 24 h mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk inkubiert worden waren, war die Nuklease-Aktivität im Vergleich zu einer Behandlung mit DMSO leicht verringert. Im Gegensatz dazu bewirkte zVAD-fmk im Reaktionsansatz keine Hemmung der Nuklease-Aktivität (Abbildung 68).

Um zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche Behandlungen der Zellen vor der Isolierung der Zellkerne auf diese Nukleaseaktivität besitzen, wurden die Zellen mit UVC-Licht bestrahlt und für 1 h mit DMSO, TCDD sowie dem AhR-Antagonisten CH-223191 inkubiert. Nach Isolierung der Zellkerne und Inkubation dieser bei 37°C für 1 h wurde die DNS aus den Kernen isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 69). Hierbei zeigte sich, dass weder TCDD noch CH-223191 einen Einfluss auf die DNS-Fragmentierung besaßen. Die UV-Bestrahlung erhöhte die Nukleaseaktivität, welche durch TCDD wieder gehemmt wurde. CH-223191 führte zu keiner Reversion des hemmenden Effektes von TCDD auf die DNS-Fragmentierung. Die DNS-Fragmentierung resultierte nicht direkt aus den Behandlungen, da die DNS-Extraktion isolierter Kerne vor der Inkubation bei 37°C nur hochmolekulare DNS in der Gelelektrophorese aufwies.

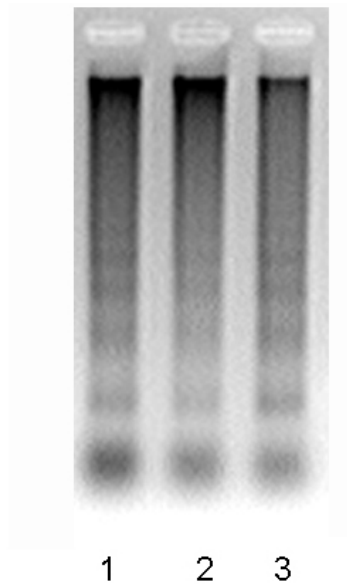
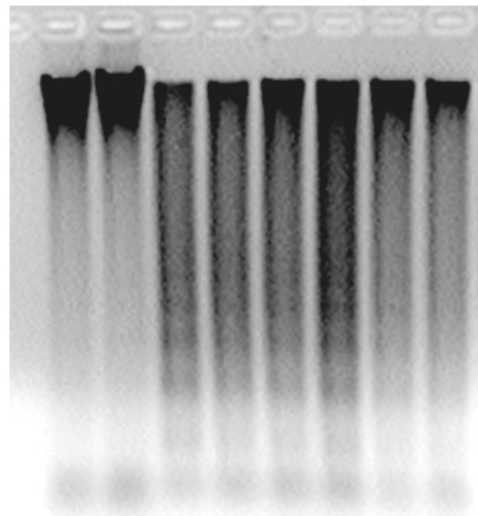


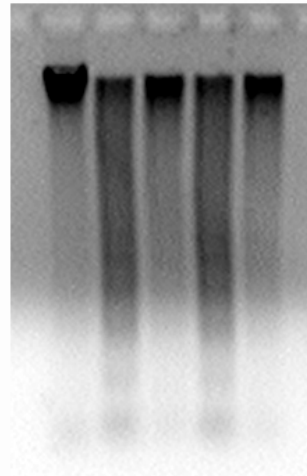
Abbildung 68: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO und zVAD-fmk). Primäre Hepatozyten wurden mit für 24 h mit DMSO oder zVAD-fmk behandelt. Isolierte Zellkerne wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Lanes: 1: DMSO; 2: zVAD-fmk (25 µM); 3: DMSO mit 25 µM zVAD-fmk im Reaktionsansatz.



1 h, 37°C	-	-	+	+	+	+	+	+
UV (50 J/m ²)	-	+	-	-	-	+	+	+
TCDD (1 nM)	-	-	-	+	-	-	+	+
CH-223191 (1 µM)	-	-	-	-	+	-	-	+

Abbildung 69: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 1 h, ohne CAD, UV, DMSO, TCDD, CH-223191). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m² bestrahlt und für 1 h mit DMSO, TCDD oder CH-223191 behandelt. Isolierte Zellkerne wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

Als nächstes wurden Zellkerne aus Zellen isoliert, die für 24 h mit DMSO, TCDD, dem AhR-Antagonisten CH-223191, sowie mit Kombinationen dieser Behandlungen inkubiert worden waren. Nach Durchführung des Versuchs zeigte sich, dass TCDD die Nukleaseaktivität im Vergleich zur DMSO-Behandlung stark unterdrückte. CH-223191 alleine hatte keinen Einfluss auf die Nukleaseaktivität. Der AhR-Antagonist hob die TCDD-bedingte Hemmung der Aktivität nicht auf (Abbildung 70).

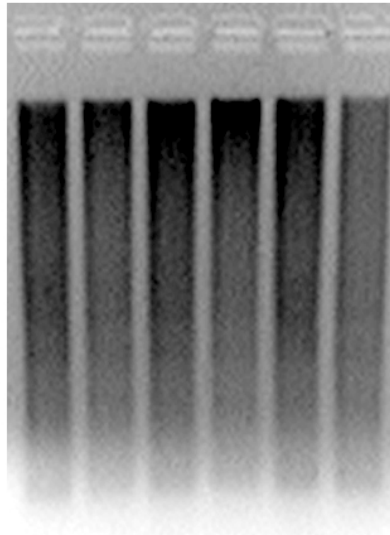


1 h, 37°C	-	+	+	+	+
TCDD 1 nM	-	-	+	-	+
CH-223191 1 µM	-	-	-	+	+

Abbildung 70: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO, TCDD, CH-223191). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit DMSO, TCDD oder CH-223191 behandelt. Isolierte Zellkerne wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

Um die gefundene Nukleaseaktivität weiter zu charakterisieren, wurden isolierte Zellkerne aus mit DMSO bzw. TCDD-behandelten Zellen mit Antikörpern gegen Endonuklease G oder CAD inkubiert (in Anwesenheit von 0,1% Triton X-100, um die Kernmembran zu permeabilisieren). Der Endonuklease G-Antikörper (Cell Signaling Technologies) ist gegen die Aminosäuren um die Position Cys122 humaner Endonuklease G gerichtet. Für die katalytische Aktivität dieser Nuklease sind die Aminosäuren in den Positionen 141, 163 und 172 besonders wichtig (Wu et al., 2009). Der CAD-Antikörper (Santa-Cruz) ist gegen das gesamte humane CAD-Protein gerichtet.

Abbildung 71 zeigt, dass die Inkubation der Zellen mit TCDD zu einer im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verringerten DNS-Fragmentierung führte. Keiner der beiden verwendeten Antikörper besaß eine Wirkung auf die DNS-Fragmentierung.



TCDD (1 nM)	-	+	-	+	-	+
EndoG-Ab	-	-	+	+	-	-
CAD-Ab	-	-	-	-	+	+

Abbildung 71: CAD Aktivitätstest (Zellkerne 24 h, ohne CAD, DMSO, TCDD, Endonuklease G-Antikörper, CAD-Antikörper). Primäre Hepatozyten wurden für 24 h mit DMSO oder TCDD behandelt. Isolierte Zellkerne wurden für 1 h bei 37°C inkubiert.

4.1.14 Histon 2AX-Phosphorylierung

Posttranslationale Veränderungen der Histone spielen eine Rolle bei einer Reihe physiologischer Prozesse (Jenuwein und Allis, 2001). Die Phosphorylierung des Histons 2AX am Serin-Rest 139 (γ H2AX) findet als Antwort auf das Auftreten von DNS-Doppelstrangbrüchen statt, sowohl nach genotoxischem Stress als auch im Zuge der apoptotischen DNS-Fragmentierung (Burma et al., 2001; Mukherjee et al., 2006). Diese Phosphorylierung wird nicht nur als Konsequenz apoptotischer DNA-Fragmentierung, sondern auch als eine Bedingung dafür diskutiert. Ferner wurde gezeigt, dass CAD mit phosphoryliertem H2AX interagiert und dass diese Wechselwirkung die Aktivität dieser Nuklease beeinflusst (Lu et al., 2006).

Um zu untersuchen, ob die H2AX-Phosphorylierung als Antwort auf UVC-Bestrahlung in primären Rattenhepatozyten stattfindet und ob TCDD einen Einfluss auf diese Phosphorylierung besitzt, wurden Western blot Experimente mit einem Antikörper gegen γ H2AX durchgeführt.

Primäre Hepatozyten wurden mit UV-C Licht in Dosen von 10 und 50 J/m² bestrahlt und mit DMSO oder 1 nM TCDD behandelt. Nach der Inkubation der Zellen für 1 bzw. 24 h wurden Western blot Experimente gegen phosphoryliertes H2AX und Tubulin als Beladungskontrolle durchgeführt. Abbildung 72A zeigt einen repräsentativen blot für dieses Experiment, Abbildung 72B und 72C die entsprechenden densitometrischen Auswertungen.

Es zeigte sich, dass unbestrahlte Zellen wenig γ H2AX aufwiesen. 1 h nach der Bestrahlung war der γ H2AX-Gehalt leicht erhöht. Die densitometrische Auswertung (Abbildung 72B) ergab eine Dosis-abhängige, statistisch nicht signifikante Steigerung des γ H2AX-Gehalts. TCDD besaß keinen Einfluss hierauf. Nach 24 h (Abbildung 72C) war dieser Effekt stärker ausgeprägt. Es zeigte sich eine Dosis-abhängige Induktion der Phosphorylierung dieses Proteins. Die Koinkubation mit TCDD bewirkte eine geringe, statistisch nicht signifikante Reduktion der γ H2AX-Gehalte bei beiden Strahlendosen.

Im nächsten Schritt wurden Zellen mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m² bestrahlt und für 24 Stunden mit DMSO, TCDD sowie dem AhR-Antagonisten CH-223191 behandelt. Abbildung 73A zeigt, dass UV-Strahlung zu einer starken Induktion der Histonphosphorylierung führte. TCDD besaß einen schwachen inhibierenden Effekt hierauf. Die Koinkubation mit dem AhR-Antagonisten bewirkte, dass die Phosphorylierung nahezu wieder auf das Niveau der DMSO-Kontrolle abfiel. Die densitometrische Auswertung in Abbildung 73B verdeutlicht diese Beobachtung.

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss eine Hemmung der Caspasen-Aktivitäten auf die UV-Licht induzierte H2AX-Phosphorylierung besitzt. Abbildung 74A zeigt ein repräsentatives Western blot Experiment. UV-Strahlung bewirkte H2AX-Phosphorylierung, welche komplett durch die Inhibierung der Caspasen-Aktivitäten mit zVAD-fmk gehemmt wurde. In Abbildung 74B ist die densitometrische Auswertung dieses Experiments wiedergegeben.

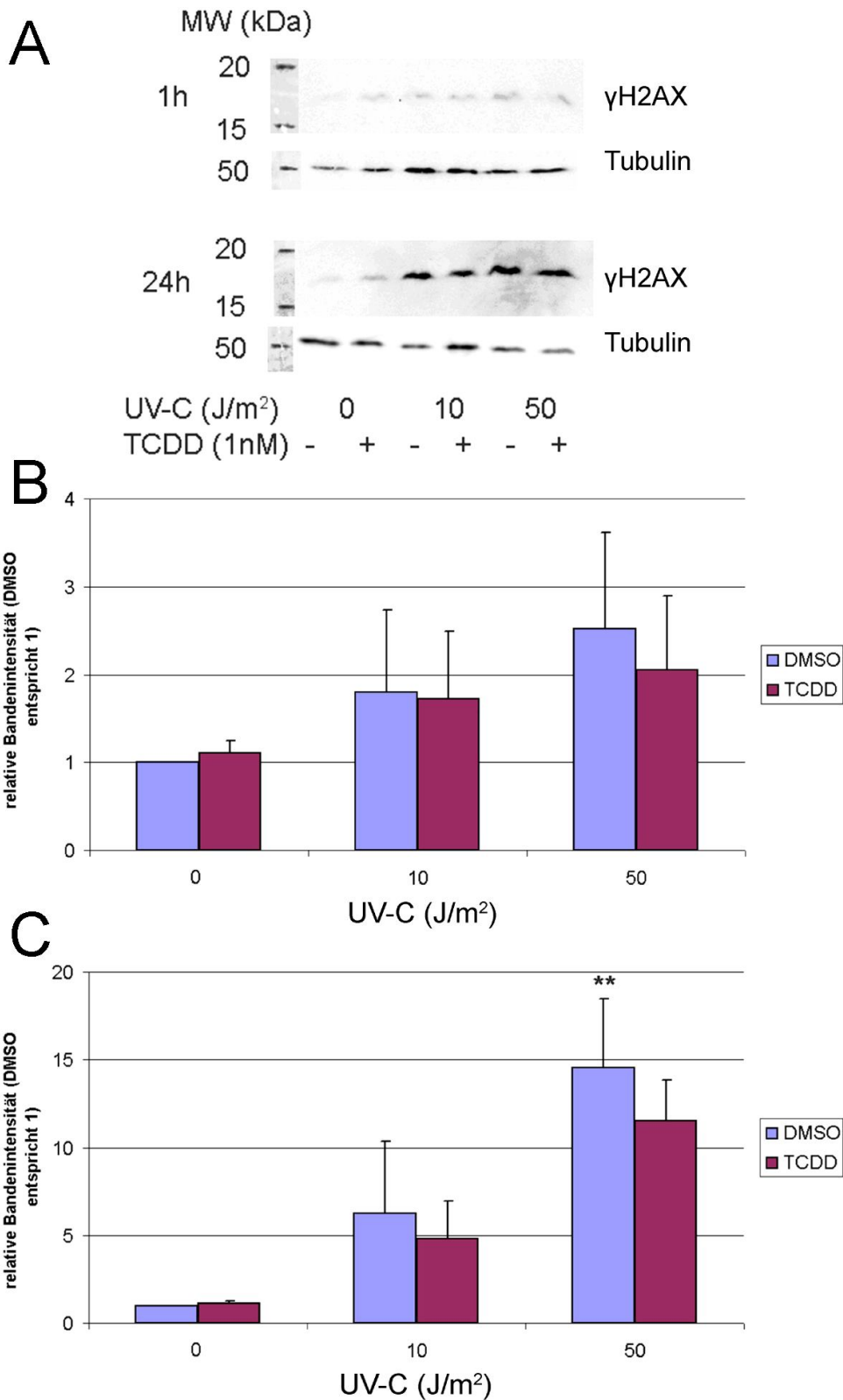


Abbildung 72: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV und TCDD, 1 h und 24 h). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und für 1 oder 24 h mit DMSO oder 1 nM TCDD inkubiert. $n = 3$. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** $p \leq 0,01$. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX 1 h. C: Densitometrische Auswertung γ H2AX 24 h.

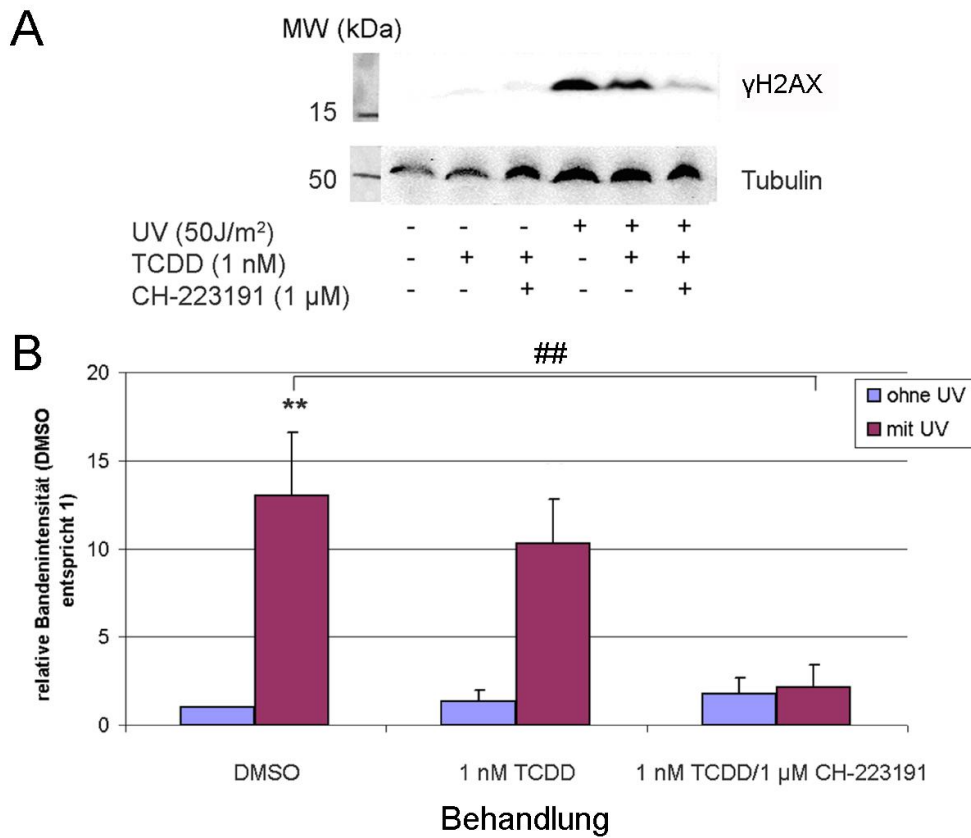


Abbildung 73: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV, TCDD und CH-223191). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO, 1 nM TCDD und/oder 1 μM CH-223191 inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01. UV vs. UV + TCDD + CH-223191: *one-tailed unpaired student's t-test*, ## p ≤ 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX.

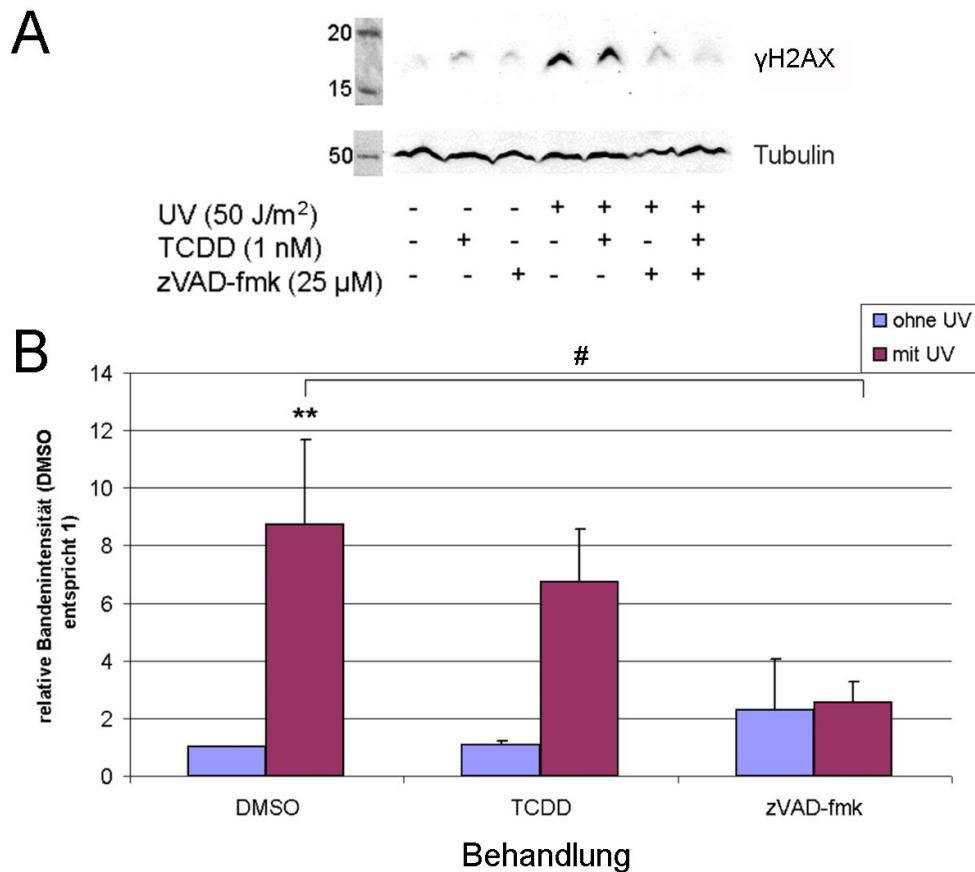


Abbildung 74: Western blot γ H2AX (primäre Hepatozyten, UV, TCDD und zVAD-fmk). Primäre Hepatozyten wurden mit UVC-Licht bestrahlt und für 24 h mit DMSO, 1 nM TCDD und/oder 25 μ M zVAD-fmk inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p \leq 0,01. UV vs. UV + zVAD-fmk: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p \leq 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX.

4.1.15 Einfluss von PARP-Inhibitoren auf die Hemmung der UVC-induzierten Apoptose durch TCDD

In einer Studie an menschlichen RKO Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass PARP mit CAD interagieren kann. Es wurde diskutiert, ob die Auto-PARYlierung von PARP für eine Hemmung der CAD-Aktivität verantwortlich sein könnte. Da CAD eine PAR-Erkennungsdomäne besitzt, wurde vorgeschlagen, dass diese Nuklease an PARYlierte Proteine bindet und somit nicht mehr in ausreichendem Maße für die Spaltung der genomischen DNS zur Verfügung steht (West et al., 2005).

TCDD induziert in verschiedenen Zellen und Geweben ein Enzym, das Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne von PARP besitzt (TCDD-inducible PARP, TiPARP) (Ma et al., 2001; Dere et al., 2006; Hockley et al., 2007; Boutros et al., 2008; Boutros et al., 2009). Daher besteht die Möglichkeit, dass es in Zellen, die

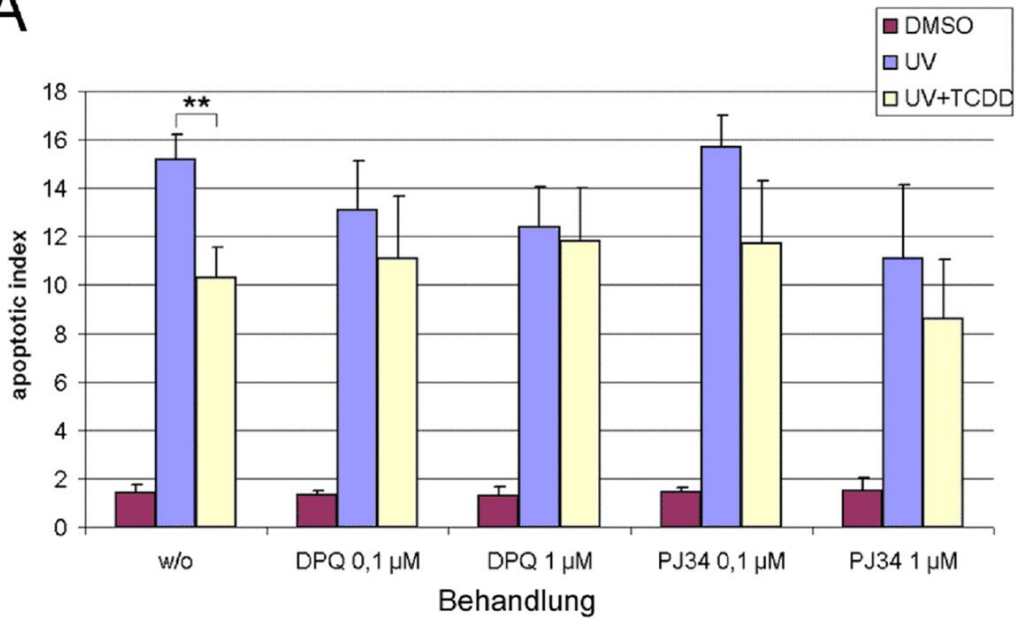
mit TCDD behandelt worden sind, zu einer verstärkten PARylierung von Proteinen kommt, was als Konsequenz die CAD-Aktivität beeinflussen könnte.

Um zu untersuchen, ob die PARP-Aktivität in der Apoptose-Hemmung durch TCDD eine Rolle spielt, wurden primäre Hepatozyten mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 bestrahlt und mit 1 nM TCDD sowie den beiden PARP-Inhibitoren DPQ und PJ34 in Konzentrationen von jeweils $0,1$ und $1 \text{ }\mu\text{M}$ behandelt. Die behandelten Zellen wurden mit DAPI angefärbt und apoptotische Zellkerne wurden ausgezählt. Daneben wurden DNS-Fragmentierungsanalysen für die Behandlungen durchgeführt.

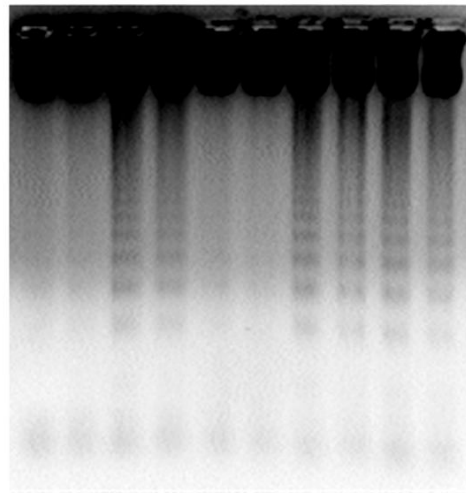
Abbildung 75A zeigt das Ergebnis zu den DAPI-Färbeexperimenten. Weder TCDD alleine, noch die beiden PARP-Inhibitoren alleine bewirkten eine Erhöhung der Apoptoserate in den Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Es zeigte sich ein statistisch hochsignifikanter Unterschied in der Apoptoserate zwischen bestrahlten Zellen und Zellen, die bestrahlt und mit TCDD behandelt worden waren. Die Behandlung bestrahlter Zellen mit den beiden PARP-Inhibitoren bewirkte eine leichte, Konzentrations-abhängige Hemmung der Apoptose. Für PJ34 zeigte sich ein additiver Effekt zwischen dem PARP-Inhibitor und TCDD, was die Hemmung der UV-Licht induzierten Apoptose betrifft. Für DPQ war kein additiver Effekt zu erkennen.

Die DNS-Fragmentierungsanalyse (Abbildung 75B) zeigte, dass die Behandlung der Zellen mit 1 nM TCDD nicht zur internukleosomalen DNS-Fragmentierung führte. Ebenso bewirkten die Behandlungen mit den beiden PARP-Inhibitoren keine DNS-Fragmentierung. Es zeigte sich eine teilweise Hemmung der durch UV-Licht induzierten Apoptose durch TCDD. Die Intensität der DNS-Leiter wurde durch die Inkubation der bestrahlten Zellen mit den PARP-Inhibitoren im Vergleich zur Bestrahlung alleine nicht beeinflusst. Die Koinkubation bestrahlter Zellen mit TCDD und den PARP-Inhibitoren bewirkte keine Reversion des hemmenden Effektes von TCDD auf die DNS-Fragmentierung.

A



B



UV (50 J/m ²)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
TCDD (1 nM)	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
DPQ (1 µM)	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
PJ34 (1 µM)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Abbildung 75: Einfluss von PARP-Inhibitoren auf die TCDD-abhängige Apoptosehemmung. Primäre Rattenhepatozyten wurden mit UVC-Licht (50 J/m²) bestrahlt und mit DMSO oder 1 nM TCDD in Kombination mit 0,1 oder 1 µM DPQ und PJ34 für 24 h inkubiert. n = 3. UV + Behandlung vs. UV + TCDD + Behandlung, *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01. A: DAPI-Färbung. Gezählt wurden apoptotische Zellkerne zur Ermittlung des *apoptotic index*. B: Exemplarisches Agarose-Gel für DNS-Fragmentierungsanalyse UV, TCDD und PARP-Inhibitoren.

4.1.16 Beeinflussung der Topoisomerase II α -Aktivität durch OTA und TCDD

Die Topoisomerase II ist ein essentielles nukleäres Enzym, das an der Regulation der DNS-Topologie beteiligt ist. Hemmstoffe der Topoisomerase II lassen sich in zwei Klassen einteilen, so genannte Topoisomerasegifte, welche den „*cleavable complex*“ stabilisieren und somit die Religation der DNS verhindern, was in Doppelstrangbrüchen resultiert. Die zweite Gruppe, katalytische Inhibitoren, blockieren das Enzym und damit dessen enzymatische Aktivität. Topoisomerasehemmung und daraus resultierende DNS-Schäden führen dazu, dass die Zelle in die Apoptose getrieben wird. Hierauf beruht auch der Einsatz von Chemotherapeutika der Gruppe der Topoisomerasehemmstoffe (z.B. Doxorubicin, Etoposid) (Kawiak et al., 2007).

Da sowohl OTA als auch TCDD planare Strukturen besitzen, wurde untersucht, ob diese Substanzen die Aktivität der humanen Topoisomerase II α beeinflussen. Hierzu wurde die Enzymaktivität über die Spaltung von Kinetoplast DNS untersucht.

Die Ergebnisse zu diesem Versuch zeigten, dass der Reaktionsansatz ohne Testsubstanz erwartungsgemäß zu einer Aufspaltung der Kinetoplast DNS führte. Das Fehlen von ATP im Reaktionspuffer verhinderte diese Aufspaltung, es zeigte sich keine Topoisomerase-Aktivität. Die Inkubation mit 100 μ M Etoposid hemmte die Aktivität des Enzyms vollständig. Weder OTA (Abbildung 76) noch TCDD (Abbildung 77) hemmten die Aktivität der humanen Topoisomerase II α in dem durchgeführten *in vitro* Testsystem in den verwendeten Konzentrationen.

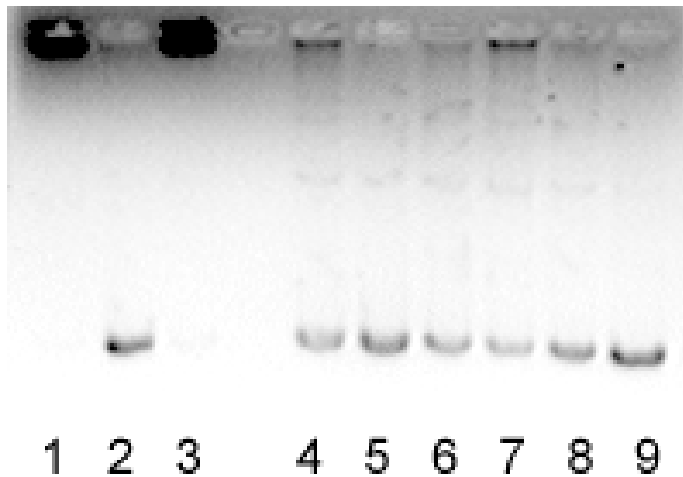


Abbildung 76: Topoisomerase II α -Aktivität OTA. Repräsentativer Versuch (n = 2), lanes: 1: Reaktion ohne ATP, 2: Reaktion mit ATP, 3: 100 μ M Etoposid, 4: DMSO, 5: 0,5 μ M OTA, 6: 1 μ M OTA, 7: 5 μ M OTA, 8: 10 μ M OTA, 9: 50 μ M OTA.

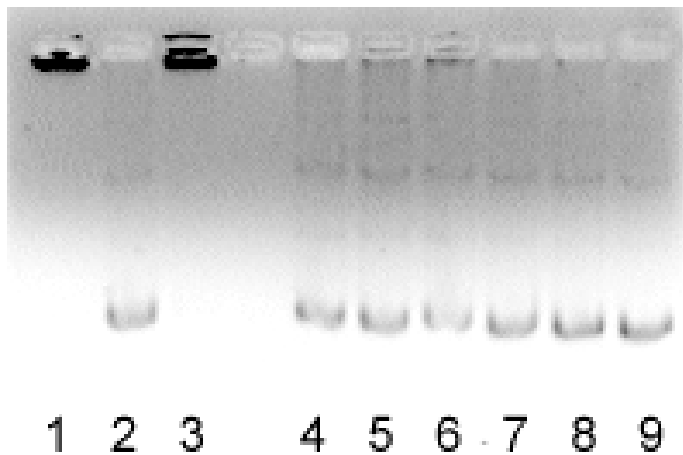


Abbildung 77: Topoisomerase II α -Aktivität TCDD. Repräsentativer Versuch (n = 2), lanes: 1: Reaktion ohne ATP, 2: Reaktion mit ATP, 3: 100 μ M Etoposid, 4: DMSO, 5: 10⁻¹² M TCDD, 6: 10⁻¹¹ M TCDD, 7: 10⁻¹⁰ M TCDD, 8: 10⁻⁹ M TCDD, 9: 10⁻⁸ M TCDD.

4.2 Humane Hepatomzellen Huh-7

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass TCDD die UVC-Licht-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten auf Ebene der DNS-Fragmentierung und Chromatinkondensation und –fragmentierung hemmte. In einem nächsten Schritt sollte daraufhin untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch in einem humanen Leberzellsystem zeigte. Hierzu wurden eine Reihe von Versuchen mit der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 durchgeführt.

4.2.1 DNS-Fragmentierung – „DNA-laddering“

Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. Unbestrahlte Zellen dienten als Kontrollen. Nach der Inkubation wurde aus den Zellen die genomische DNS mit Hilfe des Genra Puregene DNA isolation kit isoliert. 5 μg isolierte DNS wurden in einem 2% Agarose-Gel in Anwesenheit von 0,01% SYBR Safe elektrophoretisch getrennt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

In Abbildung 78 ist ein exemplarisches Agarose-Gel abgebildet. Es zeigte sich, dass weder die Behandlung mit DMSO noch mit 10 nM TCDD in diesen Zellen zu detektierbarer DNS-Fragmentierung führten. Die Bestrahlung der Zellen mit UVC-Licht bewirkte internukleosomale Fragmentierung der DNS, was teilweise durch TCDD gehemmt wurde.

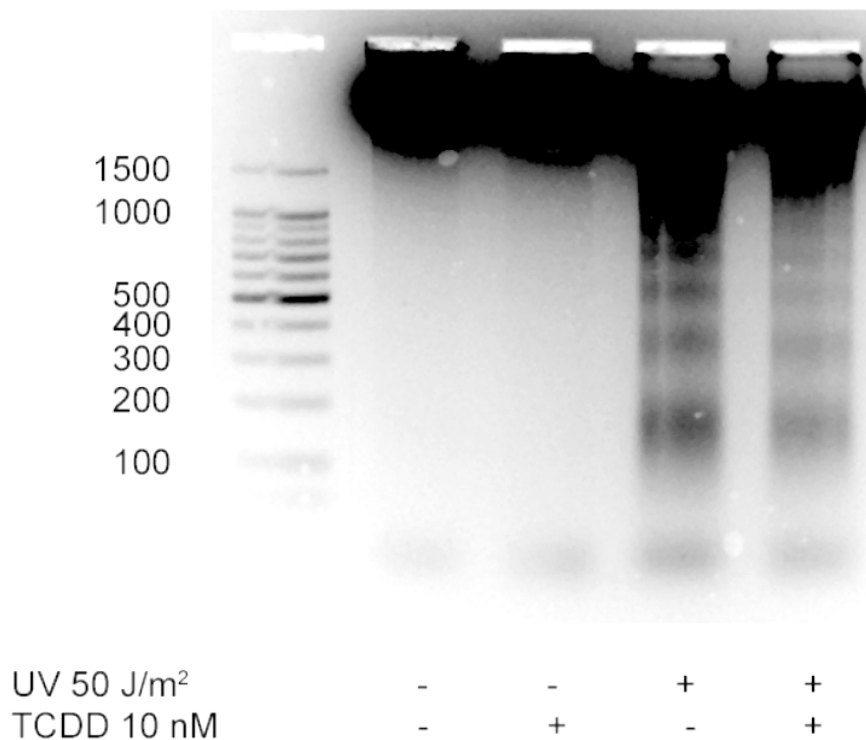


Abbildung 78: DNS-Fragmentierungsanalyse (Huh-7-Zellen, UV und TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt.

Apoptose wird begleitet von morphologischen Veränderungen der Zellen. So lösen sich die Zellen von ihrer Wachstumsfläche ab und nehmen eine runde Gestalt an. Die Zellen kondensieren und bilden Membranausstülpungen. Abbildung 79 zeigt mikroskopische Aufnahmen von Huh-7-Zellen, nach 24 h Inkubation mit DMSO oder 10 nM TCDD, sowie nach Bestrahlung mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 und

nachfolgender Inkubation mit DMSO oder TCDD. Weder DMSO noch TCDD führten zu morphologischen Anzeichen von Apoptose. Die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht bewirkte ein Ablösen der Zelle von der Wachstumsfläche, die Zellen kondensierten und zeigten Anzeichen von Membranausstülpungen. Dieser Effekt wurde durch die Inkubation mit TCDD teilweise unterdrückt: weniger Zellen zeigten Anzeichen von Apoptose.

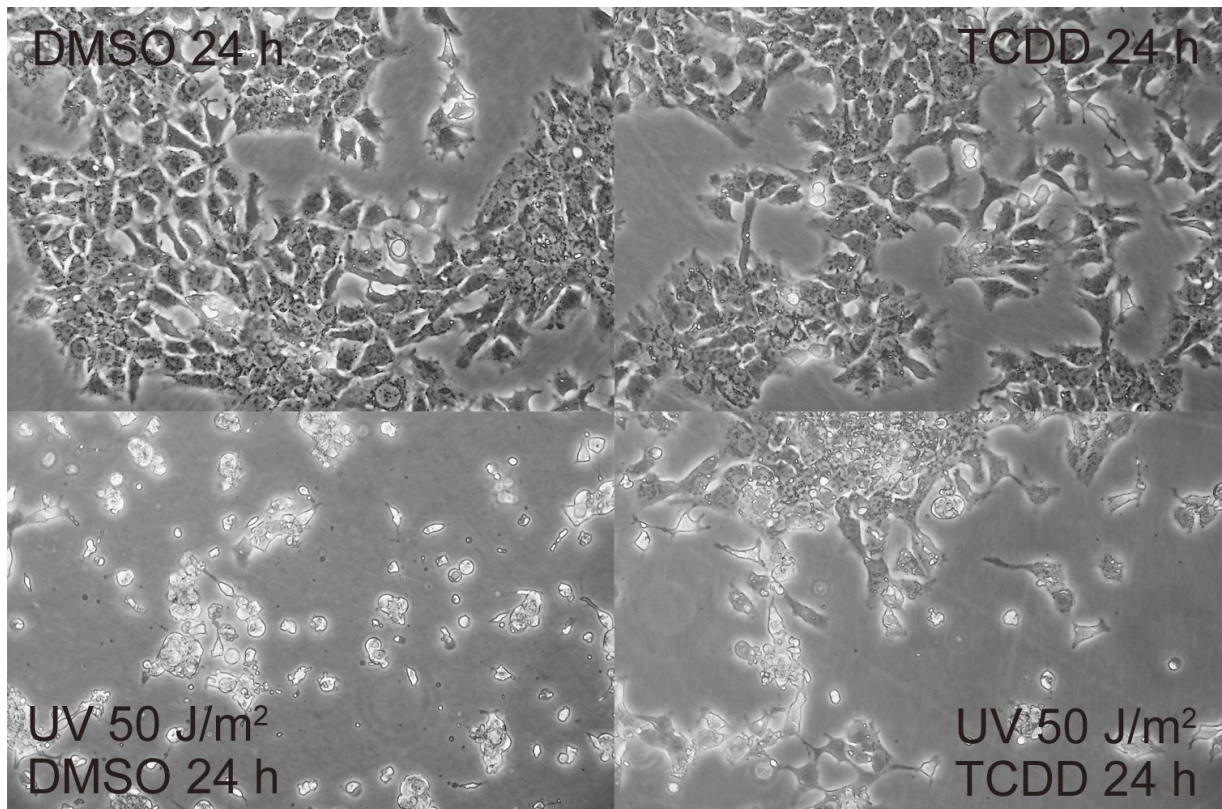


Abbildung 79: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Huh-7-Zellen (UV und TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 50 J/m^2 bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt.

In einem Zeitverlauf von 0 bis 24 h nach der Bestrahlung der Zellen mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m^2 zeigte sich, dass die Zellen nach 6 Stunden anfangen, eine rundliche Gestalt anzunehmen und sich von der Wachstumsoberfläche zu lösen. Nach 24 h zeigten sie Zeichen von Apoptose (Abbildung 80).

Die Analyse der DNS-Fragmentierung zu diesen Zeitpunkten bestätigte die morphologischen Beobachtungen. Nach 6 h ließen sich erste Anzeichen von DNS-Fragmentierung beobachten, was nach 24 h stärker ausgeprägt war. Nach 1 bzw. 2 h zeigte sich kein „*DNA-laddering*“. Die Inkubation bestrahlter Zellen mit 10 nM TCDD für 24 h resultierte in verringerter internukleosomaler DNS-Spaltung als in Zellen, die nicht mit TCDD behandelt worden waren (Abbildung 81).

