

CROSTALK ZWISCHEN MURINEN MYELOIDEN ZELLEN UND FREMDSTOFFMETABOLISIERENDEN HEPATOMZELLEN DURCH LIGANDEN DES AHR-SIGNALWEGES

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

Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin
Anastasia Messer

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 28.11.2012
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 24.10.2014

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Melanie Esselen

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation entstand im Zeitraum von Dezember 2010 bis Februar 2014 an der Technischen Universität Kaiserslautern im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk.

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	vii
Abstract	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xv
Abkürzungsverzeichnis.....	xvii
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Immunsystem	3
2.1.1 Zellen des Immunsystems	4
2.1.1.1 Natürliche Killerzellen, Mastzellen, B- und T-Lymphozyten.....	5
2.1.1.2 Makrophagen.....	5
2.1.1.3 Dendritische Zellen	6
2.1.1.4 Granulozyten	7
2.1.2 Oberflächenmerkmale von Immunzellen.....	8
2.2 Arylhydrocarbon Rezeptor.....	9
2.2.1 AhR-Signaltransduktion.....	10
2.2.2 Liganden des AhR.....	12
2.2.2.1 Synthetische Liganden	12
2.2.2.2 Natürliche Liganden	13
2.2.3 Rolle des Ah-Rezeptors im Immunsystem.....	15
2.3 Vitamin D.....	16
2.3.1 Vitamin-D-Rezeptor.....	18

2.3.1.1	VDR-Signaltransduktion	19
2.3.2	Rolle des Vitamin-D-Rezeptors im Immunsystem	20
2.3.3	Cytochrom P450 Enzyme	21
2.3.3.1	CYP1-Enzyme.....	21
2.3.3.2	CYP24A1-Enzym.....	22
2.4	Interaktion des VDR mit dem AhR.....	22
3.	Materialien	25
3.1	Labortiere	25
3.2	Zelllinien	25
3.3	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
4.	Methoden.....	27
4.1	Primäre murine Knochenmarkzellen	27
4.1.1	Isolierung primärer muriner Knochenmarkzellen.....	27
4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	28
4.1.3	Kultivierung und Differenzierung primärer Knochenmarkzellen.....	29
4.1.4	Behandlung muriner myeloider Zellen	30
4.1.5	Adhärenz und Proliferation von Knochenmarkzellen.....	31
4.2	Zellkultur.....	32
4.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	32
4.2.2	Subkultivierung von Zelllinien	33
4.2.3	Aussaat und Behandlung von Zelllinien	33
4.2.4	Einfrieren von Zelllinien	34
4.3	Extraktion von Kernproteinen.....	36
4.4	Extraktion totaler RNA	37
4.5	Biochemische Analysemethoden	40
4.5.1	Resazurinreduktionstest	40
4.5.2	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase (EROD) Assay	41
4.5.2.1	EROD Assay in vitalen Zellen	42
4.5.3	Bicinchoninsäure (BCA) Assay	44
4.5.4	Real-Time Polymerase Kettenreaktion	46
4.5.4.1	Reverse Transkription	46
4.5.4.2	Quantitative Real-Time PCR.....	47
4.5.5	Nitritbestimmung nach Griess.....	51
4.5.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	52

4.5.7 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
4.5.7.1 Probenvorbereitung	56
4.5.7.2 Gelelektrophorese.....	56
4.5.8 Western Blot und Immunoblot.....	58
4.5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	62
4.5.9.1 Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen	63
4.5.9.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese	64
4.5.9.3 Transfer auf eine Nylonmembran und Crosslink	65
4.5.9.4 Detektion der Chemilumineszenz	66
4.6 Durchflusszytometrie	66
4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	69
4.7.1 Probenvorbereitung	70
4.7.2 HPLC-Analyse	71
4.8 Statistische Auswertung	71
5. Ergebnisse.....	73
5.1 Charakterisierung muriner Knochenmarkzellen	73
5.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen.....	74
5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse.....	75
5.1.3 Adhärenz und Proliferation	79
5.2 Einfluss von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen auf Hepatomzelllinien. 80	
5.2.1 Zellvitalität	80
5.2.2 EROD-Aktivität	82
5.2.3 Cytochrom P450 1A1 Genexpression.....	85
5.3 Einfluss von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen auf Hepatomzellen nach Co-Inkubation mit TCDD	86
5.3.1 Zellvitalität	87
5.3.2 EROD-Aktivität	88
5.3.3 Cytochrom P450 1A1 Genexpression.....	90
5.4 Analytik muriner myeloider Zellen.....	91
5.4.1 NO-Bestimmung nach Griess	91
5.4.2 Quantifizierung von Zytokinen	93
5.5 Einfluss von Zytokinen auf HepG2	94
5.5.1 Zellvitalität	94
5.5.2 EROD-Aktivität	99
5.6 Einfluss von TCDD und Calcitriol auf myeloide Zellen	101

5.6.1 Zellvitalität	102
5.6.2 Zytokinausschüttung	104
5.6.2.1 IL-1 α	105
5.6.2.2 IL-1 β	106
5.6.2.3 IL-6.....	107
5.6.2.4 TNF- α	109
5.6.2.5 Stickoxid (NO)	110
5.6.3 Genexpression	112
5.6.3.1 Genexpression der Zytokine.....	112
5.6.3.2 Genexpression von <i>Cyp1a1</i> und <i>Cyp24a1</i>	114
5.6.4 Western Blot Analyse	123
5.7 Einfluss von TCDD und Calcitriol auf HepG2	126
5.7.1 Zellvitalität	126
5.7.2 EROD-Aktivität	127
5.7.3 Genexpression von <i>CYP1A1</i>	128
5.8 Interaktion des VDR mit dem AhR (EMSA).....	130
5.9 HPLC-Analyse myeloider Zellen und deren Überstände	133
6. Diskussion.....	143
6.1 Charakterisierung myeloider Zellen.....	144
6.2 Einfluss von Mediumüberständen myeloider Zellen auf Hepatomzellen.....	147
6.2.1 Zellvitalität	147
6.2.2 CYP1A1-Aktivierung	154
6.3 HPLC-Analyse von Mediumüberständen	161
6.4 Vitamin D ₃ und TCDD	163
6.4.1 Zellvitalität und Proliferation.....	163
6.4.2 Zytokine	165
6.4.2.1 Einfluss des Calcitriols.....	165
6.4.2.2 Einfluss des 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxins	169
6.4.3 Rezeptoren und CYPs	171
6.4.4 Wechselwirkung zwischen AhR und VDR?.....	175
7. Zusammenfassung und Ausblick	189
8. Literaturverzeichnis	195
9. Anhang.....	225

9.1 Weitere Daten	225
9.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	233
9.2.1 Chemikalien	233
9.2.2 Antikörper	235
9.2.3 Kits	236
9.2.4 Verbrauchsmaterialien	236
9.2.5 Geräte	237
9.2.6 Software	239
10. Eidesstattliche Erklärung	241
11. Lebenslauf	243

ABSTRACT

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der zur Familie der basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) Proteine gehört. Am besten bekannt durch seine Rolle bei der Toxizität und Kanzerogenität von polychlorierten/polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, wurde er in diesem Zusammenhang weitestgehend untersucht. Auch wenn seine physiologische Rolle noch nicht eindeutig geklärt wurde, zeigen aktuelle Studien, dass der AhR in vielen anderen Bereichen wie Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose, aber auch bei der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle spielt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Knochenmarkzellen adulter C57BL/6 Mäuse isoliert und in Gegenwart von GM-CSF *in vitro* ausdifferenziert. Die adhärente Population konnte antigenpräsentierenden MHCII⁺ Zellen, mit dem Charakter CD11c⁺ dendritischer Zellen und F4/80⁺ Makrophagen, zugeordnet werden. Nach Behandlung myeloider Zellen mit LPS, zeigten die gewonnenen Mediumüberstände in HepG2-Zellen eine signifikante und teilweise AhR-abhängige CYP1A1-Induktion im EROD-Assay, aber auch eine signifikant erhöhte *CYP1A1*-Genexpression. Gleichzeitig konnte durch die konditionierten Mediumüberstände myeloider Zellen eine Inhibition der TCDD-induzierten CYP1A1-Aktivität festgestellt werden. Ein Teil der inhibitorischen Wirkung konnte auf hohe Gehalte inflammatorischer Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α in Mediumüberständen zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einer Infektion/Inflammation Immunzellen Substanzen sezernieren, welche die Aktivität des Arylhydrocarbon Rezeptors beeinflussen. Welche Verbindung(en) in Mediumüberständen LPS-stimulierter Zellen für die induktive Wirkung des CYP1A1 auf Enzym- und mRNA-Ebene verantwortlich ist/sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Weiterhin wurde die Wirkung des bekannten AhR-Agonisten 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), sowie des biologisch aktiven Vitamin D₃-Metaboliten und physiologischen VDR-Liganden Calcitriol untersucht. Beide Substanzen zeigten modulierende Effekte auf Viabilität/Proliferation sowie Ausschüttung und Genexpression inflammatorischer Zytokine in myeloiden Zellen. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass beide Verbindungen die Expression der AhR und VDR Targetgene *Cyp1a1* und *Cyp24a1* induzierten. Die Expression des *Cyp1a1* stieg durch Behandlung myeloider Zellen mit Calcitriol in gleichem Maße an, wie durch Inkubation mit TCDD. Für *Cyp24a1* ergab sich eine stark erhöhte Expression durch Calcitriol und eine wesentlich geringere, aber dennoch statistisch signifikant gesteigerte Expression durch Inkubation mit TCDD. Nach Co-Inkubation mit beiden Substanzen konnte ein zeitabhängiger Synergismus bezüglich der *Cyp1a1*-Expression ermittelt werden. Für *Cyp24a1* wurde durch Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol eine signifikante Verringerung der Expression beobachtet. Ferner zeigte sich nach „Blockierung“ des Ah-Rezeptors durch seinen Antagonisten CH223191, zusätzlich zur Inhibition der *Cyp1a1*-Expression, auch eine statistisch hoch signifikante Hemmung der *Cyp24a1*-Expression. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren AhR und VDR in einer Beziehung zueinander stehen und für die adäquate Funktion des jeweils anderen Rezeptors notwendig sind. Dieser Zusammenhang liefert einen interessanten Ansatz für weiterführende Forschung und würde einen besseren Einblick in die physiologische Rolle des „Dioxin-Rezeptors“ AhR liefern.

ABSTRACT

The arylhydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor belonging to the family of basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) proteins. Best known for its role in mediating toxicity and carcinogenicity of environmental chemicals like polychlorinated / polycyclic aromatic hydrocarbons, the AhR has been widely studied in this context for many decades, but its physiological role remains still unrevealed. Recent investigations show the involvement of AhR in many other areas including cell growth, differentiation, apoptosis as well as function in the immune system, indicating its role in many different physiological processes.

Within the framework of this doctoral thesis bone marrow cells of adult C57BL/6 mice were isolated and differentiated *in vitro* in the presence of GM-CSF. Adherent cells turned out to be antigen presenting MHCII⁺ cells, showing the character of CD11c⁺ dendritic cells and F4/80⁺ macrophages. After treatment with bacterial endotoxin LPS, supernatants of bone marrow derived cells showed a significant and partially AhR-dependent induction of CYP1A1-activity in HepG2 cells. The inductive effect could also be observed on mRNA level. In addition, supernatants of LPS-treated bone marrow derived cells caused a significant suppression of TCDD-induced EROD activity in human hepatoma cells by co-treatment with TCDD and supernatants. Increased concentrations of inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in supernatants of bone marrow derived immune cells could be proven to relevantly contribute to the inhibitory effect on TCDD-induced EROD activity. These results indicate that during an infection/inflammation immune cells are producing different substances which affect the activity of the AhR and maybe result in a crosstalk between different cell types. The aspect regarding the induction of CYP1A1 activity and gene expression needs further investigation.

Further, effects of the potent AhR agonist 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and the physiological VDR ligand Calcitriol were investigated in murine bone marrow derived cells. Both compounds showed modulating effects on viability/proliferation of myeloid cells as well as on secretion and gene expression of inflammatory cytokines. It could be shown for the first time that both, Calcitriol and TCDD, have an influence on the expression of AhR and VDR target genes *Cyp1a1* and *Cyp24a1*. After treatment of murine myeloid cells with Calcitriol expression of *Cyp1a1* reached similarly increased values as after treatment with TCDD. Incubation with Calcitriol resulted in dramatically high gene expression of *Cyp24a1*. TCDD also led to a rise of *Cyp24a1* gene expression, but on a significantly lower scale compared to Calcitriol. After co-treatment with both compounds a time-dependent synergistic effect was observed concerning *Cyp1a1*. No synergism could be determined after simultaneous treatment of bone marrow derived cells with TCDD and Calcitriol regarding the expression of *Cyp24a1*. The expression of *Cyp24a1* even significantly decreased referred to treatment with Calcitriol alone. In addition, inhibition of AhR with its antagonist CH223191 resulted not only in a significant decrease of *Cyp1a1* expression, but also in a significantly diminished gene expression of *Cyp24a1*. These data suggest a strong interaction between the two transcription factors AhR and VDR, maybe requiring each other for their proper function. This possible interaction provides an interesting approach for further research and would give a better insight into the physiological role of AhR.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Entwicklung hämatopoetischer Zellen aus Knochenmarkstammzellen.....	4
Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Ah-Rezeptors mit funktionellen Domänen.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des AhR-Signalweges.....	11
Abbildung 4: Strukturformeln einiger synthetischer AhR-Liganden.....	12
Abbildung 5: Strukturformeln ausgewählter, natürlich vorkommender AhR-Liganden.	13
Abbildung 6: Mögliche endogene Liganden des Ah-Rezeptors.	14
Abbildung 7: Metabolismus von Vitamin D	17
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Vitamin-D-Rezeptors mit funktionellen Domänen	18
Abbildung 9: Schematische Darstellung der VDR-Signaltransduktion.....	19
Abbildung 10: <i>Femur</i> (A), <i>tibia</i> mit <i>fibula</i> (B) einer adulten, männlichen C57BL/6 Maus...	28
Abbildung 11: Aufbau des Zählfeldes einer Neubauer Zählkammer	28
Abbildung 12: Durchführung des Adhärenz-/Proliferationstests im 48-Well Format.....	31
Abbildung 13: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung.....	38
Abbildung 14: Absorptionsspektrum einer RNA-Probe.	39
Abbildung 15: Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter Verbrauch von NADH.....	40
Abbildung 16: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin.	42
Abbildung 17: Bildung des violetten BCA-Cu ¹⁺ -Komplexes.....	45
Abbildung 18: Modell eines Plots der quantitativen RT-PCR.....	48
Abbildung 19: Mechanismus der Griess-Reaktion.	51
Abbildung 20: Funktionsprinzip des ELISA.....	53
Abbildung 21: Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols.....	58
Abbildung 22: Aufbau einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur.....	59
Abbildung 23: Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays	62
Abbildung 24: Aufbau der Tank-Blotting Apparatur.....	65

Abbildung 25: Prinzips der Durchflusszytometrie.....	67
Abbildung 26: HPLC-System, schematisch.....	69
Abbildung 27: Murine Knochenmarkzellen in verschiedenen Stadien der Kultivierung.	74
Abbildung 28: Dotplot - FSC und SSC myeloider Zellen	75
Abbildung 29: Oberflächeneigenschaften myeloider Zellen (Einzelfärbung).	76
Abbildung 30: Oberflächeneigenschaften myeloider Zellen (Doppelfärbung).....	78
Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf adhärerender und proliferierender myeloider Zellen.	79
Abbildung 32: Zellvitalität in Hepatomzelllinien durch Mediumüberstände myeloider Zellen.	81
Abbildung 33: Zellvitalität in HepG2 durch Mediumüberstände frisch isolierter Knochenmarkzellen.	82
Abbildung 34: Vergleich der EROD-Aktivität in Hepatomzellen.....	83
Abbildung 35: EROD-Aktivität in HepG2-Zellen durch Mediumüberstände muriner myeloider Zellen.	84
Abbildung 36: AhR-Abhängigkeit der EROD-Aktivität.	85
Abbildung 37: relative <i>CYP1A1</i> Genexpression in HepG2-Zellen durch Überstände muriner myeloider Zellen.	86
Abbildung 38: Zellvitalität. 48 h-Co-Inkubation von Mediumüberständen myeloider Zellen und TCDD in HepG2-Zellen.	87
Abbildung 39: Vitalität in HepG2-Zellen. Vergleich Mediumüberstände vs. Co-Inkubation mit TCDD.	88
Abbildung 40: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in HepG2 nach 48 Co-Inkubation mit TCDD (10^{-9} M).	89
Abbildung 41: Einfluss von LPS auf EROD-Aktivität.	90
Abbildung 42: relative <i>CYP1A1</i> Expression in HepG2-Zellen nach Co-Inkubation mit TCDD und Überständen myeloider Zellen.	91
Abbildung 43: Nitrit Konzentration in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen.	92
Abbildung 44: Zytokin-Konzentrationen in Mediumüberständen myeloider Zellen.....	93
Abbildung 45: Einfluss von IL-1 α auf Zellvitalität.....	96
Abbildung 46: Einfluss von IL-1 β auf Zellvitalität.....	96
Abbildung 47: Einfluss von IL-6 auf Zellvitalität.....	97
Abbildung 48: Einfluss von TNF- α auf Zellvitalität.....	98
Abbildung 49: Einfluss des Zytokinmix auf Zellvitalität.....	98
Abbildung 50: EROD-Aktivität von Zytokinen.....	100
Abbildung 51: Prozentuale Suppression TCDD-induzierter EROD-Aktivität durch Zytokine.	101
Abbildung 52: Zellvitalität. Calcitriol in myeloiden Zellen.....	103
Abbildung 53: Zellvitalität. TCDD in myeloiden Zellen.....	103

Abbildung 54: Zellvitalität. Calcitriol und TCDD (1 nM) in myeloiden Zellen.....	104
Abbildung 55: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-1 α	105
Abbildung 56: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-1 β	107
Abbildung 57: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-6.	108
Abbildung 58: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf TNF- α	110
Abbildung 59: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf NO.....	111
Abbildung 60: relative Zytokin-Genexpression.	113
Abbildung 61: relative <i>Cyp1a1</i> Expression in myeloiden Zellen (48 h).....	115
Abbildung 62: relative <i>Cyp1a1</i> Expression in myeloiden Zellen (24 h).....	116
Abbildung 63: relative <i>Cyp24a1</i> Expression in myeloiden Zellen (48 h).....	117
Abbildung 64: relative <i>Cyp24a1</i> Expression in myeloiden Zellen (24 h).....	118
Abbildung 65: relative Genexpression von <i>AhR</i> (A) und <i>Vdr</i> (B).	120
Abbildung 66: AhR-Abhängigkeit der <i>Cyp1a1</i> und <i>Cyp24a1</i> Expression durch Calcitriol und TCDD.	121
Abbildung 67: relative <i>Cyp24a1</i> Expression nach Inkubation mit Telmisartan und Calcitriol.	123
Abbildung 68: Western Blot-Analyse in myeloiden Zellen nach Calcitriol Inkubation.....	124
Abbildung 69: Densitometrische Auswertung des Western Blots für VDR (A) und <i>Cyp24a1</i> (B).	125
Abbildung 70: Western Blot-Analyse in myeloiden Zellen nach TCDD Inkubation.	126
Abbildung 71: Zytotoxizität von Calcitriol und TCDD in HepG2.	127
Abbildung 72: EROD-Aktivität von Calcitriol und TCDD in HepG2.....	128
Abbildung 73: relative Genexpression von <i>CYP1A1</i> durch TCDD und Calcitriol.....	129
Abbildung 74: Western Blot Untersuchung von Zellextrakten.....	130
Abbildung 75: EMSA. Bindung des VDR an CYP1A1 Promoter (AhR Antikörper).	131
Abbildung 76: EMSA. Bindung des VDR an CYP1A1 Promoter (VDR-Antikörper).....	132
Abbildung 77: UV-Chromatogramm unbehandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberstand.	133
Abbildung 78: UV-Chromatogramm und UV-Spektren unbehandelter myeloider Zellen....	134
Abbildung 79: UV-Chromatogramm LPS-behandelter myeloider Zellen.....	135
Abbildung 80: UV-Chromatogramm und UV-Spektren LPS-behandelter myeloider Zellen	135
Abbildung 81: Vergleich der UV-Chromatogramme unbehandelter (rot) und LPS-behandelter (blau) myeloider Zellen	136
Abbildung 82: UV-Chromatogramm des Kulturmediums. Gesamtchromatogramm, 280 nm.	137
Abbildung 83: UV-Chromatogramm und UV-Spektren des Kulturmediums.	137
Abbildung 84: Vergleich der UV-Chromatogramme: Kulturmedium (blau) LPS-behandelte myeloide Zellen (rot).	138

Abbildung 85: UV-Chromatogramm mit Calcitriol (100 nM) behandelter myeloider Zellen	139
Abbildung 86: UV-Chromatogramm und UV-Spektren myeloider Zellen behandelt mit Calcitriol.	139
Abbildung 87: Vergleich der UV-Chromatogramme myeloider Zellen DMSO (blau) Calcitriol (rot).	140
Abbildung 88: UV-Chromatogramm und UV-Spektrum von Calcitriol (100 µM), 280 nm.	141
Abbildung 89: TLR-abhängige, LPS-vermittelte Zytokin-Induktion in Immunzellen	150
Abbildung 90: relative <i>Cyp1a1</i> Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	176
Abbildung 91: relative <i>Cyp24a1</i> Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	180
Abbildung 92: hypothetischer Zusammenhang der VDR-Aktivität vom AhR.....	182
Abbildung 93: Schematische Darstellung des klassischen und alternativen NF-kB- Signalweges	185
Abbildung 94: Anregungs- und Emissionswellenlängen von FITC (A) und PE-Cy7 (B).....	225
Abbildung 95: Isotyp-Kontrollen durchflusszytometrischer Analysen muriner myeloider Zellen.	226
Abbildung 96: Zytotoxizität von Mediumüberständen myeloider Zellen in primären Rattenhepatozyten.....	227
Abbildung 97: Zytotoxizität von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen in HepG2- Zellen hitzeinaktiviert vs. nicht hitzeinaktiviert (schraffiert).	227
Abbildung 98: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in Hepa-1.	228
Abbildung 99: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in H4IIE.	228
Abbildung 100: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in primären Rattenhepatozyten.....	229
Abbildung 101: relative <i>Cyp1a1</i> -Expression. TCDD und LPS.	229
Abbildung 102: relative <i>Cyp1a1</i> -Expression. Calcitriol und LPS.	230
Abbildung 103: relative <i>Cyp24a1</i> -Expression. TCDD und LPS.	230
Abbildung 104: relative <i>Cyp24a1</i> -Expression. Calcitriol und LPS.	231
Abbildung 105: relative <i>Cyp1a1</i> und <i>Cyp24a1</i> Expression durch LPS.	231
Abbildung 106: Chromatographische Trennung von Aminosäuren inkl. UV-Spektren.....	232

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Nährmedium für murine Knochenmarkzellen	29
Tabelle 2: Aussaat primärer muriner Knochenmarkzellen	29
Tabelle 3: Inkubationssubstanzen für murine myeloide Zellen	30
Tabelle 4: Nährmedium zur Kultivierung von Zelllinien.....	33
Tabelle 5: Format, Mediumvolumina und Zellzahlen zur Aussaat von Zelllinien	34
Tabelle 6: Zusammensetzung des Einfriermediums	35
Tabelle 7: Lösungen für Kernextraktion	36
Tabelle 8: Lösungen für den Resazurinreduktionstest	41
Tabelle 9: Lösungen für den EROD-Assay in vitalen Zellen	43
Tabelle 10: Pipettierschema für die externe Resorufin-Kalibrierreihe	44
Tabelle 11: Pipettierschema zur Kalibrierreihe des BCA-Assays.....	46
Tabelle 12: Komponenten zur Synthese von cDNA	47
Tabelle 13: Temperaturprotokoll zur Synthese von cDNA.....	47
Tabelle 14: Komponenten für die Real-Time PCR.....	49
Tabelle 15: Temperaturprotokoll für Real-Time PCR.....	49
Tabelle 16: Informationen zu verwendeten Primern für Real-Time PCR.....	50
Tabelle 17: Lösungen für Nitritbestimmung nach Griess	52
Tabelle 18: Referenzbereich untersuchter Zytokine	54
Tabelle 19: Zusätzlich zum Ready-Set-Go! [®] ELISA-Kit benötigte Lösungen.....	55
Tabelle 20: Lysepuffer und Laemmli-Ladepuffer (6x)	56
Tabelle 21: Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE	57
Tabelle 22: Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	58
Tabelle 23: Blotting Puffer.....	59
Tabelle 24: Lösungen für Immunoblot.....	60

Tabelle 25: Lösungen zur Detektion der Chemilumineszenz	61
Tabelle 26: Stripping-Puffer.....	61
Tabelle 27: Nukleotidsequenz der humanen CYP1A1 Promoter Region	63
Tabelle 28: Tris-Puffer für DNA-Annealing.....	63
Tabelle 29: Komponenten der Proben für EMSA	64
Tabelle 30: TBE-Puffer und natives Polyacrylamidgel für EMSA.....	65
Tabelle 31: Antikörper für Durchflusszytometrie	67
Tabelle 32: Einstellungen für Geräte-spezifische Parameter für Durchflusszytometrie.....	68
Tabelle 33: Eigenschaften verwendeter Fluorophore für FACS	68
Tabelle 34: Gradientenprofil der HPLC-Methode	71
Tabelle 35: Antigen Einzelfärbung.	77
Tabelle 36: Antikörper-Doppelfärbung.....	78
Tabelle 37: Zytokin-Gehalte in Mediumüberständen myeloider Zellen	94
Tabelle 38: In Zellkultur eingesetzte Zytokin Konzentrationen.	95
Tabelle 39: Zytokin-Gehalte in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen	149
Tabelle 40: Konzentrationen aromatischer Aminosäuren im RPMI- Medium	162
Tabelle 41: Verwendete Chemikalien	233
Tabelle 42: Verwendete Antikörper	235
Tabelle 43: Verwendete Kits	236
Tabelle 44: Verwendete Verbrauchsmaterialien	236
Tabelle 45: Verwendete Geräte	237
Tabelle 46: Verwendete Software	239

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFP	Alpha-Fetoprotein
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AhRR	Arylhydrocarbon Rezeptor Repressor
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ANOVA	One-way analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Arylhydrocarbon nuclear translocator
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
bHLH/PAS	basic-helix-loop-helix Per-ARNT-Sim
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CAR	constitutive androstan receptor
cDNA	Komplementäre DNA
CD	Cluster of Differentiation
C _T	Threshold Cycle
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dendritic Cell

DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immonosorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular signal-regulated MAP kinase
EROD	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Deethylase
<i>et al.</i>	<i>et aliae</i> - lat.: und andere
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
g	Gewichtskraft
G-CSF	Granulocytes Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase
I3C	Indol-3-Carbinol
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK $\alpha/\beta/\gamma$	I κ B Kinase Komplex $\alpha/\beta/\gamma$
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter

LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
mA	Milliamper
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser-Desorption/Ionization – Time of flight – Mass spectrometry
MAPK	Mitogen activated protein kinase
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MΦ	Makrophage
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MKP	Mitogen activated protein kinase phosphatase
ml	Milliliter
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
NIK	NF-κB inducing kinase
NLS	Nuclear Localization Sequence
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOS	Nitric Oxide Synthase
NQO1	Chinonoxidoreduktase 1
nVDRE	Negative Vitamin D response element
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PHA	Phytoheamagglutinin
pM	Pikomolar
PMA	Phorbolmyristataacetat
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	Pregnane X Receptor
RT-PCR	Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Reversed Phase
RT	Reverse Transkription
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SMRT	Silencing mediator of retinoid acid and thyroid receptors
SSC	Side Scatter
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	Tumor Growth Factor β
TLR	Toll-like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolette Strahlung
VDR	Vitamin D Rezeptor

VDRE

Vitamin D responsive element

XAP

Hepatitis b virus X-associated Protein 2

XRE

Xenobiotic responsive element

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Seit seiner Entdeckung in den 1970er Jahren hat der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) für die Wissenschaft nicht an Faszination verloren und bietet noch immer spannenden Forschungsstoff. Der Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktor der basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim Familie ist dadurch bekannt geworden, dass er nach Bindung einer Reihe verschiedener polyzyklischer/polychlorierter Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) oder Benzo[a]pyren, eine Genexpression reguliert und die meisten, wenn nicht alle, damit verbundenen Toxizitäten und adverse Effekte, darunter Enzyminduktion, Hepatotoxizität oder Immuntoxizität, vermittelt (Holsapple *et al.* 1991; Schrenk *et al.* 1995; IARC, 1997; Nebert *et al.* 2004). In den letzten Jahren wurde seine Rolle in vielen anderen Prozessen wie Zelldifferenzierung und –proliferation aber auch bei der Regulation des Immunsystems deutlich (Hanich, 2013; Hao *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2013). Seine tatsächliche physiologische Rolle bleibt aber noch immer unklar.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden myeloide Zellen aus dem Knochenmark adulter, männlicher C57BL/6 Mäuse isoliert. Nach einer Kultivierungs- und Differenzierungsdauer von 10 Tagen in Gegenwart des Wachstumsfaktors GM-CSF und anschließender Behandlung mit dem bakteriellen Endotoxin LPS wurden die Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse der Oberflächen-Antigen-Marker immunologisch charakterisiert. Anschließend wurde die Interaktion zwischen diesen isolierten und ausdifferenzierten myeloiden Zellen und immortalisierten Hepatomzellen im Rahmen des AhR-Signalweges untersucht um Hinweise auf die physiologische Rolle des AhR-Rezeptors und eventuelle endogene Liganden zu erhalten. Hierfür wurden Mediumüberstände der murinen Zellen, mit und ohne LPS-Stimulation, in Hepatomzellen inkubiert und bezüglich Zellvitalität, EROD-Aktivität und *CYP1A1*-Expression auf mRNA-Ebene mit und ohne zusätzliche TCDD-Induktion analysiert.

Da sich die sekretorische Aktivität von Immunzellen bei einer Infektion ändert, wurde auch untersucht wie sich der Zytokinstatus im Mediumüberstand der differenzierten Knochenmarkzellen mit und ohne Stimulation durch LPS hinsichtlich bekannter Entzündungsmarker wie Stickoxid (NO) und Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α unterscheidet. Aber auch die Auswirkungen dieser Zytokine auf die Vitalität sowie CYP1A1-Aktivität in humanen Hepatomzellen HepG2 standen im Forschungsmittelpunkt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung zweier Substanzen auf die murinen myeloiden Zellen untersucht. Zum einen von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), des wahrscheinlich potentesten Liganden des Arylhydrocarbon-Rezeptors, und zum anderen von 1,25(OH)₂Vitamin-D₃ (Calcitriol), dem physiologischen Liganden des Vitamin-D-Rezeptors (VDR). Hierbei war die Beziehung und die Wechselwirkung zwischen den beiden Rezeptoren AhR und VDR von besonderem Interesse und sollte u.a. Hinweise auf die physiologische Funktion des AhR liefern.

THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Immunsystem

Das Immunsystem (*immunis*, lat. „von etwas frei sein“) steht im biologischen Sinne für das Abwehrsystem biologischer Organismen gegenüber fremden Stoffen oder Lebewesen wie Bakterien, Viren und Parasiten. Es differenziert zwischen eigenen und fremden Strukturen und trägt so zur Erhaltung individueller Integrität bei. Klassisch unterscheidet man zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr (Schütt, 2006; Rink, 2012).

Die angeborene oder unspezifische Immunabwehr ist in allen biologischen Organismen einschließlich Pflanzen und Mikroorganismen vorhanden, sie dient der ersten Abwehr eingedrungener Fremdstoffe und reagiert bereits innerhalb von Stunden (Hoffmann *et al.* 1999). Die Struktur der dabei beteiligten Proteine ist im Genom des Organismus festgelegt und kann nicht angepasst werden. Das angeborene Immunsystem wird in drei Bereiche unterteilt: mechanische und physiologische Barrieren, zelluläre Bestandteile, sowie humorale Bestandteile. Zu mechanischen und physiologischen Barrieren zählen z.B. die Haut, Schleimhäute sowie antimikrobielle und proteolytische Enzyme in Tränen, Speichel und Magen. Zelluläre Bestandteile zirkulieren im Blut und kommen in Geweben vor. Dazu gehören Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, sie bekämpfen in den Organismus eingedrungene fremde Strukturen durch Phagozytose und können durch Ausschüttung von Zytokinen andere Abwehrzellen aktivieren und zum Entzündungsort mobilisieren, auf diese genannten Zellen wird in folgenden Kapiteln näher eingegangen. Unter humoralen Bestandteilen versteht man kleine Plasmaproteine, welche nicht aktiv zur Infektionsstelle

wandern, sondern passiv im Blut bzw. Gewebsflüssigkeit zirkulieren, dazu zählen Interleukine und das Komplementsystem (Akira *et al.* 2006; Schütt, 2006).

Das adaptive Immunsystem ist hingegen eine spezifische, recht langsame Abwehr mit einer, für jedes Pathogen, angepassten, erworbenen Immunantwort. Dies führt zu einem immunologischen Gedächtnis des Organismus, wodurch eine schnellere Reaktion und somit eine Immunität bei einer Re-Infektion gegeben ist. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems gehören Lymphozyten, die sich durch einen großen, runden Kern und einen schmalen Zytoplasmasaum auszeichnen. Dabei differiert man zwischen B- und T-Lymphozyten bzw. B- und T-Zellen. Beide besitzen klonal verteilte Rezeptoren für Antigene, B-Zell-Rezeptoren (BCR) bzw. T-Zell-Rezeptoren (TCR) (Schütt, 2006; Murphy, 2012).

2.1.1 Zellen des Immunsystems

Die Reifung von Immunzellen aus Stammzellen findet durch graduelle Differenzierung in primären lymphatischen Organen, dem Thymus und dem Knochenmark statt (Abbildung 1).

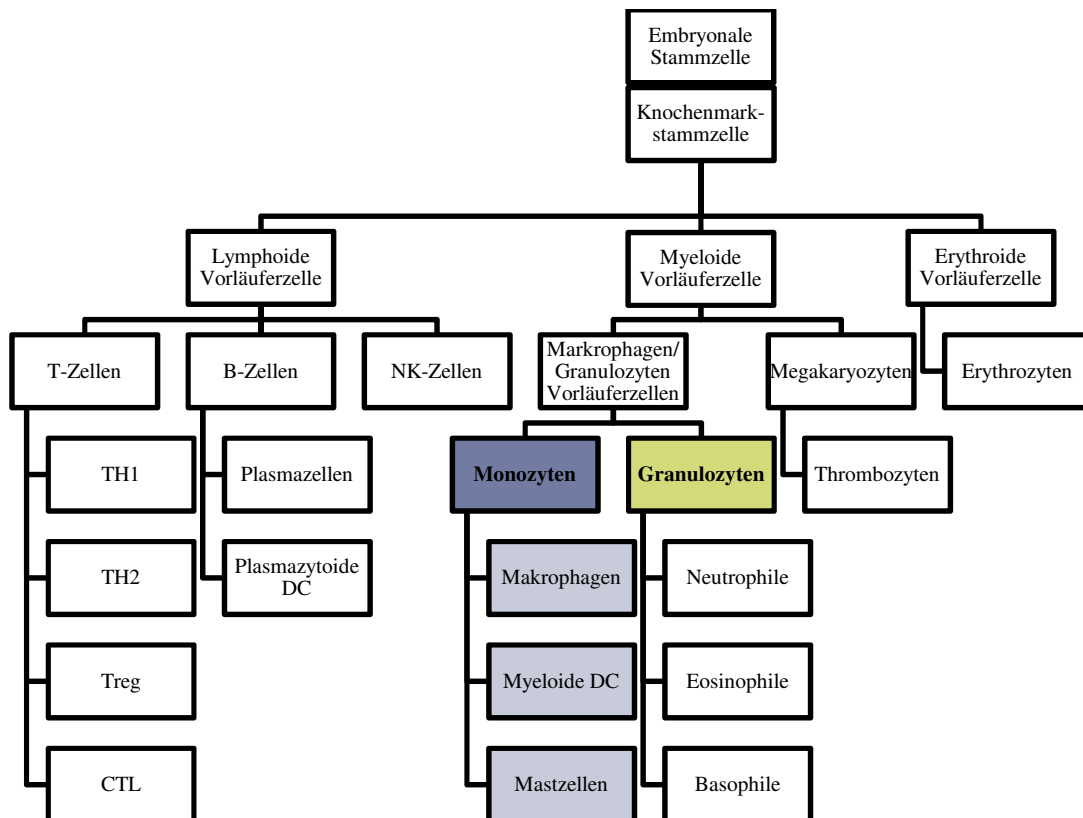


Abbildung 1: Entwicklung hämatopoetischer Zellen aus Knochenmarkstammzellen. CTL=zytotoxische T-Lymphozyten; DC=dendritische Zellen; MΦ=Makrophagen; NK=natürliche Killerzellen; TH=T-Helferzellen; Treg=regulatorische T-Zellen (nach Schütt, 2006).

Nach abgeschlossener Reifung wandern die Zellen in die sekundären lymphatischen Organe – Lymphknoten, Milz und das mukoassoziierte lymphatische Gewebe – und besiedeln diese (Schütt, 2006; Domen *et al.* 2011). Einzelne Zellarten sowie deren Aufgaben werden in folgenden Abschnitten näher beschrieben, wobei im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk den Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten gilt.

2.1.1.1 Natürliche Killerzellen, Mastzellen, B- und T-Lymphozyten

Als natürliche Killerzellen werden Lymphozyten bezeichnet, welche spezifisch infizierte Zellen, Tumorzellen und Antikörper-markierte Zellen eliminieren. Mastzellen hingegen sind große, Granula haltige Zellen in Geweben und Schleimhäuten. Nach Erkennen von Erregern, setzen sie toxische Inhaltsstoffe der Granula innerhalb von Sekunden frei und starten durch Zytokinausschüttung eine Entzündungsreaktion (Schütt, 2006; Rink, 2012).

Den Namen erhielten B-Zellen von ihrem Bildungsort in der *Bursa fabricius* bei Vögeln. Beim Menschen und einigen Säugetieren reifen B-Lymphozyten im Knochenmark (*bone marrow*) und besitzen Antigenrezeptoren – B-Zell-Rezeptoren. Nach Aktivierung reifen B-Zellen zu Plasmazellen, welche große Mengen an Immunglobulin produzieren und sezernieren (Schütt, 2006; Rink, 2012).

Das „T“ in der Bezeichnung der T-Zellen steht für Thymus, dem Ort, an dem diese Zellen ausreifen. Man unterscheidet dabei zwei Populationen: T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen. T-Helferzellen sind für die Optimierung der Immunantwort verantwortlich. Sie können die Antikörperproduktion in B-Zellen aktivieren und Makrophagen beim Eliminieren aufgenommener Mikroorganismen helfen. Regulatorische T-Zellen (Tregs) hingegen supprimieren die Immunantwort und schützen den Organismus so vor einer Überreaktion des Immunsystems. Zytotoxische T-Zellen sind auf die Beseitigung infizierter Zellen spezialisiert. Durch T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf ihrer Oberfläche erkennen T-Zellen die präsentierten Antigene (Schütt, 2006; Murphy, 2012).

2.1.1.2 Makrophagen

Schon lange werden Makrophagen als immunologische Effektorzellen angesehen. Bereits vor 100 Jahren beschrieb Ilja Metschnikow die Phagozytose und die Annahme, dass Aktivierung von Phagozyten der Schlüssel zur Immunität sei. Dafür erhielt er zusammen mit Paul Ehrlich

und seiner Entdeckung des adaptiven Immunsystems 1908 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Gordon, 2007; Nathan, 2008; Mosser *et al.* 2008).

Makrophagen sind mononukleäre Phagozyten. Sie gehören zu Zellen des angeborenen Immunsystems und entwickeln sich aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark und parentalen Monozyten, welche im Blut zirkulieren und sich nach Einwandern in das Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Je nach Gewebe, in dem sie vorkommen, tragen sie verschiedene Namen, so heißen z.B. Makrophagen in der Leber Kupffer'sche Zellen, im zentralen Nervensystem Mikroglia und im Bindegewebe Histiozyten (Mosser *et al.*, 2008; Verschoor *et al.* 2012). Ohne diese erstaunlichen phagozytierenden Zellen wäre ein Organismus zum Überleben nicht fähig. So beseitigen sie täglich ca. 2×10^{11} alternder Erythrozyten, recyceln das Eisen und Hämoglobin und stellen es dem Organismus wieder zur Verfügung. Rasch und effizient entfernen sie Bruchstücke apoptotischer Zellen. Diese Prozesse laufen unabhängig von Immunzell-vermittelten Signalen ab und bedürfen keiner oder nur geringer Produktion von Zytokinen. Im Kontrast dazu führt die Phagozytose nekrotischer Zellbruchstücke oder anderer Pathogene zu dramatischen physiologischen Änderungen der Makrophagen. Diese Bruchstücke aus nekrotischen Prozessen enthalten Fragmente wie Hitzeschock-Proteine, Histone, DNA und andere Nukleotide, welche als endogene Gefahrensignale wirken. Makrophagen erkennen diese Gefahrensignale mit Hilfe von Toll-like Rezeptoren (TLRs) und des IL-1-Rezeptors. Aufnahme dieser nekrotischer Bruchstücke bzw. Pathogene bewirkt in den Makrophagen die Antigenpräsentation auf ihrer Oberfläche sowie Produktion von Zytokinen und proinflammatorischen Mediatoren einschließlich IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , PDGF, FGF und Stickoxid (NO), wodurch eine Immunantwort in Gang gesetzt wird (Huang *et al.* 2002; Akira *et al.* 2006; Mosser *et al.* 2008; Serbina *et al.* 2008).

In vitro lassen sich Makrophagen aus Knochenmarkzellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren generieren. Dabei bietet M-CSF die Möglichkeit zur spezifischen Differenzierung CD11c-negativer und F4/80-positiver Makrophagen. Die Verwendung des GM-CSF bei der Kultivierung von Knochenmarkzellen bietet eine weitere Möglichkeit der Makrophagen-Generierung, jedoch unterscheiden sich diese morphologisch von denen mit M-CSF gebildeten Zellen (Schuetze *et al.* 2005; Zanoni *et al.* 2009; Marim *et al.* 2010).

2.1.1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden zum ersten Mal von Paul Langerhans im Jahre 1868 visualisiert, jedoch nahm er fälschlicherweise an, dass es sich hierbei um Nervenzellen der Haut handelt. Erst über 100 Jahre später zeigten Steinman und Cohn, dass es sich bei den Zellen mit ver-

zweigigen zytoplasmatischen Ausläufern um eine neue Klasse von Monozyten handelt und brachten diese mit dem Immunsystem in Verbindung (Langerhans, 1868; Steinman and Cohn, 1973).

Dendritische Zellen sind eine heterogene Population professioneller, Antigen-präsentierender Zellen und entwickeln sich je nach Art aus Vorläuferzellen im Knochenmark, Blut oder Gewebe (Liu *et al.* 2010; Van de Laar *et al.* 2012). Im stabilen Zustand des Organismus, aber auch bei Verletzungen oder einer Infektionen, patrouillieren dendritische Zellen im Körper auf der Suche nach Erregern und Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Toxinen. Sobald sie die Antigene erkannt haben, nehmen sie diese durch Makropinozytose auf, konvertieren diese in kleine Fragmente und präsentieren sie zusammen mit Haupt-histokompatibilitätskomplexen I und II (MHC I und MHC II) auf ihrer Zelloberfläche. Mit dieser Information wandern die nun reifen Immunzellen in Milz und Lymphknoten, aktivieren dort B-Zellen zur spezifischen Antikörperproduktion gegen die zuvor erkannten Antigene und aktivieren auch T-Zellen, welche einen spezifischen Angriff starten und die „Eindringlinge“ zerstören. So bilden dendritische Zellen die Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem (Banchereau *et al.* 2000; Liu *et al.* 2010).

Zahlreiche Publikationen widmen sich der Generierung dendritischer Zellen *in vitro*. Eine der meist verbreiteten Methoden ist die Entwicklung dendritischer Zellen aus Knochenmarkszellen unter Verwendung von GM-CSF und u.a. einigen Zusätzen wie IL-4 oder TNF α . Jedoch erhält man dabei in jedem Fall eine Mischpopulation verschiedener Zelltypen, neben dendritischen Zellen auch Makrophagen, Granulozyten und Megakaryozyten (Metcalf *et al.* 1986; Inaba *et al.* 1992; Scheicher *et al.* 1992; Lutz *et al.* 1999).

2.1.1.4 Granulozyten

Granulozyten sind eine Kategorie von Leukozyten und werden auf Grund ihrer verschieden geformten Kernen auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet. Man unterscheidet drei Arten der Granulozyten – Neutrophile, Eosinophile und Basophile, deren Namen sich anhand der Färbung des Protoplasmas ergeben haben. Neutrophile machen unter normalen Umständen 40-70 % aller Leukozyten aus, während Eosinophile und Basophile zusammen nur 5 % ausmachen. Eine gemeinsame morphologische Eigenschaft der Granulozyten ist das Innehaben vieler Granula im Zytoplasma dieser Zellen. Während Neutrophile und Eosinophile die Granula für Verdauung und Zerstörung phagozytierter Partikel nutzen, sind bei den Basophilen die Granula mit Histamin gefüllt, welches nach lokaler Abgabe in inflammatorischen Regionen eine vasodilatative Wirkung hat (Bos, 1997).

In einem ca. zweiwöchigen Prozess reifen Granulozyten aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Im Falle einer Infektion gelangen sie durch einen Chemokin-vermittelten Prozess über das Blut ins betroffene Gewebe. Dort nehmen sie die infektiösauslösenden Mikroben und Erreger durch Phagozytose auf und verdauen diese. Des Weiteren sezernieren sie zur Bekämpfung der Erreger zytotoxische Substanzen wie z.B. Wasserstoffperoxid, aber auch antimikrobielle Proteine und Peptide wie z.B. Defensine (Clark *et al.* 1975; Lehrer *et al.* 1993).

Als neuen Abwehrmechanismus entdeckte die Arbeitsgruppe Brinkmann *et al.* kürzlich das NET – *Neutrophils Extracellular Traps*. Bei einer Aktivierung der Neutrophile *in vitro* mit Phorbolmyristatester (PMA), Interleukin 8 (IL-8) oder Lipopolysacchariden (LPS) bilden diese aus granulären Proteinen und Chromatin eine faserige Matrix, mit welcher Bakterien gebunden und virulente Faktoren degeneriert werden (Brinkmann *et al.* 2004).

In vitro gelingt die Generierung neutrophiler Granulozyten aus Leukozyten des peripheren Blutes, nach Aufreinigung und Trennung von anderen zellulären Bestandteilen und Proteinen durch Zentrifugation und anschließende Kultivierung über einen längeren Zeitraum von über 16 Tagen unter Zugabe des Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) (DeBruyn *et al.* 2003).

2.1.2 Oberflächenmerkmale von Immunzellen

Immunzellen besitzen Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, welche je nach Differenzierungs- und Aktivierungsgrad ein charakteristisches Profil aufweisen und somit auch der Identifizierung verschiedener Zellen dienen. Dies ist besonders nützlich, wenn makroskopisch / morphologisch keine Differenzen vorliegen. Zur Markierung und Unterscheidung der Leukozyten wurden tausende monoklonaler Antikörper produziert, die mit Oberflächenmolekülen reagieren sollten und sorgten so mit ihren verschiedenen Namen für Verwirrung. Um deshalb die Kommunikation zu erleichtern, wurden Antikörper, die mit ähnlichen Antigenen reagierten zu Clustern – CD, „*cluster of differentiation*“ – zusammengefasst und die Cluster bekamen laufende Nummern (Chan *et al.* 1988; Schütt, 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die in murinen myeloiden Zellen durchflusszytometrisch untersuchten Oberflächenmarker CD11c, F4/80 und MHC II kurz beschrieben.

CD11c ist ein Transmembranprotein, welches zusammen mit CD18 einen Rezeptorkomplex CD11c/CD18 bildet und an verschiedenen biologischen Eigenschaften wie der Zelladhäsion, Antigenpräsentation, Zytotoxizität oder Phagozytose beteiligt ist. Insbesondere wird CD11c auf der Oberfläche dendritischer Zellen exprimiert, findet sich aber in einem geringen Aus-

maß auch auf anderen Zellen wie Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen wieder (Stewart *et al.* 1995; Corbi *et al.* 1997; Singh-Jasuja *et al.* 2013).

F4/80 ist ein Glykoprotein, welches als Marker zur Detektion von reifen Makrophagen dient. Er ist zwar ein selektiver, jedoch kein exklusiver Makrophagenmarker, da sowohl Eosinophile als auch epithelial-ähnliche Zellen diesen Antikörper binden (Penn *et al.* 1993; Leenen *et al.* 1994).

MHC II (*Major Histocompatibility Complex Class II*) ist eine Klasse heterodimerer integraler Membranproteine, welche von Antigen-präsentierenden Immunzellen (einschließlich dendritischer Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen) auf ihrer Oberfläche präsentiert und von T-Zellen (CD4⁺) erkannt werden (Lutz *et al.* 2002; Ting *et al.* 2002).

2.2 Arylhydrocarbon Rezeptor

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) bietet seit fast 40 Jahren spannenden Forschungsstoff für Naturwissenschaftler. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1976 (Poland *et al.* 1976) wurde er primär als Ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor mit dem durch polyzyklische und/oder halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe verursachten Mechanismus in Verbindung gebracht, wodurch er auch den Namen „Dioxin-Rezeptor“ erhielt (Okey *et al.* 1979; Poland *et al.* 1982). In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass er zusätzlich in zahlreichen anderen Bereichen wie z.B. grundlegender Zellbiologie, Entwicklung des Organismus oder im Immunsystem eine Rolle spielt (Puga *et al.* 2005; Harper *et al.* 2006; Stevens *et al.*, 2009; Marlowe *et al.* 2005). Weiterhin konnte eine Wechselbeziehung des AhR mit anderen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren wie dem Estrogen-Rezeptor, Glucocorticoid-Rezeptor, Retinoid-Rezeptor oder dem EGF-Rezeptor nachgewiesen werden (Matthews *et al.* 2006; Beischlag *et al.* 2008; Haarmann-Stemmann *et al.* 2009; Denison *et al.* 2011). Bis heute sind jedoch seine eigentliche physiologische Funktion und evolutionärer Hintergrund nicht eindeutig geklärt.

Der Ah-Rezeptor ist ein intrazelluläres, zytoplasmatisches Protein und gehört zur Familie der basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) Transkriptionsfaktoren. Nach Bindung eines Liganden reguliert der AhR die Expression einer großen Anzahl verschiedener Gene (Burbach *et al.* 1992; Fukunaga *et al.* 1995, Denison *et al.* 2003). Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Ah-Rezeptors mit seinen funktionellen Domänen.

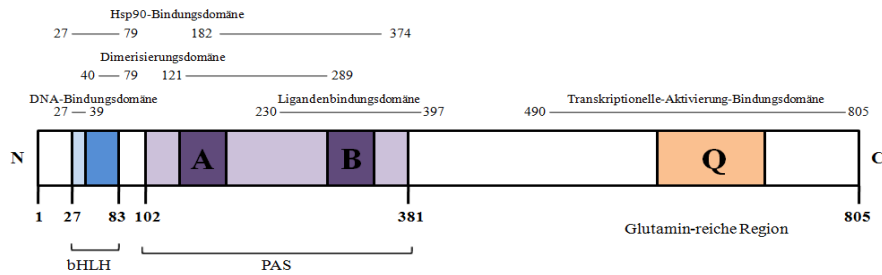


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Ah-Rezeptors mit funktionellen Domänen (nach Denison *et al.* 2002).

Am N-Terminus befindet sich die basic Region (b), welche für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich ist. An die b-Region angrenzend ist die HLH-Domäne, die die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht (Jones, 2004). Es folgt die PAS-Region (Per-Arnt-Sim) mit den zwei Domänen PAS-A und PAS-B. Diese Domänen weisen eine große Sequenzhomologie zu Proteindomänen auf, die ursprünglich in der *Drosophila gene period* (Per) und *single-minded* (Sim) und dem AhR-Dimerisierungspartner, dem *Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT) gefunden wurden (Ema *et al.* 1992). Die PAS-Domänen unterstützen die Interaktion des AhR mit anderen PAS-haltigen Proteinen, wie z.B. ARNT. Innerhalb der PAS-B Domäne befindet sich die Ligandenbindungsdomäne, welche spezifische, für die Bindung des Liganden benötigte Aminosäuren, enthält (Coumailleau *et al.* 1995; Goryo *et al.* 2007). Schließlich befindet sich am C-Terminus des Proteins eine Glutamin-reiche Region (Q-Region), welche an der Rekrutierung und Transaktivierung von Co-Aktivatoren beteiligt ist (Kumar *et al.* 2001).

2.2.1 AhR-Signaltransduktion

Der schematische Mechanismus AhR-vermittelter Signaltransduktion ist in der nachfolgenden Abbildung 3 dargestellt. In Abwesenheit eines Liganden liegt der inaktive Ah Rezeptor in der Zelle als ein zytosolischer Multiproteinkomplex mit zwei Hsp90 (heat shock protein 90 kDa), p23 (co-chaperone protein 23 kDa) und XAP2 (hepatitis b virus X-associated protein) vor. Gelangt nun ein Ligand (z.B. TCDD) in die Zelle, bindet dieser an den Ah Rezeptor durch Erkennung der NLS-Region (nuclear localization sequence) in der DNA-bindenden Domäne. Nach Dissoziation von XAP2 transloziert der nun aktivierte AhR-Komplex in den Zellkern. Im Zellkern werden die Chaperone-Proteine (Hsp90 und p23) durch ARNT, ebenfalls einem Mitglied der bHLH/PAS-Familie, verdrängt. Das resultierende AhR/ARNT-Dimer bindet an die DRE-Region (dioxin-responsive elements) der DNA und aktiviert mit Hilfe von Co-

Aktivatoren wie z.B. CBP/p300, SRC-1, NCoA-2, p/CIP, RIP140 die Transkription verschiedener Gene wie CYPs, TiPARP oder auch AhRR. AhRR – der konstitutiv aktive Repressor des Ah Rezeptors ohne einer Transaktivierungsdomäne – ist die Schlüsselkomponente des Rückkopplungssystems des AhR-Signalmechanismus. Dieses Protein bindet kompetitiv an den AhR-Dimerisierungspartner ARNT, bildet ein inaktives AhRR/ARNT-Komplex und stoppt so die Transkription. AhR wird dabei aus dem Nukleus abtransportiert und durch Proteasome im Zytoplasma abgebaut (Denison *et al.* 2003; Evans *et al.* 2008; Fujii-Kuriyama *et al.* 2010; Denison *et al.* 2011).

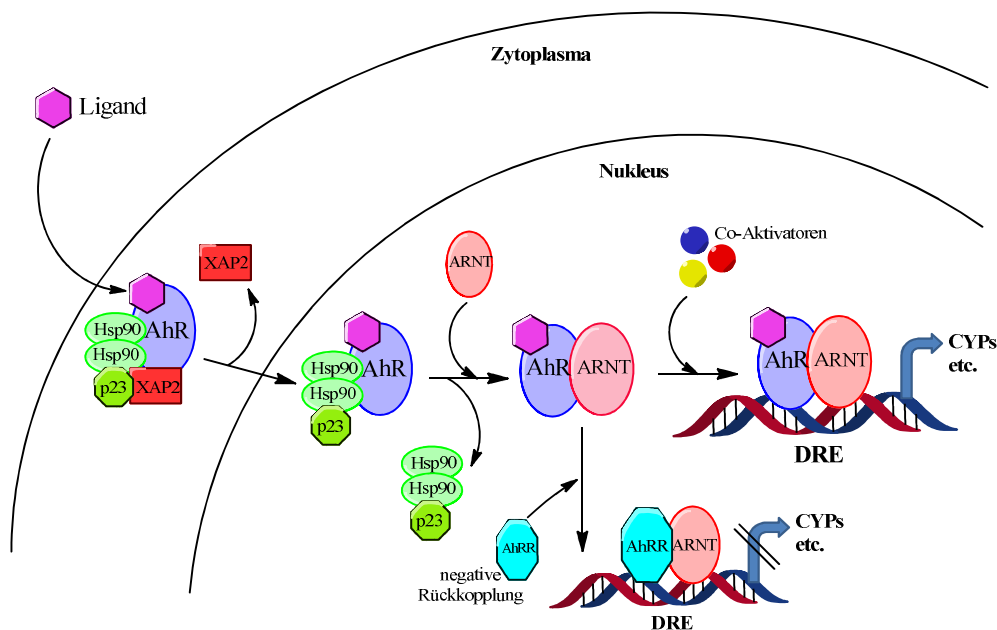


Abbildung 3: Schematische Darstellung des AhR-Signalweges (nach Denison *et al.* 2011). Abkürzungen: AhR=Arylhydrocarbon Rezeptor; AhRR= AhR Repressor; ARNT=Arylhydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator; CYP=Cytochrom P450; DRE=Dioxin-responsive element; Hsp90=heat shock protein 90 kDa; p23=23kDa co-chaperone protein 23; XAP2=hepatitis b virus X-associated protein 2.

Der aktivierte AhR reguliert eine Vielzahl an Genen – die sogenannte AhR-Genbatterie. Dazu gehören Gene des Phase I sowie Phase II Fremdstoffmetabolismus, einschließlich der Enzyme der Cytochrom P450 (CYP)- Familie, UDP-Glucuronosyltransferase (*UGT1A6/UGT1A9*), Glutathion-S-transferase Ya (*GSTYA*), Aldehyd-3-dehydrogenase (*ALDH3*), NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase (*NQO1*) (Rowlands *et al.* 1997; Schrenk, 1998; Nebert *et al.* 2000). Die Expressionshöhe der genannten Gene ist dabei spezies-, gewebe- und zelltypabhängig (Denison *et al.* 2003). Die Expressionsunterschiede zwischen den Spezies können dabei auf sequenzielle Differenzen in der DRE-Region zurückgeführt werden (Sun *et al.* 2004).

2.2.2 Liganden des AhR

Der AhR kann ein breites Spektrum strukturell diverser Verbindungen binden und dadurch aktiviert werden. Diese Liganden des Ah-Rezeptors können dabei in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden: Synthetische Liganden – Verbindungen, anthropogenen und nicht-biologischen Ursprungs – und natürlich vorkommende Liganden – Verbindungen, die in biologischen Systemen als Resultate natürlicher Prozesse entstehen. Verbindungen beider Kategorien werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

2.2.2.1 Synthetische Liganden

Zu den in der Literatur wohl am besten beschriebenen und charakterisierten Liganden des Ah-Rezeptors zählen synthetische Verbindungen, die eine hohe Affinität gegenüber dem Rezeptor besitzen. Zu dieser Kategorie gehört eine Vielfalt ubiquitär vorkommender, planarer, hydrophober Umweltkontaminanten, wie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAKs) sowie nicht-halogenierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs). Strukturformeln einiger ausgewählter Vertreter dieser synthetischen Liganden sind in der Abbildung 4 dargestellt.

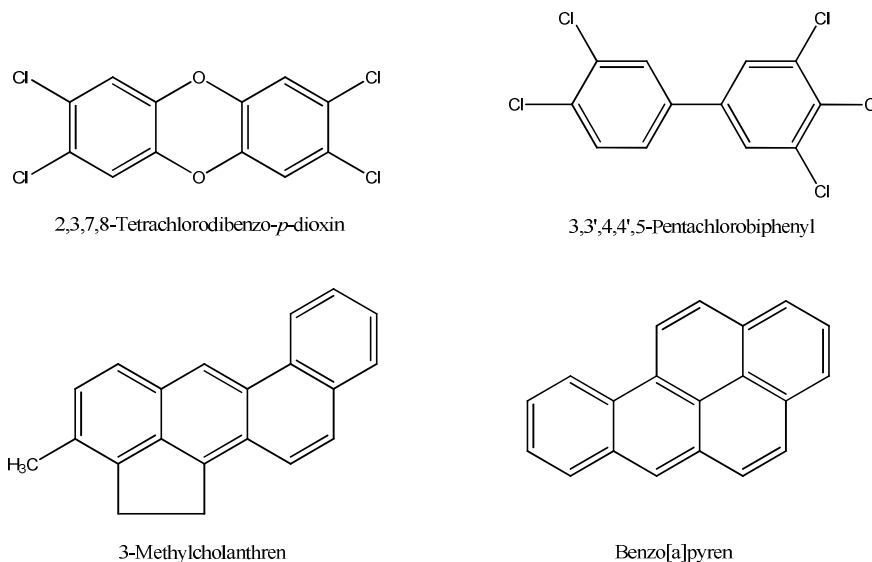


Abbildung 4: Strukturformeln einiger synthetischer AhR-Liganden.

Diese Verbindungen entstehen als Nebenprodukte infolge chemischer Synthese oder Verbrennungsprozesse und sind metabolisch und chemisch sehr persistent. Die wohl prominenteste Verbindung dieser synthetischen Substanzen ist 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin,

kurz TCDD. Diese ist der potenteste, bislang bekannte Agonist des Ah-Rezeptors. TCDD führt zur massiven Expression des *CYP1A1* und verursacht eine Reihe verschiedener spezies- und gewebespezifischer, toxischer und biologischer Effekte, darunter Chlorakne, Karzinogenität, Teratogenität oder Immunsuppression (Bock, 1993; Hankinson, 1995; Safe, 1995; Denison *et al.* 2002; Denison *et al.* 2003).

2.2.2.2 Natürliche Liganden

Bei den natürlich vorkommenden, biologischen AhR-Liganden kann nochmals zwischen exogenen, also von außen kommenden Verbindungen – z.B. in Lebensmitteln enthaltenen Inhaltsstoffen – und endogenen, also körpereigenen, Liganden unterschieden werden.

Viele Lebensmittel wie Obst, Gemüse, Tees oder Kräuter haben Inhaltsstoffe, die den AhR-Signalweg aktivieren oder inhibieren können. Dazu zählen unter anderem Flavonioide, Polyphenole, Carotinoide, Curcumin oder Indol-3-Carbinol (I3C) (Bjeldanes *et al.* 1991; Gradelet *et al.* 1996; Ciolino *et al.* 1998; MacDonald *et al.* 2001; Denison *et al.* 2003). Diese Verbindungen – einige Strukturformeln in Abbildung 5 dargestellt – sind selbst nur schwache Aktivatoren des AhR, das Aktivierungspotential steigt jedoch durch deren metabolische Umwandlung. So ist Indolo[3,2b]carbazol (ICZ), das Kondensationsprodukt von I3C, der bislang „natürliche“ AhR-Ligand höchster Affinität und ein potenter Induktor AhR-abhängiger Genexpression (Gillner *et al.* 1993; Bjeldanes *et al.* 1991; Denison *et al.* 2003).

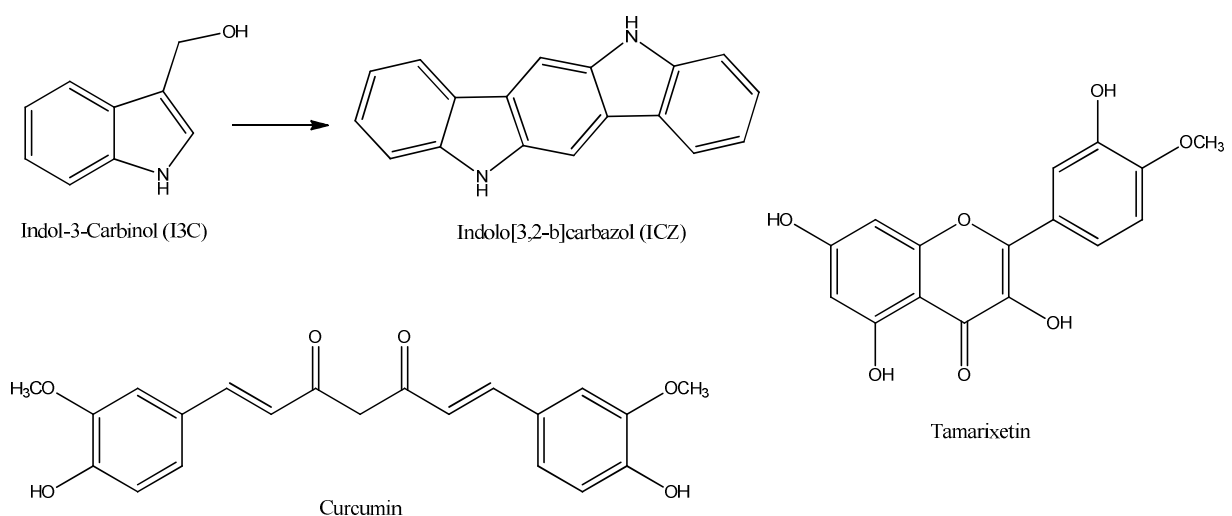


Abbildung 5: Strukturformeln ausgewählter, natürlich vorkommender AhR-Liganden.

Seit einigen Jahren suchen Wissenschaftler *bona fide* nach dem/den „endogenen Liganden“ des Ah-Rezeptors zum besseren Verständnis seiner physiologischen und entwicklungsbiologischen Rolle im Organismus. Dabei wurden einige Modelle entwickelt, die auf unterschiedlichen Ideen basieren wie z.B., dass sich der AhR im Zuge des adaptiven Metabolismus entwickelte, um schädliche (noch nicht entdeckte), endogen generierte Verbindungen, z:B. Nebenprodukte enzymatischer Reaktionen, zu eliminieren. Oder, dass der AhR einen Teil eines essentiellen Signalweges bildet, wo er nach Bildung eines endogenen Liganden aktiviert wird und so eventuell Entwicklungsprozesse induziert (Nguyen *et al.* 2008). Von besonderem Interesse bei dieser Suche sind Substanzen, von denen man weiß, dass sie in höheren Organismen endogen synthetisiert werden. In zahlreichen Studien wurden verschiedene Verbindungsklassen auf ihr AhR-Aktivierungspotential untersucht. Einige davon sind in der nachstehenden Abbildung 6 aufgeführt. Dabei wurden z.B. Indigo und Indirubin, im Urin vorkommende Verbindungen, als endogene Liganden vorgeschlagen, wobei Indirubin als potentere der beiden Substanzen erscheint (Guengerich *et al.* 2004). Weiterhin werden Häm- und Arachidonsäure-Metabolite sowie Tryptophan und seine Metabolite und UV-Photoprodukte als endogene Liganden des Ah-Rezeptors diskutiert (Kapitulnik *et al.* 1993; Heath-Pagliuso *et al.* 1998; Schaldach *et al.* 1999; Seeds *et al.* 1999; Kroetz *et al.* 2002; Nguyen *et al.* 2008; Opitz *et al.* 2011).

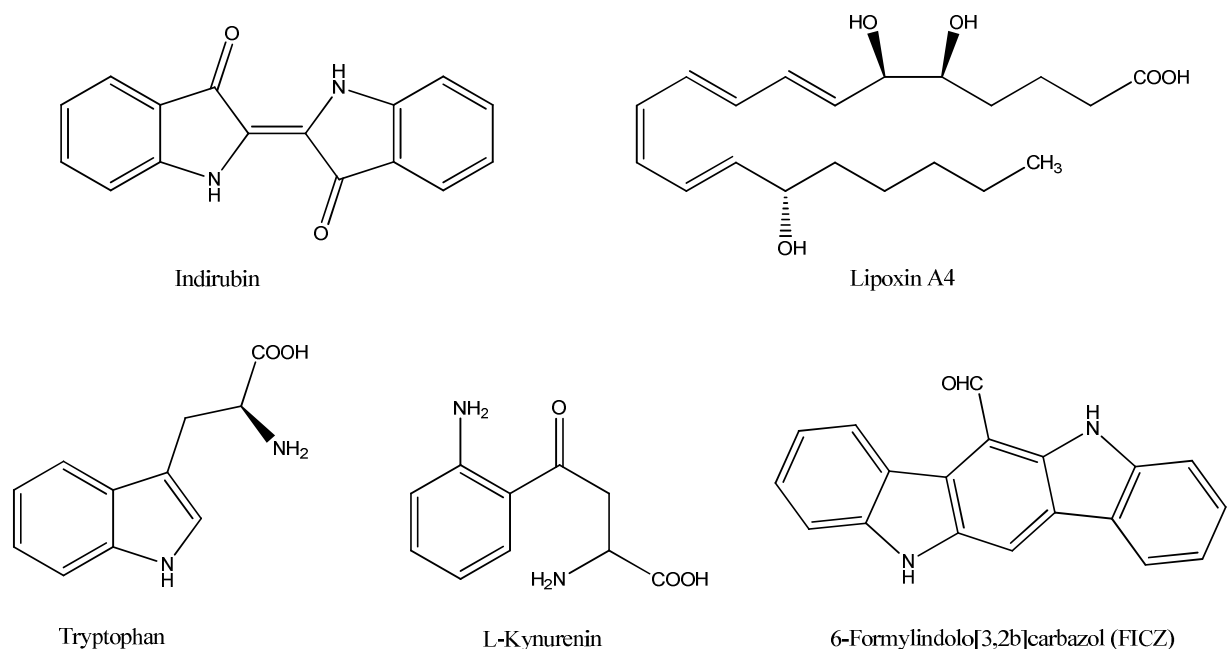


Abbildung 6: Mögliche endogene Liganden des Ah-Rezeptors.

2.2.3 Rolle des Ah-Rezeptors im Immunsystem

Viele Jahre wurde der Ah-Rezeptor fast ausschließlich hinsichtlich seiner Rolle in der Pharmakologie und Toxikologie von Xenobiotika untersucht. Erst in den letzten Jahren stieg das Interesse am AhR im Bereich der Immunologie. Die medizinische Beschreibung der Symptome bei Patienten nach einer TCDD-Exposition sowie zahlreiche Tierstudien zeigten mit Thymusinvolution, Depletion anderer lymphoider Organe oder Reduktion der Lymphozytenzahl und anomale Zytokinproduktion, den gravierenden Einfluss des aktivierten Dioxin-Rezeptors auf das Immunsystem (Holsapple *et al.* 1991; Vogel *et al.* 1997; Stockinger *et al.* 2014). Neben der Untersuchung adverser immunologischer Effekte, welche durch Umweltkontaminanten verursacht werden, möchte man auch die grundlegende physiologische Funktion des Ah-Rezeptors im Immunsystem in Abwesenheit von Xenobiotika verstehen.

Basierend auf Microarray-Untersuchungen nimmt man an, dass der Ah-Rezeptor fast ubiquitär in Zellen des nativen und adaptiven Immunsystems vorkommt, wenn auch in unterschiedlichen Expressionshöhen, und scheint viele verschiedene Funktionen dieser Zellen zu regulieren (Frericks *et al.* 2006; Stockinger *et al.* 2011). So bewirkt die Aktivierung des Ah-Rezeptors durch einen Liganden wie TCDD eine erhöhte Infiltration von Neutrophilen und eine gesteigerte IFN γ Sekretion, was mit einer reduzierten Immunantwort korreliert. Dieser Effekt konnte bei Behandlung AhR-defizienter Mäuse mit TCDD nicht beobachtet werden, was die AhR-Abhängigkeit des Mechanismus nahelegt, aber noch nicht eindeutig belegt werden konnte (Teske *et al.* 2005; Hao *et al.* 2013).