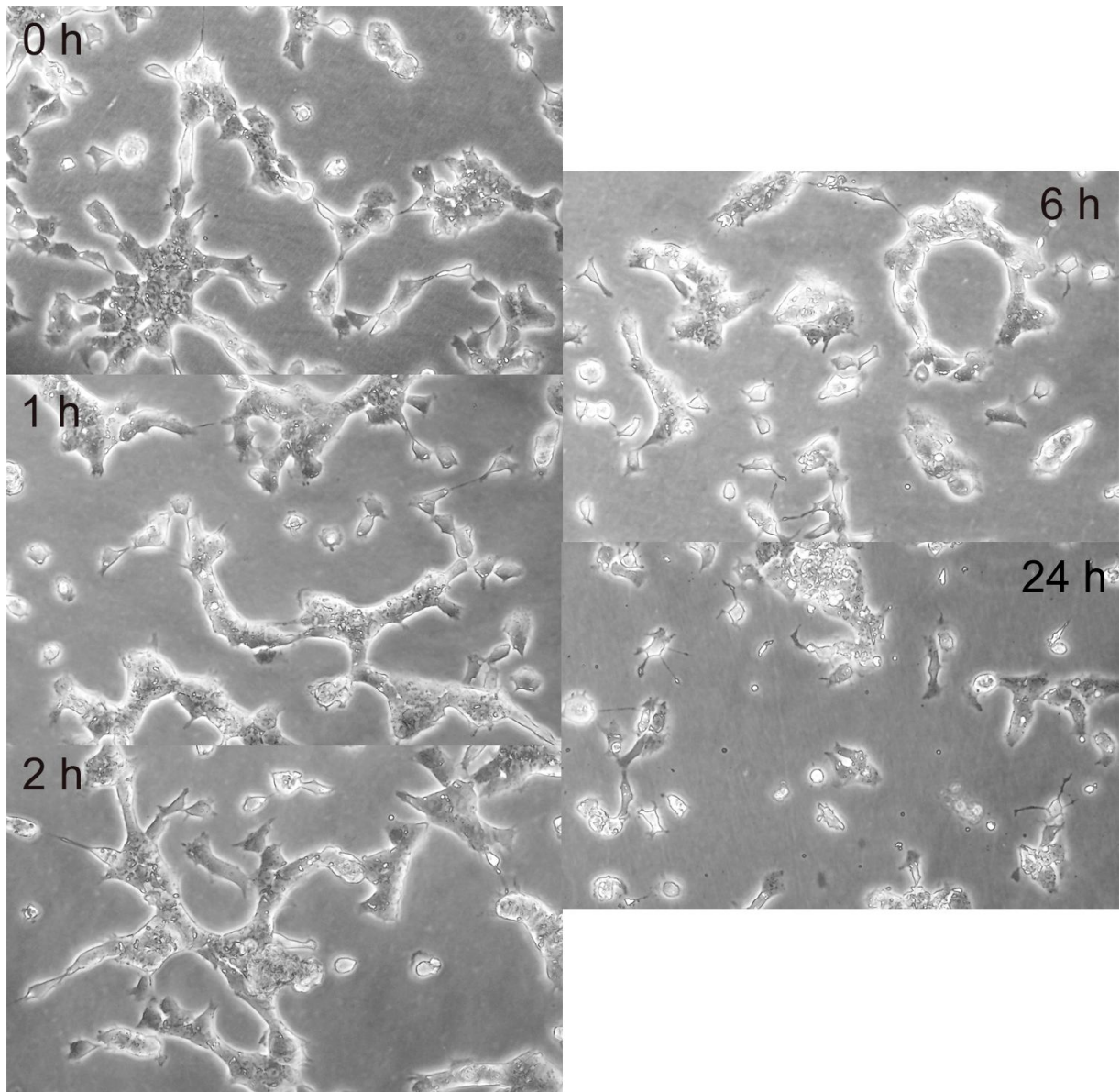


Abbildung 80: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Huh-7-Zellen 0 bis 24 h nach Bestrahlung mit UV-Licht (10 J/m^2).

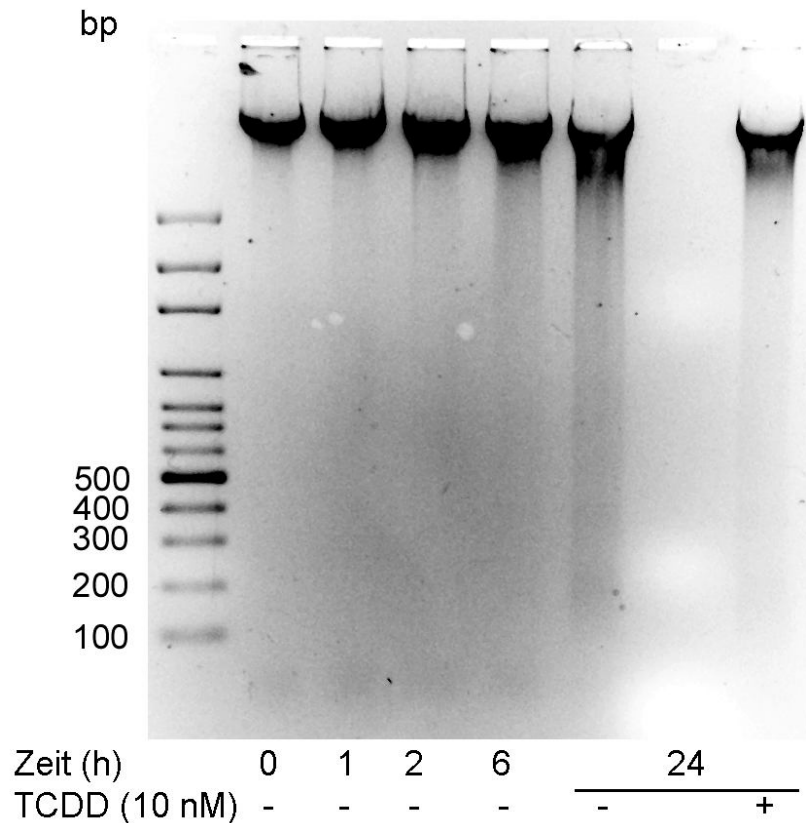


Abbildung 81: DNS-Fragmentierungsanalyse (Huh-7, Zeitverlauf UV). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m^2 bestrahlt und für 1 bis 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt.

4.2.2 Propidiumiodidfärbung und durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung und Apoptoserate

Um den Einfluss von TCDD auf die durch UVC-Strahlung induzierte Apoptose in Huh-7-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension mit Ethanol fixiert. Anschließend wurde die DNS mit Propidiumiodid angefärbt und der DNS-Gehalt einzelner Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Unterschieden wurden Zellen mit einem einfachen DNS-Gehalt, die sich in der G_1/G_0 -Phase befinden, Zellen mit einem doppelten DNS-Gehalt in der G_2 - bzw. M-Phase, sowie Zellen mit einem DNS-Gehalt zwischen G_1 und G_2/M , was der S-Phase entspricht.

In apoptotischen Zellen wird die DNS durch Nukleasen fragmentiert. Diese niedermolekulare DNS kann aus den Zellen herausgelöst werden, es resultieren Zellen mit einem DNS-Gehalt, der geringer ist als der in G_1 -Zellen (sog. „sub- G_1 -Zellen“). So kann der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden.

Abbildung 82 zeigt die Zellzyklusverteilung graphisch (y-Achse: Anzahl der Zellen, x-Achse: DNS-Gehalt).

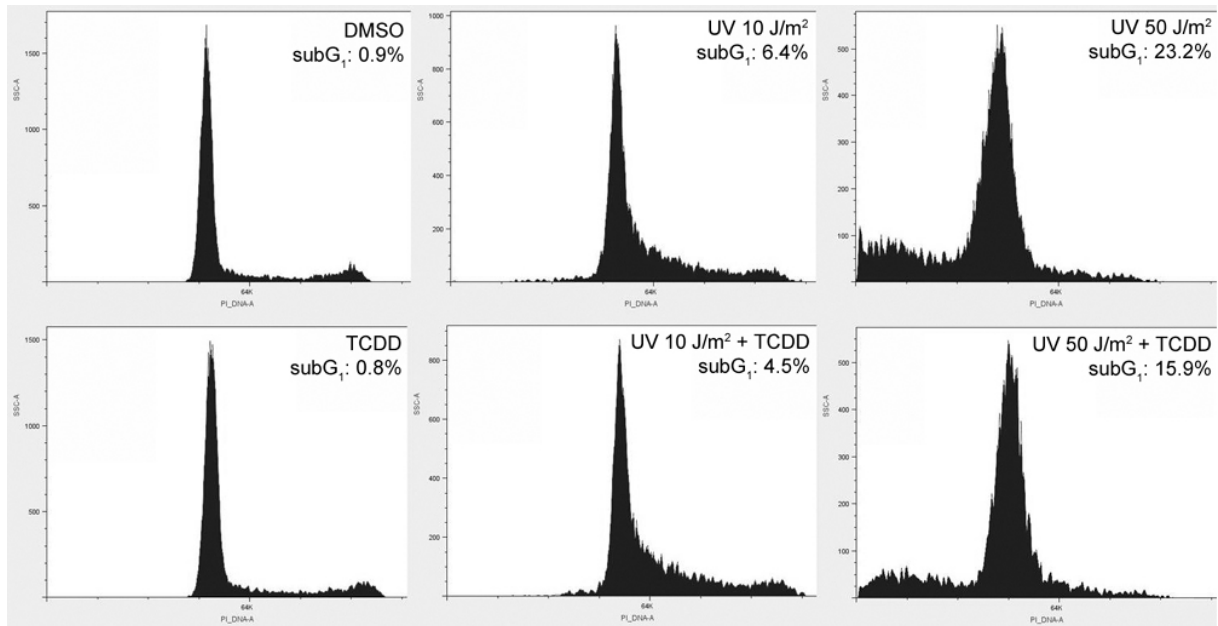


Abbildung 82: Graphische Darstellung der Zellzyklusverteilung (Huh-7, UV und 10 nM TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 oder 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt.

Abbildung 83 zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zellzyklus. Für die Proben, die nur mit DMSO oder TCDD behandelt worden waren, zeigten sich definierte Peaks für G₁ und für G₂/M. Je höher die UV-Dosis war, desto kleiner wurde der Peak der G₂/M-Zellen. UVC-Strahlung bewirkte also einen G₁-Arrest. Der Unterschied zur DMSO-Kontrolle war ab einer UV-Dosis von 50 J/m² statistisch signifikant (Abbildung 84), wobei die Inkubation bestrahlter Zellen mit TCDD zu keiner statistisch signifikanten Veränderung dieses Effektes führte.

Es war zu erkennen, dass die sub-G₁-Population mit steigender UV-Dosis zunahm (Abbildung 85). Schon die geringste eingesetzte Strahlendosis von 10 J/m² führte zu einem statistisch hochsignifikant erhöhten prozentualen Anteil (etwa 10%) der Zellen mit einem DNS-Gehalt, der geringer als der von G₁-Zellen war. Die beiden höheren UV-Dosen bewirkten eine Apoptoserate von jeweils etwa 25%. Die Inkubation der bestrahlten Zellen mit 10 nM TCDD bewirkte für alle verwendeten UV-Dosen eine Reduzierung der Apoptoserate um jeweils etwa 35%, was für die UV-Dosen von 50 und 100 J/m² statistisch signifikant verschieden zur jeweiligen DMSO-Kontrolle war.

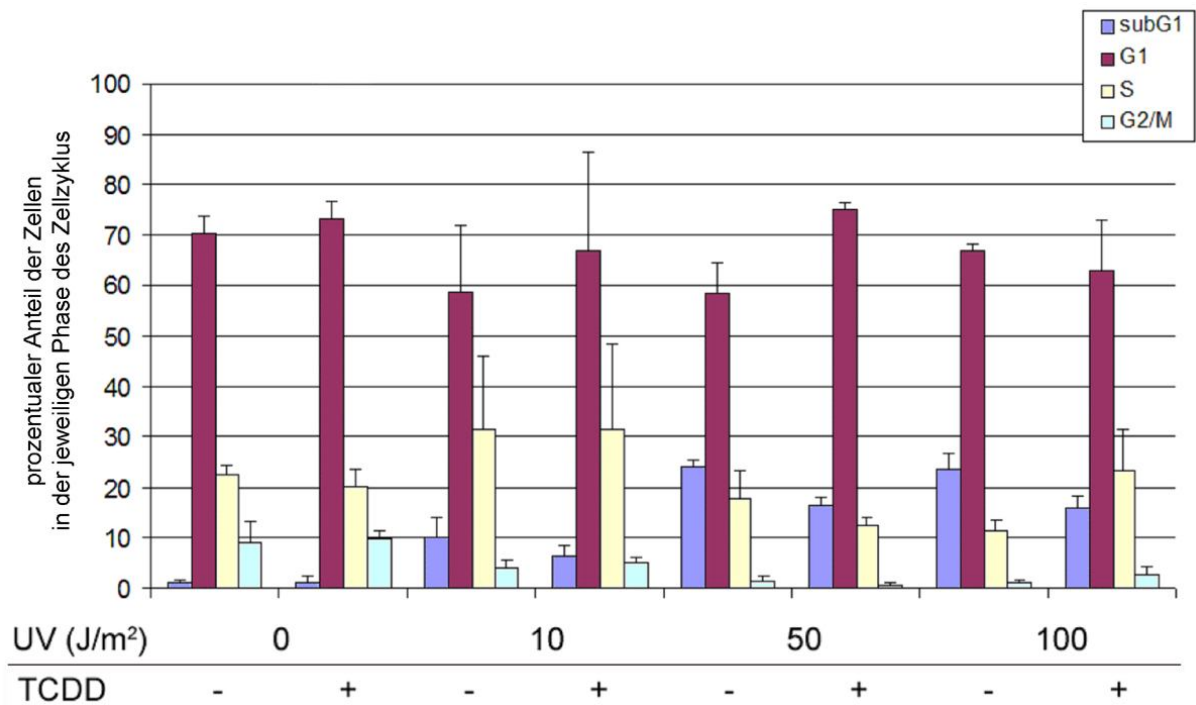


Abbildung 83: Verteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zellzyklus (Huh-7, UV und 10 nM TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 100 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt.

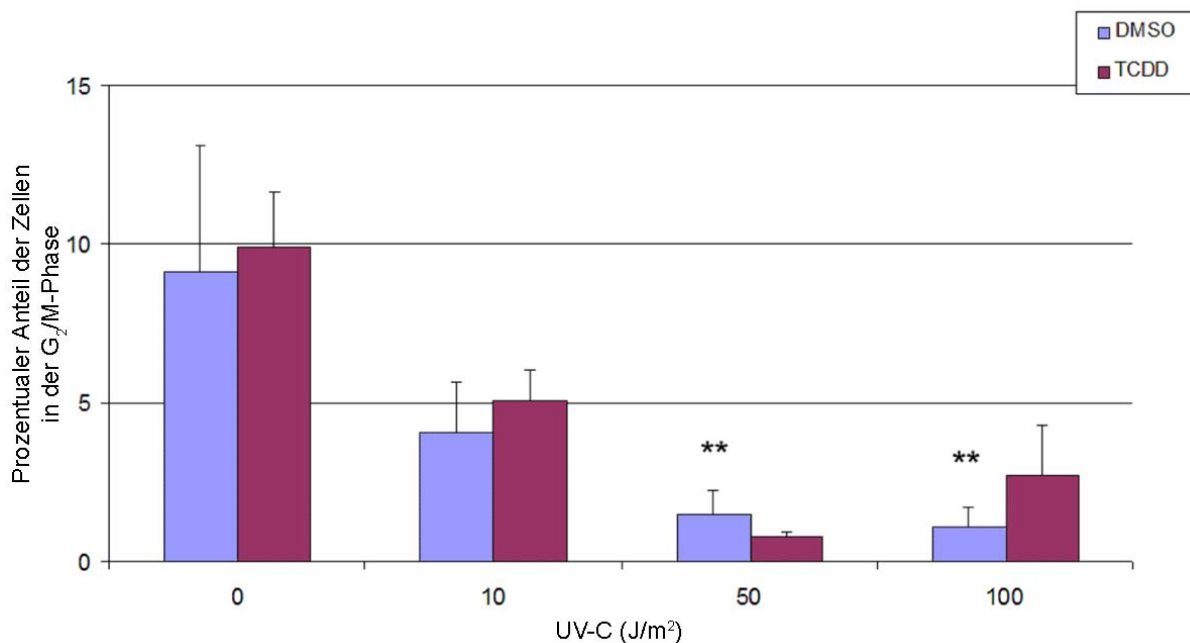


Abbildung 84: Prozentualer Anteil an G₂/M-Zellen (Huh-7, UV und 10 nM TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 100 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01.

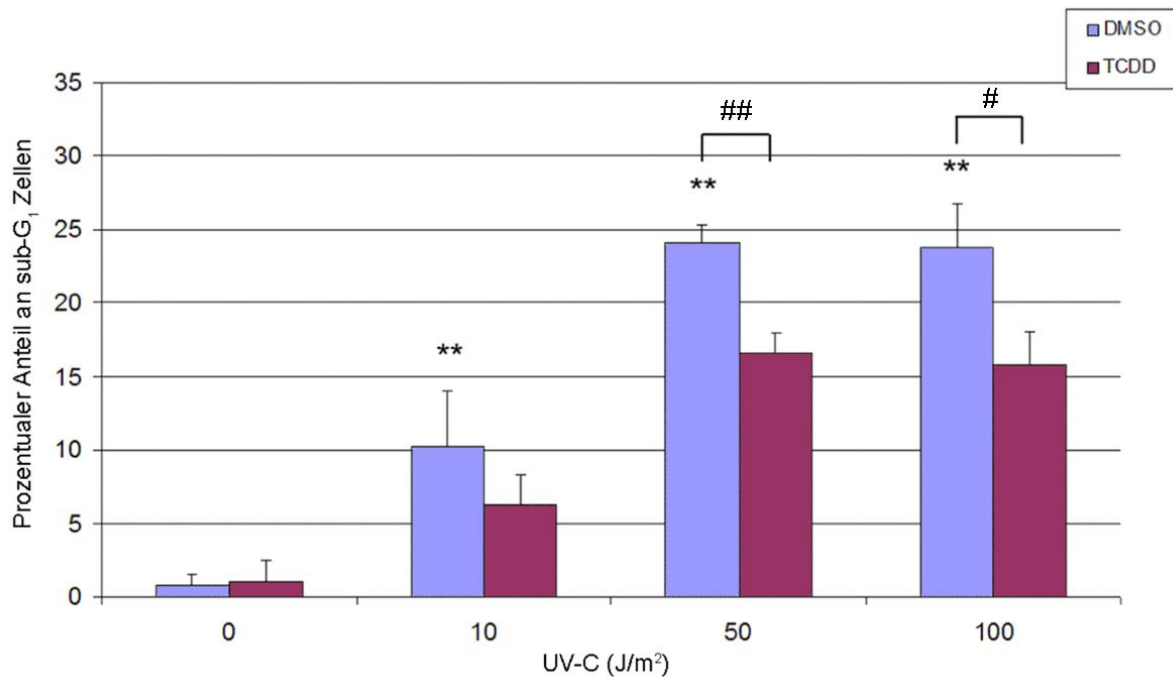


Abbildung 85: Prozentualer Anteil an sub-G₁-Zellen (Huh-7, UV und 10 nM TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 100 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnnett's post-test*, ** p ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01.

4.2.3 JC-1-Assay

In einem frühen Stadium der Apoptose verlieren die Mitochondrien ihre Membranintegrität und pro-apoptische Faktoren wie Cytochrom c, AIF und Endonuklease G werden in das Zytosol freigesetzt. Der kationische Carbocyanin-Farbstoff JC-1 sammelt sich in intakten Mitochondrien als rot fluoreszierende Aggregate an. Wird das Potenzial der inneren Mitochondrienmembran gestört, kann der Farbstoff nicht in den Mitochondrien akkumulieren sondern liegt als grün fluoreszierende Monomere im Zytosol vor. Das Verhältnis von roter zu grüner Fluoreszenz dient als Indikator für frühe apoptotische Ereignisse. Als Positivkontrolle diente CCCP, ein Entkuppeler der mitochondrialen Oxidation.

In Abbildung 86 sind die Ergebnisse zum JC-1-Assay dargestellt. Es zeigte sich, dass UVC-Strahlung in einer Dosis von 30 J/m² zu einem statistisch signifikant erniedrigten Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle führte. Niedrigere UV-Dosen verringerten zwar das Fluoreszenzverhältnis, jedoch nicht statistisch signifikant. TCDD alleine und in

Kombination mit UVC-Strahlung verringerte das Fluoreszenzverhältnis Konzentrations-abhängig im Vergleich zu den unbestrahlten oder bestrahlten DMSO-Kontrollen. Die Positivkontrolle CCCP zeigte die maximale Depolarisation der Mitochondrien an.

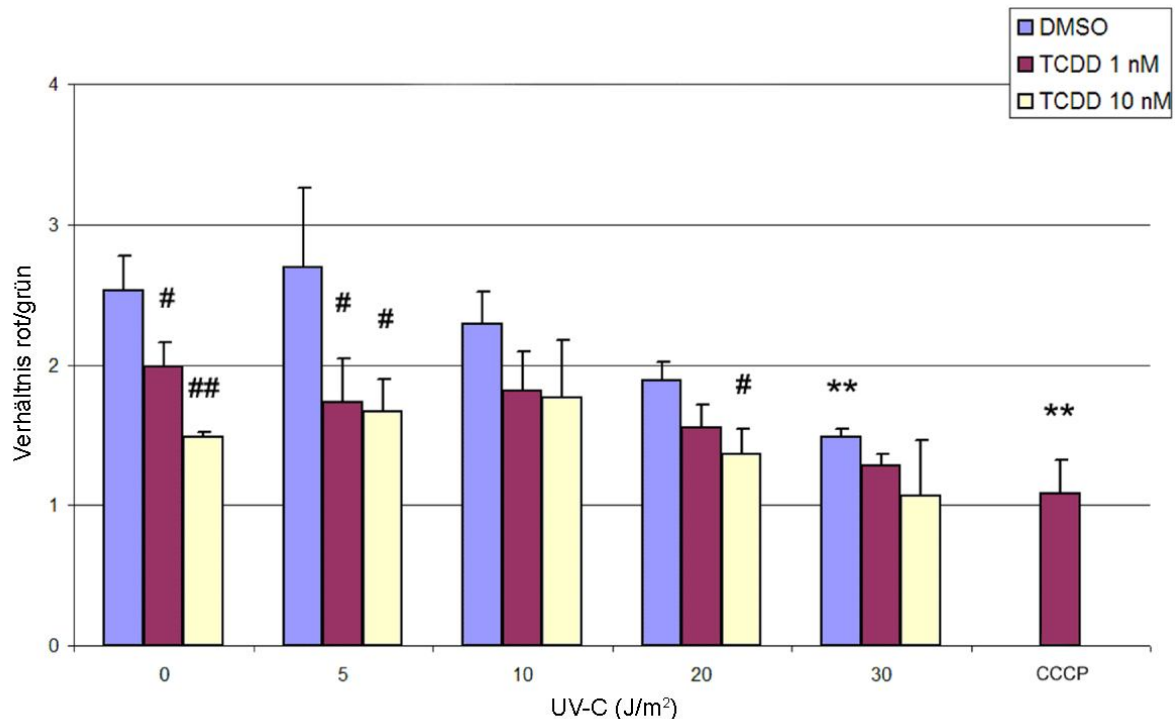


Abbildung 86: JC-1-Assay (Huh-7, UV und TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 30 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD behandelt. CCCP diente als Positivkontrolle für die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p ≤ 0,01; Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01.

4.2.4 Caspasen 3/7-Aktivität

Es wurde untersucht, ob eine Bestrahlung der humanen Hepatomzellen Huh-7 mit UVC-Licht zu einer Erhöhung der Aktivität der ausführenden Caspasen 3 und 7 führt. Hierzu wurde die Fluoreszenz des aus dem Caspase 3/7-Substrat DEVD-R110 freigesetzten Fluorophors R110 vermessen. Daneben wurden die Zellen mit TCDD in Konzentrationen von 1 oder 10 nM koinkubiert um einen eventuellen Einfluss dieser Behandlung auf die Caspase-Aktivität zu ermitteln.

Aus Abbildung 87 ist ersichtlich, dass die Inkubation der Zellen mit TCDD alleine zu keiner Induktion der Caspasen 3/7-Aktivität führte. UV-Licht bewirkte eine Dosis-

abhängige Erhöhung der DEVDase-Aktivität in den Huh-7 Zellen, welche ab einer Dosis von 50 J/m² statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war. In keiner Dosis bewirkte TCDD eine statistisch signifikante Modulation der UVC-Licht-induzierten Aktivierung der Effektor-Caspasen.

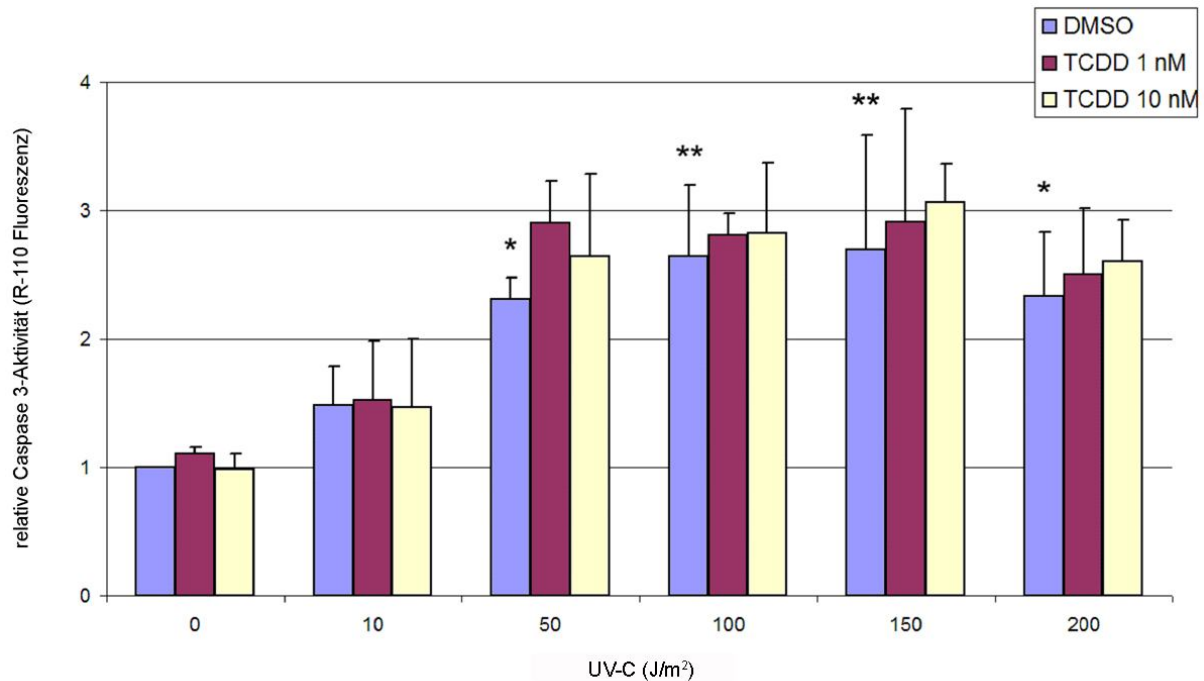


Abbildung 87: Caspasen 3/7-Aktivität (DEVDase) (Huh-7, UV und TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 10 bis 200 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD behandelt. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01.

4.2.5 Lokalisation und Expression von β-Catenin und NF-κB p65

β-Catenin ist ein Bestandteil des kanonischen wnt-Signalwegs. Wird dieser Weg aktiviert, kommt es zu einer Stabilisierung von β-Catenin, welches in den Zellkern transloziert und die Expression von Genen in Gang setzt, die mit dem Überleben der Zelle in Verbindung gebracht werden (Chen et al., 2001; Gan et al., 2008). In Huh-7-Zellen liegt β-Catenin konstitutiv aktiv vor und es kann in diesen Zellen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern detektiert werden (Takagi et al., 2008).

Ein weiterer Signalweg, der anti-apoptotisch wirkt, ist die Aktivierung von NF-κB. Im Zytosol befindet sich ein inaktiver Komplex aus p50, p65 und dem Inhibitor IκBα. Über verschiedene Wege, etwa über eine Aktivierung des TNFR wird die IκB Kinase aktiviert, welche IκBα phosphoryliert und zum Abbau dieses Proteins führt. Der freigesetzte Komplex aus p50 und p65 transloziert in den Zellkern und sorgt für die

Expression einer Reihe von anti-apoptotischen Genen, zum Beispiel den IAPs (Baldwin, 1996).

Es wurde untersucht, ob TCDD, UVC-Strahlung und die Kombination aus beiden Behandlungen zu einer Beeinflussung der Proteinlevel sowie der Lokalisation von β -Catenin und NF- κ B p65 im Zytosol und im Zellkern führen. Huh-7-Zellen wurden entsprechend behandelt, bevor zytosolische Extrakte und Kernextrakte hergestellt und mittels Western blot untersucht wurden. Als Beladungskontrollen dienten für das Zytosol β -Actin und für die Zellkerne das Histon H2A.

Abbildung 88A zeigt einen exemplarischen Western blot für die Behandlung der Zellen mit TCDD in Konzentrationen von 0,1 bis 10 nM für 24 h. β -Catenin lies sich sowohl im Zytosol der Zellen als auch im Zellkern detektieren. Die Behandlung mit TCDD führte in keiner Konzentration zu einer Änderung der Proteinlevel in den beiden Kompartimenten. Die densitometrische Auswertung der blots bestätigte dieses Ergebnis (Abbildungen 88B und 88C). Die NF- κ B-Untereinheit p65 lies sich nur im Zytosol detektieren. Es kam bei keiner der Behandlungen zu einer Translokation in den Zellkern. Ferner beeinträchtigte TCDD in Huh-7-Zellen nicht die Proteinmenge an NF- κ B p65 im Zytosol (Abbildung 88D).

Als nächstes wurden Huh-7-Zellen mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m² bestrahlt und im Anschluss für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. In Abbildung 89A ist ein repräsentatives Experiment für die zytosolische Fraktion dargestellt. Sowohl die Level für β -Catenin als auch für NF- κ B p65 nahmen im Zytosol auf UV-Bestrahlung hin ab. Die Behandlung mit TCDD hatte hierauf keinen Einfluss. Die densitometrische Auswertung für β -Catenin (Abbildung 89B) und NF- κ B p65 (Abbildung 89C) unterstreicht dieses Ergebnis. Die Abnahme an β -Catenin durch UV-Strahlung war in allen Dosen statistisch signifikant verschieden zur unbestrahlten Kontrolle.

Im Zellkern vorhandenes β -Catenin nahm ebenfalls durch UV-Bestrahlung ab ohne dass TCDD hierauf einen Einfluss besaß (Abbildung 90). Durch die Behandlung unbestrahlter Zellen mit TCDD kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme an β -Catenin im Zellkern, was sich jedoch nicht Konzentrations-abhängig zeigen lassen konnte (Abbildung 88).

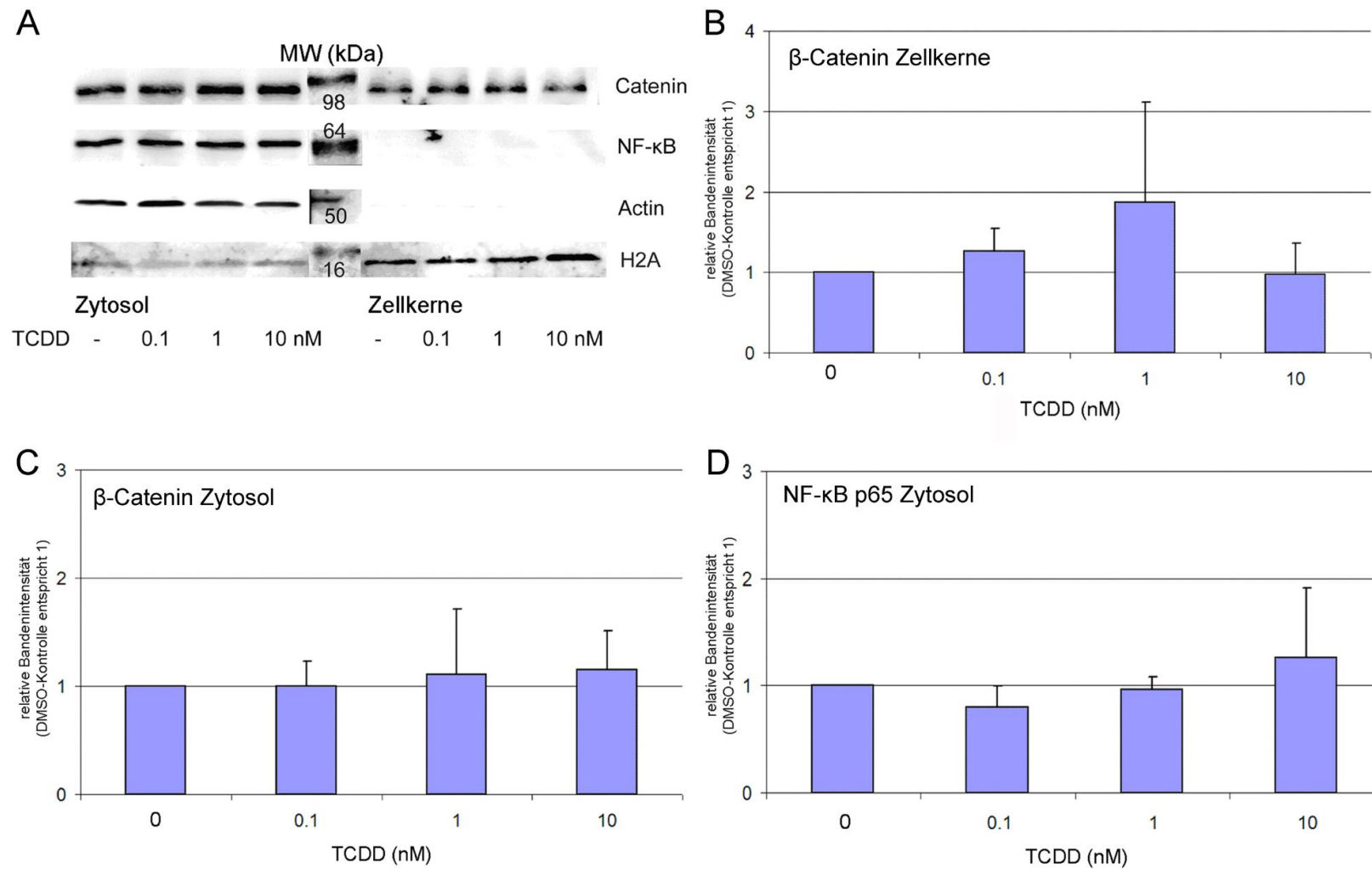


Abbildung 88: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, TCDD, Zytosol, Zellkerne). Huh-7-Zellen wurden mit 0 bis 10 nM TCDD für 24 h inkubiert. n = 3. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung β -Catenin (Zellkerne). C: Densitometrische Auswertung β -Catenin (Zytosol). D: Densitometrische Auswertung NF- κ B p65 (Zytosol).

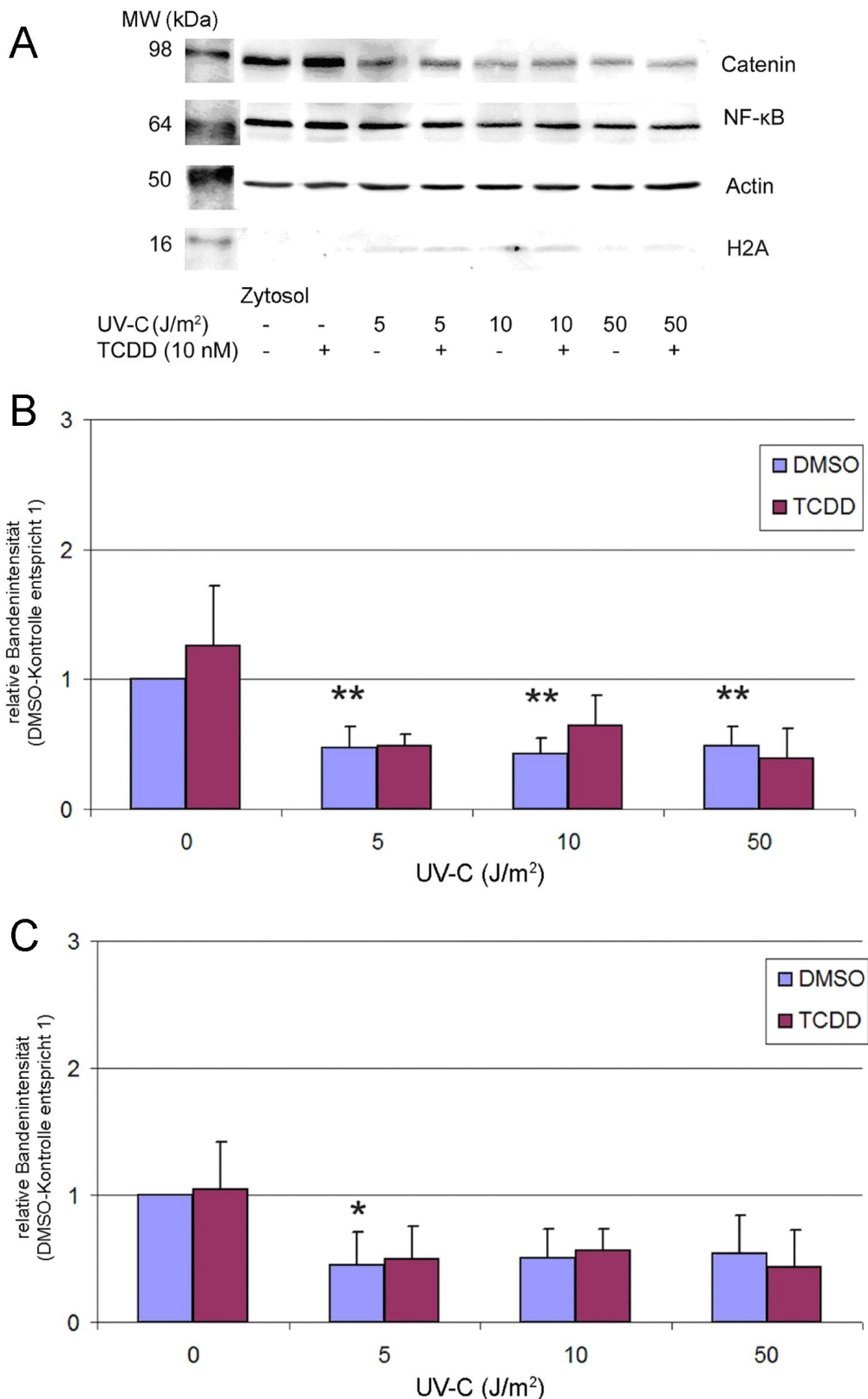


Abbildung 89: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, UV, TCDD, Zytosol). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung β -Catenin C: Densitometrische Auswertung NF- κ B p65.

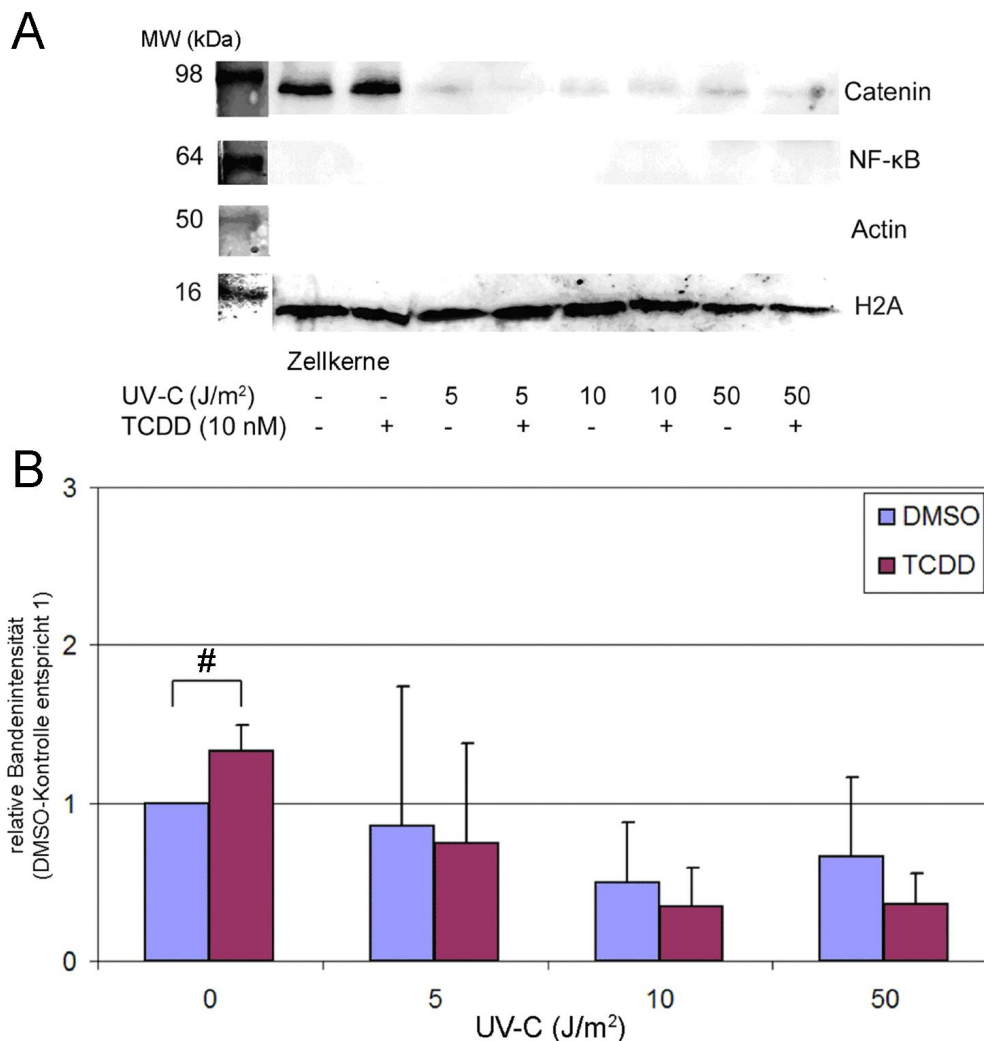


Abbildung 90: Western blot β -Catenin und NF- κ B p65 (Huh-7, UV, TCDD, Zellkerne). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p \leq 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung β -Catenin.

4.2.6 Histon 2AX-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des Histons 2AX als Antwort auf UV-Bestrahlung in Huh-7-Zellen stattfindet und ob TCDD einen Einfluss hierauf besitzt, wurden Western blot Experimente mit einem Antikörper gegen γ H2AX durchgeführt. Zunächst wurde ein Zeitverlauf aufgenommen, um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt die Phosphorylierung stattfindet. Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m² bestrahlt und mit DMSO oder 10 nM TCDD behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet. Abbildung 91A zeigt ein repräsentatives Experiment und Abbildung 91B die entsprechende densitometrische Auswertung der Banden. Es zeigte sich, dass

unbestrahlte Zellen nur sehr wenig γ H2AX aufwiesen. 1 h nach der Bestrahlung war der γ H2AX-Gehalt leicht erhöht, nach 2 h war dieser Effekt stärker ausgeprägt. Sowohl nach 6 h als auch nach 24 h zeigten sich sehr starke Banden für dieses Protein, ohne dass ein Unterschied zwischen diesen beiden Zeitpunkten sichtbar war. Die TCDD-Behandlung bestrahlter Zellen zeigte nur 1 h nach der Bestrahlung eine statistisch signifikante Reduktion der Bandenintensität. Für alle späteren Zeitpunkte zeigte sich kein Unterschied zwischen Zellen, die mit TCDD behandelt worden waren und solchen, die mit DMSO inkubiert worden waren.

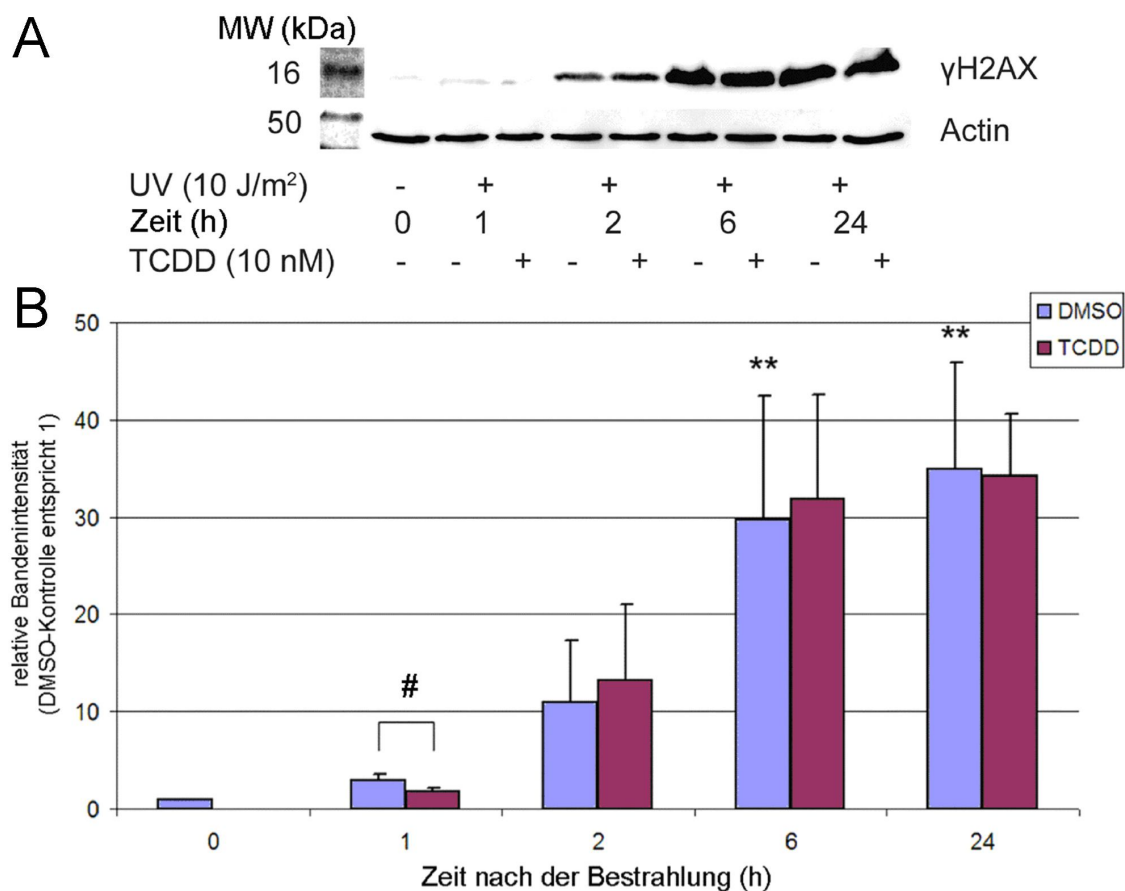


Abbildung 91: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. Zeitverlauf). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m² bestrahlt und für 0 bis 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. 0 h vs. Zeitpunkt: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** p \leq 0,01. Zeitpunkt vs. Zeitpunkt + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p \leq 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX.

Im nächsten Schritt wurden Zellen mit verschiedenen UVC-Dosen bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder TCDD behandelt. Abbildung 92 zeigt, dass sich für keine der Bestrahlungen ein Unterschied in der Bandenintensität für γ H2AX zeigte. Auch die densitometrische Auswertung zeigte, dass die unterschiedlichen UV-Dosen in der

gleichen, zur Kontrolle statistisch hochsignifikant unterschiedlichen Bandenintensität für γ H2AX resultierten, ohne dass TCDD einen Einfluss hierauf besaß.

Um den hemmenden Effekt von TCDD auf die Phosphorylierung von H2AX 1 h nach einer Bestrahlung mit UVC-Licht weiter zu untersuchen, wurden Huh-7-Zellen mit verschiedenen UV-Dosen bestrahlt, mit DMSO oder TCDD inkubiert und nach einer Stunde geerntet. Abbildung 93A zeigt einen Western blot für dieses Experiment: TCDD führte in den beiden niedrigen UV-Dosen von 5 und 10 J/m^2 zu einer Reduktion an γ H2AX, nicht jedoch für die hohe UV-Dosis. Dies bestätigte auch die densitometrische Auswertung der Experimente (Abbildung 93B).

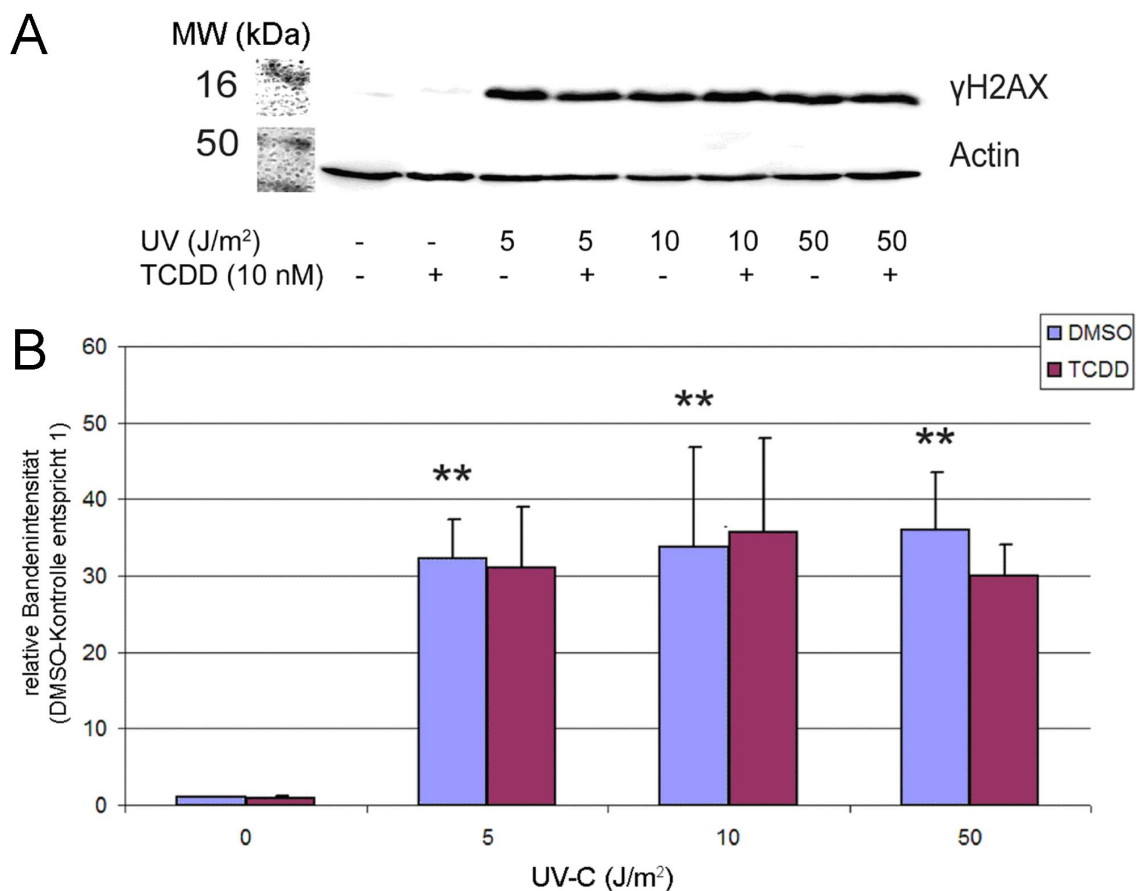


Abbildung 92: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD, 24 h). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m^2 bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, ** $p \leq 0,01$. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX.

Zuletzt wurde untersucht, ob TCDD Konzentrations-abhängig die UV-Licht-induzierte Phosphorylierung von H2AX hemmt. Hierzu wurden Huh-7-Zellen mit UV-Licht in einer Dosis von 10 J/m² bestrahlt, mit TCDD in Konzentrationen von 1 bis 50 nM behandelt und nach 1 h geerntet. TCDD führte zu einer Konzentrations-abhängigen Abnahme an γH2AX in UV-Licht-bestrahlten Huh-7 Zellen (Abbildung 94).

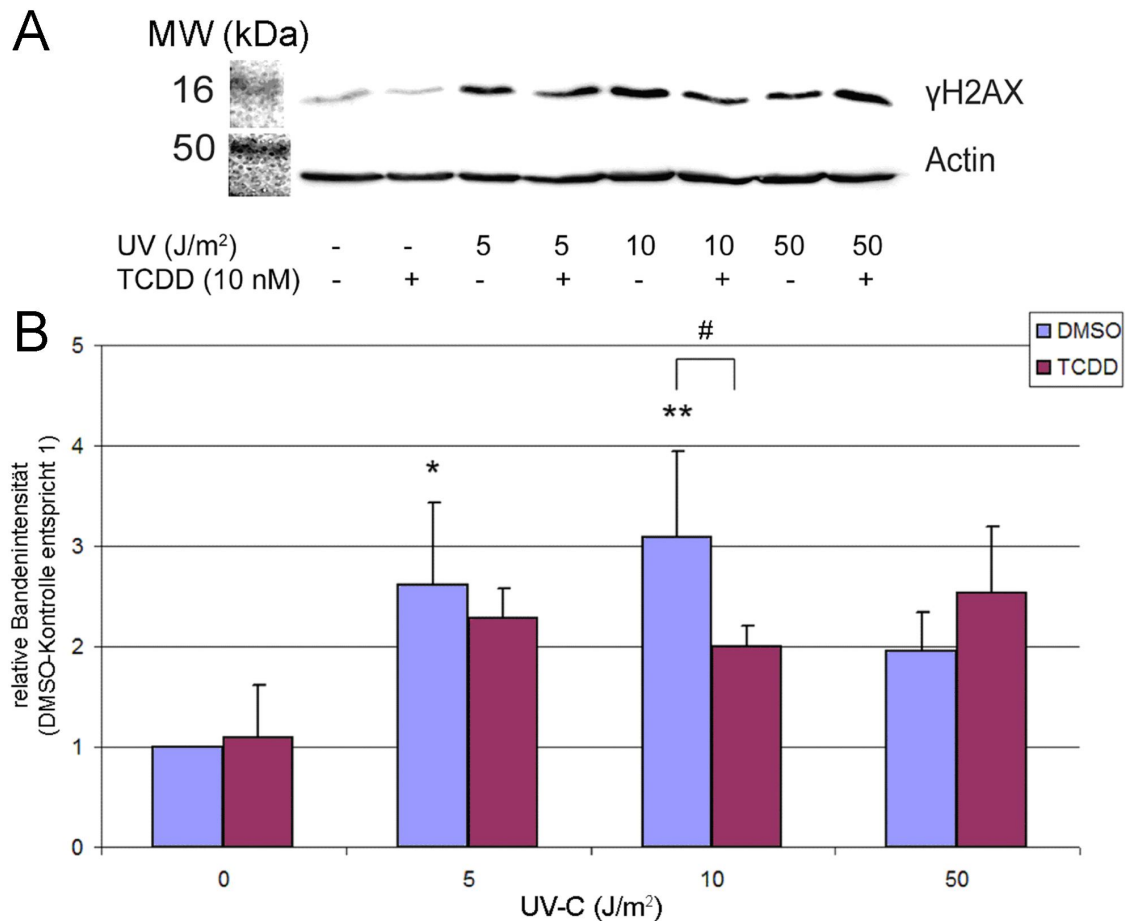


Abbildung 93: Western blot γH2AX (Huh-7, UV und TCDD, 1 h). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m² bestrahlt und für 1 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. Behandlung: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01. Behandlung vs. Behandlung + TCDD: *one-tailed unpaired student's t-test*, # p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γH2AX.

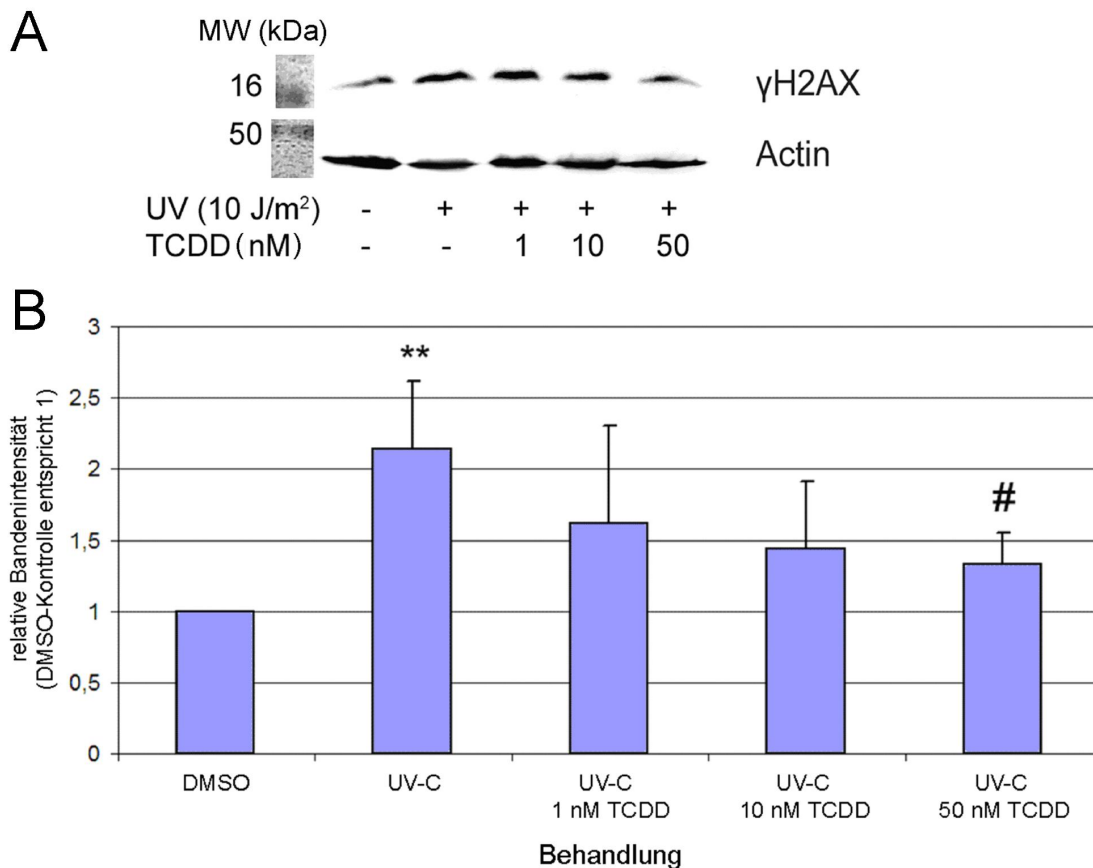


Abbildung 94: Western blot γ H2AX (Huh-7, UV und TCDD. Konzentrationsabhängigkeit). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in einer Dosis von 10 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 1 bis 50 nM TCDD inkubiert. n = 3. DMSO vs. UV-C: *one-tailed unpaired student's t-test*, ** p ≤ 0,01; UV-C vs. UV-C + TCDD: *one-way ANOVA* mit *Dunnett's post-test*, # p ≤ 0,05. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung γ H2AX.

4.2.7 Expression von sFRP-4

Das *secreted frizzled-related protein 4* (sFRP-4) stellt einen Antagonisten des kanonischen wnt-Signalwegs dar (Constantinou et al., 2008). Eine Hemmung des mit dem Überleben von Zellen in Verbindung gebrachten wnt-Signalwegs durch dieses Protein äußert sich in einer Hemmung von Zellproliferation und –differenzierung, sowie in der Induktion von Apoptose in verschiedenen Zellen (He et al., 2005; Horvath et al., 2007; Maganga et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob sFRP-4 eine Rolle in der UVC-Licht-induzierten Apoptose spielt, und ob die Expression dieses Proteins durch TCDD beeinflusst wird, wurden Western blot Experimente in Huh-7-Zellen gegen dieses Protein durchgeführt. Abbildung 95A zeigt einen repräsentativen Western blot gegen sFRP-4 in Huh-7-

Zellen nach UVC-Bestrahlung und TCDD-Inkubation in verschiedenen Kombinationen. Keine der Behandlungen bewirkte eine ausgeprägte Änderung der sFRP-4 Proteinlevel in Huh-7-Zellen. Auch die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten (Abbildung 95B) bestätigte dieses Ergebnis.

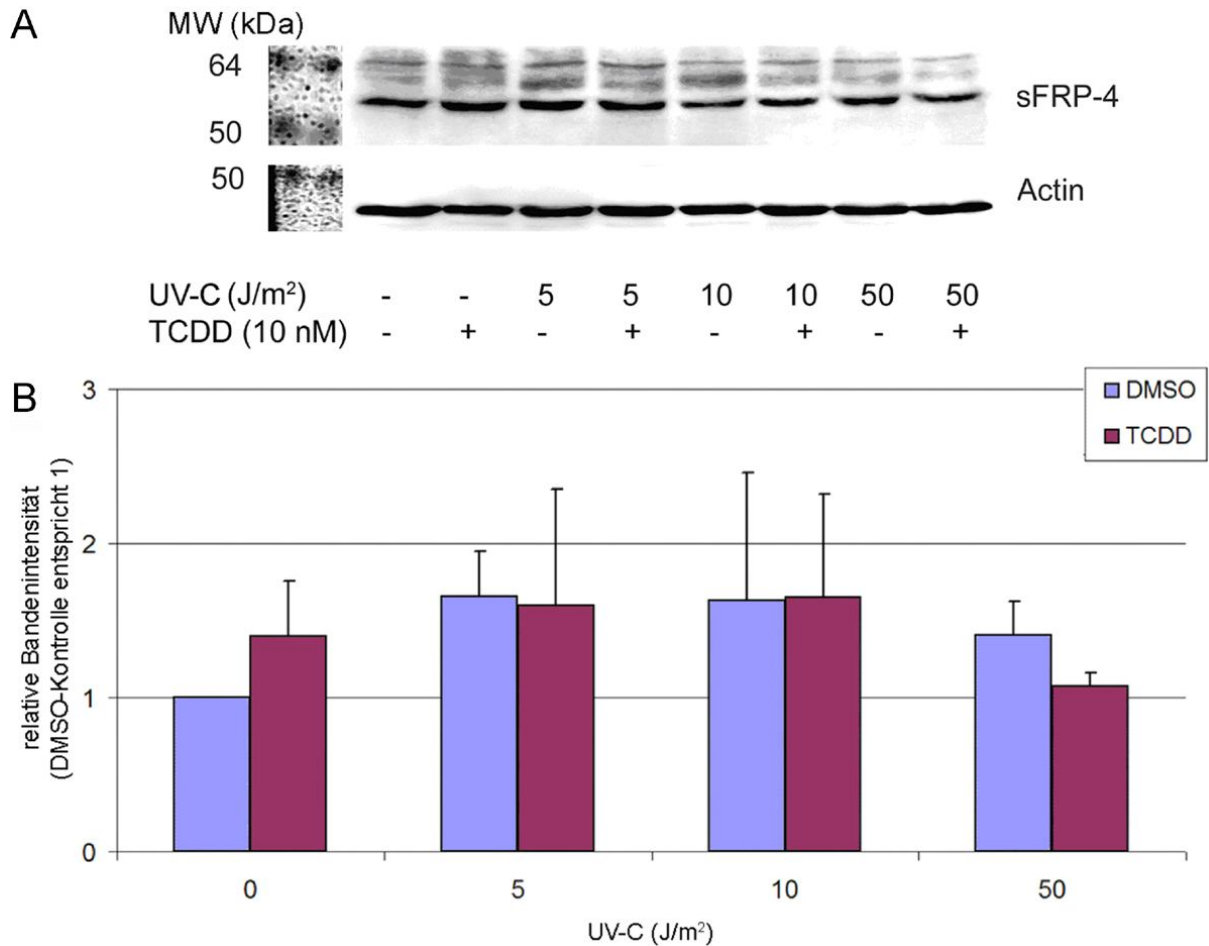


Abbildung 95: Western blot sFRP-4 (Huh-7, UV und TCDD). Huh-7-Zellen wurden mit UVC-Licht in Dosen von 5 bis 50 J/m² bestrahlt und für 24 h mit DMSO oder 10 nM TCDD inkubiert. n = 3. A: Repräsentativer Western blot. B: Densitometrische Auswertung sFRP-4.

5. Diskussion

Das hochgradig persistente chlorierte Dibenzo-*p*-dioxin TCDD verursacht im Tierversuch eine Vielzahl toxischer Effekte. Es wirkt unter anderem immunotoxisch, teratogen und hepatotoxisch (IARC, 1997). Es wird angenommen, dass die meisten, wenn nicht sogar alle der toxischen Wirkungen dieses chlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffs über den AhR vermittelt werden (Safe, 2001; Matsumura, 2009). Im Tierversuch zeigte TCDD ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential an Ratten (van Miller et al., 1977; Kociba et al., 1978; NTP, 1982a; NTP, 2005a). Im Initiations-Promotions-Modell in der Rattenleber konnte TCDD eine tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben werden, die durch eine Zunahme von enzymveränderten, präneoplastischen Hepatozyten-Foci und von Hepatomen charakterisiert war. Verglichen mit anderen tumorpromovierenden Substanzen zeigte TCDD in der Nagerleber das stärkste tumorpromovierende Potential (Pitot et al., 1980; Schrenk et al., 1994).

Im Jahr 1997 wurde TCDD von der IARC als Gruppe 1 Kanzerogen und damit als krebserzeugend für den Menschen eingestuft, obwohl die molekularen Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD bislang nicht vollständig geklärt werden konnten (IARC, 1997; Knerr und Schrenk, 2006).

Laut Hattis et al. ist der wahrscheinlichste Mechanismus eine Kombination zwischen Tumorpromotion und regenerativer Proliferation als Antwort auf eine zytotoxische Wirkung von TCDD (Hattis et al., 2009). Zur Tumorpromotion durch diese Substanz wurden bisher verschiedene Hypothesen aufgestellt. Kurz zu nennen seien hier die Hemmung der Kontaktinhibierung und der Zellzykluskontrolle (Marlowe und Puga, 2005; Weiss et al., 2008), und eine Hemmung der zellulären Seneszenz (Ray und Swanson, 2009). Verschiedene Studien lassen die Vermutung zu, dass TCDD in der Leber von Nagern tumorpromovierend wirkt, indem es die Apoptose von spontan induzierten Zellen unterdrückt und ihnen somit das Fortschreiten in die Malignität ermöglicht. Dieses Geschehen gilt als frühes Schlüsselereignis in der Tumorpromotion durch TCDD und verwandten Verbindungen (Schwarz et al., 2000; Bock und Köhle, 2005; Simon et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der Apoptose-Hemmung durch TCDD in Leberzellsystemen der Ratte und des Menschen untersucht werden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die anti-apoptotische Wirkung dieses

Fremdstoffes über den AhR vermittelt wird. Die Aufklärung der bislang noch unbekanntenen molekularen Mechanismen der TCDD-vermittelten Kanzerogenese könnte die Risikobewertung einer TCDD-Exposition des Menschen auf eine erheblich solidere Basis stellen als bisher.

5.1 TCDD und Apoptose – Stand der Forschung

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde an Leberzellen verschiedener Spezies untersucht, ob TCDD die spontane sowie die durch unterschiedliche Stimuli induzierte Apoptose zu beeinflussen vermag. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Studien, welche die Effekte von TCDD auf die Apoptose in anderen Zelltypen untersucht haben. Im Folgenden soll zunächst der aktuelle Stand der Forschung zu diesem Thema wiedergegeben werden, bevor die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten diskutiert werden.

In normalen Leberzellen der Ratte führte TCDD nur zu einer geringfügig gesteigerten Proliferation (Schrenk et al., 1992). Auch Stinchcombe et al. konnten im Initiations-Promotions-Experiment nur eine geringfügig angestiegene Mitoserate in Präneoplasien der Rattenleber nachweisen. Dagegen war die Apoptoserate im präneoplastisch veränderten Lebergewebe unter dem Einfluss von TCDD deutlich erniedrigt (Stinchcombe et al., 1995). Ebenso führte TCDD-Behandlung zu einer Verringerung der Apoptoserate in Hepatozyten *c-myc* transgener Mäuse (nur Weibchen), während ein solcher Effekt nicht bei *transforming growth factor* (TGF)- α transgenen Mäusen beobachtet werden konnte (Schrenk et al., 1997).

In vitro-Experimente in primären Rattenhepatozyten zeigten eine Hemmung der durch UV-Licht oder 2-AAF induzierten Apoptose unter Anwesenheit von TCDD. Dagegen bewirkte TCDD in dieser Studie keine Hemmung der durch TGF- β 1 induzierten Apoptose (Wörner und Schrenk, 1996). Die hemmende Wirkung von TCDD auf die UV-induzierte Apoptose konnte an Hand verringerter Chromatinkondensation, einer Inhibierung der DNS-Fragmentierung und auf Proteinebene durch Verhinderung eines Anstiegs an p53 gezeigt werden. Die Inkubation der Zellen mit TCDD alleine resultierte in einer Hyperphosphorylierung von p53 (Wörner und Schrenk, 1996; Wörner und Schrenk, 1998).

Auch *in vivo* konnten Pääjärvi et al. einen Effekt von TCDD auf p53 beobachten. Han/Wistar- und Long-Evans-Ratten wurden für acht Tage mit TCDD behandelt und

bekamen DEN als genotoxisches Agens 24 h vor Ende des Versuchs appliziert. TCDD-behandelte Ratten wiesen im Vergleich zu solchen Tieren, die nur DEN erhalten hatten, weniger TUNEL-positive Hepatozyten auf. Dies korrelierte mit einer Verringerung des Anstieges an p53-Protein und phosphoryliertem p53 (ser15). In HepG2-Zellen bewirkte TCDD in dieser Studie eine Reduktion der Zunahme an Gesamt-p53 und an phosphoryliertem p53 als Antwort auf apoptotische Stimuli. TCDD alleine bewirkte hier keine Phosphorylierung dieses Proteins (Pääjärvi et al., 2005).

Christensen et al. konnten keine Inhibierung der durch Bleomycin oder TGF- β 1 induzierten Apoptose in primären Hepatozyten von Mäusen beobachten (Christensen et al., 1998). Reiners und Clift konnten in der Maushepatomzelllinie c1c1c7 bei der Apoptose durch C₂-Ceramid keine hemmende Wirkung von TCDD zeigen, und auch in unveröffentlichten Versuchen von Schwarz et al. an den Hepatomzelllinien FTO-2B (Ratte, TGF- β 1) und HepG2 (Mensch, UV) besaß TCDD keine anti-apoptotische Wirkung (Reiners und Clift, 1999; Schwarz et al., 2000).

Verschiedene Studien konnten keinen Effekt auf die Apoptose durch TCDD in Hepatomzellen zeigen. Pääjärvi et al. fanden in HepG2-Zellen sowohl eine Hemmung der durch verschiedene genotoxische Stimuli induzierten p53-Stabilisierung durch TCDD, als auch eine Hemmung der Expression des p53-Zielgens p21. Ein direkter Effekt auf apoptotische Vorgänge in HepG2-Zellen durch TCDD wurde in dieser Studie nicht untersucht (Pääjärvi et al., 2005). In derselben humanen Hepatomzelllinie fanden Ambolet-Camoit et al. ebenfalls, dass TCDD die p53-Stabilisierung (hier durch Etoposid) hemmte. Darüber hinaus konnte ein hemmender Effekt auf die Aktivität der Effektorcaspasen durch TCDD beobachtet werden (Ambolet-Camoit et al., 2010).

Neben den kurz vorgestellten Studien an Leberzellen ist auch untersucht worden, ob TCDD Apoptose in anderen Zellsystemen hemmen kann.

In immortalisierten menschlichen Mammaepithelzellen MCF10A führte der Entzug von epidermalem Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* (EGF)) aus dem Kulturmedium zu Apoptose, welche durch TCDD unterdrückt wurde. Davis et al. konnten dies an Hand von Phosphatidylserin-Externalisierung und PARP-Spaltung zeigen. Der anti-apoptotische Effekt beruhte laut den Autoren darauf, dass TCDD den Wachstumsfaktor TGF- α induziert. Dieses Protein stellt einen Liganden des EGF-Rezeptors dar. Durch dessen Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung und

damit zur Aktivierung von Akt, was laut der Autoren das eigentliche anti-apoptotische Signal darstellt (Davis et al., 2000; Davis et al., 2001; Davis et al., 2003).

Auch Park und Matsumura führten Versuche mit MCF10A-Zellen durch. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass 10 nM TCDD die pro-apoptotische Wirkung zahlreicher Stimuli auf Ebene der DNS-Fragmentierung und Phosphatidylserin-Externalisierung in diesen Zellen unterdrückte. Die Autoren der Studie diskutierten, dass sich der anti-apoptotische Effekt von TCDD dadurch erklären lässt, dass es die Wirkung des EGF nachahmt und den *c-Src/extracellular signal regulated kinase* (ERK)-Signalweg aktiviert (Park und Matsumura, 2006).

In den humanen Lymphomzelllinien U937, DOHH-2 und Namalwa bewirkte die Vorbehandlung der Zellen mit 10 nM TCDD für 48 h eine Resistenz gegenüber UV-Licht-induzierter Apoptose, was an Hand von verminderter Phosphatidylserin-Externalisierung gezeigt wurde. Dieser Effekt ließ sich durch eine Hemmung der COX-2 mit NS-398 aufheben (Vogel et al., 2007).

In einer Studie an C2C12 Maus-Skelettmyoblasten wurde beobachtet, dass TCDD die Staurosporin-induzierte Apoptose in diesen Zellen hemmte. Dies wurde mittels TUNEL-Versuchen gezeigt und ging mit einer Depolarisation der Mitochondrien einher. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Störung der Mitochondrien zu einer Calcineurin A-abhängigen Aktivierung von NF- κ B führte. Eine Hemmung von Calcineurin A bewirkte eine Aufhebung der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD (Biswas et al., 2008).

In embryonalen Fibroblasten von AhR-knock out-Mäusen *in vitro*, in die ein aktiver AhR transfiziert worden war, verringerte TCDD die zytotoxische Wirkung von Etoposid. Die Autoren der Studie schlossen aus ihren Versuchen, dass der aktivierte AhR an den pro-apoptotischen Transkriptionsfaktor E2F1 bindet und dessen Aktivität hemmt (Marlowe et al., 2008).

TCDD wirkt in verschiedenen Zellsystemen anti-apoptotisch. Es ist daneben auch gezeigt worden, dass dieses Dioxin pro-apoptotische Effekte in bestimmten Zellen, vor allem T-Zellen besitzt. So induzierte TCDD in einer einmaligen i.p. Dosis von 50 μ g TCDD/kg bw Apoptose in T-Zellen von Mäusen. Diese Beobachtung wurde durch eine Aktivierung von NF- κ B und eine daraus resultierende Induktion des Fas-Liganden erklärt (Camacho et al., 2005). Und auch in humanen T-Zelllinien bewirkte TCDD die Induktion von Apoptose. Die Autoren der Studie zeigten, dass TCDD die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) aktivierte und dass dies ohne die Beteiligung des AhR

zum Caspasen-abhängigen Zelltod führte (Hossain et al., 1998). In einer späteren Studie zeigte diese Arbeitsgruppe, dass es durch TCDD in der T-Zelllinie L-MAT zu einem Anstieg an intrazellulärem Calcium und einer Aktivierung von Calmodulin kommt, was die Apoptose auslöst (Kobayashi et al., 2009). TCDD bewirkte im Tierversuch in verschiedenen Spezies Thymusatrophie (Hanberg et al., 1989). Die Beobachtung, dass TCDD Thymozyten und T-Zellen in die Apoptose treibt, könnte als Erklärung für dessen immunotoxische Wirkung dienen (Kamath et al., 1997).

5.2 Zytotoxizität

Zunächst wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die drei Behandlungen UVC-Strahlung, OTA und CHX zytotoxisch auf primäre Hepatozyten männlicher Wistar Ratten wirken und welchen Einfluss die Koinkubation mit 1 nM TCDD auf die Zellvitalität besitzt (siehe Kapitel 4.1.2). UV-Bestrahlung wirkte in beiden verwendeten Testsystemen (Resazurin-Reduktionstest und Trypan-Blau Test) Dosis-abhängig zytotoxisch auf die Zellen. TCDD selbst verringerte in beiden Testsystemen die Vitalität der Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle schwach, aber statistisch signifikant. Im Trypan-Blau Test, im Gegensatz zum Resazurin-Reduktionstest, verursachte TCDD bei allen Strahlungsdosen eine zusätzliche Verringerung der Vitalität im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Dieser Effekt erschien nicht abhängig von einer Aktivierung des AhR zu sein, da die Antagonisierung dieses Rezeptors mit CH-223191 die zusätzlich zytotoxische Wirkung von TCDD nicht aufhob.

Sowohl OTA als auch CHX wirkten Konzentrations-abhängig zytotoxisch auf primäre Rattenhepatozyten, ohne dass TCDD einen Einfluss hierauf besaß.

Die Versuche zeigten, dass TCDD die zytotoxische Wirkung der drei Behandlungen nicht aufhob, und insbesondere, dass TCDD selbst, sowie in Kombination mit UVC-Strahlung zusätzlich zytotoxisch wirkte. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer Reihe anderer Studien, in denen TCDD anti-apoptotisch wirkte und auch den zytotoxischen Wirkungen der verwendeten apoptotischen Stimuli entgegenwirkte (Davis et al., 2000 (Serumentzug); Marlowe et al., 2008 (Etoposid); Ambolet-Camoit et al., 2010 (Etoposid)).

5.3 Nukleäre Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass TCDD die durch UVC-Licht induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten und in humanen Hepatomzellen Huh-7 hemmt (siehe Kapitel 4.1.3, 4.2.1 und 4.2.2).

Dies wurde bei beiden Zelltypen an Hand einer Verringerung der internukleosomalen DNS-Fragmentierung gezeigt. Unter dem Einfluss von TCDD kam es nach UV-Bestrahlung zu einer weniger ausgeprägten DNS-Spaltung als in bestrahlten Zellen ohne TCDD. In den Rattenhepatozyten wurde zusätzlich als Endpunkt für eine apoptotische Wirkung das Auftreten apoptotischer Zellkerne untersucht. Auch hier besaß TCDD einen hemmenden Effekt auf die durch UVC-Licht induzierte Apoptose. Als zweiter Endpunkt für Apoptose in den Huh-7-Zellen diente das Auftreten so genannter „sub-G₁-Zellen“, Zellen mit einem geringeren DNS-Gehalt als ruhende G₁-Zellen. Auch dieser Marker für Apoptose wurde teilweise durch die Behandlung mit TCDD gehemmt. In den primären Hepatozyten machte es keinen Unterschied, ob die Zellen vor der Bestrahlung für 24 h mit TCDD inkubiert worden waren oder ob die Zugabe von TCDD 30 min nach der Bestrahlung erfolgte. In beiden Fällen bewirkte TCDD eine Reduktion des pro-apoptotischen Effekts von UVC-Strahlung auf das Chromatin.

Bisher wurde die Wirkung von TCDD auf apoptotische Effekte im Zellkern in primären Hepatozyten nach UVC-Bestrahlung sowie Inkubation mit AAF gezeigt (Wörner und Schrenk, 1996; Wörner und Schrenk, 1998), in Rattenleberzellen *in vivo* nach DEN-Behandlung (Pääjärvi et al., 2005), in MCF10A-Zellen nach UVC-Bestrahlung (Park und Matsumura, 2006), und in C2C12-Zellen nach Staurosporin-Behandlung (Biswas et al., 2008).

Als weitere pro-apoptotische Stimuli wurden OTA und CHX in den primären Hepatozyten untersucht. Sowohl OTA als auch CHX sind bekannte Induktoren von Apoptose. So konnte gezeigt werden, dass OTA in verschiedenen Zelltypen Apoptose auslöst: etwa in der Leber männlicher Han:NMRI Mäuse (Atroshi et al., 2000), in HepG2-Zellen (Bouaziz et al., 2008; El Golli Bennour et al., 2008), in einer c-myc transfizierten Ratten-Leberepithelzelllinie (Horvath et al., 2002), in Nierenzellen verschiedener Spezies (Kamp et al., 2005; Mally et al., 2006; Rached et al., 2006) und in humanen Lymphozyten (Assaf et al., 2005). CHX induzierte

Apoptose z.B. in der Leber von Ratten *in vivo* (Allesenko et al., 1997; Ito et al., 2006; Kumagai et al., 2006) und in primären Rattenhepatozyten in Suspensionskultur (Blom et al., 1999), sowie in humanen Leukozyten (Baskic et al., 2006).