In Antigen-präsentierenden Zellen – dendritischen Zellen und Makrophagen – steigt der Genexpressionslevel des Ah-Rezeptors nicht nur nach Behandlung mit TCDD, sondern auch bei Simulation einer Infektion durch Behandlung dieser Zellen mit LPS. Der aktivierte AhR induziert die Differenzierung und Aktivierung dieser Zellen und scheint eine anti-inflammatorische Rolle zu spielen. So zeigen AhR-defiziente Makrophagen in Folge einer LPS-Stimulation eine gesteigerte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF α , während dendritische Zellen mit einem AhR-Mangel nach LPS-Behandlung weniger des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 produzieren (Kimura *et al.* 2009; Sekine *et al.* 2009; Hao *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2013).

Auch in Zellen des adaptiven Immunsystems spielt der Ah-Rezeptor eine wichtige Rolle. B-Lymphozyten sind die einzigen bekannten Zellen, welche Immunglobulin exprimieren und nach Aktivierung Antikörper sezernieren. Aktivierung des AhR durch TCDD führt zu Suppression der B-Zellen und somit zu einer beeinträchtigten humoralen Immunantwort u.a. durch signifikante Reduktion der Antikörperproduktion (North *et al.* 2010; Sulentic *et al.* 2011; Hao *et al.* 2013).

Hohe AhR-Expressionslevel wurden auch in T-Lymphozyten, insbesondere in IL-17-produzierenden T-Helferzellen (Th17), nachgewiesen (Veldhoen *et al.* 2008). Der AhR reguliert die Differenzierung von Th17. So resultiert die Aktivierung des Ah-Rezeptors in einem Anstieg der Anzahl von Th17-Zellen sowie einer gesteigerter Zytokinproduktion, wobei diese Effekte Ligand-abhängig zu sein scheinen (Nguyen *et al.* 2013). Die Beeinflussung der T-Zellen ist von besonderer Bedeutung bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis oder Myocarditis (Stockinger, 2009; Esser *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2013; Hao *et al.* 2013).

2.3 Vitamin D

Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde Vitamin D zum ersten Mal mit Rachitis – einer Erkrankung des wachsenden Knochens – in Verbindung gebracht. Chemisch gesehen werden unter dem Begriff Vitamin D verschiedene Cholesterolderivate zusammengefasst, die nach klassischem Verständnis typische Effekte auf die Kalziumhomöostase ausüben. Durch Einwirkung von UVB-Strahlung (280 - 315 nm) wird in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol in einer photochemischen Reaktion, gefolgt von einer thermischen Umwandlung, das Vitamin D₃ gebildet. Dieses photochemisch generierte Vitamin D₃ wird absorbiert und gelangt in die Leber, wo es enzymatisch durch CYP27A1, CYP2R1 zu 25-Hydroxy Vitamin D₃ (Calcidiol), der im Körper am meisten vorkommenden Vitamin-D-Form, umgewandelt wird. Anschließend erfolgt ein weiterer enzymatischer Hydroxylierungsschritt durch das CYP27B1 in der Niere, wodurch die biologisch aktive Form, das 1,25(OH)₂Vitamin-D₃ (Calcitriol), entsteht (Abbildung 7). Das Calcitriol erreicht verschiedene Zielgewebe, bindet dort an ein intrazelluläres Rezeptorprotein (Vitamin-D-Rezeptor, siehe Kapitel 2.3.1) und initiiert so die Transkription verschiedener Gene, resultierend in der Translation abbauender Enzyme. Schließlich wird das Calcitriol durch CYP24A1 zunächst an Position 24 hydroxyliert und letztlich zu Calcitriolsäure katabolisiert (Abbildung 7). Auf Grund dieser endogenen Synthese und der Tatsache, dass die Wirkung der Verbindung neben dem Syntheseort auch andere Gewebe betrifft, lässt sich das Vitamin D als Hormon interpretieren. (Leitzmann, 2009; Holick, 2010; Yang *et al.* 2013).

Neben der UVB-vermittelten Synthese im Organismus kann Vitamin D₃ auch mit der Nahrung aufgenommen werden. Es ist insbesondere in fettreichen Fischen wie Lachs, Aal oder Hering vorhanden, aber auch Milchprodukte und Eier weisen geringe Mengen an Vitamin D₃ auf (Wolters *et al.* 2005; Leitzmann, 2009).

Zusammen mit Calcitonin und Parathormon spielt Vitamin D eine entscheidende Rolle sowohl bei der systemischen Kalzium- und Phosphathomöostase als auch bei der intrazellulären Aufrechterhaltung des Kalziumspiegels. Die aktive Form – Calcitriol – fungiert als Ligand nukleärer Rezeptoren (VDR) und reguliert die Expression von Targetgenen in mehr als 30 Zielgeweben, darunter Darm, Knochen und Niere (Wolters *et al.* 2005). So ist es nicht verwunderlich, dass Störungen im Vitamin-D-Metabolismus bzw. eine unzureichende Vitamin D-Zufuhr enorme Auswirkungen auf den Organismus haben. Osteopathien, Diabetes, Krebs und auch Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose werden u.a. mit Störungen des Vitamin D-Haushalts in Verbindung gebracht (Guyton *et al.* 2001; Tuohimaa *et al.* 2001; Munger *et al.* 2004; Wolters *et al.* 2005).

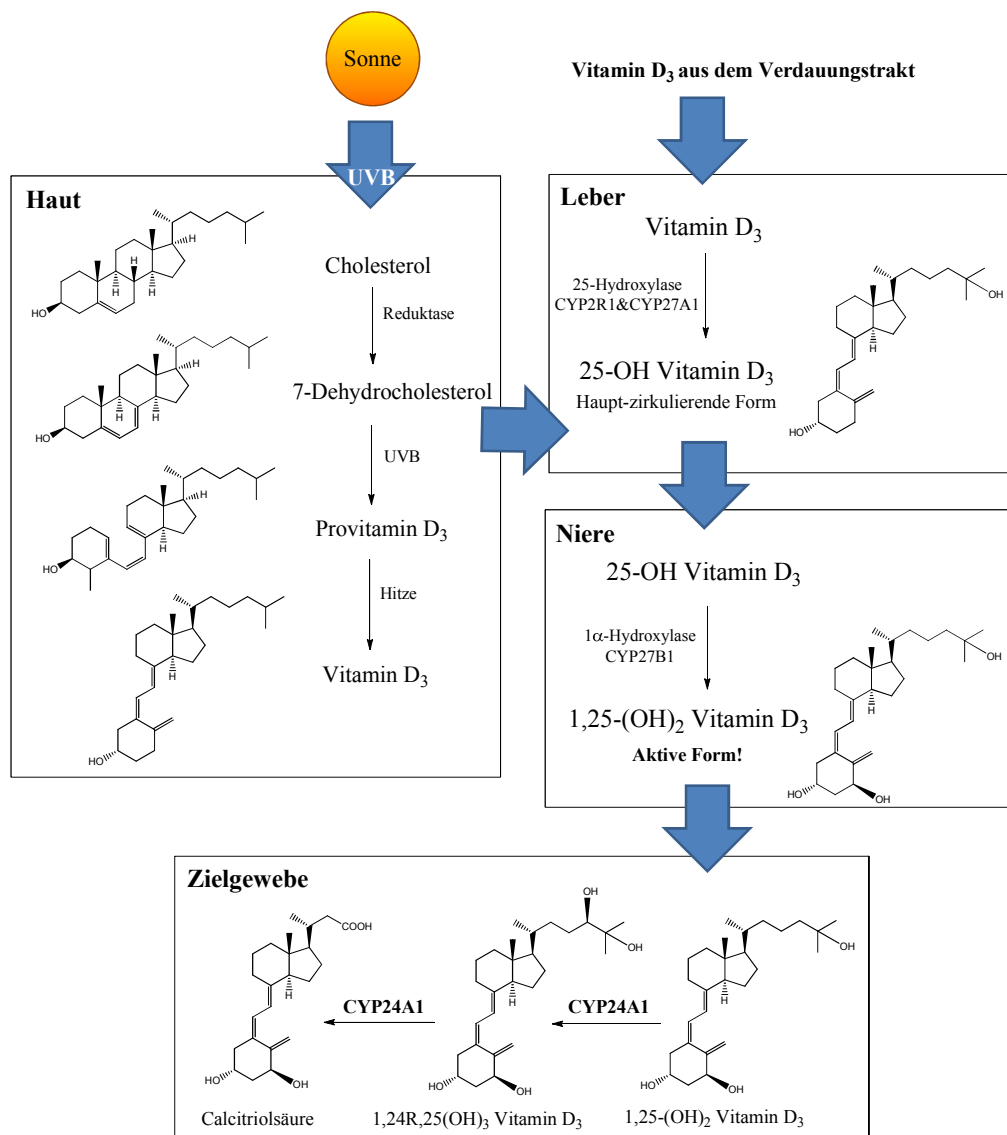


Abbildung 7: Metabolismus von Vitamin D (nach Yang *et al.* 2013; Holick, 2010).

2.3.1 Vitamin-D-Rezeptor

Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) ist ein endokrines Mitglied der Superfamilie nukleärer Rezeptoren (NR1H1) mit hoher struktureller und Ligand-bindender Homologie in verschiedenen Spezies und agiert als ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor (Moore *et al.* 2006; Bouillon *et al.* 2008). Das 48 kDa schwere Protein, bestehend aus 427 Aminosäuren und ist in verschiedene Domänen unterteilt. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 8 dargestellt. Am N-Terminus befinden sich die konservierte DNA-Bindungsdomäne sowie die Domänen für nukleäre Lokalisation, gefolgt von einer flexiblen Gelenk-Region. Schließlich, am Carboxy-Terminus, befindet sich die Ligand-bindende Tasche, welche als Zwischenabschnitte die Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomänen (AF-2) beinhaltet. Die Phosphorylierung zweier Serin-Aminosäuren an Position 51 und 208 dient der Stabilisierung des Proteins (Dusso *et al.* 2005; Deeb *et al.* 2007; Campbell *et al.* 2010).

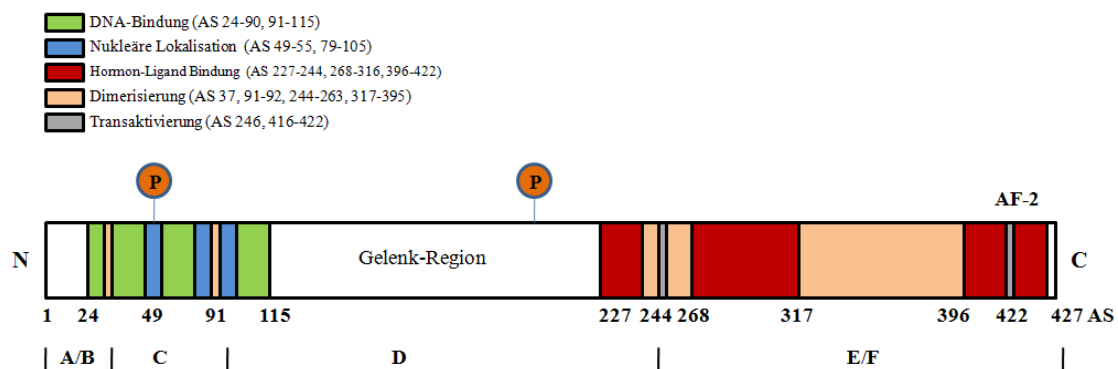


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des Vitamin-D-Rezeptors mit funktionellen Domänen (nach Deeb *et al.* 2007).

VDR ist hochaffin gegenüber dem biologisch aktiven Vitamin-D-Metabolit $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D₃ (Calcitriol) und ist unabdingbar für die Vermittlung der hormonalen Wirkung von Calcitriol in Zielzellen. Als Transkriptionsfaktor reguliert VDR die Transkription verschiedener Gene und beeinflusst so ein breites Spektrum diverser Vorgänge wie z.B. Kalziumhomöostase, Blutdruck und Prozesse im Immunsystem. Sein universelles Vorkommen in allen Geweben sowie die enormen Auswirkungen auf den Organismus bei Auftreten von Mutationen und Defekten unterstreichen die Relevanz des Rezeptors (Dusso *et al.* 2005; Deeb *et al.* 2007; Bouillon *et al.* 2008).

2.3.1.1 VDR-Signaltransduktion

Ungebunden liegt der Vitamin-D-Rezeptor meist im Zytoplasma vor. Gelangt der aktive Vitamin-D-Metabolit Calcitriol in die Zelle, bindet dieser an die entsprechende Ligand-bindende Domäne des Rezeptors. Die nukleären Lokalisierungssignale dirigieren den Rezeptor in den Zellkern. Mit Hilfe der Dimerisierungsdomäne assoziiert VDR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bildet ein Heterodimer. Der so entstandene Komplex bindet nun durch die DNA-Bindungsdomäne an die Vitamin-D-response elements (VDREs) in der Promoter-Region von Targetgenen. Nach Dissoziation verschiedener Co-Repressoren erfährt VDR eine Konformationsänderung, was die Interaktion der AF-2 Domäne mit diversen stimulierenden Co-Aktivatoren erlaubt und die Transkription von Targetgenen wie *CYP24A1* vermittelt (Abbildung 9) (Dusso *et al.* 2005; Deeb *et al.* 2007; Campbell *et al.* 2010).

Neben der direkten Aktivierung der Gentranskription kann der VDR auch direkt die Transkription von Genen (wie z.B. *CYP27B1* oder *PTH*) herunter regulieren. Dies erfolgt durch Bindung von VDR/RXR-Heterodimeren aber auch VDR-Homodimeren an negative response elements – nVDREs, die in ihrer Konsensussequenz stark den VDRE ähneln und an den VDR-interacting repressor gebunden sind. Der exakte Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Murayama *et al.* 1998; Bouillon *et al.* 2008).

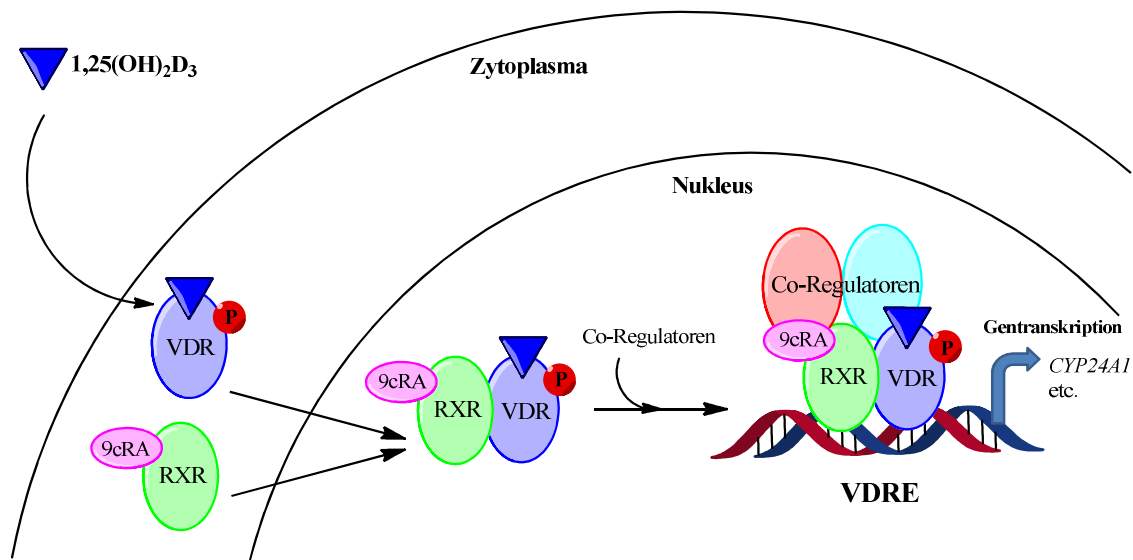


Abbildung 9: Schematische Darstellung der VDR-Signaltransduktion (nach Deeb *et al.* 2007).

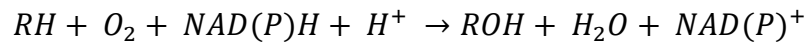
2.3.2 Rolle des Vitamin-D-Rezeptors im Immunsystem

Der Vitamin-D-Rezeptor wird in fast allen Zellen des Immunsystems exprimiert, einschließlich Antigen-präsentierender Zellen (Makrophagen und dendritischen Zellen), in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten aber auch in B-Zellen und Neutrophilen (Veldman *et al.* 2000; Chen *et al.* 2007b; Baeke *et al.* 2010). Dies führte zu der Erkenntnis, dass VDR eine zentrale und komplexe immunmodulatorische Rolle spielt, was bereits anhand zahlreicher Untersuchungen belegt werden konnte. In Immunzellen, wie auch in anderen Geweben, interagiert der VDR nach Bindung seines Liganden 1,25-(OH)₂D direkt mit den VDREs in der Promoter-Region von Zielgenen und reguliert so die Eigenschaften von Immunzellen. Es konnte z.B. *in vitro* gezeigt werden, dass Monozyten durch Behandlung mit Calcitriol differenzieren und den Phänotyp von Makrophagen annehmen. Des Weiteren reagieren Makrophagen auf Calcitriol mit gesteigerter MHCII-Präsentation, Aktivierung des Toll-like-Rezeptors und erhöhter Kapazität für Chemotaxis und Phagozytose. Diese Mechanismen erwiesen sich mitunter als antimikrobiell z.B. gegenüber dem *Mycobacterium tuberculosis* (Xu *et al.* 1993; Griffin *et al.* 2003; Liu *et al.* 2006; Baeke *et al.* 2010). Eine wichtige Rolle spielt 1,25(OH)₂D₃ auch bei der Initiation der Immunantwort. In dendritischen Zellen (DZ) stimuliert es die Erfassung und Bindung von Antigenen durch Hochregulation des dafür wichtigen Mannose-Rezeptors. Weiterhin moduliert Calcitriol die DZ-vermittelte Zytokin-Produktion. Es inhibiert z.B. die IL-12 und IL-23 Sekretion (wichtig für Th1/Th17 Differenzierung) und verstärkt die Ausschüttung des antiinflammatorischen IL-10 (Piemonti *et al.* 2000; Baeke *et al.* 2010).

Nicht weniger beeindruckend sind die Effekte des Calcitriols auf Zellen des adaptiven Immunsystems, den T- und B-Lymphozyten. In T-Zellen scheint die Aktivität und Expression des VDR in allen Phasen – von Entwicklung über Differenzierung bis hin zur Zytokinausschüttung – wichtig zu sein. *In vitro* Studien zeigten z.B. einen Zusammenhang des VDR mit Antiproliferation von T-Zellen sowie Inhibition der proinflammatorischen Aktivität von CD4⁺ Th1-Zellen und deren Zytokin-Produktion. Es wurde eine verminderte IL-2-, TNF α - und IFN γ -Sekretion festgestellt, vermutlich durch Bindung des VDR/RXR-Komplexes an nVDREs der Targetgene (Cippitelli *et al.* 1998; Hakim *et al.* 2003; Kongsbak *et al.* 2013). Der Einfluss des Vitamin-D-Rezeptors auf B-Zellen ist bislang nur spärlich untersucht und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Forscher die Anwesenheit des VDR in B-Zellen nicht nachweisen konnten (Veldman *et al.* 2000), dokumentieren andere Arbeitsgruppen potente, direkte Effekte des Calcitriols auf B-Lymphozyten darunter Inhibition der Proliferation, Generierung von B-Gedächtniszellen, Plasmazell-Differenzierung und gesteigerte Immunglobulin Produktion (Chen *et al.* 2007a). Diese divergierenden Ergebnisse verlangen jedoch nach weiteren Untersuchungen.

2.3.3 Cytochrom P450 Enzyme

Cytochrom P450 Enzyme (CYP) sind Häm-haltige Monooxygenasen und kommen ubiquitär vor – in Tieren, Insekten, Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Auf Grund ihrer enzymatischen Aktivität spielen sie eine Schlüsselrolle in der Phase I des Fremdstoffmetabolismus. Sie katalysieren eine Reihe verschiedener oxidativer Reaktionen, darunter *N*-Oxidation, Epoxidierung, Dealkylierung sowie aliphatische und aromatische Hydroxylierung, wodurch lipophile Substanzen an Hydrophilie gewinnen und somit besser aus dem Körper ausgeschieden werden können. Als Substrate fungieren dabei endogene Verbindungen wie zum Beispiel Prostaglandine oder Steroidhormone und exogene Substanzen, wie Arzneimittel aber auch PAKs, Dioxine, etc. Die oxidative Biotransformation kann neben der Detoxifizierung von Fremdstoffen auch zur Bildung karzinogener Metabolite führen. Die chemische Gleichung der NAD(P)H-abhängigen Monooxygenase-Reaktion ist in der nachfolgenden Formel dargestellt:



Für diese Vielfalt an Substraten und verschiedenen katalysierten Reaktionen werden entsprechend viele Enzyme benötigt. Bis heute sind mehr als 3000 P450-Gene bzw. cDNAs beschrieben und werden in mehr als 200 CYP-Familien unterteilt (siehe dazu <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>). Die Nomenklatur folgt dabei folgendem System: Nach der allgemeinen Bezeichnung „CYP“ für Cytochrom P450 folgt eine arabische Ziffer, die die Genfamilie kennzeichnet. Der anschließende Buchstabe bezeichnet die Subfamilie, während die folgende zweite Ziffer das einzelne Enzym charakterisiert. Mitglieder einzelner Genfamilien sind über eine >40 % Sequenzhomologie definiert. Im humanen Genom sind 58 verschiedene CYP-Gene bekannt (Bernhardt, 2004; Ortiz de Montellano, 2010). In Säugetieren werden Cytochrom P450 Enzyme simultan in verschiedenen Geweben exprimiert, darunter Leber, Niere und Nebenniere, Lunge, Keimdrüsen, Gehirn u.v.m. Die Konzentration der CYPs variiert dabei stark, wobei die Leber die höchste Konzentration aufweist (Nishimura *et al.* 2003).

2.3.3.1 CYP1-Enzyme

Eines der wohl am weitesten und besten untersuchten Gene im Zusammenhang mit dem Ah-Rezeptor ist das Phase I Enzym *CYP1A1*, auch unter dem Namen Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) bekannt. Die Induktion der *CYP1A1*-Genexpression gilt als Biomarker für die biologische Aktivität von AhR-Liganden. Zusammen mit den beiden anderen Mitgliedern der CYP1-Familie - *CYP1A2* und *CYP1B1* – katalysiert *CYP1A1* die AhR-vermittelte metaboli-

sche Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe sowie heterozyklischer und aromatischer Arylamine und führen so zur Bildung ultimaler Kanzerogene (Murray *et al.* 1988; Miller *et al.* 2001; Ma *et al.* 2007).

Während CYP1A1 und CYP1B1 vor allem in extrahepatischen Geweben, wie Lunge, Niere oder Plazenta exprimiert werden, ist CYP1A2 ein hepatospezifisches Enzym und wird beim Menschen nur in der adulten Leber gefunden (Xu *et al.* 2000). Die Exposition mit halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie TCDD oder einer Reihe polychlorierter Biphenyle führt durch Aktivierung des AhR-Signalweges zur massiven Induktion der CYP1-Enzyme, wobei CYP1A1 die höchste Induktion erreicht (Uno *et al.* 2008). Zu den endogenen Substraten der CYP1-Enzyme zählen z.B. Retinole, Steroide und Arachidonsäuren, doch keine der genannten Substanzen kommt an die Induktion heran, die durch PAKs oder TCDD hervorgerufen wird (Wang *et al.* 2009).

2.3.3.2 CYP24A1-Enzym

Zusammen bilden CYP27A1, CYP27B1 und CYP24A1, auch 24-Hydroxylase genannt, die Schlüsselenzyme beim Vitamin-D-Metabolismus. Das mitochondriale Enzym CYP24A1 katalysiert den Abbau von 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol), der biologisch aktiven Form des Vitamin D3, durch Hydroxylierung der Seitenkette an Position 24. Es wurde gezeigt, dass CYP24A1 in vielen, wenn nicht allen, Targetzellen vorkommt, die den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) enthalten, einschließlich Niere, Knochen und Darm. Das Enzym wird in den genannten Geweben VDR-vermittelt durch Agonisten des Rezeptors induziert, wobei die Induktionshöhe zwischen unterschiedlichen Spezies und Geweben differiert. Des Weiteren spielt CYP24A1 eine wichtige Rolle bei der Calciumhomöostase (Prosser *et al.* 2004; Henry, 2011; Jones *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013; Ramnath *et al.* 2014). Die Abschwächung des Vitamin-D-Signaling durch CYP24A1 wurde mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter metabolische Knochenerkrankungen, chronisches Nierenversagen und verschiedene Krebsarten (Jones *et al.* 2012; Petkovich *et al.* 2011).

2.4 Interaktion des VDR mit dem AhR

Beide nukleären Rezeptoren – Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) – können mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, was zur Beeinflussung der Targetgen-Expression führt. So ist z.B. ein Crosstalk zwischen den AhR und dem Estrogen-Rezeptor (ER) beschrieben. Dabei wird angenommen, dass der ER für die vollständige Akti-

vität des AhR notwendig sei, da ER-negative Zelllinien nach Behandlung mit TCDD keine *CYP1A1*-Induktion zeigten (Thomsen *et al.* 1994; Ohtake *et al.* 2003). Des Weiteren wird vermutet, dass die AhR-Expression durch Interaktion mit dem Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und dem Constitutive-Androstane-Rezeptor (CAR) hochreguliert wird. So wurde eine Induktion der AhR-Targetgene *CYP1A1* und *CYP1A2* durch Aktivierung der beiden Rezeptoren CAR und PXR beobachtet (Maglich *et al.* 2002). Mit denselben Transkriptionsfaktoren – PXR und CAR interagiert auch der Vitamin-D-Rezeptor. So schlagen Drocourt *et al.* aber auch andere Forschungsgruppen vor, dass VDR, PXR und CAR sowohl die basale als auch die induzierbare Expression verschiedener CYP-Gene (wie z.B. CYP3A4 oder CYP2B6) durch kompetitive Interaktion regulieren (Drocourt *et al.* 2002; Moreau *et al.* 2007; Pascussi *et al.* 2008).

Über die Wechselwirkung des VDR mit dem AhR ist hingegen nur wenig bekannt. Beispielsweise untersuchte die Arbeitsgruppe Resz-Poszarsz *et al.* auf Grund struktureller Ähnlichkeit der beiden Rezeptoren die Rolle des ARNT auf den VDR. Sie zeigten, dass der AhR-Dimerisierungspartner ARNT für die Aktivität des VDR nicht benötigt wird und auch keine Bindungsaffinität gegenüber dem „fremden“ Transkriptionsfaktor aufweist (Reisz-Porszasz *et al.* 1993). Jüngere Studien belegen, dass die beiden nukleären Rezeptoren durchaus in einer Wechselbeziehung zu stehen scheinen. So fanden Matsunawa *et al.* heraus, dass die Aktivierung des AhR durch seinen Agonisten Benzo[a]pyren (BaP) den Katabolismus von 1,25(OH)₂Vitamin-D₃ in Makrophagen stimuliert. Die Vorbehandlung der Zellen mit BaP steigerte die Calcitriol-abhängige Rekrutierung des VDR und RXR zum CYP24A1-Promoter (Matsunawa *et al.* 2009). Dieser Mechanismus scheint auch in die umgekehrte Richtung zu greifen, wie dieselbe Forschungsgruppe im Jahre 2012 belegte. Die Aktivierung des VDR durch seinen physiologischen Liganden Calcitriol steigerte die BaP-abhängige *CYP1A1*-Transkription, Aktivität der BaP-Hydroxylierung und BaP-DNA-Adduktbildung in humanen Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien (U937, THP-1) (Matsunawa *et al.* 2012).

Einen Anhaltspunkt für eine indirekte Korrelation zwischen dem AhR und VDR bietet auch die Interaktion des AhR mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), dem Dimerisierungspartner des Vitamin-D-Rezeptors (aber auch anderer Rezeptoren wie PXR und CAR). Einige Studien zeigen, dass AhR-Aktivierung durch TCDD die Funktion des RXR beeinflusst und die Transkription RXR-regulierter Gene, wie z.B. TGF- β , unterdrückt. Vermutlich erfolgt dies durch Verlust der Bindung des RXR-Liganden *trans*-Retinsäure an seinen Rezeptor RXR (Weston *et al.* 1995; Lorick *et al.* 1998; Tian *et al.* 1999; Nilsson *et al.* 2002; Ashida *et al.* 2008; Wahlström, 2008; Monostory *et al.* 2009). Auf Grund der unzureichenden Datenlage bedarf die Interaktion zwischen den beiden Rezeptoren VDR und AhR weiterer Untersuchungen.

MATERIALIEN

3.1 Labortiere

Adulte, männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6N wurden von der Firma Janvier Labs, Saint Berthevin, Frankreich bezogen und bis zum Versuch in den Räumen des Tierhauses der Technischen Universität Kaiserslautern unter SPF-Bedingungen bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 h und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

3.2 Zelllinien

Die hepatozellulären Karzinomzelllinien HepG2 (human, ACC 180), und Hepa-1c1c7 (*mus musculus*, ACC 175) wurden vom Leibniz Institut-DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Die Rattenhepatomzelllinie H4IIE wurde bei ATCC (American Type Culture Collection, Washington, USA) erworben. Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 wurde freundlicherweise vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt.

3.3 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte sowie Software sind im Anhang der vorliegenden Arbeit (Kapitel 9.2) aufgeführt.



METHODEN

4.1 Primäre murine Knochenmarkzellen

Das Knochenmark enthält hämatopoetische Stammzellen, welche sich in einem Differenzierungsprozess zu verschiedenen Arten von Blutzellen ausbilden können. Dieser Differenzierungsprozess kann durch entsprechende Bedingungen – wie Verwendung des Wachstumsfaktors GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) – auch *in vitro* nachgestellt werden. Granulozyten und Monozyten, welche aus den Vorläuferzellen hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks entstanden sind, werden kollektiv als myeloide Zellen bezeichnet (Kawamoto & Minato, 2004).

4.1.1 Isolierung primärer muriner Knochenmarkzellen

Bei adulten männlichen C57BL/6N Mäusen wird eine zervikale Dislokation durchgeführt und der sofortige Eintritt des Todes zusätzlich durch Entbluten sichergestellt. *Femora* und *tibiae* werden entnommen und unter Zuhilfenahme eines Papiertuchs vom umliegenden Muskelgewebe befreit (Abbildung 10). Die intakten Knochen werden zur Desinfektion für 3-5 min in 70 %iges Ethanol und anschließend in vortemperiertes (37°C), steriles PBS gelegt. Die Epiphysen werden mit einer Sezierschere abgetrennt und das Knochenmark mit einer Spritze und einer 26-Gauge Kanüle mit 3-4 ml sterilem PBS herausgespült. Das Knochenmark aus den beiden *femora* und *tibiae* einer Maus wird vereinigt, durch wiederholtes, kräftiges Pipettieren vereinzelt und bei 500×g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 6 ml frischen sterilen PBS resuspendiert.

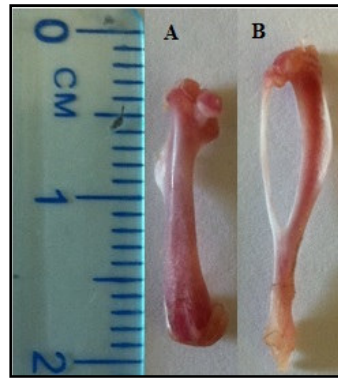


Abbildung 10: *Femur* (A), *tibia mit fibula* (B) einer adulten, männlichen C57BL/6 Maus.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl primärer muriner Knochenmarkzellen erfolgt lichtmikroskopisch bei 50-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Abbildung 11) und Färbung der Zellen mit Trypanblau. Vitale Zellen sind dabei farblos, während tote Zelle auf Grund verlorener Membranintegrität blau erscheinen.

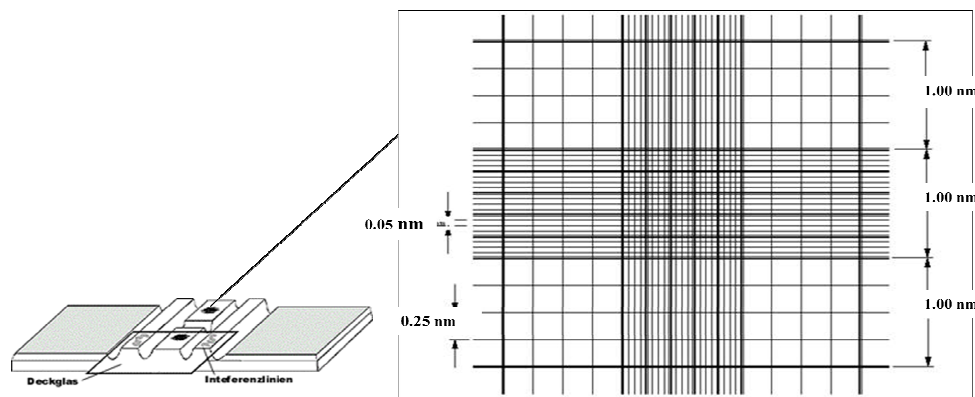


Abbildung 11: Aufbau des Zählfeldes einer Neubauer Zählkammer (www.lo-laboroptik.de; www.scienceservices.de).

Die Neubauer-Zählkammer, auch Hämozytometer genannt, besteht aus vier 4×4 Eckquadraten, mit einer Fläche von jeweils 1 mm² und einer Kammerhöhe von 0,1 mm, woraus sich ein Einschlussvolumen von 0,1 µl pro Eckquadrat ergibt. Zur Bestimmung der Zelldichte werden 20 µl der Zellsuspension zu 80 µl Trypanblaulösung (0,4 %) gegeben (1:5 Verdünnung), die Kammer mit der Suspension beschickt und die Zellen in den vier Eckquadraten am Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zelldichte wird anhand der nachstehenden Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \sum \left(\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \right) \times vf \times 10^4$$

Q_{1-4} = Anzahl der Zellen im jeweiligen Eckquadrat

vf = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor zur Errechnung der Zellzahl pro ml

4.1.3 Kultivierung und Differenzierung primärer Knochenmarkzellen

Die Kultivierung primärer Knochenmarkzellen erfolgt in einem Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte) in einer sterilen Atmosphäre. Alle für die Kultivierung der Zellen verwendeten Lösungen, darunter auch das R10-Medium, werden vor Verwendung auf 37°C vortemperiert. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Nährmedium für murine Knochenmarkzellen

R10-Medium	RPMI 1640 mit Phenolrot	89 % (500 ml)
	FKS hitzeinaktiviert	10 % (55 ml)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (5,5 ml)
	rm GM-CSF	200 U/ml
	2-Mercaptoethanol	50 µM
	Lagerung bei 4°C, 4 Wochen	

Nach Isolierung der Knochenmarkzellen und Bestimmung der Zellzahl werden diese in R10-Medium ausgesät (Tag 0). Die zur Aussaat verwendeten Formate und die entsprechenden Zellzahlen und Mediumvolumina sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Aussaat primärer muriner Knochenmarkzellen

Format	Medium (ml/Well)	Zellzahl/Well
48-Well	0,5	$0,7 \times 10^6$
Ø 60 mm	3	$1,5 \times 10^6$
Ø100 mm	10	4×10^6

72 h nach Aussaat der Zellen (Tag 3) wird das gleiche Volumen frisches R10 Medium hinzugefügt, das im jeweiligen Format zur Aussaat verwendet wurde. An Tag 5 und Tag 7 wird das Medium vollständig durch die entsprechende Menge frisches R10 Medium ersetzt. An Tag 10 erfolgt nochmals ein Mediumwechsel und anschließende Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen (Kapitel 4.1.4).

4.1.4 Behandlung muriner myeloider Zellen

An Tag 10 nach Aussaat werden die ausdifferenzierten myeloiden Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Dazu wird das Medium entfernt, die Zellen mit auf 37°C vortemperiertem PBS gewaschen – um die Behandlung nur adhärenter Zellen zu gewährleisten – und durch adäquates Volumen frisches Nährmedium ersetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe verschiedener Konzentrationen der Inkubationssubstanzen (Tabelle 3) und die Inkubation der Zellen für 48 h unter Standardbedingungen. Dabei überschreitet die Endkonzentration von DMSO im Medium nie 0,2 % (v/v), welche sich auch nicht als negativ auf die Vitalität der Zellen erwiesen hat. Jeder Versuchsansatz beinhaltet dabei Medium-, Positiv- und Negativkontrollen.

Tabelle 3: Inkubationssubstanzen für murine myeloide Zellen

Substanz	Endkonzentration
Calcitriol	1; 3; 10; 30; 100 [nM]
CH223191	10 [μ M]
TCDD	10^{-12} ; 10^{-11} ; 10^{-10} ; 10^{-9} ; 10^{-8} [M]
Telmisartan	10; 30; 100 [nM]
LPS	1; 2 [μ g/ml]

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 h wird der Mediumüberstand einzelner Behandlungspunkte gesammelt, zu 500 μ l aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Die Zellen werden mit vortemperiertem PBS gewaschen und entweder direkt einem Assay unterzogen oder bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

4.1.5 Adhärenz und Proliferation von Knochenmarkzellen

Zur Untersuchung der Adhärenz und Proliferation primärer muriner Knochenmarkzellen wird der Resazurinreduktionstest herangezogen. Anhand vorangegangener Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass vorwiegend adhärenz Knochenmarkzellen den blauen Farbstoff Resazurin in das pinke Resorufin umwandeln. Durch Knochenmarkzellen, die sich in Suspension befinden, konnte keine Umwandlung des Resazurins detektiert werden. Deshalb kann die Menge des umgesetzten Resazurins proportional zur Anzahl adhärenz Zellen angesehen werden.

Dazu werden die Zellen an Tag 0 auf 48-Well-Platten ausgesät und nach beschriebener Anleitung (Kapitel 4.1.3) kultiviert. An Tagen 0, 3, 5, 7, 10 und 12 wird das Medium von den zu messenden Wells entfernt und durch gleiches Volumen Resazurin-Arbeitslösung (

Tabelle 8) ersetzt. Anschließend werden die Zellen für 1,5 h bei Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt eine fluorimetrische Messung am Plattenreader bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm. Die Messung zu jedem Zeitpunkt wird im Triplikat durchgeführt. Anschließend wird die Resazurin-Arbeitslösung entfernt, die vermessenen Wells mit PBS gewaschen und die Platte bis zum nächsten Messzeitpunkt weiterkultiviert. Zur Messung der verschiedenen Messzeitpunkte werden nie dieselben Wells herangezogen. Abbildung 12 zeigt schematisch das Prozedere der Adhärenzmessung zu verschiedenen Zeitpunkten in einer 48-Well-Platte. Nach Abzug des Hintergrunds kann die ermittelte Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen werden.

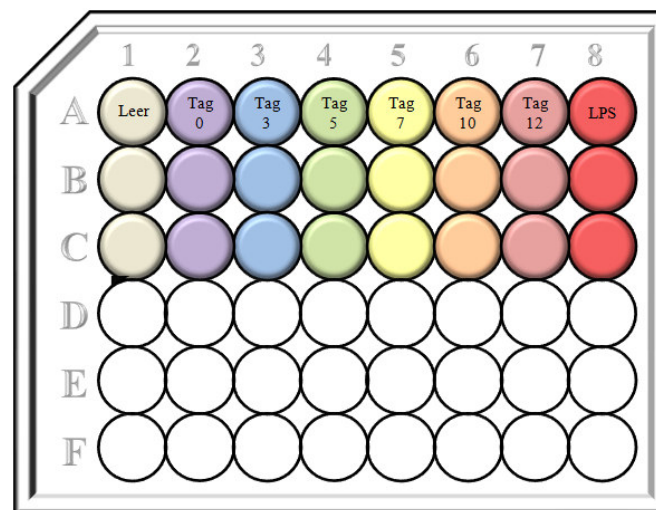


Abbildung 12: Durchführung des Adhärenz-/Proliferationstests im 48-Well Format (schematisch).

4.2 Zellkultur

Für *in vitro* Untersuchungen werden HepG2, H4IIE und Hepa-1c1c7 – drei hepatozelluläre Karzinomzelllinien unterschiedlicher Spezies – verwendet. Diese eignen sich besonders gut als *in vitro* Modellsysteme für Hepatozyten der jeweiligen Spezies.

Bei **HepG2** (ACC 180) handelt es sich um eine immortalisierte humane Hepatomzelllinie, welche zum ersten Mal 1975 aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen Argentiniers mit einem hepatozellulären Karzinom isoliert wurde. Die Zelllinie wächst adhärent als Monolayer und in kleinen Aggregaten mit einer Verdopplungszeit von 50-60 h. Die Zellen sezernieren verschiedene Plasmaproteine wie z.B. Albumin, Transferrin oder Fibrinogen (Aden *et al.* 1979; Knowles *et al.* 1980).

Die differenzierte Hepatomzelllinie **H4IIE** (ATCC[®] CRL 1548TM) ist eine Zelllinie der Spezies Ratte (*Rattus norvegicus*). Diese weist eine epitheliale Morphologie auf und wächst adhärent als Monolayer. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 30 h. Wie auch HepG2, exprimieren H4IIE leberspezifische Enzyme und finden insbesondere Anwendung in Untersuchungen der Insulin-Aktion und des Lipid- und Lipoproteinmetabolismus.

Hepa-1c1c7 (ACC 175), kurz als Hepa-1 bezeichnet, entstammt einem BW7756 Tumor einer C57L Maus. Die Zelllinie wächst adhärent als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 h. Es ist beschrieben, dass die Zellen verschiedene leberspezifische Proteine, wie Albumin, α -Fetoprotein und Amylase bilden. Allerdings fehlen diesen Hepatomzellen auch einige leberspezifische Enzyme wie z.B. Alkoholdehydrogenase, Esterase-1 oder Aldolase-B (Darlington *et al.* 1980).

Die Nierenzelllinie **HEK-293** entstand durch Transfektion einer humanen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus 5 (Ad 5). Die Zelllinie weist eine fibroblastoide Morphologie auf und wächst adhärent als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von 24-30 h. Die Zellen zeichnen sich insbesondere durch ihre Eigenschaft aus sich leicht kultivieren und transfizieren zu lassen (Graham *et al.* 1977).

4.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der genannten immortalisierten Zelllinien erfolgt unter Standardbedingungen in 75 cm² Kulturflaschen. Die Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums ist der folgenden Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Nährmedium zur Kultivierung von Zelllinien

Nährmedium	DMEM High Glucose, ohne Phenolrot	89 % (500 ml)
	Fetales Kälberserum (FKS)	10 % (55 ml)
	Penicillin/Streptomycin	1 % (5,5 ml)
	Lagerung bei 4°C, 4 Wochen	

4.2.2 Subkultivierung von Zelllinien

Ist bei adhärennten kultivierten Zellen ein geschlossener, konfluent Monolayer erreicht, nimmt die Proliferationsrate der Zellen stark ab, was zum Absterben der Kultur führen kann. Deshalb ist eine Subkultivierung, auch Splitten oder Passage genannt, nach Erreichen der Maximaldichte notwendig. Dazu wird das Medium entfernt und der Zellrasen mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Anschließend werden die noch adhärennten Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA benetzt und für einige Minuten, aber maximal für 15 min, im Brutschrank inkubiert, bis sich der Zellrasen vom Boden der Kulturflasche ablöst. Der enzymatische Verdau durch Trypsin wird durch Zugabe von 9 ml Nährmedium abgestoppt und die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt. Ein Teil der so erhaltenen Zellsuspension wird zur Weiterkultivierung in der Kulturfalsche belassen, die übrigen Zellen werden ausgezählt (Kapitel 4.1.2) und für weitere Experimente ausgesät.

Bei Zellen, die zur weiteren Kultivierung in der Zellkulturflasche belassen werden, wird 24 h nach dem Passagieren und danach alle 48 h ein Mediumwechsel durchgeführt, bis die Maximaldichte wieder erreicht ist.

4.2.3 Aussaat und Behandlung von Zelllinien

Nach Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 4.1.2) werden die Zellen im Nährmedium in der für das jeweilige Format entsprechenden Zelldichte ausgesät, so dass nach 24 h-Adhärenzphase vor Behandlung der Zellen mit der zu untersuchenden Substanz, eine Konfluenz von ca. 70 % gegeben ist. Die für die jeweilige Zelllinie und das entsprechende Format zur Aussaat verwendeten Zellzahlen sind in der nachstehenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Format, Mediumvolumina und Zellzahlen zur Aussaat von Zelllinien

Zelllinie	Methode	Format	Volumen (ml/Well)	Zelldichte (Zellen/Well)
HepG2	Resazurinreduktionstest,	48-Well	0,5	$6,5 \times 10^4$
	EROD-Assay			
	RNA-Isolierung	6-Well	2,5	$6,5 \times 10^5$
	SDS-PAGE	Ø 60 mm	3	$1,5 \times 10^6$
H4IIE	Resazurinreduktionstest,	48-Well	0,5	$5,5 \times 10^4$
	EROD-Assay			
	RNA-Isolierung	6-Well	2,5	$5,0 \times 10^5$
Hepa-1	Resazurinreduktionstest,	48-Well	0,5	$6,0 \times 10^4$
	EROD-Assay			
	RNA-Isolierung	6-Well	2,5	$6,0 \times 10^5$
HEK-293	Kernextraktion	Ø 60 mm	3	$2,5 \times 10^6$

24 h nach Aussaat, erfolgt die Behandlung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen. Dazu wird das Medium entfernt und mit dem Format entsprechenden Volumen (Tabelle 5) frischen Mediums ersetzt. Anschließend wird die in DMSO gelöste Substanz zum Medium hinzugegeben, wobei die Lösungsmittelkonzentration einen Anteil von 0,2 % nie überschreitet. Die Zellen werden bei Standardbedingungen für 48 h inkubiert. Bei jedem durchgeführten Experiment werden Positiv- sowie Negativkontrollen mitgeführt.

Im Falle der Inkubation mit konditioniertem Mediumüberstand muriner ausdifferenzierter Knochenmarkzellen wird das Medium entfernt und durch auf 37°C vorgewärmten Mediumüberstand ersetzt. Die Verdünnungen (1:2; 1:5; 1:10) des konditionierten Mediums werden entsprechend mit R10-Medium (Tabelle 1) hergestellt.

4.2.4 Einfrieren von Zelllinien

Eine andauernde Kultivierung – mehrmaliges Passagieren – von Zelllinien kann erhebliche Auswirkungen auf die Zellen haben. Dabei kann sich nicht nur der Phänotyp der Zelllinie ändern, sondern auch die Proliferationsrate und das Expressionsmuster der von der Zelle gebildeten Proteine. Deshalb ist eine Kryokonservierung von Zellkulturen einer frühen Passagezahl empfehlenswert, da auf diese zu einem späteren Zeitpunkt zurückgegriffen werden kann (Schrödel, 2009). Beim Einfrieren hat die Bildung von Eiskristallen im umliegenden Medium als auch im Zytosol eine disruptive Wirkung auf die Zellen. Um dies zu umgehen, wird ein

Einfriermedium eingesetzt, das einen hohen Anteil an DMSO und FKS aufweist, welche als Frostschutzmittel dienen und so die Bildung von Eiskristallen verhindern (Dumont *et al.* 2006; Pegg *et al.* 2007).

Zum Einfrieren werden Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wird der Zellrasen durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und die Zellen durch kräftiges Pipettieren vereinzelt. Die gesamte Zellsuspension aus einer Kulturflasche wird in ein 15 ml Falcon gegeben und bei 500 × g für 5 min zentrifugiert. Das Medium wird vorsichtig entfernt, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (Tabelle 6) aufgenommen und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wird anschließend in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol gefüllten Gefrierkontainer bei -80°C gelagert. Durch das Isopropanol wird eine sanfte und gleichmäßige Temperaturabsenkung von 1°C/min gewährleistet. Nach Erreichen einer Temperatur von -80°C können die Kryoröhrchen aus dem Gefrierkontainer entnommen werden und in einer herkömmlichen Box bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert werden.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Einfriermediums

Einfriermedium	DMEM high glucose	70 %
	ohne Phenolrot	
	FKS	20 %
	DMSO	10 %
	Lagerung bei 4°C, 4 Wochen	

Zum Auftauen wird das bei -80°C gelagerte Kryoröhrchen in einem auf 37°C vortemperierten Wasserbad zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wird dann in ein mit 12 ml vorgewärmten Nährmediums gefülltes Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig resuspendiert. Um die hohe Konzentration an DMSO im Einfriermedium zu entfernen, wird bei 500 × g für 5 min zentrifugiert, das Medium entfernt, das Zellpellet in 15 ml frischen Nährmediums aufgenommen. Die Zellsuspension wird in eine 75 cm² Kulturflasche gegeben und die Zellen bei Standardbedingungen kultiviert. 24 h nach dem Auftauprozess wird ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.3 Extraktion von Kernproteinen

Für biochemische Untersuchungen von Proteinen, die vermehrt im Kern einer Zelle vorliegen, ist eine Methode notwendig, um diese aus dem Nukleus zu isolieren und aufzureinigen. Dazu wird eine modifizierte Methode nach Dignam *et al.* genutzt (Dignam *et al.* 1983).

HEK-293 Zellen werden auf 60 mm Gewebekulturschalen ausgesät und für 48 h mit DMSO (0,1 %), Calcitriol (100 nM) oder TCDD (1 nM) unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wird das Medium entfernt und der Zellrasen durch Spülen mit 5 ml PBS vom Boden der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wird in ein Reaktionsgefäß überführt und bei $500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension für 5 sec im Ultraschallbad lysiert. Nach einer Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 10 min ergibt sich die zytosolische Fraktion als Überstand, welcher in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wird. Das Pellet wird in 140 μ l Extraktionspuffer resuspendiert und für 30 - 45 min auf Eis inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation bei $20000 \times g$ für 5 min liefert die nukleäre Fraktion als Überstand. Der Proteingehalt der zytosolischen und nukleären Fraktionen wird mittels des BCA-Assays (Kapitel 4.5.3) bestimmt. Die Extrakte werden in 10 μ l Aliquots bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Lösungen für Kernextraktion

Lysepuffer	HEPES (10 mM)	238,3 mg
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O (1,5 mM)	30,5 mg
	KCl (10 mM)	74,5 mg
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH: 7,9	
	Lagerung bei 4°C	
	DTT-Stammlösung	1 % (v/v)
	Proteaseinhibitorcocktail	1 % (v/v)
	kurz vor Gebrauch zugeben	

Extraktionspuffer	HEPES (20 mM)	476,6 mg
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O (1,5 mM)	30,5 mg
	NaCl (420 mM)	2,45 g
	EDTA-Na ₄ (0,2 mM)	8,32 mg
	Glycerin 25 % (v/v)	25 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH: 7,9	
	Lagerung bei 4°C	
	DTT-Stammlösung	1 % (v/v)
	Proteaseinhibitorcocktail	1 % (v/v)
	kurz vor Gebrauch zugeben	
DTT-Stammlösung	DTT (0,1 M)	77,1 mg
	H ₂ O _{dd}	5 ml
	Lagerung bei -20°C	
	in 50 µl Aliquots	
Proteaseinhibitorcocktail	Lagerung bei -20°C	
	in 50 µl Aliquots	

4.4 Extraktion totaler RNA

Die Extraktion der RNA ist eine der besten Methoden zur Analyse der Vorgänge in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt, da Gene isoliert werden, die in der Zelle gerade in dem Moment transkribiert werden. Die so gewonnene RNA kann anschließend für weitere Untersuchungen der Genexpression genutzt werden. Eine der schnellsten Methoden zur Isolierung der RNA ist die single-step Methode nach Chomczynski und Sacchi mit Hilfe von Guanidinthiocyanat, Phenol und Chloroform (Chomczynski *et al.* 1987). Diese Methode erlaubt eine Isolierung totaler RNA innerhalb von 4 h aus kleinen Mengen an Gewebe oder Zellen und liefert sowohl eine hohe Ausbeute als auch hohe Reinheit intakter RNA. Das nachstehende Schaubild (Abbildung 13) veranschaulicht schematisch die Arbeitsschritte der RNA-Extraktion.

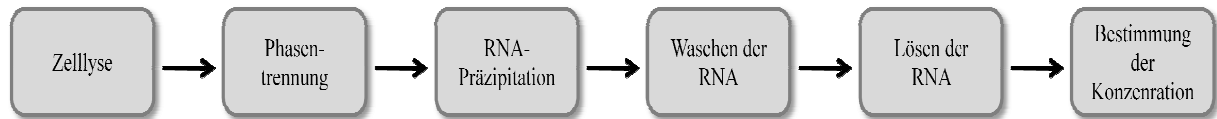


Abbildung 13: Schematische Darstellung der RNA-Isolierung.

Durchführung

Zellen der unterschiedlichen Zelllinien sowie primäre Knochenmarkszellen werden im entsprechenden Format ausgesät (Kapitel 4.1.3, Kapitel 4.2.3) und zum entsprechenden Zeitpunkt mit den zu untersuchenden Substanzen für 48 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wird das Medium entfernt und der Zellrasen mit vortemperiertem PBS gewaschen. Die Zellen können entweder direkt der RNA-Isolierung unterzogen werden oder bis zur Extraktion zu einem späteren Zeitpunkt, bei -80°C gelagert werden. Im Falle einer Lagerung der Zellproben bei -80°C werden die Zellen vor der RNA-Isolierung auf Eis aufgetaut.

Da RNA für die Degradierung durch ubiquitär vorkommende Nukleasen sehr anfällig ist, ist es wichtig darauf zu achten, dass steriles Zubehör (Pipettenspitzen, Zellschaber, Eppendorfreaktionsgefäße etc.) und Nuklease freies Wasser verwendet werden. Des Weiteren wird vor Beginn der RNA-Isolierung die Arbeitsfläche mit RNase AWAY[®] dekontaminiert.

Zur Zellyse wird auf den Zellrasen die entsprechende Menge des Extraktionsreagenzes RiboZol[®], welches Guanidinthiocyanat und Phenol enthält, gegeben (1 ml auf 60 mm Gewebekulturschalen, 0,5 ml je Well auf 6-Well-Platten) und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale / Wellplatte gelöst. Die Suspension wird durch Pipettieren homogenisiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe werden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 μl Chloroform zur Suspension gegeben und durch mehrmaliges Invertieren durchmischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min bei RT folgt ein Zentrifugationsschritt bei $12000 \times g$ für 15 min bei 4°C . Dabei trennt sich die Probe in 3 Phasen: eine rote Chloroform-Phenol-Phase, eine weiße Interphase und eine klare, farblose wässrige Phase in welcher die RNA enthalten ist. Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 250 μl Isopropanol versetzt und nach mehrmaligem Invertieren für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei $12000 \times g$ für 10 min präzipitiert die RNA als weißes Pellet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit jeweils 750 μl 75 %igem Ethanol gewaschen. Dazu wird das Pellet mit Ethanol versetzt, kurz gevortext und bei $7500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wird verworfen und die RNA-Probe für 10 min bei RT getrocknet. Das Pellet, welches durch das Trocknen durchsichtig wird, wird in 15-30 μl Nuklease-freiem

Wasser gelöst, für 1 min gevortext und bei 60°C für 10-15 min inkubiert. Die RNA wird anschließend bei -80°C gelagert.

Die Qualität sowie Konzentration der erhaltenen RNA-Lösung werden mittels NanoDrop® ND 1000 photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Nuklease-freies Wasser dient dabei als Blank. Die Quotienten der Extinktion zwischen 260 nm und 280 nm (260/280) sowie zwischen 260 nm und 230 nm (260/230) geben Auskunft über die Reinheit der RNA. Diese sollten einen Wert von 1,8 nicht unterschreiten, da dies ein Hinweis auf Kontamination der RNA mit Protein oder Phenol ist. Abbildung 14 zeigt exemplarisch das Absorptionsspektrum einer RNA-Probe.

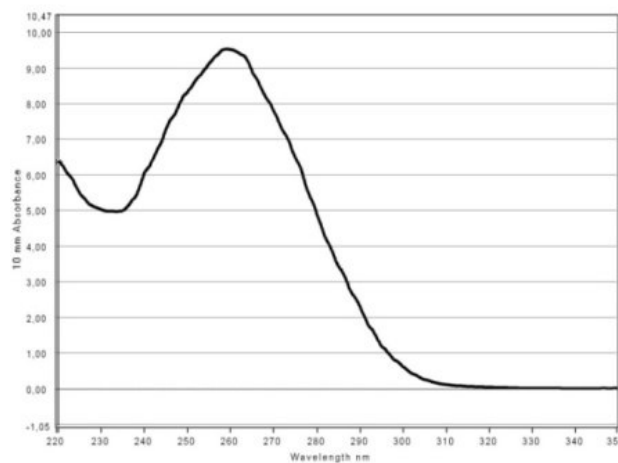


Abbildung 14: Absorptionsspektrum einer RNA-Probe.

4.5 Biochemische Analysemethoden

4.5.1 Resazurinreduktionstest

Der Resazurinreduktionstest, auch Alamar Blue Assay genannt, ist eine schnelle, sensitive und einfache Methode zur Erfassung der Zellproliferation und Zellvitalität/Zytotoxizität *in vitro*. Dabei wird die metabolische Aktivität lebender Zellen ausgenutzt.

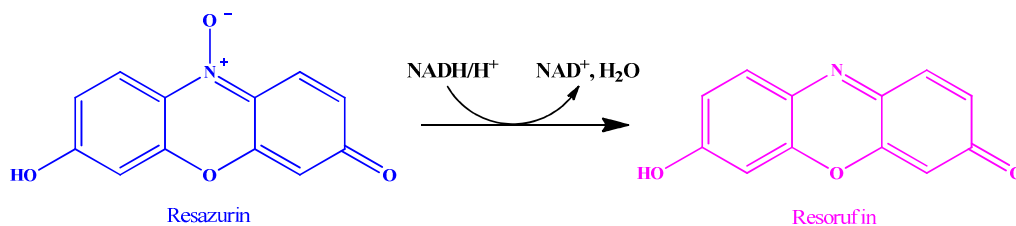


Abbildung 15: Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter Verbrauch von NADH.

Unter NADH-Verbrauch wird das blaue, nicht-fluoreszierende Resazurin zum pinken, fluoreszierenden Resorufin reduziert (Abbildung 15). Die Fluoreszenz des gebildeten Resorufins wird bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen und steht in direkter Korrelation zur Vitalität bzw. Proliferation lebender Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass die Reduktion des Resazurins intrazellulär im Zytoplasma stattfindet. (De Fries *et al.* 1995; O'Brien *et al.* 2000).

Von den im 48-Well-Format behandelten Zellen wird nach Ablauf der Inkubationszeit das Medium entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit auf 37°C vortemperiertem PBS gewaschen. Anschließend werden 0,5 ml/Well Resazurin-Arbeitslösung (

Tabelle 8) auf die Zellen gegeben, für 1 h (Zellkultur) bzw. 1,5 h (Primärkultur) im Brutschrank inkubiert und anschließend im Fluoroskan Ascent Plattenreader vermessen. Resazurin-Arbeitslösung fungiert als Blank, Saponin mit einer Endkonzentration von 0,1 % dient als Positivkontrolle, DMSO (0,1-0,2 %) bzw. Medium (unbehandelte Zellen) als Negativkontrolle. Die prozentuale Vitalität wird schließlich nach der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{M_{B-L}}{M_{K-L}} \times 100$$

M_{B-L} = Messwert behandelte Zellen abzüglich des Blankwertes

M_{K-L} = Messwert der Negativkontrolle abzüglich des Blankwertes

Tabelle 8: Lösungen für den Resazurinreduktionstest

PBS (phosphate buffered saline) Calcium- und Magnesium-frei	NaCl (137 mM)	8,006 g
	KCl (2,7 mM)	0,201 g
	NaH ₂ PO ₄ (6,5 mM)	0,923 g
	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)	0,204 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 7,4	
	Lagerung bei RT	
Resazurin-Stammlösung (440 mM)	Resazurin	110,5 mg
	DMF	1 ml
	Lagerung bei 4°C, 1 Woche, lichtgeschützt	
NaCl/P_i-Puffer	KH ₂ PO ₄	144 mg
	NaCl	9 g
	Na ₂ HPO ₄	528 mg
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	Lagerung bei 4°C, 4 Wochen	
Resazurin-NaCl/P_i-Lösung (440 µM)	Resazurin-Stammlösung	1:1000 (v/v)
	NaCl/P _i -Puffer	
	Lagerung bei 4°C, 4 Wochen, lichtgeschützt	
Resazurin-Arbeitslösung	Resazurin-NaCl/P _i -Lösung	1:10 (v/v)
	DMEM high glucose (auf 37°C vortemperiert)	
	unmittelbar vor Gebrauch, lichtgeschützt	

4.5.2 Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD) Assay

Der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase Assay, kurz EROD Assay, ist eine der besten und am weitesten verbreiteten Methoden, die es ermöglicht die katalytische Aktivität des Cytochrom P450 1A Enzyms (CYP1A) nachzuweisen und dient als Biomarker für die Exposition mit Substanzen, die an den Arylhydrocarbon Rezeptor (Ah Rezeptor) binden. Der Methode liegt

das Prinzip zugrunde, dass 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin umgewandelt wird (Abbildung 16). Diese oxidative Dealkylierung wird spezifisch durch das Enzym Cytochrom P450 1A(1) katalysiert (Behnisch *et al.* 2001; Petrusis *et al.* 2001; Behnisch *et al.* 2002).

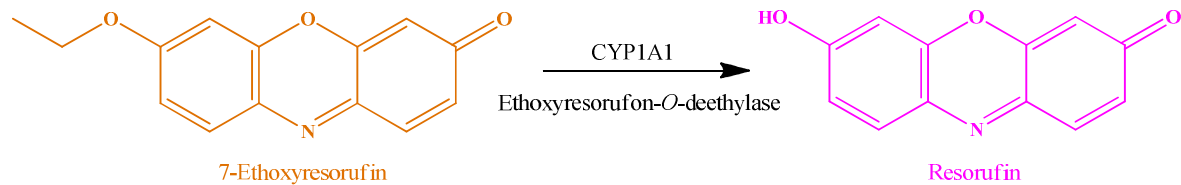


Abbildung 16: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin.

Neben der Durchführung des Assays nach Behnisch *et al.* in intakten, vitalen Zellen, welche es selbst vermögen NADPH zu bilden, kann die CYP1A1-Aktivität auch in Gewebe-/Zelllysaten/-homogenaten oder in Mikrosomen unter Zugabe von NADPH erfolgen. Dazu eignet sich besonders die Methode nach Kennedy *et al.* (Kennedy *et al.* 1994; Behnisch *et al.* 2001; Behnisch *et al.* 2002).

4.5.2.1 EROD Assay in vitalen Zellen

Die Durchführung dieser Methode erfolgt im 48-Well-Format. Zellen werden unter Standardbedingungen ausgesät und im Triplikat behandelt. Nach Ablauf der Inkubationsperiode wird das Medium entfernt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach Zugabe des vortemperierten EROD-Mediums (Tabelle 9) 0,5 ml/Well folgt eine kinetische Messung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm jede 90 sec für insgesamt 30 min bei 37°C. Dabei erfolgen alle Arbeitsschritte möglichst unter Lichtausschluss. Nach der Messung wird das EROD-Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran aufzuschließen und die Proteine und Enzyme so für die nachfolgende Quantifizierung zugänglich zu machen, wird die Platte für mindestens 24 h bei -80°C eingefroren und drei Auftau- und Einfrierzyklen unterzogen, wobei zwischen jedem Auftau- und Einfrierschritt mindestens 4 h liegen sollten. Anschließend kann der Proteingehalt mittels des BCA-Assays ermittelt werden. Zur Ermittlung der Menge des gebildeten Resorufins wird eine externe Kalibrierreihe erstellt (Tabelle 10). Dazu wird die Resorufin-Stammlösung mit DMEM High Glucose Medium entsprechend verdünnt und die Intensität der Fluoreszenz bei den oben genannten Wellenlängen nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C gemessen.

Tabelle 9: Lösungen für den EROD-Assay in vitalen Zellen

PBS (phosphate buffered saline) Calcium und Magnesium frei	NaCl (137 mM)	8,006 g
	KCl (2,7 mM)	0,201 g
	NaH ₂ PO ₄ (6,5 mM)	0,923 g
	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)	0,204 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 7,4 Lagerung bei RT	
7-Ethoxyresorufin (1 mM)	7-Ethoxyresorufin	5 mg
	DMSO	20,73 ml
	Lagerung bei -20°C, lichtgeschützt	
Resorufin-Stammlösung (10 mM)	Resorufin Natriumsalz	23,5 mg
	DMSO	10 ml
	Lagerung bei RT Lichtgeschützt	
Resorufin-Arbeitslösung (10 nM)	Resorufin-Stammlösung	1 µl
	DMSO	0,9 ml
	Kurz vor Gebrauch ansetzen lichtgeschützt	
Magnesiumchlorid Lösung (1 M)	MgCl ₂	9,521 g
	H ₂ O _{dd}	100 ml
	Lagerung bei RT	
NaOH (0,2 M)	NaOH	0,8 g
	H ₂ O _{dd}	100 ml
	Lagerung bei RT	
Dicumarol (10 mM)	Dicumarol	33,36 mg
	NaOH (0,2 M)	10 ml
	Lagerung bei 4°C	
EROD-Medium	DMEM High Glucose ohne Phenolrot, 37 °C	25 ml
	MgCl ₂ (1M)	125 µl
	Dicumarol (10 mM)	25 µl
	7-Ethoxyresorufin (1 mM)	125 µl
	Kurz vor Gebrauch ansetzen	

Tabelle 10: Pipettierschema für die externe Resorufin-Kalibrierreihe

Vial	Medium (µl)	Resorufin-Arbeitslösung/Vials	Resorufin Konzentration (nM)
1	9900	100 µl Resorufin-Arbeitslösung	1000
2	3000	3000 µl Vial 1	500
3	3000	1000 µl Vial 1	250
4	2400	600 µl Vial 2	100
5	2484	216 µl Vial 1	75
6	4000	1000 µl Vial 3	50
7	2400	600 µl Vial 4	20
8	2400	600 µl Vial 6	10
9	2400	0	0

Die gebildete Resorufinkonzentration [nM] wird schließlich anhand der linearen Gleichung der externen Resorufin-Kalibrierreihe berechnet. Dies erfolgt für jeden der gemessenen Zeitpunkte der Kinetik. Trägt man nun die errechneten Resorufinkonzentrationen linear gegen die Zeit auf, ergibt die Steigung die Resorufin-Konzentration pro Minute. Wird diese nun durch den ermittelten Protein-Gehalt dividiert, erhält man die EROD-Aktivität für jedes Well. Die Berechnung der EROD-Aktivität ist in der nachstehenden Formel nochmal verdeutlicht:

$$EROD \text{ Aktivität} \left[\frac{pmol \text{ Resorufin}}{min * mg \text{ Protein}} \right] = \frac{pmol \text{ Resorufin} / \text{min je Well}}{mg \text{ Protein je Well}}$$

4.5.3 Bicinchoninsäure (BCA) Assay

Der BCATM Assay ist eine schnelle und sehr sensitive biochemische Methode zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts biologischer Proben. Das Prinzip dieser Methode ist eine Kombination zweier Reaktionen. Im ersten Schritt kommt es in der sogenannten Biuret-Reaktion zur Reduktion von Cu²⁺ zum Cu¹⁺ durch Aminosäurereste der Proteine im alkalischen Medium. Das so gebildete Cu¹⁺ wird im zweiten Schritt durch Bicinchoninsäure komplexiert (Abbildung 17).

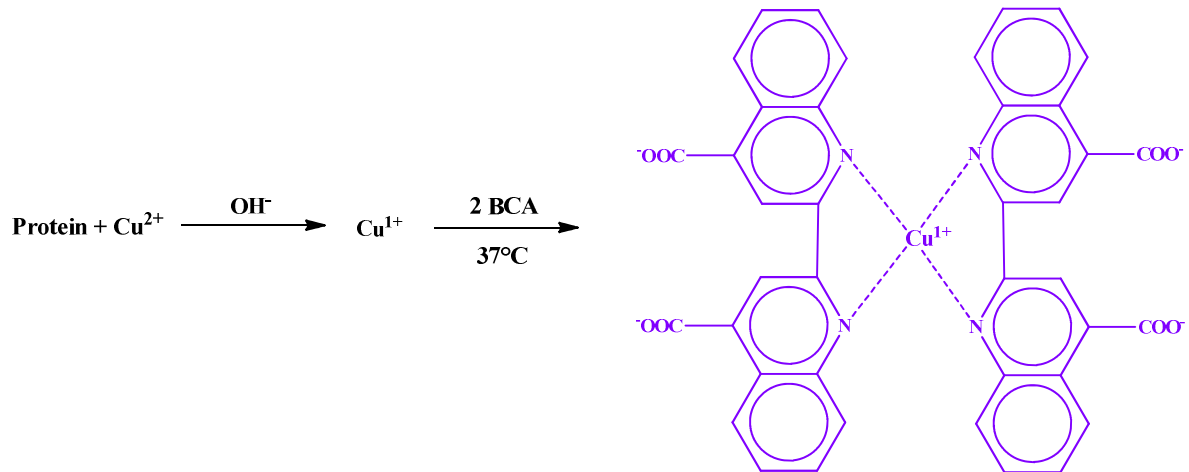


Abbildung 17: Bildung des violetten BCA-Cu¹⁺-Komplexes.

Dieser Komplex weist eine violette Farbe auf und kann auf Grund seiner starken Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden. Die Methode zeichnet sich dadurch aus, dass die Extinktion eine lineare Korrelation zum Proteingehalt über einen breiten Konzentrationsbereich von 20 – 2000 µg/ml aufweist (Smith, 1985).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der BCA Assay dazu genutzt, den Gesamtproteingehalt nach Durchführung des EROD-Assays in vitalen Zellen zu quantifizieren, aber auch den Gesamtproteingehalt in Zelllysaten sowie Kernextrakten zu bestimmen.

Nach Durchführung des EROD-Assays in vitalen Zellen und deren Aufschluss durch drei Auftau- und Einfrierzyklen werden die 48-Well-Platten auf Raumtemperatur aufgetaut. Je Well werden 50 µl bidestilliertes Wasser und 400 µl der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung (Reagenz A : Reagenz B, 50:1) hinzugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und die Extinktion bei 562 nm gemessen.

Im Falle der Proteinbestimmung von Kernextrakten werden Kernextrakt bzw. Zytosolfraktion mit bidestillitem Wasser 1:5 verdünnt, 50 µl der verdünnten Proteinlösung werden im Triplicat auf eine 48-Well-Platte gegeben, mit 400 µl BCA-Arbeitslösung versetzt und analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise verfahren.

Zur Quantifizierung der Proteingehalte wird eine externe Kalibrierreihe herangezogen, wobei Rinderserumalbumin (BSA) als Standard dient, dessen wässrige Stammlösung eine Konzentration von 2000 µg/ml aufweist. Das Pipettierschema für die Kalibrierreihe ist in der folgenden Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Pipettierschema zur Kalibrierreihe des BCA-Assays

Vial	H ₂ O _{dd} [μl]	BSA Lösung	BSA Konzentration [μg/ml]
A	0	300 μl BSA-Stammlösung	2000
B	125	375 μl BSA-Stammlösung	1500
C	325	325 μl BSA-Stammlösung	1000
D	175	175 μl Vial B	750
E	325	325 μl Vial C	500
F	325	325 μl Vial E	250
G	325	325 μl Vial F	125
H	400	325 μl Vial G	25
I	400	0	0

4.5.4 Real-Time Polymerase Kettenreaktion

4.5.4.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription beschreibt eine Methode, die es ermöglicht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus isolierter RNA ihre komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren, welche für die anschließende quantitative Real-Time-PCR verwendet werden kann. Dazu wird das iScript™ cDNA Synthese Kit der Firma Bio-Rad eingesetzt. Das Kit enthält die benötigte Reverse Transkriptase, einen RNase Inhibitor zur Verhinderung einer Degradierung der umzuschreibenden RNA-Probe, eine Mischung aus Oligonukleotiden sowie zufällige hexamere Primer (Bio-Rad).

Die Transkription wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu werden der 5× iScript™ Reaction mix und iScript™ Reverse Transkriptase zu einem Mastermix gemischt und zur RNA-Probe gegeben (Tabelle 12). Der Gehalt der RNA wird durch Zugabe Nuklease-freien Wassers auf eine einheitliche Menge von 1 μg/Reaktion eingestellt. Der Mix wird vorsichtig für einige Sekunden zentrifugiert, um eine Durchmischung der Komponenten zu gewährleisten. Mit Hilfe des MyCyclers (Bio-Rad) und des entsprechenden Temperaturprotokolls (Tabelle 13) wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 12: Komponenten zur Synthese von cDNA

Komponenten	Volumen/Reaktion [μl]
5× iScript Reaction mix	4
iScript reverse transcriptase	1
RNase freies Wasser	x
RNA-Probe (1 μg totaler RNA)	x
Gesamtvolumen	20

Tabelle 13: Temperaturprotokoll zur Synthese von cDNA

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [min]
25	5
42	30
85	5
4	∞

4.5.4.2 Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-Time PCR wird die Target-DNA nicht nur vervielfältigt, sondern simultan durch die Verwendung eines Fluoreszenz-Farbstoffs – in der vorliegenden Arbeit SYBR[®] Green – quantifiziert. Dabei interkaliert SYBR Green in die doppelsträngige DNA und die Fluoreszenz des resultierenden DNA-SYBR Green Komplexes, welche zur Menge der gebildeten DNA direkt proportional ist, kann bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert werden (Schmittgen *et al.* 2000; Tichopad *et al.* 2003).

Die Amplifikation der DNA besteht aus einer Sequenz von Zyklen, wobei sich jeder der Zyklen aus drei konsekutiven Phasen zusammensetzt. In der ersten Phase – der Denaturierung – wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 95°C durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern, wird die Temperatur nach der Denaturierung rasch auf 65°C gesenkt. In der darauffolgenden zweiten Phase, die als Annealing oder Primerhybridisierung bezeichnet wird, binden kurze DNA-Stücke, sogenannte Primer, bei einer Temperatur von 55-65°C an spezifische Abschnitte der DNA. In der dritten und letzten Phase – der Elongation – erfolgt die Synthese des durch Primer angefangenen komplementären DNA Stranges durch die Polymerase mit freien Nukleotiden bei einer Temperatur von 72°C.

Zu Beginn ist trotz Amplifikation der DNA kaum ein Anstieg der Fluoreszenz zu verzeichnen, da sich dieser noch unterhalb des Detektionslimits des Geräts befindet (Abbildung 18). Dies wird als Baseline bezeichnet. Abhängig von der Baseline wird ein arbiträrer Grenzwert der Fluoreszenz gewählt – die sogenannte „Threshold“. Meist wird dieser so gewählt, dass er sich über alle Plots in der Region exponentieller Amplifikation befindet. Der Schnittpunkt des Fluoreszenzsignals mit der Threshold wird dazu verwendet den Threshold Zyklus (C_T) für eine Probe zu definieren und wird zur Quantifizierung der amplifizierten Probe genutzt. Die Quantifizierung wird in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben (Holland *et al.* 1991; Heid *et al.* 1996; Pfaffl *et al.* 2001).

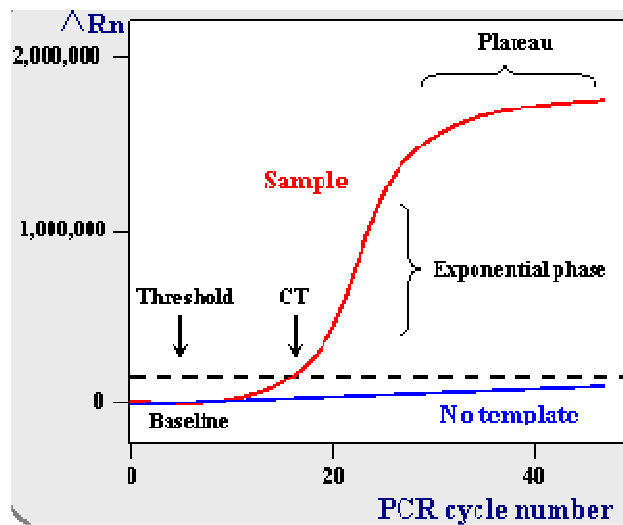


Abbildung 18: Modell eines Plots der quantitativen RT-PCR (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Alle Komponenten werden langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 1 μ l der transkribierten cDNA wird in ein PCR-Reaktionsgefäß transferiert. Ein Mastermix bestehend aus 12,5 μ l des iQ SYBR Green Supermix, je 1 μ l des für das zu untersuchende Gen spezifischen Primers (forward + reverse Primer) und 9,5 μ l Nuklease-freies Wasser, wird angesetzt und zur vorgelegten cDNA hinzugegeben (Tabelle 14). Die PCR-Gefäße werden mit optischen Deckeln versehen, kurz gevortext und beim entsprechenden Temperatur-Programm in der CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad) vermessen.

Tabelle 14: Komponenten für die Real-Time PCR

Komponenten	Volumen je Reaktion [μl]
iQ SYBR Green Supermix	12,5
Primer forward	1
Primer reverse	1
RNase freies Wasser	9,5
cDNA-Probe	1
Gesamtvolumen	25

Tabelle 15: Temperaturprotokoll für Real-Time PCR. (T_A : primerspezifische Anlagerungstemperatur)

Zyklus	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer	Prozess	
1	1x	95	15 min	Aktivierung der Polymerase
2	40x	95	20 s	Denaturierung
		T_A	30 s	Spezifische Primerhybridisierung
		72	30 s	Amplifikation
3	1x	95	1 min	Denaturierung
4	1x	T_A	1 min	Beginn der Schmelzkurve
5	80x	$T_A + 0,5$	10 s	

Die Informationen zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primern sind in der nachstehenden Tabelle 16 zusammengefasst. Die Primerpaare wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen, nach Angabe des Herstellers in Nuklease freiem Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 10 pmol/ μl verdünnt. Vor dem Einsatz erfolgt eine Validierung der Primerpaare zur Ermittlung der spezifischen Hybridisierungstemperatur.

Tabelle 16: Informationen zu verwendeten Primern für Real-Time PCR

Gen	NM-Nummer	Sequenz 5' -> 3'	Länge [bp]	T _A [°C]
Human				
<i>CYP1A1</i>	NM_000499	CAGAAGATGGTCAAGGAGCA	20	60
		GACATTGGCGTTCTCATCC	19	
<i>ACTB</i>	NM_001101	CGTGCGTGACATTAAGGAGAA	21	55,7
		CAATGCCAAGGCAGGAAGG	19	
Maus				
<i>mActb</i>	NM_007393	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA	21	58
		TCT CCG GAG TCC ATC ACA ATG	21	
<i>Cyp1a1</i>	NM_009992	ACTTCATTCCTGTCCTCCGTTACC	24	52
		GCCCTTCTCAAATGTCCTGTAGTG	24	
<i>Cyp24a1</i>	NM_009996	ACAGAGTACTCGGGCCAAAC	20	60
		GTCCTTTTGAAGGAGCCCGA	20	
<i>mAhr</i>	NM_013464	TTCTTAGGCTCAGCGTCAGCTA	22	60
		GCAAATCCTGCCAGTCTCTGAT	22	
<i>mVdr</i>	NM_009504	CTCCGGAGACTCCTCCTCCA	20	60
		GGATAGGCGGTCTGAATGG	20	
<i>mIl-1α</i>	NM_010554	AGGGAGTCAACTCATTGGCG	20	60
		ACTTCTGCCTGACGAGCTTC	20	
<i>mIl-1β</i>	NM_008361	AGCTTCAGGCAGGCAGTATC	20	60
		AAGGTCCACGGGAAAGACAC	20	
<i>mIl-6</i>	NM_031168	ACAAGTCCGGAGAGGAGACT	20	61
		GTCTTGGTCCTTAGCCACTCC	21	
<i>mTnf-α</i>	NM_01369	ACCGTCAGCCGATTTGCTAT	20	60
		CCGGACTCCGCAAAGTCTAA	20	

Berechnung der relativen mRNA-Expression

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wird die komparative Delta-Delta-C_T-Methode nach Pfaffl angewandt (Pfaffl *et al.* 2001). Zunächst wird der C_T Wert des House-keeping-Gens (β-Aktin) vom C_T-Wert des untersuchten Gens abgezogen, woraus der ΔC_T resultiert. Anschließend bildet man die Differenz der ΔC_T-Werte zwischen der behandelten Probe und der Lösungsmittelkontrolle und erhält so den ΔΔC_T-Wert. Zur Ermittlung der x-fachen mRNA-Expression wird nun die nachstehende Formel angewandt. Die Basis 2 der Exponentialfunktion ergibt sich dabei aus der Annahme, dass mit jedem Zyklus das amplifizierte Produkt verdoppelt wird, also eine optimale Primereffizienz von 100 % vorliegt.

$$x - \text{fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T(\text{behandelt}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle}))}$$

4.5.5 Nitritbestimmung nach Griess

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger physiologischer Messenger und fungiert in vielen biologischen Systemen, wie dem Nerven-, Immun- und kardiovaskulären System, als einer der Hauptregulatoren. Weiterhin wurde seine Rolle auch in vielen pathophysiologischen Vorgängen – darunter Sepsis, Hypertension und neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben (Bredt *et al.* 1994). Deshalb ist das Interesse NO in biologischen Matrices, wie Plasma, Serum, Urin oder Mediumüberständen aus *in vitro* Kulturen, nachzuweisen groß (Promega Protocols, 2009).

Eine Möglichkeit Stickoxid zu untersuchen, ist der Nachweis von Nitrit (NO_2^-), einem der zwei primären, stabilen und nicht flüchtigen Abbauprodukte von NO. Diese Methode wurde bereits im 19. Jahrhundert beschrieben, basiert auf einer Diazotierung und wurde über die Jahre nur geringfügig modifiziert (Griess, 1879). Hierbei wird die Reaktion des Nitrits mit Sulfanilamid und die folgende Bildung einer violetten Diazoverbindung mit *N*-1-naphthylethylendiamin (NED) im sauren Milieu ausgenutzt (Abbildung 19). Die gebildete Diazoverbindung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 530 nm detektiert werden. Die Quantifizierung der Nitritkonzentration erfolgt über eine externe Kalibrierreihe in einem Konzentrationsbereich von 0-100 μM , wobei eine wässrige Natriumnitrit-Lösung als Referenz-Standard dient. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei einer Nitritkonzentration von 2,5 μM .

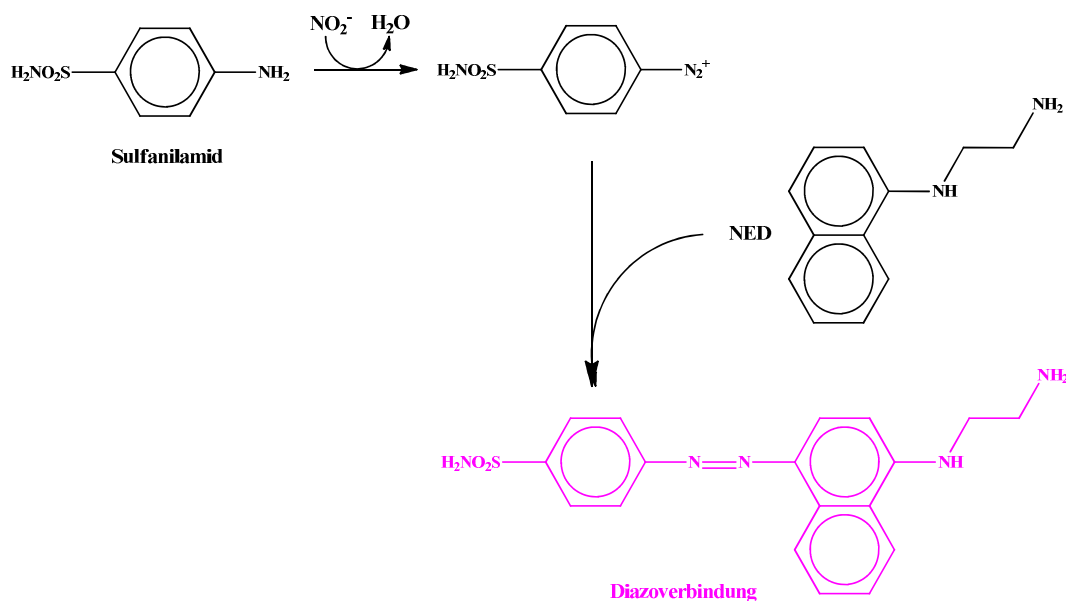


Abbildung 19: Mechanismus der Griess-Reaktion.

Zur Untersuchung der Stickoxidkonzentration in Mediumüberständen behandelte muriner Knochenmarkzellen werden diese nach Ablauf der Inkubationszeit gesammelt und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Vor dem Assay werden die Proben langsam auf Raumtemperatur aufgetaut und kurz gevortext. $50\ \mu\text{l}$ der Probe werden im Triplikat auf eine 96-Well-Platte gegeben und mit $50\ \mu\text{l}$ der Sulfanilamid-Lösung versetzt. Nach einer lichtgeschützten Inkubation für 5-10 min bei Raumtemperatur werden $50\ \mu\text{l}$ der *N*-1-Naphthylethylendiamin (NED) Lösung addiert. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 5-10 min bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 530 nm im Plattenlesegerät photometrisch bestimmt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Lösungen für Nitritbestimmung nach Griess

Sulfanilamid-Lösung (1 %)	Sulfanilamid	500 mg
	H_3PO_4	2,5 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 50 ml
	Lagerung bei 4°C lichtgeschützt	
NED-Lösung (0,1 %)	<i>N</i> -1-Naphthylethylendiamin- dihydrochlorid	50 mg
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 50 ml
	Lagerung bei 4°C lichtgeschützt	
Nitrit-Stammlösung (Referenz)	NaNO_2 (0,1 M)	34,5 mg
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 5 ml
	Lagerung bei RT lichtgeschützt	

4.5.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, kurz ELISA, ist eine schnelle und effiziente anti-körperbasierte Methode zum quantitativen Nachweis eines Antigens. So können z.B. Proteine (Antikörper), Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine oder Pestizide in einer biologischen Probe (Blut, Urin, *in vitro* Mediumüberstände) nachgewiesen werden (Engvall *et al.* 1971). Eine weit verbreitete Technik dieser Methode ist *Sandwich-*

ELISA, bei der zwei Antikörper zum Einsatz kommen. Das Prinzip dieser Methode ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 20) schematisch veranschaulicht.

Zunächst wird der erste Antikörper an eine feste Phase (96-Well-Platte) gebunden. Nach diesem sogenannten „Coating“ wird die Platte mit der zu untersuchenden Probe inkubiert, wobei das Target-Protein an den ersten Antikörper bindet. Nach der Inkubationsphase werden alle ungebundenen Bestandteile der Probe durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein Biotin-markierter Zweitantikörper zur Detektion hinzugegeben, welcher an ein anderes Epitop des Antigens bindet. Das Antigen befindet sich so zwischen zwei Antikörpern, was zur Namensgebung „Sandwich-ELISA“ dieser Methode geführt hat. Überschüssiger Zweitantikörper wird durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Nach Zugabe eines zum Enzym (Biotin) passenden chromogenen Substrats und dessen Umwandlung, erfolgt die photometrische Detektion. Anhand einer externen Kalibrierreihe mit der entsprechenden Referenz, wird das gesuchte Antigen quantifiziert.

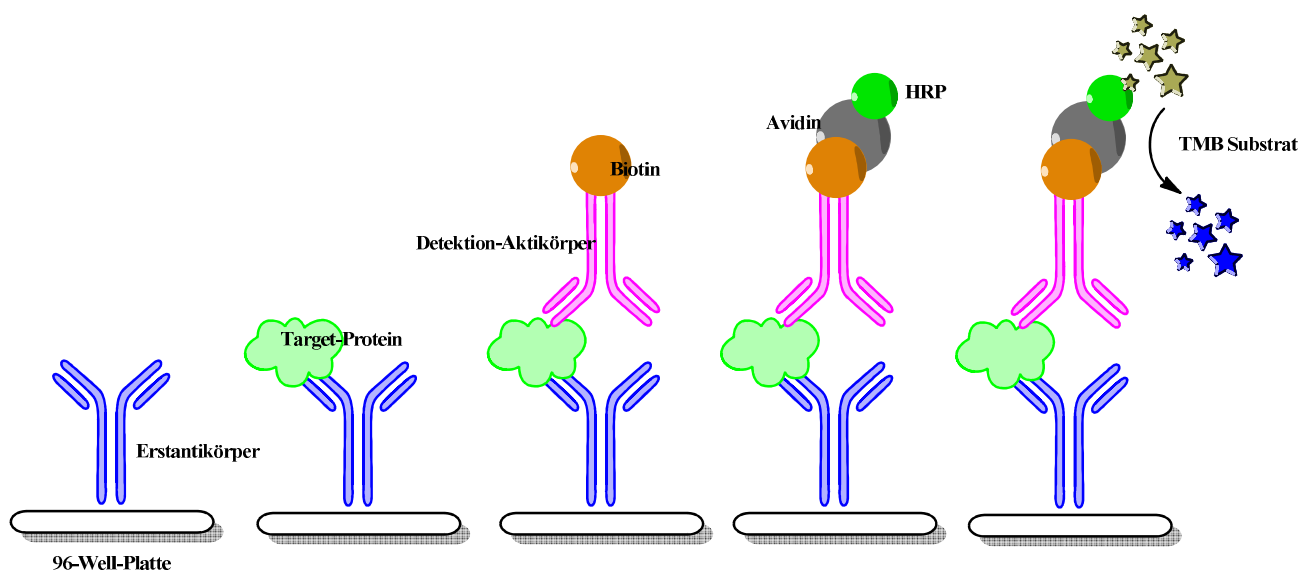


Abbildung 20: Funktionsprinzip des ELISA (schematisch).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden in Mediumüberständen behandelte primäre muriner Knochenmarkszellen die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 sowie TNF- α mit Hilfe von Ready-Set-Go![®] ELISA Kits der Firma eBioscience untersucht. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers und wird im nächsten Abschnitt kurz beschrieben.

Eine 96-Well-Platte wird mit 100 µl/Well des Coating-Puffers, dem der Erstantikörper zugefügt wird, befüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Wells mit Hilfe eines ELISA-Plate-Washers (Bio-Tek) dreimal mit 250 µl/Well Waschpuffer (Tabelle 19) gewaschen, wobei zwischen jedem Waschschrift eine Verweildauer von 1 min eingehalten wird. Die Wells werden anschließend mit 200 µl/Well Assay Diluent Puffers beschickt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Puffer entfernt und die Platte einmal mit dem Waschpuffer gewaschen. Zur Analyse werden bei -80°C gelagerte Mediumüberstände muriner Knochenmarkzellen auf Eis aufgetaut, mit 100 µl/Well im Duplikat auf die vorbereitete 96-Well-Platte aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jeder Platte wird eine Konzentrationsreihe des zu untersuchenden Zytokins im Duplikat als Referenz für die Kalibrierung mitgeführt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Referenzbereich untersuchter Zytokine

Zytokin	Referenzbereich [pg/ml]
IL-6	4 – 500
IL-1α	4 – 500
IL-1β	8 – 1000
TNF-α	8 – 1000

Die Platte wird viermal mit jeweils 250 µl/Well Waschpuffer (Tabelle 19) gewaschen, anschließend mit Assay Diluent Puffer, welchem der Biotin-markierten Zweitantikörper zugegeben wird, befüllt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren vier Waschsritten mit je 250 µl/Well Waschpuffer werden 100 µl/Well der Avidin-HRP Lösung gegeben und nochmals für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wird anschließend siebenmal mit je 250 µl/Well Waschpuffer gewaschen, wobei eine Verweildauer von 2 min zwischen jedem Waschschrift eingehalten wird. Nach der darauffolgenden Zugabe von 100 µl/Well der TMB-Substratlösung und einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur, werden 50 µl/Well der Stopplösung (Tabelle 19) pipettiert und die Platte bei 450 nm photometrisch vermessen. Zur Quantifizierung wird die erhaltene Extinktion der Kalibrierreihe gegen die Konzentrationen doppelt logarithmisch aufgetragen. Die dadurch erhaltene Exponentialfunktion ermöglicht eine Quantifizierung des jeweiligen Zytokins in der untersuchten Probe.

Tabelle 19: Zusätzlich zum Ready-Set-Go!® ELISA-Kit benötigte Lösungen

Waschpuffer	NaCl (137 mM)	8,006 g
	KCl (2,7 mM)	0,201 g
	NaH ₂ PO ₄ (6,5 mM)	0,923 g
	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)	0,204 g
	Tween-20 (0,05 %)	0,5 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 7,4 Lagerung bei RT	
Stop-Lösung	H ₃ PO ₄ (1 M)	5,24 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	Lagerung bei RT	

4.5.7 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sodium dodecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis, kurz SDS-PAGE, beschreibt eine weitverbreitete Methode zur Trennung biologischer Makromoleküle – wie Proteine oder Nucleinsäuren – in einem homogenen elektrischen Feld. Die Mobilität ist dabei von Länge, Konformation und Ladung der Moleküle abhängig. Durch Zugabe des anionischen Detergens SDS und anschließende Denaturierung der Proteinproben bei 95°C wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die Proteine linearisiert. Das im Ladungspuffer (Laemmli-Puffer) enthaltene β -Mercaptoethanol unterstützt die Linearisierung der Proteine durch Spaltung der Disulfidbrücken. Dies erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Kettenlänge proportional zur Masse, da längere Ketten eine langsamere Wandergeschwindigkeit im Gel aufweisen als kürzere.

Die Trennung erfolgt durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese. Das Polyacrylamidgel weist hierbei zwei Schichten auf, die sich in Porengröße und pH-Werte unterscheiden. Das obere Sammelgel besitzt größere Poren und einen neutralen pH-Wert (6,8), während das alkalische Trenngel (pH 8,8) eine kleinere Porengröße aufweist. Der pH-Gradient führt auf Grund gleicher Wandergeschwindigkeit zur Stapelung der Proteine an der Grenze zum Trenngel. Die Migration der Probe in das kleinporige Trenngel resultiert in einer Trennung der Proteine nach ihrer Kettenlänge. Der Einsatz eines Proteinmarkers ermöglicht die Zuordnung detektierter Proteine einer bestimmten Größe (Lottspeich *et al.* 1998; Cammann, 2001).

4.5.7.1 Probenvorbereitung

Zellen werden im entsprechenden Format ausgesät und behandelt. Nach Beenden der Inkubationszeit wird das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Proben bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Aufbereitung werden die Gewebekulturschalen auf Eis aufgetaut. Je Schale werden $200\ \mu\text{l}$ Lysepuffer (Tabelle 20) hinzugefügt, die Zellen unter Verwendung eines Zellschabers vom Boden der Kulturschale gelöst und die Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Proben werden mit Hilfe einer Ultraschallsonde homogenisiert und anschließend bei $10000 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die gelösten Proteine der Zelle und wird in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Nach Bestimmung der Proteingehalte mittels BCA Assays wird durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser eine einheitliche Proteinkonzentration von $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Jeweils $15\ \mu\text{l}$ der eingestellten Proteinproben werden mit je $3\ \mu\text{l}$ Ladepuffer (6x Laemmli-Puffer, Tabelle 20) versetzt. Anschließend werden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 2-3 min, können die Proben sofort verwendet oder bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt werden.

Tabelle 20: Lysepuffer und Laemmli-Ladepuffer (6x)

Lysepuffer	NaCl (0,9 %)	9,00 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 1 l
	Lagerung bei RT	
	Proteaseinhibitorcocktail (0,1 %)	1:1000 (v/v)
	Kurz vor Gebrauch dazugeben	
Laemmli-Ladepuffer (6x)	Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)	50 ml
	SDS	1,24 g
	Glycerin	40 ml
	Bromphenolblau	0,16 g
	β -Mercaptoethanol	5,0 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 100 ml
	Lagerung bei -20°C	

4.5.7.2 Gelelektrophorese

Die Reagenzien für das Trenngel (Tabelle 21) werden zusammengegeben und rasch zwischen die Glasplatten der zuvor zusammengebauten Gelkammer gegossen. Die Oberfläche wird sofort mit n-Butanol überschichtet, um Lufteinschlüsse zu vermeiden und eine gerade Grenz-

fläche zu gewährleisten. Nach Aushärten des Trenngels wird das n-Butanol mit Hilfe eines Filterpapiers vollständig entfernt, das frisch hergestellte Sammelgel (Tabelle 21) zügig auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm zur Bildung der Probenaschen versehen. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels werden je zwei Gelkammern in die Elektrophoresekammer (Mini Protean IV, Bio-Rad) transferiert und mit 1x-Elektrophoresepuffer (Tabelle 22) überschichtet. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und die Taschen mit je 18 µl vorbereiteter Probe beladen. Eine Tasche pro Gel wird dabei mit 5 µl Proteinmarker (Precision Plus Kaleidoscope Protein Standard, Bio-Rad) versehen. Anschließend wird die Elektrophorese bei einer Spannung von 140 V für 1,5 h durchgeführt.

Tabelle 21: Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Tris/HCl (1,5 M)	Tris	18,2 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH: 8,8	
	Lagerung bei RT	
Tris/HCl (0,5 M)	Tris	6,1 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH: 6,8	
	Lagerung bei RT	
Trenngel (10 %)	Tris/HCl (1,5 M, pH: 8,8)	1,23 ml
	H ₂ O _{dd}	2,0 ml
	Acrylamid (30 % Lösung)	1,64 ml
	SDS (10 % Lösung)	50 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
Sammelgel (4 %)	Tris/HCl (0,5 M, pH: 6,8)	0,5 ml
	H ₂ O _{dd}	1,2 ml
	Acrylamid (30 % Lösung)	0,25 ml
	SDS (10 % Lösung)	20 µl
	APS (10 %)	20 µl
	TEMED	5 µl

Tabelle 22: Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE

Elektrophoresepuffer (10x)	Glycin (2 M)	720 g
	Tris (250 M)	150 g
	SDS (20 % Lösung)	250 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 5 l
	pH: 8,4 Lagerung bei RT	
Elektrophoresepuffer (1x)	Elektrophoresepuffer (10x)	250 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 2,5 l
	Lagerung bei RT	

4.5.8 Western Blot und Immunoblot

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE werden diese mittels eines vertikalen elektrischen Feldes vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Die Proteine wandern dabei in Richtung der Anode, wobei das Muster der elektrophoretischen Trennung erhalten bleibt. Die so auf der Membran fixierten Proteine können durch Bindung von spezifischen Erstantikörpern an das zu untersuchende Protein und anschließende Bindung eines gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers spezifisch nachgewiesen werden. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation des Luminols durch Wasserstoffperoxid zum 3-Aminophthalat, welches durch den Übergang aus dem angeregten in den Grundzustand und der daraus resultierenden Chemilumineszenz die Detektion mittels einer CCD-Kamera im Lumiimager ermöglicht (Abbildung 21). Das Signal der Chemilumineszenz kann durch Einsatz von *p*-Cumarsäure verstärkt werden. (Lottspeich *et al.* 1998).

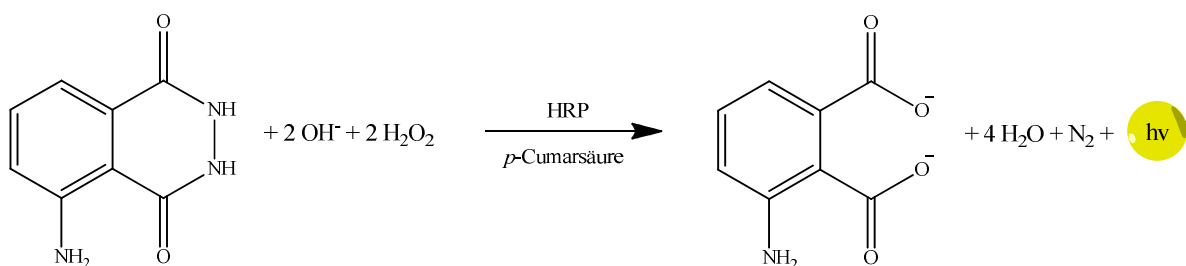


Abbildung 21: Chemilumineszenz-Reaktion des Luminols.

Für den Transfer wird die hydrophobe PVDF-Membran, welche auf eine Größe von $6,5 \times 9,0$ cm zugeschnitten wird, für 10 sec in Methanol aktiviert und anschließend im Anoden II Puffer (Tabelle 23) äquibriert. Die auf eine Größe von $7,0 \times 9,5$ cm zugeschnittenen Filterpapiere werden in den entsprechenden Puffern getränkt und der Semi-Dry-Blot zusammengebaut (Abbildung 22). Der Proteintransfer auf die Membran erfolgt innerhalb von 75 min bei einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (45 mA/Membran).

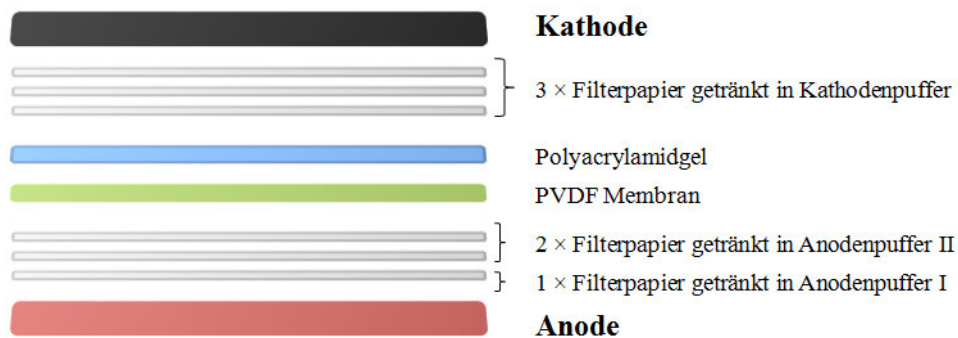


Abbildung 22: Aufbau einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur.

Tabelle 23: Blotting Puffer

Anodenpuffer I	Tris (300 mM)	36,3 g
	Methanol	100 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 10,4	
	Lagerung bei RT	
Anodenpuffer II	Tris (25 mM)	3 g
	Methanol	100 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 10,4	
	Lagerung bei RT	
Kathodenpuffer	Glycin	3 g
	Trix	3 g
	Methanol	200 ml
	SDS (20 % Lösung)	250 µl
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 9,4	
Lagerung bei RT		

Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran, wird diese über Nacht bei 4°C im Blocking-Puffer (Tabelle 24) inkubiert, um die freien unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur im frischen Blocking-Puffer mit Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Die Membran wird dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit TBS-T (Tabelle 24) gewaschen und in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 inkubiert. Schließlich folgen zwei Waschschriffe mit TBS-T und ein Waschschriff in TBS. Bis zur Detektion kann die Membran bis zu einer Woche in TBS gelagert werden. Für die Detektion der Chemilumineszenz wird die Membran unter Lichtausschluss für 1 min in der Detektionslösung (Tabelle 25) inkubiert und anschließend mit Hilfe des Lumiimagers detektiert.

Zur Detektion von verschiedenen Proteinen ähnlicher Masse auf einer Membran, können die zuvor gebundenen Primär- und Sekundärantikörper mit Hilfe eines sogenannten „Stripping-Puffers“ abgewaschen werden (Tabelle 26). Das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol und SDS lösen die Disulfidbrücken zwischen Protein und Antikörper und entfernen so die Antikörper vom Protein. Dazu wird die Membran für 20 min bei 50°C im Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wird die Membran sechsmal für jeweils 5 min bei Raumtemperatur in TBS-T gewaschen. Danach folgen erneut die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und anschließende Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern. Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationsdauer mit dem Stripping-Puffer 20 min nicht überschritten wird, da dies zur Ablösung der Targetproteine von der Membran führen kann

Tabelle 24: Lösungen für Immunoblot

TBS (20x)	NaCl (2,6 M)	304 g
	Tris/HCl (0,4 M)	97 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 7,4	
	Lagerung bei RT	
TBS (1x)	TBS (20x)	250 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 5 l
	Lagerung bei RT	
TBS-T (1x)	TBS (1x)	2 l
	Tween-20	6 ml
	Lagerung bei RT	

Blocking-Puffer	TBS-T (1x)	100 ml
	Milchpulver	5 g
	Kurz vor Gebrauch ansetzen	

Tabelle 25: Lösungen zur Detektion der Chemilumineszenz

Tris/HCl	Tris (0.1 M)	2,43 g
	H ₂ O _{dd}	ad 200 ml
	pH: 8,6	
	Lagerung bei RT	
Lösung A	Luminol	50 mg
	Tris 0,1 M	200 ml
	Lagerung bei 4°C	
	lichtgeschützt	
Lösung B	<i>p</i> -Cumarsäure	22 mg
	DMSO	20 ml
	Lagerung bei RT	
	lichtgeschützt	
H₂O₂-Lösung	Tris/HCl (0,1 M)	500 µl
	H ₂ O ₂ (30% Lösung)	25 µl
	Kurz vor Gebrauch herstellen	
	lichtgeschützt	
Detektionslösung	Lösung A	9 ml
	Lösung B	1 ml
	H ₂ O ₂ -Lösung	100 µl

Tabelle 26: Stripping-Puffer

Stripping-Puffer	Tris (62,5 mM)	757 mg
	SDS (20 % Lösung)	10 ml
	β-Mercaptoethanol (100 mM)	700 µl
	H ₂ O _{dd}	100 ml
	pH: 6,7	
	Lagerung bei RT	

4.5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Bei der Kontrolle vieler zellulärer Prozesse einschließlich der DNA-Replikation, Rekombination, Transkription und Reparatur, spielt die Interaktion von Proteinen mit der DNA eine zentrale Rolle. Eine der sensitivsten Methoden zur Untersuchung DNA-bindender Eigenschaften von Proteinen ist der *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, kurz (EMSA). Dieser wird auch als *Band Shift Assay* oder *Gel Shift Assay* bezeichnet und ist eine Affinitätselektrophorese. Die Methode basiert darauf, dass Protein-DNA-Komplexe bei der Elektrophorese in einem nativen Polyacrylamidgel eine viel geringere Migrationsgeschwindigkeit aufweisen als freie lineare DNA (Garner *et al.* 1981; Hellman *et al.* 2007).

Die relative Änderung der Mobilität eines Komplexes gibt jedoch noch keine Auskunft darüber welches Protein genau an die DNA gebunden hat. Durch Verwendung eines gegen das gesuchte Protein spezifischen Antikörpers, welcher an das Protein bindet, wird die Migrationsgeschwindigkeit des Komplexes um ein Weiteres verringert, was in einem sogenannten „Supershift“ resultiert. Abbildung 23 zeigt schematisch das Prinzip des Gel Shift Assays. Die Detektion erfolgt hierbei, analog zum Immunoblot, mittels der Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidation des Luminols zum 3-Aminophthalat und der daraus resultierenden Chemilumineszenz, die mittels einer CCD-Kamera erfasst werden kann.

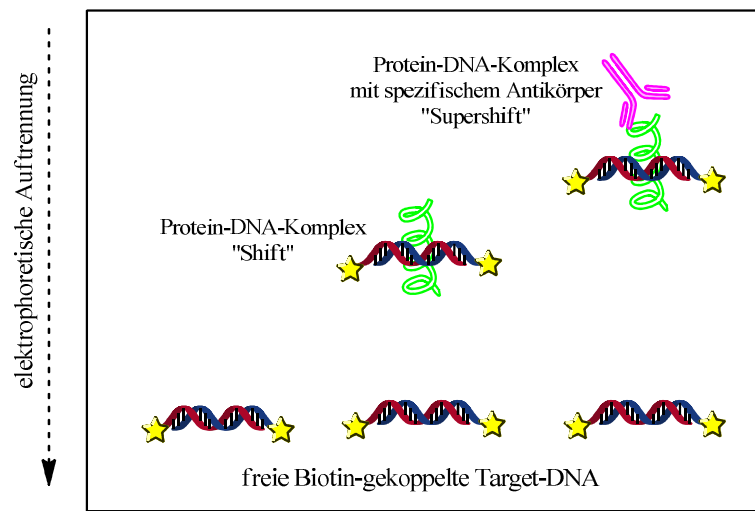


Abbildung 23: Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays (schematisch).

Für die Untersuchung der DNA-Protein-Interaktion wird das LightShift[®] Chemiluminescent EMSA Kit mit dem Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module der Firma Thermo Scientific verwendet. Der Assay wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die einzel-

nen Schritte werden in folgenden Abschnitten erläutert. Die zu untersuchenden Proteine (AhR und VDR) werden durch Kernextraktion aus mit TCDD oder Calcitriol behandelten HEK-293 Zellen gewonnen (Kapitel 4.3).

4.5.9.1 Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen

Die Oligonukleotid-Sequenz der humanen CYP1A1-Promoter-Region (Matsunawa *et al.* 2012) wurde 5'-Biotin markiert als zwei komplementäre Stränge von der Firma MWG Ope-ron synthetisiert und bezogen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Nukleotidsequenz der humanen CYP1A1 Promoter Region (Matsunawa *et al.* 20120).

Biotin-5'-CCG GCT CGC GTG AGA AGC GCT GCG ACC CCA GCC CTG AGG TCA CGG GG-3'
3'-GGC CGA GCG CAC TCT TCG CGA CGC TGG GGT CGG GAC TCC AGT GCC CC-5'-Biotin

Zum Hybridisieren der komplementären DNA-Stränge werden die einzelnen Stränge in Tris-Puffer (Tabelle 28) aufgenommen und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. 30 µl der jeweiligen DNA-Strang-Lösung werden in ein 15 ml Reaktionsgefäß zusammengefügt und auf 6 ml TRIS-Puffer aufgefüllt, so dass die Konzentration von 1 pmol/µl erreicht wird. Die DNA-Lösung wird zu je 500 µl aliquotiert. 400 ml Wasser werden in einem Becherglas zum Kochen gebracht und die aliquotierten DNA-Proben darin für 5 min inkubiert. Die Heizplatte wird ausgestellt, das Becherglas mit den Proben darauf belassen und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben werden zu 10 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Vor der Verwendung im Gel Shift Assay wird die DNA-Lösung langsam auf Eis aufgetaut und mit Tris-Puffer auf eine Konzentration von 10 fmol/µl verdünnt.

Tabelle 28: Tris-Puffer für DNA-Annealing

Tris-Puffer	Tris (10 mM)	60,6 mg
	Na ₄ -EDTA (1 mM)	18,6 mg
	NaCl (50 mM)	146,1 mg
	H ₂ O _{dd} , Nuklease frei	50 ml
	pH: 8,0	
	Lagerung bei RT	

4.5.9.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Für die Bindungsreaktion werden die einzelnen Komponenten in der aufgeführten Reihenfolge (Tabelle 29) in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben mit je 5 µl Ladepuffer (5×) versehen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Bei jedem Versuchsansatz werden Kit-interne Kontrollen mitgeführt.

Während der Inkubationszeit der Proben werden die Reagenzien für das native Polyacrylamidgel (Tabelle 30) zusammengegeben, rasch zwischen die Glasplatten der zuvor zusammengebauten Gelkammer gegossen und mit einem Kamm zur Bildung der Probetaschen versehen. Nach Auspolymerisieren des Polyacrylamidgels werden zwei Gelkammern in die Elektrophoresekammer (Mini Protean IV, Bio-Rad) transferiert und mit 0,5×-TBE-Puffer (Tabelle 30) überschichtet. Der Kamm wird vorsichtig entfernt, die Taschen kurz mit 0,5×-TBE-Puffer gespült und eine Präelektrophorese des Gels für 30-60 min bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Nach der Präelektrophorese werden die Probetaschen mit 0,5×-TBE-Puffer gespült und mit je 20 µl der vorinkubierten Proben beladen. Anschließend folgt die elektrophoretische Trennung der Proben bei 100 V, bis die Bromphenol-Lauffront $\frac{3}{4}$ der Länge des Gels erreicht hat (ca. 65 min).

Tabelle 29: Komponenten der Proben für EMSA

Komponente	Endkonzentration	Probe		
		DNA	DNA + Protein	DNA + Protein + Antikörper
H ₂ O _{dd}	---	12 µl	10 µl	9 µl
Bindungspuffer (10×)	1×	2 µl	2 µl	2 µl
Poly-AT (1µg/µl)	50 ng/µl	1 µl	1 µl	1 µl
Glycerin (50 %)	2,5 %	1 µl	1 µl	1 µl
NP-40 (1 %)	0,05 %	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ (100 mM)	5 mM	1 µl	1 µl	1 µl
Kernextrakt (2µg/µl)	4 µg	---	2 µl	2 µl
Antikörper (20 ng/µl)	20 ng	---	---	1 µl
Biotin-DNA (10 fmol/µl)	20 fmol	2 µl	2 µl	2 µl
Ladepuffer (5×)	1×	5 µl	5 µl	5 µl

Tabelle 30: TBE-Puffer und natives Polyacrylamidgel für EMSA

TBE-Puffer (5x)	Tris (450 mM)	54,5 g
	Borsäure (450 mM)	27,8 g
	Na ₂ -EDTA (10 mM)	3,7 g
	H ₂ O _{dd}	ad 1 l
	pH: 8,3 Lagerung bei 4°C	
TBE-Puffer (0,5x)	TBE-Puffer (5x)Tris	250 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 2,5 l
	pH: 6,8 Lagerung bei 4°C	
natives Polyacrylamidgel (6 %)	TBE-Puffer (5x)	1,2 ml
	H ₂ O _{dd}	8,4 ml
	Acrylamid (30 % Lösung)	2,4 ml
	APS (10 %)	200 µl
	TEMED	10 µl

4.5.9.3 Transfer auf eine Nylonmembran und Crosslink

Nach der elektrophoretischen Trennung werden die Proben, ähnlich wie beim Western-Blot (Kapitel 4.5.8), auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Dazu werden die auf eine Größe von 7,0 × 9,0 cm zugeschnittenen Blotting-Schwämme und Membran für mindestens 20 min in 0,5×-TBE-Puffer gelegt. Der Blot wird zusammengebaut (Abbildung 24), in die Tank-Blotting-Apparatur eingespannt und mit 4°C kaltem 0,5×-TBE-Puffer überschichtet. Der Transfer findet bei 380 mA und einer Temperatur von ~10°C für 45 min statt.

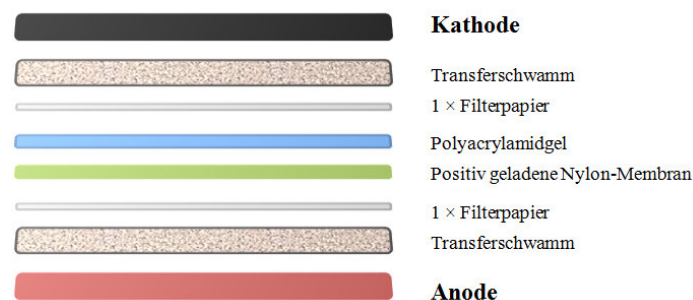


Abbildung 24: Aufbau der Tank-Blotting Apparatur.

Nach dem Transfer der DNA-Protein-Komplexe auf die Nylon-Membran, müssen diese darauf fixiert werden, dieser Prozess wird auch Crosslinking genannt. Dazu wird die Membran für 45-60 sec in einer Crosslink-Apparatur einer UV-Strahlung von 120 mJ/cm^2 ausgesetzt.

4.5.9.4 Detektion der Chemilumineszenz

Zur Detektion wird die Membran nach dem Crosslinking für 15 min in 20 ml auf $37\text{-}50^\circ\text{C}$ vortemperiertem Blocking-Puffer inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Blocken wird das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat mit dem Blocking-Puffer 1:300 verdünnt und die Membran darin für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran viermal für jeweils 5 min mit dem Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen und für 5 min in 30 ml Substrat-Äquilibriumspuffer inkubiert. Darauf folgt eine lichtgeschützte, 5 min Inkubation der Membran in der Detektionslösung, welche Luminol und Wasserstoffperoxid enthält. Die resultierende Chemilumineszenz wird mittels des Lumiimagers detektiert.

4.6 Durchflusszytometrie

Ursprünglich als in der Immunologie und Hämatologie entwickelte Methode, ist die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) genannt, heute eine in verschiedenen Bereichen der Biowissenschaften weit verbreitete Technik. Diese Methode erlaubt es Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften sowie deren intrazellulärer Unterschiede zu differenzieren und zu charakterisieren. Dabei passieren Zellen einer Zellsuspension einzeln einen fokussierten Laserstrahl. Das dadurch erzeugte charakteristische Streulicht und Fluoreszenz werden separat detektiert. Der Forward-Scatter gibt Auskunft über die Zellgröße, während der Side-Scatter Informationen über die intrazelluläre Beschaffenheit, wie Granularität, liefert (Abbildung 25). Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper lassen sich spezifische Strukturen auf und in den Zellen markieren und erkennen, wobei die Verwendung verschiedener Chromophore eine simultane Detektion unterschiedlicher Strukturen ermöglicht. (Shapiro, 2003; Luttmann *et al.* 2006).

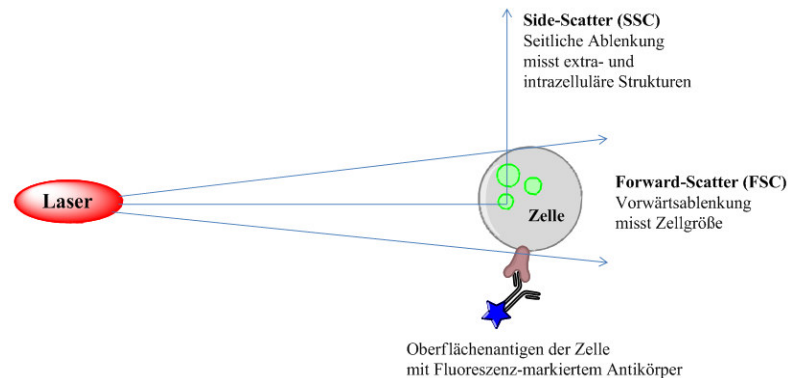


Abbildung 25: Prinzips der Durchflusszytometrie (nach Luttmann *et al.* 2006).

Für die durchflusszytometrische Analyse werden murine Knochenmarkzellen an Tag 9 nach Aussaat bzw. an Tag 11 nach LPS-Stimulation geerntet. Dazu wird das Medium entfernt, der Zellrasen mit eiskaltem PBS versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die adhärennten Zellen werden durch kräftiges Pipettieren vom Boden der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension wird für 3 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und das Zellpellet im Stain-Buffer zu einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Jeweils $100 \mu\text{l}$ dieser Suspension werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit antigenspezifischen Antikörpern für 30 min bei 4°C inkubiert (Tabelle 31). Die eingesetzte Antikörper-Konzentration wird vorab empirisch durch Titration ermittelt.

Die enzymatische Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale mittels Trypsin oder Accutase sollte vermieden werden, da durch Behandlung mit Enzymen die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen angegriffen wird, wodurch eine adäquate Antigen-Analyse nicht mehr gewährleistet werden kann (Zhang *et al.* 2012b).

Tabelle 31: Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Konzentration der Stammlösung	Eingesetztes Volumen [μl]
FITC Hamster Anti-Mouse CD11c	0,5 mg/ml	0,5
FITC Hamster IgG1 λ 1 Isotyp Kontrolle		
FITC Anti-Mouse F4/80 Antigen	0,5 mg/ml	1
FITC Rat IgG2a κ Isotyp Kontrolle		
PE-Cy7 Anti-Mouse MHC Class II	0,2 mg/ml	1,25
PE-Cy7 Rat IgG2b κ Isotyp Kontrolle		

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Zellsuspension für 10 sec bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 μ l der Cell Wash Lösung (BD Biosciences) resuspendiert. Die Suspension wird in ein FACS-Röhrchen überführt, vorsichtig gevortext und einer durchflusszytometrischen Analyse mit Hilfe des BD FACSCanto II unterzogen. Die verwendeten Geräteparameter sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 32) aufgeführt. Die Anregung erfolgt stets mit blauem Laser mit der Wellenlänge von 488 nm.

Tabelle 32: Einstellungen für Geräte-spezifische Parameter für Durchflusszytometrie

Parameter	Einstellung
Durchflussrate der Probe	10 μ l/min
Proben-Akquirierung	10000 Zellen
Spannung FSC	180 V
Spannung SSC	350 V
Spannung FITC	400 V
Spannung PE-Cy7	350 V

Die Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe der BD FACSDiva Software und der Flowing Software. Dotplots (Auftragung FSC gegen SSC) werden sowohl von Fluoreszenz-markierten als auch ungefärbten Zellen aufgenommen. Zur Darstellung eines Histogramms wird bei Proben, die mit nur einem Antikörper markiert werden, die Zellzahl gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Im Falle der Proben, die mit zwei Antikörpern markiert werden, wird zur Errechnung prozentualer Verteilung der unterschiedlich markierten Zellen ebenfalls ein Dotplot dargestellt. Tabelle 33 fasst die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore zusammen.

Tabelle 33: Eigenschaften verwendeter Fluorophore für FACS

	FITC	PE-Cy7
Absorptionsmaximum [nm]	494	496
Emissionsmaximum [nm]	520	785
Fluoreszenzdetektion mit 488 nm Laser [nm]	515-545	750-810
Fluoreszenz-Kanal (BD FACSCanto)	Grün	Infrarot
Filter [nm]	530/30	780/60

Um die unspezifische Bindung des untersuchten Antikörpers einzuschätzen, ist der Einsatz einer adäquaten Isotyp-Kontrolle zu jedem verwendeten Antikörper unabdingbar. Zur Auswertung wird im Histogramm das Raster für die Isotyp Kontrolle so gesetzt, dass es 99 % aller Zellen einschließt. Diese Einstellung wird für die Messung der Antikörper-markierten Probe beibehalten.

4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, kurz HPLC (engl. für *High Pressure Liquid Chromatography*) ist eine leistungsfähige Technik, zur Auftrennung und Analyse von Komponenten biologischer Proben, bei der das Probengemisch zwischen zwei Phasen – der stationären und der mobilen Phase – in einer Trennsäule verteilt wird. Da die Bestandteile der zu untersuchenden Probe diverse Eigenschaften besitzen – unterschiedlich lipophil oder hydrophil sind – interagieren diese verschieden mit dem Säulenmaterial. Je nach Stärke der Wechselwirkung eluieren die Komponenten der Probe zu unterschiedlichen Retentionszeiten, die anhand diverser Detektoren erfasst werden können (Eppert, 1979; Cammann, 2001; Meyer, 2004).

Bei der stationären Phase werden zwei Arten unterschieden – die Normalphase (NP) und die Umkehrphase (*reversed phase*, RP). Bei der NP-HPLC liegt eine polare stationäre Phase (z.B. Silicagel/Kieselgel, Aluminiumoxid) und eine unpolare mobile Phase (z.B. Hexan, Chloroform) vor. Bei der RP-HPLC hingegen kommen eine unpolare stationäre Phase (meistens modifizierte Silane, wie C₈ oder C₁₈) und eine polare mobile Phase (z.B. Wasser, Gemische mit Methanol oder Acetonitril) zum Einsatz. Der Aufbau eines HPLC-Systems ist in der folgenden Abbildung 26 schematisch dargestellt.

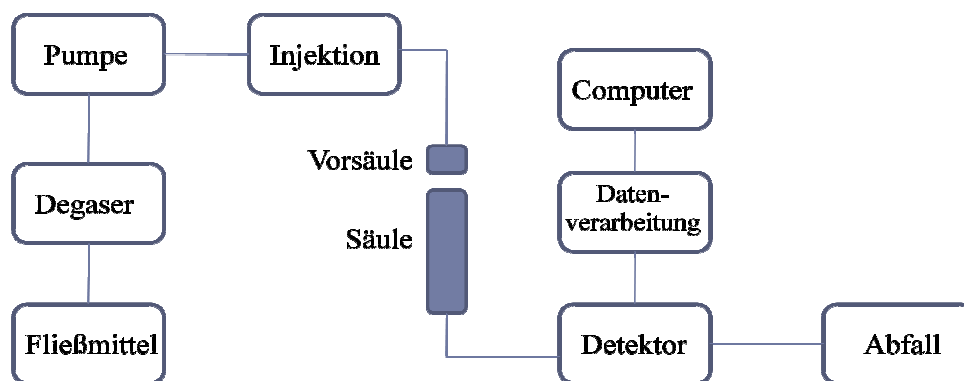


Abbildung 26: HPLC-System, schematisch (nach Cammann, 2001).

Nach dem Entgasen wird das Fließmittel durch eine Pumpe mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit gefördert und die gelöste Probe auf die Chromatographiesäule gegeben. Nach Passieren der Säule werden die Analyten anhand eines geeigneten Detektors erfasst. Die Wahl des Detektors orientiert sich an den Eigenschaften der untersuchten Analyten. Dabei stehen verschiedene Arten an Detektorsystemen für die HPLC zur Auswahl. Neben Fluoreszenz, Chemilumineszenz und Brechungsindex können die Analyten auch mittels UV-Vis Spektroskopie oder Massenspektrometrie detektiert werden (Cammann, 2001; Meyer, 2004).

In der vorliegenden Arbeit dient die UV-Vis Spektroskopie mittels DAD als Detektionsverfahren zur Analyse chromatographisch getrennter Analyten, eine der am häufigsten eingesetzten Detektionsmethoden. Die Detektion ist jedoch nur dann möglich, wenn das untersuchte Molekül eine chromophore Gruppe, wie z.B. einen aromatischen Ring oder eine Carbonylgruppe, beinhaltet. Die Messung der Extinktion kann bei einer festen, spezifischen, vom eingebauten Filter abhängigen Wellenlänge erfolgen (Photometer), wobei ein Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung (Spektrometer) die Möglichkeit bietet die Wellenlänge auf das Absorptionsmaximum des untersuchten Analyten anzupassen. Die wohl flexibelste Art der UV-Vis Detektion bietet der Diodenarray-Detektor (DAD). Dabei erfolgt die Umwandlung der Absorption in ein elektrisches Messsignal nicht durch eine einzelne Photomesszelle, sondern durch eine Anordnung zahlreicher Photodioden (215 – 1024). Dies ermöglicht der Zahl der Dioden entsprechend die Anzahl verschiedener Wellenlängen gleichzeitig zu erfassen. So kann von jedem Peak im Chromatogramm das gesamte UV-Vis Spektrum aufgenommen werden, was zur Strukturaufklärung beitragen kann (Cammann, 2001; Meyer, 2004).

4.7.1 Probenvorbereitung

Für die HPLC-Analyse werden murine Knochenmarkzellen auf 60 mm Kulturschalen ausgesät und wie beschrieben (Kapitel 4.1.3) kultiviert. Am Tag 10 erfolgt die Behandlung der Zellen mit DMSO, Calcitriol oder LPS für 48 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Mediumüberstände behandelte Zellen gesammelt. Der Zellrasen wird mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst und zu den gesammelten Mediumüberständen gegeben. Die Zellsuspension wird mittels Ultraschall homogenisiert. Für die Präzipitation der Proteine wird zu 25 ml der homogenisierten Zellsuspension gleiches Volumen eiskalten Acetons gegeben, durch kräftiges Schütteln vermischt und für 6-8 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension für 15 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 6-8 h bei -20°C inkubiert, um eine vollständige Präzipitation der Proteine zu gewährleisten. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei $10000 \times g$ für 15 min wird der Überstand in einen Spitzkolben überführt und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 1

ml bidestilliertem Wasser aufgenommen und durch eine 0,2 μm PVDF Membran gefiltert. Die Proben werden direkt einer HPLC-Analyse unterzogen oder bei 4°C aufbewahrt.

4.7.2 HPLC-Analyse

Zur chromatographischen Analyse wird eine LiChrospher[®] 100 RP-18-Trennsäule (250 × 4 mm, 5 μm) mit der entsprechenden RP-18-Vorsäule LiChrospher[®] 100 (5 μm) LiChroCART[®] 4-4 der Firma Merck verwendet. Als Fließmittel dienen bidestilliertes Wasser (A) und Acetonitril (B). Das Injektionsvolumen beträgt 50 μl , die Durchflussrate 0,8 ml/min und die Dauer einer jeden Messung 65 min. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das zur Trennung verwendete Gradientenprofil ist in der folgenden Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34: Gradientenprofil der HPLC-Methode

Zeit [min]	Fließmittelzusammensetzung [% B]
0-10	0 (isokratisch)
10-55	100 (linear)
55-60	100 (isokratisch)
60-61	0 (linear)
61-65	0 (isokratisch)

4.8 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Daten der vorliegenden Arbeit werden mit Hilfe der GraphPad InStat 3.0 Software (GraphPad Software, San Diego, USA) statistisch analysiert. Die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Varianz Analyse One-way ANOVA mit dem *Dunnnett's Multiple Comparisons Test* dient zur Untersuchung der Unterschiede zwischen mit verschiedenen Konzentrationen behandelten Proben und der entsprechenden Kontrolle. Zur statistischen Analyse multipler Paarvergleiche – mehrerer Gruppen untereinander – wurde die Varianz Analyse One-way ANOVA mit dem *Bonferroni's Multiple Comparisons Test* herangezogen. Zum Vergleich der Kontrolle mit nur einem Behandlungspunkt wird der *one-tailed unpaired Student's t-test* mit Welch Korrektur angewandt. Signifikanzen werden durch Sternchen über den entsprechenden Daten markiert: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$.

ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung primärer muriner Knochenmarkzellen ohne und mit 48-stündiger Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), den Endotoxinen gramnegativer Bakterien, zum Nachstellen einer Infektion. Die gewonnenen konditionierten Mediumüberstände der myeloider Zellen, vor und nach LPS-Stimulation, wurden hinsichtlich ihrer Stickoxid- und Zytokin-Konzentration analysiert. Des Weiteren wurden die gewonnenen Mediumüberstände auf ihr Vermögen das Enzym Cytochrom P450 1A1 in immortalisierten Hepatomzellen auf verschiedenen Ebenen (Enzymaktivität, mRNA, Protein) zu induzieren beziehungsweise zu inhibieren, untersucht. Weiterhin wurden murine myeloide Zellen mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin sowie Calcitriol für 48 h behandelt und die daraus resultierende Änderung der Zytokinausschüttung und der Genexpression verschiedener Gene analysiert. Zusätzlich sollte der Zusammenhang zwischen den beiden durch die genannten Substanzen beeinflussten Rezeptoren Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) – beziehungsweise deren Signalwegen – näher betrachtet werden.

5.1 Charakterisierung muriner Knochenmarkzellen

Das Knochenmark enthält hämatopoetische Stammzellen und Precursorzellen. Nach Isolierung dieser Zellen kann bei der Kultivierung, unter Verwendung bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die Differenzierung beeinflusst und in eine Richtung gesteuert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Kultivierung der isolierten Stammzellen der Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor – kurz GM-CSF – verwendet, um so die

Ausdifferenzierung der Stammzellen zu Immunzellen – Granulozyten und Monozyten – zu lenken. In der Literatur wird unter Verwendung des GM-CSF die Bildung von dendritischen Zellen als auch Makrophagen aus Knochenmarkzellen beschrieben (Inaba *et al.* 1992; Lutz *et al.* 1999; Marim *et al.* 2010). Über den Zeitraum der 12-tägigen Kultivierung wurden Adhärenz und Proliferation der Zellen sowie deren Morphologie lichtmikroskopisch untersucht. Da eine lichtmikroskopische Untersuchung alleine nicht ausreicht, um eine eindeutige Charakterisierung vorzunehmen, wurden die Zellen am Ende der Kultivierungsperiode, vor und nach der LPS-Stimulation, hinsichtlich dreier Oberflächenmarker CD11c, F4/80 und MHC II zusätzlich einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

5.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Innerhalb der 12-tägigen Kultivierung muriner Knochenmarkzellen kann eine morphologische Änderung der Zellen beobachtet werden. Direkt nach der Aussaat, an Tag 0, weisen die Zellen eine kleine, runde Form auf. Ab dem dritten Kultivierungstag beginnen die Zellen zu adhären und proliferieren, sodass bis zum zehnten Kultivierungstag ein konfluenter, adhärenter Zellrasen beobachtet werden kann. Ein kleiner Teil der Zellen verbleibt jedoch in Suspension und weist die Morphologie dendritischer Zellen auf (Abbildung 27). Werden die Zellen für 48 h mit LPS (1 µg/ml) stimuliert, kann die Bildung von langen Zellfortsätzen, sogenannten Pseudopodien, und Granula im Zellinneren, festgestellt werden (Abbildung 27 C). Dabei hat die LPS-Stimulation nur kleinen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Anhand einer Trypanblaufärbung konnte zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung eine Vitalität von über 90 % festgestellt werden.

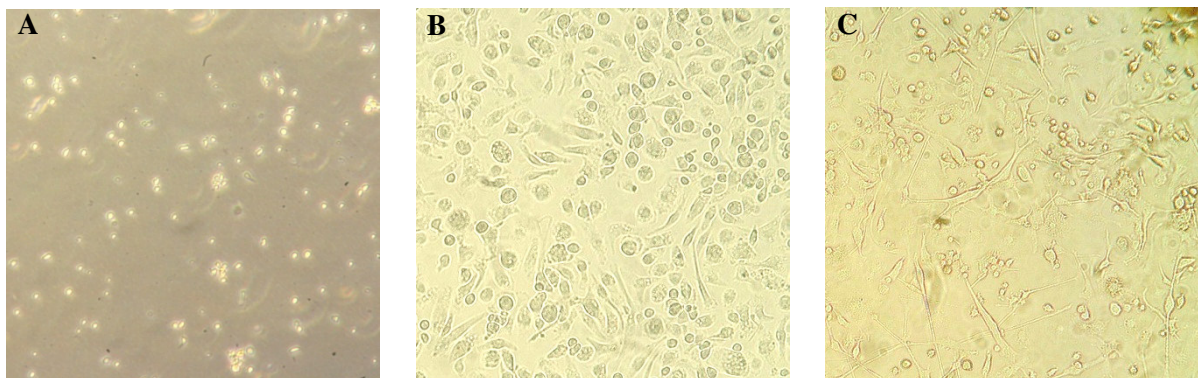


Abbildung 27: Murine Knochenmarkzellen in verschiedenen Stadien der Kultivierung. Tag 0, direkt nach Isolierung (A), Tag 10 (B), Tag 12, nach 48 h Stimulation mit 1µg/ml LPS (C). 100-fache Vergrößerung.

5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Durchflusszytometrische Untersuchungen wurden im Zeitraum Juni 2012 bis März 2013 von Verena Ziegler im Rahmen einer Masterarbeit des Masterstudiengangs Toxikologie im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk an der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt.

Um murine Knochenmarkszellen besser zu charakterisieren, wurden diese einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen. Zunächst wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Granularität und Zellgröße mit und ohne LPS Stimulation untersucht. Dabei ist der Forward Scatter (FSC) ein Maß für die Zellgröße, während der Sideward Scatter (SSC) ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Die nachfolgende Abbildung 28 zeigt eine leichte Zunahme der Zellgröße nach Behandlung mit LPS (1 µg/ml), welche sich in steigenden Werten des Forward Scatter (FSC) widerspiegelt. Die Granularität der Zellen wird durch die Stimulation mit LPS (1 µg/ml) nicht beeinflusst. Zelltrümmer zeigen sich durch einen sehr kleinen FSC-Wert und betragen weniger als 10 %. Dies korreliert mit der festgestellten Vitalität der Zellen durch Trypanblau-Färbung.

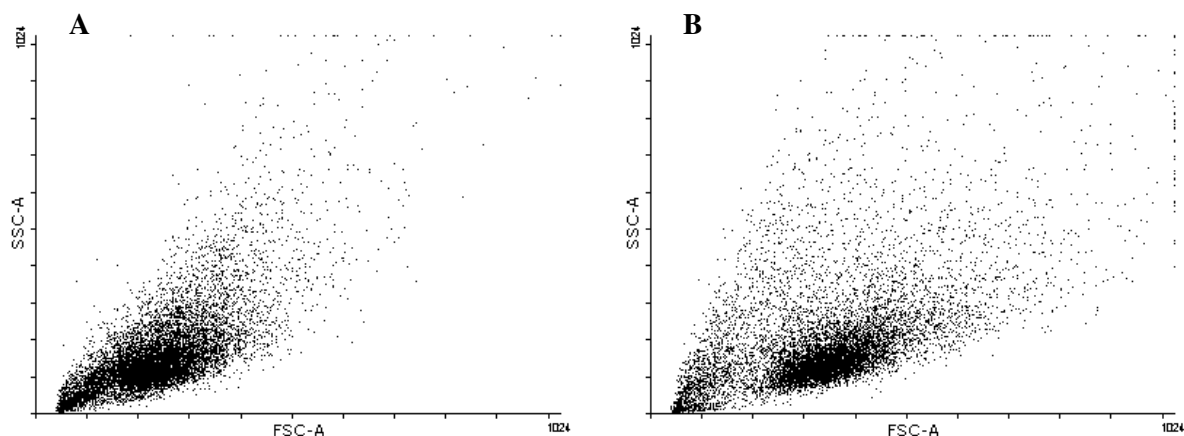


Abbildung 28: Dotplot - FSC und SSC myeloider Zellen mit und ohne LPS Stimulation. Zellen an Tag 11 ohne LPS Stimulation (A). Zellen an Tag 11 nach 48 h LPS Stimulation 1 µg/ml (B). Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen.

Weiterhin wurden die Zellen auf Eigenschaften dreier Oberflächenantigene untersucht: CD11c – ein Antigen, welches spezifisch von dendritischen Zellen präsentiert wird, F4/80 – spezifisch von Makrophagen präsentiertes Antigen und das Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II, von engl. *Major Histocompatibility Complex II*), welcher von beiden Zellsorten – dendritischen Zellen und Makrophagen – präsentiert wird. Es wurden Einzelfärbungen – mit Antikörpern gegen eines der genannten Antigene – sowie Doppelfärbungen – mit CD11c und MHC II bzw. F4/80 und MHC II – und den entsprechenden Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Abbildung 29 zeigt Ergebnisse der Einzelfärbungen von Knochenmarkszellen an Tag 9 und Tag 11 mit und ohne LPS Stimulation als Histogramm.

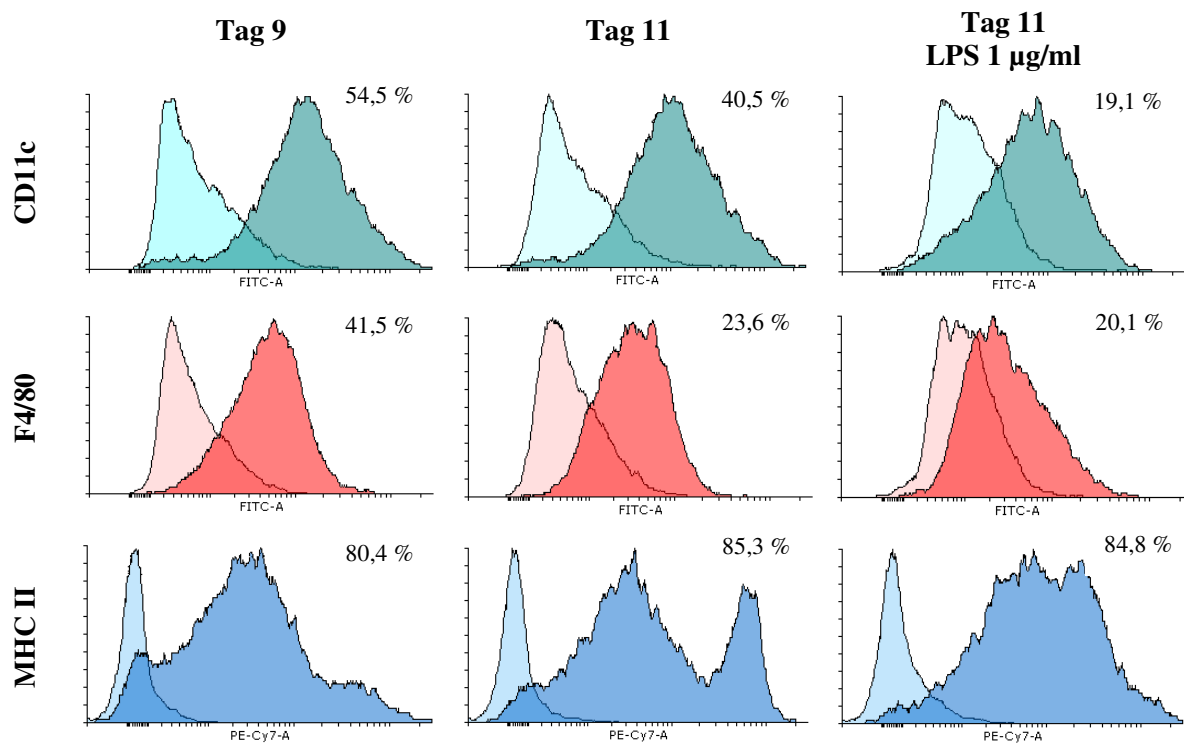


Abbildung 29: Oberflächeneigenschaften myeloider Zellen (Einzelfärbung). Knochenmarkszellen an Kulturtag 9 und 11 ohne bzw. mit einer 48 h LPS Stimulation (1 µg/ml). Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen CD11c, F4/80 oder MHC II (dunkler Bereich) und den entsprechenden Isotyp Kontrollen (heller Bereich) Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen.

Die nachfolgende Tabelle 35 fasst die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten nochmal zusammen. Nach 9-tägiger Kultivierung muriner Knochenmarkzellen sind 53,9 % aller Zellen CD11c positiv und 43,7 % der gesamten Zellpopulation F4/80 positiv. Nach weiteren 48 h fällt der Anteil CD11c-positiver Zellen auf 45,8 %. Hingegen verringert sich die Population F4/80-positiver Zellen durch eine längere Kultivierungsdauer statistisch höchst signifikant auf 22,1 %. Nach 48-stündiger Stimulation mit 1 µg/ml LPS sinkt der Anteil CD11c-positiver Zellen höchst signifikant auf 22,3 %, während die Population F4/80 positiver konstant bleibt. Die Präsentation von MHC II-Oberflächenmolekülen bleibt über den Zeitraum der Kultivierung und durch Stimulation mit LPS unbeeinflusst, rund 85 % aller Zellen weisen MHC II Moleküle auf ihrer Oberfläche auf.