Beide Verbindungen, OTA und CHX bewirkten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Konzentrations-abhängig für die Apoptose kennzeichnende Effekte: Chromatin-Kondensation und -Fragmentierung, sowie internukleosomale DNS-Fragmentierung. Die pro-apoptotische Wirkung von OTA und CHX wurde nicht durch TCDD-Koinkubation beeinflusst (siehe Kapitel 4.1.3).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass TCDD die pro-apoptotische Wirkung einer Reihe verschiedener Stimuli, welche über die verschiedensten Mechanismen Apoptose induzieren, hemmt. Neben Apoptose durch UVC-Strahlung wurde in der Studie von Wörner und Schrenk in primären Rattenhepatozyten auch die 2-AAF-induzierte Apoptose gehemmt, nicht aber der durch TGF- β 1 induzierte apoptotische Zelltod (Wörner und Schrenk, 1996). In weiteren Studien hemmte TCDD die Apoptose durch Entzug von EGF (Davis et al., 2001), durch DEN (Pääjärvi et al., 2005), UVC-Licht, H₂O₂, Staurosporin, Ionomycin, γ -Strahlen, Paraquat und TGF- β (Park und Matsumura, 2006), Staurosporin (Biswas et al., 2008), sowie durch Etoposid (Ambolet-Camoit et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass TCDD generell Apoptose zu hemmen vermag. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur OTA- und CHX-induzierten Apoptose, die nicht durch TCDD hemmbar waren. Um diese Beobachtung weiter charakterisieren zu können, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit vergleichende Studien zu den drei pro-apoptotischen Stimuli UVC-Strahlung, OTA und CHX durchgeführt. Hierdurch sollten eventuelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Signalwegen, die zur Apoptose durch diese Behandlungen führen, aufgezeigt werden, um an Hand dieser Beobachtungen die molekularen Ziele von TCDD in der Apoptose zu identifizieren.

5.4 Beteiligung des AhR an der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD

Es wurde der Frage nachgegangen, ob der hemmende Effekt von TCDD auf die durch UVC-Licht induzierte Apoptose abhängig von einer Aktivierung des AhR ist.

Hierzu wurden zwei AhR-Antagonisten eingesetzt: α -Naphthoflavon (Santostefano et al., 1993) und CH-223191 (Kim et al., 2006a).

α -Naphthoflavon stellt einen partiellen Antagonisten/Agonisten des AhR dar (Santostefano et al., 1993). In einer Konzentration von 10 μ M bewirkte diese Substanz eine Induktion von CYP1A1, jedoch schwächer als 1 nM TCDD. Die Koinkubation mit beiden Substanzen führte zu einer teilweisen Hemmung der CYP1A1-Induktion von TCDD (siehe Kapitel 4.1.4). CH-223191 selbst induzierte CYP1A1 nicht, in einer Konzentration von 1 μ M hemmte es teilweise die TCDD-induzierte Expression dieses Enzyms.

Bei der Untersuchung der Apoptoserate im DAPI-Färbeexperiment fiel auf, dass weder α -Naphthoflavon noch CH-223191 das prozentuale Auftreten apoptotischer Zellkerne nach UV-Bestrahlung hemmten. Die Koinkubationen mit α -Naphthoflavon und TCDD bewirkte keine Reversion des anti-apoptotischen Effektes von TCDD. CH-223191 jedoch hob die Hemmung der Apoptose wieder auf. Dies könnte daran liegen, dass α -Naphthoflavon im Gegensatz zu CH-223191 ebenfalls den AhR aktiviert. Der spezifische Antagonist CH-223191 bewirkte auch eine Reversion des anti-apoptotischen Effektes von TCDD auf Ebene der DNS-Fragmentierung.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Hemmung der Apoptose durch TCDD in primären Rattenhepatozyten wahrscheinlich abhängig von einer Aktivierung des AhR ist. In der Literatur wird bisher die AhR-Abhängigkeit der Apoptosehemmung durch TCDD unterschiedlich bewertet, in der Mehrzahl der Studien wurde die Anwesenheit und Aktivierung des AhR als ein essentieller Bestandteil für die anti-apoptotische Wirkung von TCDD identifiziert.

Pääjärvi et al. zeigten in HepG2-Zellen, dass der hemmende Effekt von TCDD auf die Akkumulation von p53 nach Behandlung der Zellen mit Leptomycin B vermutlich AhR-abhängig ist. Die Koinkubation der Zellen mit α -Naphthoflavon bewirkte eine teilweise Wiederherstellung der p53-Proteinlevel (Pääjärvi et al., 2005).

In MCF10A-Zellen untersuchten Davis et al. die AhR-Abhängigkeit der Apoptosehemmung durch TCDD nach Serumentzug. Die Verwendung von 3'-Methoxy-4'-Nitroflavon (MNF) bewirkte eine teilweise Aufhebung des anti-apoptotischen Effektes von TCDD, was mit Hilfe von Annexin V-Bindung an externalisiertes Phosphatidylserin gezeigt worden war. Daneben unterdrückte dieser Antagonist die Induktion von TGF- α , sowie die Aktivierung von Akt und ERK und

somit wesentliche Signalelemente, die die Autoren für die Apoptosehemmung durch TCDD in ihrem experimentellen System verantwortlich machten (Davis et al., 2003). Ebenfalls in MCF10A-Zellen führte die Behandlung UVC-Licht bestrahlter Zellen mit den beiden AhR-Antagonisten α -Naphthoflavon und 10-Phenanthrolin zu einer Aufhebung des anti-apoptotischen Effektes von TCDD, weshalb die Autoren dieser Studie eine AhR-Abhängigkeit dieses Effektes vorschlugen. In dieser Studie wurde die Phosphatidylserin-Externalisierung als analytischer Endpunkt verwendet (Park und Matsumura, 2006). In einer weiteren Studie aus der gleichen Arbeitsgruppe mit MCF10A-Zellen, welche durch Selektion mit Estradiol zu einer Überexpression des AhR angeregt worden waren, konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseresistenz dieser Zellen mit dem AhR-Status korrelierte, unabhängig von der Anwesenheit eines exogenen Liganden. Die selektierten Zellen zeigten sich weniger empfindlich gegenüber verschiedenen pro-apoptotischen Stimuli als Kontrollzellen. Wurde die Aktivität des AhR mit dem AhR-Antagonisten MNF blockiert, so kam es zu einer starken Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu den alleinigen Apoptoseauslösenden Behandlungen (Wong et al., 2009).

In humanen Lymphomzellen konnte die TCDD-bedingte Resistenz gegenüber durch UVC-Licht ausgelöster Apoptose durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit MNF gehemmt werden (Vogel et al., 2007).

In den AhR-negativen Skelettmyoblastzellen C2C12 zeigte die Koinkubation der Zellen mit α -Naphthoflavon keine Effekte auf die TCDD-induzierte Expression von Markerproteinen mitochondrialen Stresses. Und auch die Transfektion der Zellen mit ARNT-siRNA bewirkte keine Reversion der TCDD-induzierten Effekte, weshalb die Autoren hier vorschlugen, dass die Effekte von TCDD auf mitochondrialen Stress, die sie verantwortlich für die Apoptosehemmung machten, nicht abhängig von einer Aktivierung des AhR seien. In dieser Studie wurde zwar eingangs mit Hilfe des TUNEL-Assays gezeigt, dass TCDD die durch Staurosporin induzierte Apoptose in diesen Zellen hemmt, die direkte AhR-Abhängigkeit dieses Effektes wurde nicht untersucht (Biswas et al., 2008).

In AhR-*knock out* Mäusen fiel auf, dass in der Leber der Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen stark erhöhte Apoptoseraten auftraten, was mit einer erhöhten Produktion von TGF- β einherging (Gonzales und Fernandez-Salguero, 1998). Auch Embryofibroblasten aus AhR-*knock out* Mäusen zeigten im Gegensatz zu Zellen aus Wildtyptieren eine stark erhöhte Apoptoserate (Elizondo et al., 2000). Die

Transfektion solcher Fibroblasten mit einem funktionierenden AhR verringerte die basale Apoptose. In Anwesenheit des Rezeptors bewirkte TCDD eine Hemmung des Etoposid-induzierten Zelltodes in diesen Zellen. War der Rezeptor ausgeschaltet, führte TCDD-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu keiner Verringerung der zytotoxischen Wirkung dieser Apoptose-auslösenden Verbindung (Marlowe et al., 2008).

5.5 p53-Akkumulation

Sowohl von Wörner und Schrenk (1996 und 1998), als auch von Päärjärvi et al. (2005) ist gezeigt worden, dass TCDD in Leberzellen der Ratte den Anstieg von p53-Protein als Antwort auf eine genotoxische Behandlung unterdrückte. In der Studie von Wörner und Schrenk wurden primäre Rattenhepatozyten mit UVC-Licht bestrahlt und für 24 h mit TCDD behandelt. Während die TCDD-Behandlung unbestrahlter Zellen sowie von Zellen, die mit einer UV-Dosis von 90 J/m^2 bestrahlt worden waren, eher zu einer Zunahme der p53-Proteinmenge führten, bewirkte die TCDD-Behandlung höher bestrahlter Zellen eine Erniedrigung der hierbei stärker auftretenden UV-bedingten p53-Induktion (Wörner und Schrenk, 1996). Päärjärvi et al. behandelten Ratten für 8 Tage mit TCDD und dann mit einer initiierenden Dosis DEN. In der Leber der Tiere führte die TCDD-Behandlung im Vergleich zu nur mit DEN behandelten Tieren zu einer Verringerung der p53-Proteinmenge, sowie der Phosphorylierung an ser15. Dieser Effekt wurde durch eine Induktion der p53-Ubiquitinligase mdm2 erklärt. Diese Ligase ubiquitiniert p53, wodurch das Protein abgebaut wird (Moll und Petrenko, 2003). Die Autoren zeigten mit Hilfe von AhR-*knock out* Mäusen, dass der Effekt von TCDD auf die p53-Proteinmenge abhängig vom AhR war. Auch in humanen Hepatomzellen HepG2 beobachteten sie, dass TCDD die durch pro-apoptotische Behandlungen bedingte p53-Induktion unterdrückte, was durch die gleichzeitige Behandlung mit α -Naphthoflavin teilweise wieder aufgehoben wurde (Päärjärvi et al., 2005). Ambolet-Camoit und Mitarbeiter konnten in HepG2-Zellen zeigen, dass der hemmende Effekt von TCDD auf die durch genotoxische Behandlung (mit Etoposid) induzierte p53-Akkumulation und -Phosphorylierung über eine AhR-abhängige Induktion des negativen p53-Regulators *Anterior Gradient-2* vermittelt wird. Die Hemmung der Expression dieses

Gens hob den hemmenden Effekt von TCDD sowohl auf die p53-Charakteristiken, als auch auf die Effektorcaspasenaktivität auf (Ambolet-Camoit et al., 2010).

TCDD führt *in vivo* ohne vormalige Behandlung mit genotoxischen Agentien zu einer Verringerung des p53-Levels. So bewirkte TCDD 14 Monate nach einmaliger Behandlung weiblicher Makaken zu erniedrigten p53- und p21 Proteingehalten in primären Zellen des Cervixepithels (Enan et al., 1998).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte zunächst bestätigt werden, dass TCDD die durch UV-Licht induzierte Akkumulation von p53 unterdrückte. Dies zeigte sich erst in hohen UV-Dosen ab 100 J/m^2 . Bei einer Dosis von 50 J/m^2 zeigte sich nur eine schwache p53-Induktion, welche nicht durch TCDD gehemmt wurde. Die Behandlung bestrahlter Zellen mit TCDD und dem AhR-Antagonisten CH-223191 zeigte, dass der Effekt von TCDD auf p53 AhR-abhängig war. Die Inkubation bestrahlter Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk reduzierte die p53-Proteinmenge nahezu auf das Niveau der Kontrolle. TCDD alleine bewirkte eine schwache, statistisch nicht signifikante Induktion der p53-Proteinmenge in unbestrahlten Primärhepatozyten (siehe Kapitel 4.1.5). Dies wurde auch von Wörner und Schrenk (1996, 1998) gezeigt, nicht aber in anderen Studien mit HepG2-Zellen, wo TCDD selbst nicht zu einer p53-Stabilisierung führte (Päärjärvi et al., 2005; Ambolet-Camoit et al., 2010). Es könnte sich hierbei um einen Zell-spezifischen Effekt handeln.

Die Beobachtung, dass die p53-Akkumulation in den primären Rattenhepatozyten Caspasen-abhängig war, lässt den Schluss zu, dass die Hemmung der durch UV-Licht induzierten p53-Akkumulation durch TCDD zumindest *in vitro* in primären Rattenhepatozyten ein sekundärer Effekt sein könnte. Durch die Bestrahlung der Zellen mit hohen UV-Dosen kommt es zu massivem Zellsterben und damit auch zu starker apoptotischer DNS-Fragmentierung. Die daraus resultierenden DNS-Doppelstrangbrüche aktivieren p53. Die Translation von p53 kann im Gegensatz zur Translation anderer Proteine, wie etwa CYP1A1 auch unter apoptotischen Bedingungen weiterlaufen, da sie cap-unabhängig abläuft (Clemens et al., 2000; Baird et al., 2006; Yang et al., 2006). Da TCDD die DNS-Fragmentierung AhR-abhängig hemmt, lässt sich der Effekt von TCDD auf die p53-Proteinmenge durch Antagonisierung des AhR wieder aufheben.

Die Beteiligung verschiedener DNS-Schäden durch UVC-Strahlung an der Aktivierung und Akkumulation von p53 wird kontrovers diskutiert und ist vermutlich Zelltyp-abhängig: in lymphoblastoiden Zellen ist sie wahrscheinlich abhängig von DNS-Strangbrüchen, die entweder durch die DNS-Reparatur oder aber durch die DNS-Replikation hervorgerufen werden. Die direkt durch UVC induzierten DNS-Schäden aktivieren p53 nicht (Nelson und Kastan, 1994). In Mausfibroblasten fand eine p53-Akkumulation als Antwort auf UVC-Bestrahlung zwar in proliferierenden Zellen statt, nicht aber in Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befanden. Trotz der mangelnden p53-Akkumulation in diesen Zellen kam es zur DNS-Bindung des Tumorsuppressors (Pitkänen et al., 1998). In humanen Fibroblasten schienen hingegen UV-induzierte DNS-Schäden direkt für die p53-Akkumulation verantwortlich zu sein (Enns et al., 2000).

Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass UVC-induzierte DNS-Schäden direkt zu einer Akkumulation von p53 in primären Rattenhepatozyten führen. Trotzdem lässt der Umstand, dass eine Hemmung der Caspasenaktivität eine vollständige Hemmung der UVC-induzierten p53-Akkumulation bewirkte, den Schluss zu, dass die Caspasen-abhängige DNS-Fragmentierung in diesem Fall für die p53-Akkumulation verantwortlich war.

Durch OTA-Behandlung kam es trotz ausgeprägter DNS-Fragmentierung nur zu einem sehr geringen Anstieg an p53 (siehe Kapitel 4.1.5). Auch in HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, dass OTA-Behandlung zu einer Akkumulation von p53 führte (Buaziz et al., 2008; El Golli Bennour et al., 2008). Durch die Behandlung mit CHX kam es zu keiner p53-Akkumulation (siehe Kapitel 4.1.5).

Obwohl OTA und CHX beide in den verwendeten Konzentrationen die Proteinbiosynthese komplett hemmten (siehe Kapitel 4.1.10), kam es durch OTA im Gegensatz zu CHX zu einem geringen, statistisch signifikanten p53-Anstieg. Dies könnte daran liegen, dass beide Proteinbiosynthese-Inhibitoren auf unterschiedliche Arten wirken: OTA interferiert auf Grund seiner Strukturähnlichkeit mit der Phenylalanin-tRNS-Synthase und der Phenylalanin-Hydroxylase und hemmt somit die Peptidelongation (Creppy et al., 1990; Bennett und Klich, 2003). CHX greift an den 80S-Ribosomen an und hemmt dort sowohl die Initiation als auch die Elongation der Proteinsynthese (Obrig et al., 1971). In Mausfibroblasten bewirkte die Anwesenheit von CHX eine komplette Hemmung der durch UVC-Licht induzierten p53-Akkumulation (Pitkänen et al., 1998).

Ein Unterschied im jeweiligen Mechanismus der Proteinsynthesehemmung könnte die Grundlage dafür sein, dass trotz apoptotischer DNS-Fragmentierung durch beide Substanzen nur OTA zu einer leichten p53-Induktion führte.

5.6 Genexpression

TCDD vermittelt eine Vielzahl, wenn nicht sogar alle seiner toxischen Wirkungen über den AhR. Dieser Rezeptor bindet an DNS-Erkennungssequenzen und moduliert die Expression von AhR-Zielgenen (Safe, 2001; Kawajiri und Fujii-Kuriyama, 2007; Matsumura, 2009).

In dieser Arbeit wurde zunächst von der Hypothese ausgegangen, dass TCDD hemmend auf die Apoptose wirkt, indem es die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins Bcl-x_L induziert. Diese Annahme rührte unter anderem aus unveröffentlichten Ergebnissen von Knerr (2006): in Microarray-Experimenten war gezeigt worden, dass in C57BL/6 Mäusen die Behandlung mit 1 µg TCDD/kg bw für 48 h zu einer erhöhten Expression des bcl-x-Gens in der Leber führte. Derselbe Effekt war in der Leber von Mäusen zu beobachten, welche einen konstitutiv aktiven AhR exprimierten (Knerr, 2006). In einer chronischen Kanzerogenitätsstudie mit männlichen B6C3F1 Hybridmäusen zeigte sich in TCDD-induzierten Adenomen und Karzinomen in der Leber im Vergleich zum umliegenden Gewebe eine erhöhte Expression von Bcl-x_L (Christensen et al., 1999). Und auch Fischer et al. konnten in einer Studie an C57BL/6 Mäusen zeigen, dass im Thymus der Tiere nach akuter TCDD-Gabe eine Induktion des bcl-x Gens stattfand (Fischer et al., 2004). In einer weiteren Studie entwickelten weibliche C57BL/10J Mäuse nach TCDD-Gabe Lymphome, was mit einer erhöhten Bcl-x_L-Expression in den Lymphknoten einherging. In derselben Studie konnte in verschiedenen humanen Lymphomzelllinien gezeigt werden, dass TCDD in diesen Zellen eine Resistenz gegenüber UVC-Licht induzierter Apoptose bewirkte, die von einer Induktion von bcl-x_L begleitet worden war (Vogel et al., 2007).

Zunächst wurde auf diesen Ergebnissen aufbauend untersucht, ob TCDD in primären Rattenhepatozyten Zeit- und Konzentrations-abhängig die Expression von Bcl-x_L auf mRNA- und Proteinebene moduliert (siehe Kapitel 4.1.1). Es zeigten sich keine Effekte auf die Expression dieses Gens durch die Behandlung der Zellen mit TCDD.

Eine Literaturrecherche ergab abgesehen von den oben genannten Studien keine weiteren Ergebnisse in Bezug einer Regulation von *bcl-x_L* durch TCDD. In diesen Studien, sowie von Knerr, sind Mäuse untersucht worden. Bcl-x trat in keiner Studie mit Ratten als durch TCDD regulierbar auf, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen Spezies-spezifischen Effekt bei der Maus handelt. In der Literatur herrscht Einheit darüber, dass TCDD zwar Spezies-übergreifend die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen induziert, weitere Zielgene jedoch Spezies-spezifisch reguliert werden. Dies liegt vermutlich nicht an einer unterschiedlichen Spezifität des AhR, welcher hochkonserviert ist, sondern viel mehr daran, dass die responsiven Elemente (DRE, XRE) in der DNS der unterschiedlichen Spezies nicht konserviert vorliegen (McGregor et al., 1998; Sun et al., 2004; Kim et al., 2009).

Da TCDD in Primärehepatozyten der Ratte die UVC-Licht-induzierte Apoptose hemmte, interessierte die Frage, welche an der Apoptose beteiligten Gene in diesem Zellsystem durch TCDD reguliert werden (siehe Kapitel 4.1.6). In einem ersten Schritt wurden daher Experimente mit kommerziell erhältlichen qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* durchgeführt, um zu untersuchen, welche an der Apoptose beteiligten Gene durch TCDD, UVC-Bestrahlung, OTA sowie durch Kombinationen der pro-apoptotischen Stimuli mit TCDD moduliert werden.

Zunächst sollen die Ergebnisse zu den Inkubationen primärer Rattenhepatozyten mit 1 nM TCDD für 24 und 48 h diskutiert werden. Hierbei ist zunächst zu erwähnen, dass auch in diesen Experimenten TCDD keinen Einfluss auf die Expression von *bcl-x_L* besaß.

Im Vergleich zur Induktion von CYP1A1 durch TCDD nach 24 bzw. 48 h waren die Änderungen in der Expression von an der Apoptose beteiligten Genen gering. Die durch TCDD regulierten Gene ließen keinen offensichtlichen Signalweg der Apoptosehemmung ableiten. Es wurden sowohl pro- als auch anti-apoptotische Gene in ihrer Expression moduliert. Induziert wurden die Gene *bcl2l11* (Bim, pro-apoptotisches Bcl-2 Protein), *birc1b* (NAIP, anti-apoptotisches IAP Protein), *pycard* (*Pyrin domain and caspase recruitment domain containing*, auch bekannt als *apoptosis associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) oder *target of methylation-induced silencing 1* (TMSI)), *tnfa* (pro-apoptotisches und pro-

inflammatorisches Zytokin) sowie faslg (pro-apoptotischer FAS-Rezeptor-Ligand). Reprimiert wurde die Expression des Gens tnfrsf11b (Osteoprotegerin, anti-apoptotisch).

In der Literatur trat das pro-apoptotische bcl2l11 bisher nur in einer Microarraystudie in der Leber von ovariectomierten C57BL/6 Mäusen als durch TCDD induzierbar auf (Boverhof et al., 2005). NAIP wurde in der Microarraystudie von Fisher et al. im Thymus von intakten C57BL/6 Mäusen durch TCDD induziert (Fisher et al., 2004).

Tnfrsf11b ist in humanen Leberstammzellen durch TCDD-Inkubation reprimiert worden (Kim et al., 2009), und auch in weiblichen, nicht aber in männlichen C57BL/6 Mäusen mit einem konstitutiv aktiven AhR war die Expression dieses Gens im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erniedrigt (Wejheden et al., 2010). Tnfrsf11b ist ein löslicher Rezeptor der TNF-Familie und wurde ursprünglich als ein Faktor, der eine Rolle in der Knochenhomöostase spielt, identifiziert. Tnfrsf11b stellt einen Rezeptor für den *receptor activator of nuclear factor-B ligand* dar und verhindert die Differenzierung von Osteoklasten. Darüber hinaus bindet auch der *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) an Tnfrsf11b. Diese Bindung wirkt anti-apoptotisch, da TRAIL nicht mehr für eine Bindung an seine membranständigen Rezeptoren *death receptor* DR4 und DR5 zur Verfügung steht. Tnfrsf11b scheint besondere Wichtigkeit in der Resistenz von Tumorzellen (und anderen Zellen) gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose zu besitzen (Chamoux et al., 2008; De Toni et al., 2008; Zauli et al., 2009).

In keinen weiteren aufgefunden Studien wurden diese drei Gene (bcl2l11, birc1b, tnfrsf11b) durch die Behandlung von Versuchstieren oder Zellen mit TCDD reguliert. Die genannten Gene wurden durch die Behandlung der Primärhepatozyten für 48 h jeweils um den Faktor 2 hoch bzw. runter-reguliert. Es kann keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, welchen Einfluss diese Expressionsänderungen auf das apoptotische Geschehen in den Zellen besitzen könnten.

Faslg und tnfa sind zwei Gene, welche für pro-apoptotische Liganden der TNF-Familie codieren. Eine Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges durch diese beiden Todesliganden in Hepatozyten scheint eine Rolle in zahlreichen experimentellen und menschlichen Lebererkrankungen zu spielen, etwa bei viraler Hepatitis, akutem Leberversagen oder hepatozellulärem Karzinomen (Hatano, 2007). Bei Faslg handelt es sich um den Liganden des FAS-Rezeptors (auch Apo-1 oder CD95 genannt), welcher auf den meisten Zellen exprimiert wird. Faslg selbst wird

dagegen vor allem von CD4 und CD8 T-Zellen gebildet. Dieses Protein spielt eine Rolle im Entzündungsgeschehen sowie in der Apoptose. Bindet Faslg an seinen Rezeptor kommt es zur Bildung des *death inducing signaling complex* (DISC). Der FAS-DISC enthält neben dem Rezeptor-Ligand-Komplex ferner FADD sowie die Procaspasen 8 und 10. Diese Procaspasen werden im DISC autokatalytisch aktiviert und können nun entweder direkt die Effektor-Caspasen aktivieren oder über eine Spaltung von Bid und der darauf folgenden Freisetzung pro-apoptischer Faktoren aus den Mitochondrien die intrinsische Caspase-Kaskade in Gang setzen. Die zelluläre Kontrolle der FAS/Faslg-induzierten Apoptose geschieht durch die Regulation der Expression von Faslg durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. In den meisten Zellen ruht die Expression des Faslg. In geringerem Maße wird diese Form der Apoptose durch die Expression von FAS direkt reguliert, etwa durch p53. Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der FAS/Faslg-induzierten Apoptose geschieht über c-Flip, welches die Aktivierung der Caspase-8 hemmt (Hohlbaum et al., 2002; Wajant, 2002; Heyer et al., 2006).

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert und spielt in vielen physiologischen Vorgängen eine Rolle, zum Beispiel in Entzündung und Apoptose. Dieses Protein wirkt hauptsächlich über die Bindung an zwei Oberflächenrezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. Die Bindung an TNF-R1 führt zur Komplexbildung mit TRADD sowie mit FADD, TRAF2 und der *death domain kinase* RIPK. In diesem Komplex ist FADD wichtig für die Aktivierung der Caspase-Kaskade und der Auslösung der Apoptose. TRAF2 und RIPK aktivieren NF- κ B sowie MAP-Kinasekaskaden. Dieser Weg wirkt der Apoptose entgegen, etwa über die Induktion von IAPs durch NF- κ B (Liu, 2005; Hatano, 2007; Ilnatko und Kubes, 2007).

Beide Gene, *tnfa* und *faslg*, sind in verschiedenen Studien als durch TCDD regulierbar identifiziert worden. TNF- α wird speziesübergreifend durch TCDD induziert, sowohl *in vivo* als auch in Zelllinien verschiedener Gewebe (Vogel und Abel, 1995; Charles und Shiverick, 1997; Yang et al., 1999; Kern et al., 2002; Zeytun et al., 2002; Fisher et al., 2004; Abe et al., 2006; Cheon et al., 2007). Die Expression von *faslg* wird durch TCDD reprimiert (Puga et al., 2000a; Knerr, 2006 (konstitutiv aktiver AhR)) oder induziert (Kamath et al., 1999; Zeytun et al., 2002). Sowohl TNF- α als auch FAS/Faslg scheinen eine wichtige Rolle in der toxischen Wirkung von TCDD zu spielen.

Die akute Exposition gegenüber TCDD führte bei männlichen ICR Mäusen zu Leberschädigungen sowie zu einem starken Gewichtsverlust (*wasting syndrome*). Diese akuten Wirkungen gingen mit einer Erhöhung der Serumlevel an TNF- α in exponierten Tieren einher (Wu et al., 2004). Die gleichzeitige Behandlung von männlichen C57BL/6J Mäusen mit TCDD und einem TNF- α -Antikörper oder mit Dexamethason, einem anti-inflammatorischen Glukokortikoid führte zu einer Verringerung der Mortalität durch TCDD (Taylor et al., 1992). In haarlosen HRS/J Mäusen bewirkte die topische Applikation von TCDD eine Erhöhung der TNF- α -Menge in der Haut. In Kulturen primärer Keratinozyten oder Fibroblasten neugeborener Mäuse jedoch kam es durch TCDD-Behandlung zu keiner Induktion dieses Zytokins (Connor et al., 1994). Eine Studie an einer humanen Makrophagen-Zelllinie zeigte, dass TCDD über einen AhR-abhängigen Mechanismus unter der Beteiligung von EGFR und ERK eine Induktion von TNF- α bewirkte (Cheon et al., 2007).

Die thymusathrophische Wirkung von TCDD sowie die Induktion von Apoptose in Thymozyten sind in C57BL/6 Mäusen abhängig vom Vorhandensein sowohl des FAS-Rezeptors als auch des Faslg, beide *knock outs* bewirkten einen erheblichen Schutz der Tiere vor diesen adversen Wirkungen von TCDD. Ferner bewirkte die Behandlung der Tiere mit TCDD die Induktion von Faslg in Thymozyten sowie in der Leber. In denselben Mäusen wurde gezeigt, dass die Induktion von Faslg sowie die Induktion von Apoptose in T-Zellen AhR-abhängig über eine Aktivierung von NF- κ B vermittelt werden (Kamath et al., 1999; Camacho et al., 2005; Singh et al., 2007). *In vitro* ließen sich diese Beobachtungen für T-Zellen nur in aktiviertem Zustand der Zellen, bzw. in Anwesenheit dendritischer Zellen reproduzieren (Singh et al., 2008).

TNF- α kann abhängig vom Zellgeschehen sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkungen nach sich ziehen (Liu, 2005; Ilnatko und Kubes, 2007). Daher besteht die Möglichkeit, dass TCDD die Apoptose hemmt, indem es über eine Induktion von TNF- α den anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Eine Wechselwirkung zwischen NF- κ B und TCDD (bzw. dem AhR) ist in verschiedenen Studien bereits gezeigt worden (Tian et al., 1999; Puga et al., 2000b; Camacho et al., 2005; Singh et al., 2007; Vogel und Matsumura, 2009). Hierfür würden auch die Induktion von faslg sowie birc1b, einem IAP, durch TCDD sprechen. Es ist nicht klar, ob die Hepatozyten selbst TNF- α als Antwort auf TCDD exprimieren oder ob die beobachtete Induktion dieses Zytokins von Lebermakrophagen (Kupfferzellen),

welche ebenfalls in der Kultur primärer Hepatozyten enthalten sein können (Johnston und Jasuja, 1994), herrührt.

Pycard trat bisher nur in einer Expressionsstudie in HepG2-Zellen als durch TCDD induzierbar auf (Jennen et al., 2010). Bei Pycard handelt es sich um ein zentrales Adapterprotein im Inflammasom. In diesem zytosolischen Proteinkomplex wird im Zuge der Pathogenerkennung die Caspase-1 aktiviert, welche wiederum proinflammatorische Zytokine aktiviert (Taniguchi und Sagara, 2007). In Neutrophilen wird Pycard sowohl durch TNF- α , als auch durch Faslg induziert (Shiohara et al., 2008), ferner scheint dieses Protein einen Effekt auf die Aktivierung von NF- κ B zu besitzen, je nach zellulärem Kontext aktivierend (Hasegawa et al., 2005) oder reprimierend (Sakar et al., 2006). In Kolonkarzinomzellen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass Pycard in der p53-Bax-abhängigen Apoptose eine sensibilisierende Rolle spielt. Die häufig in Krebszellen aufgefundene Methylierung des Pycard-Promotors und die damit einhergehende Stilllegung der Expression dieses Gens könnte eine Funktion in der Resistenz dieser Zellen gegenüber p53-abhängiger Apoptose besitzen (Das et al., 2006; Ohtsuka et al., 2006; Riojas et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Die beobachtete Induktion von Pycard durch TCDD könnte auf die Expression der beiden Todesliganden TNF- α und Faslg zurückzuführen sein (Shiohara et al., 2008). Da Pycard als ein Tumorsuppressor mit pro-apoptotischen Eigenschaften gilt, erscheint die Induktion dieses Gens unwahrscheinlich als ursächlich für die Apoptosehemmung durch TCDD, insbesondere, da dieses Protein Zellen gegenüber p53-abhängiger Apoptose sensibilisieren kann (Ohtsuka et al., 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TCDD nicht die spontan in primären Rattenhepatozyten auftretende Apoptose hemmte, jedoch aber den durch UVC-Licht induzierten apoptotischen Zelltod. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt mit Hilfe der qRT-PCR-Arrays *rat apoptosis* untersucht, welche an der Apoptose beteiligten Gene durch Bestrahlung mit UVC-Licht in Dosen von 10 und 50 J/m² reguliert werden und welche Effekte hierauf die Inkubation bestrahlter Zellen mit 1 nM TCDD besitzt.

UVC-Bestrahlung führte in den primären Hepatozyten zu einer Vielzahl von Dosis-abhängigen Effekten. Hier sind besonders solche Gene zu nennen, welche als p53-Zielgene bekannt sind, nämlich *apaf-1*, *bak*, *bax*, *caspase 6*, *caspase 7*, *tnfsf10*

(trail), tnfrsf6 (fas), sowie tnfrsf10b (trailr2, dr5) (Takimoto und El-Deiry, 2000; Fortin et al., 2001; Kannan et al., 2001; Wang et al., 2001; Qian et al., 2002; Jen und Cheung, 2005; Kuribayashi et al., 2008; Yang et al., 2008). Außerdem wurde Dosis-abhängig die Expression des anti-apoptotischen bcl-2 reprimiert. Dieses Gen kann durch aktiviertes p53 negativ reguliert werden (Budhram-Mahadeo et al., 1999). Interessanterweise wurden andere bekannte p53-Zielgene nicht durch die Bestrahlung induziert (gadd45a) oder reprimiert (birc3) (Kannan et al., 2001; Wang et al., 2001). Darüber hinaus wurde durch UV-Bestrahlung p53 selbst sowie das Gen polb induziert, welches für eine DNS-Polymerase codiert, die eine Rolle in der DNS-Reparatur zu spielen scheint. In CHO-Zellen wurde dieses Gen als Antwort auf die Behandlung mit DNS-schädigenden Substanzen induziert (Fornace et al., 1989).

Die genannten Effekte deuten darauf hin, dass eine Bestrahlung von primären Rattenhepatozyten mit UVC-Licht vermutlich zu DNS-Schäden führt, welche p53 aktivieren. Dies wiederum führt zur Expression von pro-apoptotischen p53-Zielgenen. Die hohe UV-Dosis von 50 J/m^2 bewirkte gravierende Änderungen im Expressionsmuster von an der Apoptose beteiligten Genen. Es wurden von 84 untersuchten Genen 30 statistisch signifikant um mindestens Faktor 2 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle reguliert. Über die erwähnten p53-Zielgene hinaus befanden sich unter den regulierten Genen vor allem solche, welche Caspasen codieren (caspasen 1, 3, 6, 7, 8, 9 und 14) als auch Gene des extrinsischen Apoptoseweges (tnfrsf1b, tnfrsf5 (CD40), card6, fadd, ripk2, tradd). Neben diesen, hauptsächlich an der Ausführung der Apoptose beteiligten Genen wurden noch eine Reihe weiterer Gene induziert, welche mehrheitlich an der Regulation und weniger an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind. Auf diese Gene soll im Folgenden nicht näher eingegangen werden, da der Mechanismus sowie das Expressionsmuster der UV-Licht induzierten Apoptose hinreichend bekannt sind (Latonen et al., 2001; Kulms und Schwarz, 2002; McKay et al., 2004; Scoltock und Cidlowski, 2004; Boerma et al., 2005).

Da im Zuge der Apoptose durch aktivierte Effektorcaspasen die Proteintranslation durch eine Inaktivierung von cap-abhängigen Initiationsfaktoren gehemmt wird (Bushell et al., 1999; Clemens et al., 2000), kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der beobachteten Effekte durch eine Hyperinduktion dieser Gene zu Stande kam.

Die Inkubation bestrahlter Zellen mit 1 nM TCDD für 24 h bewirkte nur wenige statistisch signifikante Änderungen verglichen mit UVC-Bestrahlung alleine, was die Expression von an der Apoptose beteiligten Genen betrifft.

Insbesondere trat keine konsistente Modulierung der Induktion der erwähnten p53-Zielgene durch die Behandlung mit TCDD auf. Im Gegensatz hierzu konnten Park und Matsumura zeigen, dass in MCF10A-Zellen die Inkubation mit TCDD eine Hemmung der durch UV-Bestrahlung induzierten bax-Expression bewirkte. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch keine Aussage über eine etwaige Signifikanz dieses Effektes getroffen (Park und Matsumura, 2006). Päärjärvi et al. beobachteten durch TCDD eine Hemmung der durch p53 induzierten p21-Expression in HepG2-Zellen. In dieser Studie wurden die Zellen mit Benzo[a]pyren als genotoxischen Stimulus sowie mit TCDD behandelt (Päärjärvi et al., 2005). In Hepa-1c1c7 Zellen, die eine konstitutiv aktive *checkpoint kinase* Chk2 exprimierten, kam es spontan zu einer Induktion von apaf-1. Dies geschah vermutlich auf Grund einer Aktivierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors E2F1. Die Behandlung dieser Zellen mit TCDD führte zu einer Verminderung der Expression von apaf-1. Die Autoren der Studie schlossen aus ihren Ergebnissen darauf, dass der aktivierte AhR mit E2F1 interagiert und so die Expression von E2F1-Zielgenen hemmt (Marlowe et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Effekt von TCDD auf die mRNA-Menge von apaf-1 festgestellt werden.

Als statistisch signifikante Effekte zwischen der Bestrahlung alleine und der Inkubation bestrahlter Zellen mit TCDD kam es hauptsächlich zu einer Induktion solcher Gene, die auch durch TCDD alleine reguliert worden waren (signifikante Unterschiede bei *pycard* und *tnf α* , statistisch nicht signifikant bei *birc1b*, *bcl2l11* und *faslg*). Daneben wurde eine Reihe weiterer Gene statistisch signifikant durch die TCDD-Koinkubation im Vergleich zur Bestrahlung alleine hochreguliert: *birc3*, *c-flip*, *myeloid cell leukemia-1 (mcl1)*, sowie *defender against cell death (dad1)*.

Interessant ist, dass alle hier als durch TCDD im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zusätzlich hochregulierten Gene anti-apoptotische Wirkung besitzen. *Birc3* (c-IAP2) ist ein IAP, welches aktivierte Caspasen 3,7, und 9 hemmen kann (Deveraux et al., 1998; Li und Li, 2000). *C-flip* verhindert die Aktivierung der Procaspase 8 (Hu et al., 1997; Irmeler et al., 1997). Sowohl die Expression von *birc3* als auch von *c-flip* werden zum Beispiel über NF- κ B reguliert (Wang et al., 1998; Micheau et al., 2001; Conte et al., 2006).

Mcl1 ist ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie (Akgul, 2008), welches über den PI3K/Akt-Signalweg sowie über *mitogen-activated protein kinase*-Signaltransduktionskaskaden reguliert wird (Kuo et al., 2001; Le Gouill et al., 2004). Das anti-apoptotische Dad1 ist eine Untereinheit der Oligosaccharyltransferase (Sugimoto et al., 1995; Kelleher und Gilmore, 1997). Dieses Enzym scheint eine Rolle in der Regulation der Apoptose im Zuge der Embryogenese zu spielen (Nishii et al., 1999; Hong et al., 2000), der Verlust dieses Proteins führte zu spontaner Apoptose (Nakashima et al., 1993). Auch die Expression von dad1 kann über NF- κ B reguliert werden (Patel et al., 2000). In verschiedenen Tumorformen wurde Dad1 als überexprimiert identifiziert, was auf eine Rolle dieses Proteins in der Tumorgenese hindeutet (Tanaka et al., 2001; Kim et al., 2006b; Kulke et al., 2008). Über den Mechanismus der Apoptosehemmung durch Dad1 ist wenig bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein mit Mcl1 interagieren kann (Makishima et al., 2000).

In früheren Genexpressionsstudien traten manche dieser Gene in verschiedenen Geweben als durch TCDD regulierbar auf. In der Studie von Fischer et al. im Thymus von weiblichen B57BL/6 Mäusen wurde mcl1 durch TCDD induziert (Fischer et al., 2004). lap2 wurde sowohl in der Milz als auch in der Leber von mit TCDD behandelten C57BL/6 Mäusen sowie in HepG2-Zellen induziert (Zeytun et al., 2004; Jennen et al., 2010).

Nur ein durch UV-Bestrahlung induziertes pro-apoptotisches Gen wurde durch die Inkubation mit TCDD reprimiert. Hierbei handelte es sich um trail, dessen Expression durch TCDD unter das Maß der DMSO-Kontrolle runter-reguliert wurde.

Bindung von TRAIL an die membranständigen Rezeptoren TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) bewirkt eine Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges, da diese beiden Rezeptoren Todesdomänen in ihrem zytosolständigen Teil tragen. Neben DR4 und 5 kann TRAIL an zwei sogenannte *decoy* Rezeptoren, TRAIL-R3 (DcR1) und TRAIL-R4 (DcR2), sowie an das lösliche Osteoprotegerin binden, welche keine Todesdomäne besitzen. Eine Bindung von TRAIL an diese drei Rezeptoren wirkt der pro-apoptotischen Wirkung des TRAIL/DR-Systems entgegen (Herr et al., 2007; Corazza et al., 2009). TRAIL spielt eine Rolle in der antitumoralen und antiviralen Wirkung von dendritischen Zellen, Monozyten, natürlichen Killerzellen und T-Zellen (Ashkenazi und Herbst, 2008). DR4 und 5 werden auf der Oberfläche der meisten Zellen des Organismus exprimiert, während TRAIL selbst nur von Zellen des

Immunsystems gebildet wird (Herr et al., 2007). Das TRAIL/DR-System wird streng reguliert, so dass normale Körperzellen resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sind. Tumorzellen hingegen, sofern sie nicht weitere Störungen in der Regulation der Apoptose aufweisen (etwa eine Überexpression von *mcl-1* oder *flip*) (Nam et al., 2003; Kim et al., 2008), werden selektiv durch TRAIL in die Apoptose getrieben (Herr et al., 2007; Ashkenazi und Herbst, 2008; Corazza et al., 2009). Fehlerregulierungen im TRAIL/DR-System führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für verschiedene maligne Veränderungen (Cretney et al., 2002; Zerafa et al., 2005; Finnberg et al., 2008).