Tabelle 35: Antigen Einzelfärbung. Profil der Oberflächen Antigene muriner myeloider Zellen ohne und mit 48 h LPS Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD; n=4. Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen. *=p≤0,05; **=p≤0,01; *=p≤0,001.**

Oberflächen Antigen	Tag 9	Tag 11 ohne LPS	Tag 11 LPS 1 µg/ml
CD11c	53,9 ± 10,7 %	45,8 ± 5,5 %	22,3 ± 4,5 % ***
F4/80	43,7 ± 5,1 %	22,1 ± 4,2 % ***	20,5 ± 5,0 %
MHC II	81,0 ± 5,1 %	84,0 ± 7,7 %	85,0 ± 1,4 %

Des Weiteren wurden murine myeloide Zellen an Kulturtag 11 mit und ohne eine LPS-Stimulation einer Antikörper-Doppelfärbung – CD11c und MHC II beziehungsweise F4/80 und MHC II – und anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung unterzogen. Die nachstehende Abbildung 30 illustriert die Ergebnisse der Antikörper-Doppelfärbung. Für jede Messung erfolge eine Akquirierung von 10000 Zellen. Die Einstellungen des Zytometers wurden bei jeder Messung gleich gehalten. Die Raster-Einstellung erfolgte entsprechend der Isotyp Kontrollen (Anhang, Abbildung 95).

Bei den gezeigten Dotplots wird die Fluoreszenzintensität von CD11c oder F4/80 (FITC-gekoppelte Antikörper) gegen die Fluoreszenzintensität von MHC II (PE-Cy7-konjugierter Antikörper) aufgetragen. Doppel-positive Zellen erscheinen dabei im rechten oberen Quadranten. Neun Tage nach Isolierung und Aussaat präsentieren 14,3 % der Zellen CD11c und MHC II auf ihrer Oberfläche. Dieser Befund ändert sich nicht signifikant durch eine Verlängerung der Kultivierungsdauer auf 11 Tage oder eine 48-stündige Stimulation mit dem Endotoxin Lipopolysaccharid. Der Anteil an F4/80-MHC II positiven Zellen beträgt an Tag 9 rund

21 % und bleibt konstant auch nach Kultivierung für weitere zwei Tage. Die Behandlung mit 1 µg/ml LPS für 48 h senkt den Anteil F4/80-MHC II doppelt-positiver Zellen nicht signifikant auf 11,3 % (Tabelle 36). Insgesamt weisen die Werte jedoch hohe, von Tier zu Tier interindividuelle Abweichungen auf.

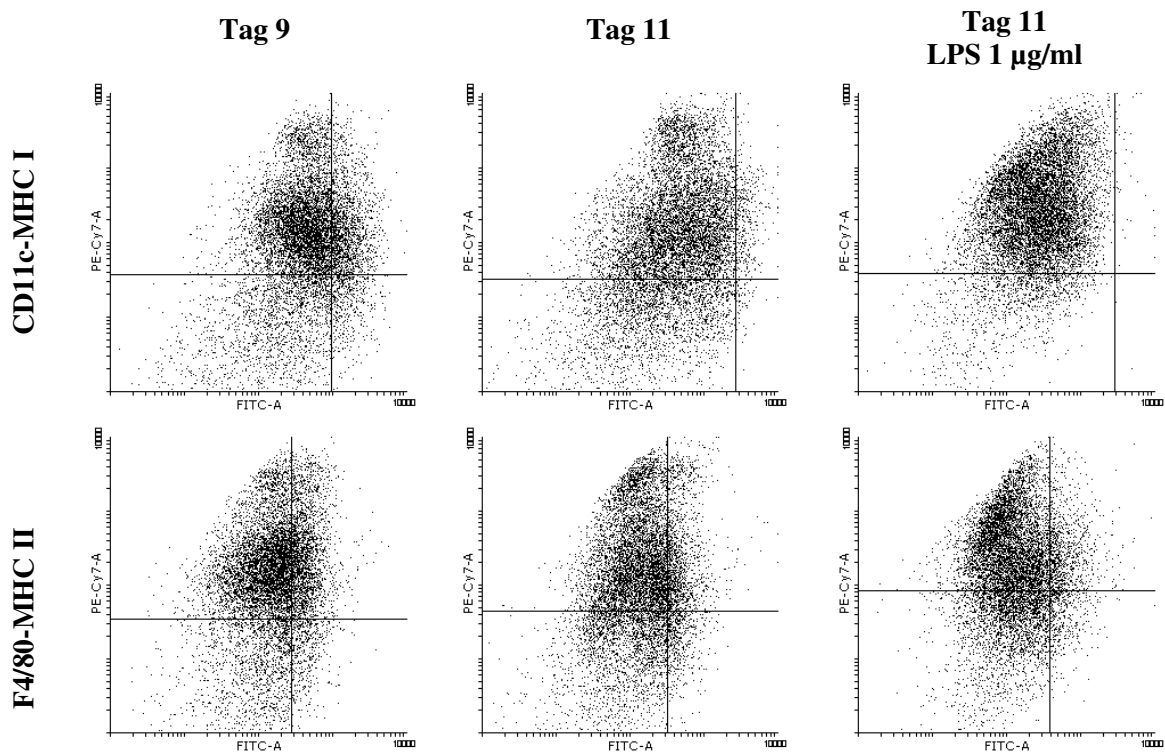


Abbildung 30: Oberflächeneigenschaften myeloider Zellen (Doppelfärbung). Knochenmarkszellen ohne bzw. mit einer 48 h LPS Stimulation (1 µg/ml). Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen CD11c + MHC II oder F4/80 + MHC II und den entsprechenden Isotyp Kontrollen. Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen.

Tabelle 36: Antikörper-Doppelfärbung. Profil der Oberflächen Antigene muriner ohne und mit 48 h LPS Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD; n=4. Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen.

Oberflächen Antigen	Tag 9	Tag 11 ohne LPS	Tag 11 LPS 1 µg/ml
CD11c-MHC II	14,3 ± 11,4 %	15,4 ± 11,6 %	8,9 ± 15,8 %
F4/80-MHC II	21,3 ± 11,0 %	21,5 ± 13,8 %	11,3 ± 2,8 %

5.1.3 Adhärenz und Proliferation

Über den Zeitraum der Kultivierung muriner Knochenmarkzellen von 12 Tagen wurde die Adhärenz der Zellen mit Hilfe des Resazurinreduktionstests fluorimetrisch bestimmt. In vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Umwandlung des blauen Farbstoffs Resazurin in das pinke fluoreszierende Resorufin hauptsächlich durch adhärenente Knochenmarkzellen erfolgt. Myeloide Zellen in Suspension zeigten eine marginale, kaum detektierbare Umwandlung des Resazurins zum fluoreszierenden Resorufin. Somit konnte angenommen werden, dass die gemessene Fluoreszenz proportional zur Anzahl adhärenter Zellen ist.

Abbildung 31 zeigt den zeitlichen Verlauf des Anteils adhärrierter Zellen. Über den Kultivierungszeitraum von 12 Tagen nimmt die Menge adhärrierter Zellen zu und ist, verglichen mit Tag 0, ab Tag 5 nach Aussaat statistisch hoch signifikant erhöht. Durch 48-stündige Behandlung der myeloiden Zellen mit 1 µg/ml des Endotoxins LPS stagniert die Zahl adhärrierter Zellen und ergibt sich im Vergleich zu Zellen an Tag 12 ohne LPS-Stimulation als statistisch signifikant.

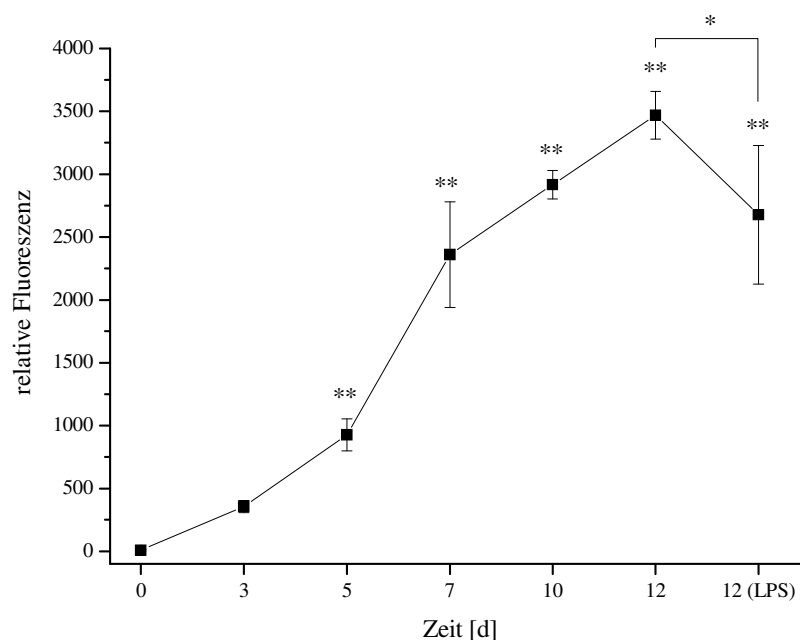


Abbildung 31: Zeitlicher Verlauf adhärrierender und proliferierender myeloider Zellen. MW ± SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$**

5.2 Einfluss von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen auf Hepatomzelllinien

Nach Isolierung und Aussaat muriner Knochenmarkzellen wurden diese, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, mit GM-CSF-haltigem Medium kultiviert. An Tag 10 wurden die ausdifferenzierten Zellen für 48 h mit 0 µg/ml, 1 µg/ml oder 2 µg/ml LPS behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Mediumüberstände der drei Gruppen gesammelt und hinsichtlich ihrer Eigenschaften auf Zytotoxizität in drei Hepatomzelllinien HepG2 (human), H4IIE (Ratte) sowie Hepa-1 (Maus) sowie bezüglich des Einflusses auf Cytochrom P450 1A1 in der humanen Zelllinie HepG2 untersucht. Die Behandlung der Hepatomzelllinien mit den gewonnenen Überständen der Knochenmarkzellen erfolgte unter Standardbedingungen für 48 h in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur).

5.2.1 Zellvitalität

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung. Kontroll-Mediumüberstände von Knochenmarkzellen, welche nicht mit LPS stimuliert wurden (LPS 0), zeigen keinen zytotoxischen Effekt auf humane und murine Hepatomzelllinien. Lediglich in der Rattenhepatomzelllinie H4IIE (Abbildung 32, C) ist eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Verringerung der Vitalität zu verzeichnen.

Nach einer 48 h Inkubation mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen (LPS 1 bzw. LPS 2), zeigt sich in den drei untersuchten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität. Durch Behandlung der Zelllinien mit unverdünnten LPS-konditionierten Mediumüberständen, wird eine statistisch hoch signifikante Reduktion der Vitalität auf rund 70 % erreicht, in Rattenhepatomzellen H4IIE sogar auf unter 50 %. Die Stimulation myeloider Zellen mit einer höheren Konzentration an LPS (2 µg/ml gegenüber 1 µg/ml) hat keinen wesentlich stärkeren Vitalitätsreduzierenden Einfluss des Mediumüberstandes in Hepatomzelllinien zur Folge, die Differenz der relativen Vitalität ist dabei nur geringfügig. Deshalb wurde für weitere Untersuchungen nur der mit 1 µg/ml LPS konditionierte Mediumüberstand verwendet.

Zur Überprüfung, ob der beobachtete zytotoxische Effekt auf LPS zurückzuführen ist, wurden die Zelllinien für 48 h mit 1 µg/ml bzw. 2 µg/ml LPS behandelt (Abbildung 32, D). In murinen und humanen Hepatomzellen konnte durch LPS in den genannten Konzentrationen kein negativer Effekt auf die Vitalität festgestellt werden. Nur in Rattenhepatomzellen H4IIE wurde ein geringer, aber statistisch signifikanter bzw. hoch signifikanter Rückgang der Vitalität

auf 93 % bzw. 89 % durch LPS verzeichnet. Insgesamt zeigten sich die Rattenhepatomzellen H4IIE bei diesem Assay am empfindlichsten während sich HepG2-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung der Mediumüberstände myeloider Zellen sowie gegenüber LPS am resistentesten erwiesen.

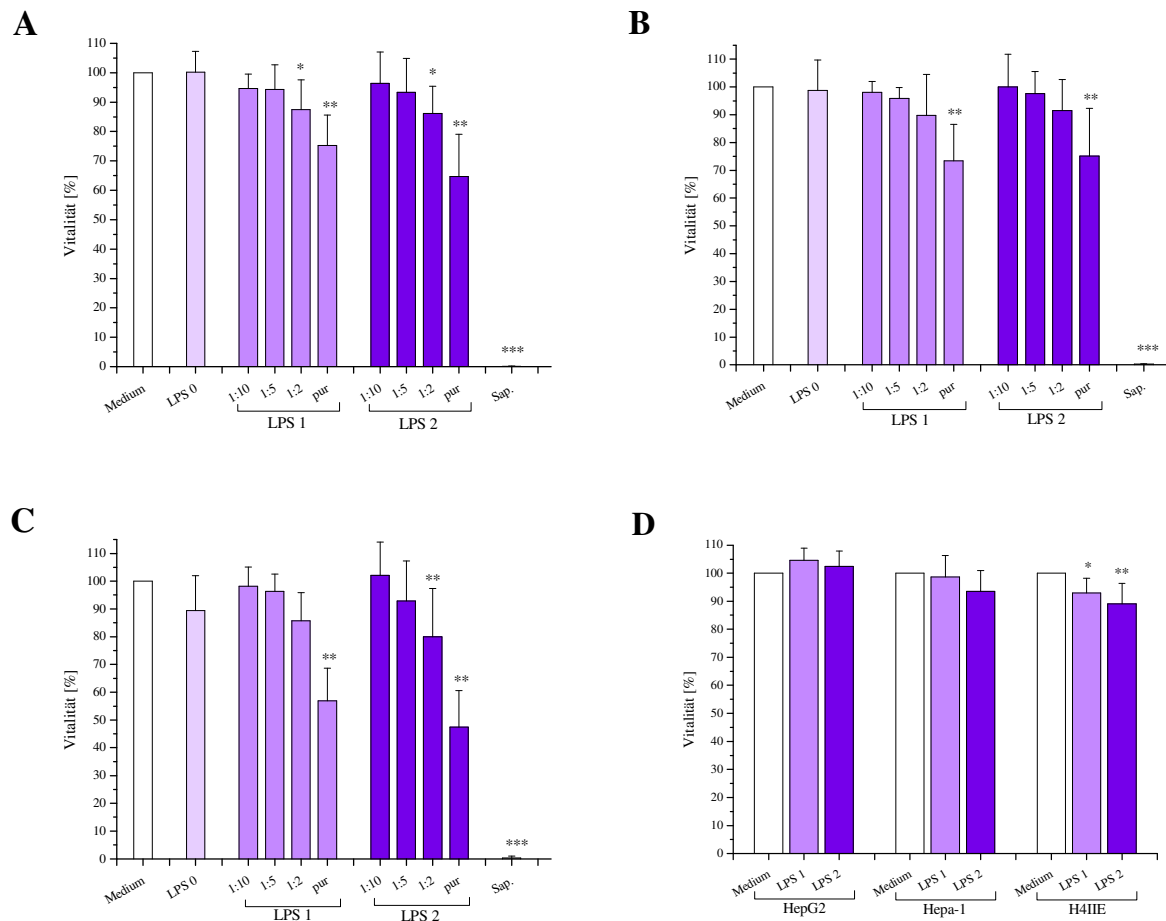


Abbildung 32: Zellvitalität in Hepatomzelllinien durch Mediumüberstände myeloider Zellen. Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) und LPS-Kontrollen. HepG2 (A), Hepa-1 (B) und H4IIE (C). LPS-Kontrollen 0, 1 und 2 $\mu\text{g/ml}$ (D). Sap.=Saponin, 0,1 %. MW \pm SD; n \geq 6. *=p \leq 0,05; **=p \leq 0,01; *=p \leq 0,001.**

Um zu testen, ob der beobachtete zytotoxische Effekt nur von Mediumüberständen ausdifferenzierter myeloider Zellen nach einer LPS-Stimulation herrührt, wurden frisch isolierte murine Knochenmarkzellen direkt an Tag 0 für 48 h mit LPS (0; 1 bzw. 2 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert, die Mediumüberstände gesammelt und analog vorangegangener Zytotoxizitätsuntersuchungen in HepG2-Zellen getestet. Wie anhand Abbildung 33 ersichtlich, zeigen Mediumüberstände

myeloider Zellen, welche an Tag 0 mit LPS inkubiert wurden, keinen zytotoxischen Effekt in humanen Hepatomzellen HepG2 nach einer 48 h-Inkubation unter Standardbedingungen.

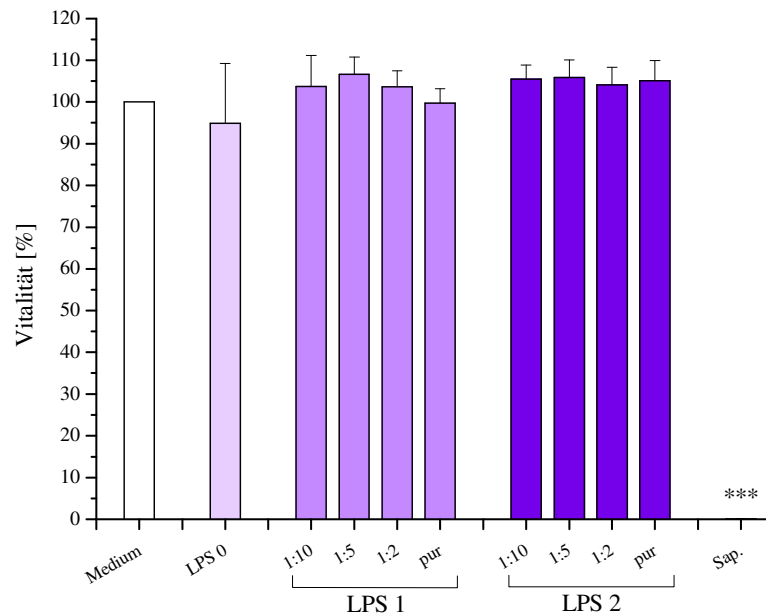


Abbildung 33: Zellvitalität in HepG2 durch Mediumüberstände frisch isolierter Knochenmarkzellen. Knochenmarkzellen wurden an Tag 0 für 48 h mit LPS (0; 1 bzw. 2 µg/ml) inkubiert und die Mediumüberstände gesammelt. HepG2-Zellen wurden mit den gewonnenen Überständen muriner Knochenmarkzellen in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) für 48 h behandelt. Sap.=Saponin 0,1 %. MW ± SD; n=3. *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001.

5.2.2 EROD-Aktivität

Der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) Assay ermöglicht die Untersuchung der Induktion des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms Cytochrom P450 1A1 und dient als Biomarker für Substanzen, die an den Ah-Rezeptor binden (Petrulis *et al.* 2001).

Zunächst wurde die EROD-Aktivität der drei Hepatomzelllinien HepG2, H4IIE und Hepa-1 überprüft. Dazu wurden die Zellen nach Aussaat und 24-stündiger Adhärenzphase für 48 h mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) der Konzentration 10⁻⁹ M sowie der Lösungsmittelkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) 0,1 % (v/v) unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mittels des EROD-Assays nach Behnisch analysiert. Abbildung 34 zeigt Aktivitäten der Ethoxyresorufin-*O*-deethylase und somit die Induktion des CYP1A1 in Hepatomzelllinien der drei Spezies Maus, Ratte und Mensch im Vergleich.

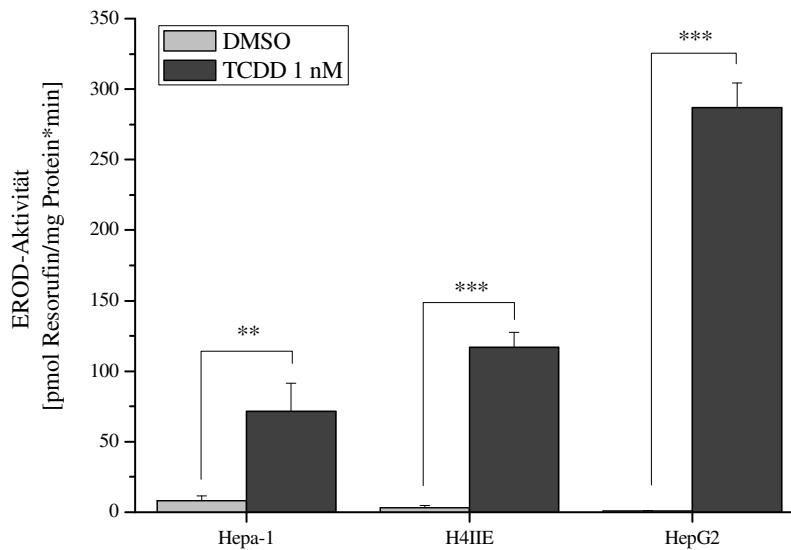


Abbildung 34: Vergleich der EROD-Aktivität in Hepatomzellen (HepG2, H4IIE und Hepa-1). 48h Inkubation mit TCDD 10^{-9} M und DMSO 0,1 % (v/v). MW \pm SD; n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

Nach 48 h Behandlung mit TCDD (10^{-9} M) weisen H4IIE und HepG2-Zellen eine statistisch höchst signifikante und Hepa-1-Zellen statistisch hoch signifikante Induktion des Enzyms CYP1A1 verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 % v/v). Mit einer EROD-Aktivität von 287 ± 18 pmol/mg/min zeigt die humane Hepatomzelllinie HepG2 die höchste Resonanz und wird deshalb für weitere Untersuchungen mit Mediumüberständen muriner myeloider Zellen gewählt, da hier im Vergleich zu Hepa-1-Zellen auch geringe Auswirkungen auf die EROD-Aktivität besser detektiert werden können.

Mediumüberstände myeloider Zellen, mit und ohne 1 μ g/ml LPS-Stimulation, wurden auf ihre Eigenschaft die EROD-Aktivität in Hepatomzellen zu beeinflussen, untersucht. Dazu wurden HepG2 für 48 h mit den gewonnenen Überständen in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) inkubiert und anschließend dem EROD-Assay unterzogen. Als Positivkontrolle für die Induktion des CYP1A1 diente der bekannte AhR-Ligand TCDD in der Konzentration 10^{-9} M. Anhand der nachstehenden Abbildung 35 ist ersichtlich, dass Mediumüberstände, welche ohne vorangegangene LPS-Stimulation myeloider Zellen gewonnen wurden, keine Änderung der EROD-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle hervorrufen. Hingegen zeigen Mediumüberstände nach einer 48-stündigen Stimulation mit 1 μ g/ml LPS eine konzentrationsabhängige Steigerung der CYP1A1 Induktion auf Enzymebene. Der unverdünnte Überstand hat verglichen mit der Kontrolle in HepG2-Zellen eine hoch signifikante

Erhöhung der EROD-Aktivität zur Folge. Durch die Positivkontrolle TCDD (10^{-9} M) wird das Enzym CYP1A1 statistisch höchst signifikant induziert. Die Inkubation von HepG2-Zellen mit LPS ($1\mu\text{g/ml}$) hat keine Auswirkungen auf die EROD-Aktivität (Abbildung 41).

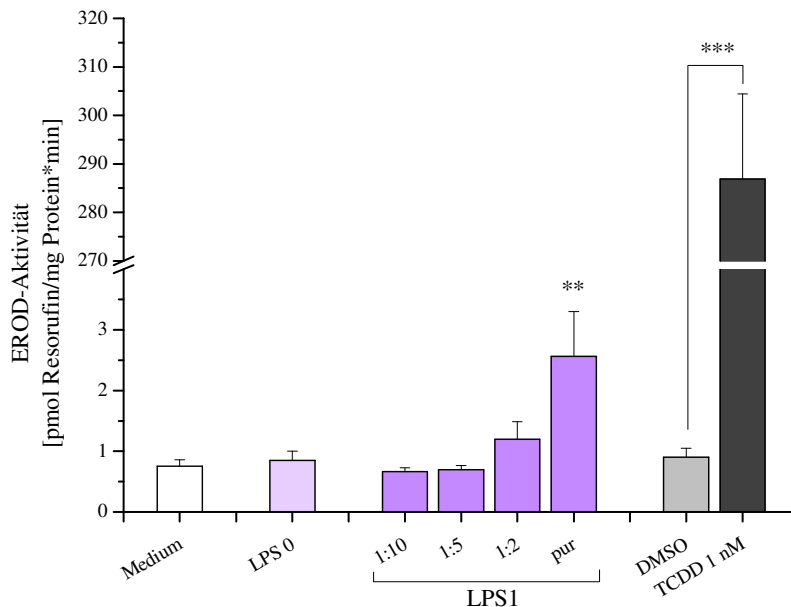


Abbildung 35: EROD-Aktivität in HepG2-Zellen durch Mediumüberstände muriner myeloider Zellen. Murine myeloide Zellen wurden an Tag 10 für 48 h mit LPS (0 bzw. $1\mu\text{g/ml}$) inkubiert und Mediumüberstände gesammelt. HepG2-Zellen wurden mit den gewonnenen Überständen in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) für 48 h behandelt. MW \pm SD; n=4. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$; ***= $p\leq 0,001$.

Zur Überprüfung, ob die beobachtete EROD-Aktivität, welche durch LPS-stimulierte Mediumüberstände muriner myeloider Zellen hervorgerufen wird, Ah Rezeptor abhängig ist, wurden HepG2-Zellen für 4 h CH223191 – einem spezifischen AhR Antagonisten – vorinkubiert und anschließend für 24 h mit TCDD bzw. mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen behandelt. Abbildung 36 zeigt, dass die TCDD bedingte EROD-Aktivität durch vorangegangene Behandlung mit dem Antagonisten ($1\mu\text{M}$) auf durchschnittlich 4,8 % hoch signifikant gesenkt wird. Wird wie Konzentration des Antagonisten auf $10\mu\text{M}$ erhöht, fällt die EROD-Aktivität weiter auf 1,7 %. Im Vergleich mit den Ergebnissen der TCDD-Gruppe fällt die Inhibition der EROD-Aktivität durch Vorinkubation mit $1\mu\text{M}$ CH223191 und nachfolgende Behandlung mit LPS-konditioniertem Mediumüberstand myeloider Zellen geringer aus. Die Aktivität wird auf durchschnittlich 23,8 % reduziert. Eine Erhöhung der Antagonisten-Konzentration auf $10\mu\text{M}$ führt nicht zur stärkeren Inhibition der EROD-Aktivität, diese

sinkt dabei im Mittel auf 41,7 %. Durch beide untersuchten CH223191 Konzentrationen ist das Herabsinken der EROD-Aktivität jedoch statistisch hoch signifikant (Abbildung 36).

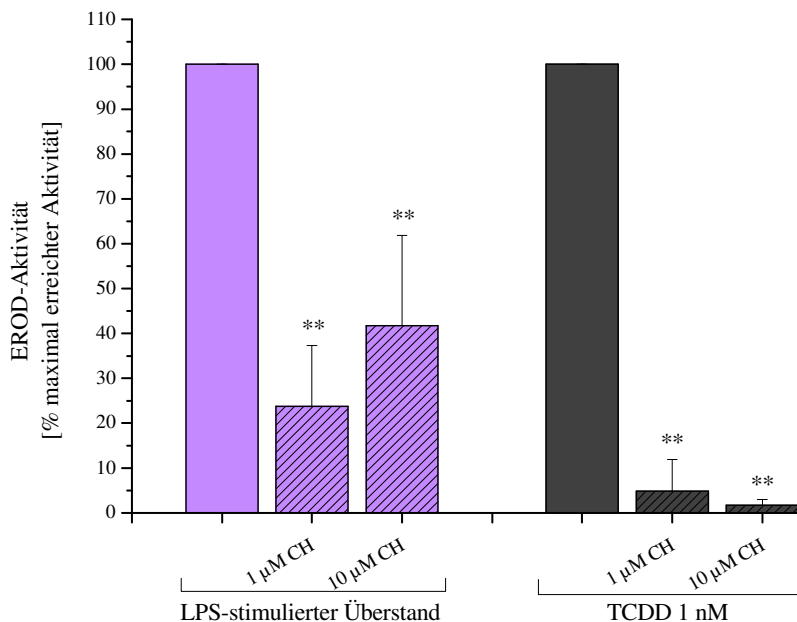


Abbildung 36: AhR-Abhängigkeit der EROD-Aktivität. HepG2-Zellen wurden für 4 h mit CH223191 (1 µM bzw. 10 µM) behandelt und anschließend für 24 h mit TCDD (10^{-9} M) oder dem Mediumüberstand LPS-stimulierter myeloider Zellen inkubiert. Als Kontrolle dient die Inkubation mit TCDD bzw. Mediumüberstand ohne vorangegangene CH223191 Behandlung. Daten sind der Masterarbeit von Verena Ziegler, März 2013 (Masterstudiengang Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk) entnommen. MW \pm SD, n \geq 3. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$; ***= $p\leq 0,001$.

5.2.3 Cytochrom P450 1A1 Genexpression

Nach den beobachteten Effekten LPS-konditionierter Mediumüberstände muriner myeloider Zellen in humanen Hepatomzellen bezüglich des CYP1A1 auf Enzymebene (EROD-Assay), wurde auch die *CYP1A1* Genexpression auf mRNA-Ebene überprüft. Dazu wurden HepG2-Zellen nach einer Adhärenzphase von 24 h mit Mediumüberständen LPS simulierter myeloider Zellen sowie mit TCDD 10^{-9} M für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Behandlungsperiode wurde die RNA der Zellen isoliert (Kapitel 4.4) und nach Umschreiben in cDNA mittels real-time PCR auf Genexpression des Phase I fremdstoffmetabolisierenden Enzyms *CYP1A1* untersucht. Abbildung 37 illustriert die Resultate der Genexpressionsanalyse. Man sieht eine konzentrationsabhängige Steigerung der relativen *CYP1A1*-Expression nach Inkubation mit LPS-konditionierten Mediumüberständen. Bei einer 1:2-Verdünnung wird eine statistisch signifikante, rund 4-fache Expression des *CYP1A1* erreicht. Die Inkubation mit

unverdünnten Mediumüberständen führt zur hoch signifikanten rund 10-fachen *CYP1A1*-Expression relativ zur Mediumkontrolle. Die 48 h-Behandlung humaner Hepatomzellen HepG2 mit der Positivkontrolle TCDD (10^{-9} M) bewirkt eine statistisch hoch signifikante, rund 86-fache Expression des AhR-Targetgens *CYP1A1* bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %).

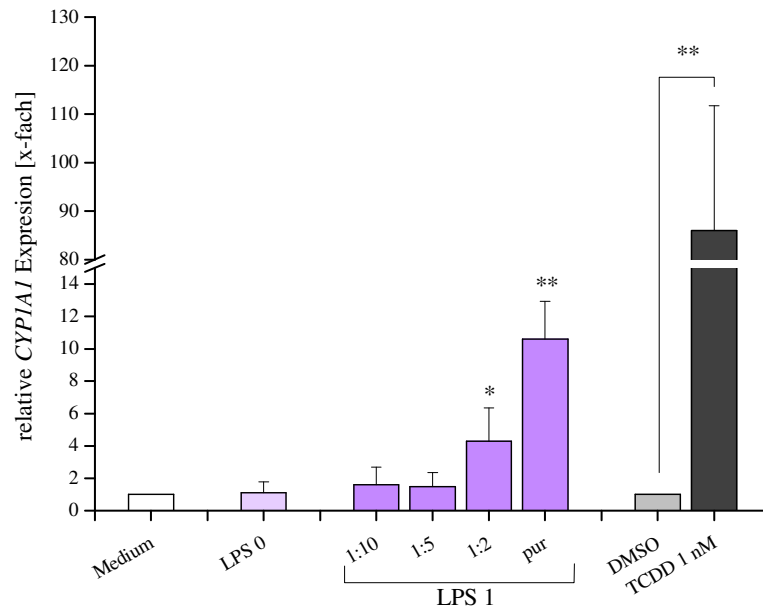


Abbildung 37: relative *CYP1A1* Genexpression in HepG2-Zellen durch Überstände muriner myeloider Zellen. Murine myeloide Zellen wurden an Tag 10 für 48 h mit LPS (0 bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und Mediumüberstände gesammelt. HepG2-Zellen wurden mit den gewonnenen Überständen in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) für 48 h. MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.3 Einfluss von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen auf Hepatomzellen nach Co-Inkubation mit TCDD

Da nach Behandlung der Hepatomzellen mit LPS-konditionierten Mediumüberständen muriner myeloider Zellen ein Vitalitätsreduzierender Effekt sowie eine Induktion der EROD-Aktivität festgestellt wurde, sollte untersucht werden, wie sich diese Überstände auf die TCDD-induzierte EROD-Aktivität, aber auch auf die Vitalität auswirken. Dazu wurden HepG2-Zellen nach 24-stündiger Adhärenzphase mit LPS-stimulierten Mediumüberständen muriner myeloider Zellen in den Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) und simultan mit TCDD 10^{-9} M für 48 h co-inkubiert. Anschließend wurden Analysen auf Zytotoxizität, EROD-Aktivität sowie *CYP1A1*-Genexpression durchgeführt.

5.3.1 Zellvitalität

Der Resazurinreduktionstest (Abbildung 38) zeigt, dass eine 48 h Co-Inkubation der Mediumüberstände myeloider Zellen mit TCDD (10^{-9} M) zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Vitalität in HepG2-Zellen führt. Bereits ab einer Verdünnung von 1:5 sinkt die Vitalität statistisch hoch signifikant. Beim unverdünnten LPS-stimulierten Mediumüberstand (pur) ist zusammen mit TCDD (10^{-9} M) ist ein Rückgang der Vitalität auf rund 52 % zu verzeichnen. Auch die Co-Inkubation der Mediumüberstände unstimulierter myeloider Zellen (LPS 0) zeigen einen statistisch hoch signifikanten Rückgang der Vitalität.

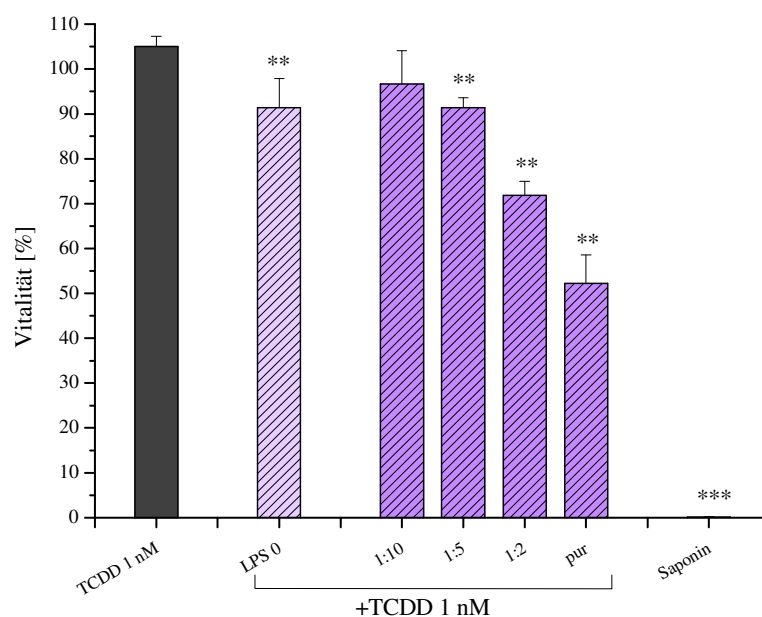


Abbildung 38: Zellvitalität. 48 h-Co-Inkubation von Mediumüberständen myeloider Zellen und TCDD in HepG2-Zellen. Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) simultan mit TCDD (10^{-9} M) für 48 h. MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

Der direkte Vergleich der Ergebnisse mit und ohne Co-Inkubation mit TCDD zeigt nochmal deutlich den Unterschied. Durch Co-Inkubation von HepG2-Zellen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter Zellen zusammen mit TCDD sinkt die Vitalität statistisch signifikant bzw. hoch signifikant im Vergleich zu Vitalitäten ohne TCDD (Abbildung 39).

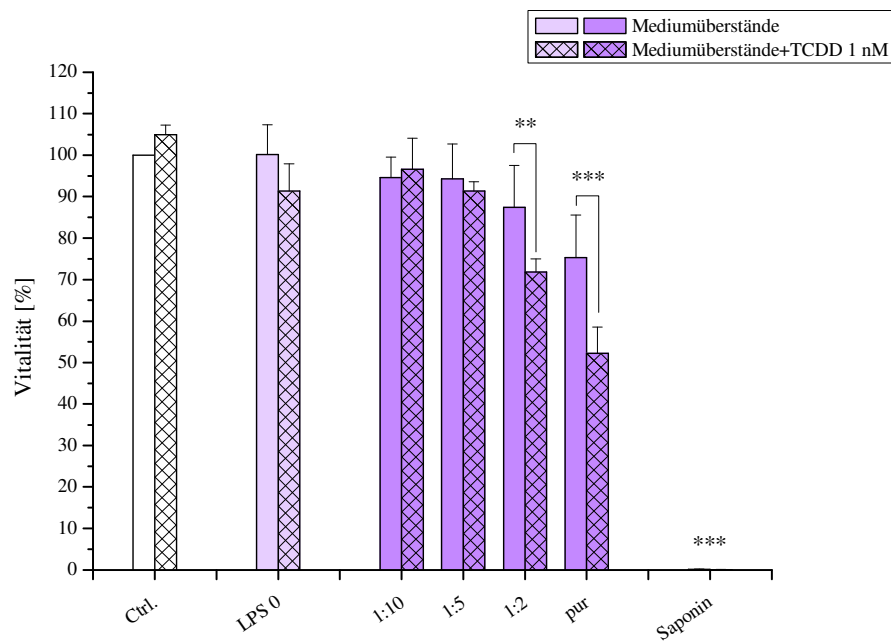


Abbildung 39: Vitalität in HepG2-Zellen. Vergleich Mediumüberstände vs. Co-Inkubation mit TCDD. 48 h Inkubation von HepG2-Zellen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter muriner Zellen. Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) mit und ohne Co-Inkubation mit TCDD (10^{-9} M). MW \pm SD, $n \geq 4$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

5.3.2 EROD-Aktivität

Ferner wurde der Effekt der Mediumüberstände LPS-stimulierter und nicht stimulierter myeloider Zellen in Kombination mit dem Ah-Rezeptor Agonisten 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin hinsichtlich der Induktion des Enzyms CYP1A1 im EROD-Assay untersucht, um festzustellen, ob ein synergistischer oder inhibierender Effekt auf TCDD-induzierte Enzymaktivität auftritt.

Hierzu wurden humane Hepatomzellen HepG2 nach Aussaat und 24-stündiger Adhärenzphase mit Mediumüberständen muriner myeloider Zellen in zuvor eingesetzten Verdünnungen simultan mit TCDD (10^{-9} M) für 48 h co-inkubiert und anschließend auf die EROD-Aktivität getestet. Abbildung 40 veranschaulicht die Ergebnisse des EROD-Assays.

Mediumüberstände myeloider Zellen ohne LPS-Stimulation (LPS 0) haben keine Auswirkungen auf die durch TCDD hervorgerufene EROD-Aktivität in HepG2-Zellen. Bei Überständen, die nach einer 48 h LPS-Inkubation muriner myeloider Zellen gewonnen wurden, ergibt sich ein anderes Bild. Es ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der EROD-Aktivität zu verzeichnen. Die Inkubation mit der 1:2-Verdünnung muriner Mediumüberstände zusammen mit

TCDD verursacht eine statistisch signifikante Reduktion der EROD-Aktivität um durchschnittlich 40 %. Werden humane Hepatomzellen für 48 h mit unverdünnten Mediumübersständen LPS-stimulierter myeloider Zellen und TCDD (10^{-9} M) co-inkubiert, beträgt die Induktion des Enzyms CYP1A1 nur noch durchschnittlich 33 % verglichen mit der durch TCDD allein hervorgerufenen Induktion. Der beobachtete suppressive Effekt ist statistisch hoch signifikant (Abbildung 40). Es kann ausgeschlossen werden, dass die Suppression von LPS verursacht wird, denn die Inkubation der HepG2-Zellen mit TCDD und LPS zeigte keinen Unterschied der EROD-Aktivität im Vergleich zu TCDD alleine (Abbildung 41).

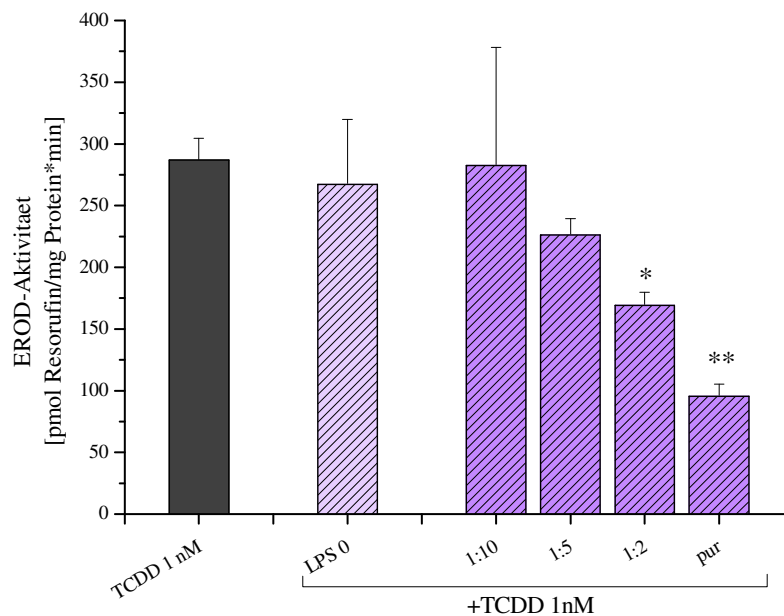


Abbildung 40: EROD-Aktivität von Mediumübersständen myeloider Zellen in HepG2 nach 48 Co-Inkubation mit TCDD (10^{-9} M). Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur) und simultane Inkubation mit TCDD (10^{-9} M) für 48 h. MW \pm SD; n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

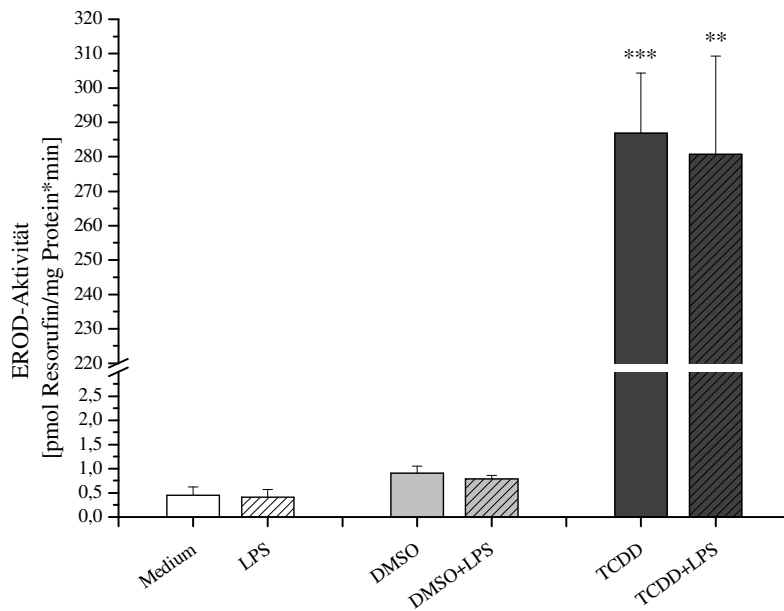


Abbildung 41: Einfluss von LPS auf EROD-Aktivität. 48 h-Inkubation von HepG2 mit Medium / DMSO (0,1 %) / TCDD (10^{-9} M) mit und ohne LPS 1 μ g/ml. MW \pm SD, $n \geq 3$.

5.3.3 Cytochrom P450 1A1 Genexpression

Der Einfluss von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen auf HepG2 in Kombination mit TCDD wurde auch auf mRNA Ebene hinsichtlich der Genexpression des Cytochrom P450 1A1 untersucht. HepG2-Zellen wurden im entsprechenden Format und adäquater Zelldichte ausgesät (siehe Tabelle 5). Nach 24-stündiger Adhärenzphase wurden die Zellen mit den gewonnenen Mediumüberständen ausdifferenzierter muriner Knochenmarkzellen – mit und ohne LPS-Stimulation – zusammen mit TCDD (10^{-9} M) für 48 h co-inkubiert. Nach Isolierung der RNA und deren Umschreiben in cDNA wurde die Expression von *CYP1A1* mittels quantitativer real-time PCR analysiert.

Wie man anhand Abbildung 42 erkennen kann, wird die durch TCDD hervorgerufene relative Expression des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms *CYP1A1* in humanen Hepatomzellen HepG2 durch 48-stündige Co-Inkubation mit TCDD (10^{-9} M) und konditionierten Mediumüberständen myeloider Zellen statistisch nicht beeinflusst. Man sieht aber eine tendenzielle Hemmung der TCDD-induzierten *CYP1A1*-Expression durch Mediumüberstände LPS-stimulierter myeloider Zellen. Die Werte unterliegen hierbei großen Schwankungen.

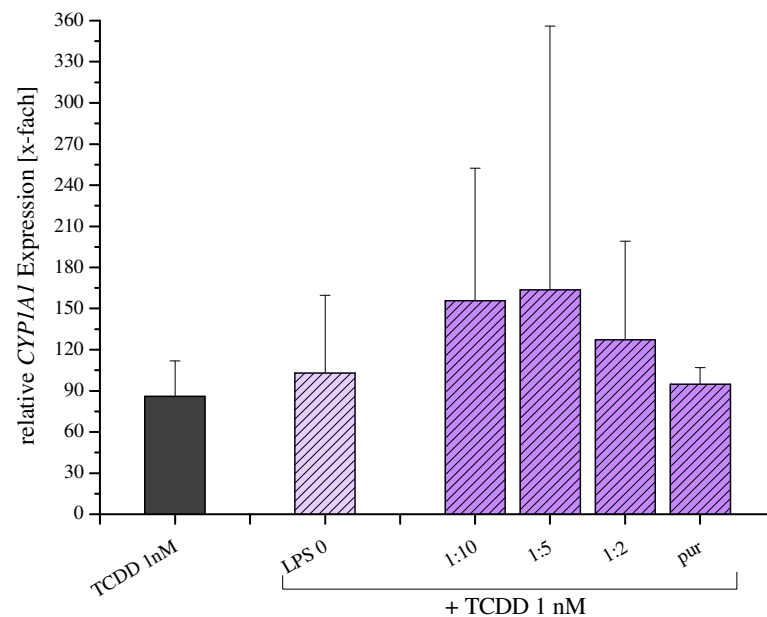


Abbildung 42: relative *CYP1A1* Expression in HepG2-Zellen nach Co-Inkubation mit TCDD und Überständen myeloider Zellen. Verdünnungen 1:10, 1:5, 1:2 und unverdünnt (pur), Co-Inkubation zusammen mit TCDD (10^{-9} M). MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.4 Analytik muriner myeloider Zellen

Um die beobachteten Effekte von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen in humanen Hepatomzellen besser nachvollziehen zu können, wurden die gewonnenen Überstände bezüglich der Konzentration der vier Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie hinsichtlich der NO-Konzentration analysiert. Des Weiteren wurden myeloide Zellen und deren Mediumüberstände einer HPLC-Untersuchung unterzogen.

5.4.1 NO-Bestimmung nach Griess

Stickoxid ist ein wichtiger physiologischer Botenstoff und Effektormolekül in vielen biologischen Systemen und Prozessen, darunter z.B. bei der Immunfunktion von Makrophagen oder als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem (Bredt *et al.* 1994; Dawson *et al.* 1995). Mit Hilfe des Griess Reagenz ist es möglich Stickoxid (NO) anhand seines stabilen Abbauproduktes Nitrit (NO $_2^-$) zu bestimmen.

Murine Knochenmarkzellen wurden isoliert und für zehn Tage kultiviert (Kap. 4.1.3). An Tag 10 wurden die ausdifferenzierten myeloiden Zellen für 48 h mit LPS (0 bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$) bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Mediumüberstände gesammelt und mittels des Griess-Assay auf den Gehalt von NO untersucht (Kap 4.5.5).

Abbildung 43 veranschaulicht die Ergebnisse der Stickoxid-Analyse. Nach einer 12 tägigen Kultivierung produzieren ausdifferenzierte myeloide Zellen ohne eine Stimulation mit LPS nur wenig Stickoxid. Die Nitrit Konzentration liegt hier bei durchschnittlich $8,8 \pm 1,9 \mu\text{M}$. Werden die Zellen jedoch an Tag 10 für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert, ist der ermittelte Nitrit Gehalt – NO-Abbauprodukt – mit durchschnittlich $76,1 \pm 8,5 \mu\text{M}$ fast zehn mal höher als ohne LPS-Stimulation und somit statistisch hoch signifikant.

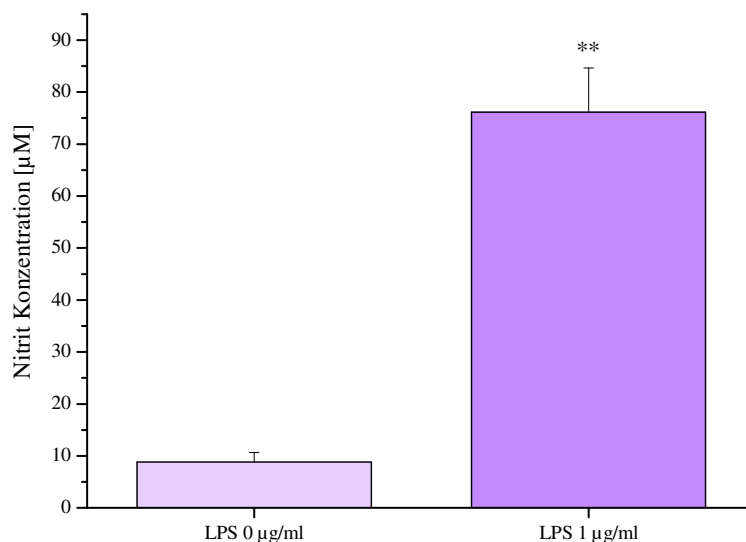


Abbildung 43: Nitrit Konzentration in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen. Murine myeloide Zellen wurden an Tag 10 für 48 h mit LPS (0 bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Mediumüberstände wurden gesammelt und auf den Nitrit-Gehalt getestet. MW \pm SD, n=3. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

5.4.2 Quantifizierung von Zytokinen

Zytokine stellen zentrale Mediatoren des Immunsystems dar und regulieren verschiedene Immunreaktionen, darunter auch Entzündungsreaktionen. So spielen sie eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen (Resch, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die vier inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen quantifiziert. Murine Knochenmarkszellen wurden wie beschrieben (Kap.4.1.3) kultiviert und am zehnten Kulturtag mit LPS (0 bzw. 1 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden die gewonnenen Mediumüberstände mittels ELISA auf den Gehalt der vier Zytokine untersucht.

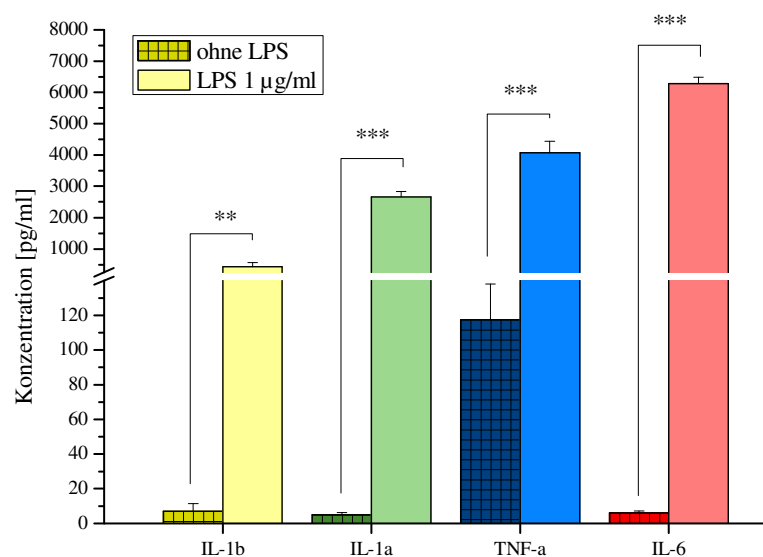


Abbildung 44: Zytokin-Konzentrationen in Mediumüberständen myeloider Zellen. Murine myeloide Zellen wurden an Tag 10 für 48 h ohne bzw. mit LPS (1 μ g/ml) inkubiert. Mediumüberstände wurden gesammelt und auf den Gehalt von IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α getestet. MW \pm SD, n \geq 3. *=p \leq 0,05; **=p \leq 0,01; ***=p \leq 0,001.

Abbildung 44 zeigt die ermittelten Konzentrationen von IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Ohne eine 48-stündige LPS-Stimulation myeloider Zellen sind die Zytokin-Gehalte der drei Interleukine relativ niedrig und befinden sich unter 10 pg/ml. TNF- α weist mit durchschnittlich 117 pg/ml die höchste Konzentration auf. Nach einer Behandlung der myeloiden Zellen mit 1

$\mu\text{g/ml}$ LPS ändert sich das Bild drastisch. Die Konzentrationen der vier Zytokine steigen statistisch hoch/höchst signifikant an, verglichen mit den Gehalten ohne LPS-Stimulation. IL-6 weist hier mit einem über 1000-fachen Anstieg von $6,1 \text{ pg/ml}$ auf durchschnittlich $6290 \pm 199 \text{ pg/ml}$ die höchste Zytokin-Konzentration auf, während IL-1 β mit $434 \pm 129 \text{ pg/ml}$ die geringste Konzentration zeigt (vgl. Tabelle 37).

5.5 Einfluss von Zytokinen auf HepG2

Die mittels ELISA ermittelten Zytokin Konzentrationen in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen nach Stimulation mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS sollten in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 auf Vitalität sowie CYP1A1 Induktion im EROD-Assay analysiert werden, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen den zuvor beobachteten Vitalitätsreduzierenden und CYP1A1-induktiven Effekten der Mediumüberstände und deren Co-Inkubation mit TCDD zu untersuchen. Die nachfolgende Tabelle 37 fasst nochmals die quantifizierten Zytokin-Gehalte sowie die daraus abgeleiteten Konzentrationen zur Inkubation in HepG2-Zellen zusammen.

Tabelle 37: Zytokin-Gehalte in Mediumüberständen myeloider Zellen und in Zellkultur eingesetzte Zytokin Konzentrationen. MW \pm SD, $n \geq 3$.

Zytokin	Konzentration ohne LPS-Stimulation [pg/ml]	Konzentration nach 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-Stimulation [pg/ml]	In Zellkultur höchste eingesetzte Konzentration [pg/ml]
IL-1α	$4,94 \pm 1,27$	2661 ± 175	2700
IL-1β	$7,07 \pm 4,22$	434 ± 129	450
IL-6	$6,14 \pm 1,18$	6290 ± 199	6500
TNF-α	$117,5 \pm 20,5$	4066 ± 377	4100

5.5.1 Zellvitalität

Die vier Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf Vitalität in HepG2-Zellen mit und ohne TCDD-Co-Inkubation untersucht. Rekombinante, murine Zytokine wurden dabei in der aus den ELISA-Untersuchungen abgeleiteten Konzentrationen und den Verdünnungen 1:10, 1:5 und 1:2 verwendet. Die sich ergebenden Konzentrationen der einzelnen Zytokine sind in der nachstehenden Tabelle 38 zusammengefasst.

Tabelle 38: In Zellkultur eingesetzte Zytokin Konzentrationen.

Zytokin	Höchste Konzentration [pg/ml]	Verdünnung 1:2 [pg/ml]	Verdünnung 1:5 [pg/ml]	Verdünnung 1:10 [pg/ml]
IL-1α	2700	1350	540	270
IL-1β	450	225	90	45
IL-6	6500	3250	1300	650
TNF-α	4100	2050	820	410

HepG2-Zellen wurden für 48 h unter Standardbedingungen mit den vier Zytokinen in jeweils vier verschiedenen Konzentrationen (Tabelle 38) mit und ohne eine Co-Inkubation mit TCDD (10^{-9} M) behandelt und im Resazurinreduktionstest untersucht. Desweiteren wurde eine Mischung der vier Zytokine in gleichen Verdünnungen in HepG2-Zellen getestet. Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 45 - Abbildung 49) illustrieren die Resultate der Zytotoxizitätsuntersuchungen.

Anhand Abbildung 45 erkennt man, dass IL-1 α nach 48 h-Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich 270-2700 pg/ml einen geringen Effekt auf die Vitalität von HepG2-Zellen hat. Nach statistischer Analyse mittels des *Dunnnett Multiple Comparisons Tests* ergibt sich zwar eine Signifikanz bezogen auf die Kontrolle (Medium), jedoch ist kein konzentrationsabhängiger Effekt zu beobachten und die Vitalität sinkt auch bei der höchsten verwendeten IL-1 α -Konzentration von 2700 pg/ml nicht unter 85 %. Werden humane Hepatomzellen mit IL-1 α und TCDD (10^{-9} M) co-inkubiert, ist eine tendenzielle Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Bei einer IL-1 α -Konzentration von 1350 pg/ml ergibt sich eine statistische Signifikanz im Vergleich auf die TCDD-Kontrolle. Aber auch hier bleibt die Vitalität stets über 85 %. Vergleicht man die Vitalitäten bei Inkubation mit dem Interleukin IL-1 α mit denen der TCDD-Co-Inkubation, ist kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Bei Inkubation humaner Hepatomzellen mit 45-450 pg/ml IL-1 β ist eine leichte konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung evident (Abbildung 46). Die höchste untersuchte Konzentration des Interleukins von 450 pg/ml verursacht eine statistisch signifikante Reduktion der Vitalität auf durchschnittlich 89,5 % relativ zur Mediumkontrolle. Dieser Effekt wird durch Co-Inkubation des Zytokins mit 10^{-9} M TCDD verstärkt. Bei der Konzentration von 450 pg/ml IL-1 β zusammen mit 1 nM TCDD sinkt die Vitalität der Zellen statistisch hoch signifikant um weitere 17 % auf durchschnittlich 72,4 %.

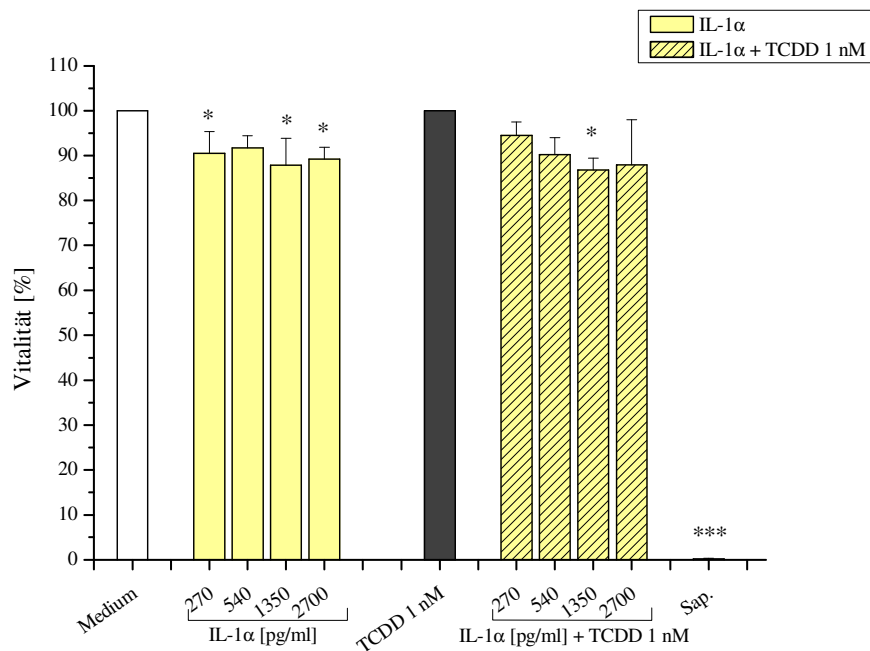


Abbildung 45: Einfluss von IL-1α auf Zellvitalität. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit IL-1α mit und ohne TCDD. MW ± SD, n=3. *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001

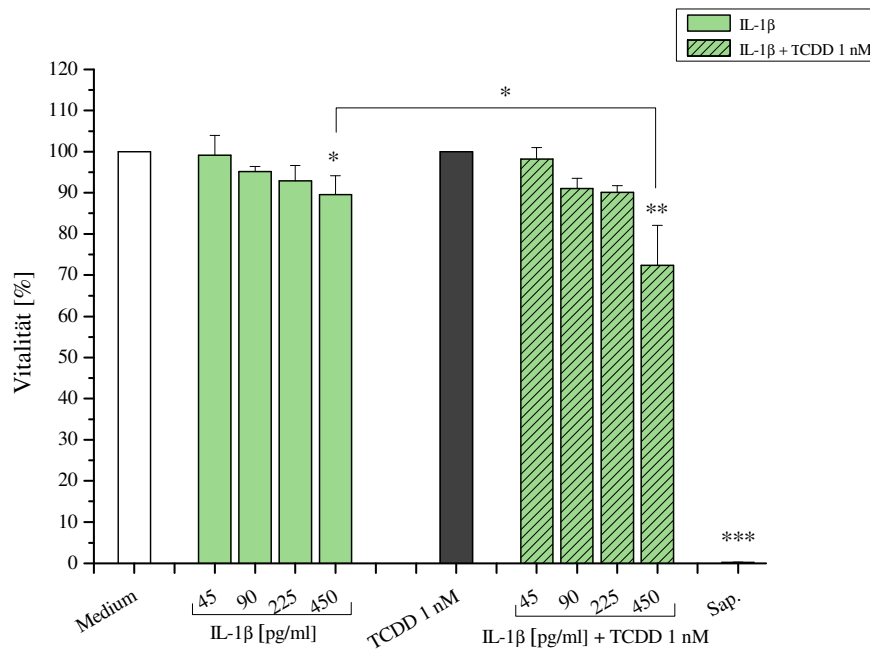


Abbildung 46: Einfluss von IL-1β auf Zellvitalität. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit IL-1β mit und ohne TCDD (1 nM). MW ± SD, n=3. *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001.

Nach 48 h-Inkubation in HepG2-Zellen zeigt das Interleukin IL-6 im analysierten Konzentrationsbereich 650-6500 pg/ml keinen Effekt auf die Vitalität. Dies ändert sich auch nicht nach Co-Inkubation der humanen Hepatomzellen mit dem Interleukin und TCDD (10^{-9} M). Lediglich das Tensid Saponin, welches mit der Endkonzentration von 0,1 % als Positivkontrolle verwendet wurde, zeigt eine höchst signifikante Reduktion der Zellvitalität (Abbildung 47).

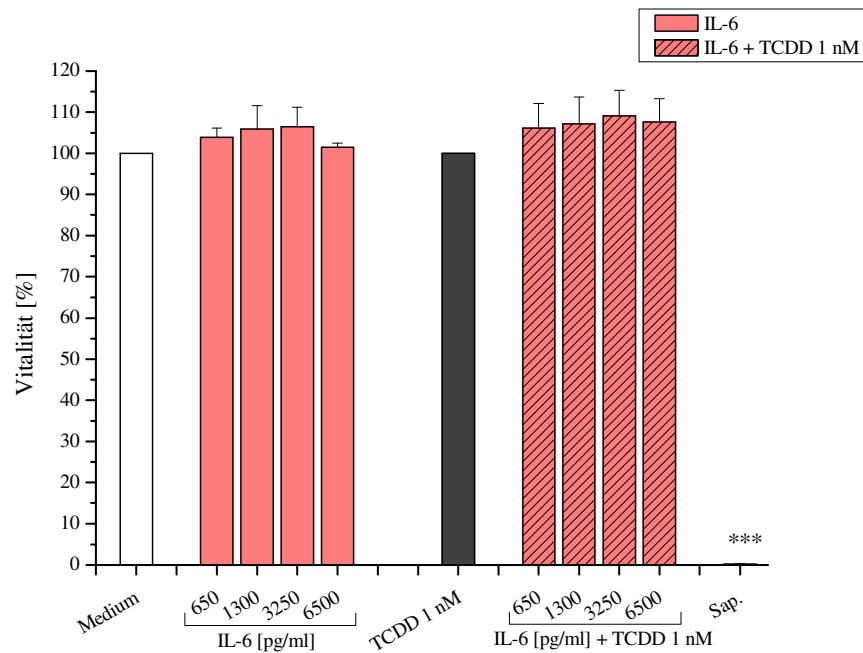


Abbildung 47: Einfluss von IL-6 auf Zellvitalität. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit IL-6 mit und ohne TCDD MW \pm SD, n=3. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

Abbildung 48 illustriert die Resultate des Resazurinreduktionstests nach einer 48 h-Inkubation der Zelllinie HepG2 mit dem Zytokin TNF- α . Im untersuchten Konzentrationsbereich 410 – 4100 pg/ml konnte nach 48 h-Behandlung keine Änderung der Vitalität festgestellt werden. Im Gegenteil, die Vitalität humaner Hepatomzellen ist sogar höher als bei der Mediumkontrolle. Bei einer TNF- α -Konzentration von 2050 pg/ml beträgt die Vitalität durchschnittlich $117,0 \pm 5,7$ % und erweist sich bei statistischer Analyse als hoch signifikant. Bei simultaner Behandlung humaner Hepatomzellen mit TNF- α und 1 nM TCDD bleibt die Zellvitalität in allen untersuchten Konzentrationen auf dem Level der TCDD-Kontrolle.

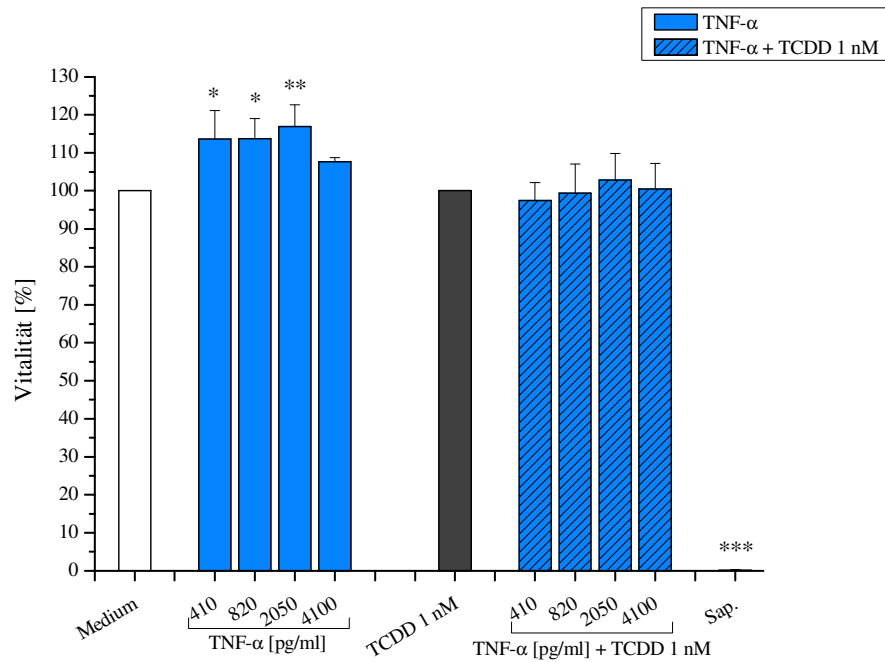


Abbildung 48: Einfluss von TNF- α auf Zellvitalität. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit TNF- α mit und ohne TCDD MW \pm SD, n=3. *=p \leq 0,05; **=p \leq 0,01; ***=p \leq 0,001.

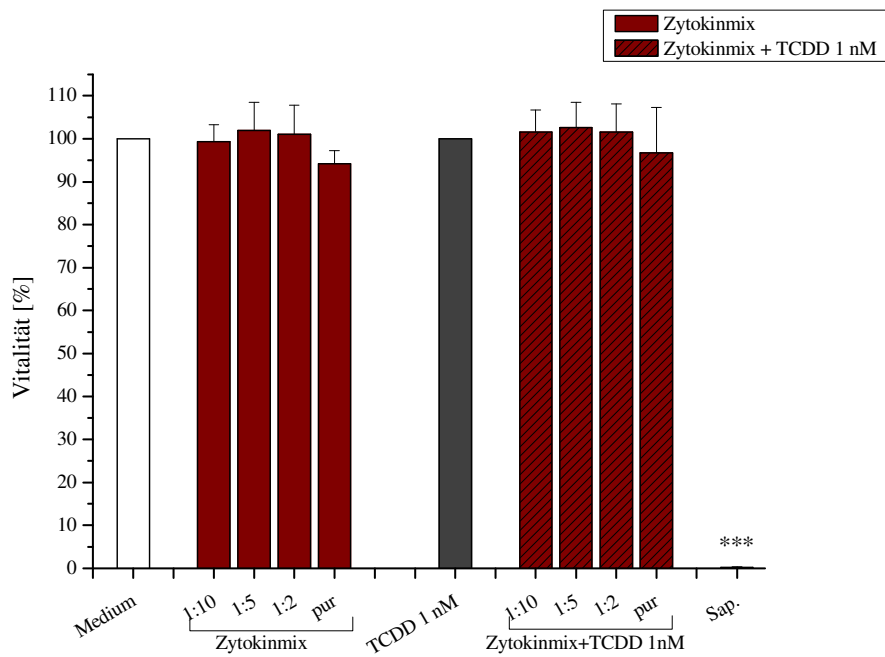


Abbildung 49: Einfluss des Zytokinmix auf Zellvitalität. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit Zytokinmix mit und ohne TCDD MW \pm SD, n=3. *=p \leq 0,05; **=p \leq 0,01; ***=p \leq 0,001.

Des Weiteren wurde die humane Hepatomzelllinie HepG2 für 48 h mit einer Mischung der vier Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α , mit identischen Konzentrationen wie im Einzelnen untersucht, inkubiert. Wie man anhand Abbildung 49 erkennt, zeigt ein Mix der Zytokine keine Wirkung auf die Vitalität von HepG2-Zellen. Die ermittelten relativen Vitalitäten bewegen sich in den getesteten Konzentrationen im Bereich der Kontrolle. Auch nach Co-Inkubation der Zytokinmischung mit TCDD (1 nM) bleibt die Zellvitalität mit leichten Abweichungen auf dem Niveau der Kontrolle. Nur die Positivkontrolle Saponin (0,1 %) zeigt eine höchst signifikante Zytotoxizität im verwendeten Zellsystem (Abbildung 49).

5.5.2 EROD-Aktivität

Nach Untersuchung der vier Zytokine auf ihre Wirkung hinsichtlich der Vitalität in humanen Hepatomzellen, wurden diese in selben Konzentrationsbereichen (Tabelle 38) auch hinsichtlich ihrer Wirkung im EROD-Assay mit und ohne 1 nM TCDD-Co-Inkubation analysiert. Die Ergebnisse sind den nachfolgenden Graphen (Abbildung 50) zu entnehmen.