In HepG2 Zellen bewirkte TCDD ebenfalls eine Repression dieses Gens (Puga et al., 2000a; Frueh et al., 2001). Auch in der Leber von Mäusen mit einem konstitutiv aktiven AhR lag *trail* ebenfalls niedriger exprimiert vor als in Wildtyp C57BL/6 Mäusen (Knerr, 2006). Im Gegensatz hierzu wurde *trail* in der Milz von mit TCDD behandelten C57BL/6 Mäusen induziert (Zeytun et al., 2004).

Eine Hemmung der TRAIL-Expression durch TCDD könnte somit einen Weg darstellen, über den das Immunsystem daran gehindert wird, entartete Zellen in die Apoptose zu treiben, was einen tumorpromovierenden Effekt bewirken könnte. Dennoch steht nicht fest, ob sich die Effekte, die auf mRNA-Ebene beobachtet werden konnten, sich bei der Proteinmenge zeigen. Darüber hinaus steht die Relevanz dieser Beobachtung in Frage, da TRAIL vor allem von Zellen des Immunsystems produziert wird (Herr et al., 2007). Die in den Primärhepatozyten beobachtete Induktion von *trail* durch UVC-Bestrahlung und die Hemmung dieser Induktion durch TCDD könnte in isolierten Lebermakrophagen oder anderen Immunzellen stattfinden.

Alle vorher genannten anti-apoptotischen Proteine, welche durch TCDD-Inkubation bestrahlter Zellen induziert worden waren (*birc1b*, *birc3*, *c-flip* und *mcl-1*) wirken entweder vor einer Aktivierung von Effektorcaspasen anti-apoptotisch (*c-flip* und *mcl1*) oder sie hemmen direkt aktivierte Caspasen (*birc1b* und *birc3*). Auch eine Hemmung der Expression von *trail* sollte sich in einer niedrigeren Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges und damit verringerter Caspaseaktivität äußern.

In weiteren Experimenten hemmte TCDD weder die durch UVC-Licht induzierte Aktivität verschiedener Caspasen, noch besaß es einen Einfluss auf die proteolytische Aktivierung der Caspase 3 sowie auf die Spaltung von

Caspasesubstraten (siehe Kapitel 4.1.8 und 4.1.9). Deshalb erscheinen die beobachteten Expressionsänderungen dieser anti-apoptotisch wirkenden Proteine unwahrscheinlich als ursächliche Faktoren für die durch TCDD bedingte Hemmung der UVC-Licht induzierten Apoptose in primären Rattenhepatozyten.

Als weiterer pro-apoptotischer Stimulus wurde OTA mit den qRT-PCR-Arrays untersucht. Hierbei bewirkte die Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit 1 µM OTA für 24 h zahlreiche Änderungen in der Expression von an der Apoptose beteiligter Gene.

Durch die Behandlung der Zellen mit OTA kam es zur Induktion einer Reihe von p53-Zielgenen, nämlich *apaf-1*, *bad*, *bid*, *bik*, *bok*, *caspase 7*, *tnfrsf6* (*fas*) und *faslg* (Fukazawa et al., 1999; Fortin et al., 2001; Kannan et al., 2001; Quian et al., 2002; Sax et al., 2002; Yakovlev et al., 2004; Hur et al., 2006; Jiang et al., 2006; Yang et al., 2008). Außerdem wurde *polb* durch OTA-Behandlung induziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass OTA DNS-schädigend wirkt und die Zellen dadurch p53-abhängig in die Apoptose treibt.

OTA wurde in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen auf seine Mutagenität hin überprüft und zeigte sich negativ (Föllmann und Lucas, 2003), OTA bewirkte eine Induktion der SOS DNS-Reparatur in *Escherichia coli* PQ37. Die Anwesenheit von Trolox C, einer wasserlöslichen Form des Vitamin E, verhinderte den Effekt vollständig. Eine Behandlung mit OTA führte in verschiedenen Zellen zu *unscheduled DNA synthesis*. Auch ließen sich nach OTA-Behandlung in Leber und Niere von Ratte und Maus DNS-Strangbrüche nachweisen. Insgesamt sind die Studien zur Mutagenität von OTA widersprüchlich, die Mehrheit der Autoren kommt jedoch zu dem Schluss, dass OTA vermutlich nicht mutagen ist, aber klastogen in Säugerzellen wirkt (Turesky, 2005).

In primären Zellen des proximalen Tubulus von Ratten sowie in LLC-PK₁-Zellen zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit OTA in mikromolaren Konzentrationen eine signifikante Zunahme bei Parametern, die oxidativen Stress anzeigen. Es kam zu einer Zunahme an gebildeten ROS, einem Abfall an Glutathion in den Zellen sowie zur Bildung von oxidativen DNS-Schäden. Diese oxidativen Effekte konnten in der Studie durch die Prä- und Koinkubation mit N-Acetylcystein verhindert werden, nicht jedoch durch Tocopherol (Schaaf et al., 2002). In einer *in vivo* Studie an F344 Ratten bewirkte eine tägliche Gabe von 0,3 mg OTA/kg bw über vier Wochen eine

Schädigung der Niere mit morphologischen Veränderungen und apoptotischen Läsionen an den Epithelzellen der proximalen Tubuli. Mittels Einzelzell-Gelelektrophorese wurde in dieser Studie gezeigt, dass es durch OTA zu einer Dosis-abhängigen Zunahme an oxidativen DNS-Schäden sowohl in der Niere als auch der Leber der Tiere kam. Auch in primären Rattennierenzellen bewirkte OTA ab einer Konzentration von 1 μ M eine signifikante Zunahme von oxidativen DNS-Schäden (Kamp et al., 2005a; Kamp et al., 2005b).

In HepG2-Zellen verursachte die Inkubation mit OTA p53-abhängige Apoptose, sowie die Induktion von oxidativem Stress. Da die vermehrte Bildung von Superoxidradikalanionen durch eine Hemmung der Caspasenaktivität verhindert werden konnte, deutete dies auf einen sekundären Effekt im Verlauf der Apoptose hin (Bouaziz et al., 2008; El Golli Bennour et al., 2008).

In der Niere von Ratten bewirkte die chronische Gabe von OTA eine Runterregulierung der Expression anti-oxidativ wirksamer Enzyme. Eine Erniedrigung der zellulären Schutzsysteme vor oxidativem Stress durch OTA könnte zu einer ständigen Erhöhung von ROS in der Zelle und letztendlich zu oxidativen Schäden sowie der Induktion p53-abhängiger Apoptose führen. Dieser Mechanismus, über den darüber hinaus diskutiert wird, dass er auch für die kanzerogene Wirkung von OTA verantwortlich sein könnte, ist jedoch umstritten (Marin-Kuan et al., 2008; Mally und Dekant, 2009).

Weiterhin wurden in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch OTA eine Reihe anderer, sowohl pro- als auch anti-apoptotischer Gene induziert: birc5 (survivin), caspase 14, die beiden an der apoptotischen DNS-Fragmentierung beteiligten Gene cideb und dffb (cad), interleukin 10 (il10), lta, mcl-1, tnfrsf1a, cd40lg, sowie traf3.

Da OTA schon in der verwendeten Konzentration zu einem erheblichen Teil die Proteinbiosynthese hemmte (siehe Kapitel 4.1.10), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte von einer Hyperinduktion herrühren.

Die Koinkubation primärer Rattenhepatozyten mit sowohl OTA als auch TCDD bewirkte im Vergleich zur alleinigen OTA-Inkubation ähnliche Effekte wie sie auch bei den Versuchen zur UVC-Bestrahlung beobachtet worden waren: es kam zu einer Induktion solcher Gene, welche auch durch TCDD alleine induziert worden waren (signifikante Unterschiede bei pycard, tnfa und faslg, statistisch nicht signifikant bei bcl2l11). Außerdem wurde ebenfalls wie bei der Inkubation bestrahlter Zellen mit

TCDD birc3 induziert. Darüber hinaus kam es durch die Koinkubation zu einer zusätzlichen Hochregulation der Expression von caspase 14 und il10. Caspase 14 spielt eine Rolle in der Differenzierung von Keratinozyten und wird nur in kornifizierenden Epithelzellen, etwa in der Haut exprimiert (Denecker et al., 2008). Il10 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert wird. Auf der einen Seite besitzt dieses Zytokin immunsuppressive Wirkung, indem es die Expression pro-inflammatorischer Zytokine hemmt, auf der anderen Seite scheint es aber auch immunaktivierende Funktionen zu haben (Mocellin et al., 2005; Mege et al., 2006).

Auf Ebene der Transkription zeigte sich kein Effekt zwischen bestrahlten Zellen und Zellen, die zusätzlich zur Bestrahlung mit TCDD inkubiert worden waren, was die Expression von p53-Zielgenen betrifft. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest in den verwendeten UV-Dosen von 10 und 50 J/m² TCDD keinen Einfluss auf die transaktivierende Funktion von p53 besitzt. Um dieser Beobachtung weiter nachzugehen, wurden zusätzlich Western blot Experimente für zwei p53-Zielgene, Apaf-1 (Fortin et al., 2001) und Bax (Qian et al., 2002; Jen und Cheung, 2005) durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.7). Für Bax zeigte sich in der hohen UV-Dosis eine leichte Induktion des Proteins, ohne dass TCDD diese Induktion modulierte. Auch für Apaf-1 wurde eine Induktion der Proteinmenge durch die hohe UV-Dosis festgestellt, diese Induktion wurde durch die Inkubation bestrahlter Zellen mit 1 nM TCDD zu einem Teil wieder unterdrückt. Für apaf-1 konnte kein Effekt auf Ebene der mRNA durch TCDD festgestellt werden. Daher muss die beobachtete Hemmung der durch UVC-Bestrahlung verursachten Erhöhung der Apaf-1-Proteinmenge auf Ebene der Translation oder Proteinstabilität geschehen.

Da sowohl Apaf-1 als auch p53 während der Apoptose durch einen cap-unabhängigen Translationsmechanismus (*internal ribosome entry*) gebildet werden können (Baird et al., 2006; Ray et al., 2006), liegt die Vermutung nahe, dass TCDD eventuell diesen Mechanismus stört und dadurch eine Reduktion der durch UV-Bestrahlung induzierten Apaf-1- und p53-Proteinlevel bewirkt.

Auch für OTA wurde untersucht, ob sich die Induktion von p53-Zielgenen, welche auf mRNA-Ebene beobachtet worden war, auf der Proteinebene zeigte. OTA induzierte in niedrigen Konzentrationen von 0,1 und 1 µM die p53-Zielgene Bad (Jiang et al.,

2006) und Bax, in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µM OTA waren die Level für diese beiden Proteine wieder erniedrigt, was darauf zurückzuführen ist, dass OTA die Proteinbiosynthese in dieser Konzentration hemmte (siehe Kapitel 4.1.10). Die Apaf-1-Proteinmenge wurde ebenfalls durch OTA erhöht, im Gegensatz zu Bad und Bax jedoch Konzentrations-abhängig, selbst bei 10 µM OTA.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass OTA eventuell selektiv die Proteinbiosynthese hemmt. Proteine, die über *internal ribosome entry* translatiert werden, können trotz der inhibierenden Wirkung von OTA auf die allgemeine, cap-abhängige Proteinbiosynthese weiter gebildet werden. Dies ist auch einvernehmlich mit der Beobachtung, dass OTA in einer Konzentration von 10 µM, in der es die Synthese von CYP1A1 durch TCDD vollständig hemmte, trotzdem die Proteinlevel von p53 erhöhte (siehe Kapitel 4.1.5 und 4.1.10). Bisher gibt es keine Studien zur Beeinflussung von speziell cap-abhängiger Proteintranslation oder *internal ribosome entry* durch dieses Mykotoxin. Da OTA bekanntermaßen die Proteinbiosynthese hemmt, indem es mit dem Metabolismus von Phenylalanin interferiert (Creppy et al., 1990; Bennet und Klich, 2003), erscheint es fraglich, ob die Hemmung der Proteinbiosynthese durch dieses Mykotoxin selektiv funktionieren kann.

5.7 Caspasen-abhängige Apoptosewege

Mit Hilfe einer Reihe verschiedener Experimente ist im Weiteren untersucht worden, über welche Signalwege die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Behandlungen UVC-Strahlung, OTA und CHX in den primären Rattenhepatozyten zur Apoptose führten und welchen Einfluss TCDD auf die einzelnen Endpunkte besaß. Auf diesem Wege sollten Ziele für die anti-apoptotische Wirkung von TCDD identifiziert werden. TCDD führte in den qRT-PCR-Array Experimenten zu einer Reihe von Expressionsänderungen, welche auf folgenden Mechanismus der Apoptosehemmung hindeuteten: über die Bildung von TNF- α , oder direkt, kommt es zu einer Aktivierung von NF- κ B und damit zur Expression von anti-apoptotischen Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors (birc1b, birc3, c-flip). Diese Proteine sind bekannt dafür, dass sie entweder die Aktivierung oder die Aktivität von Caspasen hemmen. Somit könnte TCDD der Apoptose durch UVC-Bestrahlung entgegen wirken. Dies würde auch in Übereinkunft damit stehen, dass TCDD nicht die durch OTA und CHX induzierte Apoptose beeinflusste, da diese beiden Substanzen die

Proteinbiosynthese hemmen (siehe Kapitel 4.1.10), und die anti-apoptotische Wirkung von NF- κ B abhängig von Protein-Biosynthese ist: die Kombination von TNF- α und einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese wird häufig eingesetzt, um Apoptose in Zellsystemen auszulösen (z.B. Pinti et al., 2003; Novo et al., 2006; Wang et al., 2008). TNF- α alleine induziert in den meisten Zellsystemen keine Apoptose, da es nicht nur pro-apoptotische Signalwege über FADD aktiviert, sondern auch über TRAF2 und RIPK NF- κ B aktiviert und somit der eigenen pro-apoptotischen Wirkung entgegenwirkt (Liu, 2005; Hatano, 2007; Ihnatko und Kubes, 2007). Erst eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch z.B. CHX bewirkt, dass anti-apoptotische Proteine, welche durch NF- κ B induziert werden, nicht mehr gebildet werden können. Somit verschiebt sich das Gleichgewicht zur Seite der Apoptose, was keine Proteinbiosynthese benötigt (Novo et al., 2006; Wang et al., 2008).

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zunächst Versuche zur Aktivität verschiedener Caspasen (extrinsischer Apoptoseweg: Caspase 8; intrinsischer Apoptoseweg: Caspase 9; Effektorcaspasen 3 und 7), sowie Western blot Experimente zur proteolytischen Aktivierung der Caspase 3 durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.8).

Die Bestrahlung mit UVC-Licht bewirkte sowohl in den primären Rattenhepatozyten, als auch in den Huh-7 Zellen eine Steigerung der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 ohne dass TCDD hierauf einen Einfluss besaß. In den primären Rattenhepatozyten induzierte die UVC-Bestrahlung außerdem Dosis-abhängig die Aktivitäten der Caspasen 8 und 9, ebenfalls ohne dass TCDD einen modulierenden Effekt hierauf bewirkte. In den Primärhepatozyten wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen darüber hinaus mit Hilfe eines Western blots gegen Caspase 3 untersucht. Auch hier zeigte sich eine Dosis-abhängige Aktivierung durch UVC-Licht ohne einen Einfluss von TCDD.

Die Effekte der UVC-Bestrahlung auf das Chromatin, d.h. Chromatinkondensation und -fragmentierung sowie die internukleosomale DNS-Fragmentierung, konnten durch eine Hemmung der Caspaseaktivität durch zVAD-fmk vollständig aufgehoben werden, was nahe legt, dass diese Effekte vollständig durch Caspasen vermittelt werden. Die Caspasen-Abhängigkeit der Ausbildung apoptotischer Merkmale im Zellkern durch UVC-Bestrahlung ist für eine Reihe von Zelltypen gezeigt worden, etwa für Rattenembryofibroblasten Rat1a (Kennedy et al., 1999), humane

Epidermoidtumorzellen A431 (Choi et al., 2000) oder humane Keratinozyten HaCaT (Takasawa et al., 2005).

Schrenk et al. konnten 2004 zeigen, dass TCDD und dioxinartige polychlorierte Biphenyle (PCB) die durch MNNG induzierte Caspase 3-Aktivierung in primären Rattenhepatozyten nicht hemmten. Phenobarbital und nicht-dioxinartige PCB führten zu einer Reduktion der Caspaseaktivität (Schrenk et al., 2004).

Bisher konnte nur in einer Studie gezeigt werden, dass TCDD die durch pro-apoptotische Behandlung induzierte Caspasenaktivität zu hemmen vermag. In HepG2-Zellen, die mit Etoposid in die Apoptose getrieben worden waren, bewirkte TCDD eine Hemmung der DEVDase-Aktivität (Ambolet-Camoit et al., 2010).

OTA bewirkte in der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μM ebenfalls eine Induktion der Aktivitäten der drei untersuchten Caspase-Klassen. Die Aktivität der Effektorcaspasen war im Vergleich zur UV-Bestrahlung in einer Dosis von 50 J/m^2 geringer und auch die proteolytische Aktivierung der Caspase 3 nach OTA-Inkubation der Primärhepatozyten fand in einem geringeren Ausmaß statt, als nach UVC-Bestrahlung. Weder bei der Caspase 3-Spaltung, noch auf Ebene der Caspaseaktivitäten besaß TCDD einen Einfluss auf die durch OTA bewirkten Effekte. Die Koinkubation der Zellen mit OTA und zVAD-fmk bewirkte eine nahezu vollständige Hemmung der apoptotischen Geschehnisse im Zellkern.

In humanen Lymphozyten führte OTA ebenfalls zur Apoptose unter der Beteiligung der Caspasen 9 und 3. Die Hemmung der Caspasenaktivität durch zVAD-fmk hob das Auftreten einer sub- G_1 -Population in diesen Zellen nicht vollständig auf (Assaf et al., 2005). In HepG2-Zellen bewirkte OTA eine Aktivierung der Effektorcaspasen. Der Einfluss von zVAD-fmk wurde in dieser Studie nur auf den durch OTA induzierten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials untersucht. Die Hemmung dieses Effektes durch zVAD-fmk deutete darauf hin, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt der Apoptose handelte (Bouaziz et al., 2008). In einer späteren Studie der gleichen Gruppe unterdrückte zVAD-fmk den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch OTA nicht vollständig (El Golli Bennour et al., 2009). Auch in humanen SH-SY5Y Neuroblastomzellen und primären Rattenneuronen bewirkte OTA eine Aktivierung der Caspasen 9 und 3. In dieser Studie bewirkte zVAD-fmk ebenfalls nur eine teilweise Aufhebung des cytotoxischen Effekts von OTA auf diese Zellen (Zhang et al., 2009).

Die OTA-induzierte Apoptose scheint also in einer Vielzahl von Zellsystemen, und auch in primären Rattenhepatozyten, zu einem Großteil, nicht aber komplett über Caspasen-abhängige Mechanismen zu verlaufen.

Die Behandlung primärer Hepatozyten mit CHX bewirkte für keine der untersuchten Caspasen-Klassen eine signifikante Aktivitätssteigerung und auch die proteolytische Spaltung der Caspase 3 fand nur in sehr geringem Ausmaß durch Inkubation mit 10 µg CHX/ml statt. Die Koinkubation der Zellen mit CHX und zVAD-fmk führte nicht zu einer Aufhebung der durch CHX alleine bedingten Chromatinkondensation. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die durch CHX induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten Caspasen-unabhängig ist.

Im Gegensatz dazu führte in primären Rattenhepatozyten männlicher Wistar Ratten in Suspensionskultur die Inkubation mit CHX zu einem Anstieg der Aktivität der Effektorcaspasen und zVAD-fmk bewirkte eine komplette Hemmung des Auftretens von Annexin V-positiven Zellen durch CHX (Blom et al., 1999). Und auch in B-Lymphozyten weiblicher C57BL/6 Mäuse induzierte CHX Apoptose, was mit einer Aktivierung der Caspase 3 einherging. Die Koinkubation mit zVAD-fmk bewirkte eine komplette Aufhebung des Auftretens einer sub-G₁-Population durch CHX (Lemaire et al., 1999).

Bei keiner der drei verwendeten pro-apoptotischen Stimuli führte die zusätzliche Behandlung mit TCDD zu einer Änderung der Aktivität der untersuchten Caspasen oder zu einer Modulation der proteolytischen Aktivierung der Caspase 3. Auf Grund dieser Beobachtungen scheint ausgeschlossen zu sein, dass TCDD direkt auf die Prozessierung bzw. die Aktivität der untersuchten Caspasen wirkt. In einem nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, welche Effekte die Behandlungen auf die Spaltung verschiedener Caspasesubstrate besitzen und ob hierbei ein Effekt durch TCDD auftritt.

In den primären Hepatozyten wurden PARP (Boulares et al., 1999) und ICAD (Enari et al., 1998; Tang und Kidd, 1998) als Caspasesubstrate im Verlauf der UVC-induzierten Apoptose betrachtet. Für beide Proteine zeigte sich bei der Behandlung mit UV-Strahlung eine Dosis-abhängige Spaltung (PARP), bzw. Abnahme der

Proteinmenge (ICAD), ohne dass TCDD diese Effekte modulierte (siehe Kapitel 4.1.8 und 4.1.9).

Durch die Behandlungen mit OTA und CHX kam es zu keiner Spaltung von ICAD, vielmehr bewirkten beide Substanzen eine leichte Induktion der Proteinmenge. Vor allem für die durch CHX induzierte Apoptose spiegelt das Ergebnis der nicht vorhandenen Spaltung von ICAD die Beobachtungen zu den Caspasen-Aktivitäten nach CHX-Behandlung wider (siehe Kapitel 4.1.8). CHX scheint in primären Rattenhepatozyten über einen Caspasen-unabhängigen Mechanismus pro-apoptotisch zu wirken. Für OTA sind die Ergebnisse widersprüchlich, trotz einer statistisch signifikanten Steigerung der Caspasenaktivität ließ sich keine Abnahme in der Proteinmenge von ICAD feststellen.

Bisher ist nur in einer Studie zur anti-apoptotischen Wirkung von TCDD die Spaltung eines Caspasesubstrats als Marker für die Effekte von TCDD untersucht worden. Davis und Mitarbeiter konnten unter TCDD-Einfluss eine teilweise Hemmung der durch Serumentzug induzierten PARP-Spaltung in MCF10A-Zellen zeigen (Davis et al., 2000). Dass der AhR alleine wichtig ist, um Zellen vor spontaner Apoptose zu schützen, konnte in Mausfibroblasten auch an Hand der Spaltung von PARP gezeigt werden (Marlowe et al., 2008).

Als Caspasesubstrate in den Huh-7-Zellen dienten β -Catenin (Brancolini et al., 1997; Bannerman et al., 1998) und NF- κ B p65 (Levkau et al., 1999; Coiras et al., 2008). Die Proteinmenge für die zwei untersuchten Caspasesubstrate nahm in den Zellen UV-Dosis-abhängig ab. Im Zellkern war die Spaltung von β -Catenin stärker ausgeprägt als im Zytoplasma der Zellen (siehe Kapitel 4.2.5). Die Behandlung bestrahlter Zellen mit TCDD führte zu keiner Änderung der Abnahme der Bandenintensitäten beider Proteine, was die Ergebnisse zur Caspase 3/7-Aktivität nach UV- und TCDD-Behandlung in diesen Zellen widerspiegelt (siehe Kapitel 4.2.4).

5.8 Weitere anti-apoptotische Signalwege in Huh-7-Zellen

Für die Huh-7-Zellen lässt sich darüber hinaus aussagen, dass es durch die Behandlung mit TCDD vermutlich nicht zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt, da die p65-Untereinheit dieses Transkriptionsfaktors für alle Inkubationen nur im Zytosol, nicht aber im Zellkern detektierbar war (siehe Kapitel 4.2.5).

In dendritischen Zellen der Maus führte TCDD zu einer Hemmung der TNF- α -induzierten Aktivierung von NF- κ B sowie zu einer Hemmung der Translokation der Untereinheiten RelA (p65), RelB und cRel in den Zellkern. Die Funktion des p50-Homodimers wurde durch TCDD nicht beeinflusst. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass der aktivierte AhR mit p65 interagiert und dessen Translokation in den Zellkern sowie dessen DNA-Bindung verhindert (Ruby et al., 2002). Und auch in Hepa1c1c7 Maushepatomzellen reprimierte TCDD die Aktivität von NF- κ B (Tian et al., 1999). In Maus Hepa1-Zellen bewirkte die Behandlung mit TCDD eine erhöhte Bindungsaktivität des p50-Homodimers, nicht aber des p65/p50-Heterodimers (Puga et al., 2000b). In Thymus Stromazellen der Maus kam es nach TCDD-Behandlung *in vivo* zu einer Translokation der beiden Untereinheiten p50 und p65 in den Zellkern, unabhängig vom AhR-Status der Tiere. In Thymozyten der Tiere wurde diese Translokation nicht beobachtet (Camacho et al., 2005). Auch Biswas et al. zeigten in AhR-negativen C2C12-Zellen, dass es nach TCDD-Behandlung zu einer Translokation der NF- κ B-Untereinheiten p50 und cRel kam (Biswas et al., 2008).

Verschiedene Studien konnten also zeigen, dass TCDD-Behandlung unterschiedlicher Zellsysteme bevorzugt zur Aktivität des p50-Homodimers führt. Dieser NF- κ B-Komplex besitzt keine transaktivierende Domäne und gilt als kompetitiver Inhibitor der transkriptionell aktiven Rel/NF- κ B-Heterodimere. Generell wird davon ausgegangen, dass TCDD hemmend auf die Aktivität von NF- κ B wirkt (Tian et al., 2002). Die Interaktionen zwischen dem AhR und NF- κ B sind jedoch noch nicht abschließend aufgeklärt.

Des Weiteren wurden zwei Komponenten des anti-apoptotisch wirkenden wnt-Signalweges in den Huh-7-Zellen untersucht: β -Catenin und sFRP-4.

In Abwesenheit von Aktivatoren dieses Weges liegt β -Catenin im Zytoplasma in einem Multiproteinkomplex mit *adenomatous polyposis coli*, Axin und der Glycogensynthasekinase (GSK)-3 vor. β -Catenin wird durch GSK-3 phosphoryliert und daraufhin Ubiquitin-abhängig abgebaut. Wird der kanonische wnt-Signalweg aktiviert, so wird diese Phosphorylierung inhibiert. β -Catenin kann sich nun im Zytoplasma ansammeln und transloziert daraufhin in den Zellkern, wo es an den Co-Faktor *T cell factor/lymphoid-enhancer-factor-1* bindet und zur gesteigerten Expression verschiedener Gene führt (Zerlin et al., 2008). Zu diesen Zielgenen

zählen c-myc (He et al., 1998), c-jun (Mann et al., 1999), cyclin D1 (Shtutman et al., 1999), connexin 43 (van der Heyden et al., 1998), und survivin (Zhang et al., 2001). Dieser Signalweg wirkt anti-apoptotisch, wie Chen et al. durch Überexpression von wnt-1 in Rat-1 Fibroblastenzellen zeigen konnten. So wurde durch Wnt-1 die Induktion von Apoptose durch Chemotherapeutika in diesen Zellen unterdrückt (Chen et al., 2001). Auch wurde eine gegenseitige Beeinflussung des β -Catenin-abhängigen wnt-Signalweges und NF- κ B gezeigt: so verhindert β -Catenin die Aktivierung von NF- κ B in menschlichen Kolon- und Brustkrebszellen, was zu einer verminderten Expression pro-apoptotischer Gene wie Fas und TRAF durch NF- κ B führt und somit anti-apoptotisch wirkt (Deng et al., 2002). sFRP-4 stellt einen Antagonisten des kanonischen wnt-Signalwegs dar (Constantinou et al., 2008). In Huh-7-Zellen liegt β -Catenin konstitutiv sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vor (Takagi et al., 2008), was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. TCDD besaß in keiner der durchgeführten Versuche eine Wirkung auf die Gehalte von β -Catenin im Zytosol der Zellen, es erhöhte jedoch die Menge an β -Catenin im Zellkern (siehe Kapitel 4.2.5).

Weder UVC-Bestrahlung noch TCDD bewirkten eine Änderung in der Menge an sFRP-4 in den Huh-7-Zellen (siehe Kapitel 4.2.7).

Es gibt nur wenige Studien bezüglich der Wirkung von TCDD auf den wnt-Signalweg, so konnte z.B. gezeigt werden, dass im Zebrafisch TCDD das Wachstum der Schwanzflosse nach Amputation hemmt, indem es AhR-abhängig den wnt-Signalweg stört (Mathew et al., 2009). Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass der AhR selbst ein Zielgen des wnt-Signalweges darstellt (Chesire et al., 2004). Die Expression von Zielgenen des wnt-Signalweges durch TCDD bzw. den AhR zeigt kein einheitliches Ergebnis: die beiden Zielgene connexin 43 und survivin werden nicht reguliert, die Gene c-myc, c-jun und cyclin D1 werden in manchen Studien induziert, in anderen reprimiert (Ito et al., 2004; Boverhof et al., 2005; Dere et al., 2006; Kopec et al., 2008; Jennen et al., 2010). Die in manchen Studien gezeigte AhR-abhängige Induktion von c-myc könnte über einen alternativen Signalweg geschehen: es wurde in Brustkrebszellen gezeigt, dass der AhR in Kombination mit NF- κ B dieses Gen induzieren kann (Kim et al., 2000). Und auch die AhR-abhängige Induktion von c-jun durch TCDD scheint nicht über den wnt-Signalweg, sondern über den p38-MAPK-Signalweg vermittelt werden zu können (Weiss et al., 2005).

5.9 Apoptotische Nukleasen

Es konnte für beide Zellmodelle (primäre Rattenhepatozyten und Huh-7-Zellen) gezeigt werden, dass TCDD nicht in die durch UVC-Bestrahlung induzierte, Caspasen-abhängige Apoptosewege eingriff. Weder kam es zu einer Modulation der proteolytischen Caspase 3-Aktivierung, noch zu einer Änderung der Caspasenaktivitäten oder der Spaltung von Caspasesubstraten. Als nächster Schritt in der Caspasen-abhängigen Apoptose-Signalkette steht nach der proteolytischen ICAD-Spaltung die Aktivität von CAD. Da TCDD trotz einem mangelnden Effekt auf Charakteristiken der Caspase-Kaskade die apoptotische DNS-Fragmentierung inhibierte, erscheinen apoptotische Nukleasen als mögliche Ziele für die anti-apoptotische Wirkung von TCDD in primären Rattenhepatozyten in Frage zu kommen.

Die bekanntesten apoptotischen Nukleasen sind CAD und Endonuklease G (Widlak und Garrard, 2005). CAD ist im Zellkern lokalisiert, wo sie durch Caspasen aktiviert wird. Dagegen ist die Endonuklease G in den Mitochondrien lokalisiert. Während der Apoptose gelangt sie in den Zellkern (Samejima und Earnshaw, 2005). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass Endonuklease G Caspasen-unabhängig die DNS fragmentiert. Von Arnoult et al. konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Caspasen-Aktivität zwar nicht die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhinderte, jedoch aber die Freisetzung der Endonuklease G sowie von AIF. Dies stellte die Caspasen-Unabhängigkeit dieser Apoptosewege in Frage (Arnoult et al., 2003).

Neben CAD und Endonuklease G sind in der Literatur noch eine Reihe weiterer apoptotischer Nukleasen beschrieben worden, auf die im Weiteren nicht weiter eingegangen werden soll (Samejima und Earnshaw, 2005).

5.9.1 Endonuklease G

Die Endonuklease G ist eine apoptotische Nuklease, die im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist (Samejima und Earnshaw, 2005; David et al., 2006). Bei einer Störung der Integrität der Mitochondrien im Zuge der Apoptose transloziert diese Nuklease in den Zellkern und fragmentiert die DNS (Samejima und Earnshaw, 2005). Endonuklease G spaltet dsDNS, ssDNS und RNS. Sie ist Magnesium- und Mangan-abhängig und spaltet genomische DNS zunächst in Abständen von 50 kpb,

dann internukleosomal und letztlich jeweils in einem Abstand von 10 bp (Widlak et al., 2001; Wu et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Endonuklease G nur in Zellkernen detektiert werden - selbst in unbehandelten Zellen (siehe Kapitel 4.1.12). Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien. Ishihara und Shimamoto fanden heraus, dass Endonuklease G in unbehandelten primären Hepatozyten männlicher Wistar Ratten in den Mitochondrien lokalisiert ist und nach Apoptoseinduktion translozierte diese in den Zellkern (Ishihara und Shimamoto, 2006). Ursprünglich wurde die Endonuklease G im Zellkern und nicht in den Mitochondrien gefunden (Ruiz-Carrillo und Renaud, 1987; Cote und Ruiz-Carrillo, 1993). Die Lokalisierung dieser Nuklease im Zellkern, selbst in unbehandelten Zellen, würde nach einem Regulationsmechanismus verlangen, entweder analog des ICAD/CAD-Systems, bei dem die Aktivierung der CAD durch einen endogenen Inhibitor reguliert wird, oder durch einen alternativen Mechanismus.

Bisher ist zur Regulation dieser Nuklease nur wenig bekannt. In *Drosophila melanogaster* wurde ein Protein identifiziert (Endo GI) welches hochspezifisch die Aktivität der Endonuklease G hemmt. Endo GI kommt im Zellkern vor und verlässt diesen im Zuge der Apoptose. Zu Endo GI wurden keine homologen Gene in Säugetiergenomen gefunden (Temme et al., 2009). Die Aktivität aufgereinigter Endonuklease G wurde durch physiologische Kaliumkonzentrationen ab etwa 40 mM gehemmt (Widlak et al., 2001; Kalinowska et al., 2005). Ferner scheint Endonuklease G kooperativ mit anderen Nukleasen sowie mit AIF zu wirken (Widlak et al., 2001; Parrish et al., 2003; Kalinowska et al., 2005). Hsp70 wirkt hemmend auf die Aktivität der Nuklease (Kalinowska et al., 2005).

Sowohl UVC-Strahlung als auch OTA und CHX führten in den primären Hepatozyten jeweils zu einer Dosis- bzw. Konzentrations-abhängigen Reduktion der Endonuklease G-Proteinlevel in den Zellen (siehe Kapitel 4.1.12). TCDD führte bei keiner der Behandlungen zu einem konsistenten Effekt auf die Menge an Endonuklease G in den Zellen. Puga et al. konnten in HepG2-Zellen zeigen, dass TCDD zu einer Reduktion der Expression dieser Nuklease führte (Puga et al., 2000). Interessanterweise konnte Endonuklease G im Western blot nur detektiert werden, wenn die isolierten Zellkerne mit Lysispuffer mit 1% SDS, nicht aber mit Lysispuffer mit 0,1% Triton X-100 lysiert worden waren.

5.9.2 AIF

AIF ist eine im mitochondrialen Intermembranraum lokalisierte Oxidoreduktase. Die genaue Funktion von AIF in den Mitochondrien ist unbekannt, das Protein könnte aber eine Rolle in der oxidativen Phosphorylierung spielen. Wird die mitochondriale Membranintegrität während der Apoptose gestört, so transloziert AIF in den Zellkern. Dort verursacht das Protein Caspasen-unabhängig Grobfragmentierung und Kondensation des Chromatins, nicht aber internukleosomale DNS-Fragmentierung. AIF besitzt selbst keine Nukleaseaktivität, es fungiert vielmehr als ein Cofaktor für andere Nukleasen (Daugas et al., 2000; Samejima und Earnshaw, 2005).

Es gibt verschiedene Studien zum Molekulargewicht und der Prozessierung von AIF, mit unterschiedlichen Befunden. In den Rattenhepatozyten konnte in den Mitochondrien AIF mit einem Molekulargewicht von etwa 62 kDa detektiert werden, dies könnte die membrangebundene Form repräsentieren. Im Zytosol wurde AIF mit etwa 57 kDa, als lösliche Form detektiert (Modjtahedi et al., 2006). UVC-Bestrahlung der Zellen bewirkte eine Dosis-abhängige Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien ins Zytosol. Dieser Effekt wurde durch TCDD in der hohen UV-Dosis verstärkt (siehe Kapitel 4.1.12).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass PARP-1-induzierte Apoptose in primären Mausneuronen über AIF vermittelt wird. Das PAR-Polymer war direkt für die Freisetzung von AIF verantwortlich, der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch nicht bekannt (Yu et al., 2006). In der Leber von Ratten bewirkte die Behandlung mit TCDD eine Verringerung der AIF-Proteinmenge (Pastorelli et al., 2006).

5.9.3 CAD

CAD ist die am besten charakterisierte apoptotische Nuklease. Im Gegensatz zu vielen anderen Komponenten der Apoptosesignalwege scheint CAD keine Funktion über die Apoptose hinaus zu besitzen. Zusammen mit ICAD bildet CAD einen inaktiven Komplex, der im Zellkern lokalisiert ist. Während der Apoptose wird ICAD durch die Caspasen 3 und 7 sowie durch Granzym B gespalten. CAD bildet daraufhin aktive Homodimere oder Oligomere, die die DNS zunächst in Abständen von 50-300 kbp und dann internukleosomal spalten (Samejima und Earnshaw, 2005).

CAD spaltet nur doppelsträngige DNS, die Nuklease wird durch Magnesium aktiviert, nicht aber durch andere divalente Ionen. Ihre Aktivität wird erst durch sehr niedrige

(< 50 mM) oder sehr hohe (> 150 mM) Kalium- oder Natriumionen beeinflusst. Ihre maximale Aktivität erreicht diese Nuklease in Anwesenheit von Natrium oder Kalium jeweils in Konzentrationen zwischen 50 und 150 mM (Widlak und Garrard, 2001).

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die pro-apoptotischen Behandlungen der primären Rattenhepatozyten zu einer veränderten Expression von CAD führten und in wieweit TCDD hierauf einen Einfluss besaß. Sowohl UVC-Strahlung als auch OTA führten in den qRT-PCR-Arrays zu einer Induktion der Expression von CAD, ohne dass dieser Effekt durch TCDD moduliert wurde (siehe Kapitel 4.1.6).

In einem nächsten Schritt wurden Western blot Experimente mit einem Antikörper gegen CAD durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.9). Hier konnte gezeigt werden, dass keine der Behandlungen (UVC, OTA, CHX; jeweils alleine oder in Kombination mit TCDD) zu einer Konzentrations-abhängigen Modulierung der CAD-Proteinmenge führte, weshalb nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Hemmung der DNS-Fragmentierung durch TCDD von einer verringerten CAD-Proteinmenge herrührt. Keine im Rahmen einer Literaturrecherche aufgefundene Studie hat bisher CAD als ein Zielgen des TCDD/AhR-Systems identifiziert.

5.9.3.1 *in vitro* CAD-Aktivitätstest

Da die Expression von CAD nicht durch die Behandlung mit TCDD modifiziert wurde, ist im nächsten Schritt versucht worden, die Frage zu klären, ob TCDD direkt oder indirekt die Aktivität rekombinant exprimierter CAD beeinflusst. Hierzu wurden *in vitro* CAD-Aktivitätstests durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.13).

In diesem Experiment wurde ein rekombinant exprimierter DFF-Komplex aus muriner GST-getaggtter CAD und humaner ICAD (Meiss et al., 2001) mit Hamster Caspase 3 aktiviert. Die aktivierte Nuklease wurde nun zunächst mit isolierter genomischer DNS in Anwesenheit verschiedener TCDD-Konzentrationen inkubiert. Bei keiner der Inkubationen bewirkte TCDD eine Modulation der CAD-Aktivität, weshalb es nicht wahrscheinlich scheint, dass TCDD direkt die Aktivität der CAD beeinflusst.

Als nächstes wurden Zellkerne aus Zellen, die mit DMSO oder TCDD für 24 h behandelt worden waren, mit aktivierter CAD inkubiert. Auch in diesem Versuch zeigte sich kein Unterschied zwischen mit DMSO und mit TCDD behandelten Zellen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch erhalten, wenn Kerne aus Zellen für den Versuch verwendet wurden, die mit UVC-Licht bestrahlt und im Anschluss mit TCDD behandelt worden waren. Keine der Versuchsbedingungen bewirkte eine Modulation der Aktivität der exogen zu den Zellkernen gegebenen CAD.

Im Laufe der Durchführung dieser Versuche wurde beobachtet, dass es durch die Inkubation der Zellkerne bei 37°C für 1 h auch ohne exogene CAD zu internukleosomaler DNS-Spaltung kam, wenn der Waschschrift bei der Isolierung der Zellkerne mit Kernisolierungspuffer statt mit PBS durchgeführt wurde. Diese abgeänderte Methode für die Isolierung der Zellkerne resultierte in einer erniedrigten Natriumkonzentration im Reaktionsansatz. Bei der Durchführung mit PBS betrug die Summe der Konzentrationen an Natrium und Kalium 198,5 mM und bei der Durchführung mit Kernisolierungspuffer 106 mM. Dieser Unterschied könnte die Ursache dafür sein, dass eine Nuklease, die unter physiologischen Bedingungen in den Zellkernen gehemmt ist, aktiviert wird. Die gefundene Nukleaseaktivität wurde weiter charakterisiert: Es zeigte sich, dass bei jeweils 5 mM Calcium- oder Magnesiumionen diese Aktivität maximal war.

In der Literatur ist in einer Reihe von Studien beschrieben worden, dass es apoptotische Nucleasen gibt, deren Aktivität durch physiologische Konzentrationen an Kalium oder Natrium gehemmt werden können.

Durch die Inkubation von isolierten Zellkernen aus Rattenleberzellen mit Caspase 3 wurde eine apoptotische Nuklease aktiviert, welche durch Konzentrationen an Kalium oder Natrium unterhalb von 50 mM sowie oberhalb von 120 mM gehemmt wurde. Da diese Aktivierung durch die Anwesenheit einer nicht durch Caspasen spaltbare ICAD-Mutante verhindert wurde, schlossen die Autoren der Studie darauf, dass es sich bei der identifizierten Nuklease um CAD handelt, welche auch im Zellkern detektiert werden konnte (Kim et al., 2005).

In Ovarienfollikeln von Ratten wurde eine durch Serumentzug induzierte Nukleaseaktivität identifiziert. Die Aktivierung der Nuklease ging mit einer Verringerung intrazellulärer Kaliumlevel einher und konnte durch jeweils 150 mM Natrium- oder Kaliumionen gehemmt werden. Diese monovalenten Ionen besaßen zwar einen hemmenden Effekt auf die internukleosomale DNS-Fragmentierung, nicht aber auf die 50 kbp-Grobfragmentierung des Chromatins oder das Auftreten apoptotischer Zellkerne (DAPI-Färbung, nur für Kalium getestet). Die gleichen Effekte

wurden auch in Zellkernen aus unbehandelten Follikelzellen beobachtet: die Inkubation der Kerne für 30 min bei 37°C führte in Anwesenheit von 10 mM Calcium und Magnesium sowohl zu 50 kbp-DNS-Fragmentierung als auch zu internukleosomaler DNS-Spaltung. Durch je 150 mM Kalium oder Natrium wurde nur die 200 bp-Fragmentierung, nicht aber die 50 kbp-Fragmentierung gehemmt. Interessanterweise wurden auch die Aktivitäten aufgereinigter DNase I und II durch 150 mM Kalium gehemmt (Perez et al., 2000).

Wurden isolierte Zellkerne aus Thymozyten männlicher Sprague Dawley Ratten für 60 min bei 37°C inkubiert, so kam es in Anwesenheit von 0,5 mM Calcium zu 50 kbp-DNS-Fragmentierung und internukleosomaler DNS-Fragmentierung. 40 mM Kalium änderte diese Effekte nicht, Kaliumkonzentrationen von mehr als 90 mM führten zu einer Hemmung der internukleosomalen DNS-Fragmentierung ohne die Grobfragmentierung der DNS zu beeinflussen. Der hemmende Effekt auf die 200 bp-Fragmentierung war nicht abhängig von der Osmolarität, da Saccharose keinen Effekt bewirkte. Interessanterweise hemmten Calciumkonzentrationen von mehr als 8 mM die DNS-Fragmentierung. Die beobachteten Effekte konnten nicht durch eine Hemmung der Caspasenaktivität beeinflusst werden. Auch konnten in den Zellkernen weder Caspase 3 noch CAD nachgewiesen werden. Der Mechanismus oder die Identität dieser Nukleaseaktivität ist unbekannt, es wurde aber vermutet, dass sie konstitutiv im Zellkern vorkommt und auf unbekannte Art reguliert wird. Durch Änderungen im Ionengleichgewicht im Zuge der Apoptose (Calcium ↑, Kalium ↓) wird die Nuklease aktiviert. Kalium oder Kationen allgemein inaktivieren die Nuklease wieder (Ajiro et al., 2008).

Das Gleichgewicht monovalenter Ionen ist sehr wichtig für das apoptotische Geschehen. In verschiedenen Zellen (S49 Neo Mauslymphomzellen, Bortner et al., 1997; Thymozyten männlicher Sprague Dawley Ratten, Hughes et al., 1997) bewirkte die Behandlung mit verschiedenen pro-apoptotischen Stimuli einen Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration. Wurde die Kaliumkonzentration des Mediums erhöht, verhinderte dies die Apoptose.

In Jurkat-Zellen ließ sich durch hyperosmolare Konzentrationen an NaCl (500 mosM) Apoptose induzieren. Hierbei kam es zu einer Aktivierung der Caspase 3, sowie zu PARP- und ICAD-Spaltung. Dennoch konnte keine internukleosomale DNS-Fragmentierung beobachtet werden. Da dieser Effekt auch beobachtet werden konnte, wenn Chlorideffluxkanal-Blocker eingesetzt worden waren, schlossen die

Autoren der Studie darauf, dass eine Erhöhung des intrazellulären Chloridspiegels für eine Hemmung der apoptotischen DNS-Fragmentierung in ihrem Modell verantwortlich war (Rasola et al., 1999).

Die in dieser Arbeit im Rahmen des CAD-Aktivitätstests in Abwesenheit von CAD gefundene Nukleaseaktivität wurde weiter charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivität zu einem Teil, aber nicht komplett, durch die Inkubation der Zellen mit zVAD-fmk vor der Kernisolierung gehemmt wurde. Die Anwesenheit des pan-Caspasen-Inhibitors direkt im Reaktionsansatz führte zu keiner Modulation der Nukleaseaktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit TCDD vor der Isolierung der Kerne zu einer Reduktion dieser Nukleaseaktivität führte, unabhängig von einer Aktivierung des AhR. Die Antagonisierung dieses Rezeptors mit CH-223191 führte zu keiner Reversion des Effektes.

In einem letzten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Nukleaseaktivität durch die Inkubation isolierter Zellkerne mit Antikörper gegen CAD oder Endonuklease G gehemmt werden konnte. Keiner der beiden Antikörper besaß einen Effekt auf diese Nukleaseaktivität, jedoch ist nicht bekannt, ob die verwendeten Antikörper neutralisierend auf die jeweilige Nuklease wirkten.

5.9.3.2 Regulationsmechanismen für CAD

Aus den bis hierhin durchgeführten Versuchen wurde nicht ersichtlich, um welche apoptotische Nuklease es sich handelte, die in den CAD-Aktivitätstests ohne exogene CAD zu internukleosomaler DNS-Spaltung führte. Da die durch UVC-Licht induzierte Apoptose komplett Caspasen-abhängig war (siehe Kapitel 4.1.3), wurde davon ausgegangen, dass TCDD auf eine Nuklease wirken müsste, die Caspasen-abhängig aktiviert wird. Aus diesem Grund wurde die Aufmerksamkeit primär auf die Regulation von CAD gerichtet. In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Studien, die regulatorische Mechanismen für CAD identifiziert haben. Im Folgenden sollen diese kurz vorgestellt werden.

CAD spaltet die DNS zwischen den Nukleosomen. Daher ist es nicht überraschend, dass die Nuklease mit Histon H1, dem Linkerhiston interagieren kann. H1 erhöht die katalytische Aktivität von CAD (Liu et al., 1999; Widlak et al., 2000). Dieser Effekt ist

unabhängig von der H1-Variante oder dem Phosphorylierungsstatus des Histons (Goebel et al., 2007). In 5L Rattenhepatomzellen wurde die Proteinmenge von H1t durch TCDD-Behandlung induziert (Sarioglu et al., 2006). Darüber hinaus gibt es keine Hinweise in der Literatur, dass H1 über das TCDD/AhR-System reguliert wird.

Überexpression von HSP70 verstärkte die DNS-Spaltung in der T-Zelllinie Tag-Jurkat. Es konnte gezeigt werden, dass HSP70 zusammen mit freier CAD präzipitiert werden konnte, nicht aber mit dem CAD/ICAD-Komplex. *In vitro* verstärkte HSP70 die CAD-vermittelte Chromatin-Spaltung. Die Autoren der Studie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass HSP70 freie CAD bindet und als Chaperon hilft, die Aktivität der Nuklease aufrecht zu erhalten (Liu et al., 2003). TCDD scheint HSP70 in verschiedenen Zellsystemen zu induzieren (Kurachi et al., 2002; Ishida et al., 2005; Jennen et al., 2010). Da dieses Chaperon die Aktivität von CAD zu erhöhen scheint, ist es unwahrscheinlich, dass diese Interaktion der Hemmung der Apoptose durch TCDD zu Grunde liegen kann.

Choo und Mitarbeiter konnten 2003 ein Protein der Maus identifizieren, das mit CAD assoziieren kann und deren Aktivität hemmt, ohne dass es die Spaltung von ICAD beeinflusst. Dieses Protein wurde *caspase-activated DNase inhibitor that interacts with apoptosis signal-regulating kinase 1* (CIIA) genannt. Es bindet an die CIDE-N-Domäne von CAD und hemmt so deren Nukleaseaktivität. CIIA wird in einer Vielzahl von Geweben der Maus exprimiert, so auch in der Leber. Überexpression von CIIA in 293T-Zellen bewirkte verringerte internukleosomale DNS-Fragmentierung nach Behandlung mit TNF- α /Actinomycin D oder H₂O₂ sowie verringertes Auftreten apoptotischer Zellkerne im Vergleich zu Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren. In der Ratte gibt es ein homologes Protein: *vacuolar protein sorting-associated protein 28* (Choo et al., 2003). Es konnten keine Studien zur Regulation der Apoptose durch dieses Protein der Ratte gefunden werden, auch gibt es keine Hinweise darauf, dass dieses Protein durch TCDD oder den AhR reguliert wird.

In PC12-Zellen (Nebennierenmedullazellen der Ratte) bewirkte die Behandlung mit *nerve growth factor* (NGF) eine Erhöhung der Menge an Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat. Dieser *second messenger* bindet an ein Protein im Zellkern,

Nucleophosmin/B23, welches daraufhin mit CAD interagiert. Diese Interaktion hemmt die katalytische Aktivität der CAD. Die direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen konnte gezeigt werden. B23 schien auch vor der eigentlichen CAD-Aktivität anti-apoptotisch zu wirken, da die Spaltung von Caspasesubstraten gehemmt worden war (Ahn et al., 2005). In 5L Rattenhepatomzellen bewirkte TCDD eine Repression der Proteinmenge an B23 (Sarioglu et al., 2006). Darüber hinaus gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine Regulation dieses Proteins durch TCDD.

Ebenfalls in PC12-Zellen wurde Ebp1 als ein Protein identifiziert, das bei NGF-Behandlung der apoptotischen DNS-Fragmentierung entgegenwirkt, indem es die Aktivität von CAD hemmt. Das Protein selbst interagiert mit CAD und behindert deren katalytische Aktivität. Ebp1 kann auch zusammen mit phosphoryliertem Akt in einem Komplex an CAD binden, was die hemmende Wirkung von Ebp1 auf die Nuklease verstärkt. Überexpression von Ebp1 verhinderte nicht nur die DNS-Fragmentierung, sondern auch die proteolytische Spaltung von ICAD. Der *knock down* des Proteins ging mit PARP-Spaltung einher (Ahn et al., 2006). In der Literatur gibt es keine Hinweise darauf, dass Ebp1 durch TCDD/AhR reguliert wird.

Da diese beiden in PC12-Zellen aufgefundenen Proteine zwar die katalytische Aktivität von CAD direkt inhibieren können, aber im apoptotischen Geschehen auch auf Ebene der Caspasenaktivität eingreifen können, erscheint es unwahrscheinlich, dass diese beiden Proteine die Ursache für die Hemmung der DNS-Fragmentierung durch TCDD darstellen können.

Ein weiteres Protein, das die Aktivität von CAD beeinflusst, ist das *high mobility group box-containing chromatin protein* HMGB1, ein Strukturprotein, das in der Linkerregion zwischen den Nukleosomen vorkommt. In *in vitro* Experimenten mit Plasmid-DNS wurde gezeigt, dass HMGB1 zwar die CAD-induzierte DNS-Spaltung verstärkte, selbst aber nicht mit CAD interagiert. Vielmehr scheint dieses Protein die Konformation der DNS so zu ändern, dass sie für die CAD besser zugänglich ist (Widlak et al., 2000; Kalinowska-Herok und Widlak, 2008). Es gibt in der Literatur keine Hinweise darauf, dass TCDD/AhR eine Wirkung auf HMGB-Proteine besitzt.

Darüber hinaus kann die enzymatische Aktivität der CAD durch eine Reihe von Substanzen, meist *in vitro*, gehemmt werden. RNS, Polyglutamat und Heparin hemmen alle, vermutlich auf Grund ihrer polyanionischen Eigenschaften, kompetitiv

die Bindung der CAD an die DNS (Widlak und Garrard, 2006). Es lässt sich diskutieren, dass TCDD die Aktivität der CAD hemmt, indem durch die starke Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme große Mengen an mRNA gebildet werden. Der anti-apoptotische Effekt von TCDD auf die DNS-Fragmentierung ist nicht bei der OTA- oder CHX-induzierten Apoptose zu beobachten, obwohl hierbei durch die Hemmung der Proteintranslation durch diese beiden Substanzen große Mengen an mRNA in der Zelle vorhanden sein sollten. Daher scheint die Vermutung, dass TCDD die DNS-Fragmentierung durch gebildete mRNA hemmt, unwahrscheinlich.

In Jurkat-Zellen induzierte Curcumin die Aktivität der Caspase 3 sowie die Spaltung von PARP und ICAD. Dennoch kam es weder zu Chromatinkondensation, noch zur Bildung von sub-G₁-Zellen. UVC-Strahlung führte in diesen Zellen zu nukleärer Apoptose, was durch die Behandlung bestrahlter Zellen mit Curcumin gehemmt werden konnte. Die Aktivierung der Caspase 3 sowie die Spaltung von Caspasesubstraten durch UVC-Strahlung wurden durch Curcumin dagegen nicht beeinflusst. Curcumin hemmte die katalytische Aktivität der CAD ohne dass es deren DNS-Bindung beeinflusste. Vielmehr wurde vermutet, dass es an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet (Sikora et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Curcumin zu verwenden, um die anti-apoptotische Aktivität von TCDD zu charakterisieren. Da Curcumin selbst in den primären Hepatozyten zu Chromatinkondensation führte (nicht gezeigte Ergebnisse), wurde nicht weiter an dieser Fragestellung gearbeitet.

In RKO humanen Kolonkarzinomzellen führte die Behandlung mit 4-Hydroxy-2-Nonenal zu Caspasen-abhängiger DNS-Fragmentierung. Hierbei wurde PARP Caspasen-abhängig gespalten und es kam im Zuge der Apoptose zur Auto-PARYlierung von PARP, was ebenfalls durch eine Hemmung der Caspasenaktivität mit zVAD-fmk unterdrückt werden konnte. Aus diesen Versuchen schlossen die Autoren der Studie, dass die PARP-Aktivierung im Zuge der Apoptose der DNS-Fragmentierung folgte. PARP wurde hier durch DNS-Strangbrüche, die durch CAD gebildet wurden, aktiviert. In einem *in vitro* CAD-Aktivitätstest im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von PARP die CAD-Aktivität erhöhte, während PARP und NAD⁺ die Aktivität wieder hemmten. Diese Hemmung

war abhängig von dem Vorhandensein des PAR-Polymers. In der Publikation von West et al. (2006) ist außerdem postuliert worden, dass CAD eine PAR-Erkennungsdomäne besitzt, über deren Bindung es mit PAR interagiert und so in ihrer Aktivität gehemmt wird. Durch die Spaltung von PARP durch Caspasen soll somit unter anderem verhindert werden, dass die DNS-Fragmentierung inhibiert wird (West et al., 2006). Auch Widlak und Garrard konnten zeigen, dass die Aktivität der CAD durch PAR negativ beeinflusst wird, wenn auch nur schwach (Widlak und Garrard, 2006).

Im Jahr 2001 ist von Ma und Mitarbeitern ein neues Zielgen für TCDD identifiziert worden. Die *TCDD-inducible* PARP (TiPARP). Dieses Protein besitzt Sequenzhomologie zur PARylierungsdomäne von PARP-1 und wird über den AhR/ARNT-Signalweg in zahlreichen Zellen und Geweben induziert, auch in der Leber von Ratten (Ma et al., 2001; Ma et al., 2002; Dere et al., 2006; Tijet et al., 2006; Hockley et al., 2007; Boutros et al., 2008; Kopec et al., 2008; Boutros et al., 2009). Es ist nicht bekannt, ob TiPARP katalytische PARylierungsaktivität besitzt oder ob es im Zuge der Apoptose gespalten werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Frage zu klären, ob eine übermäßige PARylierungsaktivität, etwa durch die Induktion der TiPARP durch TCDD zu einer Hemmung der CAD-Aktivität führen kann. Hierzu wurden Primärhepatozyten mit UVC-Licht bestrahlt und mit Kombinationen von TCDD und den beiden PARP-Inhibitoren DPQ und PJ34 behandelt (siehe Kapitel 4.1.15). Hierbei zeigte sich, dass beide Inhibitoren zu einer leichten, Konzentrations-abhängigen Reduktion der Apoptoserate in den DAPI-Färbeexperimenten führten, sie besaßen dagegen keinen Effekt auf die internukleosomale DNS-Fragmentierung. Beide Substanzen bewirkten keine Reversion des anti-apoptotischen Effektes von TCDD, weshalb wahrscheinlich nicht davon ausgegangen werden kann, dass PARP-Aktivität Ursache für die Hemmung der apoptotischen DNS-Fragmentierung ist. Jedoch ist nicht klar, ob die TiPARP, sofern sie denn PARylierungsaktivität besitzt, durch die beiden eingesetzten PARP-Inhibitoren gehemmt werden kann.

Posttranslationale Veränderungen von Histonen spielen eine Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen (Jenuwein und Allis, 2001). Im Zuge der Apoptose werden verschiedene Histone phosphoryliert, z.B. H2AX (siehe unten),

H2B (Ajiro et al., 2000), H3 (Waring et al., 1997) oder auch dephosphoryliert, z.B. H1 (Kratzmeier et al., 2000).

Als Antwort auf DNS-Doppelstrangbrüche wird das Histon H2AX an der Position ser139 durch *ataxia telangiectasia mutated kinase* (ATM) und *ATM and Rad-3 related* (ATR) phosphoryliert (Burma et al., 2001; Hanasoge und Ljungman, 2007; Staszewski et al., 2008), die eigentliche Funktion dieser Phosphorylierung ist nicht bekannt.

Lu und Mitarbeiter untersuchten die Phosphorylierung von H2AX in Mausepidermiszellen JB6 nach UV-Bestrahlung. UVA, UVB und UVC-Bestrahlung führten alle zu Dosis- und Zeit-abhängiger γ H2AX-Phosphorylierung. Alle weiteren Experimente dieser Studie wurden mit UVA-Bestrahlung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die γ H2AX-Phosphorylierung durch die JNK, und nicht durch ATM oder ATR in diesen Zellen als Antwort auf UVA-Bestrahlung vermittelt wurde und dass das Ausschalten von JNK sowohl die Phosphorylierung von H2AX als auch die Aktivierung der Caspase 3 verhinderte. In Embryofibroblasten aus Wildtyp Mäusen kam es nach UVA-Bestrahlung und nach Etoposid-Behandlung zu Apoptose was mit DNS-Fragmentierung und der Ausbildung einer sub-G₁-Population einherging. In H2AX-*knock out* Mäusen kam es nicht zu nukleärer Apoptose. Dennoch kam es in beiden Zelltypen gleichermaßen zur Aktivierung der Caspase 3. Die Behandlung von Wildtyp-Zellen mit zVAD-fmk verhinderte die Aktivierung der Caspase 3 sowie die internukleosomale DNS-Fragmentierung, nicht aber die H2AX-Phosphorylierung nach UVA-Bestrahlung. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass CAD mit H2AX *in vitro* interagiert und dass die Phosphorylierung des Histons aktivierend auf CAD wirkt (Lu et al., 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob TCDD die Aktivität apoptotischer Nukleasen hemmen könnte, indem es die Phosphorylierung von H2AX beeinflusst und somit hemmend auf CAD wirkt. Um dieser Frage nachzugehen wurden Western blot Experimente gegen phosphoryliertes H2AX in den primären Rattenhepatozyten nach UVC-Bestrahlung durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.14). Es zeigte sich, dass 1 h nach der Bestrahlung nur wenig γ H2AX in den Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen vorlag. 24 h nach der Bestrahlung kam es zu einer starken Dosis-abhängigen Induktion der H2AX-Phosphorylierung. TCDD besaß einen hemmenden Effekt hierauf, ohne dass die Unterschiede statistische Signifikanz erreichten. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Effekte abhängig vom

AhR und von der Aktivität von Caspasen waren. CH-223191 führte überraschenderweise zu einer nahezu vollständigen Hemmung der UVC-induzierten H2AX-Phosphorylierung. Der Mechanismus dieser Hemmung ist nicht bekannt. Auch korrelierte dieser Effekt nicht mit anderen Apoptosemarkern in dieser Arbeit. Der Einsatz von zVAD-fmk zeigte, dass die UVC-induzierte H2AX-Phosphorylierung Caspasen-abhängig war.

In den Huh-7-Zellen (siehe Kapitel 4.2.6) konnte eine Zeit-abhängige Induktion der H2AX-Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung beobachtet werden, jedoch ließ sich nach 24 h keine Dosis-Abhängigkeit nachweisen. TCDD besaß nur 1 h nach der Bestrahlung eine signifikant reduzierende Wirkung auf die γ H2AX-Menge. Dieser Effekt zeigte eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit.

In nicht proliferierenden Zellen wird H2AX als Antwort auf UV-Bestrahlung nur leicht phosphoryliert, dies ist vermutlich abhängig von der DNS-Reparatur. In proliferierenden Zellen ist die H2AX-Phosphorylierung darüber hinaus abhängig von der Replikation: DNS-Schäden, die im Zuge der Zellteilung in Doppelstrangbrüche umgewandelt werden, führen zu dieser Histon-Phosphorylierung. Nach ionisierender Bestrahlung bilden sich im Zellkern γ H2AX-Foci, nach UV-Bestrahlung zeigte sich γ H2AX pan-nukleär (Marti et al., 2006; Hanasoge und Ljungman, 2007). Sobald die Zellen in die Apoptose eintreten, können große Mengen an γ H2AX detektiert werden (Halicka et al., 2005). Dies ist abhängig von Caspasen und CAD und tritt schon während der Grobfragmentierung des Chromatins, also vor der internukleosomalen DNS-Spaltung auf (Rogakou et al., 2000). Diese Phosphorylierung wird vermutlich durch die DNS-abhängige Proteinkinase katalysiert (Mukherjee et al., 2006).

Sowohl in den primären Rattenhepatozyten als auch in den Huh-7-Zellen kam es durch UVC-Bestrahlung zu H2AX-Phosphorylierung. In den Primärhepatozyten war die Phosphorylierung im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lu et al. (2006) Caspasen-abhängig und damit erscheint es möglich, dass sie einen sekundären Effekt der apoptotischen DNS-Fragmentierung darstellte. Auch Trisciuglio und Bianchi (2009) konnten zeigen, dass die H2AX-Phosphorylierung in verschiedenen humanen Zelllinien Caspasen-abhängig ist. Die geringe hemmende Wirkung von TCDD auf die H2AX-Phosphorylierung in den Primärhepatozyten spiegelt wahrscheinlich die verringerte DNS-Fragmentierung wider. In den Huh-7-Zellen zeigte sich kein Effekt durch TCDD nach 24 h, es ist unklar, weshalb die Hemmung der DNS-Fragmentierung hierbei nicht auf Ebene der H2AX-Phosphorylierung zu

beobachten war, es könnte aber sein, dass der Effekt auf die unterschiedlichen Charakteristiken zwischen den beiden Zelltypen (Proliferation der Zellen) zurückzuführen ist. Aus den Ergebnissen zur Zellzyklusverteilung in den Huh-7-Zellen (siehe Kapitel 4.2.2) lässt sich schließen, dass TCDD nicht zu einem Zellzyklusstopp führte. Die Hemmung der H2AX-Phosphorylierung 1 h nach der Bestrahlung könnte eventuell auf eine zytotoxische Wirkung von TCDD hindeuten. Weniger Proliferation schlägt sich in weniger Replikations-bedingter H2AX-Phosphorylierung nieder.

5.10 Proteinbiosynthese

Ein Grund für den mangelnden Effekt von TCDD auf die OTA- und CHX-induzierte Apoptose könnte in der Hemmung der Proteinbiosynthese durch diese beiden Substanzen liegen (Obrig et al., 1971; Creppy et al., 1990; Bennett und Klich, 2003). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte bestätigt werden, dass beide Substanzen die Neusynthese von Proteinen in primären Rattenhepatozyten hemmten (siehe Kapitel 4.1.10). Dies wurde zum einen durch die Hemmung der durch TCDD-induzierten CYP1A1-Expression auf Proteinebene gezeigt (statistisch signifikante Verringerung der CYP1A1-Proteinmenge durch OTA ab 1 μM , durch CHX ab 0,1 $\mu\text{g/ml}$) und zum anderen durch die Hemmung des Einbaus von radioaktiv markiertem Leucin (statistisch signifikante Hemmung durch OTA in einer Konzentration von 10 μM , durch CHX ab 0,1 $\mu\text{g/ml}$).

Die Hemmung der durch UVC-Bestrahlung induzierten apoptotischen DNS-Fragmentierung durch TCDD wurde als AhR-abhängig charakterisiert (siehe Kapitel 4.1.4). Die meisten AhR-abhängigen Effekte rühren von einer Änderung der Expression von AhR-Zielgenen her. Obwohl der AhR auch nicht-genomische Signalfunktionen besitzt (Matsumura, 2009), erscheint es plausibel, dass die Expression und Translation eines oder mehrerer AhR-Zielgene an der AhR-abhängigen Apoptosehemmung beteiligt sind. Um dies indirekt zu überprüfen, wurden weitere Experimente zur nukleären Apoptose durchgeführt: Hierzu wurde CHX in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Diese Konzentration war ausreichend, um die Proteinbiosynthese statistisch signifikant zu hemmen, ohne in ausgeprägtem Maße Apoptose zu induzieren. Mit UV-Licht bestrahlte Zellen wurden mit CHX in dieser Konzentration sowie mit TCDD inkubiert und als Endpunkte

wurden die DNS-Fragmentierung und die Chromatin-Kondensation und Fragmentierung untersucht (siehe Kapitel 4.1.11). Es konnte gezeigt werden, dass CHX zu einer Aufhebung des anti-apoptotischen Effektes von TCDD führte.

In den DAPI-Färbeexperimenten wurde beobachtet, dass CHX alleine schon zu einer Reduktion der durch UV-Bestrahlung induzierten Apoptoserate führte. Dies lässt sich eventuell dadurch erklären, dass eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch diese Substanz zu einer Erniedrigung der Level pro-apoptotischer Proteine führen könnte. So hemmte zum Beispiel CHX in einer niedrigen Konzentration (0,05 µg/ml) die durch verschiedene Stimuli induzierte Apoptose in Mauslymphozyten, während eine hohe CHX-Konzentration (2,5 µg/ml) selbst Apoptose induzierte (Lemaire et al., 1999). In HepG2-Zellen bewirkte CHX eine Hemmung der durch Serumentzug verursachten Apoptose. Der anti-apoptotische Effekt wurde von den Autoren durch eine Hemmung der p53-Akkumulation, bzw. eine Reduktion der Level an phosphoryliertem p53 erklärt. Dieser Effekt trat nicht nur bei Serumentzug auf, sondern auch bei der Behandlung mit weiteren pro-apoptotischen Stimuli (Bai und Cederbaum, 2006). Ferner ist diskutiert worden, ob CHX aktiv anti-apoptotische Signalwege aktivieren kann (Mattson und Furukawa, 1997).

Es könnte sein, dass TCDD die Apoptose dadurch hemmt, dass AhR-abhängig ein oder mehrere anti-apoptotische Proteine induziert werden, was durch CHX gehemmt wird. Andererseits könnte es aber auch sein, dass durch die UV-Bestrahlung ein pro-apoptotisches Protein induziert wird, auf welches TCDD über den AhR wirkt. Eine Hemmung der Proteinbiosynthese bewirkt in diesem Fall, dass das Zielprotein für die anti-apoptotische Wirkung von TCDD nicht mehr gebildet wird.

5.11 Mitochondriales Membranpotential

In den Huh-7-Zellen wurde zusätzlich als ein Marker für apoptotische Prozesse die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran nach Behandlungen der Zellen mit UVC-Licht sowie mit TCDD untersucht. Hierbei zeigte sich neben der erwartungsgemäßen Dosis-abhängigen Depolarisation durch UVC-Bestrahlung ein Konzentrations-abhängiger Effekt auf das mitochondriale Membranpotential durch TCDD. Die Testsubstanz führte alleine sowie in Kombination mit UV-Licht zu einer Abnahme des Membranpotentials (siehe Kapitel 4.2.3), ohne dass die basale oder

UVC-induzierte Apoptoserate oder Caspasen 3/7-Aktivitäten erhöht waren (siehe Kapitel 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.4).

Dass TCDD diese Wirkung besitzt ist in zwei Studien an verschiedenen Zelltypen gezeigt worden: in C2C12-Zellen führte die Inkubation mit TCDD zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Die Autoren der Studie schlugen vor, dass der Effekt auf einer Störung der mitochondrialen DNS-Transkription durch TCDD beruhte. Hierdurch wurde eine Signalkaskade initiiert, die über Calcineurin und NF- κ B/Rel anti-apoptotisch wirkte. Die durch TCDD induzierten Effekte waren AhR-unabhängig (Biswas et al., 2008). Auch in Spermatozoen männlicher Wildtyp C57BL/6 Mäusen führte die Behandlung der Tiere mit TCDD zu einer Depolarisation der Mitochondrien, nicht jedoch in Spermatozoen von AhR-*knock out* Tieren. Trotz der Depolarisation der Mitochondrien führte die Behandlung der Tiere mit TCDD in dieser Studie nicht zu einer Änderung der basalen Apoptoserate (Fisher et al., 2005). Im Gegensatz hierzu führte in der Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen die einmalige Behandlung der Tiere mit TCDD nach einer Woche zu einer Hyperpolarisation der Mitochondrien (Shen et al., 2005).

5.12 Topoisomerase II α

Sowohl TCDD als auch OTA besitzen planare Strukturen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese Substanzen als Topoisomerase-Inhibitoren wirken können. Insbesondere für OTA war die Beantwortung dieser Frage interessant, da Topoisomerase-Hemmstoffe (z.B. Doxorubicin, Etoposid) pro-apoptotisch wirken (Kawiak et al., 2007).

Weder TCDD noch OTA führten in den eingesetzten Konzentrationen zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität der humanen Topoisomerase II α (siehe Kapitel 4.1.16).

In der Literatur gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass TCDD die Aktivität von Topoisomerasen beeinflusst.

Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Wirkung von OTA auf die humane Topoisomerase II α , wirkte dieses Mykotoxin in einer anderen Studie hemmend auf das Enzym. In der vorliegenden Arbeit wurde OTA bis zu einer Konzentration von 50 μ M getestet. In der Studie von Cosimi et al. wurde OTA in

Konzentrationen von 50 μM bis 1 mM getestet und erst ab einer Konzentration von 200 μM wirkte es hemmend auf die Topoisomerase II (Cosimi et al., 2009).

5.13 Zusammenfassende Diskussion

Mit Hilfe der beiden Leberzellsysteme Primärhepatozyten männlicher Wistar Ratten und der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 wurden die Mechanismen der UVC-Licht-, OTA- und CHX-induzierten Apoptose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die durch UVC-Licht induzierte Apoptose folgende Schritte umfasst (nicht zwingend in der richtigen zeitlichen Reihenfolge):

- Bildung von DNS-Schäden
- p53-Aktivierung und -Akkumulation
- Induktion von p53-Zielgenen
- Depolarisation der Mitochondrien
- Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien
- Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Caspase-Kaskaden
- Spaltung von Caspase-Substraten
- Freisetzung von CAD
- Chromatin-Kondensation und -Fragmentierung
- Internukleosomale DNS-Spaltung
- H2AX-Phosphorylierung
- Zytotoxizität

Die beobachtete massive p53-Akkumulation nach Bestrahlung mit hohen UVC-Dosen sowie die H2AX-Phosphorylierung waren Caspasen-abhängig und damit vermutlich durch die apoptotische DNS-Fragmentierung verursachte sekundäre Effekte. Die durch UVC-Bestrahlung induzierte Apoptose war vollständig abhängig von der Aktivierung von Caspasen.

Für die durch OTA induzierte Apoptose konnten folgende Schritte identifiziert werden:

- Bildung von DNS-Schäden
- p53-Aktivierung und -Akkumulation
- Induktion von p53-Zielgenen

Aktivierung der intrinsischen Caspase-Kaskade
Chromatin-Kondensation und -Fragmentierung
Internukleosomale DNS-Spaltung
Zytotoxizität

Die OTA-induzierte Apoptose war zum größten Teil, aber nicht vollständig Caspasen-abhängig.

Für die durch CHX induzierte, Caspasen-unabhängige Apoptose konnten nur die Chromatin-Kondensation und –Fragmentierung, sowie internukleosomale DNS-Spaltung als Apoptosemarker identifiziert werden. Auch CHX erwies sich in den primären Hepatozyten als zytotoxisch.

TCDD besaß nur auf die UVC-induzierte Apoptose einen hemmenden Effekt und hier nur bei der Chromatin-Kondensation und -Fragmentierung, sowie bei der internukleosomalen DNS-Spaltung. Dieser Effekt war abhängig von einer Aktivierung des AhR. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl OTA als auch CHX in solchen Konzentrationen, in denen sie Apoptose auslösten, die Proteinbiosynthese nahezu komplett hemmten. Die durch diese beiden Substanzen ausgelöste Apoptose wurde nicht durch TCDD beeinflusst. Dies lässt den Schluss zu, dass die Neusynthese von Proteinen nötig ist, um den anti-apoptotischen Effekt von TCDD zu vermitteln. Es scheint plausibel, dass TCDD über den AhR ein oder mehrere Proteine induziert, die im Verlauf der Apoptose hemmend auf die apoptotische DNS-Fragmentierung, z.B. auf die Aktivität apoptotischer Nukleasen wirken.

Es konnte eine Nukleaseaktivität in isolierten Zellkernen primärer Rattenhepatozyten identifiziert werden, die durch TCDD-Inkubation der Zellen gehemmt wurde. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, um welche Nuklease es sich handelte.

Da der Effekt der Hemmung der apoptotischen DNS-Fragmentierung durch TCDD auch in den humanen Huh-7-Zellen zu beobachten war, scheint dieser Mechanismus auch für den Menschen eine Rolle spielen zu können.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Apoptosehemmung durch TCDD stehen zum Teil im Widerspruch mit anderen Studien zu diesem Thema. Zu beachten ist hierbei aber, dass die Effekte von TCDD auf die Apoptose sich innerhalb der Literatur stark zu unterscheiden scheinen, je nach zellulärem Testsystem und apoptogenen Stimulus. Es ist möglich, dass mehrere Signalwege an der anti-apoptotischen Wirkung von TCDD beteiligt sind, die sich je nach Versuchsbedingungen in unterschiedlichem Ausmaße zeigen.

Auch erwähnenswert ist, dass TCDD in einer Reihe von Versuchen eine leichte pro-apoptotische Wirkung zu besitzen schien. Die Substanz führte zu einer gewissen Akkumulation von p53 (siehe Kapitel 4.1.5) und zu einer leichten Spaltung der Caspase 3 (siehe Kapitel 4.1.8). Ferner wirkte TCDD selbst leicht zytotoxisch in den primären Rattenhepatozyten (siehe Kapitel 4.1.2) und induzierte eine Reihe pro-apoptotischer Gene (siehe Kapitel 4.1.6). Auch bewirkte TCDD die Depolarisation der Mitochondrien in den Huh-7-Zellen (siehe Kapitel 4.2.3) und verstärkte die UVC-induzierte Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien von primären Rattenhepatozyten (siehe Kapitel 4.1.12).

Abschließend stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der Apoptose, die nur auf Ebene der Fragmentierung des Chromatins stattfindet, dazu führen kann, dass sich Zellen von der Induktion der Apoptose wieder erholen können, um ihre erworbenen DNS-Schäden an Tochterzellen weiterzugeben. Es gibt Hinweise darauf, dass sich selbst solche Zellen, bei denen die Apoptose bis hin zur Fragmentierung der DNS abläuft, wieder erholen können. Klinische Relevanz besitzt diese Problematik in der Entstehung von durch Chemotherapie bedingten Leukämien. Etwa durch Etoposid kann es zu Caspasen-abhängigen DNS-Strangbrüchen und -Translokationen kommen, welche leukämogenes Potential besitzen. Die gleichen Caspasen-abhängigen Translokationen konnten auch *in vitro* nach Apoptose-Induktion beobachtet werden (Vaughan et al., 2002; Vaughan et al., 2005).

Apoptotische Nukleasen spielen eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Eine Hemmung oder der Verlust der CAD-Aktivität führte in primären Mauszellen und in transformierten humanen Zelllinien zu einer teilweisen Hemmung der DNS-Fragmentierung ohne das Auftreten von Annexin V-positiven Zellen zu beeinflussen. Auch kam es zum verstärkten Auftreten von spontanen oder

induzierten Mutationen, zu Genamplifikationen und zu chromosomaler Instabilität in diesen Zellen. Darüber hinaus sind CAD-*knock out* Mäuse empfindlicher gegenüber Strahlungs-induzierter Kanzerogenese als Wildtyp Mäuse. Initiations-Promotionsstudien an der Mäusehaut haben ebenfalls gezeigt, dass CAD-*knock out* Tiere empfindlicher gegenüber chemisch induzierter Tumorpromotion sind als Wildtyp Tiere. Der diesen Effekten zu Grunde liegende Mechanismus ist vermutlich auf das Überleben einiger weniger Zellen zurückzuführen, in denen ansonsten das apoptotische Programm vollständig abgelaufen wäre (Yan et al., 2006a; Yan et al., 2006b; Yan et al., 2009).

Es ist möglich, dass der durch Fremdstoffe aktivierte AhR eine Hemmung der Apoptose auf Ebene der DNS-Fragmentierung bewirkt, um die DNS-Integrität der Zelle zu bewahren und den Fremdstoffmetabolismus aufrecht zu erhalten. Dies ermöglicht der Zelle zunächst, die Fremdstoffe zu metabolisieren, was den gesamten Organismus vor potentiell adversen Wirkungen der Fremdstoffe schützt. Nach erfolgreichem Metabolismus und damit einem Wegfallen des AhR-aktivierenden Signals kann die Zelle die Apoptose fertig ausführen. TCDD ist ein ausgesprochen potenter Aktivator des AhR und wird selbst kaum oder nicht metabolisiert, was der Grund für eine überschießende Apoptosehemmung sein könnte. Dieser Mechanismus könnte zur Tumorpromotion durch TCDD und verwandte Verbindungen beitragen und auch die Grundlage für eine hepatokanzerogene Wirkung anderer Induktoren des Fremdstoffmetabolismus sein.

6 Zusammenfassung und Ausblick

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) wurde im Jahr 1997 von der *International Agency for Research on Cancer* als Gruppe 1 Kanzerogen eingestuft, obwohl die molekularen Mechanismen der kanzerogenen Wirkung von TCDD bislang nicht vollständig geklärt werden konnten. TCDD zeigte im Tierversuch ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential an Ratten, und im Initiations-Promotions-Modell in der Rattenleber konnte TCDD eine starke tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben werden. Eine Reihe von Studien zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in unterschiedlichen Zellsystemen eine Hemmung des durch verschiedene Stimuli induzierten programmierten Zelltodes, der Apoptose durch TCDD. Diese anti-apoptotische Wirkung wird als ein möglicher Mechanismus für die Tumorpromotion von TCDD diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der Apoptose-Hemmung durch TCDD in Leberzellsystemen der Ratte und des Menschen untersucht werden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die anti-apoptotische Wirkung dieses Fremdstoffes über den Arylhydrokarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt wird. Die Aufklärung der bislang noch unbekanntenen molekularen Mechanismen der TCDD-vermittelten Kanzerogenese könnte die Risikobewertung einer TCDD-Exposition des Menschen auf eine erheblich solidere Basis stellen als bisher.