Es ist ersichtlich, dass nach einer 48 h-Inkubation keines der vier untersuchten Zytokine in HepG2-Zellen eine Induktion des Enzyms CYP1A1 im EROD-Assay bewirkt. Die EROD-Aktivität bleibt innerhalb der verwendeten Konzentrationen auf dem Level der Mediumkontrolle. Die Positivkontrolle TCDD (10^{-9} M) zeigt im Vergleich zu seiner Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) eine statistisch höchst signifikante Induktion der CYP1A1-Aktivität. Werden humane Hepatomzellen für 48 h mit IL-1 α , IL-1 β , IL-6 oder TNF- α – bzw. einer Mischung dieser – mit TCDD (1 nM) co-inkubiert, ist bei allen vier Zytokinen eine konzentrationsabhängige Reduktion der EROD-Aktivität feststellbar. Dabei ist der inhibierende Effekt auf CYP1A1-Aktivität bei Co-Inkubation mit TNF- α und TCDD am schwächsten ausgeprägt. Die Inkubation der HepG2-Zellen mit 450 pg/ml IL-1 β zusammen mit 1 nM TCDD führt zu einer signifikanten Inhibition der CYP1A1 Aktivität auf durchschnittlich 78,5 % relativ zur TCDD-Kontrolle. Ebenfalls eine signifikante Verminderung der EROD-Aktivität ist durch simultane Behandlung humaner Hepatomzellen mit der Zytokin-Mischung in den höchsten untersuchten Konzentrationen und 1 nM TCDD zu beobachten. Die Zytokine IL-1 α und IL-6 zeigen bei 48 h-Co-Inkubation mit TCDD zwar eine deutliche konzentrationsabhängige Verminderung der EROD-Aktivität auf 77 % bzw. 67 % verglichen mit der TCDD-Kontrolle, dies ergibt sich jedoch in der Varianz Analyse One-way ANOVA mit dem *Dunnnett Multiple Comparisons Test* auf Grund der vorliegenden Schwankungen als statistisch nicht signifikant (Abbildung 50).

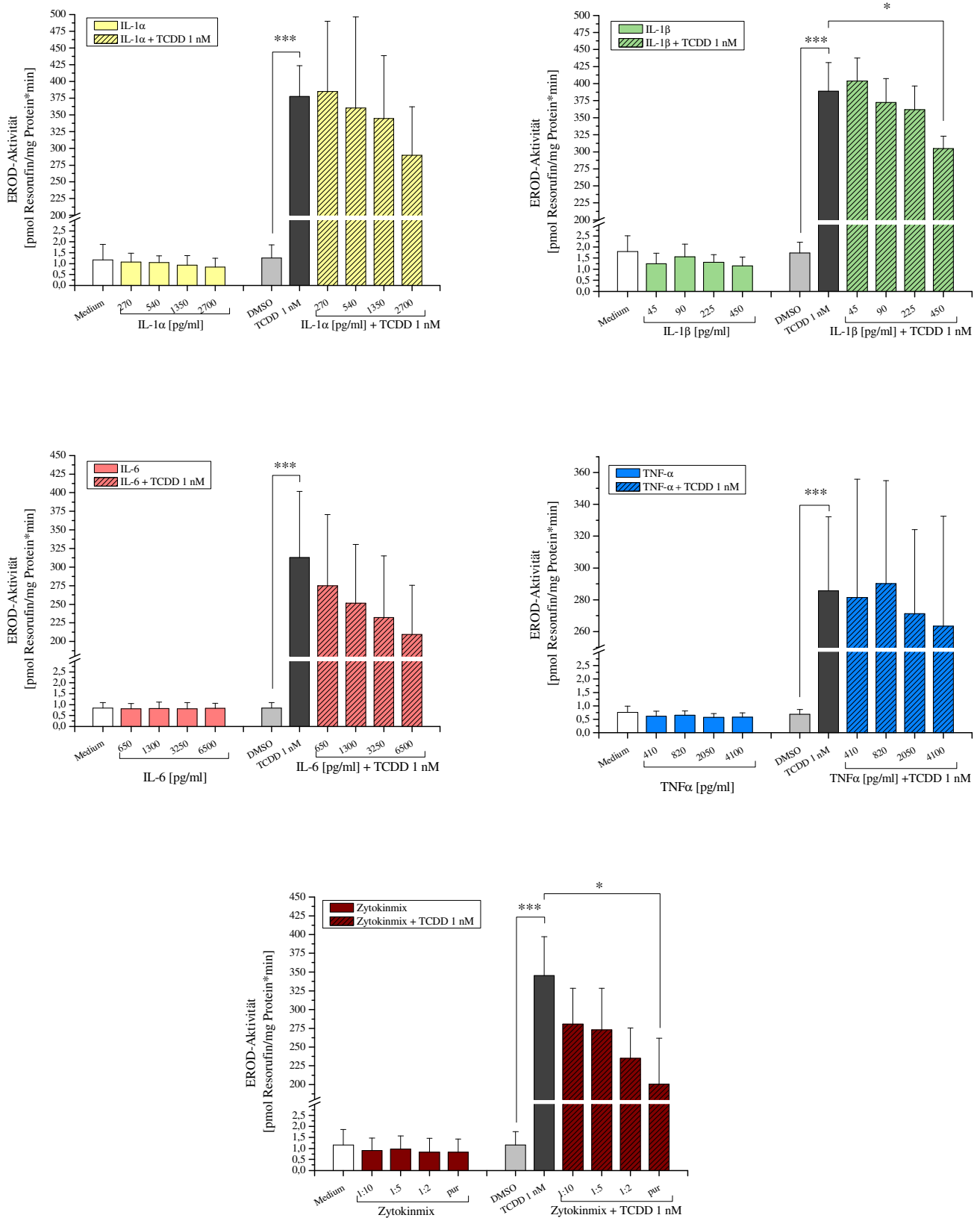


Abbildung 50: EROD-Aktivität von Zytokinen. HepG2-Zellen, 48 h-Inkubation mit Zytokinen IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α und dem Mix mit und ohne TCDD. MW ± SD, n=3. *=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001.

Zur besseren Gegenüberstellung der Interleukine hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz, wurde die durchschnittliche prozentuale EROD-Suppression gegen die eingesetzten Zytokin Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 51). Hierdurch erkennt man, dass unter Berücksichtigung der Konzentrationen IL-1 β im ähnlichen Konzentrationsbereich die EROD-Aktivität am stärksten hemmt.

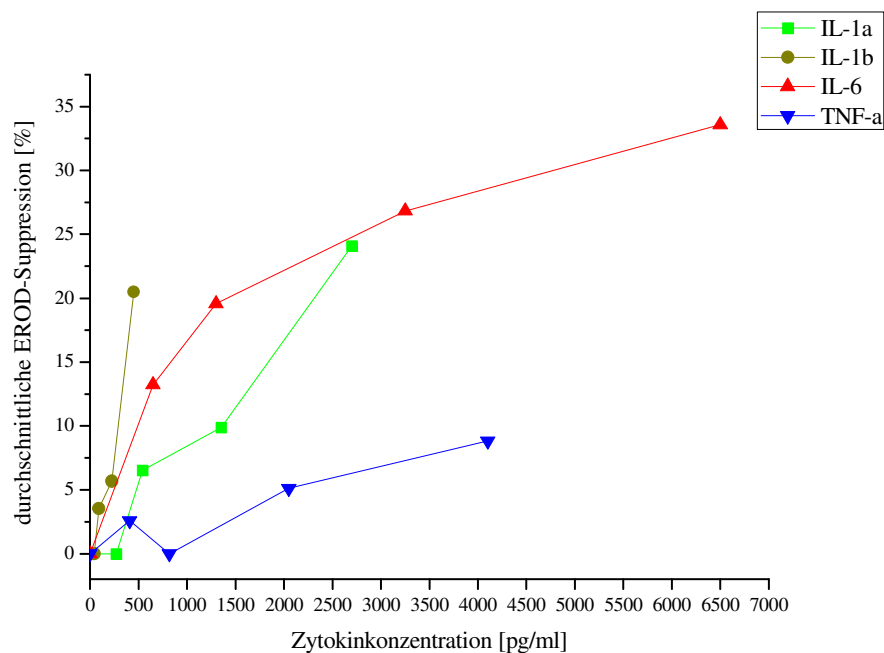


Abbildung 51: Prozentuale Suppression TCDD-induzierter EROD-Aktivität durch Zytokine. 48 h-Inkubation von HepG2-Zellen mit TCDD (10^{-9} M) und Zytokinen.

5.6 Einfluss von TCDD und Calcitriol auf myeloide Zellen

Neben der Analytik von Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen sowie deren Wirkung auf fremdstoffmetabolisierende Hepatomzellen, sollte in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss des Ah-Rezeptor-Liganden 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin und des Vitamin-D-Rezeptor-Liganden Calcitriol als auch deren Kombination auf murine myeloide Zellen untersucht werden.

5.6.1 Zellvitalität

Murine Knochenmarkzellen wurden ausgesät und wie beschrieben kultiviert (Kapitel 4.1.3). An Tag 10 nach Aussaat wurden die Zellen für 48 h mit 1-100 nM Calcitriol und 10^{-12} – 10^{-8} M TCDD behandelt. Weiterhin wurden die Zellen mit einer Kombination von Calcitriol 1-100 nM und TCDD 1 nM simultan inkubiert. Die Behandlung mit den genannten Substanzen erfolgte zum Vergleich mit und ohne einer 48 h-Stimulation der Zellen mit 1 µg/ml LPS an Kulturtag 10. Anschließend erfolgte der Resazurinreduktionstest zur Bestimmung der Zellvitalität.

Wie Abbildung 52 zeigt, ist nach 48 h Behandlung myeloider Zellen mit Calcitriol im gewählten Konzentrationsbereich von 1-100 nM ein Rückgang der Zellvitalität zu beobachten. In den beiden höchsten Konzentrationen 30 nM und 100 nM sinkt die Vitalität der Zellen statistisch hoch signifikant auf durchschnittlich 79 % bzw. 82 % verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Untersuchungen einer Trypanblau-Färbung ergaben aber auch bei der höchsten Calcitriol-Konzentration von 100 nM einen Anteil von über 90 % vitaler Zellen. Der beobachtete Effekt des Calcitriols ist deshalb auf Hemmung der Proliferation zurückzuführen. Werden die Zellen simultan zur Calcitriol Inkubation mit 1 µg/ml LPS stimuliert, ist kein Rückgang der Zellzahl zu verzeichnen, die Vitalität bleibt mit leichten Abweichungen im Bereich der Lösungsmittelkontrolle. Die Positivkontrolle Saponin (0,1 %) führt zu einer statistisch höchst signifikanten Verringerung der Zellvitalität.

Erfahren ausdifferenzierte myeloide Zellen eine Behandlung mit TCDD in einem Konzentrationsbereich von 10^{-12} M bis 10^{-8} M, so ergibt sich ein anderes Bild. Wie anhand Abbildung 53 ersichtlich, führt TCDD in myeloiden Zellen nach einer 48-stündigen Inkubationsperiode zu keiner Reduktion der Vitalität oder Zellzahl. Bei einer simultanen Stimulation mit 1 µg/ml LPS kann ein Rückgang der Vitalität/Zellzahl beobachtet werden. Inkubation der Zellen mit 10^{-9} bzw. 10^{-8} M TCDD führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Vitalität auf durchschnittlich 81 % bzw. 76 % relativ zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %).

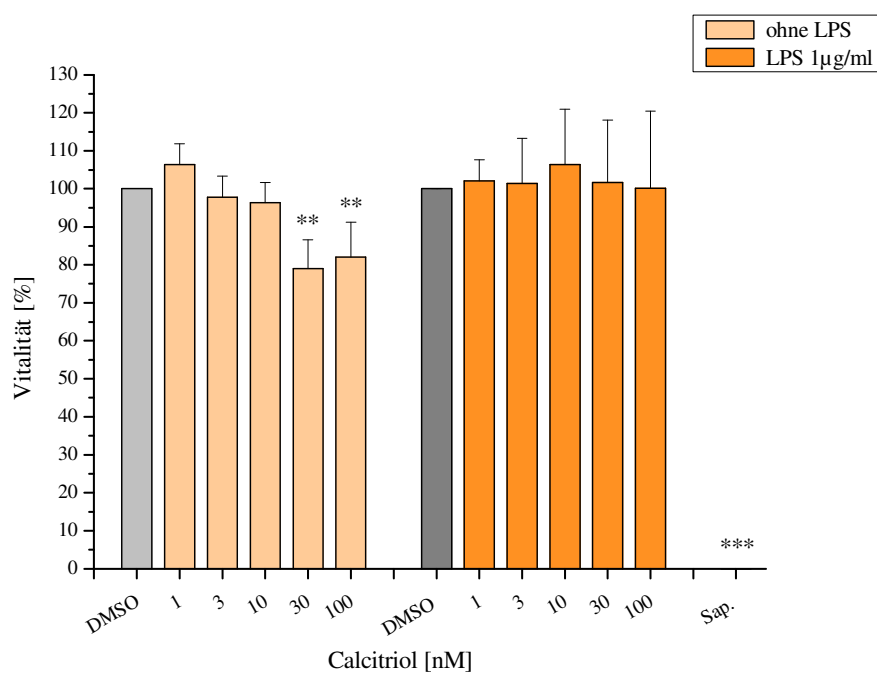


Abbildung 52: Zellvitalität. Calcitriol in myeloiden Zellen. 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol mit und ohne LPS-Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

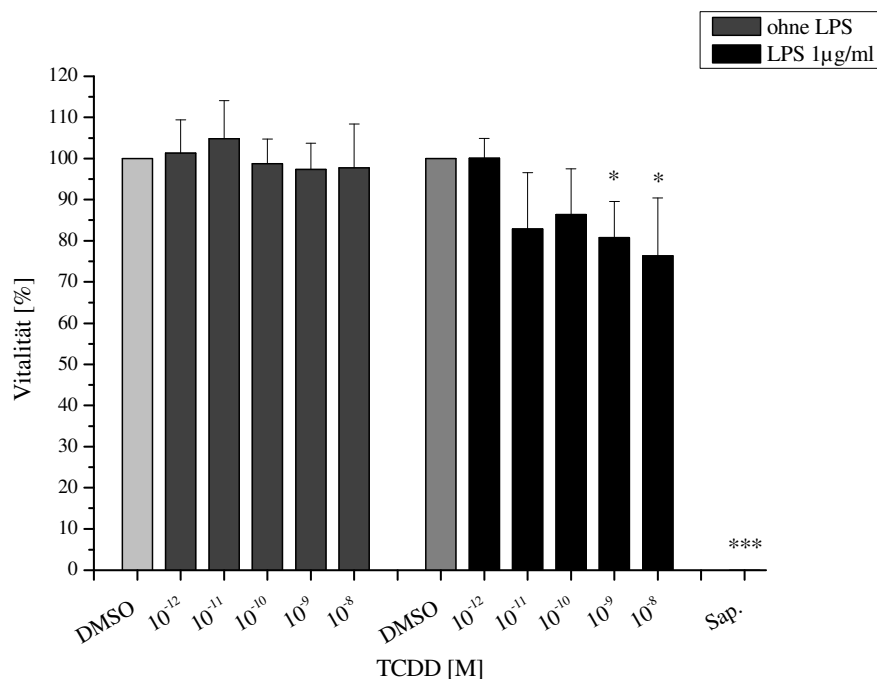


Abbildung 53: Zellvitalität. TCDD in myeloiden Zellen. 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit TCDD mit und ohne LPS-Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

Eine Co-Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (1-100 nM) und gleichbleibender Konzentration an TCDD (1 nM) für 48 h führt zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der Vitalität/Zellzahl (Abbildung 54). Bei 30 nM bzw. 100 nM Calcitriol zusammen mit 1 nM TCDD sinkt der Umsatz des Resazurins hoch signifikant auf durchschnittlich 84 % bzw. 77 % verglichen mit der TCDD-Kontrolle. Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit 1 µg/ml des Endotoxins LPS hat in allen untersuchten Konzentrationen einen Rückgang der Zellzahl zur Folge. Bezogen auf die TCDD-Kontrolle liegt der Anteil bei 87-83 %. Für die Konzentrationen 3-100 nM ergibt sich eine statistische Signifikanz der Vitalität/Zellzahl relativ zur TCDD-Kontrolle.

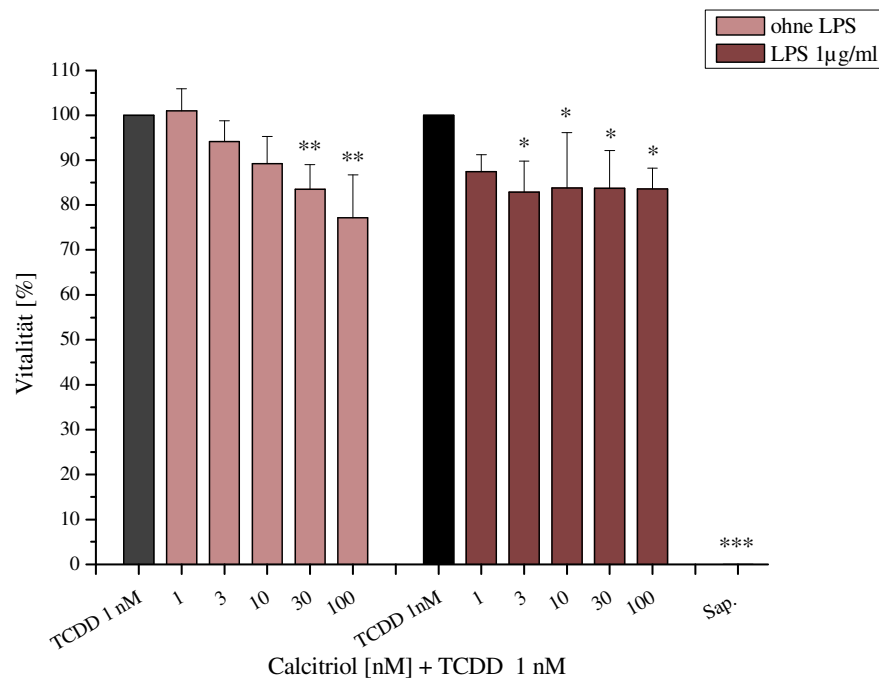


Abbildung 54: Zellvitalität. Calcitriol und TCDD (1 nM) in myeloiden Zellen. 48 h Co-Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und TCDD (1nM) mit und ohne LPS-Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

5.6.2 Zytokinausschüttung

Die Wirkung von Calcitriol und TCDD sowie deren Kombination wurde auch hinsichtlich der Zytokinausschüttung in murinen myeloiden Zellen untersucht. Dazu wurden ausdifferenzierte Knochenmarkszellen mit Calcitriol, TCDD und der Kombination der beiden Substanzen mit und ohne eine LPS-Stimulation für 48 h behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Mediumüberstände der behandelten Zellen gesammelt und auf den Gehalt der bereits zuvor

untersuchten Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.6.2.1 IL-1 α

Abbildung 55 zeigt die Gehalte von IL-1 α in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen nach Inkubation mit Calcitriol, TCDD oder einer Kombination der beiden Substanzen mit und ohne LPS-Stimulation.

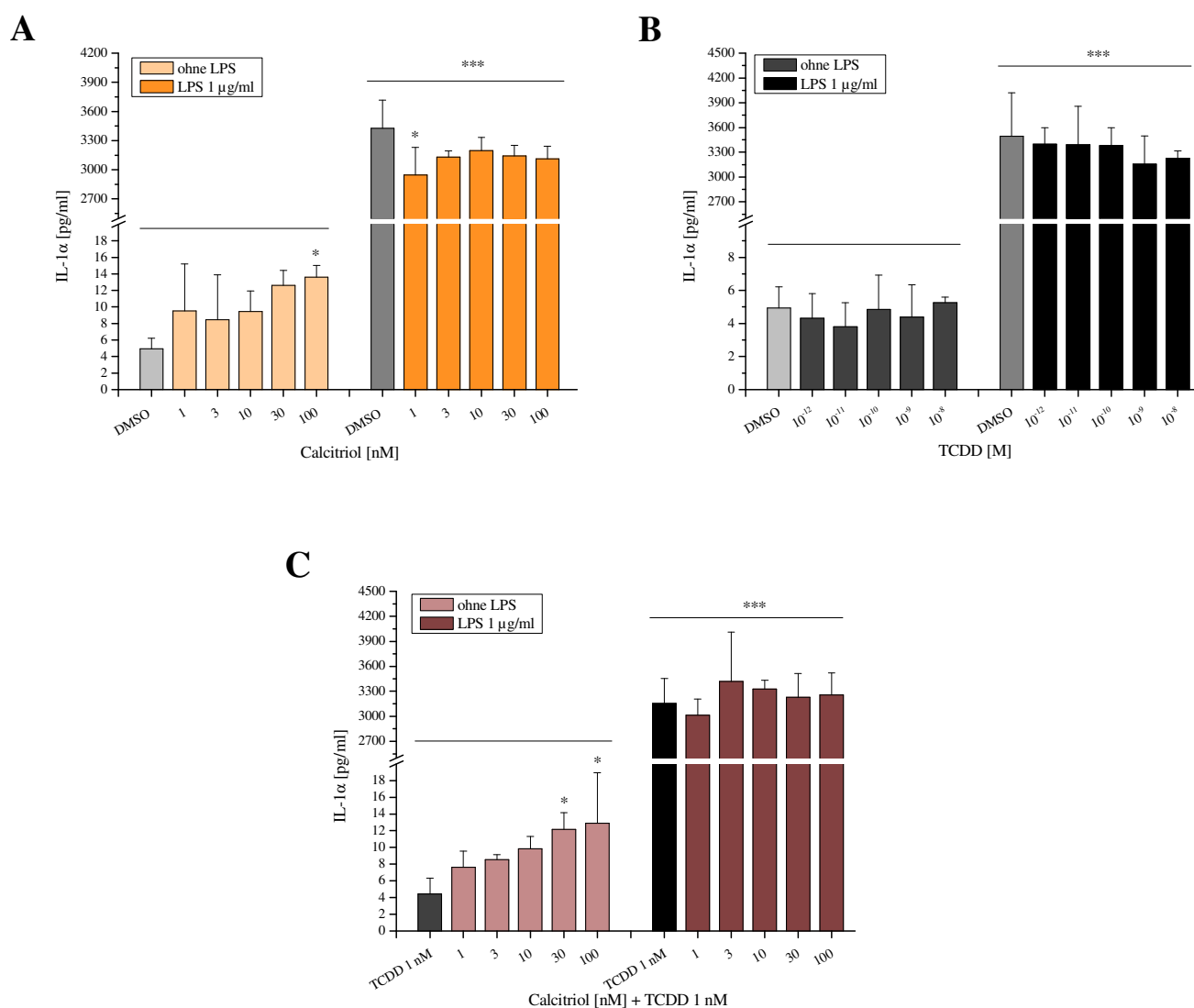


Abbildung 55: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-1 α . Gehalt an IL-1 α nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und Co-Inkubation mit Calcitriol und 1 nM TCDD (C) mit und ohne LPS-Stimulation (1 μ g/ml). MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

48 h-Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol hat eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-1 α Ausschüttung zur Folge (Abbildung 55 A). Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100 nM steigt der Gehalt von IL-1 α auf durchschnittlich $13,6 \pm 1,4$ pg/ml und ist verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) statistisch signifikant.

Ein ähnliches Bild ergibt sich nach Inkubation der Zellen mit Calcitriol und 1 nM TCDD: Calcitriol-Konzentrationen von 30 nM und 100 nM führen zu statistisch signifikant erhöhter IL-1 α Konzentration von $12,1 \pm 2,0$ pg/ml bzw. $12,9 \pm 6,9$ pg/ml im Mediumüberstand myeloider Zellen (Abbildung 55 C). TCDD zeigt im untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-12} bis 10^{-8} M keine Auswirkungen auf IL-1 α im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 55 B). Eine simultane Stimulation der Zellen mit 1 μ g/ml LPS für 48 h führt zu statistisch höchst signifikant erhöhten Gehalten von IL-1 α . TCDD oder Calcitriol haben dabei keine zusätzlichen Auswirkungen. Die IL-1 α Gehalte bewegen sich im Bereich von 3000 - 3500 pg/ml (Abbildung 55).

5.6.2.2 IL-1 β

Myeloide Zellen wurden nach 48-stündiger Behandlung mit Calcitriol und TCDD und deren Kombination auch auf den Gehalt von IL-1 β , dem zweiten Zytokin aus der Interleukin-1-Familie, im Mediumüberstand untersucht. Abbildung 56 illustriert die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen.

Weder Calcitriol noch TCDD führen im untersuchten Konzentrationsbereich von 1-100 nM bzw. 10^{-12} – 10^{-8} M zu einer Änderung des IL-1 β in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen. Der IL-1 β -Gehalt bewegt sich mit 4-9 pg/ml im Bereich der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abbildung 56 A, B). Durch Kombination unterschiedlicher Konzentrationen Calcitriol mit 1 nM TCDD ist ebenfalls keine Änderung des IL-1 β -Gehalts zu beobachten (Abbildung 56 C).

Werden myeloide Zellen bei Inkubation mit 1,25(OH) $_2$ D oder TCDD bzw. deren Kombination gleichzeitig mit 1 μ g/ml LPS stimuliert, steigt die Sekretion von IL-1 β ins Medium auf über 900 pg/ml statistisch höchst signifikant an. Bei den Konzentrationsreihen von Calcitriol und TCDD sind die IL-1 β -Gehalte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO) etwas geringer, jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 56).

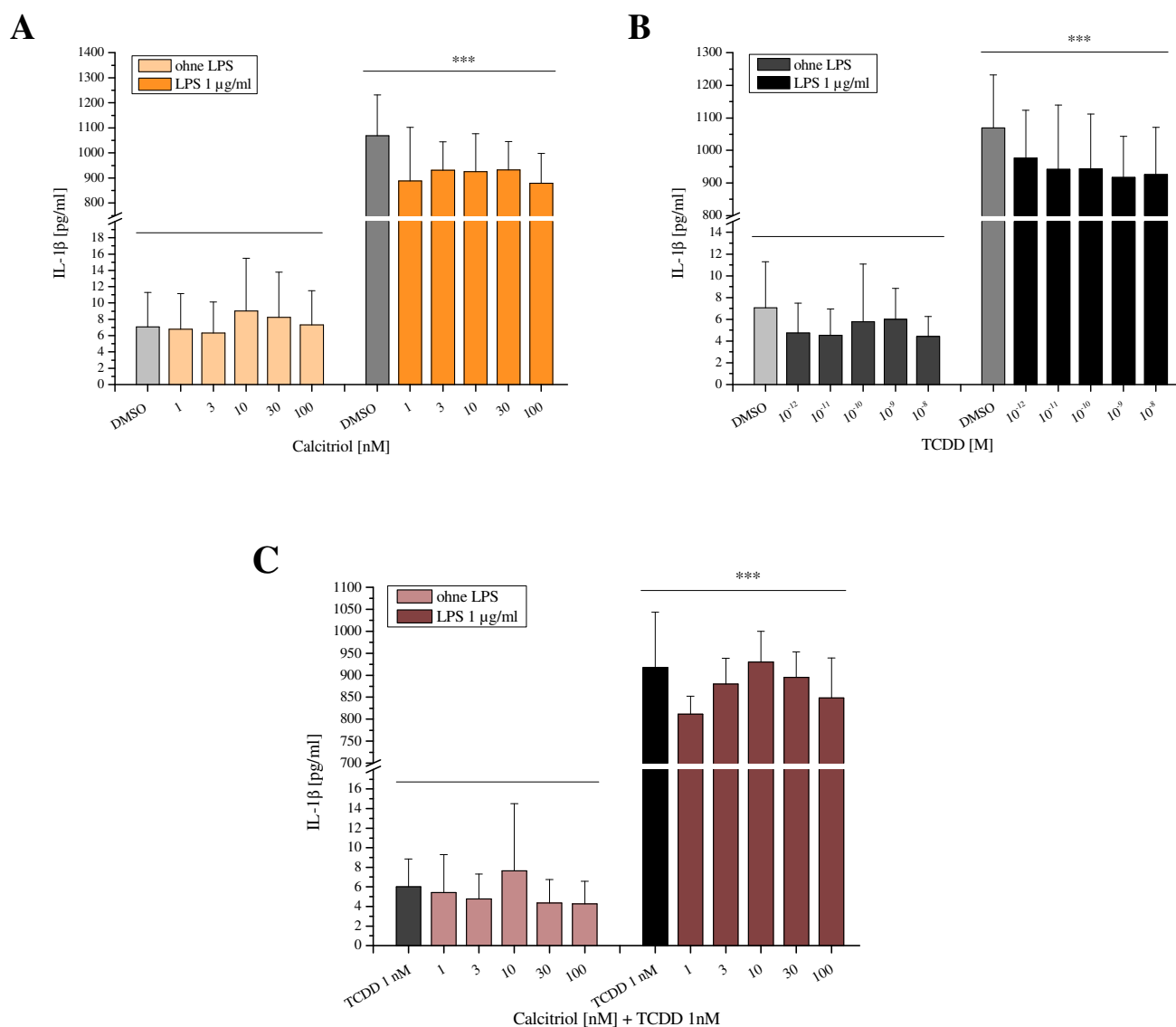


Abbildung 56: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-1 β . Gehalt an IL-1 β nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und Co-Inkubation mit Calcitriol und 1 nM TCDD (C) mit und ohne LPS-Stimulation (1 μ g/ml). MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.6.2.3 IL-6

Des Weiteren wurden Mediumüberstände myeloider Zellen nach 48 h-Behandlung mit Calcitriol und TCDD auf den Gehalt von IL-6 untersucht. Die Ergebnisse sind den Graphen in Abbildung 57 zu entnehmen. Es ist ersichtlich, dass TCDD und Calcitriol nach 48 h Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-12} - 10^{-8} M bzw. 1-100 nM keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 in murinen myeloiden Zellen haben. Die Gehalte bewegen sich verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO im gleichen Bereich von 6-7 pg/ml (Abbildung 57 A, B).

Dieses Ergebnis ändert sich auch nicht durch Co-Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen (Abbildung 57 C). Eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) führt zur statistisch höchst signifikanten Zunahme von IL-6 in Mediumüberständen myeloider Zellen. Der IL-6-Gehalt steigt dabei von durchschnittlich 6 pg/ml auf über 50000 pg/ml . Dieser Gehalt bleibt durch Behandlung mit Calcitriol bzw. TCDD unbeeinflusst.

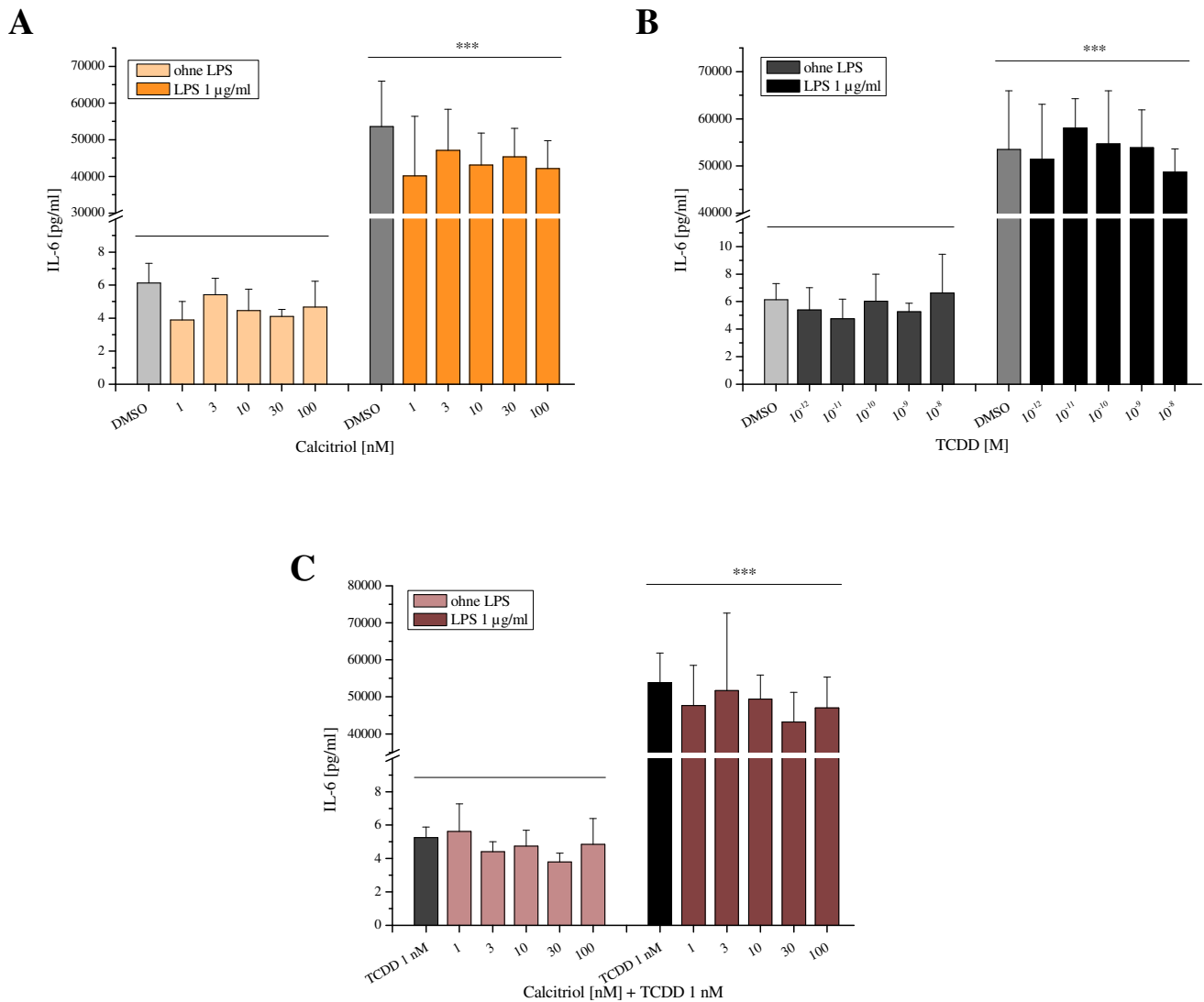


Abbildung 57: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf IL-6. Gehalt an IL-6 nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und Co-Inkubation mit Calcitriol und 1 nM TCDD (C) mit und ohne LPS-Stimulation (1 $\mu\text{g/ml}$). MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.6.2.4 TNF- α

Ferner wurde der Gehalt an TNF- α in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen nach 48 h Inkubation mit Calcitriol oder TCDD und deren Kombination mit und ohne LPS-Stimulation untersucht. Wie anhand der Graphen in Abbildung 58 ersichtlich, wird die Sekretion von TNF- α in myeloiden Zellen durch Behandlung mit Calcitriol konzentrationsabhängig gehemmt. Bereits 30 nM Calcitriol führen zu einer statistisch signifikanten Reduktion des TNF- α -Gehaltes um durchschnittlich 44 % verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abbildung 58 A).

Behandlung der Zellen mit 100 nM Calcitriol senkt den TNF- α -Gehalt statistisch signifikant von durchschnittlich $117,5 \pm 20,5$ pg/ml auf rund $54,5 \pm 13,9$ pg/ml. Diese Beobachtung ändert sich nicht durch die simultane Inkubation des Calcitriols mit 1 nM TCDD. Auch hier sinkt der TNF- α -Gehalt ab 30 nM statistisch signifikant auf $58,4 \pm 15,0$ pg/ml. Die 48 h-Inkubation der Zellen mit TCDD, hat im analysierten Konzentrationsbereich von 10^{-12} bis 10^{-8} M keinen Einfluss auf die TNF- α Sekretion in myeloiden Zellen verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abbildung 58 B).

Wie bereits bei anderen Zytokinen beobachtet, wird auch der Gehalt an TNF- α in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen durch eine Stimulation mit 1 μ g/ml LPS statistisch höchst signifikant erhöht. Nur bei Co-Inkubation der Zellen mit Calcitriol und 1 nM TCDD, und simultaner Stimulation mit 1 μ g/ml LPS ist eine konzentrationsabhängige Abnahme des TNF- α -Gehaltes in den Mediumüberständen zu beobachten. Bei der höchsten untersuchten Calcitriol Konzentration von 100 nM und 1 nM TCDD sinkt der TNF- α -Gehalt statistisch signifikant um rund 13,5 % (Abbildung 58 C).

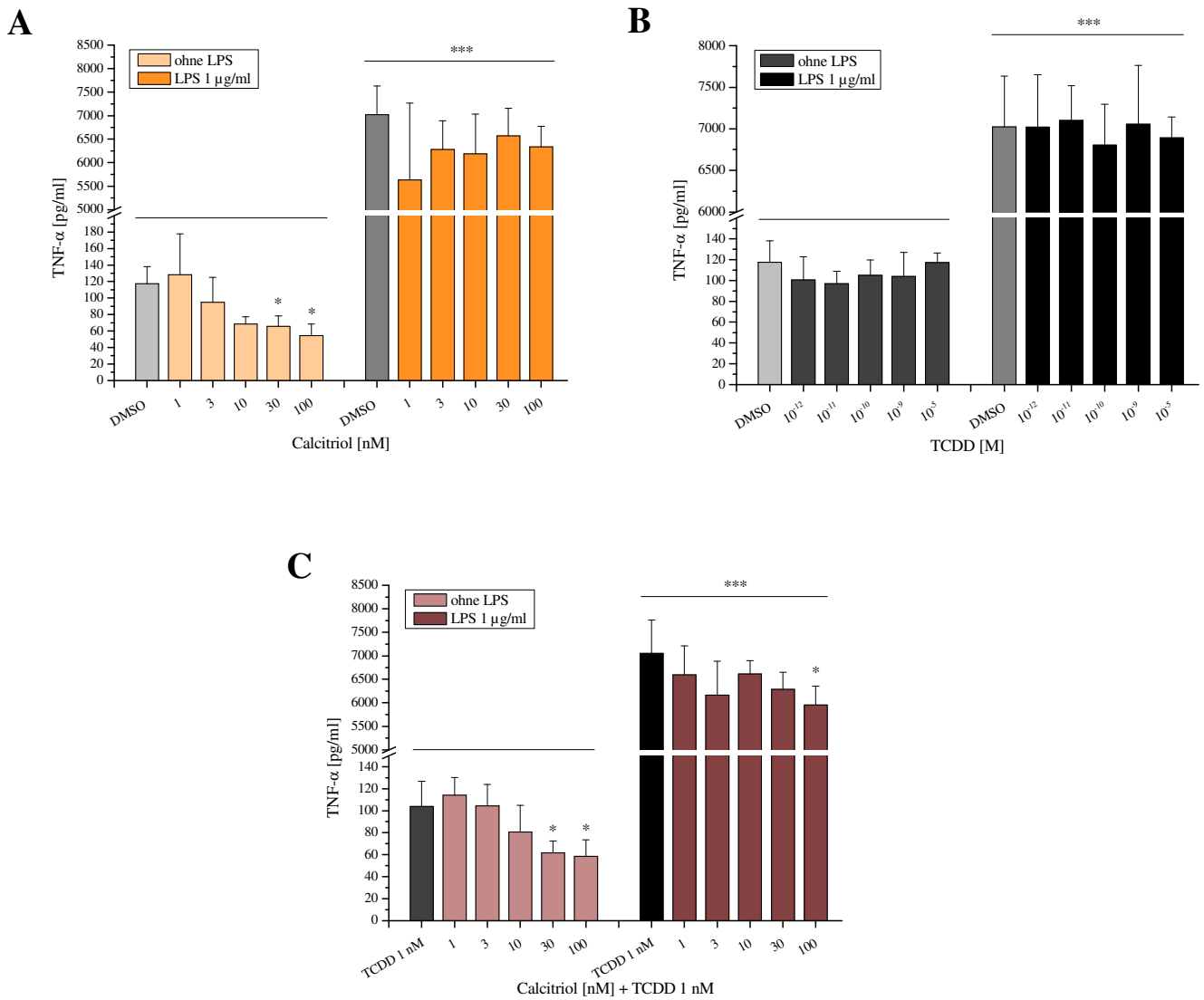


Abbildung 58: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf TNF- α . Gehalt an TNF- α nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und Co-Inkubation mit Calcitriol und 1 nM TCDD (C) mit und ohne LPS-Stimulation (1 µg/ml). MW \pm SD, n=4. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.6.2.5 Stickoxid (NO)

Zusätzlich zu den Zytokinen wurde auch der Gehalt an NO in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen nach 48 h Inkubation mit Calcitriol oder TCDD und deren Kombination mit und ohne LPS-Stimulation untersucht. Wie die nachfolgende Abbildung 59 zeigt, hat Calcitriol keinen Einfluss auf die NO-Sekretion in murinen myeloiden Zellen bei simultaner Stimulation der Zellen mit LPS (1 µg/ml). Ohne LPS-Stimulation zeigt sich ein geringer suppressiver, jedoch nicht signifikanter Effekt des Calcitriol auf die NO-Sekretion (Abbildung 59 A).

TCDD hingegen verändert nicht die NO-Sekretion der Zellen, aber steigert konzentrationsabhängig die LPS-induzierte NO-Ausschüttung. Bei einer TCDD-Konzentration von 10^{-9} M ist der NO-Gehalt verglichen mit der DMSO-Kontrolle statistisch signifikant erhöht (Abbildung 59 B). Bei Co-Inkubation myeloider Zellen mit TCDD und Calcitriol zeigt sich kein synergistischer Effekt. Durch simultane Stimulation mit LPS und Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol liegen die NO-Gehalte durchschnittlich höher als bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO, zeigen aber keine statistische Signifikanz (Abbildung 59 C).

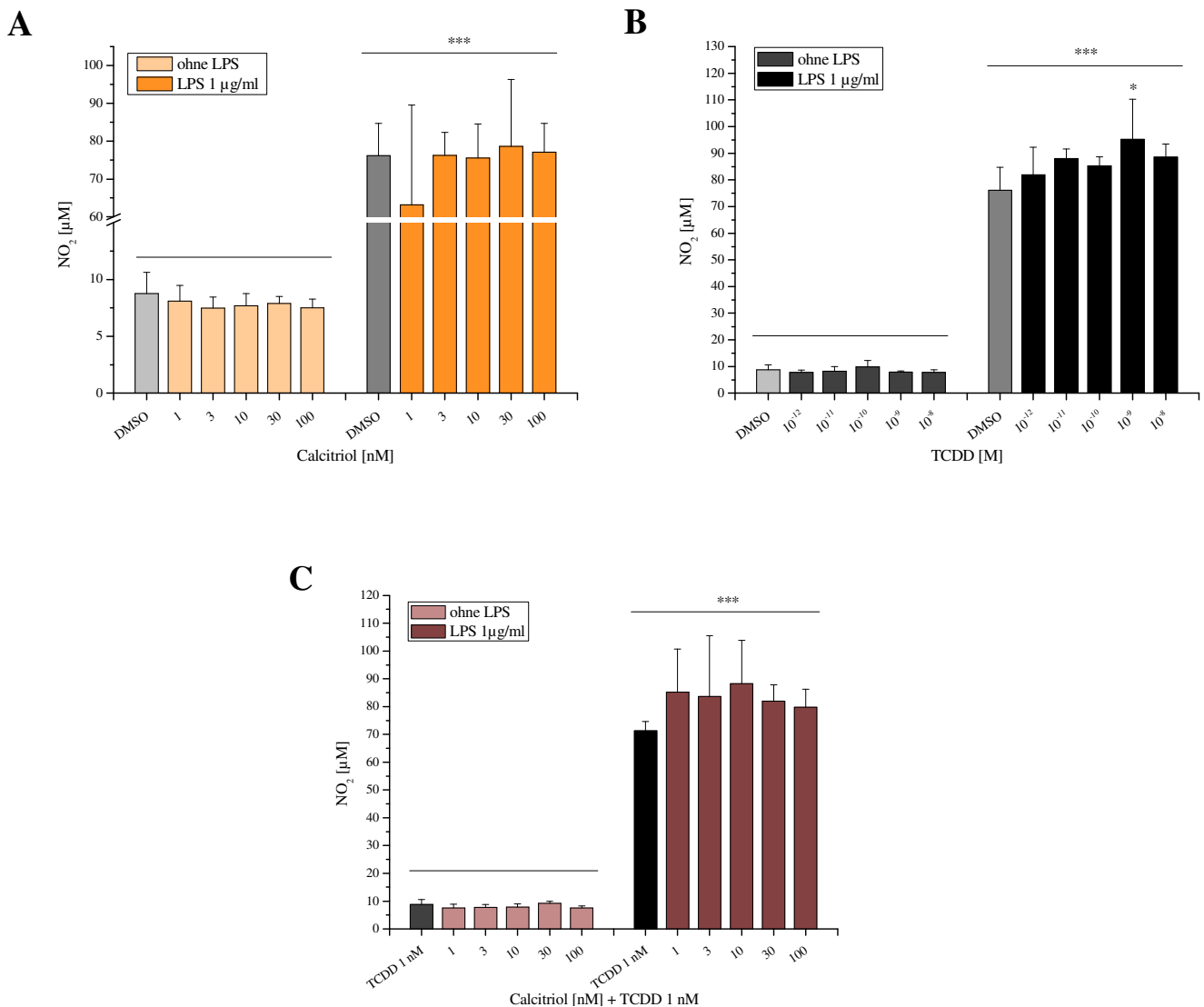


Abbildung 59: Einfluss von Calcitriol und TCDD auf NO. Gehalt an NO₂ nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und Co-Inkubation mit Calcitriol und 1 nM TCDD (C) mit und ohne LPS-Stimulation (1 µg/ml). MW ± SD, n=3. * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001.

5.6.3 Genexpression

Da sich murine myeloide Zellen für den EROD-Assay als ungeeignet erwiesen, wurde der Einfluss von Calcitriol und TCDD in myeloiden Zellen auf mRNA-Ebene hinsichtlich der Expression von *Cyp1a1* untersucht. Des Weiteren wurde die Expression anderer Gene wie *Cyp24a1*, *AhR*, *Vdr* aber auch der Zytokine *Il-1 α* , *Il-1 β* , *Il-6* und *Tnf- α* analysiert. Auf eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit LPS wurde hierbei auf Grund unzureichender RNA-Ausbeute und –Reinheit verzichtet.

5.6.3.1 Genexpression der Zytokine

Nach der Untersuchung der Zytokin-Gehalte in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen nach 48 h Inkubation mit Calcitriol und TCDD, wurde auch die Expression der vier Zytokine auf mRNA-Ebene bestimmt. Hierbei wurde auf eine Co-Inkubation mit Calcitriol und TCDD sowie eine zusätzliche LPS-Stimulation myeloider Zellen verzichtet, da bereits bei den ELISA-Untersuchungen kein kumulativer Effekt beobachtet werden konnte. Weiterhin wies die isolierte RNA LPS-behandelter Proben eine unzureichende Qualität auf.

Abbildung 60 stellt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse graphisch dar. Es ist ersichtlich, dass Calcitriol im untersuchten Bereich von 1-100 nM eine konzentrationsabhängige Steigerung der *Il-1 α* -Expression in murinen myeloiden Zellen auf mRNA-Ebene bewirkt. Bei einer Konzentration von 30 nM des Vitamin D₃-Metaboliten wird mit durchschnittlich $19,3 \pm 7,0$ -fach die höchste *Il-1 α* -Expression erreicht. Diese ist verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) statistisch signifikant. Wird die Calcitriol-Konzentration auf 100 nM erhöht, sinkt die relative *Il-1 α* -Expression auf das rund 14-fache. Verglichen mit den anderen untersuchten Zytokinen, weist *Il-1 α* die höchste mRNA-Expression auf. TCDD verursacht im untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-12} - 10^{-8} M keinen signifikanten Einfluss auf die *Il-1 α* -mRNA. Die höchste erreichte Expression liegt bei 10^{-9} M TCDD mit durchschnittlich $1,6 \pm 1,3$ -facher Erhöhung (Abbildung 60 A).

Auf Grund hoher Abweichungen ist nach 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol kein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt hinsichtlich der *Il-1 β* mRNA-Expression festzustellen. Die höchste $5,6 \pm 2,5$ -fache Expression wird bei einer Calcitriol-Konzentration von 3 nM erreicht und sinkt dann kontinuierlich bei höheren Konzentrationen bis auf $3,1 \pm 2,4$ -fach bei 100 nM. Nach Behandlung der Zellen mit TCDD steigt die *Il-1 β* -Expression bis zu einer Konzentration von 10^{-10} M auf durchschnittlich $3,3 \pm 3,1$ -fach und nimmt bei höheren Konzentrationen bis 10^{-8} M wieder ab (Abbildung 60 B).

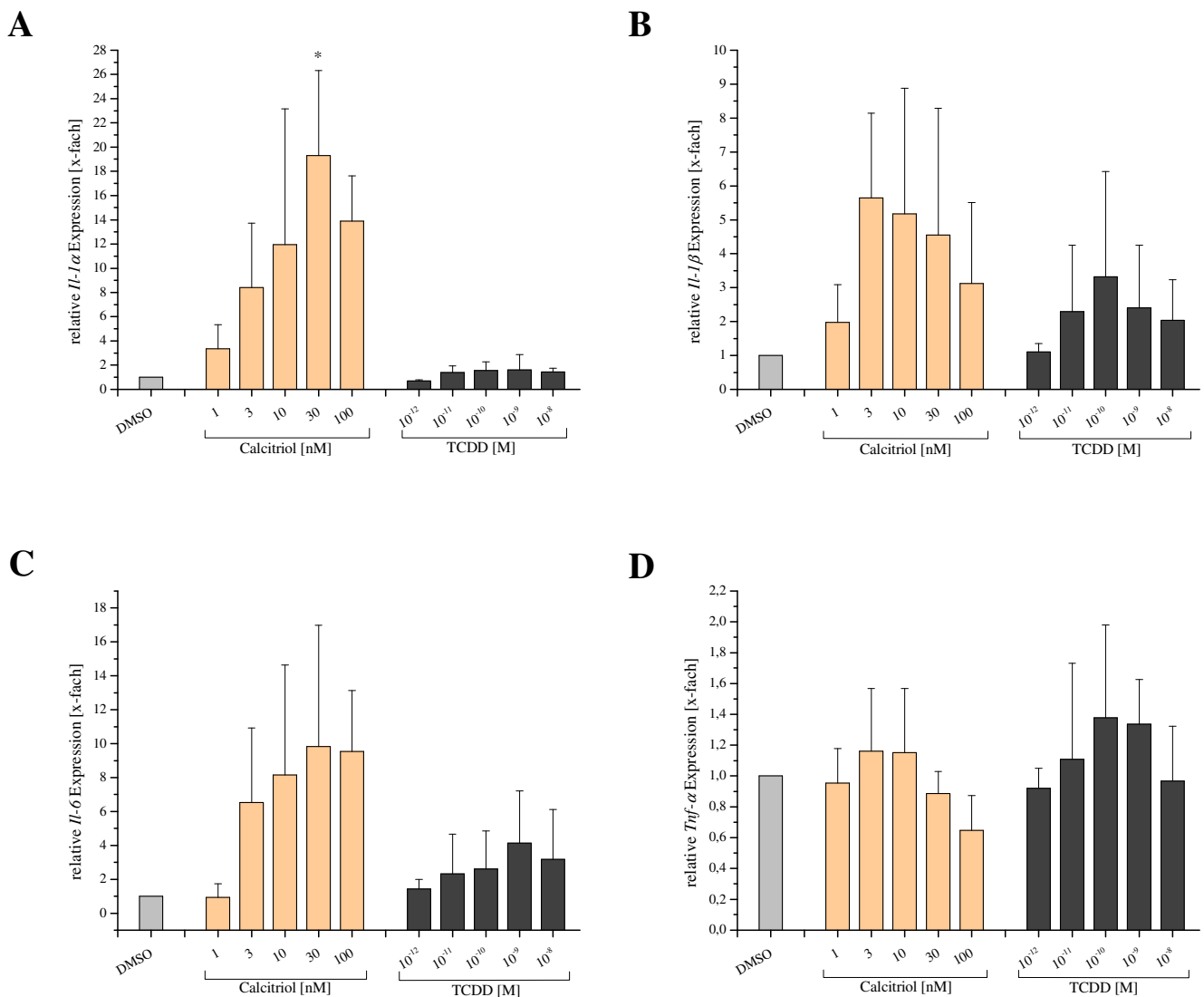


Abbildung 60: relative Zytokin-Genexpression. 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und TCDD. x-fache mRNA-Expression von *Il-1α* (A), *Il-1β* (B), *Il-6* (C) und *Tnf-α* (D). MW ± SD, n≥3. * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; * = p ≤ 0,001.**

Bei *Il-6* ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mRNA-Expression durch Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol ersichtlich. Bei der höchsten untersuchten Calcitriol-Konzentration von 100 nM wird eine 9,5 ± 3,6-fache Expression erreicht. TCDD bewirkt in murinen myeloiden Zellen nach 48-stündiger Inkubation eine maximale *Il-6*-mRNA-Expression von durchschnittlich 4,1 ± 3,1-fach bei einer Konzentration von 10⁻⁹ M. Durch die hohen Schwankungen der Ergebnisse ergibt sich statistisch keine Signifikanz (Abbildung 60 C).

Nach Inkubation der Zellen mit 1-100 nM Calcitriol wird eine konzentrationsabhängige Reduktion der *Tnf- α* -Expression beobachtet und korreliert mit den Ergebnissen zu TNF- α Gehalten in Mediumüberständen myeloider Zellen. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 100 nM Calcitriol ist verglichen mit dem Lösungsmittel (DMSO 0,1 %) im Mittel eine $0,6 \pm 0,2$ -fache mRNA-Expression von *Tnf- α* messbar. Diese Beobachtung ergibt sich jedoch auf Grund hoher Abweichungen als statistisch nicht signifikant. Eine 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit TCDD 10^{-12} - 10^{-8} M ergibt eine tendenzielle konzentrationsabhängige Steigerung der *Tnf- α* -Expression. Diese ist jedoch sehr gering und erweist sich als statistisch nicht signifikant (Abbildung 60 D).

5.6.3.2 Genexpression von *Cyp1a1* und *Cyp24a1*

Murine Knochenmarkzellen wurden nach Isolierung zehn Tage kultiviert und anschließend für 48 h mit Calcitriol (1-100 nM), TCDD (10^{-12} - 10^{-8} M) oder der Kombination von Calcitriol (1-100 nM) mit TCDD (1 nM) behandelt. Nach Isolation der totalen RNA und deren Umschreiben in komplementäre DNA wurden mit Hilfe der quantitative RT-PCR die Expressionsprofile der Cytochrom P450 Enzyme *1a1* und *24a1* untersucht. Eine zusätzliche LPS-Stimulation der Zellen lieferte eine nur grenzwertige RNA-Qualität. Einige Resultate von Genexpressionen bei LPS-Stimulation werden aber im Anhang dargestellt (Anhang, Abbildung 101 - Abbildung 105).

Anhand Abbildung 61 sieht man eine konzentrationsabhängig steigende mRNA-Expression des *Cyp1a1* nach Behandlung myeloider Zellen mit 10^{-12} - 10^{-8} M TCDD, einem der potentesten *Cyp1a1*-Induktoren. Die höchste Expression wird bei einer Konzentration von 10^{-9} M TCDD erreicht. Diese steigt dabei statistisch signifikant auf durchschnittlich $39,0 \pm 21,9$ -fach relativ zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) an. Bei der nächsthöheren Konzentration des TCDD (10^{-8} M) sinkt die mRNA-Expression wieder auf $21,7 \pm 12,6$ -fach ab.

Werden murine myeloide Zellen für 48 h mit dem Vitamin D₃-Metaboliten Calcitriol inkubiert und anschließend hinsichtlich der *Cyp1a1*-Expression untersucht, kann man feststellen, dass Calcitriol ebenfalls eine konzentrationsabhängige Steigerung der *Cyp1a1*-mRNA-Expression zur Folge hat. Die relative Expression liegt dabei im gleichen Bereich wie bei Inkubation der Zellen mit TCDD. Bei der verwendeten Maximalkonzentration des Calcitriols von 100 nM wird die *Cyp1a1* mRNA durchschnittlich $40,9 \pm 22,6$ -fach stärker exprimiert und ist in Relation zur Lösungsmittelkontrolle statistisch signifikant (Abbildung 61).

Nach einer 48 h-Inkubation mit Calcitriol (1-100 nM) in Kombination mit 1 nM TCDD ist ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit der *Cyp1a1*-Expression zu verzeichnen. Bei einer

Konzentration des Calcitriols von 30 nM zusammen mit 1 nM TCDD ergibt sich eine statistisch signifikante relative Expression des *Cyp1a1*. Ein additiver Effekt der *Cyp1a1*-Expression durch die Kombination der beiden untersuchten Substanzen konnte nicht beobachtet werden. Im Gegenteil, bei Co-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol in Konzentrationen 1 nM bzw. 3 nM zusammen mit TCDD 1 nM konnte eine statistisch signifikant geringere *Cyp1a1*-Expression im Vergleich zu TCDD 1 nM festgestellt werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse eine relativ hohe Schwankungsbreite auf (Abbildung 61).

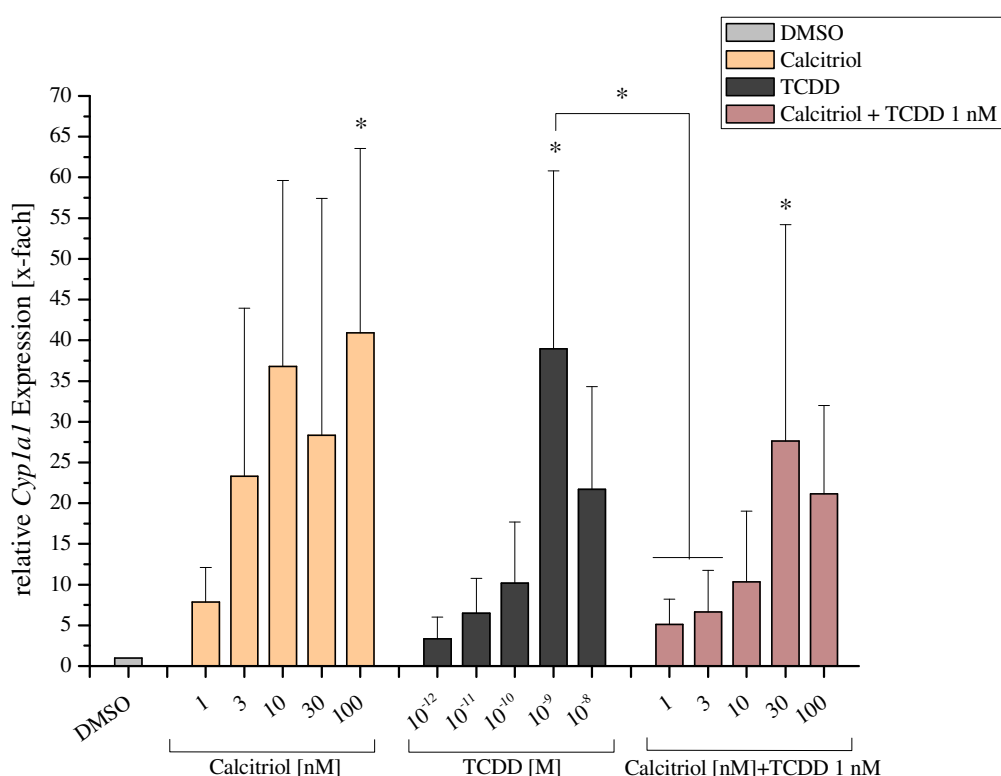


Abbildung 61: relative *Cyp1a1* Expression in myeloiden Zellen (48 h). 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und der Kombination von Calcitriol (1-100 nM) mit TCDD (1 nM) (C). MW \pm SD, $n \geq 4$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

Eine kürzere Inkubationsdauer von 24 h lieferte zur Expression des *Cyp1a1* andere Resultate (Abbildung 62). Sowohl für TCDD (10^{-12} - 10^{-8} M) als auch für Calcitriol (1-100 nM) ergibt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der *Cyp1a1*-Expression. In einer Calcitriol-Konzentration von 30 nM wird eine $10,7 \pm 6,0$ -fach erhöhte Expression erreicht und ergibt sich im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO als statistisch signifikant. Für *Cyp1a1*-Expression durch TCDD wird auf Grund hoher Standardabweichungen keine statistische Sig-

nifikanz erreicht. Im Gegensatz zur Behandlung der Zellen über 48 h, wird nach verkürzter Inkubationsdauer von 24 h durch Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol ein synergistischer Effekt bzgl. *Cyp1a1* beobachtet. Beim Vergleich der Expressionen durch Calcitriol gegenüber der Co-Inkubation mit TCDD ergeben sich für die Konzentrationen 10-100 nM statistisch signifikante bzw. statistisch hoch signifikante Unterschiede. In Bezug auf TCDD ist die Expression des *Cyp1a1* durch beide Verbindungen statistisch signifikant (Abbildung 62).

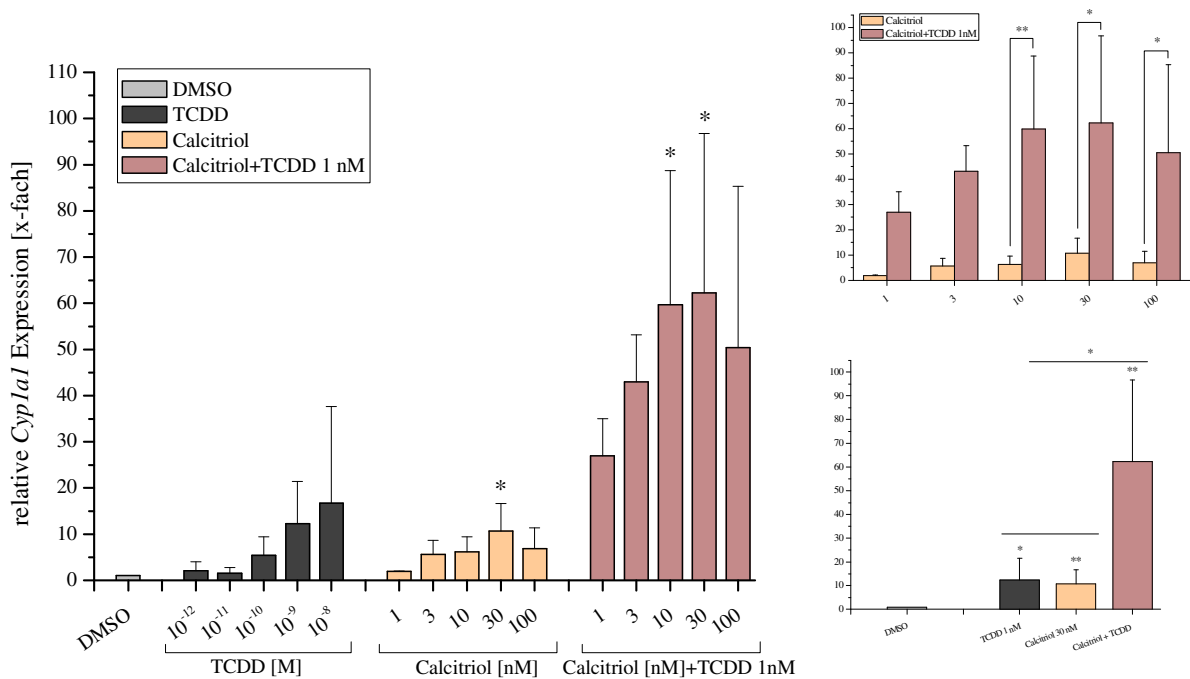


Abbildung 62: relative *Cyp1a1* Expression in myeloiden Zellen (24 h). 24 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (1-100 nM), TCDD (10^{-12} - 10^{-8} M) und der Kombination von Calcitriol (1-100 nM) mit TCDD (1 nM). MW \pm SD, n \geq 2. * = p \leq 0,05; ** = p \leq 0,01; *** = p \leq 0,001.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression des Enzyms Cytochrom P450 *24a1* in murinen myeloiden Zellen nach 48 h-Behandlung mit Calcitriol und/oder TCDD untersucht. Wie anhand Abbildung 63 ersichtlich, führt die Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol zu drastischer, konzentrationsabhängiger Induktion der *Cyp24a1*-Expression. Bereits die geringste verwendete Konzentration von 1 nM verursacht durchschnittlich eine 552-fach erhöhte Expression. Bei Inkubation der Zellen mit 30 nM Calcitriol wird eine maximale, durchschnittlich 13491 ± 8824 -fach erhöhte Expression erreicht und ergibt sich relativ zur Lösungsmittelkontrolle als statistisch hoch signifikant. In der höchsten untersuchten Calcitriol-Konzentration

(100 nM) sinkt die *Cyp24a1* Expression leicht auf 11948 ± 7721 -fach, bleibt jedoch verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle statistisch hoch signifikant (Abbildung 63).

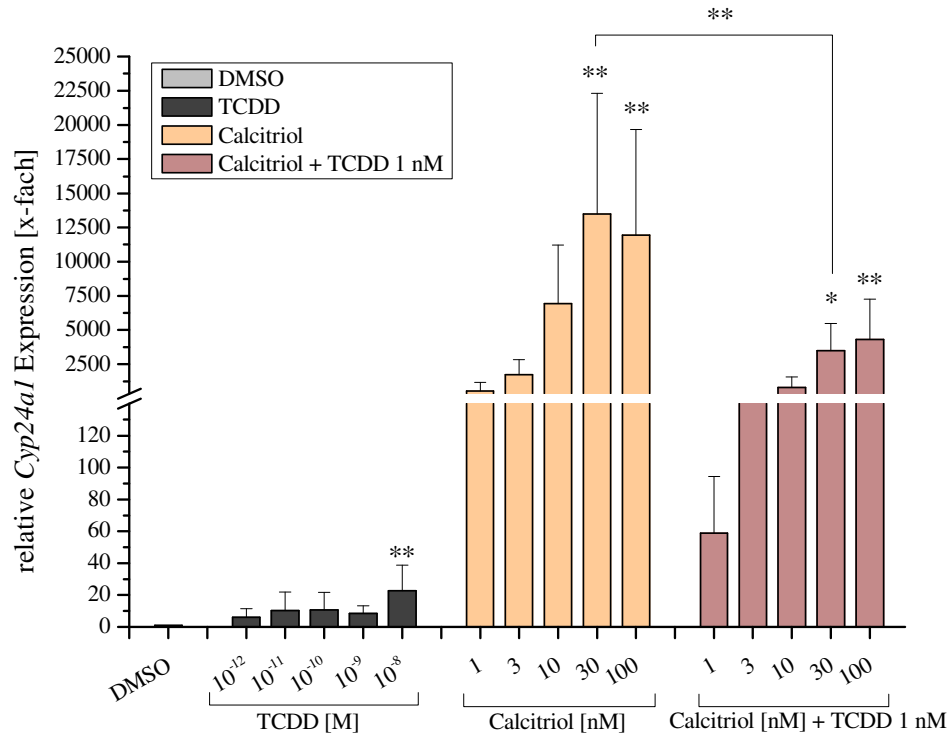


Abbildung 63: relative *Cyp24a1* Expression in myeloiden Zellen (48 h). 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und der Kombination von Calcitriol (1-100 nM) mit TCDD (1 nM) (C). MW \pm SD, $n \geq 4$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

48-stündige Exposition muriner myeloider Zellen mit TCDD im Konzentrationsbereich von 10^{-12} – 10^{-8} M hat ebenfalls eine konzentrationsabhängige Erhöhung der *Cyp24a1* mRNA-Expression zur Folge. Verglichen mit der durch Calcitriol verursachten *Cyp24a1*-Expression fällt diese jedoch wesentlich geringer aus. Bei der höchsten inkubierten TCDD-Konzentration von 10^{-8} M kann durchschnittlich eine $22,6 \pm 16,2$ -fache Expression beobachtet werden. Bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) ist die Expressionssteigerung statistisch hoch signifikant (Abbildung 63). Werden myeloide Zellen für 48 Stunden mit Calcitriol (1-100 nM) und TCDD (1 nM) co-inkubiert, ergibt sich ebenfalls ein massiver, konzentrationsabhängiger Anstieg der *Cyp24a1* mRNA-Expression. Bei der Inkubation mit 30 nM Calcitriol in Kombination mit 1 nM TCDD liegt die *Cyp24a1* mRNA im Mittel 3493 ± 1982 -fach höher exprimiert vor und ist somit verglichen mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) statistisch signifikant. Wird die Konzentration des Calcitriols auf 100 nM erhöht und mit 1 nM TCDD kombiniert, erreicht die *Cyp24a1*-Expression eine statistisch hoch signifikante, durchschnitt-

lich 4299 ± 2948 -fache Steigerung (Abbildung 63). Durch Behandlung der Zellen mit der Kombination der beiden Substanzen Calcitriol und TCDD kann jedoch kein synergistischer Effekt beobachtet werden. Im Gegenteil, die Expressionshöhe des *Cyp24a1* ist deutlich niedriger verglichen mit der alleinigen Calcitriol-Inkubation. Die statistische Gegenüberstellung der beiden Gruppen ergibt für die Konzentration von 30 nM Calcitriol verglichen mit der gleichen Konzentration in Kombination mit 1 nM TCDD eine statistisch hoch signifikante Differenz (Abbildung 63).

Auch bei einer kürzeren Inkubationsdauer von 24 h sieht man einen Anstieg der *Cyp24a1*-Expression durch TCDD, dieser ist jedoch etwas geringer verglichen mit der längeren Behandlung von 48 h und erweist beim Vergleich mit DMSO als statistisch nicht signifikant. Durch Calcitriol wird eine konzentrationsabhängige Steigerung von *Cyp24a1* beobachtet. In einer Konzentration von 30 nM wird eine 2082 ± 1323 -fach erhöhte *Cyp24a1*-Expression erreicht. Verglichen mit DMSO ergibt sich diese Differenz als statistisch signifikant. Durch Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol konnte kein Synergismus festgestellt werden (Abbildung 64).