Es konnte sowohl in primären Rattenhepatozyten als auch in der humanen Hepatomzelllinie Huh-7 bestätigt werden, dass TCDD die durch UVC-Licht induzierte Apoptose hemmt. Dies wurde auf Ebene der DNS-Fragmentierung und an Hand morphologischer Veränderungen des Zellkerns gezeigt. In den Primärhepatozyten war der anti-apoptotische Effekt von TCDD abhängig von einer Aktivierung des AhR. Die Apoptose durch die beiden Proteinbiosynthese-Inhibitoren Ochratoxin A und Cycloheximid wurde im Gegensatz zur UVC-Licht-induzierten Apoptose nicht durch TCDD gehemmt. Dies lässt den Schluss zu, dass eventuell die Neusynthese eines durch den AhR induzierten Proteins für die Hemmung der Apoptose in diesen Zellen nötig ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass entgegen früherer Studien, eine Hemmung der Aktivität des Tumorsuppressors p53 vermutlich nicht für die Apoptosehemmung durch TCDD verantwortlich ist.

TCDD-bedingte Änderungen in der Expression von an der Apoptose beteiligten Genen ließen die Vermutung zu, dass diese Substanz zu einer Aktivierung des anti-

apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B führt. Dies würde letztendlich zu einer Hemmung der Caspase-abhängigen Apoptosewege führen. Es konnte dennoch keine Wirkung des Fremdstoffes auf die Charakteristiken der durch UVC-Licht induzierten Caspasen-abhängigen Apoptose beobachtet werden. Weder wurden die proteolytische Aktivierung, noch die katalytische Aktivität von Caspasen oder die Spaltung von Caspasensubstraten durch TCDD moduliert. Daher wurde angenommen, dass TCDD im Signalweg der Apoptose zwischen der Caspasenaktivität und der apoptotischen DNS-Fragmentierung wirken müsste. Auf Grund dieser Hypothese wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Charakteristiken apoptotischer Nukleasen untersucht. Weder konnte eine verringerte Proteinmenge an Endonuklease G oder Caspase-aktivierter DNase (CAD) festgestellt werden, noch wurde die Aktivität rekombinant exprimierter CAD durch TCDD moduliert.

In isolierten Zellkernen primärer Rattenhepatozyten konnte eine intrinsische Nukleaseaktivität identifiziert werden, die Calcium- und Magnesium-abhängig war und vermutlich durch nicht-physiologische Konzentrationen an monovalenten Ionen aktiviert wird. TCDD besaß eine hemmende Wirkung auf diese Nukleaseaktivität.

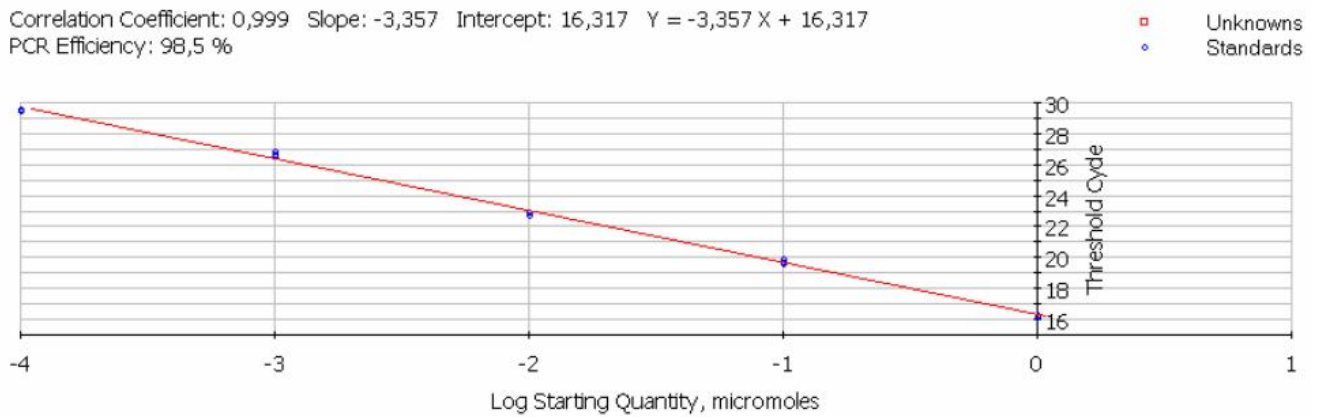
Es erscheint plausibel, dass TCDD die apoptotische DNS-Fragmentierung über einen bisher unbekanntem, AhR-abhängigen Mechanismus hemmt, und damit trotz einer Initiation der Apoptose die Integrität der DNS aufrecht erhält, um der Zelle die Möglichkeit zur Entgiftung von Aktivator des Fremdstoffmetabolismus zu geben. Diese Zellen könnten sich nach Entzug des pro-apoptotischen Stimulus letztendlich wieder erholen. Da solche Zellen DNS-Schäden tragen können, durch die sie unter normalen Umständen in die Apoptose getrieben worden wären, könnte dieser Mechanismus schließlich eine Rolle in der Tumorpromotion durch TCDD und verwandte Verbindungen spielen.

Anhänge

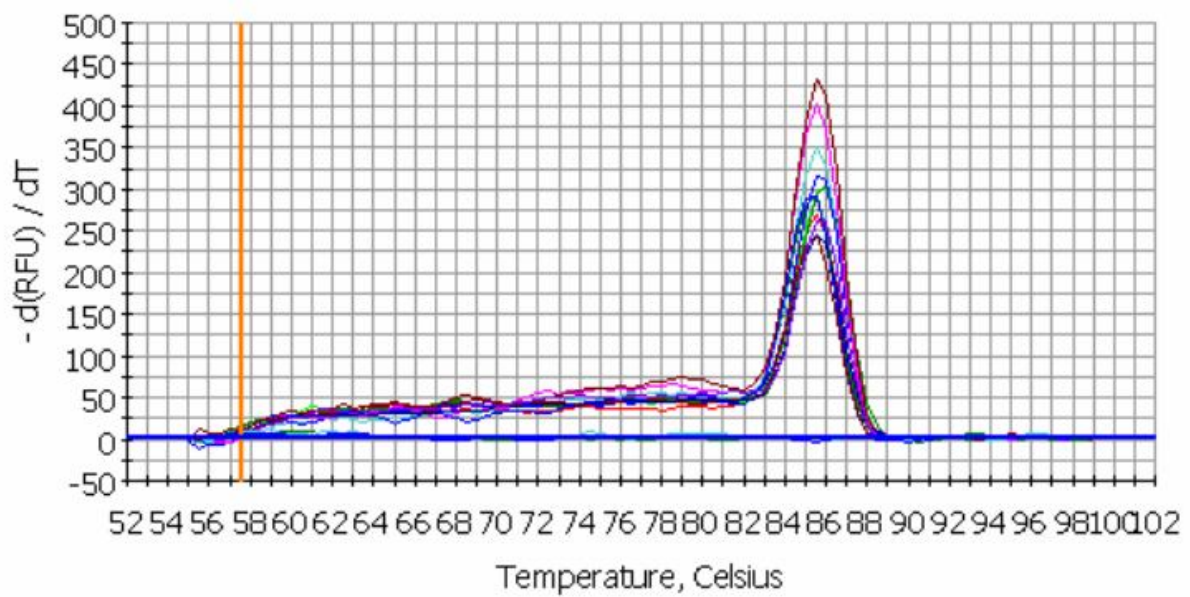
Ergebnisse der Primervalidierung

Bcl-x_L

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,357 Intercept: 16,317 $Y = -3,357 X + 16,317$
PCR Efficiency: 98,5 %



Standardkurve für Primervalidierung Bcl-x_L

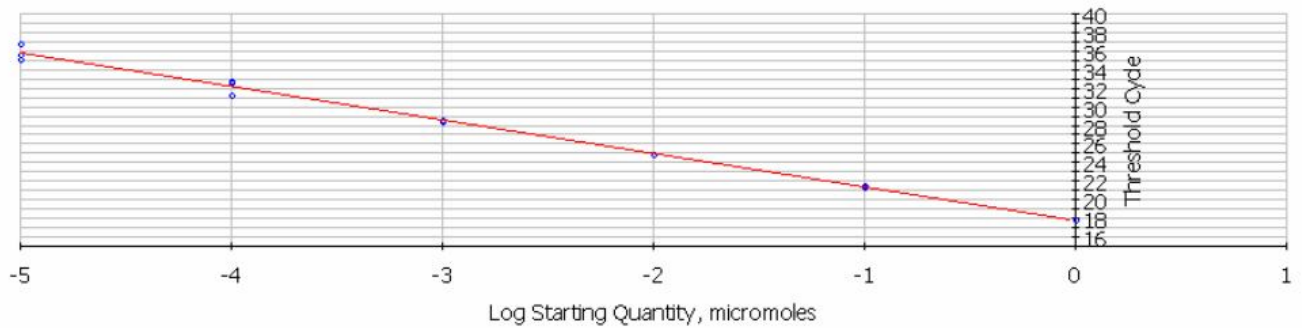


Schmelzkurve für Primervalidierung Bcl-x_L

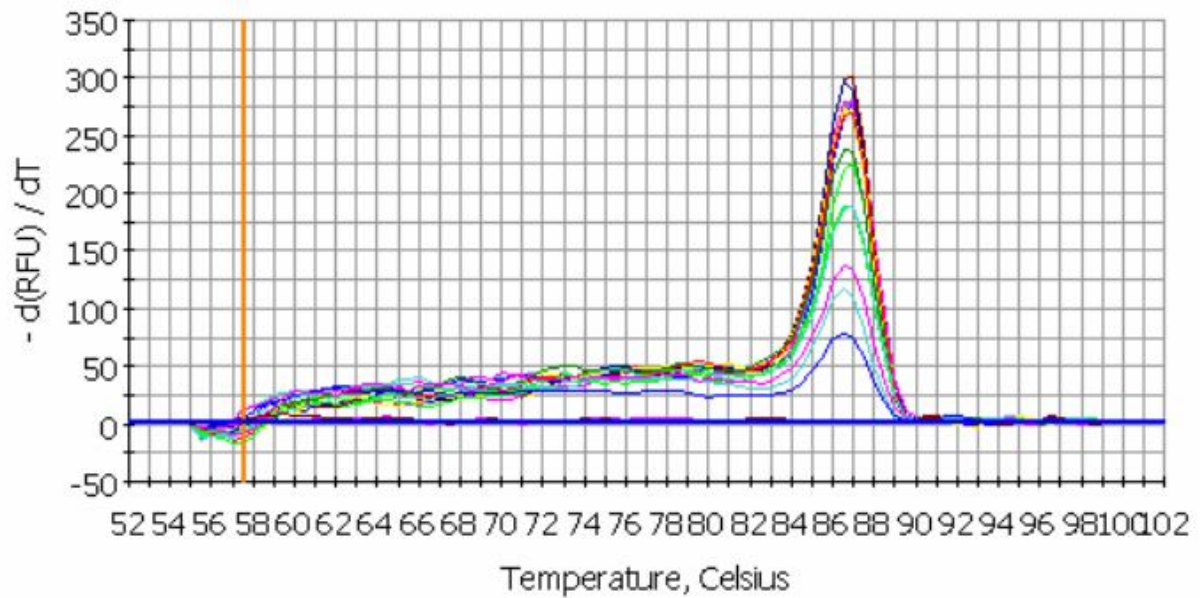
CYP1A1

Correlation Coefficient: 0,998 Slope: -3,595 Intercept: 17,816 $Y = -3,595 X + 17,816$
PCR Efficiency: 89,7 %

□ Unknowns
○ Standards



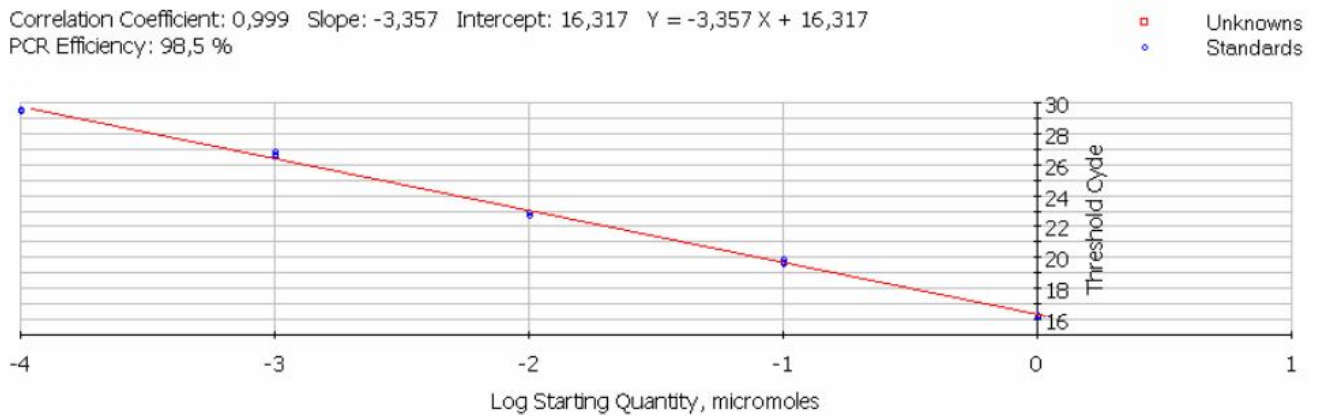
Standardkurve für Primervalidierung CYP1A1



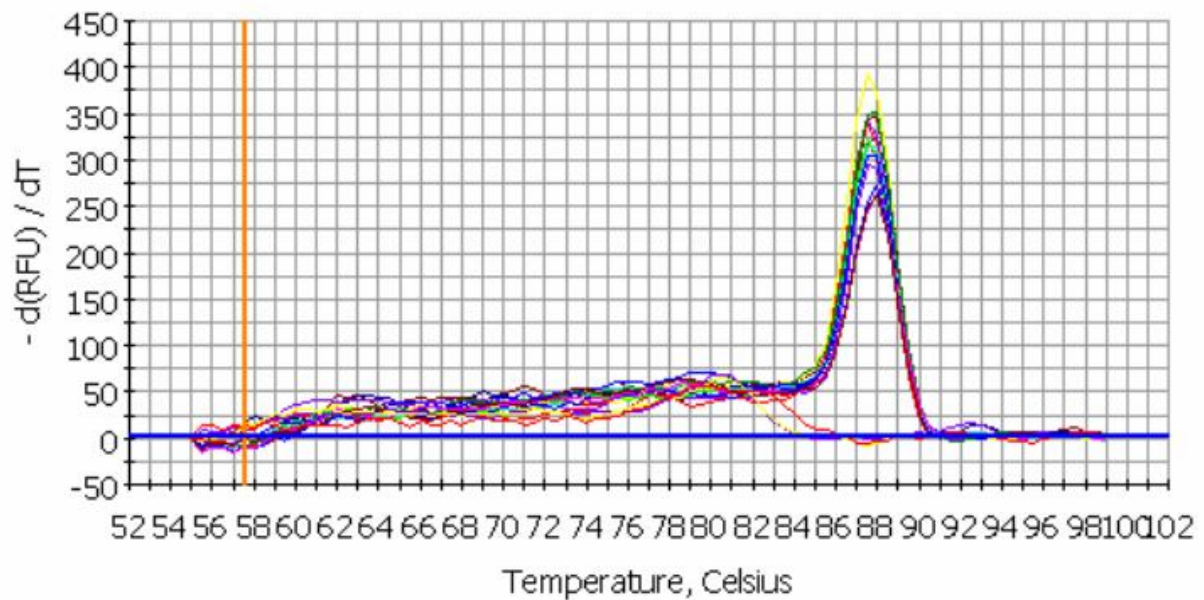
Schmelzkurve für Primervalidierung CYP1A1

β-Actin

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,357 Intercept: 16,317 $Y = -3,357 X + 16,317$
PCR Efficiency: 98,5 %



Standardkurve für Primervalidierung β-Actin



Schmelzkurve für Primervalidierung β-Actin

PCR-Effizienzen:	Bcl-xL:	1,9032 (90,3%)
	CYP1A1:	1,8974 (89,7%)
	Actin (Bcl-xL):	1,9856 (98,5%)
	Actin (CYP1A1):	1,9852 (98,5%)

Berechnung nach Pfaffl, 2001 ausgehend von den erreichten PCR-Effizienzen:

$$\mathit{ratio}_{Bcl-xL} = \frac{1,9032^{(cT_{Bcl-xL}DMSO - cT_{Bcl-xL}Probe)}}{1,9856^{(cT_{Actin}DMSO - cT_{Actin}Probe)}}$$

$$\mathit{ratio}_{CYP1A1} = \frac{1,8974^{(cT_{CYP1A1}DMSO - cT_{CYP1A1}Probe)}}{1,9852^{(cT_{Actin}DMSO - cT_{Actin}Probe)}}$$

Literaturverzeichnis

- Abe Y., Sinozaki H., Takagi T., Minegishi T., Kokame K., Kangawa K., Uesaka M., Miyamoto K. (2006): Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible genes in human amniotic epithelial cells. *Endocrine Biology and Endocrinology*, doi:10.1186/1477-7827-4-27
- Adachi J., Mori Y., Matsui S., Matsuda T. (2004): Comparison of gene expression patterns between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and a natural arylhydrocarbon receptor ligand, indirubin. *Toxicological Sciences*, **80**; 161-169
- Ahn J.-Y., Liu X., Cheng D., Peng J., Chan P.-K., Wade P.A., Ye K. (2005): Nucleophosmin/B23 a nuclear PI(3,4,5)P₃ receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Molecular Cell*, **18**; 435-445
- Ahn J.-Y., Liu X., Liu Z., Pereira L., Cheng D., Peng J., Wade P.A., Hamburger A.W., Ye K. (2006): Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated Dnase. *The EMBO Journal*, **25**; 2083-2095
- Ajiro K. (2000): Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**; 439-443
- Ajiro K., Bortner C.D., Westmoreland J., Cidlowski J.A. (2008): An endogenous calcium-dependent, caspase-independent intranuclear degradation pathway in thymocyte nuclei: antagonism by physiological concentrations of K⁺ ions. *Experimental Cell Research*, **314**; 1237-1249
- Akgul C. (2008): Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**; 1326-1336
- AL-Anati L., Katz N., Petzinger E. (2005): Interference of arachidonic acid and its metabolites with TNF- α release by ochratoxin A from rat liver. *Toxicology*, **208**; 335-346
- Alessenko A.V., Boikov P.Y., Filippova G.N., Khrenov A.V., Loginov A.S., Makarieva E.D. (1997): Mechanisms of cycloheximide-induced apoptosis in liver cells. *FEBS Letters*, **46**; 113-116
- Ambolet-Camoit A., Bui L.C., Pierre S., Chevallier A., Marchand A., Coumoul X., Garlatti M., Andreau K., Barouki R., Aggebeck M. (2010): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker AGR2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicological Sciences*; doi, 10.1093/toxisci/kfq082
- Andera L. (2009): Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic*, **153**; 173-180

- Anderson G.R., Hasan A., Yin H., Qadri I., Quattrochi L.C. (2006): Regulation of the *CYP1A1* gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin but not by β -naphthoflavone or 3-methylcholanthrene is altered in hepatitis C virus replicon-expressing cells. *Molecular Pharmacology*, **70**; 1062-1070
- Anzenbacher P. und Anzenbacherova E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**; 737-747
- Arnoult D., Gaume B., Karbowski M., Sharpe J.C., Cecconi F., Youle R.J. (2003): Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO Journal*, **22**; 4385-4399
- Ashkenazi A. und Herbst R.S. (2008): To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**; 1979-1990
- Assaf H., Azouri H., Pallardy M. (2004): Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-x_L. *Toxicological Sciences*, **79**; 335-344
- Atroshi F., Biese I., Saloniemi H. (2000): Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **3**; 281-291
- Bai J. und Cederbaum A.I. (2006): Cycloheximide protects HepG2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing p53 and phosphorylated p53 levels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **319**; 1435-1443
- Bailly-Maitre B., de Sousa G., Boulukos K., Gugenheim J., Rahmani R. (2001): Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-x_L induction. *Cell Death and Differentiation*, **8**; 279-288
- Baird S.D., Turcotte M., Korneluk R.G., Holcik M. (2006): Searching for IRES. *RNA*, **12**; 1755-1785
- Baldwin A.S. Jr. (1996): The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, **14**; 649-683
- Bannerman D.D., Sathyamoorthy M., Goldblum S.E. (1998): Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**; 35371-35380
- Baskic D., Popovic S., Ristic P., Arsenijevic N.N. (2006): Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*, **30**; 924-932

- Basu A. und Haldar S. (1998): The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*, **4**; 1099-1109
- Batista L.F.Z., Kaina B., Meneghini R., Menck C.F.M. (2009): How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research*. **681**; 197-208
- Beebe L.E., Fornwald L.W., Diwan B.A., Anver M.R., Anderson L.M. (1995): 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 Research*, **55**; 4875-4880
- Bennett J.W. und Klich M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**; 497-516
- Biswas G., Srinivasan S., Anandatheerthavarada H.K., Avadhani N.G. (2008): Dioxin-mediated tumor progression through activation of mitochondria-to-nucleus stress signaling. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **105**; 186-191
- Blom W.M., de Bont H.J.G.M., Meijerman I., Mulder G.J., Nagelkerke J.F. (1999): Prevention of cycloheximide-induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors. *Biological Pharmacology*, **58**; 1891-1898
- Bock K.W. und Köhle C. (2005): Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, **69**; 1403-1408
- Boerma M., van der Wees C.G.C., Vrieling H., Svensson J.P., Wondergem J., van der Laarse A., Mullenders L.H.F., van Zeeland A.A. (2005): Microarray analysis of gene expression profiles of cardiac myocytes and fibroblasts after mechanical stress, ionizing or ultraviolet radiation. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-6-6
- Bouaziz C., Sharaf el dein O., El Golli E., Abid-Essif S., Brenner C., Lemaire C., Bacha H. (2008): Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, **254**; 19-28
- Boulares A.H., Yakovlev A.G., Ivanova V., Stoica B.A., wang G., Iyer S., Smulson M. (1999): Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 22932-22940
- Boutros P.C., Yan R., Moffat I.D., Pohjanvirta R., Okey A.B. (2008): Transcriptomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in liver: Comparison of rat and mouse. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-9-419

- Boutros P.C., Bielefeld K.A., Pohjanvirta R., Harper P.A. (2009): Dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries: comparison of liver and kidney in AhR-null mice. *Toxicological Sciences*, **112**; 245-256
- Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. (1997): A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**; 32436-32442
- Boverhof D.R., Burgoon L.D., Tashiro C., Chittim B., Harkema J.R., Jump D.B., Zacharewsky T.R. (2005): Temporal and dose-dependent hepatic gene expression patterns in mice provide new insights into TCDD-mediated hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, **85**; 1048-1063
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254
- Brancolini C., Lazarevic D., Rodriguez J., Schneider C. (1997): Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of β -catenin. *The Journal of Cell Biology*, **139**; 759-771
- Buchmann A., Stinchcombe S., Körner W., Hagenmaier H., 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
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. (1999): Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, **15**; 269-290
- Bundesgesetzblatt (BGBl) I (1999): Verordnung über Höchstmengen an Mykotoxinen in Lebensmitteln. BGBl I 1999, 1248, zuletzt geändert am 22.02.2006
- Budhram-Mahadeo V., Morris P.J., Smith M.D., Midgley C.A., Boxer L.M, Latchman D.S. (1999): p53 suppresses the activation of the bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 15237-15244
- Burma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D.J. (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**; 42462-42467
- Bushell M., McKendrick L., Jänicke R.U., Clemens M.J., Morley S.J. (1999): Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Letters*, **451**; 332-336

- Camacho I.A., Singh N., Hegde V.L., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2005): Treatment of mice with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin leads to aryl hydrocarbon receptor-dependent nuclear translocation of NF- κ B and expression of Fas ligand in thymic stromal cells and consequent apoptosis in T cells. *The Journal of Immunology*, **175**; 90-103
- Cavin C., Delatour T., Marin-Kuan M., Fenaille F., Holzhäuser D., Guignard G., Bezencon C., Piguet D., Parisod V., Richoz-Payot J., Schilter B. (2009): Ochratoxin A-mediated DNA and protein damage: roles of nitrosative and oxidative stresses. *Toxicological Sciences*, **110**; 84-94
- Chamoux E., Houde N., L'Eriger K., Roux S. (2008): Osteoprotegerin decreases human osteoclast apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *Journal of Cellular Physiology*, **216**; 536-542
- Charles G.D. und Shiverick K.T. (1997): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases mRNA levels for interleukin-1 β , urokinase plasminogen activator, and tumor necrosis factor- α in human uterine endometrial adenocarcinoma RL95-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **238**; 338-342
- Chen S., Guttridge D.C., You Z., Zhang Z., Fribley A., Mayo M.W., Kitajewski J., Wang C.-Y. (2001): Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. *The Journal of Cell Biology*, **152**; 87-96
- Cheon H., Woo Y.-S., Lee J.Y., Kim H.S., Kim H.J., Cho S., Won N.H., Sohn J. (2007): Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced TNF- α production in differentiated THP-1 human macrophages. *Experimental and Molecular Medicine*, **39**; 524-534
- Chesire D.R., Dunn T.A., Ewing C.M., Luo J., Isaacs W.B. (2004): Identification of arylhydrocarbon receptor as a putative wnt/ β -catenin pathway target gene in prostate cancer cells. *Cancer Research*, **64**; 2523-2533
- Choi K.H., Hama-Inaba H., Wang B., Haginoya K., Odaka T., Yamada T., Hayata I., Ohyama H. (2000): UVC-induced apoptosis in human epithelial tumor A431 cells: sequence of apoptotic changes and involvement of caspase (-8 and -3) cascade. *Journal of Radiation Research*, **41**; 243-258
- Choo S.-G., Kim J.W., Lee Y.H., Hwang H.S., Kim M.-S., Ryoo K., Kim M.J., Noh K.T., Kim E.K., Cho J.-H., Yoon K.W., Cho E.-G., Park H.-S., Chi S.W., Lee M.-J., Kang S.S., Ichijo H., Choi E.-J. (2003): Identification of a novel antiapoptotic protein that antagonizes ASK1 and CAD activities. *The Journal of Cell Biology*, **163**; 71-81

- Christensen J.G., Gonzales A.J., Cattley R.C., Goldsworthy T.L. (1998): Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic Carcinogens. *Cell Growth and Differentiation*, **9**; 815-825
- Christensen J.G., Romach E.H., Healy L.N., Gonzales A.J., Anderson S.P., Malarkey D.E., Corton J.C., Fox T.R., Cattley R.C., Goldsworthy T.L. (1999): Altered bcl-2 family expression during non-genotoxic hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, **20**; 1583-1590
- Clemens M.J., Bushell M., Jeffrey I.W., Pain V.M., Morley S.J. (2000): Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death and Differentiation*, **7**; 603-615
- Coiras M., Lopez-Huertas M.R., Mateos E., Alcamí J. (2008): Caspase-3-mediated cleavage of p65/RelA results in a carboxy-terminal fragment that inhibits I κ B α and enhances HIV-1 replication in human T lymphocytes. *Retrovirology*, doi: 10.1186/1742-4690-5-109
- Connor M.J., Nanthur J., Puhvel S.M. (1994): Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on TNF- α levels in the skin of congenic haired and hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **129**; 12-15
- Constantinou T., Baumann F., Lacher M.D., Saurer S., Friis R., Dharmarajan A. (2008): SFRP-4 abrogates Wnt-3a-induced β -catenin and Akt/PKB signalling and reverse a Wnt-3a-imposed inhibition of *in vitro* mammary differentiation. *Journal of Molecular Signaling*, **377**; 606-611
- Conte D., Holcik M., Lefebvre C.A., LaCasse E., Picketts D.J., Wright K.E., Korneluk R.G. (2006): Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Molecular and Cellular Biology*, **26**; 699-708
- Corazza N., Kassahn D., Jakob S., Badmann A., Brunner T. (2009): TRAIL-induced apoptosis. Between tumor therapy and immunopathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1171**; 50-58
- Cosimi S., Orta L., Mateos S., Cortes F. (2009): The mycotoxin ochratoxin A inhibits DNA topoisomerase II and induces polyploidy in cultured CHO cells. *Toxicology in Vitro*, **23**; 1110-1115
- Cote J. und Ruiz-Carillo A. (1993): Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science*, **261**; 765-769
- Creppy E.E., Chakor K., Fisher M.J., Dirheimer G. (1990): The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and *in vivo*. *Archives of Toxicology*, **64**; 279-284

- Cretney E., Takeda K., Yagita H., Glaccum M., Peschon J.J., Smyth M.J. (2002): Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *The Journal of Immunology*, **168**; 1356-1361
- Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, **27**; 1-20
- Das P.M., Ramachandran K., van Wert J., Ferdinand L., Gopisetty G., Reis I.M., Singal R. (2006): Methylation mediated silencing of *TMS1/ASC* gene in prostate cancer. *Molecular Cancer*, doi:10.1186/1476-4598-5-28
- Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G. (2000): Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters*, **476**;118-123
- David K.K., Sasaki M., Yu S.-W., Dawson T.M., Dawson V.L. (2006): EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **13**; 1147-1155
- Davis J.W. Jr., Melendez K., Salas V.M., Lauer F.T., Burchiel S.W. (2000): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A. *Carcinogenesis*, **21**; 881-886
- Davis J.W. Jr., Lauer F.T., Burdick A.D., Hudson L.G., Burchiel S.W. (2001): Prevention of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the MCF-10A cell line: correlation with increased transforming growth factor α production. *Cancer Research*, **61**; 3314-3320
- Davis J.W. Jr., Burdick A.D., Lauer F.T., Burchiel S.W. (2003): The arylhydrocarbon receptor antagonist, 3'methoxy-4'nitroflavone, attenuates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-dependent regulation of growth factor signaling and apoptosis in the MCF-10A cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **188**; 42-49
- Denecker G., Ovaere P., Vandenabeele P., Declercq W. (2008): Caspase-14 reveals its secrets. *Journal of Cell Biology*, **180**; 451-458
- Deng J., Miller S.A., Wang H.-Y., Xia W., Wen Y., Zhou B.P., Li Y., Lin S.-Y., Hung M.-C. (2002): β -Catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*, **2**; 323-334
- Dere E., Boverhof D.R., Burgoon L.D., Zacharewski T.R. (2006): In vivo – in vitro toxicogenomic comparison of TCDD-elicited gene expression in Hepa1c1c7 mouse hepatoma cells and c57BL/6 hepatic tissue. *BMC Genomics*, doi:10.1186/1471-2164-7-80

- De Toni E.N., Thieme S.E., Herbst A., Behrens A., Stieber P., Jung A., Blum H., Göke B., Kolligs F.T. (2008): OPG is regulated by β -catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, **14**; 4713-4718
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) (2004): Schimmelpilzgifte (Mykotoxine) in Lebensmitteln. In: Ernährungsbericht 2004. DGE-Medienservice, Bonn
- Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Salvesen G.S., Reed J.C. (1998): IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*, **17**; 2215-2223
- Dragan Y.P., Bidlack W.R., Cohen S.M., Goldsworthy T.L., Hard G.C., Howard P.C., Riley R.T., Voss K.A. (2001): Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk Assessment: Fumonisin B1 as an example. *Toxicological Sciences*, **61**; 6-17
- Dunkern T.R. und Kaina B. (2002): Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese Hamster Cells. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 348-361
- El Golli Bennour E., Rodriguez-Enfedaque A., Bouzaziz C., Ladjimi M., Renaud F., Bacha H. (2008): Toxicities induced in cultured human hepatocarcinoma cells exposed to ochratoxin A: oxidative stress and apoptosis status. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **23**; 87-96
- Elizondo G., Fernandez-Salguero P., Sheikh M.S., Kim G.-Y., Fornace A.J., Lee K.S., Gonzalez F.J. (2000): Altered cell cycle control at the G₂/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Molecular Pharmacology*, **57**; 1056-1063
- Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **35**; 495-516
- European Food Safety Authority (EFSA) (2006): Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commissin related to ochratoxin A in food. *The EFSA Journal*, **365**; 1-56
- Enan E., El-Sabeawy F., Scott M., Overstreet J., Lasley B. (1998): Alterations in the growth factor signal transduction pathways and modulators of the cell cycle in endocervical cells from macaques exposed to TCDD. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **151**; 283-293
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**; 43-50

- Enns L., Murray D., Mirzayans R. (2000): Lack of correlation between DNA strand breakage and p53 protein levels in human fibroblast strains exposed to ultraviolet light. *Photochemistry and Photobiology*, **72**; 562-568
- Finnberg N., Klein-Szanto A.J.P., El-Deiry W.S. (2008): TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**; 111-123
- Fisher M.T., Nagakatti M., Nagarkatti P.S. (2004): Combined screening of thymocytes using apoptosis-specific cDNA array and promoter analysis yields novel gene targets mediating TCDD-induced toxicity. *Toxicological Sciences*, **78**; 116-124
- Fisher M.T., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2005): Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicology Letters*, **157**; 99-107
- Föllmann W. und Lucas S. (2003): Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Archives of Toxicology*, **77**; 298-304
- Fornace A.J. Jr., Zmudzka B., Hollander M.C., Wilson S.H. (1989): Induction of β -Polymerase mRNA by DNA-damaging agents in chinese hamster ovary cells. *Molecular and Cellular Biology*, **9**; 851-853
- Fortin A., Cregan S.P., MacLaurin J.G., Kushwaha N., Hickman E.S., Thompson C.S., Hakim A., Albert P.R., Cecconi F., Helin K., Park D.S., Slack R.S. (2001): APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neural cell death. *Journal of Cellular Biology*, **155**; 207-216
- Frueh F.W., Hayashibara K.C., Brown P.O., Whitlock J.P. Jr. (2001): Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression. *Toxicology Letters*, **122**; 189-203
- Fujii-Kuriyama Y. und Kawajiri K. (2010): Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proceedings of the Japan Academy, Ser.B*, **86**; 40-53
- Fukazawa T., Fujiwara T., Morimoto Y., Shao J., Nishizaki M., Kadowaki Y., Hizuta A., Owen-Schaub L.B., Roth J.A., Tanaka N. (1999): Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene*, **18**; 2189-2199

- Gagliano N., Doone I.D., Torri C., Migliori M., Grizzi F., Milzani A., Filippi C., Annoni G., Colombo P., Costa F., Ceva-Grimaldi G., Bertelli A.A., Giovannini L., Gioia M. (2006): Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology*, **225**; 214-224
- Gan X., Wang J., Xi Y., Wu Z., Li Y., Li L. (2008): Nuclear Dvl, c-Jun, β -catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of β -catenin-TCF interaction. *Journal of Cell Biology*, **180**; 1087-1100
- Geiger L.E. und Neal R.A. (1981): Mutagenicity testing of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **59**; 125-129
- Gekle M., Sauvant C., Schwerdt G. (2005): Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, **49**; 118-130
- Goebel W., Obermeyer N., Bleicher N., Kratzmeier M., Eibl H.-J., Doenecke D., Albig W. (2007): Apoptotic DNA fragmentation is not related to the phosphorylation state of histone H1. *Biological Chemistry*, **388**; 197-206
- Gonzales F.J. und Fernandez-Salguero P. (1998): The aryl hydrocarbon receptor - studies using AHR-null mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **26**; 1194-1198
- Gouedard C., Barouki R., Morel Y. (2004): Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, **24**; 5209-5222
- Halicka H.D., Huang X., Traganos F., King M.A., Dai W., Darzynkiewicz Z. (2005): Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B. *Cell Cycle*, **4**; 339-345
- Hanahan D. und Weinberg R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**; 57-70
- Hanasoge S. und Ljungman M. (2007): H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by ATR kinase. *Carcinogenesis*, **28**; 2298-2304
- Hanberg A., Hakansson H., Ahlborg U.G. (1989): "ED50" values for TCDD-induced reduction of body weight gain, liver enlargement, and thymic atrophy in Hartley guinea pigs, Sprague-Dawley rats, C57BL/6 mice, and Golden Syrian hamsters. *Chemosphere*, **19**; 813-816

- Hasegawa M., Imamura R., Kinoshita T., Matsumoto N., Masumoto J., Inohara N., Suda T. (2005): ASC-mediated NF- κ B activation leading to interleukin-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**; 15122-15130
- Hatano E. (2007): Tumor necrosis factor signaling in hepatocytes apoptosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **22**; S43-S44
- Hattis D., Chu M., Rahmioglu N., Goble R., Verma P., Hartman K., Kozlak M. (2009): A preliminary operational classification system for nonmutagenic modes of action for carcinogens. *Critical Reviews in Toxicology*, **39**; 97-138
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. (2003): Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science*, **116**; 4077-4085
- He T.C., Sparks A.B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L.T., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**; 1509-1512
- He B., Lee A.Y., Dadfarmay S., You L., Xu Z., Reguart N., Mazieres J., Mikami I., McCormick F., Jablons D.M. (2005): Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in β -catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Research*, **65**; 743-748
- Hebert C.D., Harris M.W., Elwell M.R., 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. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **102**; 362-377
- Helinek T.G., Devlin T.M., Ch'ih J.J. (1982): Initial inhibition and recovery of protein synthesis in cycloheximide-treated hepatocytes. *Biological Pharmacology*, **31**; 1219-1225
- Hengartner M.O. (2001): DNA destroyers. *Nature*, **412**; 27-29
- Herr I., Schemmer P., Büchler M.W. (2007): On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease. *Hepatology*, **46**; 266-274
- Heyer M.L., Samuel T., Reed J.C. (2006): The FLIP-Side of Fas Signaling. *Clinical Cancer Research*, **12**; 5929-5931

- Hockley S.L., Arlt V.M., Brewer D., te Poele R., Workman P., Giddings I., Phillips D.H. (2007): AhR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chemical Research in Toxicology*, **20**; 1797-1810
- Höffeler F. (2004): Chronik eines angekündigten Todes: Die Maschinerie der Apoptose. *Biologie in Unserer Zeit*, **34**; 16-23
- Hohlbaum A.M., Saff R.R., Marshak-Rothstein A. (2002): Fas-Ligand – Iron Fist or Achilles' Heel? *Clinical Immunology*, **103**; 1-6
- Hong N.A., Flannery M., Hsieh S.N., Cado D., Pedersen R., Winoto A. (2000): Mice lacking Dad1, the defender against apoptotic death-1, express abnormal N-linked glycoproteins and undergo increased embryonic apoptosis. *Developmental Biology*, **220**; 76-84
- Horvath A., Upham B.L., Ganey V., Trosko J.E. (2002): Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol*, **40**; 273-282
- Horvath L.G., Lelliott J.E., Kench J.G., Lee C.-S., Williams E.D., Saunders D.N., Grygiel J.J., Sutherland R.L., Henshall S.M. (2007): Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *The Prostate*, **67**; 1081-1090
- Hossain A., Tsuchiya S., Minegishi M., Osada M., Ikawa S., Tezuka F.-a., Kaji M., Konnos T., Watanabe M., Kikuchi H. (1998): The Ah receptor is not involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in human leukemic T cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**; 19853-19858
- Hu S., Vincenz C., Ni J., Gentz R., Dixit V.M. (1997): I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**; 17255-17257
- Hug H. (2000): Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit*, **30**; 128-135
- Hughes F.M. Jr., Bortner C.D., Purdy G.D., Cidlowski J.A. (1997): Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**; 30567-30576
- Humboldt-Universität Berlin. Homepage: edoc.hu-berlin.de (Zugriff am 4.12.2006): http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/miksa-michael-2004-03-26/HTML/Miksa_html_m809a45b.gif

- Hur J., Bell D.W., Dean K.L., Coser K.R., Hilario P.C., Okimoto R.A., Tobey E.M., Smith S.L., Isselbacher K.J., Shioda T. (2006): Regulation of expression of BIK proapoptotic protein in human breast cancer cells: p53-dependent induction of BIK mRNA by fulvestrant and proteosomal degradation of BIK protein. *Cancer Research*, **66**; 10153-10163
- Ihnatko R. und Kubes M. (2007): TNF signaling: early events and phosphorylation. *General Physiology and Biophysics*, **26**; 159-167
- Inouye K., Shinkyo R., Takita T., Ohta M., Sakaki T. (2002): Metabolism of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) by human cytochrome P450-dependent monooxygenase systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**; 5496-5502
- International Agency for Research on Cancer (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **56**
- International Agency for Research on Cancer (1997): Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **69**
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.-L., Schröter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, **388**; 190-195
- Ishida T., Naito E., Mutoh J., Takeda S., Ishii Y., Yamada H. (2005): The plant flavonoid, quercetin, reduces some forms of dioxin toxicity by mechanism distinct from aryl hydrocarbon receptor activation, heat-shock protein induction and quenching oxidative stress. *Journal of Health Sciences*, **51**; 410-417
- Ishihara Y. und Shimamoto N. (2006): Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**; 6726-6733
- Ito T., Tsukumo S.-i., Suzuki N., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Mimura J., Lin T.-M., Peterson R.E., Tohyama C., Nohara K. (2004): A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of Jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**; 25204-25210
- Ito K., Kiyosawa N., Kumagai K., Manabe S., Matsunuma N., Yamoto T. (2006): Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocytes apoptosis in rat liver by morphological and microarray analysis. *Toxicology*, **219**; 175-186

- Jackel M. C. (1998): Die genetische Kontrolle des programmierten Zelltod (Apoptose). *HNO*, **46**; 614-625
- Jen K.-Y. und Cheung V.G. (2005): Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Research*, **65**; 7666-7673
- Jennen D.G.J., Magkoufopoulou C., Ketelslegers H.B., van Herwijnen M.H.M., Kleinjans J.C.S., van Delft J.H.M. (2010): Comparison of HepG2 and HepaRG by whole genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological Sciences*, doi: 10.1093/toxsci/kfq026
- Jenuwein T. und Allis C.D. (2001): Translating the histone code. *Science*, **293**; 1074-1080
- Jiang P., Du W., Hesse K., Wu M. (2006): The bad guy cooperates with a good cop p53: bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, **26**; 9071-9082
- Johnston D.E. und Jasuja R. (1994): Purification of cultured primary rat hepatocytes using selection with ricin a subunit. *Hepatology*, **20**; 436-444
- Kalinowska M., Garncarz W., Pietrowska M., Garrard W.T., Widlak P. (2005): Regulation of the human apoptotic Dnase/Rnase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, **10**; 821-830
- Kalinowska-Herok M. und Widlak P. (2008): High mobility group proteins stimulate DNA cleavage by apoptotic nuclease DFF40/CAD due to HMG-box interactions with DNA. *Acta Biochimica Polonica*, **55**; 21-26
- Kamath A.B., Xu H., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. (1997): Evidence of induction of apoptosis in thymocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **142**; 367-377
- Kamath A.B., Camacho I., Nagarkatti P.S., Nagarkatti M. (1999): Role of Fas-Fas ligand interactions in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced immunotoxicity: increased resistance of thymocytes from fas-deficient (lpr) and fas ligand-defective (gld) mice to TCDD-induced toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **160**; 141-155
- Kamp H.G., Eisenbrand G., Janzowski C., Kiossev J., Latendresse J.R., Schlatter J., Turesky R.J. (2005a): Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, **49**; 1160-1167

- Kamp H.G., Eisenbrand G., Schlatter J., Würth K., Janzowski C. (2005b): Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*, **206**; 413-425
- Kannan K., Amariglio N., Rechavi G., Jakob-Hirsch J., Kela I., Kaminski N., Getz G., Domany E., Givol D. (2001): DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene*, **20**; 2225-2234
- Kawajiri K. und Fujii-Kuriyama Y. (2007): Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **464**; 207-212
- Kawiak A., Piosik J., Stasiłojc G., Gwizdek-Wisniewska A., Marczak L., Stobiecki M., Bigda J., Lojkowska E. (2007): Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **223**; 267-276
- Kelleher D.J. und Gilmore R. (1997): DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **94**; 4994-4999
- Kennedy S.G., Kandel E.S., Cross T.K., Hay N. (1999): Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, **19**; 5800-5810
- Kern P.A., Dicker-Brown A., Said S.T., Kennedy R., Fonseca V.A. (2002): The stimulation of tumor necrosis factor and inhibition of glucose transport and lipoprotein lipase in adipose cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Metabolism*, **51**; 65-68
- Kim D.W., Gazourian L., Quadri S.A., Romieu-Mourez R., Sherr D.H., Sonenshein G.E. (2000): The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the *c-myc* promoter in mammary cells. *Oncogene*, **19**; 5498-5506
- Kim B.-E., Lee Y.-H., Seong C., Shin S.Y., Lee J.S., Cho B.Y., Park I.-S. (2005): Salt is necessary for nucleosomal DNA fragmentation induced by caspase. *Biotechnology Letters*, **27**; 1935-1942
- Kim S.-H., Henry E.C., Kim D.-K., Kim Y.-H., Shin K.J., Han M.S., Lee T.G., Kang J.-K., Gasiewicz T.A., Ryu S.h., Suh P.-G. (2006a): Novel compound, CH-223191, prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology*, **69**; 1871-1878
- Kim S.-H., Ricci M.S., El-Deiry W.S. (2008): Mcl-1: a gateway to TRAIL sensitization. *Cancer Research*, **68**; 2062-2064

- Kim S., Dere E., Burgoon L.D., Chang C.-C., Zacharewski T.R. (2009): Comparative analysis of AhR-mediated TCDD-elicited gene expression in human liver adult stem cells. *Toxicological Sciences*, **112**; 229-244
- Kim Y.H., Girard L., Giacomini C.P., Wang P., Hernandez-Boussard T., Tibshirani R., Minna J.D., Pollack J.R. (2006b): Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene*, **25**; 130-138
- Kinehara M., Fukuda I., Yoshida K.-i., Ashida H. (2008): High-throughput evaluation of aryl hydrocarbon receptor-binding sites via chromatin immunoprecipitation-based screening in Hepa-1c1c7 cells stimulated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Genes & Genetic Systems*, **83**; 455-468
- Knerr S. (2006): Bedeutung von Arylhydrocarbon Rezeptor regulierten Phase I Enzymen für die Kanzerogenität von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation
- Knerr S. und Schrenk D. (2006): Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in experimental models. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**; 897-907
- Kobayashi D., Ahmed S., Ishida M., Kasai S., Kikushi H. (2009): Calcium/calmodulin signaling elicits release of cytochrome c during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced apoptosis in the human lymphoblastic T-cell line, L-MAT. *Toxicology*, **258**; 25-32
- 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., Humiston C.G. (1978): Results of a two-year clinic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **46**; 279-303
- Koolman J. und Röhm K.-H. (2003) Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag
- Kopec A.K., Boverhof D.R., Burgoon L.D., Ibrahim-Aibo D., Harkema J.R., Tashiro C., Chittim B., Zacharewski T.R. (2008): Comparative toxicogenomic examination of the hepatic effects of PCB126 and TCDD in immature, ovariectomized C57BL/6 mice. *Toxicological sciences*, **102**; 61-75
- Kratzmeier M., Albig W., Hänecke K., Doenecke D. (2000): Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**; 30478-30486

- Kulke M.H., Freed E., Chiang D.Y., Phillips J., Zahrieh D., Glickman J.N., Shivdasani R.A. (2008): High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Gene, Chromosomes & Cancer*, **47**; 591-603
- Kulms D. und Schwarz T. (2002): Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, **64**; 837-841
- Kumagai K., Ando Y., Kiyosawa N., Ito K., Kawai R., Yamoto T., Manabe S., Teranishi M. (2006): Toxicoproteomic investigation of the molecular mechanism of cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis in rat liver. *Toxicology*, **228**; 299-309
- Kuo M.-L., Chuang S.-E., Lin M.-T., Yang S.-Y. (2001): The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene*, **20**; 677-685
- Kurachi M., Hashimoto S.-i., Obata A., Nagai S., Nagahata T., Inadera H., Sone H., Tohayama C., Kaneko S., Kobayashi K.-i., Matsushima K. (2002): Identification of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **292**; 368-377
- Kuribayashi K., Kringsfeld G., Wang W., Xu J., Mayes P.A., Dicker D.T., Wu G.S., El-Deiry W.S. (2008): TNFSF10 (TRAIL), a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biology & Therapy*, **7**; 2034-2038
- Latonen L., Taya Y., Laiho M. (2001): UV-irradiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene*, **20**; 6784-6793
- Laudet V. und Gronemeyer H. (2002), *The Nuclear Receptor FactsBook*, Academic Press, London
- Le Gouill S., Podar K., Harousseau J.-L., Anderson K.C. (2004): Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle*, **3**; 1259-1262
- Lemaire C., Andreau K., Souvannavong V., Adam A. (1999): Specific dual effects of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/Caspase-3. *Biochemical Pharmacology*, **58**; 85-93
- Levkau B., Scatena M., Giachelli C.M., Ross R., Raines E.W. (1999): Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF- κ B loop. *Nature Cell Biology*, **1**; 227-233
- Li Y.Y. und Li X.M. (2000): The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research*, **10**; 169-177

- Liu Q.-L., Kishi H., Ohtsuka K., Muraguchi A. (2003): Heat shock protein 70 binds caspase-activated DNase and enhances its activity in TCR-stimulated T cells. *Blood*, **102**; 1788-1796
- Liu X., Zou H., Widlak P., Garrard W., Wang X. (1999): Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or Nuclease). *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 13836-13840
- Liu Z.-g. (2005): Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Research*, **15**; 24-27
- Lorenzo, H.K. und Susin, S.A. (2007): Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resistance Updates*, **10**; 235-255
- Lowe S.W. und Lin A.W. (2000): Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**; 485-495
- Lu C., Zhu F., Cho Y.-Y., Tang F., Zykova T., Ma W.-y., Bode A.M., Dong Z. (2006): Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Molecular Cell*, **23**; 121-132
- Lucier G.W., Tritscher A., Goldsworthy T., Foley J., Clark G., Goldstein J., Maronpot R. (1991): Ovarian hormones enhance 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated increase in cell proliferation and preneoplastic foci in a two-stage model for rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Research*, **51**, 1391-1397
- Ma Q., Baldwin K.T., Renzelli A.J., McDaniel A., Dong L. (2001): TCDD-inducible Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **289**; 499-506
- Ma Q. (2002): Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible poly (ADP-ribose) polymerase: role of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **404**; 309-316
- Maganga R., Giles N., Adcroft K., Unni A., Keeney D., Wood, F., Fear M., Dharmarajan A. (2008): Secreted frizzled related protein-4 (sFRP4) promotes epidermal differentiation and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **377**; 606-611
- Mally A., Decker M., Bekteshi M., Dekant W. (2006): Ochratoxin A alters cell adhesion and gap junction intercellular communication in MDCK cells. *Toxicology*, **223**; 15-25
- Mally A. und Dekant W. (2009): Mycotoxins and the kidney: modes of action for renal tumor formation by ochratoxin A in rodents. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**; 467-478

- Makishima T., Yoshimi M., Komiyama S., Hara N., Nishimoto T. (2000): A subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase, DAD1, interacts with Mcl-1, one of the Bcl-2 protein family. *Journal of Biochemistry*, **128**; 399-405
- Mann B., Gelos M., Siedow A., Hanski M.L., Gratchev A., Ilyas M., Bodmer W.F., Moyer M.P., Riecken E.O., Buhr H.J., Hanski C. (1999): Target genes of β -catenin-T cell factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **96**; 1603-1608
- Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., Bezencon C., Piguet D., Mansourian R., Holzwarth J., Grigrov M., Delatour T., Mantle P., Cavin C., Schilter B. (2008): A toxigenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin A carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences*, **89**; 120-134
- Marlowe J.L., Fan Y., Chang X., Peng L., Knudsen E.S., Xia Y., Puga A. (2008): The aryl hydrocarbon receptor binds E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, **19**; 3263-3271
- Marlowe J.L. und Puga A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, **96**; 1174-1184
- Marti T.M., Hefner E., Feeney L., Natale V., Cleaver J.E. (2006): H2AX phosphorylation within the G₁ phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **103**; 9891-9896
- Marquardt H. und Schäfer S. (2004), Lehrbuch der Toxikologie, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Mathew L.K., Simonich M.T., Tanguay R.L. (2009): Ahr-dependent misregulation of wnt signaling disrupts tissue regeneration. *Biochemical Pharmacology*, **77**; 498-507
- Matthews J., Wihlen B., Thomsen J., Gustafsson J.-A. (2005): Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor α to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive promoters. *Molecular and Cellular Biology*, **25**; 5317-5328
- Matsumura F. (2009): The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochemical Pharmacology*, **77**; 608-626
- Mattson M.P. und Furukawa K. (1997): Anti-apoptotic actions of cycloheximide: blockade of programmed cell death or induction of programmed cell life? *Apoptosis*, **2**; 257-264

- McGregor D.B., Partensky C., Wilbourn J., Rice J.M. (1998): An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**; 755-760
- McKay B.C., Stubbert L.J., Fowler C.C., Smith J.M., Cardamore R.A., Spronck J.C. (2004): Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **101**; 6582-6586
- McMilian M.K., Li L., Parker J.B., Patel L., Zhong Z., Gunnett J.W., Powers W.J., Johnson M.D. (2002): An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology*, **18**; 157-173
- Mege J.-L., Meghari S., Honstetter A., Capo C., Raoult D. (2006): The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, **6**; 557-569
- Meiss G., Scholz R.S., Korn C., Gimadutdinow O., Pingoud A. (2001): Identification of functionally relevant histidine residues in the apoptotic nuclease CAD. *Nucleic Acids Research*, **29**; 3901-3902
- Micheau O., Lens S., Gaide O., Alevizopoulos K., Tschopp J. (2001): NF- κ B signals induce the expression of c-flip. *Molecular and Cellular Biology*, **21**; 5299-5305
- Mocellin S., Marincola F.M., Young H.A. (2005): Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of Leukocyte Biology*, **78**; 1043-1051
- Moll U.M. und Petrenko O. (2003): The MDM2-p53 interaction. *Molecular Cancer Research*, **1**; 1001-1008
- Modjtahedi N., Giordanetto F., Madeo F., Kroemer G. (2006): Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *TRENDS in Cell Biology*, **16**; 264-272
- Mukherjee B., Kessinger C., Kobayashi J., Chen B.P.C., Chen D.J., Chatterjee A., Burma S. (2006): DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, **5**; 575-590
- Nakashima T., Sekiguchi T., Kuraoka A., Fukushima K., Shibata Y., Komiyama S., Nishimoto T. (1993): Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology*, **13**; 6367-6374

- Nam S.Y., Jung G.-A., Hur G.-C., Chung H.-Y., Kim W.H., Seol D.-W., Lee B.L. (2003): Upregulation of FLIP_s by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Science*, **94**; 1066-1073
- National Toxicology Program, Technical Report Series No. 209 (1982): NTP technical report on the carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel rats and B6C3F₁ mice (gavage study). NIH Publication No. 82-1765
- National Toxicology Program, Technical Report Series No. 521 (2005a): NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in female Harlan Sprague-Dawley rats (gavage studies). NIH Publication No. 06-4468
- National Toxicology Program. 11th Report on carcinogens, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD); "Dioxin". 2005b
- National Toxicology Program. 11th Report on carcinogens, ochratoxin A. 2005c
- Nelson W.G. und Kastan M.B. (1994): DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and Cellular Biology*, **14**; 185-1823
- Nishii K., Tsuzuki T., Kumai M., Takeda N., Koga H., Aizawa S., Nishimoto T., Shibata Y. (1999): Abnormalities of developmental cell death in Dad1-deficient mice. *Genes to Cells*, **4**; 243-252
- Novo E., Marra F., Zamara E., Valfre di Bonzo L., Monitillo L., Cannito S., Petrai I., Mazzocca A., Bonacchi A., De Franco R.S.M., Colombatto S., Autelli R., Pinzani M., Parola M. (2006): Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut*, **55**; 1174-1182
- O'Brian J., Wilson I., Orton T., Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, **267**; 5421-5426
- Obrig T.G., Culp W.J., McKeehan W.L., Hardesty B. (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **246**; 174-181
- Oesch-Bartlomowicz B., Huelster A., Wiss O., Antoniou-Lipfert P., Dietrich C., Arand M., Weiss C., Bockamp O., Oesch F. (2005): Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **102**; 9218-9223

- Ohtsuka T., Liu X.F., Koga Y., Kitajima Y., Nakafusa Y., Ha C.W., Lee S.W., Miyazaki K. (2006): Methylation-induced silencing of ASC and the effect of expressed ASC on p53-mediated chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncogene*, **25**; 1807-1811
- Olsson A., Strasser A., Villunger A. (2007): How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression. *Cell Death and Differentiation*, **14**; 1561-1575
- Oren M., Damalas A., Gottlieb T., Michael D., Taplick J., Martinez Leal J.F., Maya R., Moas M., Seger R., Taya Y., Ben-Ze'ev A. (2002): Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Biochemical Pharmacology*, **64**; 865-871
- Pääjarvi G., Viluksela M., Pohjanvirta R., Stenius U., Högberg J. (2005): TCDD activates mdm2 and attenuates the p53 response to DNA damaging agents. *Carcinogenesis*, **26**; 201-208
- Parrish J.Z., Yang C., Shen B., Xue D. (2003): CRN-1, a *Caenorhabditis elegans* FEN-1 homologue, cooperates with CPS-6/EndoG to promote apoptotic DNA degradation. *The EMBO Journal*, **22**; 3451-3460
- 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
- Pastorelli R., Carpi D., Campagna R., Airoidi L., Pohjanvirta R., Viluksela M., Hakansson H., Boutros P.C., Moffat I.D., Okey A.B., Fanelli R. (2006): Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance. *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**; 882.894
- Patel N.M., Nozaki S., Shortle N.H., Bhat-Nakshatri P., Newton T.R., Rice S., Gelfanov V., Boswell S.H., Goulet R.J. Jr., Sledge G.W. Jr., Nakshatri H. (2000): Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- κ B is enhanced by I κ B α super-repressor and parthenolide. *Oncogene*, **19**; 4159-4169
- Perez G.I., Maravei D.V., Trbovich A.M., Cidlowski J.A., Tilly J.L., Hughes F.M. Jr. (2000): Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, **63**; 1358-1369
- Pesatori A.C., Consonni D., Rubagotti M., Grillo P., Bertazzi P.A. (2009): Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident": twenty years of follow-up. *Environmental Health*, doi:10.1186/1476-069X-8-39

- Petraik J., Zanic-Grubisic T., Barisic K., Pepeljnjak S., Radic B., Ferencic Z., Cepelak I. (2003): Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology*, **77**; 685-693
- Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**; 2002-2007
- Pfaffl M.W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, **10**; 92-95
- Pinti M., Biswas P., Troiano L., Nasi M., Ferraresi R., Mussini C., Vecchiet J., Esposito R., Paganelli R., Cossarizza A. (2003): Different sensitivity to apoptosis in cells of monocytic or lymphocytic origin chronically infected with human immunodeficiency virus type-1. *Experimental Biology and Medicine*, **228**; 1346-1354
- Pitkänen K., Haapajarvi T., Laiho M. (1998): U.V.C.-induction of p53 activation and accumulation is dependent on cell cycle and pathways involving protein synthesis and phosphorylation. *Oncogene*, **16**; 459-469
- Pitot H.C., Goldsworthy T., Campbell H.A., Poland A. (1980): Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Research*, **40**; 3616-320
- Poland A. und Glover E. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, **251**; 4936-4946
- 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. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, **22**; 517-554
- Puga A., Maier A., Medvedovic M. (2000a): The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology*, **60**; 1129-1142
- Puga A., Barnes S.J., Chang C., Zhu H., Nephew K.P., Khan S.A., Shertzer H.G. (2000b): Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor- κ B by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochemical Pharmacology*, **59**; 997-1005
- Qian H., Wang T., Naumovski L., Lopez C.D., Brachmann R.K. (2002): Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene*, **21**; 7901-7911

- Rached E., Pfeiffer E., Dekant W., Mally A. (2006): Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics? *Toxicological Sciences*, **92**; 78-86
- Rasola A., Far D.F., Hofman P., Rossi B. (1999): Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl⁻ efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB Journal*, **13**; 1711-1723
- Ray P.S., Grover R., Das S. (2006): Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Reports*, **7**; 404-410
- Ray S. und Swanson H.I. (2009): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: A tumor promoting event? *Biochemical Pharmacology*, **77**; 681-688
- Reed J. C. (1998): Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, **17**; 3225-3236
- Reiners J.J. und Cliff R.E. (1999): Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 2502-2510
- Ringot D., Chango A., Schneider Y.-J., Larondelle Y. (2006): Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, **159**; 18-46
- Riojas M.A., Guo M., Glöckner S.C., Machida E.O., Baylin S.B., Ahuja N. (2007): Methylation-induced silencing of ASC/TMS1, a pro-apoptotic gene, is a late-stage event in colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **6**; 1710-1716
- Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M. (2000): Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**; 9390-9395
- Roos W.P. und Kaina B. (2006): DNA damage-induced cell death by apoptosis. *TRENDS in Molecular Medicine*, **12**; 440-450
- Ruby C.E., Leid M., Kerkvliet N.I. (2002): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses tumor necrosis factor- α and anti-CD-40-induced activation of NF- κ B/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected. *Molecular Pharmacology*, **62**; 722-728
- Ruiz-Carillo A. und Renaud J. (1987): Endonuclease G: a (dG)_n X (dC)_n-specific DNase from higher eukaryotes. *EMBO Journal*, **6**; 401-407
- Safe S. (2001): Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, **120**; 1-7

- Sakahira H., Enari M., Nagata S. (1999): Functional differences of two forms of the inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD-L, and ICAD-S. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 15740-15744
- Sakar A., Duncan M., Hart J., Hertlein E., Guttridge D.C., Wewers M.D. (2006): ASC directs NF- κ B activation by regulating receptor interacting protein-2 (RIP) caspase-1 interactions. *The Journal of Immunology*, **176**; 4979-4986
- Samejima K. und Earnshaw W.C. (2005): Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, **6**; 677-688
- Santostefano M., Merchant M., Arellano L., Morrison V., Denison M.S., Safe S. (1993): Alpha-Naphthoflavone-induced CYP1A1 gene expression and cytosolic aryl hydrocarbon receptor transformation. *Molecular Pharmacology*, **43**; 200-206
- Sarioglu H., Brandner S., Jacobsen C., Meindl T., Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F., Andrae U. (2006): Quantitative analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced proteome alterations in 5L rat hepatoma cells using isotope-coded protein labels. *Proteomics*, **6**; 2407-2421
- Sax J.K., Fei P., Murphy M.E., Bernhard E., Korsmeyer S.J., El-Deiry W.S. (2002): BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nature Cell Biology*, **4**; 842-849
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E. (1998): Two CD95 (APO-1/FAS) signaling pathways. *EMBO Journal*, **17**; 1675-1687
- Schaaf G.J., Nijmeijer S.M., Maas R.F.M., Roestenberg P., de Groene E.M., Fink-Gremmels J. (2002): The role of oxidative stress in ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1588**; 149-158
- Schrenk D., Karger A., Lipp H.P., 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., Buchmann A., Dietz K., Lipp H.-P., Brunner H., Sirma H., Münzel P., Hagenmaier H., Gebhardt R., 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., Müller M., Merlino G., Thorgeirsson S.S. (1997): Interactions of TCDD with signal transduction and neoplastic development in c-myc transgenic and TGF- α transgenic mice. *Archives of Toxicology Supplement*, **19**; 367-375

- Schrenk D., Kunz S., Schmitz H.-J. (2004): Modulation of caspase-3-activation by liver tumor promoters in primary rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **197**; 374
- Schwarz M., Buchmann A., Stinchcombe S., Kalkuhl A., Bock K.-W. (2000): Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells. *Toxicology Letters*, **112-113**; 69-77
- Scoltock A.B. und Cidlowski J.A. (2004): Activation of intrinsic and extrinsic pathways in apoptotic signaling during UV-C-induced death of Jurkat cells: the role of caspase inhibition. *Experimental Cell Research*, **297**; 212-223
- Seglen P.O. (1972): Preparation of rat liver cells. *Experimental Cell Research*, **74**; 450-454
- Shen D., Dalton T.P., Nebert D.W., Shertzer H.G. (2005): Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**; 25305-25312
- Shiohara M., Taniguchi S., Masumoto J., Yasui K., Koike K., Komiyama A., Sagara J. (2002): ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **293**; 1314-1318
- Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestel R., Ben-Ze'ev A. (1999): The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **96**; 5522-5527
- Sikora E., Bielak-Zmijewska, Magalska A., Piwocka K., Mosieniak G., Kalinowska M., Widlak P., Cymerman I.A., Bujnicki J.M. (2006): Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated Dnase endonuclease in human Jurkat cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5**; 927-934
- Simon T., Aylward L.L., Kirman C.R., Rowlands J.C., Budinsky R.A. (2009): Estimates of cancer potency of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo(p)dioxin using linear and nonlinear dose-response modelling and toxicokinetics. *Toxicological Sciences*, **112**; 490-506
- Singh N.P., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2007): Role of dioxin response element and nuclear factor- κ B motifs in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated regulation of Fas and Fas ligand expression. *Molecular Pharmacology*, **71**; 145-157
- Singh N.P., Nagarkatti M., Nagarkatti P. (2008): Primary peripheral T cells become susceptible to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in vitro upon activation and in the presence of dendritic cells. *Molecular Pharmacology*, **73**; 1722-1735

- Staszewski O., Nikolova T., Kaina B. (2008): Kinetics of γ -H2AX focus formation upon treatment of cells with UV light and alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **49**; 734-740
- Stinchcombe S., Buchmann A., Bock K.W., Schwarz M. (1995): Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis*, **16**; 1271-1275
- Sugimoto A., Hozak R.R., Nakashima T., Nishimoto T., Rothman J.H. (1995): dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *The EMBO Journal*, **14**; 4434-4441
- Sun Y.V., Boverhof D.R., Burgoon L.D., Fielden M.R., Zacharewski T.R. (2004): Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Research*, **32**; 4512-4523
- Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Constantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prevost M.-C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C., Kroemer G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, **192**; 571-579
- Takagi H., Sasaki S., Suzuki H., Toyota M., Maruyama R., Nojima M., Yamamoto H., Omata M., Tokino T., Imai K., Shinomura Y. (2008): Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, **43**; 378-389
- Takasawa R., Nakamura H., Mori T., Tanuma S. (2005): Differential apoptotic pathways in human keratinocyte HaCaT cells exposed to UVB and UVC. *Apoptosis*, **10**; 1121-1130
- Takimoto R. und El-Deiry W.S. (2000): Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, **19**; 1735-1743
- Tanaka K., Kondoh N., Shuda M., Matsubara O., Imazeki N., Ryo A., Wakatsuki T., Hada A., Goseki N., Igari T., Hatsuse K., Aihara T., Horiuchi S., Yamamoto N., Yamamoto M. (2001): Enhanced expression of mRNAs of antiselectory factor-1, gp96, DAD1 and CDC34 in human hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1536**; 1-12
- Tang D. und Kidd V.J. (1998): Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**; 28549-28552
- Taniguchi S. und Sagara J. (2007): Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Seminars in Immunopathology*, **29**; 231-238

- Taylor M.J., Lucier G.W., Mahler J.F., Thompson M., Lockhart A.C., Clark G.C. (1992): Inhibition of acute TCDD toxicity by treatment with anti-tumor necrosis factor antibody or dexamethasone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **117**; 126-132
- Temme C., Weissbach R., Lilie H., Wilson C., Meinhart A., Meyer S., Golbik R., Schierhorn A., Wahle E. (2009): The *Drosophila melanogaster* gene CG4930 encodes a high affinity inhibitor for endonuclease G. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**; 8337-8348
- Thornton A.S., Oda Y., Stuart G.R., Glickman B.W., de Boer J.G. (2001): Mutagenicity of TCDD in Big Blue transgenic rats. *Mutation Research*, **478**; 45-50
- Tian Y., Ke S., Denison M.S., Rabson A.B., Gallo M.A. (1999): Ah receptor and NF- κ B interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**; 510-515
- Tian Y., Rabson A.B., Gallo M.A. (2002): Ah receptor and NF- κ B interactions: mechanisms and physiological implications. *Chemico-Biological Interactions*, **141**; 97-115
- Tijet N., Boutros P.C., Moffat I.D., Okey A.B., Toumisto J., Pohjanvirta R. (2006): Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Molecular Pharmacology*, **69**; 140-153
- Triscioglio L. und Bianchi M.E. (2009): Several nuclear events during apoptosis depend on caspase-3 activation but do not constitute a common pathway. *PLoS One*, **4**; e6234
- Tritscher A.M., Seacat A.M., Yager J.D., Groopman J.D., Miller B.D., Bell D., Sutter T.R., Lucier G.W. (1996): Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Letters*, **98**; 219-225
- Turesky R.J. (2005): Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*, **18**; 1082-1090
- Van den Berg M., Peterson R.E., Schrenk D. (2000): Human risk assessment and TEFs. *Food Additives and Contaminants*, **17**; 347-358
- Van der Heyden M.A.G., Rook M.B., Hermans M.M.P., Rijkse G., Boonstra J., Defize L.H.K., Destree O.H.J. (1998): Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *Journal of Cell Science*, **111**; 1741-1749
- Van Loo G., Saelens X., Van Gurp M., MacFarlane M., Martin S.J., Vandenabeele P. (2002): The role of mitochondrial factors in apoptosis: a russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, **9**; 1031-1042

- Van Miller J.P., Lalich J.J., Allen J.R. (1977): Increased incidence of neoplasms in rats exposed to low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere*, **9**; 537-544
- Vaughan A.T.M., Betti C.J., Villalobos M.J. (2002): Surviving apoptosis. *Apoptosis*, **7**; 173-177
- Vaughan A.T., Betti C.J., Villalobos M.J., Premkumar K., Cline E., Jiang Q., Diaz M.O. (2005): Surviving apoptosis: a possible mechanism of benzene-induced leukemia. *Chemico-Biological Interactions*, **153-154**; 179-185
- Virag L. und Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological Reviews*, **54**; 375-429
- Vogel C. und Abel J. (1995): Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line MCF-7. *Archives of Toxicology*, **69**; 259-265
- Vogel C.F.A., Li W., Sciuillo E., Newman J., Hammock B., Reader J.R., Tuscani J., Matsumura F. (2007): Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression. *The American Journal of Pathology*, **171**; 1538-1548
- Vogel C.F. und Matsumura F. (2009): A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF- κ B family. *Biochemical Pharmacology*, **77**; 734-745
- Wajant, H. (2002): The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, **269**; 1635-1636
- Wang C.-Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., Goeddel D.V., Baldwin A.S. Jr. (1998): NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**; 1680-1683
- Wang L., Wu Q., Qui P., Mirza A., McGuirk M., Kirschmeier P., Greene J.R., Wang Y., Pickett C.B., Liu S. (2001): Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatics and microarray approaches. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**; 43604-43610
- Wang L., Du F., Wang X. (2008): TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, **133**; 693-703
- Waring P., Khan T., Sjaarda A. (1997): Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**; 17929-17936

- Weiss C., Faust D., Dürk H., Kolluri S.K., Pelzer A., Schneider S., Dietrich C., Oesch F., Göttlicher M. (2005): TCDD induces *c-jun* expression via a novel Ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway. *Oncogene*, **24**; 4975-4983
- Weiss C., Faust D., Schreck I., Ruff A., Farwerck T., Melenberg A., Schneider S., Oesch-Bartlomowicz B., Zatloukalova J., Vondracek J., Oesch F., Dietrich C. (2008): TCDD deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via Ah receptor, junD and cyclin A. *Oncogene*, **27**; 2198-2207
- Wejheden C., Brunnberg S., Larsson S., Lind P.M., Andersson G., Hanberg A. (2010): Transgenic mice with a constitutively active aryl hydrocarbon receptor display a gender-specific bone phenotype. *Toxicological Sciences*, **114**; 48-58
- West J.D., Ji C., Marnett L.J. (2005): Modulation of DNA fragmentation factor 40 nuclease activity by poly(ADP-ribose) Polymerase 1. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**; 15141-15147
- Whitlock J.P. Jr., Okino S.T., Dong I., Ko H.P., Clarke-Katzenberg R., Ma Q., Li H. (1996): Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **10**; 809-818
- Widlak P. (2000): The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochimica Polonica*, **47**; 1037-1044
- Widlak P., Li P., Wang X., Garrard W.T. (2000): Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase of nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**; 8226-8232
- Widlak P. und Garrard W.T. (2001): Ionic and cofactor requirements for the activity of the apoptotic endonuclease DFF40/CAD. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **218**; 125-130
- Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T. (2001): Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**; 48404-48409
- Widlak P. und Garrard W.T. (2005): Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry*, **94**; 1078-1087
- Widlak P. und Garrard W.T. (2006): The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyions. *Apoptosis*, **11**; 1331-1337
- WHO Consultation (25.-29.05.1998, Genf, Schweiz): Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI)

- Wong P.S., Li W., Vogel C.F., Matsumura F. (2009): Characterization of MCF mammary epithelial cells overexpressing the arylhydrocarbon receptor (AhR). *BMC Cancer*, 234 doi: 10.1186/1471-2407-9-234
- 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 β 1. *Cancer Research*, **56**; 1272-1278
- Wörner W. und Schrenk D. (1998): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses apoptosis and leads to hyperphosphorylation of p53 in rat hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **6**; 239-247
- Wu C.-H., Chen H.-L., Su H.J., Lee C.-C., Shen K.-T., Ho W.-L., Ho S.-Y., Ho Y.-S., Wang Y.-J. (2004): The topical application of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin lacks skin tumor-promoting potency but induces hepatic injury and tumor necrosis factor- α expression in ICR male mice. *Food and Chemical Toxicology*, **42**; 1217-1225
- Wu S.-L., Li C.-C., Chen J.-C., Chen Y.-J., Lin C.-T., Ho T.-Y., Hsiang C.-H. (2009): Mutagenesis identifies the critical amino acid residues of human endonuclease G involved in catalysis, magnesium coordination, and substrate specificity. *Journal of Biomedical Sciences*, doi:10.1186/1423-0127-16-6
- Yakovlev A.G., Di Giovanni S., Wang G., Liu W., Stoica B., Faden A.I. (2004): BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**; 28367-28374
- Yan B., Wang H., Peng Y., Hu Y., Wang H., Zhang X., Chen Q., Bedford J.S., Dewhirst M.W., Li C.-Y. (2006a): A unique role of the DNA fragmentation factor in maintaining genomic stability. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **103**; 1504-1509
- Yan B., Wang H., Wang H., Zhuo D., Li F., Kon T., Dewhirst M., Li C.-Y. (2006b): Apoptotic DNA fragmentation factor maintains chromosome stability in a p53-independent manner. *Oncogene*, **25**; 5370-5376
- Yan B., Wang H., Xie D., Wakamatsu N., Anscher M.S., Dewhirst M.W., Mitchel R.E.J., Chen B.J., Li C.-Y. (2009): Increased skin carcinogenesis in caspase-activated Dnase knockout mice. *Carcinogenesis*, **30**; 1776-1780
- Yang J.-H., Vogel C., Abel J. (1999): A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exhibits altered expressions of growth regulatory factors. *Carcinogenesis*, **20**; 13-18

- Yang D.-Q., Halaby M.-J., Zhang Y. (2006): The identification of an internal ribosome entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene*, **25**; 4613-4619
- Yang C., Kaushal V., Haun R.S., Seth R., Shah S.V., Kaushal G.P. (2008): Transcriptional activation of caspase-6 and -7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity. *Cell Death and Differentiation*, **15**; 530-544
- Yu S.-W., Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. (2006): Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **103**; 18314-18319
- Zauli G., Melloni E., Capitani S., Secchiero P. (2009): Role of full length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**; 841-851
- Zerafa N., Westwood J.A., Cretney E., Mitchell S., Waring P., Iezzi M., Smyth M.J. (2005): Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates haematological malignancies. *The Journal of Immunology*, **175**; 5586-5590
- Zerlin M., Julius M.A., Kitajewski J. (2008): Wnt/Frizzled signaling in angiogenesis. *Angiogenesis*, **11**; 63-69
- Zeytun A., McKallip R.J., Fisher M., Camacho I., Nagarkatti M., 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
- Zhang C., Li H., Zhou G., Zhang Q., Zhang T., Li J., Zhang J., Hou J., Liew C.T., Yin D. (2007): Transcriptional silencing of the *TMSI/ASC* tumour suppressor gene by an epigenetic mechanism in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Pathology*, **212**; 134-142
- Zhang T., Otevrel T., Gao Z., Ehrlich S.M., Fields J.Z., Boman B.M. (2001): Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Research*, **62**; 8664-8667
- Zhang X., Boesch-Saadatmandi C., Lou Y., Wolffram S., Huebbe P., Rimbach G. (2009): Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes & Nutrition*, **4**; 41-48

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht worden:

Originalpublikationen

Chopra M., Dharmarajan A.M., Meiss G., Schrenk D. (2009): Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicological Sciences*, **111 (1)**; 49-63, doi: 10.1093/toxsci/kfp128

Chopra M., Link P., Michels C., Schrenk D. (2009): Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology*, doi: 10.1007/s10565-009-9131-0

Chopra M., Gähns M., Haben M., Michels C., Schrenk D. (2010): Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin depends on protein biosynthesis. *Cell Biology and Toxicology*, doi: 10.1007/s10565-010-9151-9

Vorträge

Chopra M., Meiss G., Dharmarajan A.M., Schrenk D.: Inhibition of apoptotic DNA-fragmentation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, 13. - 16. September 2009, Dresden, Deutschland. *Toxicology Letters*, **189S**; S97, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.06.317

Posterbeiträge

Chopra M., Knerr S., Groß M., Kamyschnikow A., Schrenk D.: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) has no Effect on the Expression of Bcl-xL in Primary Rat Hepatocytes. 25 Jahre Lebensmittelchemie & Toxikologie an der TU Kaiserslautern, Symposium "Cornerstones of Life Sciences in Chemistry", 28. September 2007, Kaiserslautern, Deutschland

Chopra M., Knerr S., Groß M., Kamyschnikow A., Schrenk D.: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the expression of apoptosis-related genes in primary rat hepatocytes. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11. - 13. März 2008, Mainz, Deutschland. *Archives of Pharmacology*, **377S**; 78-79.

Chopra M., Knerr S., Schrenk D.: Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the Expression of Apoptosis-Related Genes in Mouse Liver and Primary Rat Hepatocytes. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 17. - 20. März 2008, Seattle, USA USA. *The Toxicologist*, Supplement to *Toxicological Sciences*, **102S**; 251.

Chopra M., Schrenk D.: Charakterisierung der Ochratoxin-A-induzierten Apoptose in primären Rattenhepatozyten. 37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 8. - 10. September 2008, Kaiserslautern, Deutschland., *Lebensmittelchemie*, **63** (2009); 99.

Chopra M., Meiss G., Schrenk D.: Inhibition of apoptosis in primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 48th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 15. - 19. März 2009, Baltimore, USA. *The Toxicologist*, Supplement to *Toxicological Sciences*, **108S**; 61-62.

Chopra M., Meiss G., Dharmrajan A.M., Schrenk D.: Inhibition of apoptotic DNA-fragmentation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 46th Congress of the European Societies of Toxicology, 13. – 16. September 2009, Dresden, Deutschland. *Toxicology Letters*, **189S**; S97, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.06.317

Chopra M., Meiss G., Schrenk D.: Inhibition of apoptotic DNA-fragmentation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 7. - 11. März 2010, Salt Lake City, USA. *The Toxicologist*, Supplement to *Toxicological Sciences*, **114S**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Chopra
Anschrift	Sieglindenstraße 30 67059 Ludwigshafen am Rhein
Telefon	+ 49 (0) 621 115 4060 34
Mobil	+ 49 (0) 176 617 0189 1
E-mail	chopra@rhrk.uni-kl.de
Geburtsdatum	06. Juli 1982
Geburtsort	Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Praktische Erfahrungen

04/2007 - 06/2010 **Technische Universität Kaiserslautern**
Lebensmittelchemie und Toxikologie
Professor Dieter Schrenk

10/2008 - 03/2009 **University of Western Australia, Crawley, Australia**
Anatomy and Human Biology
Professor Arunasalam Dharmarajan

Dissertation

"Untersuchungen zur durch UVC-Bestrahlung, Ochratoxin A und Cycloheximid induzierten Apoptose in Leberzellen von Ratte und Mensch sowie zu deren Beeinflussung durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin."

10/2006 - 03/2007 **Technische Universität Kaiserslautern**
Lebensmittelchemie und Toxikologie
Professor Dieter Schrenk

Diplomarbeit

" Untersuchungen zur Zytotoxizität verschiedener Pilzmetabolite sowie von Pilzkulturextrakten"

Studium

10/2004 - 03/2007

Technische Universität Kaiserslautern

Hauptstudium der Lebensmittelchemie

10/2002 - 09/2004

Technische Universität Kaiserslautern

Grundstudium der Lebensmittelchemie

Schulbildung

09/1993 - 03/2002

Albert-Einstein-Gymnasium, Frankenthal

Leistungsfächer Mathematik, Chemie und Englisch

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

- Untersuchungen zur durch UVC-Bestrahlung, Ochratoxin A und Cycloheximid induzierten Apoptose in Leberzellen von Ratte und Mensch sowie zu deren Beeinflussung durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin -

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Kaiserslautern, den 25. April 2010



(Martin Chopra)