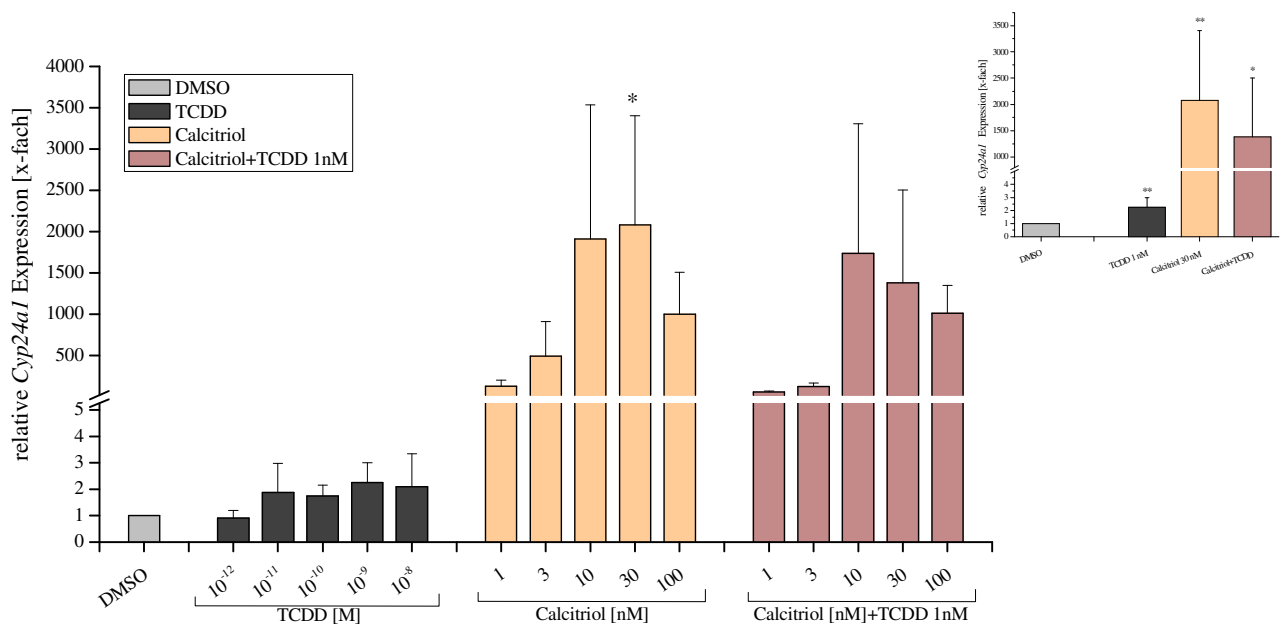


Abbildung 64: relative *Cyp24a1* Expression in myeloiden Zellen (24 h). 24 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und der Kombination von Calcitriol (1-100 nM) mit TCDD (1 nM) (C). MW \pm SD, $n \geq 2$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

Zur Vervollständigung wurden mit Calcitriol bzw. TCDD behandelte myeloide Zellen auf die Genexpression der entsprechenden Rezeptoren *Ahr* und *Vdr* untersucht. Die folgende Abbildung 65 zeigt die Resultate der RT-PCR Analysen. Nach 48-stündiger Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol im Bereich von 1-100 nM steigt die mRNA-Expression des für Calcitriol hochaffinen Vitamin-D-Rezeptors *Vdr* konzentrationsabhängig an. Bei einer Calcitriol-Konzentration von 30 nM erreicht die *Vdr*-Expression im Mittel das $9,5 \pm 5,4$ -fache und ist bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) statistisch signifikant. Wird die Calcitriol-Konzentration auf 100 nM erhöht, wächst die *Vdr*-Expression verglichen mit dem Vehikel DMSO im Durchschnitt auf das $11,1 \pm 6,0$ -fache an und ergibt sich in der statistischen Analyse als hoch signifikant (Abbildung 65 A).

Werden murine myeloide Zellen für 48 h mit TCDD, dem Arylhydrocarbon-Rezeptor Agonisten, im Bereich von 10^{-12} – 10^{-8} M behandelt, sieht man einen Anstieg der *Ahr*-mRNA-Expression. Die höchste Expressionsrate wird bei Inkubation der Zellen mit 10^{-9} M TCDD erreicht, diese beträgt dabei das $1,9 \pm 1,4$ -fache relativ zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Nach statistischer Analyse erweist sich der Anstieg jedoch auf Grund der geringen Induktion und relativ hohen Schwankungen als nicht signifikant (Abbildung 65 B).

Werden die beiden Substanzen auf das Expressionsvermögen des entsprechend anderen Rezeptors untersucht – also TCDD auf Expression des *Vdr* und Calcitriol auf Expression des *Ahr* – sieht man, dass im Falle des Calcitriols bei der geringsten Konzentration von 1 nM ein signifikanter Anstieg der *Ahr*-Expression zu verzeichnen ist. Mit steigender Calcitriol-Konzentration sinkt die Expression jedoch wieder ab. TCDD hingegen hatte keine Auswirkung auf die Expression des Vitamin-D-Rezeptors (Abbildung 65 A/B).

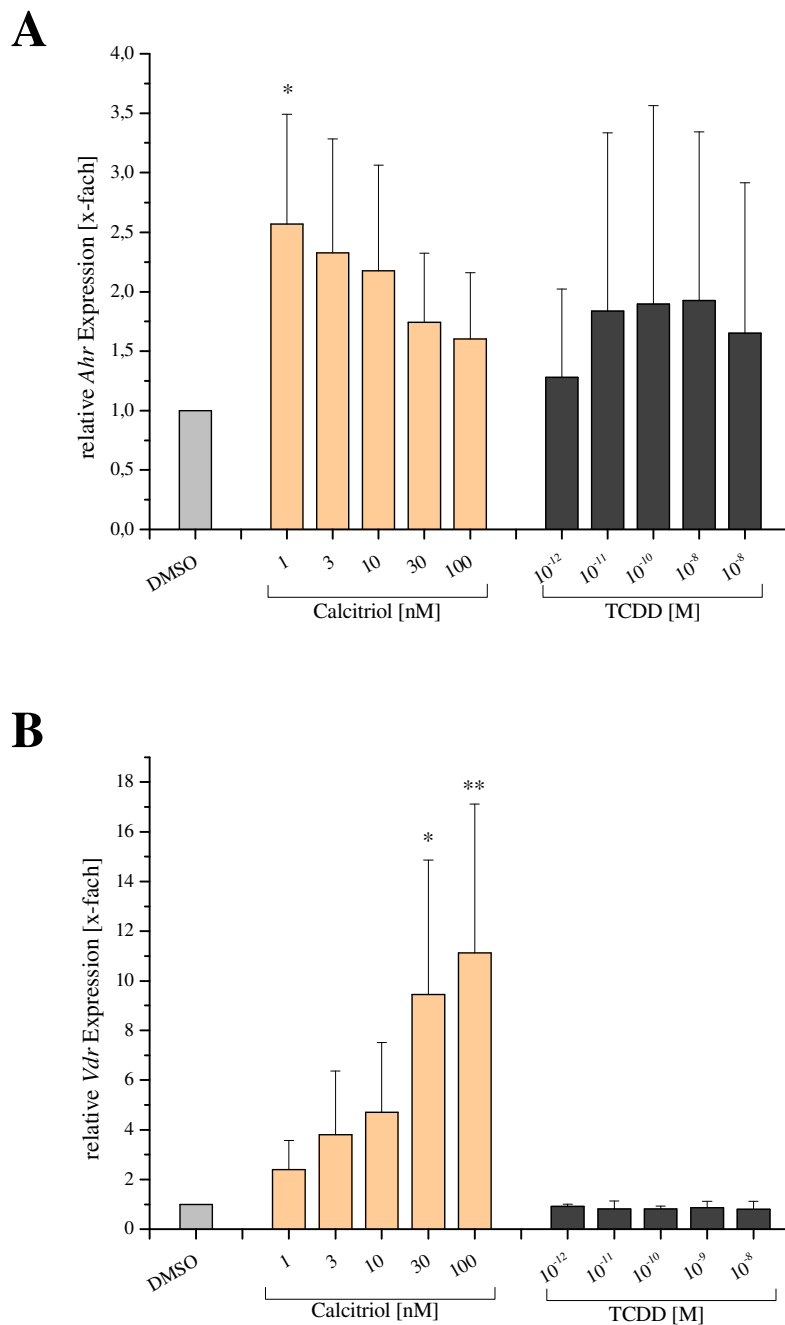


Abbildung 65: relative Genexpression von AhR (A) und Vdr (B). 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und TCDD. MW \pm SD, n \geq 4. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$; *= $p\leq 0,001$.**

Die beobachtete induzierte Genexpression von *Cyp1a1* bzw. *Cyp24a1* durch Calcitriol und TCDD sollte auf die Ah-Rezeptor-Abhängigkeit untersucht werden. Dazu wurden murine myeloide Zellen mit dem AhR-Antagonisten CH223191 für 4 h vorbehandelt und anschließend für 48 h mit Calcitriol (30 nM) und TCDD (1 nM) inkubiert. Nachfolgend wurde die Genexpression von *Cyp1a1* sowie *Cyp24a1* untersucht (Abbildung 66).

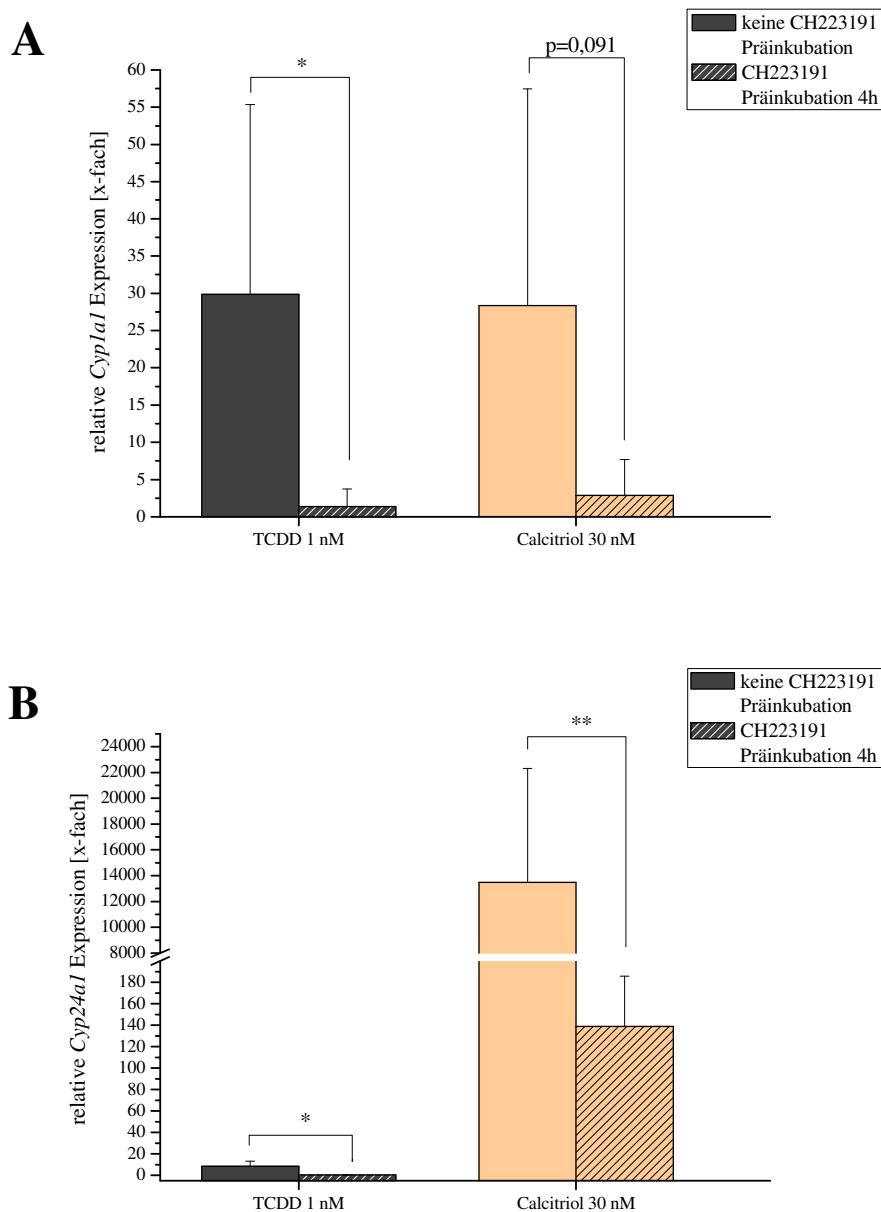


Abbildung 66: AhR-Abhängigkeit der *Cyp1a1* und *Cyp24a1* Expression durch Calcitriol und TCDD. Vorinkubation myeloider Zellen mit AhR-Antagonisten CH223191 für 4 h, anschließende Inkubation mit Calcitriol (30 nM) und TCDD (1 nM) für 48 h. MW \pm SD, n=4. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$; *= $p\leq 0,001$.**

Es zeigt sich, dass die in murinen myeloiden Zellen durch TCDD (1 nM) verursachte *Cyp1a1* Expression von durchschnittlich 29,8-fach durch eine 4 h-Vorinkubation der Zellen mit dem AhR-Antagonisten CH223191 (10 μ M) statistisch signifikant auf durchschnittlich 1,4-fach gesenkt wird. Eine ähnliche Beobachtung kann gemacht werden, wenn myeloide Zellen nach

einer vorangegangenen CH223191 Inkubation, mit Calcitriol (30 nM) behandelt werden. Dadurch sinkt die relative *Cyp11a1*-Expression um 90 % von durchschnittlich 28,4-fach auf 2,8-fach. Auf Grund der hohen Standardabweichung wird nur hier ein p-Wert von $p=0,091$ erreicht, wodurch die Differenz der Expression sich in einer statistisch Analyse als nicht signifikant ergibt (Abbildung 66 A).

Bei der Untersuchung der *Cyp24a1*-Genexpression ergibt sich ein vergleichbares Bild. Die durch TCDD hervorgerufene *Cyp24a1* Induktion von durchschnittlich 8,5-fach wird durch Vorinkubation mit dem AhR-Antagonisten CH223191 auf 0,04-fach statistisch signifikant reduziert. Dies entspricht einer 99,5 %igen Reduktion der Expression. *Cyp24a1*-Genexpression, welche durch die Behandlung mit dem Target Calcitriol (30 nM) in myeloide Zellen gemessen wurde (durchschnittlich 13491-fach) beträgt nach 4 h-Vorinkubation mit CH223191 (10 μ M) nur noch 1 % der ursprünglichen Expression (durchschnittlich 139-fach). Nach einer statistischen Analyse ergibt sich diese Differenz als hoch signifikant (Abbildung 66 B).

Des Weiteren wurde ein Vitamin-D-Rezeptor-Antagonist getestet. Marshall *et al.* beschrieben das Antihypertonikum Telmisartan anhand von *in silico* Untersuchungen als einen voraussichtlich starken VDR-Antagonisten mit einer Calcitriol-ähnlichen VDR-Affinität und einer Inhibitionskonstante von $K_i=0,04$ nmol (Marshall *et al.* 2006).

Dazu wurden murine myeloide Zellen für 4 h mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Telmisartan (10, 30, 100 nM) und anschließend für 48 h mit Calcitriol (30 nM) behandelt. Nachfolgend wurde die Genexpression des Enzyms *Cyp24a1* mittels RT-PCR untersucht. Wie die folgende Abbildung 67 veranschaulicht, führt eine Vorinkubation mit Telmisartan und anschließender Calcitriol Behandlung zu keiner Reduktion der *Cyp24a1*-Genexpression. Im Gegenteil, die Expression des Enzyms stieg im Vergleich zur Kontrolle Calcitriol an. Sogar bei der höchsten untersuchten Telmisartan Konzentration (100 nM) betrug die Expression noch eine über vierfach höhere Expression verglichen mit Calcitriol ohne Telmisartan-Vorbehandlung. Auf Grund hoher Standardabweichungen ergibt sich hierbei keine statistische Signifikanz.

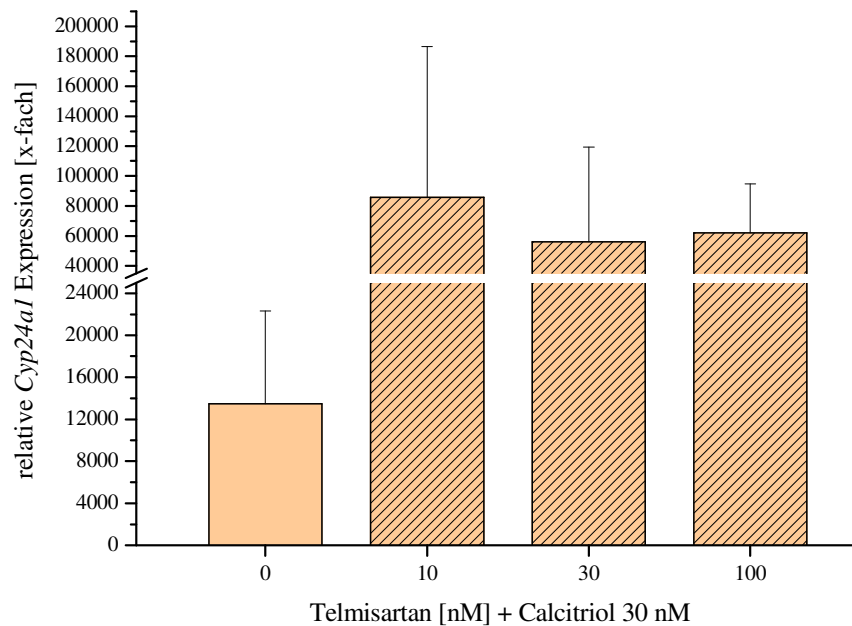


Abbildung 67: relative *Cyp24a1* Expression nach Inkubation mit Telmisartan und Calcitriol. 4 h Vorinkubation muriner myeloider Zellen mit Telmisartan (10, 30, 100 nM) und 48 h Inkubation mit Calcitriol (30 nM). MW \pm SD, $n \geq 2$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.6.4 Western Blot Analyse

Nach den Untersuchungen bezüglich der Induktion von *Cyp1a1* auf Enzym- und mRNA-Ebene, sowie den Expressionen von *Cyp24a1*, *Ahr* und *Vdr* auf mRNA-Ebene, wurde auch der Protein-Status der genannten Enzyme und Rezeptoren in murinen myeloiden Zellen mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden murine Knochenmarkzellen analog zu vorangegangenen Untersuchungen am zehnten Kulturtag mit Calcitriol (1 – 100 nM) bzw. TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M) für 48 h behandelt. Anschließend wurden Proteine aus dem Gesamtzelllysat gewonnen und einer Western Blot Analyse unterzogen.

Wie Abbildung 68 zeigt, ist in murinen myeloiden Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation mit Calcitriol im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 100 nM keine Änderung der AhR-Proteinexpression zu erkennen. Der AhR-Proteinlevel (96 kDa) bleibt auf dem Basalniveau und unterscheidet sich nicht von der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) (Abbildung 68 A). Für den Vitamin D-Rezeptor ergibt eine Calcitriol-Inkubation hingegen eine konzentrationsabhängige Steigerung des Proteinlevels (51 kDa) (Abbildung 68 B). Die Beobachtung

des konzentrationsabhängig ansteigenden VDR-Proteinlevels ergibt sich auch nach densitometrischer Auswertung der Daten. Bei Inkubation myeloider Zellen mit 30 nM Calcitriol steigt die relative Bandenintensität auf das 7,9-fache an. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 100 nM wird eine 12,6-fache relative Bandenintensität erreicht. Diese zeigt sich in der statistischen Auswertung als statistisch hoch signifikant (Abbildung 69 A).

Ein Ähnliches Bild zeigt sich für Cyp24a1. Nach Behandlung myeloider Zellen für 48 h mit Calcitriol im Bereich von 1 – 10 nM steigt der Cyp24a1-Protein-Level (65 kDa) konzentrationsabhängig an (Abbildung 68 C). Dies wird durch die densitometrische Auswertung bestätigt. Bei der höchsten untersuchten Calcitriol-Konzentration (100 nM) erhält man eine durchschnittliche 3,5-fach erhöhte Bandenintensität (Abbildung 69 B). Für Cyp1a1 konnte nach Inkubation der Zellen mit Calcitriol im untersuchten Konzentrationsbereich kein Protein nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten mit TCDD (1 nM) behandelte HepG2-Zellen, welche in der Western Blot Analyse eine deutliche Bande bei 52 kDa für CYP1A1 zeigen (Abbildung 68 E). Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin verwendet. Dieses zeigt bei allen untersuchten Calcitriol-Konzentrationen sowie bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO eine Bande bei 43 kDa mit konstanter Intensität (Abbildung 68 D, F).

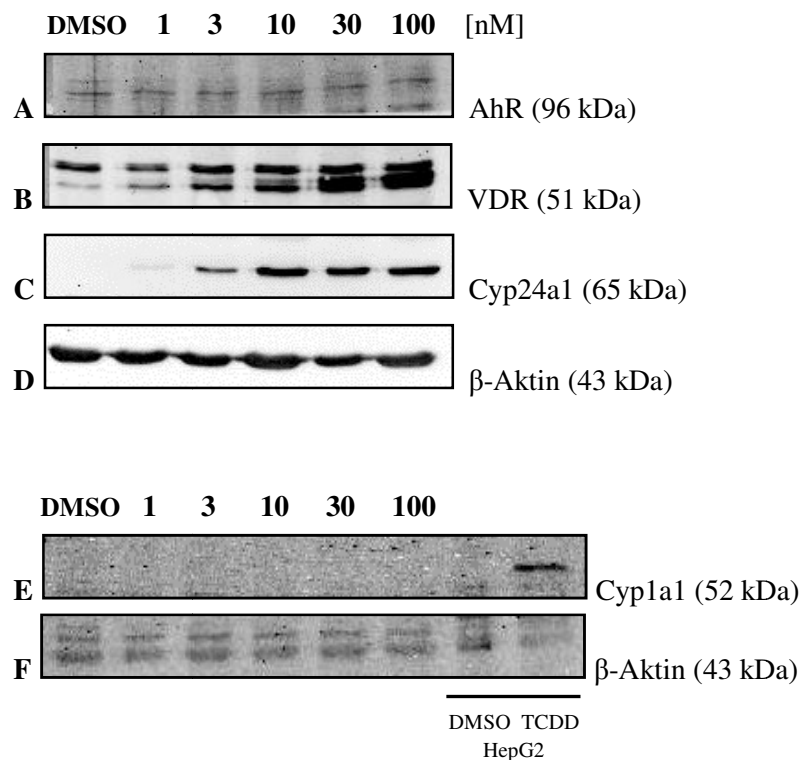


Abbildung 68: Western Blot-Analyse in myeloiden Zellen nach Calcitriol Inkubation. 48 h Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol (1-100 nM) Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %). Untersuchung auf Protein-Expression von AhR (A), VDR (B), Cyp24a1 (C), β -Aktin (D/F), Cyp1a1 (E).

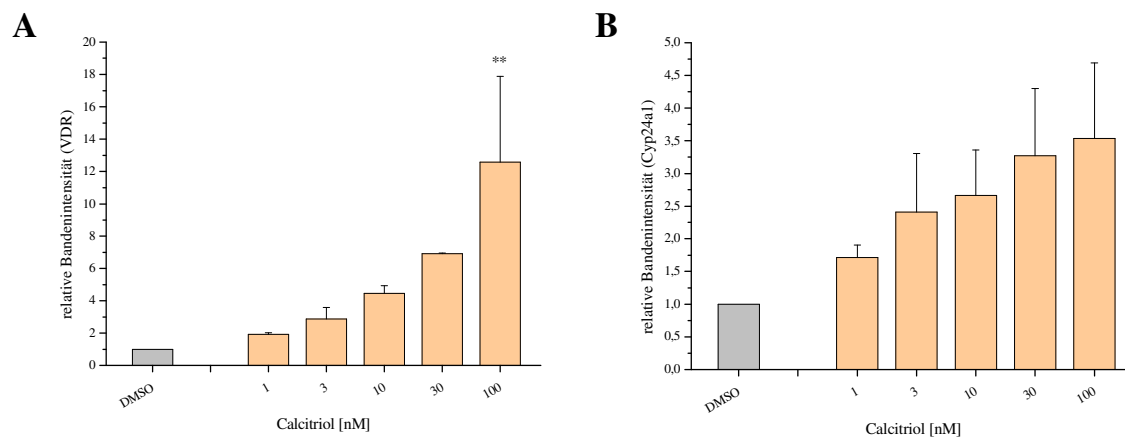


Abbildung 69: Densitometrische Auswertung des Western Blots für VDR (A) und Cyp24a1 (B). 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol. MW \pm SD, n=2. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

Nach Inkubation muriner myeloider Zellen mit TCDD im Konzentrationsbereich von 10^{-12} – 10^{-8} M und anschließender Western Blot Analyse kann man erkennen, dass die beiden untersuchten Rezeptoren AhR und VDR in ihrer Proteinexpression durch TCDD nicht beeinflusst werden und nur eine basale Expression festzustellen ist, die durch Banden gleichmäßiger Intensität bei 96 kDa bzw. 51 kDa widergespiegelt wird (Abbildung 70 A, B).

Für Cyp1a1 konnte durch Behandlung myeloider Zellen mit TCDD keine Proteinexpression nachgewiesen werden. Lediglich bei der Kontrolle mit HepG2-Zellen, welche mit 1 nM TCDD behandelt wurden, ist eine CYP1A1-Bande bei 52 kDa sichtbar (Abbildung 70 C, E). Auch für Cyp24a1 konnte durch Behandlung mit TCDD keine Proteinexpression detektiert werden. Im Gegensatz zur Inkubation mit Calcitriol (Abbildung 68 C) war im Fall von TCDD keine Bande bei 65 kDa detektierbar (Abbildung 70 D). Ähnliches Ergebnis konnte bei Expression von VDR beobachtet werden. Nach Inkubation mit TCDD war nur die basale VDR-Proteinexpression sichtbar (Abbildung 70 B).

Die Ladungskontrolle β -Aktin weist sowohl bei der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) als auch bei der Behandlung mit verschiedenen TCDD-Konzentrationen stets Banden gleichmäßiger Intensität bei 43 kDa auf (Abbildung 70 D, F).

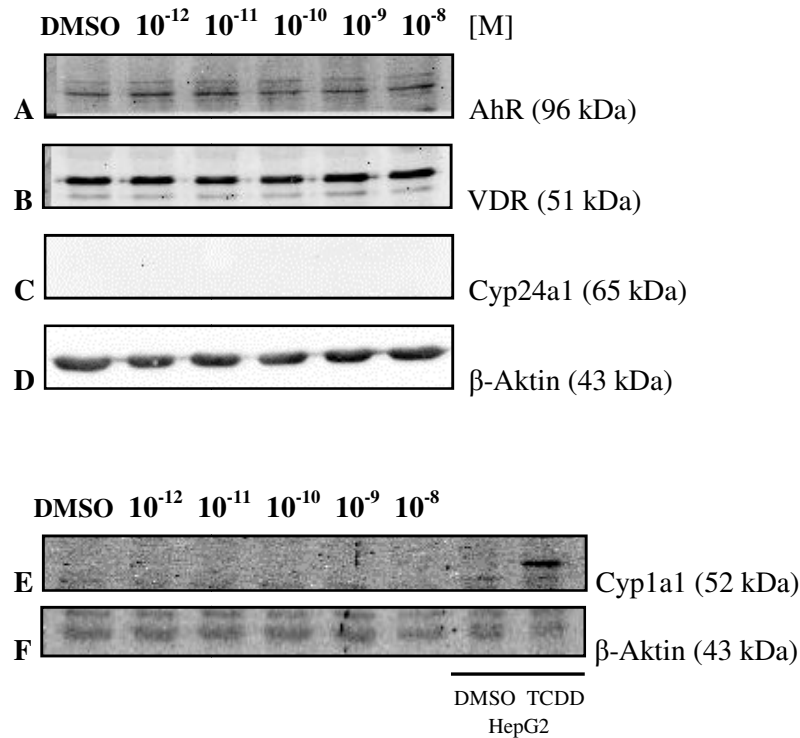


Abbildung 70: Western Blot-Analyse in myeloiden Zellen nach TCDD Inkubation. 48 h Inkubation myeloider Zellen mit TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M), Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %). Untersuchung auf Protein-Expression von AhR (A), VDR (B), Cyp24a1 (C), β -Aktin (D/F), Cyp1a1 (E).

5.7 Einfluss von TCDD und Calcitriol auf HepG2

Nach den erhaltenen Ergebnissen zum Einfluss von Calcitriol und TCDD in murinen myeloiden Zellen wurde auch die Wirkung der beiden Substanzen auf die humane Hepatomzelllinie HepG2 untersucht. Hierbei wurden folgende Parameter analysiert: Zellvitalität, EROD-Aktivität sowie Induktion von *CYP1A1* auf mRNA-Ebene. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

5.7.1 Zellvitalität

Für die Untersuchung der Zellvitalität wurden HepG2-Zellen für 48 h mit Calcitriol (1 – 100 nM), mit TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M) sowie einer Kombination aus Calcitriol und TCDD (10^{-9} M) behandelt und nach Ablauf der Inkubationszeit dem Resazurinreduktionstest unterzogen. Die folgende Abbildung 71 zeigt die Resultate der Untersuchungen. Wie man erkennen kann, haben Calcitriol und TCDD in den untersuchten Konzentrationsbereichen von 1 – 100 nM bzw. 10^{-12} – 10^{-8} M keinen Einfluss auf die Vitalität der humanen Hepatomzellen. Auch die Kom-

bination verschiedener Calcitriol-Konzentrationen mit 1 nM TCDD zeigte nach 48-stündiger Inkubation keine Wirkung auf HepG2-Zellen. Die relative prozentuale Vitalität bewegt sich stets im Bereich der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Nur die Positivkontrolle Saponin (0,1 %) weist wie erwartet eine statistisch höchst signifikante Reduktion der Vitalität auf.

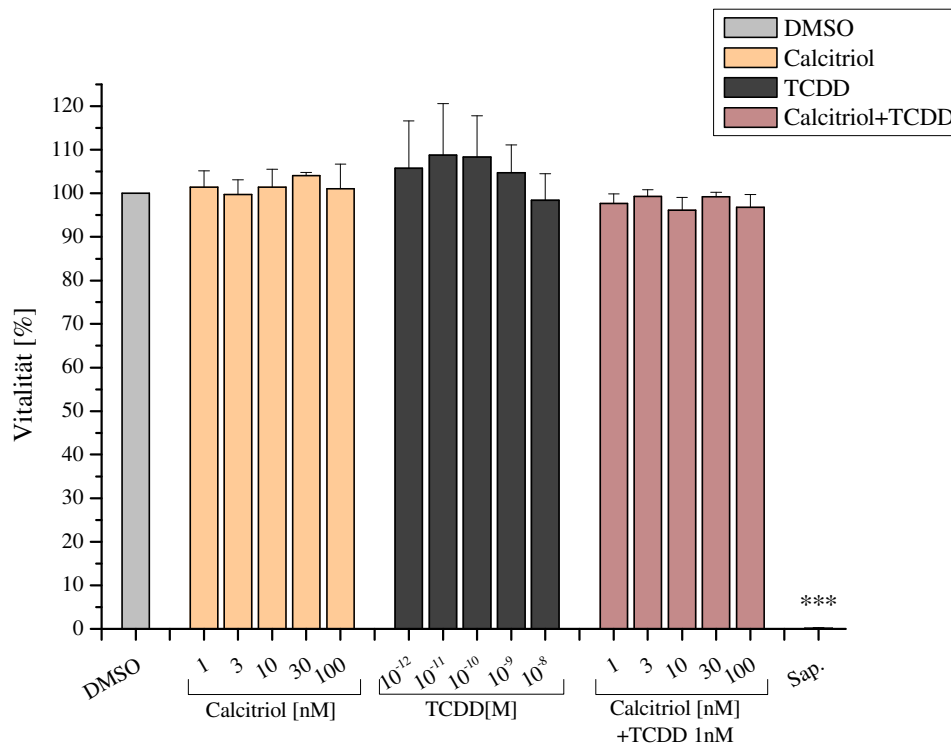


Abbildung 71: Zytotoxizität von Calcitriol und TCDD in HepG2. 48 h Inkubation von HepG2 mit Calcitriol, TCDD und deren Kombination. MW \pm SD, $n \geq 3$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.7.2 EROD-Aktivität

Zur Überprüfung des Einflusses von Calcitriol und TCDD auf CYP1A1 auf Enzym-Ebene wurde der EROD-Assay herangezogen. Dazu wurden HepG2-Zellen für 48 h mit Calcitriol (1 – 100 nM), mit TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M) als auch der Kombination verschiedener Konzentration an Calcitriol mit 1 nM TCDD inkubiert. Anschließend wurde in noch vitalen Zellen der EROD-Assay nach Behnisch *et al.* durchgeführt.

Wie die nächste Abbildung 72 illustriert, konnte für Calcitriol im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 100 nM keine Induktion der EROD-Aktivität festgestellt werden, die Werte bewegen sich im Bereich der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) (Abbildung 72).

TCDD, welches in diesem System auch als Positivkontrolle dient, zeigt im Bereich von 10^{-12} – 10^{-8} M eine konzentrationsabhängige Steigerung der EROD-Aktivität. Bei einer Konzentration von 10^{-9} M erreicht die Enzymaktivität ihr Maximum und ist mit durchschnittlich $327,6 \pm 97,4$ pmol/mg/min im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO statistisch hoch signifikant. Bei der höchsten verwendeten TCDD-Konzentration von 10^{-8} M sinkt die EROD-Aktivität leicht ab auf durchschnittlich $320,3 \pm 108,4$ pmol/mg/min und bleibt verglichen mit dem Vehikel DMSO statistisch hoch signifikant (Abbildung 72). Werden humane Hepatomzellen simultan mit Calcitriol (1-100 nM) und TCDD (1nM) für 48 h behandelt, ist keine Änderung der EROD-Aktivität verglichen mit TCDD (10^{-9} M) feststellbar (Abbildung 72).

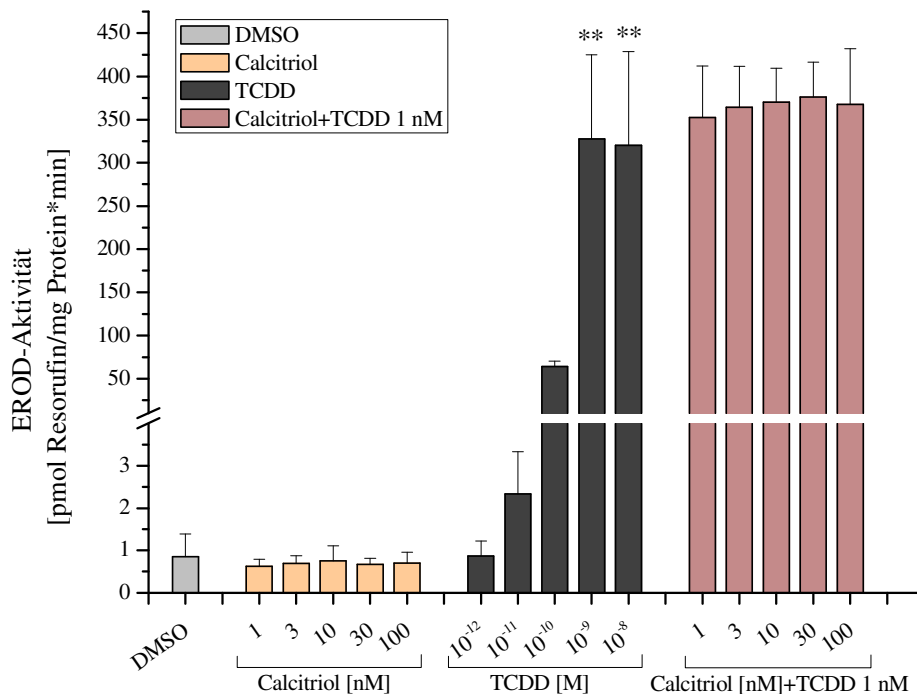


Abbildung 72: EROD-Aktivität von Calcitriol und TCDD in HepG2. 48 h Inkubation von HepG2-Zellen mit Calcitriol (A), TCDD (B) und deren Kombination (C). MW \pm SD, n=3. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

5.7.3 Genexpression von *CYP1A1*

Nach Analysen der CYP1A1-Aktivität auf Enzym-Ebene nach Behandlung mit Calcitriol und TCDD, sollten ergänzend auch die Auswirkungen auf mRNA-Ebene untersucht werden. Nach einer 48 h Inkubation humaner Hepatomzellen mit Calcitriol (1 – 100 nM), TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M) sowie deren Kombination wurde die Genexpression des *CYP1A1* mit Hilfe der quanti-

tativen RT-PCR untersucht. Wie das Diagramm (Abbildung 73) graphisch veranschaulicht, wird die Genexpression des Cytochrom P450 *IA1* nach Inkubation von HepG2-Zellen mit Calcitriol im untersuchten Konzentrationsbereich kaum beeinflusst. Die ermittelten Werte bewegen sich im Bereich der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %).

Die Behandlung humaner Hepatomzellen mit TCDD im Bereich von (10^{-12} – 10^{-8} M) zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der *CYP1A1*-Genexpression. Die höchste Expression kann bei einer 1 nM TCDD-Konzentration und erreicht einen Wert von durchschnittlich 403 ± 269 -fach und ist im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle DMSO statistisch hoch signifikant. Wird die Konzentration an TCDD verzehnfacht (10 nM) fällt die relative Genexpression im Mittel auf 345-fach, ergibt sich jedoch auf Grund der hohen Standardabweichung als statistisch nicht signifikant. Durch Kombination von Calcitriol mit TCDD (1 nM) ist keine signifikante Änderung der *CYP1A1*-Genexpression zu verzeichnen, diese bleibt im Bereich der TCDD-Kontrolle (1 nM). Bei Calcitriol-Konzentrationen von 1 nM bzw. 100 nM sinkt die relative Expression auf 190 ± 54 -fach bzw. 182 ± 157 -fach, verglichen mit der Kontrolle ergibt sich dies in einer statistischen Analyse als nicht signifikant (Abbildung 73).

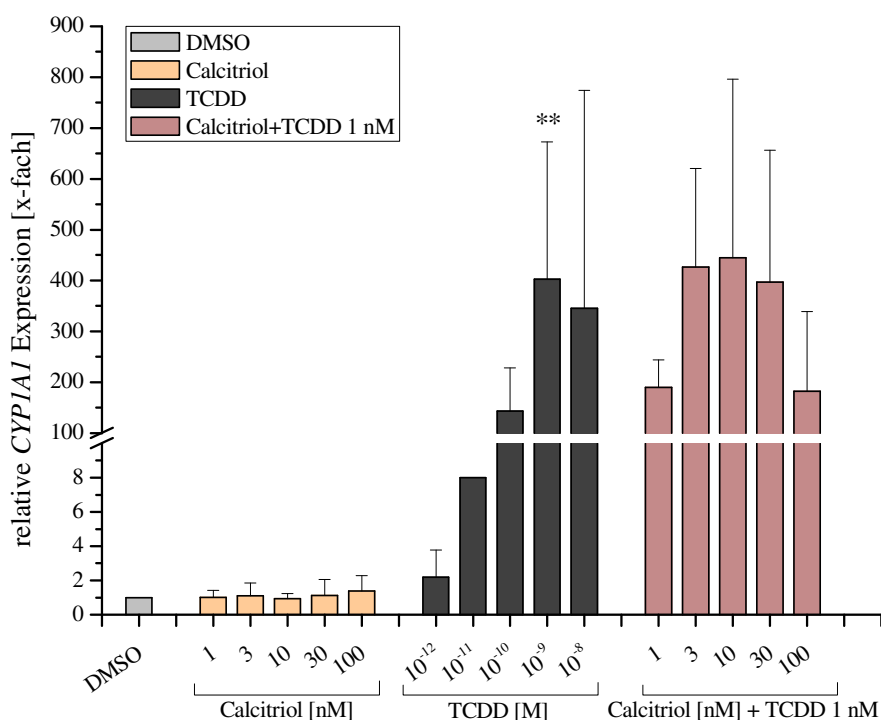


Abbildung 73: relative Genexpression von *CYP1A1* durch TCDD und Calcitriol. 48 h Inkubation von HepG2 mit Calcitriol (A), TCDD (B) und deren Kombination (C). MW \pm SD, $n \geq 3$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

5.8 Interaktion des VDR mit dem AhR (EMSA)

Die Ergebnisse aus Genexpressionsuntersuchungen in murinen myeloiden Zellen nach Behandlung mit Calcitriol und TCDD ließen einen Zusammenhang zwischen dem AhR- und VDR-Signalweg vermuten. Um diesen Aspekt besser untersuchen zu können, wurde der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) herangezogen. Dabei sollte analysiert werden, ob der Vitamin D-Rezeptor als Transkriptionsfaktor an die Promotor-Sequenz des CYP1A1 bindet.

Zu diesem Zweck wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 verwendet, da diese vermehrt VDR, aber auch AhR exprimiert. Die Zellen für 48 h mit TCDD (1 nM), Calcitriol (30 nM) bzw. dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. Anschließend wurde sowohl die zytosolische als auch die Kernfraktion der Zellen gewonnen und im Western Blot auf Anwesenheit von AhR bzw. VDR untersucht. Abbildung 74 zeigt die Resultate der Western Blot Untersuchungen von Zellextrakten. Anhand der schwachen Banden sieht man, dass in der zytosolischen Fraktion nur geringe Mengen an VDR oder AhR vorhanden sind. Im Gegensatz dazu ist die Bandenintensität für beide Proteine – AhR und VDR – in der Kernfraktion deutlich stärker. Es fällt auf, dass auch bei Behandlung der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO eine basale Expression der untersuchten Proteine vorhanden ist. Die Bandenintensität des AhR (96 kDa) scheint sich durch die Inkubation der Zellen mit TCDD oder Calcitriol nicht zu ändern. Die Bande des VDR (51 kDa) hingegen gewinnt an Intensität durch Exposition der Zellen mit TCDD (1 nM) oder Calcitriol (30 nM) im Vergleich zum Lösungsmittel DMSO. Es fällt aber auf, dass unabhängig davon ab die Zellen mit TCDD oder Calcitriol behandelt wurden, sich die Bandenintensität von VDR bzw. AhR nicht unterscheidet (Abbildung 74).

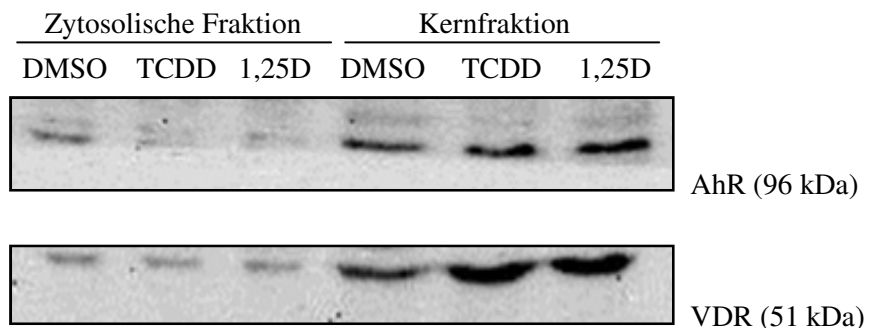


Abbildung 74: Western Blot Untersuchung von Zellextrakten. HEK-293 Zellen, 48 h Inkubation mit DMSO (0,1 %), TCDD (1 nM) oder Calcitriol („1,25D“, 30 nM). Extraktion der zytosolischen sowie der nukleären Fraktion.

Um zu untersuchen, ob nun VDR an die CYP1A1-Promoter-Region bindet, wurden die gewonnenen Kernextrakte von HEK-293 Zellen im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) eingesetzt. Als Target diente der 5'-Biotin markierte DNA Abschnitt der CYP1A1-Promoter-Region (Tabelle 27). Zur zusätzlichen Identifizierung wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen AhR und VDR eingesetzt. Abbildung 75 illustriert das Ergebnis einer EMSA-Untersuchung. Die ersten drei Spuren zeigen Kit-interne Kontrollen, welche das Funktionieren des Systems nachweisen. Die vierte Spur zeigt die freie, Biotin-markierte CYP1A1-Promoter DNA. Spuren 5-7 beinhalten Mischungen aus der markierten Target DNA sowie den Kernextrakten unterschiedlich behandelter HEK-Zellen (DMSO, TCDD, Calcitriol). Hierbei sieht man in allen drei Proben Laufweitenverschiebungen, sogenannte „Shifts“, im Vergleich zur freien DNA des CYP1A1 Promoters. Während der Kernextrakt mit DMSO behandelter HEK-293 Zellen mit der Target DNA nur einen „Shift“ zeigt, weisen die mit TCDD bzw. Calcitriol Kernextrakte jeweils drei Verschiebungen auf. Bei Verwendung eines Antikörpers gegen AhR sind die unteren beiden „Shifts“ nur noch ganz schwach zu sehen, während die oberste Bande intensiver erscheint. Beim DMSO Kernextrakt ist keine Verschiebung der Bande zu erkennen (Abbildung 75, Spuren 8-10).

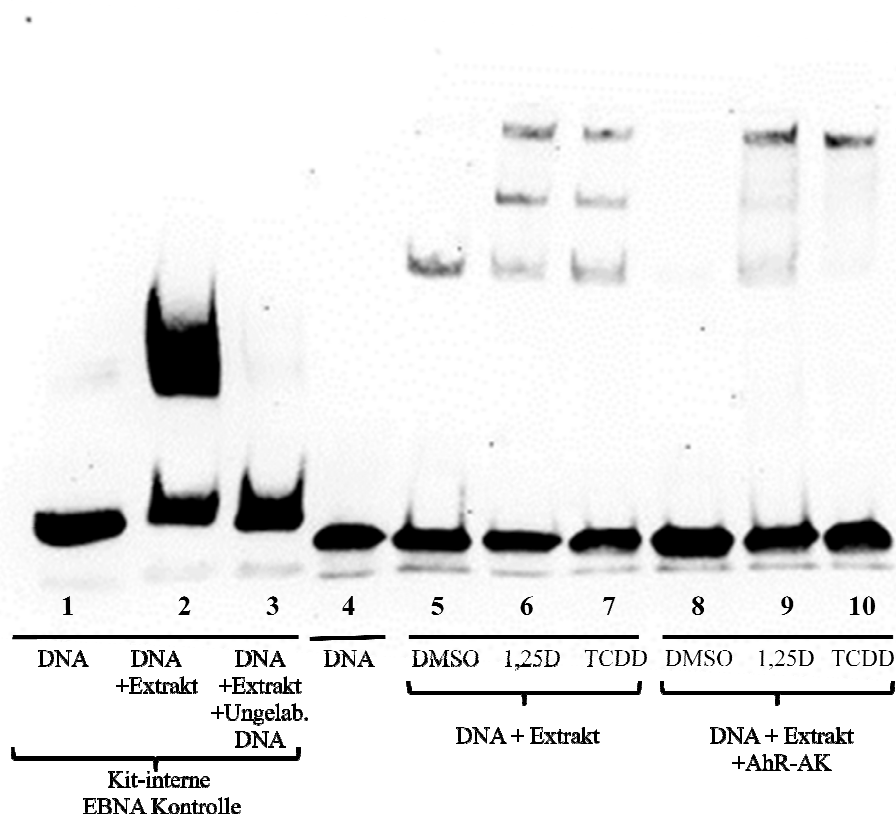


Abbildung 75: EMSA. Bindung des VDR an CYP1A1 Promoter (AhR Antikörper). Kernextrakte aus HEK-293 Zellen für 48 h behandelt mit DMSO 0,1%, TCDD 1 nM oder Calcitriol 30 nM (1,25D). Mix der Extrakte mit DNA-Region des CYP1A1-Promoters mit und ohne Antikörper gegen AhR.

Analoges Bild ergibt sich wenn Kernextrakte behandelter HEK-293 Zellen (TCDD und Calcitriol) mit dem DNA-Abschnitt des CYP1A1-Promoters und einem Antikörper gegen VDR im EMSA getestet werden (Abbildung 76). Bei den Proben ohne Antikörper sind „Shifts“ erkennbar (Spuren 9+10). Die unteren beiden Banden sind bei zusätzlicher Verwendung des Anti-VDR-Antikörpers nur noch schwach zu sehen, während der oberste „Shift“ die deutlichste Bande bildet (Spuren 6+7). Beim DMSO-Extrakt ist kein „Shift“ sichtbar (Spur 5).

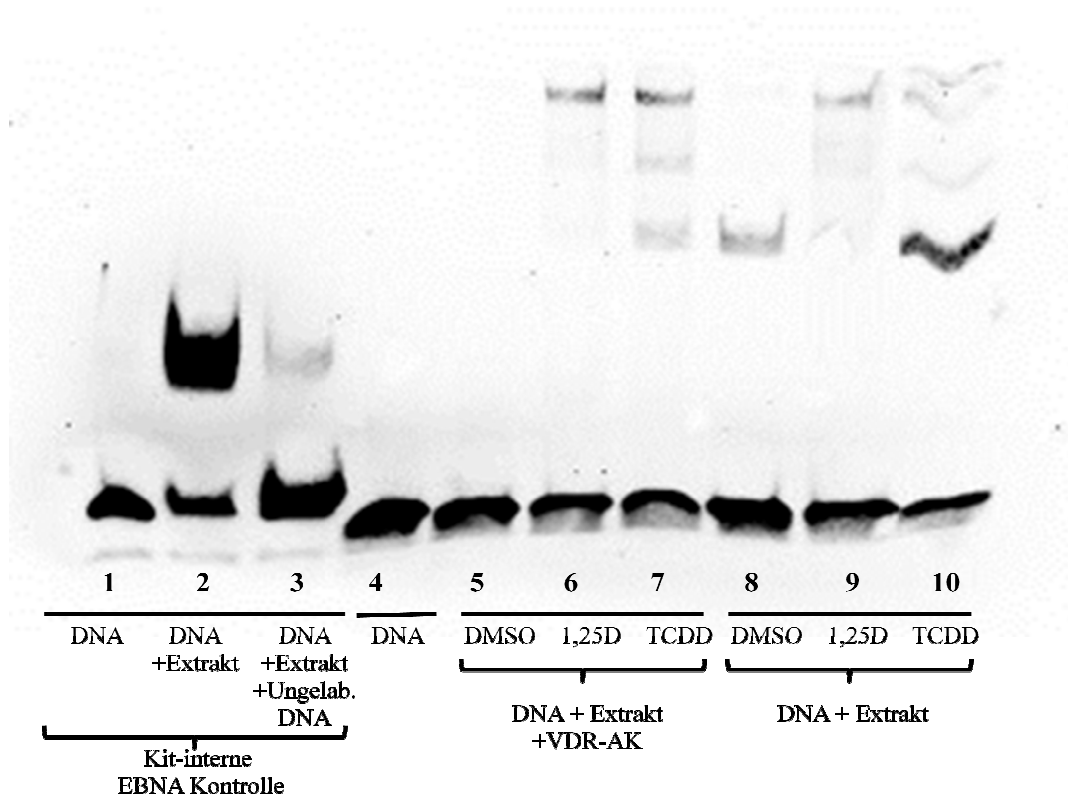


Abbildung 76: EMSA. Bindung des VDR an CYP1A1 Promoter (VDR-Antikörper). Kernextrakte aus HEK-293 Zellen für 48 h behandelt mit DMSO 0,1%, TCDD 1 nM oder Calcitriol 30 nM (1,25D). Mix der Extrakte mit DNA-Region des CYP1A1-Promoters mit und ohne Antikörper gegen VDR.

5.9 HPLC-Analyse myeloider Zellen und deren Überstände

Des Weiteren wurden myeloide Zellen zusammen mit den zugehörigen Mediumüberständen nach Behandlung mit LPS oder Calcitriol auf mögliche Unterschiede mittels UV-HPLC untersucht. Dazu wurden Zellen für 48 h mit Calcitriol (100 nM) bzw. LPS (1 µg/ml) inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen durch Sonifikation, Extraktion der Proteine und Aufkonzentrieren der Probe (Kapitel 4.7.1) erfolgte die HPLC-Analyse (Kapitel 4.7.2). Die Ergebnisse der HPLC-Analysen werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Abbildung 77 zeigt das UV-Chromatogramm unbehandelter myeloider Zellen bei 280 nm über den gesamten gemessenen Zeitbereich von 65 min. Es ist ersichtlich, dass zwei Gruppen von Peaks auftreten. Verbindungen mit einer hohen Polarität und somit einer geringen Retentionszeit bis 10 min in der ersten Gruppe, und in der zweiten Gruppe Verbindungen mit geringerer Polarität, welche zu einem späteren Zeitpunkt um die 20 min von der Säule eluieren. Nach 30 min, was beim verwendeten Gradienten einer Fließmittelzusammensetzung von 44,5 % Acetonitril und 55,5 % Wasser entspricht, sind keine weiteren signifikanten Peaks zu verzeichnen.

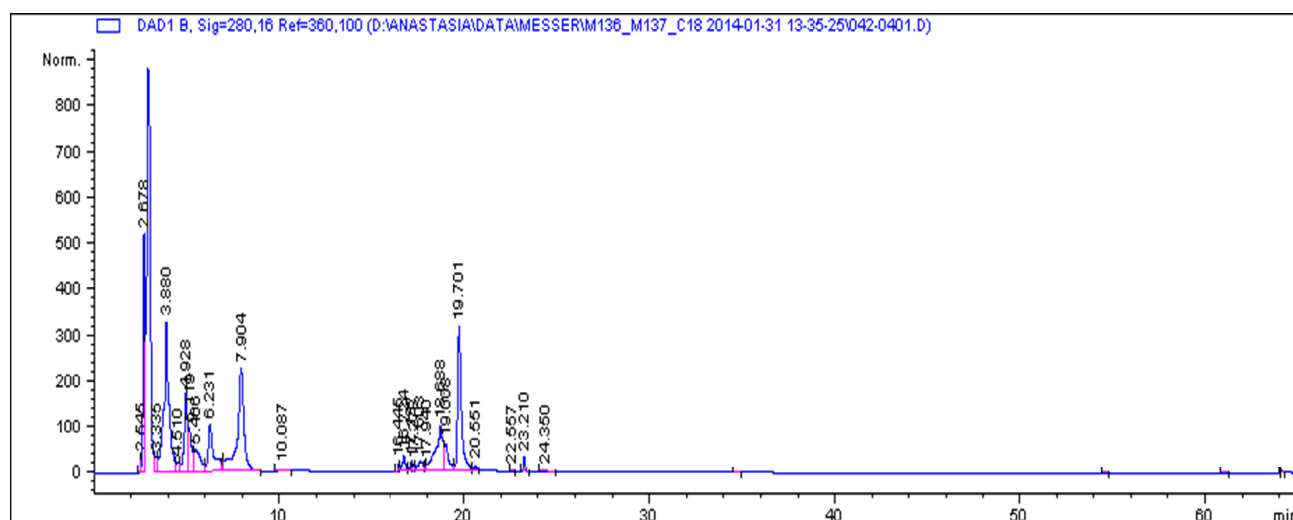


Abbildung 77: UV-Chromatogramm unbehandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberstand. Myeloide murine Zellen, Kulturtag 11. Gesamtchromatogramm, 280 nm.

In der nachfolgenden Abbildung 78 ist ein Ausschnitt des Gesamtchromatogramms von 0 – 25 min bei 280 nm und zugehörige UV-Spektren ausgewählter Peaks dargestellt. Die Zahlen in den UV-Spektren geben die entsprechenden Maxima an.

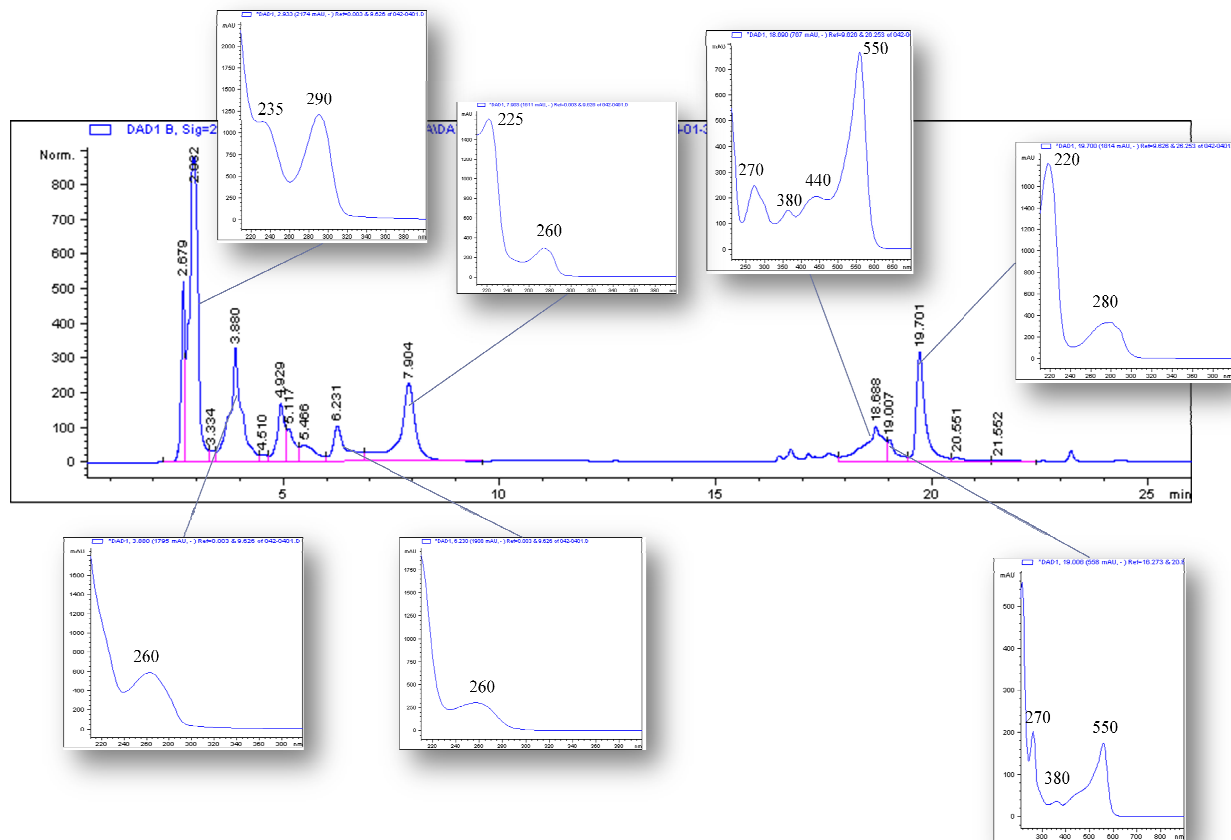


Abbildung 78: UV-Chromatogramm und UV-Spektren unbehandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberstand. Myeloide murine Zellen, Kulturtag 11. Zeitlicher Ausschnitt des Chromatogramms bei 280 nm.

Werden murine myeloide Zellen für 48 h mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben aufbereitet, erhält man nach der HPLC-Analyse der Probe folgendes Chromatogramm bei 280 nm (Abbildung 79). Auch in diesem Fall treten nach 25 min keine signifikanten Peaks auf. Insgesamt erscheint das Chromatogramm dem von unbehandelten Zellen sehr ähnlich. Nach Analyse der UV-Spektren ergeben sich diese bei den entsprechenden Peaks im Vergleich zu denen aus der Probe unbehandelter Zellen ebenfalls als sehr ähnlich (Abbildung 80).

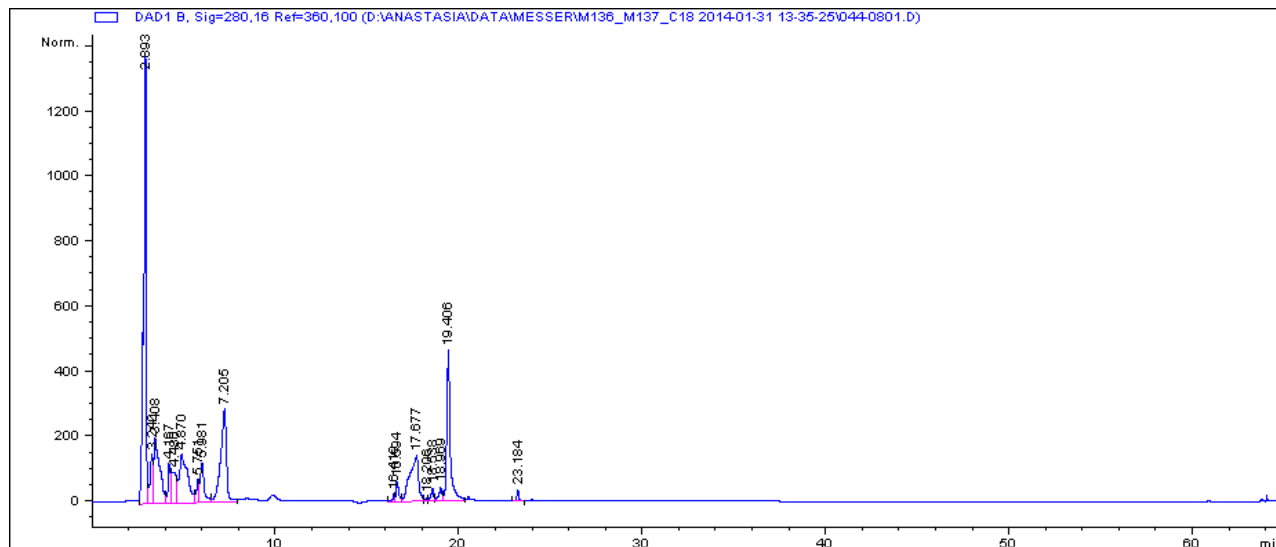


Abbildung 79: UV-Chromatogramm LPS-behandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberstand. 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit LPS (1 µg/ml). Gesamtchromatogramm, 280 nm.

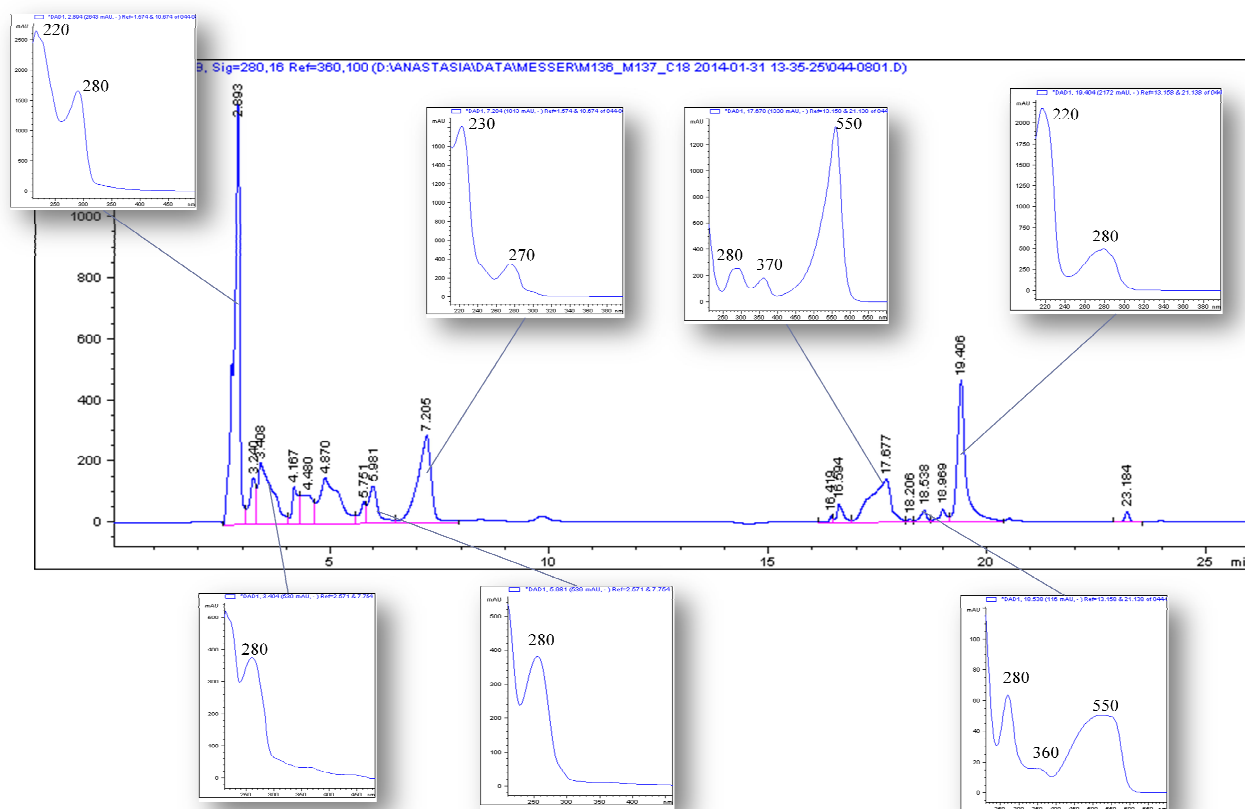


Abbildung 80: UV-Chromatogramm und UV-Spektren LPS-behandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberstände. 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit LPS (1 µg/ml). Zeitlicher Ausschnitt des Chromatogramms bei 280 nm.

Zum besseren Vergleich werden die beiden Chromatogramme (280 nm) in einem Graphen übereinandergelegt (Abbildung 81). Das rote Chromatogramm stellt die unbehandelten Zellen dar, während das blaue Chromatogramm die mit LPS behandelten Zellen repräsentiert. Bis auf eine geringe zeitliche Verschiebung der Peaks, wird die Ähnlichkeit der Proben sichtbar.

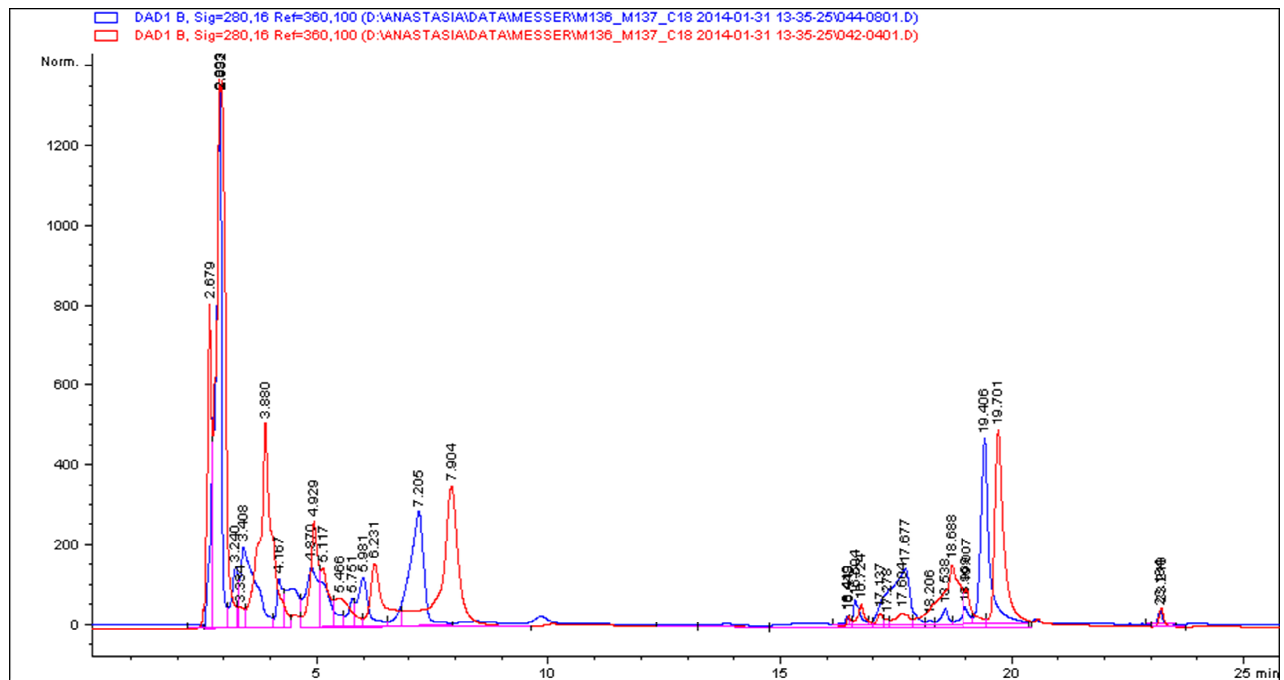


Abbildung 81: Vergleich der UV-Chromatogramme un behandelter (rot) und LPS-behandelter (blau) myeloider Zellen und Mediumüberstände. 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen ohne/ mit LPS (1 µg/ml). Zeitlicher Ausschnitt der Gesamtchromatogramme, 280 nm.

Zur Überprüfung welche Peaks Verbindungen aus dem Kulturmedium zugeordnet werden können, wurde das Kulturmedium (ohne Zellen!) auf die gleiche Weise aufbereitet und mittels HPLC untersucht. Die nachfolgende Abbildung 82 zeigt das sich ergebende Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 280 nm. Es ist ersichtlich, dass hier dieselben Peaks mit ähnlichen Retentionszeiten zwischen 0 und 25 min anzutreffen sind, wie bereits bei vorangegangenen Chromatogrammen un behandelter und LPS-stimulierter Zellen und deren Mediumüberständen. Ebenso gleichen sich die UV-Spektren der entsprechenden Peaks und weisen identische Maxima auf (Abbildung 83).

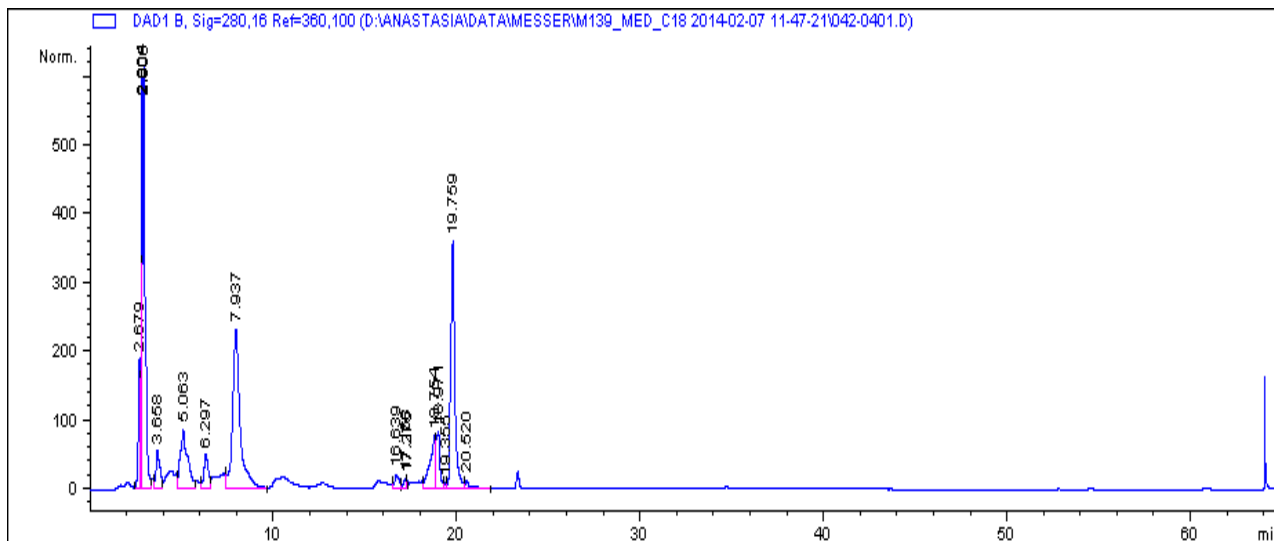


Abbildung 82: UV-Chromatogramm des Kulturmediums. Gesamtchromatogramm, 280 nm.

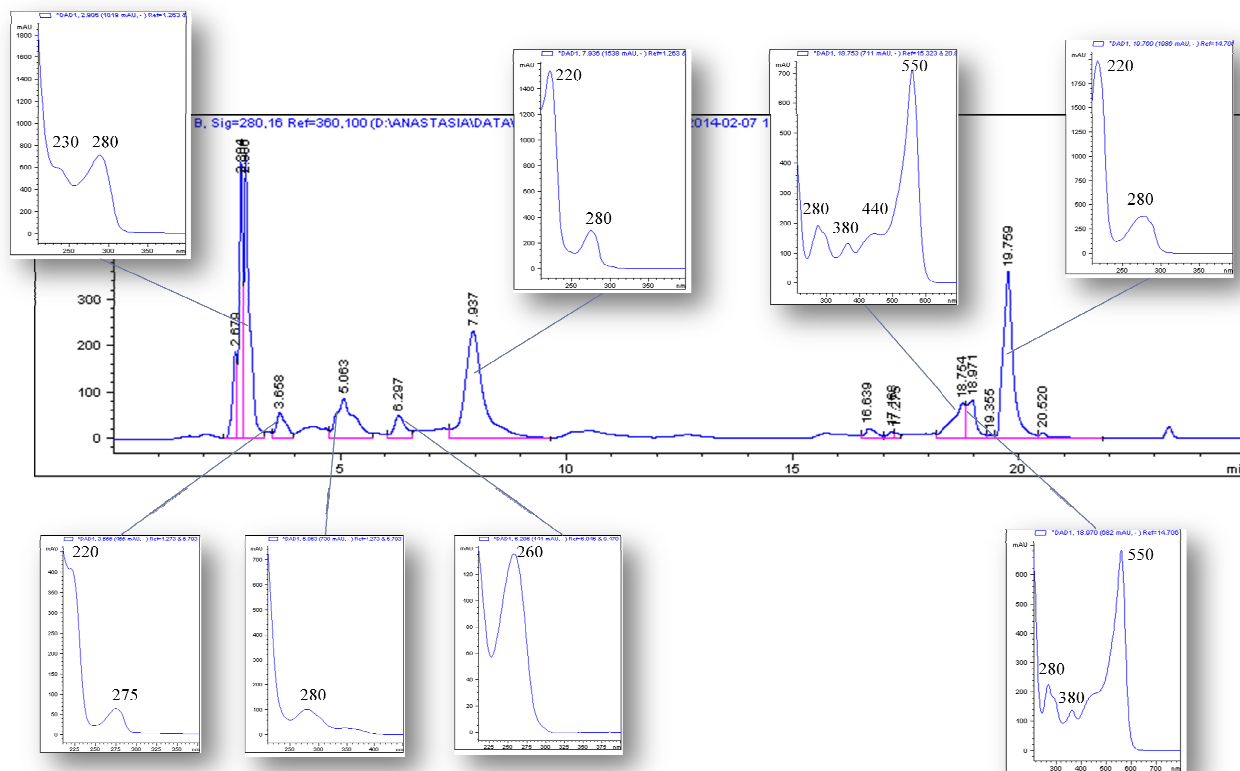


Abbildung 83: UV-Chromatogramm und UV-Spektren des Kulturmediums. Zeitlicher Ausschnitt des Chromatogramms bei 280 nm.

Besonders deutlich wird die Übereinstimmung beim direkten Vergleich der Chromatogramme in einem Diagramm, wie die nächste Abbildung 84 zeigt. Die blaue Spur gehört zum Kulturmedium, während die rote Spur zur Probe LPS-behandelter myeloider Zellen gehört. Beide Proben zeigen sich als fast deckungsgleich, bis auf geringfügige zeitliche Verschiebungen sowie Intensitätsunterschiede.

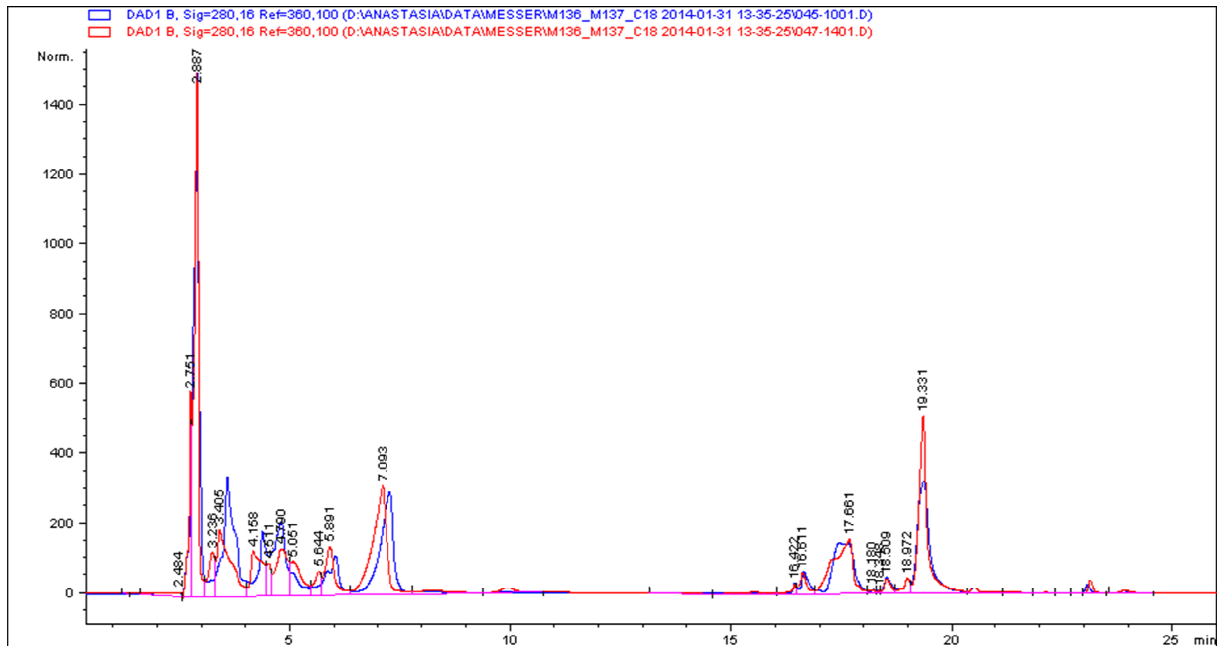


Abbildung 84: Vergleich der UV-Chromatogramme: Kulturmedium (blau) LPS-behandelte myeloide Zellen (rot). 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit LPS (1 µg/ml). Zeitlicher Ausschnitt der Gesamtchromatogramme, 280 nm

Wie anhand Abbildung 85 und Abbildung 86 ersichtlich, können auch nach 48 h-Behandlung myeloider Zellen mit Calcitriol und anschließender chromatographischer Analyse keine signifikanten Unterschiede im UV-Chromatogramm (280 nm) oder in UV-Spektren der Peaks im Vergleich zu unbehandelten Proben festgestellt werden.

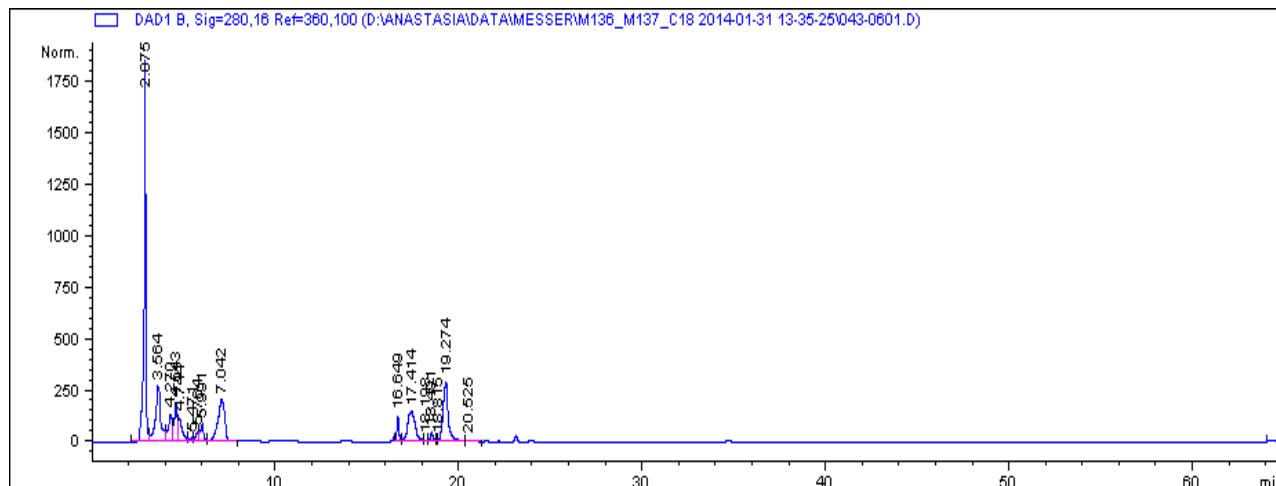


Abbildung 85: UV-Chromatogramm mit Calcitriol (100 nM) behandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberständen. 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (100 nM). Gesamtchromatogramm, 280 nm.

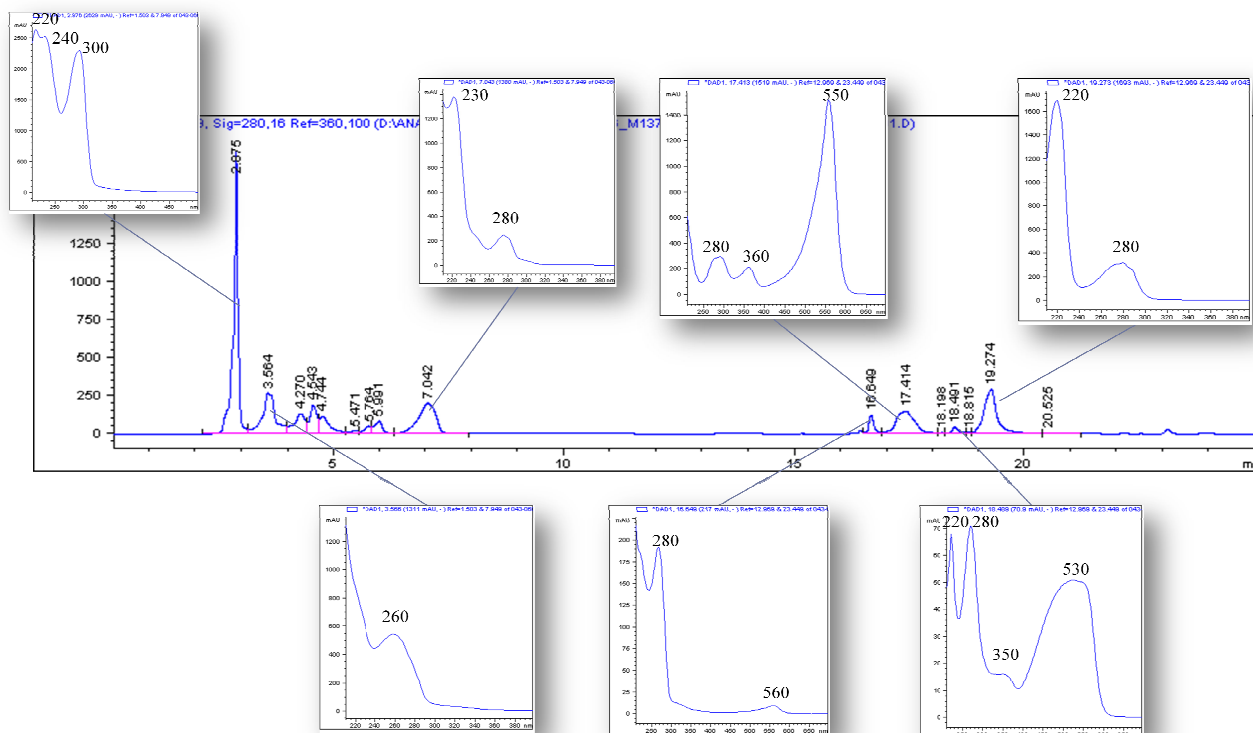


Abbildung 86: UV-Chromatogramm und UV-Spektren myeloider Zellen behandelt mit Calcitriol. 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (100 nM). Zeitlicher Ausschnitt des Chromatogramms bei 280 nm.

Beim direkten Vergleich der Chromatogramme mit Calcitriol behandelter und unbehandelter myeloider Zellen in einer Graphik (Abbildung 87) zeigen sich erneut nur geringfügige Unterschiede in der Retentionszeit sowie Intensität. Ansonsten lassen sich hierbei keine signifikanten Differenzen feststellen.

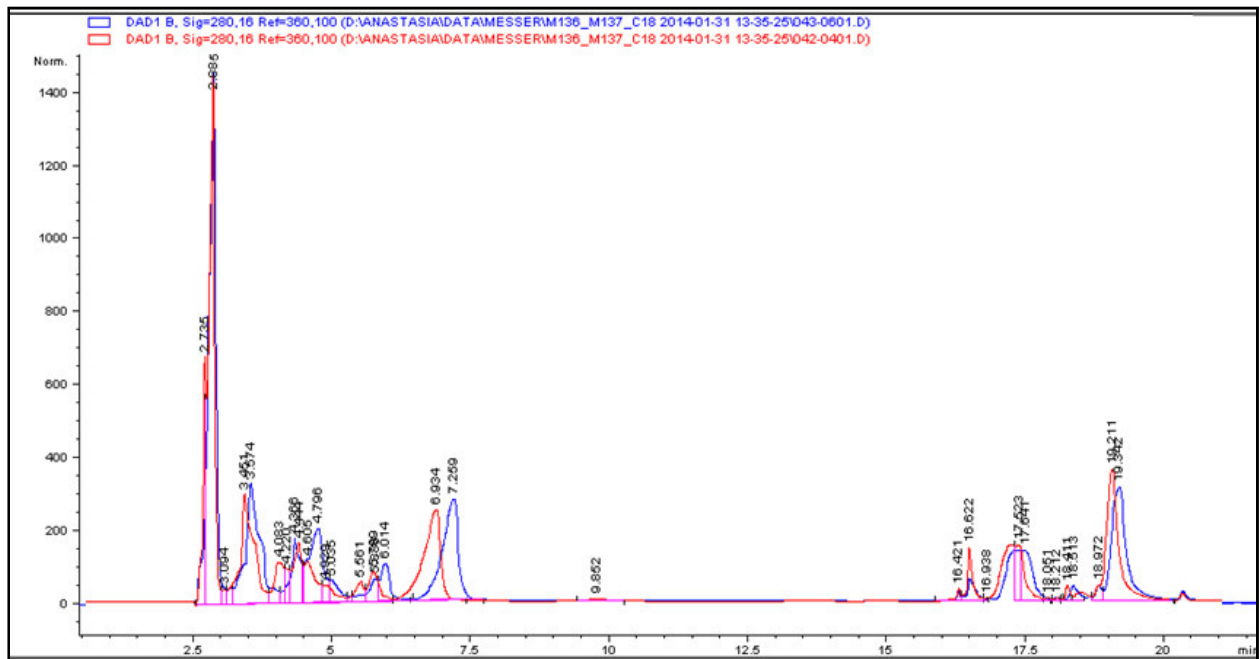


Abbildung 87: Vergleich der UV-Chromatogramme myeloider Zellen DMSO (blau) Calcitriol (rot). 48 h Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (100 nM) bzw. DMSO (0,1 %). Zeitlicher Ausschnitt der Gesamtchromatogramme, 280 nm.

Zusätzlich wurde Calcitriol als Reinsubstanz bei gleichen Bedingungen mittels HPLC untersucht. Wie anhand der nachstehenden Abbildung festgestellt werden kann, zeigt Calcitriol seinen lipophilen Charakter durch ein spätes Auftreten im Chromatogramm bei den verwendeten Bedingungen, mit einer Retentionszeit von 47,9 min und einem relativ unspezifischen UV-Spektrum mit zwei Maxima bei 220 nm und 280 nm (Abbildung 88).

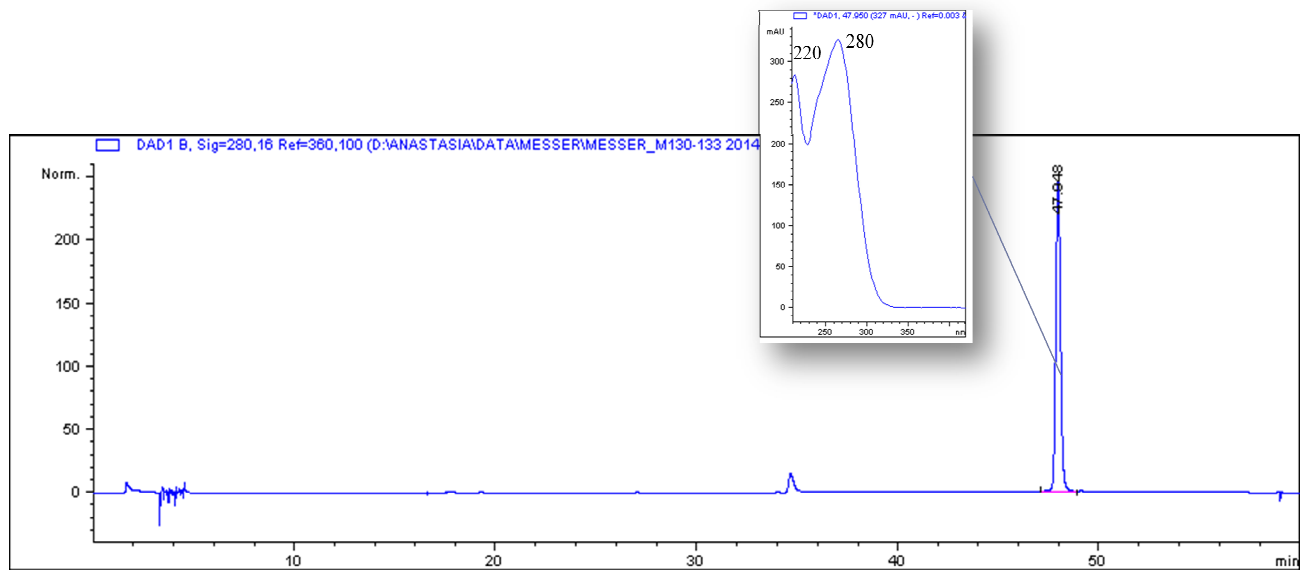


Abbildung 88: UV-Chromatogramm und UV-Spektrum von Calcitriol (100 µM), 280 nm.

Nach Behandlung myeloider Zellen mit Calcitriol und anschließender chromatographischer Analyse von Mediumüberständen und Zellen konnte bei einer Retentionszeit um 50 min kein Peak detektiert werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass in diesen Proben myeloider Zellen und deren Überständen unter verwendeten Bedingungen kein Calcitriol nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 85).

DISKUSSION

Unser Immunsystem leistet unglaubliche Arbeit, um unseren Organismus vor Angreifern wie Bakterien, Viren und anderen Parasiten zu schützen und dies geschieht meistens, ohne dass wir Notiz davon nehmen. Dazu bedient sich das Immunsystem eines komplexen Netzwerks von Proteinen und spezialisierten Zellen, die im gesamten Organismus zirkulieren, Pathogene erkennen und umgehend reagieren, um diese zu eliminieren. (Schütt, 2006; Rink, 2012). Unter Laborbedingungen können unterschiedliche Zellen des Immunsystems – wie Lymphozyten, dendritische Zellen oder Makrophagen – *ex vivo* bzw. *in vitro* z.B. aus peripherem Blut, Knochenmark, Lungengewebe etc. isoliert und kultiviert werden (Lutz *et al.* 1999; Marim *et al.* 2010; Bi *et al.* 2014). So lassen sich die Wirkungen und Effekte verschiedener Substanzen auf das Immunsystem auf zellulärer Ebene gezielt untersuchen.

Aktuelle Studien zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) in fast allen Zelltypen des Immunsystems vorkommt und dort eine wichtige Rolle spielt. Dies zeigt sich besonders deutlich in der starken Immunsuppression nach Exposition mit Dioxinen oder in einer gestörten Immunfunktion nach genetischer Ausschaltung des Ah-Rezeptors (Holsapple *et al.* 1991; Vogel *et al.* 1997; Teske *et al.* 2005; Frericks *et al.* 2006; Stockinger *et al.* 2011; Hao *et al.* 2013; Stockinger *et al.* 2014). Die Wechselwirkung zwischen Immunzellen und Zellen anderer Gewebe im Hinblick auf den Ah-Rezeptor-Signalweg ist jedoch bislang kaum untersucht worden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus dem Knochenmark adulter männlicher C57BL/6 Mäuse isoliert, mit Hilfe des Wachstumsfaktors GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) ausdifferenziert und zur Charakterisierung durchflusszytometrisch analysiert. Mittels des Endotoxins LPS wurden die Zellen hinsichtlich einer Abwehr-

reaktion stimuliert. Mediumüberstände sowohl stimulierter als auch nicht stimulierter Zellen wurden auf Zytotoxizität und ihr Vermögen der AhR-vermittelten CYP1A1-Regulation auf Enzym- und mRNA-Ebene in Hepatomzellen untersucht. Weiterhin wurden die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α , welche insbesondere bei einer Inflammation eine Rolle spielen, im Mediumüberstand stimulierter myeloider Zellen quantifiziert und deren Einfluss auf CYP1A1-Aktivität analysiert, um eine mögliche Rolle und Interaktion des Immunsystems im Rahmen des AhR-Signalweges zu untersuchen.

Ferner wurde die Wirkung des prominentesten und wahrscheinlich potentesten exogenen AhR-Liganden 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), sowie des biologisch aktiven Vitamin-D-Metaboliten und physiologischen VDR-Liganden 1,25(OH)₂-Vitamin-D₃ (Calcitriol, 1,25(OH)₂D) auf murine myeloide Zellen untersucht. Hierbei waren die Effekte der beiden Substanzen auf die Haupt-Targetgene der AhR- und VDR-Signalwege – *Cyp1a1* sowie *Cyp24a1* – von besonderem Interesse, um eventuelle Anhaltspunkte für einen Crosstalk der beiden Rezeptoren zu erhalten.

6.1 Charakterisierung myeloider Zellen

Das Knochenmark beinhaltet pluripotente Stammzellen, welche sich auf Grund ihres hohen Differenzierungspotenzials besonders gut für Generierung und funktionale Untersuchungen verschiedener Immunzellen wie Granulozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen eignen. Zahlreiche unterschiedliche Methoden zur *ex vivo* / *in vitro* Generierung und Kultivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen aus murinen Knochenmarkzellen sind in der Literatur beschrieben – mit und ohne Zusatz von Serum, Interleukinen (z.B. IL-4), Antibiotika usw. – allen gemein ist dabei die Verwendung des als Zytokin wirkenden Glykoproteins „Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“, kurz GM-CSF (Inaba *et al.* 1992, Lutz *et al.* 1999; Warncke *et al.* 2006; Eske *et al.* 2009; Marim *et al.* 2010; Depke *et al.* 2014).

Mit Hilfe des GM-CSF ist jedoch die selektive Generierung einer einzigen Zellsorte nicht möglich. Bei gleichen Kultivierungsbedingungen ist die simultane Entwicklung verschiedener Zellpopulationen – darunter Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen – beschrieben (Inaba *et al.* 1992; Lutz *et al.* 1999; Marim *et al.* 2010). Dabei ist es wichtig zu wissen, um welche Zellarten es sich hierbei handelt und daher die Zellen entsprechend zu charakterisieren. Erste Informationen liefert die mikroskopische Beobachtung. In der vorliegenden Arbeit wurden murine Knochenmarkzellen für zwölf Tage kultiviert. Während dieser Kultivierungsperiode konnten verschiedene Formen der Zellen beobachtet werden. Zu Beginn der Kultur lagen alle Zellen in Suspension vor und unterschieden sich mikroskopisch lediglich durch ihre

unterschiedliche Größe. Nach zwei bis drei Tagen begannen die Zellen zu adhären, wobei die Zahl adhärenter Zellen während der Kulturdauer stetig anstieg (vgl. Kapitel 5.1.3). Am zwölften Kulturtag beinhalteten die Kulturschalen vorwiegend adhärente Zellen, deren Anteil fast das 10-fache betrug verglichen mit dem dritten Kulturtag. Des Weiteren waren insbesondere zu Beginn der Kultur auch kleine, runde, nicht-adhärente Zellen – sowohl einzeln als auch in Clustern – zu beobachten, deren Zahl reduzierte sich jedoch während der fortschreitenden Kultivierungsdauer.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen in der Literatur. So beschrieben Lutz *et al.* ebenfalls drei Zellarten bei Kultivierung muriner Knochenmarkzellen in Gegenwart von GM-CSF. Die eher zu Beginn der Kultur auftretenden Cluster stellen Granulozyten dar. Zum späteren Zeitpunkt der Kultivierung wurden nur zwei Populationen beschrieben – adhärente und nicht-adhärente Zellen (Lutz *et al.* 1999). Es gibt zahlreiche Publikationen, die vorschlagen, dass es sich bei den nicht-adhären Zellen um dendritische Zellen handelt. Diese Annahme basiert auf Untersuchungen, dass diese Zellen die charakteristischen Oberflächenmarker CD80 und CD86 tragen, zur Aufnahme von Antigenen fähig sind und in der „*Mixed Lymphocyte Reaction*“ (MLR) eine Aktivierung von T-Zellen zeigten (Lutz *et al.* 1999, Li *et al.* 2010).

Bezüglich der stark adhären Population, unter den mit GM-CSF kultivierten Knochenmarkzellen, divergieren die publizierten Daten hinsichtlich ihrer Zuordnung. Einige, insbesondere ältere Publikationen beschreiben die adhären Zellen als Makrophagen (*Bone Marrow Derived Macrophages*, BMDM), da diese Zellen in MLR-Untersuchungen keine Aktivität zeigten und eine hohe Expression des charakteristischen Makrophagen-Oberflächenmarkers F4/80 aufwiesen (Inaba *et al.* 1992; Lutz *et al.* 1999; Eske *et al.* 2009; Marim *et al.* 2010). Andere Arbeitsgruppen dokumentierten hingegen, dass die adhären Zellpopulation ebenso Eigenschaften dendritischer Zellen aufwies. Die Gruppe um Siegemund *et al.* zeigte, dass die adhären Zellpopulation kultivierter muriner Knochenmarkzellen auch die charakteristischen Oberflächenmarker dendritischer Zellen „CD11c“ trug, während die Makrophagen-Marker F4/80 nicht nachweisbar waren (Siegemund *et al.* 2008). Diese Ergebnisse wurden von Li *et al.* untermauert, auch hier wurden die charakteristischen Oberflächenmarker dendritischer Zellen – CD11c, CD86 und MHC II – in adhären Zellen nachgewiesen (Li *et al.* 2010).

Eigene Untersuchungen (im Rahmen der Masterarbeit von Verena Ziegler, TU Kaiserslautern, Masterstudiengang Toxikologie, AG Prof. Dr. Dr. Schrenk, März 2013) sollten Aufschluss über die Einordnung der adhären Zellpopulation muriner Knochenmarkzellen geben. Dazu wurden adhären Zellen am elften Kulturtag mit und ohne 48-stündige LPS-Stimulation mit eiskaltem PBS durch Abspülen vom Boden der Kulturschale gelöst. Auf enzymatische Ablö-

sung des Zellrasens durch Trypsin oder Accutase sowie Abschaben wurde hierbei verzichtet, um die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen für nachfolgende durchflusszytometrische Analysen möglichst unversehrt zu lassen und den Anteil an Zelltrümmern möglichst niedrig zu halten. Auch Zhang *et al.* konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass eine enzymatische Ablösung adhärenter Zellen zum Verlust von Oberflächenrezeptoren führen kann (Zhang *et al.* 2012b). Zur Untersuchung, ob die in Gegenwart von GM-CSF kultivierten murinen Knochenmarkzellen den Charakter von Makrophagen oder von dendritischen Zellen aufweisen, wurden drei verschiedene Antikörper verwendet: CD11c als spezifischer Marker für dendritische Zellen, F4/80 als spezifischer Marker für Makrophagen und MHC II als Marker für Antigen-präsentierende Zellen, welcher sowohl von Makrophagen als auch von dendritischen Zellen exprimiert wird.

Ohne LPS-Stimulation war nach einer Kultivierungsdauer von neun bzw. elf Tagen rund die Hälfte (53,8 % bzw. 45,8 %) adhärenter Zellen CD11c positiv und wies somit den Charakter dendritischer Zellen auf. Dieser Wert sank statistisch höchst signifikant auf 22,3 %, wenn Zellen für 48 Stunden mit 1 µg/ml LPS behandelt wurden. In der Literatur finden sich höhere Anteile CD11c positiver Zellen innerhalb der adhärenen Zellpopulation muriner Knochenmarkzellen nach einem vergleichbaren Kultivierungszeitraum. Li *et al.* konnten zeigen, dass am zehnten Kulturtag 83,8 % der adhärenen myeloiden Zellen CD11c positiv sind (Li *et al.* 2010). Singh-Jasuja *et al.* beobachteten einen starken Rückgang CD11c-positiver Zellen durch Stimulation mit 1 µg/ml LPS (Singh-Jasuja *et al.* 2013). Diese Runterregulation des Oberflächen-Antigens CD11c verläuft dabei jedoch nicht auf mRNA-Ebene und korreliert mit einem steigenden intrazellulären CD11c-Gehalt, weshalb die Autoren vermuten, dass das Membran-gebundene CD11c nach Aktivierung mit LPS von der Oberfläche ins Zytosol internalisiert (Singh-Jasuja *et al.* 2013).

Das Oberflächen-Antigen F4/80, welches charakteristisch für Makrophagen ist, änderte sich hingegen unabhängig von LPS-Stimulation myeloider Zellen und sank von Tag 9. auf Tag 11. der Kultur statistisch höchst signifikant von rund 44 % auf 22 %. Dies lässt vermuten, dass bei den adhärenen Zellen während der Kultivierung zeitabhängig ein Verlust des Makrophagen-Charakters stattfindet. Die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC II auf der Oberfläche der Zellen blieb im Zeitraum zwischen dem neunten und elften Kulturtag, unabhängig von einer LPS-Stimulation, relativ konstant bei 80-85 % und unterstreicht den Charakter Antigen-präsentierender Zellen. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Gruppe Li *et al.*, die am zehnten Kulturtag bei adhärenen myeloiden Zellen einen Anteil von 89 % als MHC II-positiv feststellten (Li *et al.* 2010). Eine Doppelmarkierung der Zellen mit CD11c und MHC II bzw. F4/80 und MHC II lieferte keinen Beitrag zur genaueren Charakterisierung

der adhärennten Zellpopulation. Die prozentuale Verteilung schwankte stark zwischen 10-20 % und lässt keine konkrete Aussage zu.

Insgesamt kann man sagen, dass die Annahme bisheriger Publikationen (Inaba *et al.* 1992, Lutz *et al.* 1999, Marim *et al.* 2010), es handle sich bei adhärennten Zellen um Makrophagen, nicht bestätigt werden konnte. Anhand der vorliegenden Daten, muss man die adhärennten Zellen viel mehr als eine Mischpopulation betrachten, die sowohl den Charakter von CD11c⁺ dendritischen Zellen als auch von F4/80⁺ Makrophagen, aber vermutlich auch anderer Zellarten, aufweisen. Genauere Aussagen ließen sich durch Verwendung weiterer Marker treffen, da auch eine unzureichende Spezifität der eingesetzten Antikörper nicht ausgeschlossen werden kann. Weitere Informationen könnten auch erhalten werden, wenn die Zellen beispielsweise mit Hilfe eines Zellsorters getrennt und weiter untersucht würden.

6.2 Einfluss von Mediumüberständen myeloider Zellen auf Hepatomzellen

6.2.1 Zellvitalität

Es ist bekannt, dass das Immunsystem bei einer Infektion u.a. mit Ausschüttung zytotoxischer Substanzen (Zytokine und Interferone) reagiert. Diese Reaktion ist wichtig, da dadurch infizierte oder krankhaft veränderte Zellen kontrolliert eliminiert werden können, z.B. durch Einleiten der Apoptose (Schütt, 2006). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit murine myeloide Zellen nach einem 10-tägigen Differenzierungszeitraum in Gegenwart von GM-CSF für 48 h mit dem Endotoxin gramnegativer Bakterien, Lipopolysaccharid (LPS, 0; 1 und 2 µg/ml) stimuliert, um so eine Abwehrreaktion hervorzurufen. Anschließend wurden Mediumüberstände stimulierter Zellen gesammelt und zunächst auf ihre Wirkung hinsichtlich der Zellvitalität in drei Hepatomzelllinien mittels des Resazurinreduktionstests untersucht. Während Überstände unstimulierter myeloider Zellen keine Auswirkungen auf die Vitalität der Hepatomzellen zeigten, konnte durch Behandlung mit LPS-stimulierten Mediumüberständen in drei analysierten Zelllinien Hepa-1 (Maus), H4IIE (Ratte) und HepG2 (Mensch) ein statistisch hoch signifikanter Rückgang der Vitalität beobachtet werden. Zwischen den drei Spezies zeigten sich jedoch Unterschiede. Die Rattenhepatomzelllinie H4IIE erwies sich als die empfindlichste. Hier sank die relative Vitalität bei 48 h-Inkubation mit unverdünnten LPS-Mediumüberständen (2 µg/ml) auf unter 50 % bzw. auf rund 57 % bei Mediumüberständen nach 1 µg/ml LPS-Stimulation. Im Vergleich dazu waren die Maushepatomzelllinie Hepa-1 und humane Hepatomzellen HepG2 weniger empfindlich und zeigten beide eine Zellvitalität

in einem ähnlichen Bereich von durchschnittlich 70-75 % nach 48 h-Behandlung mit unverdünnten LPS-stimulierten Überständen (1 und 2 µg/ml LPS). Insgesamt unterliegen die Daten relativ hohen Schwankungen. Dies könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Tiere zurückgeführt werden, aus denen die myeloiden Zellen isoliert wurden. Der Zustand von Gesundheit, Immunsystem oder Stress kann von Tier zu Tier stark differieren, was sich auch auf die Eigenschaften von Knochenmarkzellen auswirken kann.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Reduktion der Vitalität nicht von LPS selbst herrührt, wurde das Endotoxin in den Konzentrationen 1 und 2 µg/ml getestet. Dabei zeigte sich bei H4IIE und Hepa-1 eine leichte Verringerung der relativen Zellvitalität durch LPS, während in HepG2 kein Effekt beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 32). Nicht nur der geringere zytotoxische Einfluss von Mediumüberständen und LPS auf humane Hepatomzellen, sondern auch eine höhere Induzierbarkeit der CYP1A1-Aktivität (siehe Kapitel 6.2.2) machte die Zelllinie HepG2, verglichen mit den Hepatomzellen anderer Spezies, zu einem geeigneteren Modell für weiterführende Untersuchungen. Der Unterschied der Spezies sollte hierbei jedoch nicht vernachlässigt werden. Zusätzliche Analysen mit Überständen dendritischer Zellen humanen Ursprungs und deren Einfluss auf HepG2, um den Effekt nur einer Spezies zu analysieren, wäre in diesem Zusammenhang hilfreich.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass der festgestellte Effekt reduzierter Vitalität in Hepatomzellen nur von Mediumüberständen ausdifferenzierter und LPS-stimulierter Knochenmarkzellen herrührt. Denn wurden murine Knochenmarkzellen direkt nach ihrer Isolierung für 48 h mit LPS behandelt und Mediumüberstände gewonnen, hatten diese keine Auswirkungen auf die Vitalität humaner Hepatomzellen. Diese Befunde legen nahe, dass ausdifferenzierte myeloide Immunzellen (Makrophagen / dendritische Zellen) durch Aktivierung mit Lipopolysacchariden, Substanzen sezernieren, welche die Vitalität von Hepatomzellen vermindern. Hinsichtlich der Wirkung von Mediumüberständen stimulierter, primärer Immunzellen auf die Vitalität gibt es nur wenige vergleichbare Untersuchungen in der Literatur. So hatten beispielsweise Mediumüberstände LPS-stimulierter Makrophagen-Zelllinien keinen Effekt auf die Vitalität muriner Hepatomzellen (Paton *et al.* 1998; Jeong *et al.* 2001). Interessanterweise hatten Mediumüberstände stimulierter myeloider Zellen keine Auswirkungen auf die Vitalität von primären Rattenhepatozyten (Anhang, Abbildung 96). Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass primäre Hepatozyten im Gegensatz zu Hepatomzelllinien nicht proliferieren. So könnten die sezernierten Substanzen eventuell in den Zellzyklus eingreifen und so eine eher zytostatische als eine zytotoxische oder zytolytische Wirkung haben. Anhand des verwendeten Resazurinreduktionstests kann hierbei zwischen einer zytotoxischen und zytostatischen Wirkung nicht unterschieden werden. Deshalb sind weitere Unter-

suchungen notwendig, um bezüglich des beobachteten Effekts auf die Vitalität in Hepatomzellen eine genauere Aussage treffen zu können.

In zahlreichen Publikationen wird die Sekretion von verschiedenen Zytokinen durch Immunzellen beschrieben und mit zytotoxischen Eigenschaften gegenüber anderen Zellen *in vitro* wie z.B. Oligodendrozyten oder Hepatozyten in Verbindung gebracht. Unter den sezernierten Substanzen befinden sich TNF- α , diverse Interleukine sowie andere Proteine wie z.B. Interferon- γ oder macrophage inflammatory protein α/β (MIP α/β) (Price *et al.* 1999; Jones *et al.* 2000; Jurewicz *et al.* 2005; Miller *et al.* 2013; Tatro *et al.* 2014). Einige Zytokine scheinen sogar vielversprechende Wirkstoffe bei der Behandlung von Krebs zu sein. In aktuellen Studien wird der Einsatz von Zytokinen, insbesondere IL-2 und IFN- γ , bei verschiedenen Krebsarten untersucht (Lode *et al.* 1998; Johnson *et al.* 2008; Ronca *et al.* 2009). Um den in der vorliegenden Arbeit beobachteten, vitalitätsreduzierenden Effekt der Mediumüberstände LPS-stimulierter muriner myeloider Zellen weiter zu untersuchen, wurden die inflammatorischen Zytokine – IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α – in Mediumüberständen myeloider Zellen mittels ELISA quantifiziert. Ohne LPS-Stimulation waren die Gehalte der genannten Zytokine im Medium ausdifferenzierter myeloider Zellen nur gering. Die Interleukine IL-1 α , IL-1 β und IL-6 lagen mit durchschnittlich 5-7 pg/ml im gleichen Bereich. Den größten Gehalt wies hierbei mit durchschnittlich 117 pg/ml das Zytokin TNF- α auf (Tabelle 39). Ganz anders sahen die Gehalte der Zytokine im Medium aus, wenn die Zellen für 48 h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert wurden. Bei jedem der vier Zytokine stieg die Konzentration statistisch höchst signifikant an. Den geringsten Gehalt nach LPS-Behandlung wies mit durchschnittlich 434 pg/ml IL-1 β auf, gefolgt von IL-1 α und TNF- α mit 2661 pg/ml und 4066 pg/ml. Der höchste Gehalt ist mit 6290 pg/ml bei IL-6 zu verzeichnen. Dies entspricht einer über 1000-fachen Steigerung verglichen mit dem Gehalt ohne eine LPS-Behandlung (Tabelle 39).

Tabelle 39: Zytokin-Gehalte in Mediumüberständen muriner myeloider Zellen mit und ohne 48 h LPS-Stimulation, n \geq 3.

Zytokin	Gehalt [pg/ml]	
	Ohne LPS-Stimulation	Mit LPS-Stimulation (1 $\mu\text{g/ml}$)
IL-1α	4,9 \pm 1,3	2661 \pm 175
IL-6	6,1 \pm 1,2	6290 \pm 198
IL-1β	7,1 \pm 4,2	434 \pm 129
TNF-α	117,5 \pm 20,5	4066 \pm 377

Ähnliche Ergebnisse finden sich auch in der Literatur. So ermittelten Xu *et al.* in Mediumüberständen der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 ohne LPS-Stimulation nur geringe Gehalte an IL-1 β , IL-6 und TNF- α , wobei TNF- α mit ca. 200 pg/ml auch hier das Zytokin mit der höchsten Konzentration darstellt. Nach 24 h-Inkubation mit 1 μ g/ml LPS stiegen die Gehalte signifikant an und ergaben für IL-1 β ca. 500 pg/ml, für IL-6 ca. 1800 pg/ml und die höchste Konzentration für TNF- α mit ca. 3500 pg/ml (Xu *et al.* 2014). Für IL-1 α fanden Carmi *et al.* in Mediumüberständen muriner peritonealer Makrophagen ohne eine Aktivierung einen Gehalt von 91 pg/ml. Nach 24 h Behandlung mit 1 μ g/ml LPS stieg der IL-1 α -Gehalt auf durchschnittlich 310 pg/ml (Carmi *et al.* 2009). Andere Autoren berichten auch von erhöhter Zytokin-Ausschüttung durch LPS-Stimulation dendritischer Zellen (Verhasselt *et al.* 1997; Labeur *et al.* 1999). Nach 24 h-Behandlung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark mit LPS werden Konzentrationen von 1000 pg/ml für IL-1 β und 1800 pg/ml für TNF- α detektiert (Labeur *et al.* 1999). Insgesamt weisen Zytokin-Gehalte anderer Forschungsgruppen jedoch überwiegend eine deutlich niedrigere Konzentration auf, verglichen mit den Gehalten der vorliegenden Arbeit. Dies ist möglicherweise auf die kürzere Dauer der LPS-Behandlung zurückzuführen. Die LPS-vermittelte Zytokin-Ausschüttung in Immunzellen erfolgt über einen Toll-like-Rezeptor-abhängigen Signalweg (Kaisho *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2003; Shi *et al.* 2006). Dieser ist in der nachfolgenden Abbildung 89 schematisch dargestellt.

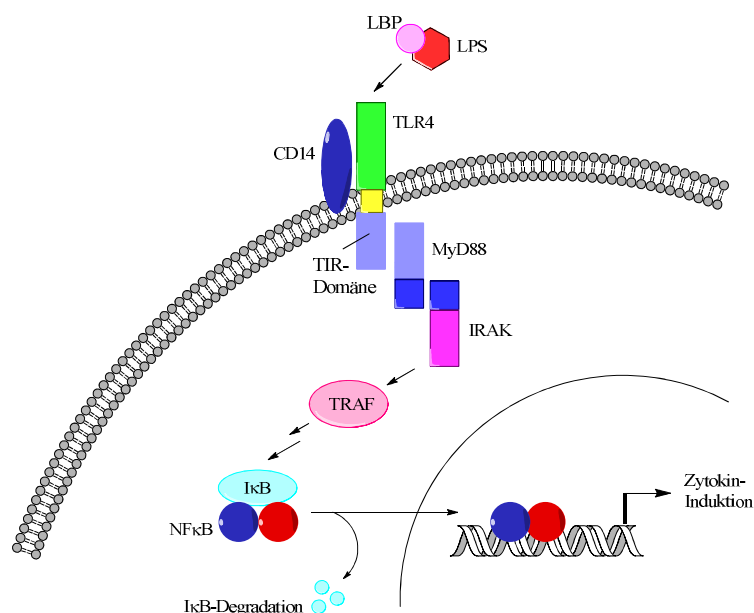


Abbildung 89: TLR-abhängige, LPS-vermittelte Zytokin-Induktion in Immunzellen(schematisch) (nach Kaisho *et al.* 2001). IκB=Inhibitor of kappa B; IRAK=IL-1-receptor-associated kinase; LBP= LPS binding protein; LPS=Lipopolysaccharide; NFκB=Nuclear Factor kappa B; TIR=Toll/IL-1 Receptor; TLR4=Toll-like-Receptor 4; TRAF=Tumor necrosis factor receptor- associated factor.

Das Endotoxin LPS interagiert mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) und bindet dann an den Toll-like-Rezeptor auf der Zellmembran. Es kommt zur Aktivierung des myeloid differentiation factor MyD88. Dies setzt eine Signalkaskade in Gang, durch welche über mehrere Schritte der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert wird und letztendlich zur Expression proinflammatorischer Zytokine führt (Aderem *et al.* 2000; Kaisho *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2003; Shi *et al.* 2006). Bei LPS-Behandlung wird als erstes TNF- α produziert. Dieses stimuliert die weitere Produktion von sich selbst sowie von IL-1. TNF- α und IL-1 stimulieren dann zusammen die Freisetzung von IL-6 und weiteren Zytokinen (Morgan, 1997).

Nach Quantifizierung der vier Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α in Mediumüberständen myeloider Zellen, wurden rekombinante Zytokine in den ermittelten Konzentrationen sowie den Verdünnungen 1:10, 1:5 und 1:2 für 48 h in HepG2-Zellen hinsichtlich der Vitalität getestet. IL-6 und TNF- α hatten nach 48 h keinen Einfluss auf die Vitalität von HepG2. IL-1 α zeigte einen geringen Effekt auf die Vitalität. Diese lag relativ konstant um 90 % und wies keine Konzentrationsabhängigkeit auf. Lediglich IL-1 β zeigte in der humanen Hepatomzelllinie nach 48 h Inkubation eine leichte, konzentrationsabhängige Reduktion der Vitalität. In der höchsten Konzentration des IL-1 β von 450 pg/ml betrug die Vitalität $89,5 \pm 4,6$ %. Der Effekt fällt dabei etwas schwächer aus als bei 48-stündigen Inkubation mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen ($75,3 \pm 10,2$ %). Auch nach 48 h-Co-Inkubation von HepG2 mit allen vier Zytokinen als Mischung sank die Vitalität der humanen Hepatomzellen in den höchsten verwendeten Konzentrationen nur geringfügig auf $94,2 \pm 3,0$ %. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der beobachtete Rückgang der Vitalität in HepG2 nach Behandlung mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen nur zu einem geringen Teil auf den Zytokinen IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α basiert.

Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass in zahlreichen Studien vor allem TNF- α mit Hepatotoxizität in Verbindung gebracht wird. Durch Bindung des TNF- α an den TNF-Rezeptor wird dessen „Todes-Domäne“ aktiviert und eine Signalkaskade ausgelöst, die in einigen Zwischenschritten zur Aktivierung von Fas und Caspase 8 und letztendlich zum Zelltod (Apoptose) führt (Bradham *et al.* 1998; Jones *et al.* 2000; Ding *et al.* 2004). HepG2 hingegen sind resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von TNF- α , da HepG2 endogenes und exogenes Alpha-Fetoprotein (AFP) besitzen, welches protektiv gegenüber TNF- α wirkt (Semenkova *et al.* 1997). Dies würde den ausbleibenden Effekt des TNF- α auf die Vitalität der humanen Hepatomzelllinie erklären. Man darf aber auch nicht vernachlässigen, dass es sich bei den getesteten Zytokinen um murine Proteine handelt, während HepG2 eine humane Zelllinie ist, sodass die Wirkungen unterschiedlich ausfallen können. Beispielsweise liegt das humane TNF- α im Gegensatz zum TNF- α im Nager nicht glykosyliert vor (Olszewski *et al.* 2007).

Über eine direkte negative Wirkung des IL-1 auf die Vitalität von Hepatozyten gibt die Literatur nur wenig bzw. keinen Aufschluss. Es ist aber belegt, dass IL-1 α in der Leber prokarzinogen wirkt: nekrotische, murine aber auch humane Hepatozyten setzen hohe Mengen des proinflammatorischen Zytokins IL-1 α frei, welches wiederum Kupffer'sche Zellen (Makrophagen des Lebergewebes) zur Produktion von IL-6 aktiviert. Dies führt zur kompensatorischen Proliferation der Hepatozyten und zu Hepatokarzinogenese (Chen *et al.* 2007a; Naugler *et al.* 2007; Sakurai *et al.* 2008). Während IL-1 α aus nekrotischen Hepatozyten tumorpromovierend wirkt, wurde für IL-1 β ein antitumoraler/tumortoxischer Effekt beschrieben. So zeigten z.B. Lachmann *et al.* einen zytotoxischen Effekt des von stimulierten Monozyten sezernierten IL-1 β auf die Melanomzelllinie A375 (Lachmann *et al.* 1986). Ellman *et al.* fanden bei Inkubation von Ratten-Ovarialzellen mit IL-1 β einen zeitabhängigen zytotoxischen Effekt. Nach 48 h sank die Vitalität der Zellen um ca. 5 % und nach 100 h um über 60 % (Ellman *et al.* 1993). Ähnliche zytotoxische Wirkung des IL-1 stellten auch weitere Arbeitsgruppen in verschiedenen Zelllinien fest, darunter humane myeloide Tumorzelllinie K562, murine T-Lymphomzellen oder humane Thyreozyten (Lovett *et al.* 1986; van den Hove *et al.* 2002).

Das Interleukin 6 (IL-6) ist ein Zytokin mit unterschiedlichen Funktionen. Neben seiner ursprünglich entdeckten Funktion als Faktor für Differenzierung und Reifung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Zellen, spielt es eine wichtige Rolle bei vielen anderen Prozessen, darunter Makrophagen-Differenzierung, T-Zell-Proliferation, Akute-Phase-Proteinsynthese in der Leber oder neurale Entwicklung (Gauldie *et al.* 1987; Kishimoto *et al.* 1989-1995). Über eine zytotoxische Wirkung des Polypeptid-Interleukins gibt es in der Literatur keine Belege, was auch mit den Befunden dieser Arbeit korreliert. Es ist aber beschrieben, dass das IL-6 mit anderen Zytokinen interagiert und diese auch reguliert. So scheint es als Rückkopplung für TNF- α und IL-1 β zu fungieren: durch LPS-Stimulation werden primär vermehrt TNF- α und IL-1 β sezerniert, wodurch die IL-6-Produktion induziert wird, welche die Ausschüttung der zytotoxischen Zytokine (TNF- α und IL-1 β) wiederum hemmt und herunter reguliert (Shalaby *et al.* 1989; Schindler *et al.* 1990; Morgan, 1997; Jones, 2005). Dies könnte eine Erklärung für den extrem hohen Level an IL-6 in Mediumüberständen LPS-stimulierter muriner myeloider Zellen in der vorliegenden Arbeit sein.

Ein weiterer vielseitiger Mediator biologischer, insbesondere auch immunologischer Prozesse neben den Zytokinen ist Stickoxid (NO). Dieses wird bei Infektionen bzw. *in vitro* durch Behandlung mit LPS, im Zuge enzymatischer Arginin-Umwandlung vermehrt gebildet und wirkt unter anderem antimikrobiell (Bogdan, 2001). In Lösung oxidiert NO rasch zum Nitrit, welches in biochemischen Assays – wie z.B. dem Griess-Assay – nachgewiesen und quantifiziert werden kann (MacMicking *et al.* 1997). Ohne LPS-Stimulation wurde im Medium myeloider Zellen nach zwölf-tägiger Kultivierung eine Nitrit-Konzentration von $8,8 \pm 1,9 \mu\text{M}$ gefunden.

Diese stieg bei 48-stündiger Inkubation mit 1 µg/ml LPS signifikant auf $76,1 \pm 8,5$ µM (siehe Kapitel 5.4.1). Die ermittelten Gehalte liegen im gleichen Konzentrationsbereich verglichen mit der Literatur: ohne LPS-Stimulation ist in Mediumüberständen peritonealer, alveolarer oder Knochenmark-Makrophagen nur wenig NO vorhanden (unter 10 µM). Durch Stimulation mit LPS steigt die NO-Konzentration signifikant an und liegt im Bereich von 80-120 µM (Chinen *et al.* 1999; Li *et al.* 2002; Peron *et al.* 2007). Auf Grund der schnellen Oxidation zu stabilen Nitrit/Nitrat-Anionen ist die Analyse der Wirkung von NO schwierig. Stuehr *et al.* dokumentierten, dass Nitrit selbst weder eine zytotoxische noch zytostatische Wirkung auf die Leukämie-Zelllinie L1210 hatte. Erst bei Reduktion des pH-Werts auf 6 konnte eine Vitalität von 77-90 % beobachtet werden (Stuehr *et al.* 1989). Vielmehr scheint Stickoxid als ein wichtiger Vermittler bei der Zytokin-induzierten Zytotoxizität (insbesondere IL-1) involviert zu sein (Ellman *et al.* 1993, van den Hove *et al.* 2002).

Zur Vollständigkeit hinsichtlich weiterführender Untersuchungen der CYP1A1-Aktivität, wurde auch die Vitalität der HepG2-Zellen nach 48 h-Behandlung mit Mediumüberständen muriner Zellen zusammen mit TCDD (1 nM) untersucht. TCDD hatte bei der eingesetzten Konzentration von 10^{-9} M keinen Einfluss auf die Vitalität der humanen Hepatomzellen. Bei simultaner Behandlung der Zellen mit TCDD und Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen sank die Vitalität wie bereits zuvor beobachtet ab, jedoch geschah dies in einem stärkeren Ausmaß als ohne Anwesenheit von TCDD. Der statistische Vergleich zeigte eine signifikante bzw. hoch signifikante Differenz zwischen den beiden Behandlungen bei der Verdünnung 1:2 und unverdünnten Mediumüberständen (vgl. Abbildung 39). Weiterhin wurde die Vitalität von HepG2 nach 48 h Co-Inkubation der vier inflammatorischen Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α) mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, 10^{-9} M) untersucht. Kein Unterschied war feststellbar bei simultaner Behandlung der humanen Hepatomzellen mit TCDD und IL-1 α bzw. IL-6. Für TNF- α ergab sich zwar mathematisch eine signifikant niedrigere Vitalität durch Co-Inkubation mit dem Dioxin, aber die Werte lagen durchschnittlich bei über 97 % was auf keine biologisch signifikante Wirkung schließen lässt. Nur bei IL-1 β war in der höchsten untersuchten Konzentration von 450 pg/ml zusammen mit TCDD (10^{-9} M) eine signifikant niedrigere Vitalität zu verzeichnen. Diese sank durch Co-Inkubation mit TCDD statistisch hoch signifikant um durchschnittlich 17 %, verglichen mit Behandlung ohne TCDD. Dies deutet darauf hin, dass der Rückgang der Vitalität bei Co-Inkubation der Mediumüberstände mit TCDD unter anderem auf das von myeloiden Zellen sezernierte IL-1 β zurückzuführen ist. TCDD scheint die zytotoxische Wirkung von Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen zu verstärken. Es ist belegt, dass TCDD in HepG2 neben CYP1A1 eine Reihe verschiedener weiterer Gene signifikant induziert, unter anderem auch TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 oder NO-Synthase iNOS (DiNatale *et al.* 2010; Li *et*

al. 2010b). Zusammen mit den in Mediumüberständen bereits enthaltenen, sezernierten Zytokinen, könnte dies zur weiteren Senkung der Viabilität führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der beobachtete vitalitätsreduzierende Effekt von Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen auf Hepatomzellen nur teilweise auf die untersuchten Zytokine zurückzuführen ist. Da nach Stimulation mit LPS neben den vier untersuchten (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α), zusätzlich noch andere Zytokine ausgeschüttet werden, die eine vitalitätssenkende Wirkung auf Hepatomzellen ausüben könnten, wie z.B. IL-2 oder IFN- γ , sollten in Zukunft weitere Zytokine bestimmt und auf ihre Wirkung untersucht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass neben Zytokinen auch niedermolekulare Verbindungen sezerniert wurden, die sich negativ auf die Vitalität von Hepatomzellen auswirken. Diese Annahme geht auch aus der Beobachtung hervor, dass LPS-stimulierte Mediumüberstände nach einer Hitzeinaktivierung für 30 min bei 95°C keinen Verlust der zytotoxischen Aktivität aufwiesen (Anhang, Abbildung 97). Für TNF- α sowie IL-1 ist bei ähnlichen Temperatur-Bedingungen eine fast vollständige Inaktivierung (über 90 %) beschrieben (Opp *et al.* 1995; Dekaris *et al.* 1999; Gao *et al.* 2006). Bezüglich niedermolekularer Verbindungen beschreiben beispielsweise Masuda *et al.* eine erhöhte Histamin-Produktion in murinen Peritonealmakrophagen nach Behandlung mit LPS (Masuda *et al.* 2011). Histamin wiederum zeigte in der humanen Hepatomzelllinie HuH-6 eine wachstumsreduzierende Wirkung (Lampiasi *et al.* 2007). Die simultane Behandlung der HepG2-Zellen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen und TCDD führte zur signifikanten Reduktion der Vitalität. Es stellte sich heraus, dass unter anderem IL-1 β am weiteren Vitalitätsverlust beteiligt ist. Eine Beteiligung weiterer Verbindungen ist hierbei nicht auszuschließen.

6.2.2 CYP1A1-Aktivierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Zellen des Immunsystems nach Simulation einer Infektion durch Behandlung mit dem Endotoxin gramnegativer Bakterien (LPS), Verbindungen sezernieren, welche im Zusammenhang mit dem AhR-Signalweg eine Rolle spielen und eventuell mehr Aufschluss über die physiologische Rolle des AhR bzw. über einen endogenen Liganden des Rezeptors geben.

In Voruntersuchungen konnte bei einem Vergleich von Hepatomzelllinien dreier Spezies – Mensch, Maus und Ratte – gezeigt werden, dass die humanen HepG2-Zellen am sensitivsten gegenüber einer Aktivierung des Ah-Rezeptors durch seinen exogenen Liganden TCDD reagieren (vgl. Abbildung 34). Nach Inkubation mit 1 nM TCDD für 48 h zeigten sie die höchste CYP1A1-Aktivität im EROD-Assay und erwiesen sich als am besten geeignet, auch einen

geringen Effekt auf die CYP1A1-Aktivität detektieren zu können. Deshalb wurden Mediumüberstände ausdifferenzierter muriner myeloider Zellen mit und ohne LPS-Stimulation auf ihr Vermögen die CYP1A1-Aktivität zu beeinflussen in HepG2-Zellen untersucht. Eine 48 h-Behandlung von HepG2-Zellen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen führte zu einer Erhöhung der CYP1A1-Aktivität im EROD-Assay. Die Aktivität betrug durchschnittlich $2,6 \pm 0,7$ pmol/mg/min, was zwar verglichen mit TCDD nicht sehr hoch ist, jedoch in Bezug auf die EROD-Aktivität des Mediums als Negativkontrolle ($0,8 \pm 0,1$ pmol/mg/min) ergab sich eine statistische Signifikanz. Mediumüberstände nicht stimulierter Zellen führten zu keiner erhöhten EROD-Aktivität, diese lag mit $0,9 \pm 0,2$ pmol/mg/min im Bereich der Negativkontrolle. Die Positivkontrolle TCDD (10^{-9} M) bewirkte nach 48 h Inkubation in humanen Hepatomzellen eine statistisch höchst signifikant erhöhte EROD-Aktivität von durchschnittlich 287 ± 18 pmol/mg/min. Diese ermittelte EROD-Aktivität für TCDD (1 nM) in HepG2-Zellen korreliert auch mit den Daten in der Literatur (Korashy *et al.* 2008; Chang *et al.* 2009; Lohr, Dissertation 2013).

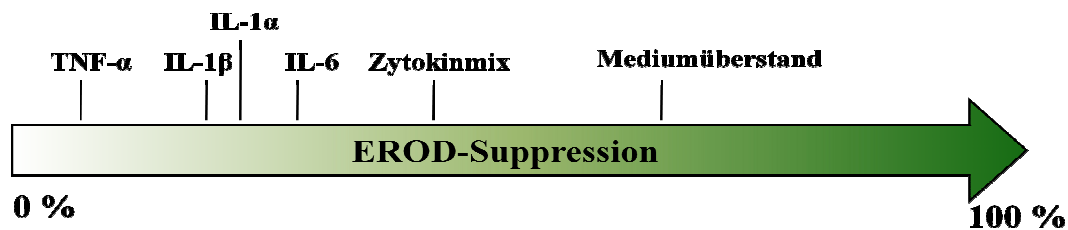
In primären Rattenhepatozyten, sowie in Hepatomzellen H4IIE oder Hepa-1 konnte keine Induktion der EROD-Aktivität durch Behandlung mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen beobachtet werden (siehe Anhang, Abbildung 98 - Abbildung 100). Eine Erklärung für diesen Befund könnte sein, dass die Kapazität zur Hochregulation von Cyp1a1 in diesen Zellen, verglichen mit HepG2, schwächer ist. Dies macht sich auch in der EROD-Aktivität der Positivkontrolle TCDD (1 nM) bemerkbar. Diese ist mit durchschnittlich $32,7 \pm 6,4$ pmol/mg/min für primäre Rattenhepatozyten, $71,4 \pm 20,1$ pmol/mg/min für Hepa-1 und $107,3 \pm 21,6$ pmol/mg/min für H4IIE, deutlich geringer als die in HepG2 erreichte CYP1A1-Enzymaktivität von 287 ± 18 pmol/mg/min. Diese Ergebnisse korrelieren mit den EROD-Aktivitäten in der Literatur. Auch Sonneveld *et al.* beobachteten in HepG2 viel höhere EROD-Aktivitäten als in vergleichbaren Nager-Modellen H4IIE oder Hepa-1 (Sonneveld *et al.* 2007). Eine Erklärung dazu liefert die Tatsache, dass sich die DRE-Regionen der unterschiedlichen Spezies unterscheiden und so zu unterschiedlichen Expressionen nach Dioxin-Exposition führen (Bank *et al.* 1992). Eine andere Möglichkeit diese Spezies-spezifischen Unterschiede zu erklären, wäre die unterschiedliche metabolische Aktivität der Zellen, unter der Annahme, dass myeloide Zellen eine Substanz sezernieren, die nicht als direkter AhR-Ligand wirkt, sondern erst durch Umwandlung zum aktiven Liganden wird. Solche Differenzen wurden beispielsweise auch beim Arzneistoff Omeprazol festgestellt. Dieses induziert CYP1A1 in humanen Hepatozyten sowie HepG2-Zellen jedoch nicht in Maushepatozyten oder Hepa-1-Zellen. Es wird vermutet, dass humane Zellen im Gegensatz zu Mauszellen einen aktivierenden Faktor besitzen müssen, welcher Omeprazol umwandelt und so zur Aktivierung von Cyp1a1 führt (Kikuchi *et al.* 1996; Dzeletovic *et al.* 1997).

Zur Untersuchung, ob die beobachtete gesteigerte EROD-Aktivität in humanen Hepatomzellen durch Mediumüberstände myeloider Zellen AhR-abhängig ist, wurden die Zellen vor der Exposition mit den Überständen oder TCDD für 4 h mit dem potenten und selektiven AhR-Antagonisten CH223191 (1 μ M und 10 μ M) behandelt. Es zeigte sich, dass die durch Mediumüberstände stimulierter myeloider Zellen verursachte EROD-Aktivität nur teilweise AhR-abhängig ist. Nach Vorbehandlung mit dem Antagonisten (1 μ M) und anschließender Inkubation mit den Überständen konnte immer noch eine knapp 24 %ige EROD-Aktivität (bezogen auf die maximale Aktivität ohne Antagonisten) detektiert werden. Auch durch Erhöhung der Konzentration des Antagonisten auf 10 μ M konnte die EROD-Aktivität nicht weiter gesenkt werden, diese betrug immer noch 42 %, während bei der TCDD-Kontrolle mit nur 1,7 % der ursprünglichen EROD-Aktivität eine hoch signifikante Hemmung zu beobachten war. CH223191 inhibiert kompetitiv die Bindung von TCDD an den AhR und/oder die AhR-vermittelte Signaltransduktion, darunter die Expression u.a. der Cytochrom P450 Enzyme (Kim *et al.* 2006). Weiterhin wirkt CH223191 stark Liganden-selektiv. So inhibiert es die Bindung/Aktivierung des AhR vorzugsweise von AhR-Agonisten wie TCDD und verwandten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen, jedoch nicht von anderen AhR-Agonisten wie PAKs, Flavonoiden oder Indirubin (Zhao *et al.* 2010). In Anbetracht dieser Tatsache kann man annehmen, dass die durch konditioniertes Medium myeloider Zellen verursachte CYP1A1 Aktivierung zumindest teilweise AhR-vermittelt abläuft. Bezüglich der Struktur des/der sezernierten und CYP1A1-aktivierenden Stoffe lässt sich daraus nur wenig ableiten, man könnte z.B. eine teilweise Flavonoid- oder Indirubin-ähnliche Struktur vermuten, jedoch sind weitere aufklärende Untersuchungen erforderlich.

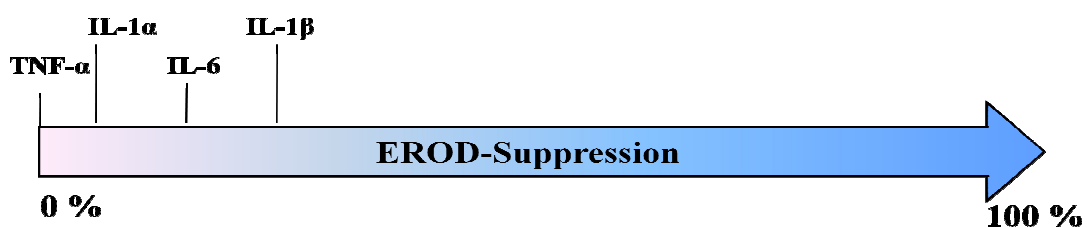
Die im EROD-Assay festgestellte CYP1A1-Induktion konnte auch auf Transkriptionsebene bestätigt werden. Nach 48-stündiger Inkubation humaner Hepatomzellen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen wurde mittels quantitativer RT-PCR ein konzentrationsabhängiger Anstieg der *CYP1A1* mRNA-Expression festgestellt. Unverdünntes konditioniertes Medium myeloider Zellen führte in HepG2-Zellen zu statistisch hoch signifikanten, rund 11-fach höheren *CYP1A1*-Expression bezogen auf die Negativkontrolle Medium, während durch Behandlung mit TCDD die relative *CYP1A1*-Expression durchschnittlich auf 94 ± 28 -fach anstieg, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Auf Protein-Ebene im Western Blot konnte nach Inkubation der HepG2-Zellen mit stimulierten murinen Mediumüberständen kein CYP1A1-Protein detektiert werden, nur die Positivkontrolle TCDD (1 nM) zeigte eine charakteristische Bande bei 52 kDa (Verena Ziegler, Masterarbeit 2013, TU Kaiserslautern, AG Prof. Dr. Dr. D. Schrenk). Es ist hierbei zu beachten, dass der Western Blot ein semi-quantitative Methode ist und weitaus weniger sensitiv als der EROD-Assay in vitalen Zellen, weshalb auch der EROD-Assay hinsichtlich geringer CYP1A1-Aktivität ein besseres Detektionssystem darstellt.

Bezüglich der CYP1A1-Induktion im EROD-Assay oder auf Transkriptionsebene durch Medium stimulierter myeloider Zellen finden sich in der Literatur keine entsprechenden Untersuchungen, weshalb die Daten dahingehend nicht verglichen werden können. Dagegen wurde die Beobachtung gemacht, dass durch Co-Inkubation LPS-konditionierter Medien myeloider Zellen und TCDD (1 nM) in Hepatomzellen die CYP1A1-Aktivität konzentrationsabhängig supprimiert wird. So wurde die TCDD-induzierte EROD-Aktivität in HepG2-Zellen durch 48-stündige Co-Inkubation mit unverdünnten LPS-stimulierten myeloiden Mediumüberständen hoch signifikant um 66 % gehemmt, bezogen auf die TCDD-Kontrolle. Dieser Effekt zeigte sich auch auf mRNA-Ebene, jedoch in einer weitaus geringeren Ausprägung. Hierbei verringerte sich die *CYP1A1* mRNA-Expression um rund 13 %. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen. So beobachteten Paton *et al.* ebenfalls eine signifikante Reduktion der TCDD-induzierten EROD-Aktivität um ca. 35 % durch Co-Inkubation muriner Hepatomzellen Hepa-1 mit Mediumüberständen LPS-stimulierter Makrophagenzelllinie IC-21 (Paton *et al.* 1998). Auch Jeong beschreibt eine signifikante Verringerung der Cyp1a1-Induktion im EROD-Assay (ca. 50 %) als auch auf mRNA-Ebene durch Behandlung von Hepa-1-Zellen mit Mediumüberständen Mitogen-aktivierter RAW 264.7 Makrophagen (Jeong, 2001). Beide Quellen machen die von Makrophagen ausgeschütteten Zytokine (TNF- α , IL-6) für den suppressiven Einfluss auf das Cytochrom P450 1A1 verantwortlich. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die in Mediumüberständen LPS-stimulierter muriner myeloider Zellen quantifizierten Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α auf ihre Fähigkeit die CYP1A1-Induktion zu beeinflussen im EROD-Assay analysiert.

Nach 48-stündiger Inkubation hatte keines der vier Zytokine einen induzierenden Effekt auf die EROD-Aktivität in HepG2-Zellen. Erst bei simultaner Behandlung mit TCDD zeigte sich die Wirkung der Zytokine. Jedes der vier Zytokine supprimierte konzentrationsabhängig die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität. Die Intensität der Zytokin-vermittelten Suppression bei den höchsten eingesetzten Konzentration variierte für jedes der einzelnen Zytokine und kann wie folgt aufgestellt werden: mit einer Verringerung der CYP1A1-Aktivität um rund 9 % hatte TNF- α die geringste suppressive Wirkung, gefolgt von IL-1 β und IL-1 α mit 20 % bzw. 24 %. Die höchste EROD-Suppression um rund 34 % konnte durch 48 h-Inkubation der HepG2-Zellen mit TCDD und IL-6 erreicht werden. Die Hemmung TCDD-induzierter EROD-Aktivität betrug 43 %, wenn die vier Zytokine als Mischung auf die Hepatomzellen gegeben wurden, war aber dennoch geringer als die Suppression durch Mediumüberstände LPS-stimulierter myeloider Zellen (66 %).



Diese Aufstellung berücksichtigt jedoch nicht die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen Zytokine im Vergleich zueinander. Zwar wird mit IL-6 die höchste EROD-Suppression erreicht, man muss aber hierbei beachten, dass IL-6 mit 6500 pg/ml im Vergleich zu den anderen Zytokinen auch in der höchsten Konzentration auftritt. Um die Potenz der Zytokine bezüglich des Einflusses auf die EROD-Aktivität besser vergleichen zu können, sollte die prozentuale EROD-Suppression der vier Zytokine im gleichen Konzentrationsbereich gegenübergestellt werden. Infolgedessen, ergibt sich eine andere Reihenfolge zur suppressiven Potenz der Zytokine: so kann bei einer Konzentration von 410-820 pg/ml für TNF- α kein inhibitorischer Effekt festgestellt werden. Ein geringer suppressiver Effekt auf die EROD-Aktivität ergibt sich für IL-1 α . In einer Konzentration von 540 pg/ml wird durchschnittlich eine Inhibition von ca. 5 % erreicht. Mit 12 %iger Suppression bei 650 pg/ml folgt IL-6. Die größte Potenz die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität zu hemmen hat bei diesem Vergleich IL-1 β . Mit nur 450 pg/ml des Zytokins sinkt die EROD-Aktivität durchschnittlich um 22 % (vgl. Abbildung 50, Abbildung 51).



Verglichen mit Mediumüberständen LPS-stimulierter myeloider Zellen bleibt der hemmende Effekt der Zytokinmischung auf die CYP1A1-Aktivität zwar noch immer geringer, belegt aber die synergistische Wirkung der Zytokine, welche auch Bleau *et al.* feststellten (Bleau *et al.* 2003). Die Daten lassen deshalb vermuten, dass noch weitere sezernierte Zytokine/Substanzen neben den untersuchten Zytokinen an der CYP1A1-Suppression beteiligt sein

könnten. So ist in der Literatur beispielsweise auch die EROD-inhibierende Wirkung von IL-2 und IFN- γ beschrieben (Calleja *et al.* 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse zur Hemmung TCDD-induzierter EROD-Aktivität korrelieren mit den in der Literatur beschriebenen Befunden. Zahlreiche Studien bestätigen den suppressiven Effekt dieser am weitesten untersuchten Zytokine der Akute-Phase-Reaktion – IL-1, IL-6 und TNF- α – auf die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität. Das Ausmaß der CYP1A1-Suppression differiert dabei abhängig von der eingesetzten Konzentration der Zytokine, der Inkubationszeit sowie dem verwendeten Zell- und Testsystem (Barker *et al.* 1992; Fukuda *et al.* 1994; Clark *et al.* 1995; Calleja *et al.* 1997; Paton *et al.* 1998; Bleau *et al.* 2000; Jeong, 2001; Bleau *et al.* 2003). Der suppressive Einfluss der Zytokine gilt jedoch nicht allein CYP1A1, auch die Aktivitäten anderer CYP-Enzyme sind nachweislich betroffen. IL-1, IL-6 und TNF- α hemmen unter anderem signifikant die Expression von CYP1A2, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2E1, CYP3A (Abdel-Razzak *et al.* 1993; Muntané-Relat *et al.* 1995; Morgan, 1997; Siewert *et al.* 2000; Bleau *et al.* 2003). Einige Studien machen neben Zytokinen auch LPS für die CYP1A1-inhibierende Wirkung verantwortlich (Ke *et al.* 2001; Gharavi *et al.* 2005). Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. In HepG2-Zellen hatte LPS keine Auswirkung auf die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität im EROD-Assay (vgl. Abbildung 41: Einfluss von LPS auf EROD-Aktivität. Abbildung 41).

Welcher Mechanismus nun der CYP-Suppression zugrunde liegt, ist nicht genau geklärt und diverse Hypothesen, angepasst an die jeweiligen CYPs, werden in der Literatur diskutiert. Einen guten Überblick dazu bieten die Reviews von Morgan (Morgan, 1997; Morgan, 2000). Für die Runterregulation von CYP1A1 durch Zytokine existieren Vorschläge über verschiedene, vor allem prätranslationale Mechanismen: eine Möglichkeit ist die Interaktion des AhR und NF- κ B auf Transkriptionsebene. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch Zytokine (insbesondere TNF- α) aktiviert wird. Ke *et al.* sowie Tian *et al.* schlagen vor, dass die transkriptionsaktive NF- κ B-Untereinheit RelA mit dem Ah-Rezeptor assoziiert und so zu seiner Repression führt, was die verminderte Expression des *CYP1A1* erklärt (Tian *et al.* 1999; Ke *et al.* 2001). Die Arbeitsgruppe Morel *et al.* vermutet, dass TNF- α die *CYP1A1*-Expression durch einen Redox-Mechanismus runterreguliert (Morel *et al.* 1998). Diese Annahme basiert darauf, dass TNF- α in Zellen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Schulze-Osthoff *et al.* 1993; Krieger-Brauer *et al.* 1995). Diese oxidativen Stimuli modulieren die Bindung des Nuclear Factor-1 (NF-1) an die Promoterregion des *CYP1A1*-Gens was zur Repression des *CYP1A1* führt (Morel *et al.* 1998).

Auch das von Makrophagen produzierte Stickoxid (NO) zeigte in Studien sein inhibitorisches Potential gegenüber CYP1A1. Es wird angenommen, dass NO an die Häm-Region des Cytochrom P450 bindet und so das Enzym inaktiviert (Stadler *et al.* 1994; Carlson *et al.* 1996; Khatsenko *et al.* 1997; Jeong, 2001). Die Mitwirkung des NO aus Mediumüberständen myeloider Zellen kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da zwischen der Ernte der Mediumüberstände und deren Inkubation in Hepatomzellen eine Zeitspanne von mindestens mehreren Stunden lag. Als freies Radikal zeichnet sich NO durch seine Kurzlebigkeit aus und oxidiert innerhalb von Sekunden zu Nitrit/Nitrat (Ignarro, 1990; Stamler *et al.* 1992). Deshalb kann man ausschließen, dass NO zum Zeitpunkt der Inkubation in den Mediumüberständen vorgelegen hat. Es ist aber möglich, dass im vorliegenden HepG2-System durch Behandlung mit TCDD und Mediumüberständen/Zytokinen durch Aktivierung der NO-Synthase neues NO synthetisiert wurde, welches dann an der Suppression des CYP1A1 beteiligt sein könnte. Es ist belegt, dass Zytokine auch in immortalisierten Hepatomzelllinien wie Hepa-1 oder HepG2 die Stickoxid Synthase (NOS) induzieren, was zur Bildung von NO aus Arginin führen kann (Nussler *et al.* 1992; Geller *et al.* 1993; Gharavi *et al.* 2003; Li *et al.* 2010; Yuhás *et al.* 2011). Die Bildung weiterer reaktiver Spezies, wie z.B. Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid, kann durch Oxidation funktioneller Aminosäuren den irreversiblen Verlust katalytischer Aktivität des Enzyms bedeuten (Paton *et al.* 1998; Bogdan, 2001; Gharavi *et al.* 2005). Diese Hypothesen sollten jedoch kritisch betrachtet werden. Denn die dazugehörigen Studien befassten sich meist mit nur einem Modell und nur einem Teil eines Signalweges, oft die umliegenden Vorgänge ausblendend, wodurch sich auch beim Vergleich der Literatur auch Widersprüche ergeben. Man darf nicht vergessen, dass die Mechanismen in der Zelle / im Organismus nicht separat verlaufen, sondern ein großes Netzwerk voneinander abhängiger Abläufe darstellen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Suppression von Cytochrom P450 Enzymen das Ergebnis eines Zusammenspiels mehrerer Vorgänge ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mediumüberstände LPS-stimulierter myeloider Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation in HepG2 einen signifikanten Anstieg der *CYP1A1*-mRNA-Expression als auch der EROD-Aktivität verursachen. Untersuchungen mit dem Liganden-selektiven AhR-Antagonisten CH223191 weisen darauf hin, dass die induzierte EROD-Aktivität zumindest teilweise AhR-abhängig ist. Was zur erhöhten EROD-Aktivität führt, bleibt ungeklärt und ist in weiteren Untersuchungen herauszufinden. Durch Co-Inkubation mit TCDD und Mediumüberständen stimulierter Immunzellen wurde eine starke Suppression der CYP1A1-Induktion im EROD-Assay und nur geringfügig auf mRNA-Ebene festgestellt. Es konnte bestätigt werden, dass die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α synergistisch zum großen Teil am suppressiven Effekt beteiligt sind. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus für die CYP-Suppression benötigt weiterer Untersuchungen. Die Modulation der CYP-Expression durch proinflammatorische Zytokine ist insbesondere aus pharma-

kologischer und toxikologischer Sicht wichtig, da bei einer vorliegenden Infektion oder Inflammation der CYP-abhängige Arzneimittelstoffwechsel beeinflusst werden kann und der therapeutische bzw. toxische Effekt eines Wirkstoffs berücksichtigt werden sollte. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass nach Stimulation muriner myeloider Zellen mit LPS eine oder mehrere Substanzen ins Medium sezerniert werden, die zu einer CYP1A1-Induktion im EROD-Assay und auf mRNA-Ebene führen. Trotz inhibitorischer Wirkung ebenfalls ausgeschütteter Zytokine, wird eine signifikante Induktion des AhR-Biomarkers CYP1A1 beobachtet. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um der detektierten CYP1A1-Aktivierung auf den Grund zu gehen und die daran beteiligten Substanzen zu identifizieren.

6.3 HPLC-Analyse von Mediumüberständen

Bei Untersuchungen von Mediumüberständen LPS-stimulierter muriner myeloider Zellen konnten sowohl induktive als auch suppressive Effekte auf die CYP1A1-Aktivität in humanen Hepatomzellen beobachtet werden. Die qualitative und quantitative Analyse der Mediumüberstände mittels ELISA zeigte hohe Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α). Für diese Zytokine konnte eine inhibitorische Wirkung auf TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität nachgewiesen werden. Es blieb jedoch die Frage, was in den Mediumüberständen enthalten war, das zur CYP1A1-Induktion in HepG2-Zellen führte. Zu diesem Zweck wurden myeloide Zellen für zehn Tage in GM-CSF haltigen Medium kultiviert und anschließend für weitere 48 h mit 0 bzw. 1 μ g/ml LPS behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium sowie der Zellrasen gesammelt und homogenisiert. Die Proteine wurden mit Hilfe eiskalten Acetons präzipitiert (vgl. Kapitel 4.7). Auch hier fiel auf, dass in LPS-behandelten Proben das Protein-Pellet viel größer war als bei Proben ohne LPS-Induktion, was mitunter auf die sezernierten Zytokine zurückzuführen ist. Nach Einengen der Probe zur Trockene wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen, sodass man eine 25-fache Aufkonzentrierung der Probe erhielt. Eine höhere Aufkonzentrierung war nicht möglich, da eine adäquate Lösung des Rückstandes nicht mehr gewährleistet werden konnte. Nach Filtration wurden die Proben einer HPLC-Analyse unterzogen. Das gleiche Verfahren wurde auch zur Untersuchung des Kulturmediums, welches als Kontrolle diente, verwendet.

In den UV-Chromatogrammen zeigt sich bei 280 nm bei allen untersuchten Proben bereits nach 2 Minuten der erste und höchste Peak. Insgesamt können zwei Gruppen von Peaks beobachtet werden. Eine Gruppe recht polarer Verbindungen mit Retentionszeiten von 2 – 8 min, gefolgt von einer zweiten Gruppe weniger polarer Substanzen mit Retentionszeiten von 16-24 min. Die Analyse der zugehörigen UV-Spektren war nur bedingt aufschlussreich. Mit unsp-

zifischen Absorptionsmaxima bei 220 und 260/280 nm, zeigten die meisten Peaks dabei keine wesentlichen Unterschiede. Es ist wahrscheinlich, dass diese unter anderem zu aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) gehören, welche bereits in der Zusammensetzung des Kulturmediums enthalten sind (Tabelle 40). In früheren Analysen einer Mischung aromatischer Aminosäuren mit einer vergleichbaren Trennmethode und Fließmittelzusammensetzung, zeigten die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan vergleichbare Retentionszeiten (Tyr: 5,5 min, Phe: 8,3 min, Trp: 18,3 min). und UV-Spektren auf (Messer, Forschungsarbeit 2009; vgl. Anhang, Abbildung 106). Auch in der Literatur zeigen sich ähnliche UV-Spektren für die drei aromatischen Aminosäuren (Belitz, 2008). Der Peak bei der Retentionszeit um 18 min zeigt ein charakteristisches UV-Spektrum mit Maxima bei 270, 330, 440 und 550 nm und unterscheidet sich deutlich von den UV-Spektren der restlichen Peaks. Nach einem Vergleich mit Literaturdaten konnte dieses UV-Spektrum, dem zugesetzten Indikator im Medium, Phenolrot zugeordnet werden (Pizarro *et al.* 2004; He *et al.* 2013).

Tabelle 40: Konzentrationen aromatischer Aminosäuren im RPMI- Medium (www.lifetechnologies.com)

Aminosäure	Konzentration im Medium [mM]
Tryptophan	0,025
Phenylalanin	0,091
Tyrosin	0,111

Zwischen den UV-Chromatogrammen unbehandelter myeloider Zellen und deren Mediumüberständen und LPS-behandelten Zellen konnten keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Beim Überlagern der Chromatogramme und beim Vergleich mit dem Kulturmedium waren diese, bis auf geringe zeitliche Verschiebungen, praktisch identisch. Anhand dieser Ergebnisse konnten keine Rückschlüsse darüber gemacht werden, welche Substanzen von murinen myeloiden sezerniert wurden, die zur Induktion der CYP1A1-Aktivität in humanen Hepatomzellen führten. Es ist möglich bzw. sogar wahrscheinlich, dass die sezernierte(n) Verbindung(en) in einer sehr geringen Konzentration vorliegen, sodass sie auf Grund der hohen Konzentration der Mediumbestandteile (Aminosäuren etc.) überlagert und unter den gegebenen Bedingungen nicht detektiert werden können. Zusätzlich ist mit der beschriebenen Methode nur die Detektion UV-aktiver Substanzen möglich. Sollte also die gesuchte Verbindung, keine UV-Aktivität aufweisen, bleibt sie bei UV-HPLC-Untersuchungen unentdeckt. Weitere Detektoren, wie beispielsweise Massenspektrometer, sollten deshalb in Betracht gezogen werden. Weiterhin ist es möglich, dass die CYP1A1-induzierende(n) Substanz(en) entweder einen Protein-ähnlichen Charakter besitzen – beispielsweise kleine Peptide – oder

als niedermolekulare Verbindung(en) mit Proteinen assoziiert vorliegen. In diesem Fall wäre eine Detektion mit der beschriebenen Methode ebenfalls nicht möglich, auf Grund der Proteinpräzipitation vor der HPLC-Analyse. Da es zu den gesuchte(n) Verbindung(en) keine Anhaltspunkte über ihre chemischen Eigenschaften gibt, sind weitere umfassenden Analysen notwendig unter Verwendung selektiver und sensitiver Methoden. Vielversprechende Möglichkeiten zur Detektion niedrigkonzentrierter Peptide wären neue biotechnologische Verfahren, die erst seit wenigen Jahren bei der Sekretionsmustererkennung von Tumorzellen zum Auffinden von Tumormarkern zum Einsatz kommen. Hierbei erfolgt die Extraktion der Substanzen aus Mediumüberständen kultivierter Tumorzellen mit mehrschichtigen, magnetischen Mikropartikeln. Nach Auftrennung der Substanzen über Kapillar-HPLC folgt eine direkt nachgeschaltete MALDI-TOF-MS Analyse (Peter *et al.* 2007).

6.4 Vitamin D₃ und TCDD

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des prominentesten und wahrscheinlich potentesten AhR-Liganden 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) sowie mit 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, auch als Calcitriol bezeichnet, der biologisch aktiven Form des Vitamin D und potentesten VDR-Liganden. Es ist bereits seit Langem bekannt, dass beide Verbindungen einen starken Einfluss auf das Immunsystem haben, die Auswirkungen hierbei sind jedoch konträr. Während eine TCDD-Exposition stark immunsuppressiv und immunotoxisch wirkt, ist Vitamin D für das Immunsystem und den Organismus essentiell (Esser *et al.* 2009; Baeke *et al.* 2010). Weiterhin wird eine Wechselwirkung zwischen dem Dioxin-Rezeptor (AhR) und dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) vermutet, aber nur wenige Studien wurden dazu durchgeführt (Reisz-Porszasz *et al.* 1993; Matsunawa *et al.* 2009; Matsunawa *et al.* 2012). Die Wirkung der beiden Substanzen TCDD und Calcitriol wurde deshalb sowohl in ausdifferenzierten murinen myeloiden Zellen, aber auch in humanen Hepatomzellen HepG2 untersucht. Der Einfluss dieser beiden Substanzen auf Vitalität, Zytokinausschüttung, *Cyp1a1*- als auch *Cyp24a1*-Expression auf verschiedenen Ebenen, sowie der Einfluss auf die Rezeptoren AhR und VDR und deren mögliche Wechselwirkung untereinander, dienen hierbei als Parameter und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

6.4.1 Zellvitalität und Proliferation

Eine 48-stündige Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol im Konzentrationsbereich 1-100 nM führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zahl adhärenter Zel-

len. Verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) sank die Fluoreszenz im Resazurinreduktionstest bei der höchsten Calcitriol-Konzentration von 100 nM durchschnittlich auf $82,0 \pm 9,2$ % und erwies sich im *Dunnett Multiple Comparison Test* als statistisch hoch signifikant. Es ist wahrscheinlich, dass mehr eine proliferationshemmende als eine zytotoxische Wirkung des Calcitriols vorliegt. Proliferationshemmender Effekt des biologisch aktiven Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)₂-Vitamin D wurde bereits Mitte der 1980er Jahre in T-Zellen beobachtet. Eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse ergab, dass Calcitriol den Übergang der Zellen aus der frühen G₁-Phase in die späte G₁-Phase blockiert, jedoch keinen Effekt auf die Transition der Zellen aus G₀ in die frühe G₁-Phase oder aus der späten G₁-Phase in die S-Phase hat (Bhalla *et al.* 1984; Rigby *et al.* 1985; Nunn *et al.* 1986). Diese Resultate zur proliferationshemmenden Wirkung des Calcitriols erhielten die Arbeitsgruppen vorwiegend nach vorangegangener Stimulation der Immunzellen mit Phytohaemagglutinin (PHA) bzw. Phorbolmyristatacetat (PMA) und anschließender Behandlung mit Calcitriol. In der vorliegenden Arbeit war bei simultaner Behandlung der Zellen mit LPS (1 µg/ml) der proliferationshemmende Effekt des Calcitriols nicht mehr feststellbar. Dies liegt vermutlich daran, dass LPS selbst die Proliferation der Zellen zu hemmen vermag (vgl. Abbildung 31), sodass sich der Effekt des Vitamin-D-Metaboliten nicht mehr bemerkbar macht. Eine Hemmung der Makrophagen-Proliferation durch LPS konnte auch von Moore *et al.* und Yokoshi *et al.* nachgewiesen werden (Moore *et al.* 1980; Yokoshi *et al.* 1985).

Anders waren die Resultate nach Behandlung myeloider Zellen mit TCDD. Nach 48-stündiger Inkubation mit TCDD zeigten die Zellen keine Änderung in der Vitalität. Dies änderte sich, wenn murine myeloide Zellen zusätzlich zur TCDD-Behandlung simultan mit LPS (1 µg/ml) stimuliert wurden. Hierbei konnte ein Rückgang der Vitalität beobachtet werden. Diese sank bei maximaler verwendeter TCDD-Konzentration von 10⁻⁸ M statistisch signifikant auf durchschnittlich $76,3 \pm 14,1$ % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Einen ähnlichen Befund machten auch Hwang *et al.*: mit GM-CSF kultivierte murine Knochenmarkzellen zeigten nach Behandlung mit 1 nM und 10 nM TCDD für sogar über sechs Tage keine Änderung in der Vitalität (Hwang *et al.* 2007). Stimulierte Zellen hingegen scheinen sensitiver gegenüber TCDD zu reagieren. So beobachteten Ruby *et al.*, dass TCDD in dendritischen Zellen, welche mit TNF-α stimuliert wurden, zu Apoptose führt (Ruby *et al.* 2005). Einen apoptotischen Effekt des TCDD in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 stellten auch Park *et al.* fest als Folge der Aktivierung von ERK, p38 und Caspase-3 durch TCDD (Park *et al.* 2005). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Immunzellen bei einer Infektion anfälliger für den zytotoxischen Effekt des TCDD sind als gesunde Immunzellen.

Eine 48 h-Co-Inkubation muriner myeloider Zellen mit beiden Substanzen, Calcitriol (1-100 nM) und TCDD (1 nM), zeigte keinen synergistischen Effekt. Ohne simultane Behandlung

mit LPS konnte erneut nur der konzentrationsabhängige proliferationshemmende Effekt des Calcitriols beobachtet werden, mit maximaler Reduktion der Zellzahl in der höchsten Calcitriol-Konzentration von 100 nM um durchschnittlich 23 % verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Bei zusätzlicher LPS-Stimulation lag die Vitalität der Zellen konstant bei rund 83 % und entspricht der durch TCDD (1 nM) verursachten Vitalitätsreduktion.

In humanen Hepatomzellen zeigten weder TCDD (10^{-12} - 10^{-8} M) noch Calcitriol (1-100 nM), oder die Kombination der beiden Substanzen (1 nM TCDD + 1-100 nM Calcitriol) bei 48-stündiger Inkubation einen Effekt auf die Vitalität. Dies deckt sich mit den Resultaten anderer Forschungsgruppen. Elizondo *et al.* stellten bei Behandlung der HepG2-Zellen mit dem Vitamin D Metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bis zu einer Konzentration von $0,25 \mu\text{M}$ keinen Effekt auf die Vitalität der Zellen fest (Elizondo *et al.* 2003). Auch für TCDD werden in der Literatur für den untersuchten Konzentrationsbereich und das verwendete Zellsystem keine zytotoxischen Effekte beobachtet (Silkworth *et al.* 2005; Lohr, Dissertation 2013). Es ist beschrieben, dass TCDD erst bei höheren Konzentrationen *in vitro* auf humane Hepatomzellen zytotoxisch wirkt, so zeigten Westerink *et al.* eine 40 %ige Zytotoxizität in HepG2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einer TCDD-Konzentration von 10^{-6} M (Westerink *et al.* 2007).

6.4.2 Zytokine

6.4.2.1 Einfluss des Calcitriols

Lange dachte man die Rolle des Vitamin D sei auf Calcium-, Phosphathomöostase und Knochenmetabolismus beschränkt. Die Entdeckung des Vitamin-D-Rezeptors in allen Arten von Immunzellen sowie in allen Geweben deutete darauf hin, dass Vitamin D – genauer sein biologisch aktiver Metabolit Calcitriol – eine wichtige Rolle beim Immunsystem spielen muss (Deluca *et al.* 2001). Mittlerweile belegen zahlreiche Studien seine Rolle bei diversen Prozessen wie Zelldifferenzierung, -proliferation, Signaltransduktion im Rahmen des angeborenen und adaptiven Immunsystems u.v.m. (Chun *et al.* 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Calcitriols auf Sekretion der vier inflammatorischen Zytokine – IL- 1α , IL- 1β , IL-6 und TNF- α – sowie deren mRNA-Expression nach 48 h-Inkubation in murinen myeloider Zellen untersucht.

Nach Inkubation myeloider Zellen mit dem biologisch aktiven Vitamin D Metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zusammen mit LPS konnte keine Veränderung des Zytokinprofils im Medium festgestellt werden. Die Gehalte der vier untersuchten Zytokine waren, wie bereits zuvor fest-

gestellt, durch Stimulation mit LPS stark erhöht (vgl. Abbildung 44; Abbildung 55 - Abbildung 59). Calcitriol hatte hierbei keine zusätzlichen Auswirkungen. Ohne Behandlung mit dem Endotoxin LPS, zeigte Calcitriol nach 48 h-Inkubation keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-1 β . Trotz relativ hoher Schwankungen blieben die Gehalte der beiden Interleukine auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Für TNF- α ergab sich ohne LPS-co-Inkubation durch Calcitriol ein konzentrationsabhängiger, suppressiver Effekt. In der höchsten Calcitriol-Konzentration von 100 nM sank der TNF- α Gehalt statistisch signifikant auf unter 50 % verglichen mit DMSO. Der Gehalt an IL-1 α hingegen stieg durch Behandlung mit Calcitriol signifikant an. In der höchsten Konzentration von 100 nM erhöhte sich der IL-1 α -Gehalt statistisch signifikant auf fast das Dreifache gegenüber DMSO. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur gestaltet sich als schwierig, denn unterschiedliche Effekte des Calcitriols auf die Zytokinausschüttung werden berichtet. Während Bhalla *et al.* einen Anstieg des IL-1 in humanen Monozyten / Makrophagen durch Calcitriol beschrieben (jedoch ohne genaue Differenzierung um welches IL-1 es sich hierbei handelt), beobachteten Tsoukas *et al.* den gegenteiligen Effekt in Monozyten – eine Inhibition von sowohl IL-1 α als auch IL-1 β durch 1,25(OH) $_2$ D (Bhalla *et al.* 1986; Tsoukas *et al.* 1989). Auch für TNF- α finden sich unterschiedliche Befunde. Die Arbeitsgruppe um Rook *et al.* berichtete von einem Anstieg der LPS-vermittelten TNF- α Ausschüttung durch 4-tägige Behandlung humaner Monozyten aus peripherem Blut mit 10 $^{-7}$ M des Vitamin D Metaboliten Calcitriol (Rook *et al.* 1987). Im Gegensatz dazu fanden Yousefi *et al.* im gleichen Zellsystem den gegenteiligen Effekt – eine erniedrigte TNF- α Konzentration in Mediumüberständen humaner Monozyten nach 3-tägiger Behandlung mit Calcitriol (Yousefi *et al.* 1987). Diese widersprüchlichen Befunde sind vermutlich auf den unterschiedlichen Ausgangs-Differenzierungsstatus der verwendeten Zellen, aber auch den Einfluss des Calcitriols auf den Differenzierungsprozess selbst zurückzuführen (Koeffler *et al.* 1984).

Aktuellere Studien zeigen jedoch überwiegend den inhibierenden Effekt des Calcitriols auf die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β und bestätigen so den beschriebenen antiinflammatorischen und antibakteriellen Effekt des biologisch aktiven Vitamin D Metaboliten. Die Beobachtung der TNF- α -Suppression in der vorliegenden Arbeit korreliert nur in einigen Punkten mit den Ergebnissen dieser zahlreichen Studien. Ein genauer Vergleich der Daten ist hierbei jedoch schwierig, da die Gestaltung und Durchführung der Studien, einschließlich Zellsystem, Inkubationsdauer und Calcitriol-Konzentrationen, stark differieren. In den meisten Fällen bezieht sich die beschriebene suppressive Wirkung des Calcitriols auf eine durch Stimulanzien wie LPS, PMA, PHA, IFN- γ etc., vermittelte Zytokinsekretion. Es muss hierbei aber betont werden, dass die Reihenfolge bei der Behandlung eine wichtige Rolle spielt. Dieser suppressive Effekt ergibt sich nur durch eine dem Calcitriol nachgeschaltete und nicht durch simultane Inkubation der Zellen mit den genannten Stimu-

lanzien (Zarrabeitia *et al.* 1992; Panichi *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2005; Gambhir *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Jeong *et al.* 2014). Neue Studien liefern Anhaltspunkte bezüglich des Mechanismus, welcher der Suppression proinflammatorischer Zytokine zugrunde liegt. Pathogene – wie auch LPS – binden an den Toll-like-Rezeptor von Immunzellen und setzen dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang. Innerhalb dieser Signalkaskade spielen Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAPKs) für die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine eine entscheidende Rolle. Damit es zu keiner unkontrollierten Inflammation kommt, werden MAPKs durch entsprechende Phosphatasen (MKP) reguliert. Es stellte sich heraus, dass Calcitriol an mehreren Stellen dieses Signalweges mitwirkt und seine antiinflammatorische Wirkung zeigt. So zeigten die Forschungsgruppen Sadeghi *et al.*, Do *et al.* und Jeong *et al.* eine Runterregulation der Expression von Toll-like-Rezeptoren (TLR) in humanen Monozyten durch Calcitriol (Sadeghi *et al.* 2006; Do *et al.* 2008; Jeong *et al.* 2014). Zusätzlich fanden Zhang *et al.* heraus, dass die Inhibition LPS-induzierter Zytokinproduktion durch Calcitriol, durch Hochregulation der Phosphatase MKP-1 erfolgt (Zhang *et al.* 2012). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Calcitriol in der Lage ist bereits den basalen Level des TNF- α zu hemmen, ohne eine vorangegangene oder nachgeschaltete LPS-Stimulation. Eine Hemmung des *Tnf- α* wurde in der vorliegenden Arbeit auch bei RT-PCR-Untersuchungen festgestellt. Bei höchster Calcitriol-Konzentration (100 nM) sank die *Tnf- α* Expression durchschnittlich um 35 % verglichen mit der Kontrolle. Es ist möglich, dass dieser suppressive Effekt des Calcitriols auf TNF- α zusätzlich über einen anderen Signalweg abläuft als den TLR-abhängigen.

Während sich Calcitriol auf die TNF- α -Sekretion suppressiv auswirkte, zeigte sich bei IL-1 α ein induktiver Effekt. Ohne zusätzliche LPS-Stimulation steigerte 1,25(OH) $_2$ D konzentrationsabhängig und statistisch signifikant die IL-1 α -Sekretion in myeloiden Zellen nach 48 h Behandlung. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Bei qRT-PCR-Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Genexpression von *Il-1 α* durch Calcitriol statistisch signifikant erhöht wird. Bei einer Calcitriol-Konzentration von 30 nM wurde die maximale, rund 19-fach erhöhte Expression erreicht. Auch die mRNA-Expression von *Il-1 β* , der zweiten Isoform des IL-1, stieg nach Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol und erreichte eine maximale Expression von $5,6 \pm 2,5$ -fach bei 3 nM, sank jedoch wieder bei höheren Calcitriol-Konzentrationen. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass auch andere Forschungsgruppen die Induktion der IL-1-Produktion und *Il-1*-Genexpression nach Calcitriol-Behandlung beobachteten. So beschrieben Lee *et al.* eine signifikant erhöhte IL-1 α -Produktion sowie *Il-1 α* -mRNA-Expression durch Behandlung muriner Osteoblasten mit Calcitriol (Lee *et al.* 2002). Eine erhöhte mRNA-Expression des *Il-1 β* zeigten Bhalla *et al.* nach Inkubation humaner monozytärer Zelllinien HL-60 und U937 mit Calcitriol (Bhalla *et al.* 1991). Schließlich belegten Liu *et al.* die VDR-Abhängigkeit der *Il-1*-Expression nach Behandlung primärer humaner Monozyten mit 1,25(OH) $_2$ D (Liu *et al.* 2009).

Da IL-1 α als einziges der untersuchten Zytokine nach Calcitriol-Inkubation vermehrt sezerniert wurde, stellt sich die Frage, welche Rolle IL-1 α bei der Wirkung des metabolisch aktiven Vitamin D hat. Eine Erklärung dafür bietet die Arbeit von Maund *et al.* Auf der Suche nach neuen Signalwegen und Targets 1,25(OH) $_2$ D-vermittelter Effekte im Zusammenhang mit Chemoprävention des Prostatakrebs stellten Maund *et al.* anhand systembiologischer Untersuchungen von Microarrays in Prostata-Vorläuferzellen/-Stammzellen ein Netzwerk auf, basierend auf Signalwegen, Protein-Gen-, Protein-Protein-Interaktionen und biologischen Funktionen (Maund *et al.* 2011). Diese Analysen ergaben, dass als Resonanz auf Calcitriol-Signalvermittlung IL-1 α eine zentrale Rolle bei Gen- und Protein-Interaktionen spielt und lassen vermuten, dass IL-1 α die antiproliferativen Effekte des 1,25(OH) $_2$ D vermittelt (Kong *et al.* 2006; Maund *et al.* 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum antiproliferativen Effekt des Calcitriols sowie eine erhöhte *Il-1*-Expression in murinen myeloiden Zellen, stehen im Einklang mit dieser These. Der Einfluss des Calcitriols auf Transkriptionsebene beschränkt sich hierbei nicht nur auf *Il-1*. Auch *Il-6* wies nach Behandlung mit Calcitriol erhöhte mRNA-Expressionswerte auf. In der höchsten Calcitriol-Konzentration von 100 nM wurde eine $9,5 \pm 3,6$ -fach erhöhte *Il-6*-Expression erreicht. Dies kann unter anderem auch durch die erhöhte IL-1 Sekretion erklärt werden. Es ist beschrieben, dass IL-1 α/β die Immunantwort regulieren. Nach Bindung des IL-1-Rezeptors aktivieren sie den NF- κ B-Signalweg und darüber die nachgeschaltete Expression des Zytokins *IL-6* (Lacey *et al.* 1993; Lee *et al.* 2002; Orjalo *et al.* 2009).

Auf die Produktion von Stickoxid (NO) zeigte Calcitriol eine leichte Suppression ohne zusätzliche Stimulation myeloider Zellen mit LPS. Die Nitrit-Konzentration in Mediumüberschständen sank durchschnittlich um 15 % nach 48 h-Behandlung mit 100 nM Calcitriol. Andere Forschungsgruppen machten ebenfalls den Befund verringerter NO-Ausschüttung in unterschiedlichen Zellsystemen wie Keratinozyten, Makrophagen oder Mikroglia, welcher auf Suppression der NO-Synthase zurückzuführen war und vermuten, dass 1,25(OH) $_2$ D eine schützende Funktion in Zellen hat, darunter z.B. vor DNA-Schäden durch UV-Strahlung (Garcion *et al.* 1997; Gupta *et al.* 2006).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die wichtige Rolle des Vitamin D Metaboliten Calcitriol im Immunsystem, wenn auch nur ein kleiner Ausschnitt davon untersucht wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Calcitriol nicht nur als Immunmodulator per se, sondern auch als Effektor bei der Regulation von Signalwegen fungiert.

6.4.2.2 Einfluss des 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins

Neben den vielfältigen akuten, subakuten und chronischen toxischen Effekten des TCDD auf den Organismus stellt auch das Immunsystem ein wichtiges Target für das prominenteste und toxikologisch potenteste Dioxin dar. In Tierversuchen zeigte sich eine Reihe verschiedener immunologischer Effekte einschließlich Thymusinvolution, geschwächter Abwehrkräfte gegenüber Infektionen sowie unterdrückter Zell-vermittelter Immunantwort (Kerkvliet, 1995; Fan *et al.* 1997; Hundeiker *et al.* 1999; Nohara *et al.* 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des TCDD auf Zytokin-Sekretion und Zytokin-mRNA-Expression in murinen myeloiden Zellen untersucht.

Innerhalb der analysierten Inkubationsdauer von 48 h hatte TCDD im Konzentrationsbereich von 10^{-12} – 10^{-8} M keine Auswirkungen auf die Sekretion der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α in murinen myeloiden Zellen. Sowohl bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit TCDD und LPS als auch ohne Anwesenheit von LPS blieb der Zytokin-Spiegel auf dem Niveau der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Ein adäquater Vergleich der erhaltenen Daten mit der Literatur gestaltet sich auf Grund unterschiedlicher Durchführungen bezüglich Zellsystem, Inkubationskonzentrationen und -dauer als schwierig. Dabei differieren die Beobachtungen einschließlich unveränderter sowie erhöhter Zytokin-Sekretion im Zuge einer TCDD-Inkubation. So finden z.B. Lang *et al.* und Connor *et al.* keine Veränderung der Sekretion oder Genexpression von TNF- α , IL-1 oder IL-6 in humanen Monozyten und Alveolarmakrophagen bzw. murinen Keratinozyten und Fibroblasten *in vitro* (Connor *et al.* 1994; Lang *et al.* 1998). Eine erhöhte Sekretion der inflammatorischen Zytokine steht meist in Verbindung mit einer zusätzlichen Stimulation der Zellen (LPS, PHA etc.) – vor, simultan oder der TCDD-Inkubation nachgeschaltet (Moos *et al.* 1997; Rier *et al.* 2001; Peltier *et al.* 2013). Dies deutet darauf hin, dass TCDD eine bereits vorhandene oder nachfolgende Entzündungsreaktion steigert. In dieser Arbeit konnte bei simultaner Inkubation myeloider Zellen mit TCDD und LPS keine Veränderung der Zytokin-Sekretion festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass die verwendete LPS-Konzentration (1 μ g/ml) eventuell zu hoch war, um einen modulierenden Effekt des TCDD beobachten zu können, auf Grund der zu starken Reaktion myeloider Zellen auf LPS. Ein weiterer Punkt ist die eingesetzte Konzentration des TCDD von maximal 10^{-8} M. Cheon *et al.* beobachteten in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 eine Steigerung der TNF- α -Sekretion bei einer TCDD-Konzentration von 50 nM und einer LPS-Konzentration von nur 1 ng/ml (Cheon *et al.* 2007).

Auf mRNA-Ebene konnten durch 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit TCDD geringe induktive Effekte hinsichtlich der Zytokin-Expression festgestellt werden. Bei Tnf- α erreicht die relative Expression ihr Maximum bei einer TCDD-Konzentration von 10^{-10} M mit

rund 1,4-fach erhöhter Expression und war im Vergleich zu den restlichen drei Interleukinen am geringsten. Mit einer maximalen Expression von rund 1,6-fach (10^{-9} M TCDD) und 3,3-fach (10^{-10} M TCDD) folgen *Il-1 α* und *Il-1 β* . Den höchsten Einfluss auf die mRNA-Expression hatte TCDD in diesem Fall auf *Il-6* mit einer rund 4,1-fachen Erhöhung in einer Konzentration von 10^{-9} M. Bei höherer TCDD-Konzentration (10^{-8} M) sank die relative Expression leicht bei allen vier Zytokinen, da bei dieser Konzentration die Sättigung vermutlich erreicht ist. Unterschiedliche Effekte des TCDD auf die Genexpression von Zytokinen werden in der Literatur beschrieben. Vogel *et al.* fanden beispielsweise in der humanen Makrophagen-Zelllinie U937 nach 24 h-Inkubation mit 40 nM TCDD eine rund 8-fach höhere *TNF- α* -Expression, aber nur eine 0,5-fache-Expression des *IL-6* im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vogel *et al.* 2005). Cheon *et al.* ermittelten eine rund 3-fach erhöhte Expression für *TNF- α* und rund 1,5-fach erhöhte Expression für *IL-1 β* nach 20 h-Behandlung humaner THP-1-Zellen mit 75 nM TCDD (Cheon *et al.* 2007). Gesteigerte Zytokin-Expression konnten auch bei *in vivo* Behandlungen von Mäusen nach oraler Gabe von TCDD festgestellt werden. Untersuchungen der mRNA in der Leber zeigten erhöhte Genexpressionen von *Il-1 α/β* sowie *Tnf- α* (Seibel, Dissertation 2014; Pierre *et al.* 2014).

Des Weiteren hatte TCDD in unstimulierten myeloiden Zellen keinen Einfluss auf die NO-Produktion. Im Griess-Assay zeigte sich eine Nitrit-Konzentration von durchschnittlich 8 μ M sowohl bei der Lösungsmittelkontrolle als auch bei Behandlung der Zellen für 48 h mit TCDD bis zu einer Konzentration von 10^{-8} M. Simultane Inkubation der Zellen mit LPS (1 μ g/ml) und TCDD (10^{-12} – 10^{-8} M) bewirkte eine signifikante, konzentrationsabhängige Steigerung der Nitrit-Konzentration im Mediumüberstand muriner myeloider Zellen. Bei einer TCDD-Konzentration von 10^{-9} M stieg diese durchschnittlich um 25 % verglichen mit DMSO. Es finden sich nur wenige Studien, welche die NO-Produktion in myeloiden Immunzellen nach TCDD-Behandlung untersuchten. So fanden Bankoti *et al.* einen gegenteiligen Effekt. Nach Behandlung muriner dendritischer Zellen mit TCDD und anschließender LPS-Stimulation sank die NO-Konzentration im Mediumüberstand signifikant um 75 %, wobei hier eine wesentlich längere Behandlung mit TCDD über sieben Tage erfolgte (Bankoti *et al.* 2010). In anderen Zellsystemen wie der Ratten-Nebennierenzelllinie PC12 oder Ratten-Mikrogliazellen HAPI zeigte TCDD einen konzentrationsabhängigen Anstieg der NO-Konzentration im Mediumüberstand durch Aktivierung der NO-Synthase (NOS) (Li *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2014). Es wird vermutet, dass Aktivierung der NO-Synthase und höhere NO-Produktion in Zellen zur apoptotischen Wirkung des TCDD beitragen (Jiang *et al.* 2014). Die Daten dieser Arbeit zur NO-Ausschüttung zusammen mit den Ergebnissen zur reduzierten Viabilität myeloider Zellen nach Inkubation mit TCDD und LPS unterstützen diesen Aspekt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TCDD bei vorliegender/gleichzeitiger Infektion, welche in der vorliegenden Arbeit durch Behandlung myeloider Zellen mit LPS simuliert wurde, in erster Linie eine signifikante vitalitätsreduzierende Wirkung auf myeloide Immunzellen hat. Die Sekretion der untersuchten Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α bleibt durch Behandlung mit TCDD unbeeinflusst, während auf mRNA-Ebene ein induktiver Effekt beobachtet werden konnte. Weiterhin steigert TCDD signifikant die LPS-vermittelte Ausschüttung von NO in myeloiden Zellen, was vermutlich mit zur reduzierten Vitalität der Zellen beiträgt. Diese Ergebnisse geben einen Einblick in die Wirkung des TCDD auf Zellen des Immunsystems und deuten seine immuntoxische Wirkung an.

6.4.3 Rezeptoren und CYPs

In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass die meisten Zellen des Immunsystems sowohl den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) als auch den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) besitzen. Diese Tatsache macht deutlich, dass die beiden Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen (Veldman *et al.* 2000; Deluca *et al.* 2001; Esser *et al.* 2009; Stockinger *et al.* 2011). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Ahr* und *Vdr* sowie der zugehörigen Cytochrom P450 Enzyme *Cyp1a1* und *Cyp24a1* nach Behandlung muriner myeloider Zellen, aber auch humaner Hepatomzellen mit TCDD und/oder Calcitriol untersucht.

Im Zusammenhang mit dem Ah-Rezeptor ist CYP1A1 das wohl am besten untersuchte Target und gilt als Biomarker für die AhR-Aktivierung. Nach 48 h-Inkubation humaner Hepatomzellen HepG2 mit TCDD im Konzentrationsbereich von 10^{-12} bis 10^{-8} M zeigte sich im EROD-Assay eine höchst signifikante Steigerung der CYP1A1-Aktivität auf durchschnittlich 328 ± 97 pmol/mg*min (10^{-9} M TCDD). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch auf mRNA- und Protein-Ebene wider. *CYP1A1* erreichte in einer TCDD-Konzentration von 10^{-9} M eine hoch signifikant erhöhte, durchschnittlich 403 ± 270 -fache Genexpression relativ zu DMSO. Auf Proteinebene war nach Behandlung der Zellen mit dem Dioxin eine deutliche CYP1A1-Bande bei 52 kDa sichtbar. Diese Daten korrelieren mit denen zahlreicher Publikationen und bestätigen die Aktivierung des Ah-Rezeptors durch das Umweltgift TCDD in der Leber als klassisches Zielorgan im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus (Schrenk *et al.* 1995; Peters *et al.* 2004; Silkworth *et al.* 2005; Westerink *et al.* 2007; Lohr, Dissertation 2013).

Verglichen mit hepatozellulären Systemen gibt es zur Aktivität und Expression des CYP1A1 in Immunzellen weitaus weniger Untersuchungen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit murine myeloide Zellen nach 10-tägiger Ausdifferenzierung in Gegenwart von GM-CSF für

48 h mit TCDD behandelt und hinsichtlich der Cyp1a1-Aktivität untersucht. Im Gegensatz zu Hepatomzelllinien HepG2, H4IIE oder Hepa-1, konnte in murinen myeloiden Zellen im EROD-Assay auch bei höchster untersuchter TCDD-Konzentration von 10^{-8} M keine Umwandlung des 7-Ethoxyresorufin zum fluoreszierenden Resorufin detektiert werden, auch nach Modulationen der Bedingungen wie höhere Zelldichte, längere Inkubationsdauer bis 72 h, zusätzliche Stimulation mit LPS (1 μ g/ml), war keine EROD-Aktivität messbar (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen scheinen für den EROD-Assay kein passendes System darzustellen. Auch andere Forschungsgruppen, stellten in ähnlichen Zelltypen wie Ratten-Splenozyten oder Ratten-/Mauslymphozyten aus peripherem Blut *in vitro* eine sehr geringe bis keine EROD-Aktivität fest (Stephen *et al.* 1997; van Ede *et al.* 2014). Einen etwas besseren Response im EROD-Assay findet man in Lymphozyten und Splenozyten nach *in vivo* Behandlung mit AhR-Agonisten (Stephen *et al.* 1997; Dye *et al.* 2001; Chanin *et al.* 2013). Die Ergebnisse des EROD-Assays zusammen mit dem Befund, dass bei murinen myeloiden Zellen auch auf Protein-Ebene (Western Blot) keine Bande für Cyp1a1 detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 70), unterstreichen die Tatsache, dass myeloide Zellen, im Gegensatz zu hepatozellulären Systemen, nicht auf die Detoxifizierung von Fremdstoffen spezialisiert sind.

Die Aktivierung des Ah-Rezeptors durch TCDD zeigte sich in murinen myeloiden Zellen erst auf mRNA-Ebene. Wobei die mRNA-Expression des *Ahr* selbst relativ niedrig ausfiel. Nach 48 h-Behandlung mit 1 nM TCDD stieg diese auf maximal $1,9 \pm 1,4$ -fach an. Auf Proteinebene konnte keine steigende Bandenintensität des AhR beobachtet werden. Diese blieb auch in höchster TCDD-Konzentration von 10^{-8} M auf dem Basallevel. Hingegen stieg die Genexpression des AhR-abhängigen Phase-I-Enzyms *Cyp1a1* konzentrationsabhängig an. In einer TCDD-Konzentration von 1 nM stieg diese statistisch signifikant auf rund das 30 ± 25 -fache an bezogen auf DMSO. Die hohe Schwankung ist unter anderem auf interindividuelle Unterschiede der Tiere, wie z.B. deren Gesundheits- und Immunstatus, zurückzuführen. Nichtsdestotrotz unterstreichen diese Ergebnisse die Rolle des AhR im Immunsystem und stehen in Korrelation mit bereits publizierten Befunden. So haben van Ede *et al.* nach Inkubation muriner Splenozyten mit TCDD eine ca. 22-fach erhöhte *Cyp1a1*-mRNA-Expression festgestellt (van Ede *et al.* 2014). Des Weiteren wird in der Literatur eine Hochregulation der *Cyp1a1/CYP1A1*-Expression in Immunzellen nach Stimulation mit LPS, PHA, PMA oder ähnlichen Stimulanzien beschrieben (van Duursen *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2010; Hao *et al.* 2013; Hanieh, 2014; Prigent *et al.* 2014). Es wird vermutet, dass die gesteigerte AhR-Expression eine schützende Funktion gegenüber einer persistenten Inflammation hat, da eine Aktivierung von Makrophagen *Ahr*-defizienter Mäuse zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF- α und einer erniedrigten Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 führte (Kimura *et al.* 2009; Hao *et al.* 2013). Aktuellste *in vivo/in vitro* Studien von Vogel *et al.* zeigen, dass die Aktivierung des AhR und gesteig-

gerter *Cyp11a1*-Expression durch Behandlung mit LPS, aber auch klassisch mit TCDD, stark vom Transkriptionsfaktor NF- κ B (RelA) abhängig ist und vermuten eine Bindung der NF- κ B-Untereinheit RelA an den Ah-Rezeptor (Vogel *et al.* 2014). Zu dem Aspekt erhöhter *Cyp11a1*-Expression durch LPS waren die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nur teilweise konsistent zur Literatur: 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit LPS verursachte zwar eine signifikante Induktion der *Cyp11a1*-Expression, diese stieg im Durchschnitt auf das $67,2 \pm 45,4$ -fache an (Anhang, Abbildung 105) und lag somit sogar höher als die durchschnittliche, durch TCDD-Inkubation erreichte *Cyp11a1*-Expression (30 ± 25 -fach). Eine Co-Inkubation der Zellen mit TCDD und LPS führte jedoch nicht zu einer Steigerung der *Cyp11a1*-Expression. Im Gegenteil, nach Stimulation muriner myeloider Zellen mit TCDD und LPS für 48 h zeigte sich eine geringere relative *Cyp11a1*-Genexpression als durch TCDD ohne LPS-Inkubation und war durchschnittlich 5,6-fach erhöht (Anhang, Abbildung 101). Auf Grund der hohen Schwankungen ist aber ein genauer Vergleich der Daten schwierig. An dieser Stelle muss auch erwähnt werden, dass die Isolierung der RNA aus LPS-stimulierten myeloiden Zellen oft nur eine unzureichende Ausbeute und RNA-Qualität für weitere PCR-Untersuchungen lieferte. Die Daten zu Genexpression in LPS-stimulierten Zellen korrelieren zwar teilweise mit der Literatur, sollten aber dennoch kritisch betrachtet werden.

Eine 48 h-Behandlung muriner myeloider Zellen mit Calcitriol im Konzentrationsbereich von 1-100 nM führte zu einem konzentrationsabhängigen, signifikanten Anstieg der *Vdr*-Expression. Bei 30 nM stieg diese statistisch signifikant auf $9,5 \pm 5,4$ -fach, wobei ein statistisch hoch signifikanter Anstieg von $11,1 \pm 6,0$ -fach nach Inkubation mit 100 nM ermittelt wurde. Diese Ergebnisse konnten auch auf Protein-Ebene beobachtet werden. Im Western Blot von Homogenaten Calcitriol-behandelter myeloider Zellen zeigte sich für den Vitamin-D-Rezeptor eine konzentrationsabhängig steigende Bandenintensität bei 51 kDa. Es ist schon länger bekannt, dass der Vitamin-D-Rezeptor in Antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, konstitutiv exprimiert wird und durch seine Liganden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* induzierbar ist (Provvedini *et al.* 1983; Brennan *et al.* 1987; Veldman *et al.* 2000; Penna *et al.* 2007; Guillot *et al.* 2010). Nach Bindung seines Liganden $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agiert VDR als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression verschiedener Gene, darunter vor allem das Calcitriol-abbauende Enzym 24-Hydroxylase *Cyp24a1*. Die Expression dieses Enzyms ist eine wichtige zelluläre Resonanz und wird als Mechanismus für den Katabolismus des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ benötigt. *Cyp24a1* katalysiert den Abbau des Calcitriol in mehreren Schritten zu Calcitriol-Säure (Makin *et al.* 1989; Masuda *et al.* 2005). In murinen myeloiden Zellen konnte nach 48-stündiger Behandlung mit Calcitriol eine massive, konzentrationsabhängige Hochregulation der *Cyp24a1*-Genexpression detektiert werden. Diese erreichte mit 13491 ± 8825 -facher Erhöhung einen Höchstwert bei einer Calcitriol-Konzentration von 30 nM und war im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO statistisch

hoch signifikant. Neben der Genexpression konnte in der vorliegenden Arbeit der konzentrationsabhängige, induktive Effekt des Calcitriols gegenüber Cyp24a1 auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Während in Homogenaten mit DMSO behandelte myeloide Zellen bei 65 kDa für Cyp24a1 keine Bande detektiert werden konnte, stieg die Bandenintensität in Homogenaten mit Calcitriol behandelte Zellen konzentrationsabhängig an. Diese Resultate belegen, dass murine Knochenmarkszellen nach 10-tägiger Ausdifferenzierung zu Immunzellen (u.a. dendritischen Zellen und Makrophagen) ein funktionell aktives und durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induzierbares Cyp24a1 besitzen. Dies steht in Korrelation zu den Befunden anderer Arbeitsgruppen. In humanen monozytären Zelllinien U937 und THP-1, aber auch in isolierten Lymphozyten aus humanem peripherem Blut sowie murinen und humanen dendritischen Zellen finden sich ebenfalls stark erhöhte Expressionswerte, im Bereich von 600- bis 10000-fach, für das $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -responsive Enzym *Cyp24a/CYP24A1* auf mRNA- und Protein-Ebene nach Behandlung der Zellen mit Calcitriol im vergleichbaren Konzentrationsbereich (Penna *et al.* 2007; Díaz *et al.* 2011; Gambhir *et al.* 2011; Matsunawa *et al.* 2012).

Eine zur Calcitriol-Behandlung simultane Stimulation mit LPS führte zur drastischen Absenkung der *Cyp24a1*-Genexpression. Nach 48 h-Inkubation myeloider Zellen mit Calcitriol und LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) konnte zwar noch ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die *Cyp24a1* mRNA beobachtet werden, jedoch nur auf einem sehr niedrigen Level. Die maximale Expression betrug nur noch $5,0 \pm 3,7$ -fach bei 30 nM Calcitriol (vgl. Anhang, Abbildung 104). Verglichen mit durchschnittlicher mRNA-Expression bei gleicher Calcitriol-Konzentration ohne LPS Co-Inkubation (13491 ± 8824 -fach) entspricht die Expression nur noch 0,04 %. Dieses Ergebnis steht in Korrelation zu Beobachtungen anderer Forschungsgruppen und führt zu der Annahme, dass der Vitamin-D-Rezeptor und der auf LPS reagierende Toll-like-Rezeptor (TLR) in einem Zusammenhang stehen (Nelson *et al.* 2010; Gambhir *et al.* 2011). Es wird vermutet, dass die Aktivierung des TLR die Transkription von *Cyp24a1* hemmt, um dadurch einen mitunter VDR-abhängigen, antimikrobiellen Signalweg zu aktivieren, was im Falle einer Infektion, gegenüber dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Metabolismus, Priorität hätte. Zur Bestätigung, ob bei einer LPS-Stimulation der Calcitriol-Metabolismus herabgesenkt wird, sollte in Zukunft der Gehalt des Calcitriols im Mediumüberstand quantifiziert werden. Das Timing der Calcitriol-Gabe/VDR-Aktivierung scheint aber auch hier eine wichtige Rolle zu spielen. Denn wird der VDR schon vor LPS-Stimulation mit Calcitriol aktiviert, fällt die Hemmung der *Cyp24a1*-Expression wesentlich geringer aus (Nelson *et al.* 2010; Gambhir *et al.* 2011). Zusammen mit der zuvor diskutierten Hemmung der TLRs durch Calcitriol im Hinblick auf die Zytokinausschüttung (vgl. Kapitel 6.4.2.1), gibt dies einen Einblick in die antiinflammatorische Wirkweise des biologisch aktiven Vitamin D Metaboliten Calcitriol und über die Interaktion des VDR mit den TLRs.

6.4.4 Wechselwirkung zwischen AhR und VDR?

Während es über die Interaktion des Ah-Rezeptors mit anderen Rezeptoren wie z.B. Glucocorticoid-Rezeptor, Östrogen-Rezeptor oder Retinoid-Rezeptor bereits zahlreiche Untersuchungen gibt (Monostory *et al.* 2009), ist über den Zusammenhang und die Wechselwirkung zwischen dem AhR und dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR), und deren Signalwegen nur wenig bekannt. Deshalb waren im Rahmen dieser Arbeit die Genexpressionen von *Cyp24a1*, *Cyp1a1*, *Ahr* und *Vdr* nach Behandlung myeloider Zellen mit TCDD und/oder Calcitriol von besonderem Interesse.

Matsunawa *et al.* berichteten kürzlich von einem verstärkten Benzo[a]pyren-Metabolismus via *CYP1A1*-Expression durch Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptors. Nach Co-Inkubation mit Calcitriol und Benzo[a]pyren (BaP) oder TCDD in humanen Makrophagen-Zelllinien U937 und THP-1 stellten sie eine signifikant höhere *CYP1A1*-Expression fest, verglichen mit der Behandlung ohne Calcitriol und folgerten daraus, dass *CYP1A1* ein neues Targetgen des VDR darstellt (Matsunawa *et al.* 2012). Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten nach 48 h-Inkubation ausdifferenzierter muriner myeloider Zellen mit TCDD (10^{-12} - 10^{-8} M) eine konzentrationsabhängige, statistisch signifikante Steigerung der *Cyp1a1*-Expression. Diese erreichte in einer TCDD-Konzentration von 1 nM eine $39,0 \pm 21,9$ -fache Erhöhung (vgl. Abbildung 61). Nach Co-Inkubation der Zellen mit Calcitriol (1-100 nM) und TCDD (1 nM) konnte jedoch keine zusätzliche Steigerung der Expression beobachtet werden. Im Gegenteil, bei kleinen Calcitriol-Konzentrationen (1 nM und 3 nM) war die Expression des AhR-Targetgens *Cyp1a1* sogar statistisch signifikant geringer verglichen mit der Expression durch 1 nM TCDD allein. In höheren Konzentrationen des Calcitriols erreichte die Expression wieder mit TCDD vergleichbare Werte (vgl. Abbildung 61). Insgesamt unterliegen die Werte relativ hohen Schwankungen, was unter anderem auf interindividuelle Unterschiede der Tiere zurückgeführt werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass die *Cyp1a1*-Expression bei Co-Inkubation mit Calcitriol und TCDD stark von der Inkubationszeit abhängig ist. Denn nach Reduktion der Inkubationszeit von 48 h auf 24 h konnte in myeloiden Zellen mit Calcitriol und TCDD ein Synergismus bezüglich der *Cyp1a1*-Expression beobachtet werden. TCDD verursachte in einer Konzentration von 10^{-9} M eine $12,3 \pm 9,1$ -fach erhöhte Expression bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Expression stieg durch simultane Behandlung mit 30 nM Calcitriol auf $62,3 \pm 34,5$ -fach (vgl. Abbildung 90 und Anhang, Abbildung 62). Verglichen mit der Behandlung nur einer der beiden Verbindungen, ergibt sich dieser Unterschied als statistisch signifikant und korreliert auch mit den Ergebnissen von Matsunawa *et al.* 2012. Eine Gegenüberstellung der *Cyp1a1*-Expression in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer macht den Unterschied nochmal deutlich (Abbildung 90).

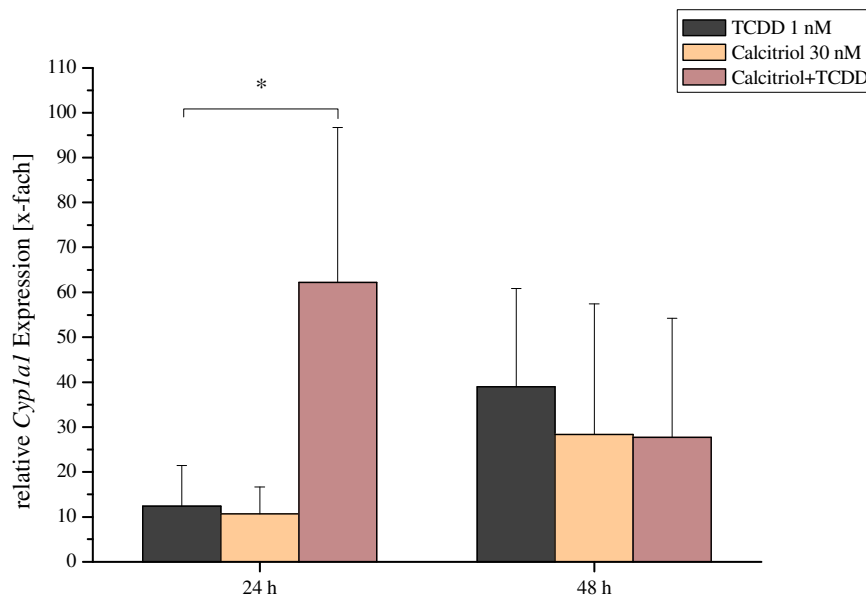


Abbildung 90: relative *Cyp1a1* Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. 24 h/48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (30 nM), TCDD (1 nM) und Co-Inkubation mit Calcitriol + TCDD (30 nM + 1 nM). MW \pm SD. $n \geq 4$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Für vollständige Statistik zu einzelnen Untersuchungen vgl. Abbildung 61 und Abbildung 62.

Es stellt sich die Frage wie es zu diesem Unterschied kommt und wieso nach 48 h kein Synergismus mehr beobachtet werden kann? Verschiedene Forschungsgruppen berichten, dass sich Expressionsmuster verschiedener Gene in Zellen in Abhängigkeit der Zeit unterschiedlich ändern. So stellten beispielsweise Li *et al.* fest, dass bei Behandlung der humanen Hepatomzelllinie HepG2 mit TCDD die Expression von *CYP1A1* bei längerer Inkubationsdauer als 24 h sinkt. Die Expression von *IL-1 β* oder *TNF- α* hingegen steigt mit längerer Behandlung stetig an (Li *et al.* 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in murinen Zellen keine Reduktion der *Cyp1a1*-Expression mit TCDD beobachtet werden. Nach 48 h stieg diese im Vergleich zu 24 h-Behandlung deutlich weiter an (Abbildung 90). Der fehlende Synergismus hinsichtlich der *Cyp1a1*-Expression bei längerer Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol könnte daher folgendermaßen erklärt werden: in murinen myeloiden Zellen wurde durch Behandlung mit Calcitriol die Expression des Calcitriol-abbauenden Enzyms Cyp24a1 auf mRNA- als auch auf Proteinebene massiv erhöht. Dies geht auch mit gesteigerter katalytischer Aktivität des Enzyms einher. Folglich wird bei längerer Behandlung auch mehr Calcitriol metabolisiert. Dies hat zur Folge, dass der Effekt des Calcitriols auf Expression anderer VDR-abhängiger Gene verringert wird. Einen solchen zeitabhängigen Effekt des Calcitriols auf VDR-abhängige Gene beobachteten kürzlich auch Hummel *et al.* Bei Inkubation der Kolonkarzinomzelllinie

COGA-1A mit Calcitriol stellten sie eine zeitabhängig reduzierte Expression VDR-abhängigen Gene *TRPV6*, *IGFBP3* aber auch *CYP3A4* fest (Hummel *et al.* 2014). Der Aspekt des zeitabhängigen Synergismus unterstreicht nochmals den Zusammenhang des AhR mit dem VDR bezüglich der *Cyp1a1*-Expression. Die Untersuchungen zum Effekt des Calcitriol bzw. TCDD in Bezug auf die Inkubationsdauer wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nur kurz angerissen, bieten aber eine Grundlage für weitere Untersuchungen.

Matsunawa *et al.* vermuteten als Grund für den Synergismus eine direkte Bindung des VDR an die DRE-Region des CYP1A1-Promoters und belegten dies anhand eines *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) (Matsunawa *et al.* 2012). Dieser Aspekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwar teilweise reproduziert werden, sollte aber kritisch betrachtet werden. Für die Bindung an den humanen CYP1A1-Promoter wurden Kernextrakte der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 verwendet, welche zuvor mit TCDD oder Calcitriol behandelt wurden, da HEK293-Zellen sowohl den AhR als auch den Vitamin-D-Rezeptor exprimieren. Diese Kernextrakte verursachten bei der elektrophoretischen Trennung auch einen deutlichen „Shift“ im Vergleich zur freien DNA des CYP1A1-Promoters, was für eine Protein-DNA-Interaktion spricht (vgl. Abbildung 75, Abbildung 76). Kritisch zu bewerten ist hierbei jedoch das Auftreten beider Proteine – VDR und AhR – in den Kernfraktionen der HEK-Zellen, unabhängig davon mit welcher der beiden Substanzen (TCDD oder Calcitriol) behandelt wurde (vgl. Abbildung 74). Deshalb ist hierbei eine Unterscheidung, ob nun VDR oder AhR an die Promoter-Sequenz gebunden hat, schwierig. Um dies weiter zu klären, wurden zusätzlich jeweils Antikörper gegen AhR bzw. VDR verwendet. Ein Supershift mit dem jeweiligen Antikörper konnte aber nicht beobachtet werden, eventuell auf Grund unzureichender Trennung der Proben bei Verwendung einer kleinen Elektrophoresekammer (vgl. Abbildung 75, Abbildung 76). Weitere Analysen, eventuell auch mit synthetischen oder aufgereinigten VDR/AhR Proteinen, sind deshalb nötig, um diesen Aspekt näher zu untersuchen.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Calcitriol selbst auch zur erhöhten Expression des *Cyp1a1* führt. Die Expressionshöhe lag dabei im gleichen Größenordnungsbereich wie nach Behandlung der Zellen mit 1 nM TCDD (Abbildung 90). Dieses Resultat divergiert von den Beobachtungen von Matsunawa *et al.*, sie hatten bei ihren Untersuchungen durch Inkubation mit dem biologisch aktiven Vitamin-D-Metaboliten keine Induktion des *Cyp1a1* festgestellt (Matsunawa *et al.* 2012). Diesen unterschiedlichen Ergebnissen können mehrere Faktoren zugrunde liegen. Zum einen muss beachtet werden, dass im Gegensatz zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, Matsunawa *et al.* bei ihren Studien keine primären Zellen, sondern immortalisierte humane Zelllinien verwendet haben, zum anderen liegt auch ein Unterschied in der gewählten Spezies vor. Primäre

und immortalisierte, sowie humane und murine Zellen können sich in ihrer metabolischen Aktivität und Genexpressionsmustern stark unterscheiden. Betrachtet man beispielsweise die Cyp1a1-Aktivität und *Cyp1a1*-Expression in primären Hepatozyten der Ratte, ist diese deutlich geringer als in der entsprechenden Hepatomzelllinie H4IIE (Zeiger *et al.* 2001; Nesor, unveröffentlichte Dissertation 2014). Im Fall humaner Hepatozyten und der entsprechenden Hepatomzelllinie HepG2 ist das Verhältnis wiederum umgekehrt. Primäre Hepatozyten weisen eine deutlich höhere *CYP1A1*-Genexpression auf als HepG2-Zellen (Wilkening *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2006; Lohr, Dissertation 2013). Zwischen den Spezies liegen auch deutliche Unterschiede vor. Am Beispiel der *Cyp1a1*-Expression in primären Hepatozyten zeigten aktuelle Untersuchungen von Forgacs *et al.*, dass Maushepatozyten mit einem EC_{50} -Wert von 0,05 nM verglichen mit Ratten ($EC_{50} = 0,08$ nM) und humanen Hepatozyten ($EC_{50} = 0,1$ nM) am stärksten auf TCDD ansprechen (Forgacs *et al.* 2013). Es könnte also sein, dass die hier verwendeten primären myeloiden Zellen der Maus eine höhere Suszeptibilität gegenüber Calcitriol und der damit zusammenhängenden *Cyp1a1*-Expression aufweisen.

Die Möglichkeit, dass es sich hierbei um eine teilweise AhR-unabhängige *Cyp1a1*-Expression handelt, sollte auch in Betracht gezogen werden. Beispielsweise zeigten Guigal *et al.* eine AhR-unabhängige *Cyp1a1*-Induktion auf transkriptioneller Ebene in CaCo-2 Zellen durch Behandlung der Zellen mit Serum verschiedener Spezies. Die Expressionshöhe lag dabei im gleichen Bereich wie die durch Inkubation mit 3-Methylcholanthren, einem bekannten AhR-Liganden (Guigal *et al.* 2000). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Induktion der *CYP1A1*-Expression auf Vitamin-D-Metaboliten im Serum zurückzuführen ist. Je nach Alter, Gesundheitsstatus, Ernährung und Jahreszeit liegt die Calcitriol-Konzentration im Serum im pM-Bereich. Die Konzentration des 25-Hydroxyvitamin-D ist im Serum hingegen viel höher – im nanomolaren Bereich (Bouillon *et al.* 1981; Chesney *et al.* 1981; Houghton *et al.* 2014). Bei Behandlung könnte 25(OH)D in die aktive Form (Calcitriol) umgewandelt werden und zur Induktion des *CYP1A1* geführt haben. Aus dem Serum kommendes Calcitriol bei Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kann ausgeschlossen werden. Da zur Kultivierung und Behandlung muriner myeloider Zellen hitzeinaktiviertes Kälberserum verwendet wurde. Calcitriol zeigte sich im Serum als stabil über mehrere Tage bei Raumtemperatur. Gegenüber hohen Temperaturen verliert es jedoch seine Stabilität (Duan *et al.* 2010; El-Khoury *et al.* 2012; Parashar *et al.* 2012).

Analysen mit dem AhR-Antagonisten CH223191 deuten aber zusätzlich darauf hin, dass es sich bei der *Cyp1a1*-Expression durch Calcitriol zumindest teilweise um einen AhR-abhängigen Effekt handelt. Die Expression des *Cyp1a1* nahm durch Vorbehandlung mit dem AhR-Antagonisten und anschließender Calcitriol-Inkubation deutlich ab, erwies sich bei der statistischen Analyse jedoch aufgrund hoher Standardabweichungen als nicht signifikant

($p=0,091$) (vgl. Abbildung 66). Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, ob die beobachtete, durch Calcitriol induzierte *Cyp11a1*-Expression vom Vitamin-D-Rezeptor abhängig ist. Der Versuch, im Vergleich zum AhR auch den Vitamin-D-Rezeptor zu hemmen, war jedoch erfolglos. In der Literatur wurde das Antihypertonikum Telmisartan als starker VDR-Inhibitor beschrieben. *In silico* Berechnungen von Marshall *et al.* ergaben für diese Verbindung eine inhibitorische Konstante von $K_i \approx 0,04$ nmol (Marshall *et al.* 2006). Eigene Untersuchungen mit Telmisartan in murinen myeloiden Zellen zeigten keinen antagonistischen Effekt. Im Gegenteil, die Vorbehandlung der Zellen mit Telmisartan (10-100 nM) und anschließende Inkubation mit Calcitriol führte zu noch höheren *Cyp24a1*-Expressionen (vgl. Abbildung 67). Ein Indiz dafür, dass die beobachtete *Cyp11a1*-Induktion durch Behandlung mit Calcitriol VDR-abhängig sein könnte, zeigten RT-PCR-Analysen von HepG2-Zellen nach Inkubation mit Calcitriol. Nach einer 48 h-Behandlung humaner Hepatomzellen mit der höchsten untersuchten Calcitriol-Konzentration (100 nM) stieg die *CYP11A1*-Expression nur marginal auf das $1,4 \pm 0,9$ -fache an. HepG2-Zellen exprimieren den Ah-Rezeptor und zeigen hohe *CYP11A1*-Expressionswerte nach Behandlung mit polychlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffen wie TCDD (vgl. Abbildung 37), doch wie Untersuchungen von Moya *et al.* zeigten, exprimieren HepG2 nur in sehr geringem Maße den Vitamin-D-Rezeptor (Moya *et al.* 2010). Dies könnte die geringe *CYP11A1*-Expression in HepG2-Zellen erklären und würde dafür sprechen, dass auch die Induktion der *Cyp11a1*-Expression durch Calcitriol in einem Zusammenspiel des VDR und AhR erfolgt. Welcher Mechanismus der *Cyp11a1*-Expression nach Behandlung der Zellen mit Calcitriol tatsächlich zugrunde liegt, sollte deshalb weiter untersucht werden.

Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression des *Cyp24a1* in murinen myeloiden Zellen untersucht. Nach Behandlung der Zellen mit Calcitriol wurde eine massive Expression des Enzyms festgestellt. Nach 24 h Inkubation stieg diese bei einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ Konzentration von 30 nM statistisch signifikant auf 2081 \pm 1323-fach (vgl. Abbildung 64). Nach Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h stieg diese weiter und ergab sich mit einer 13491 \pm 8825-fachen Erhöhung in der gleichen Konzentration als statistisch hoch signifikant (vgl. Abbildung 63). Diese Daten korrelieren mit bereits publizierten Ergebnissen: Matsunawa *et al.* beobachteten in der humanen Makrophagenzelllinie U937 nach 24 h-Inkubation mit 30 nM Calcitriol eine über 1500-fach erhöhte *CYP24A1*-Expression. Außerdem berichteten Matsunawa *et al.* von einer signifikanten Steigerung der *CYP24A1*-Expression bei simultaner Behandlung der Zellen mit BaP bzw. TCDD und Calcitriol und vermuteten eine durch BaP verstärkte VDR/RXR-Rekrutierung an den *CYP24A1*-Promoter (Matsunawa *et al.* 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein synergistischer Effekt auf Expression des Calcitriol-metabolisierenden Enzyms *Cyp24a1* durch Co-Inkubation myeloider Zellen mit TCDD und Calcitriol festgestellt werden. Nach 24 h Behandlung mit beiden Verbindungen lag die

Cyp24a1-Expression mit 1381 ± 1121 -facher Erhöhung im gleichen Bereich wie die erreichte Expression mit Calcitriol allein. Bei längerer Inkubationsdauer von 48 h war die Expression durch simultane Behandlung mit TCDD und Calcitriol sogar statistisch hoch signifikant um durchschnittlich 75 % geringer verglichen mit der Expression ohne TCDD. Die folgende Abbildung 91 stellt diese Ergebnisse nochmal gegenüber.

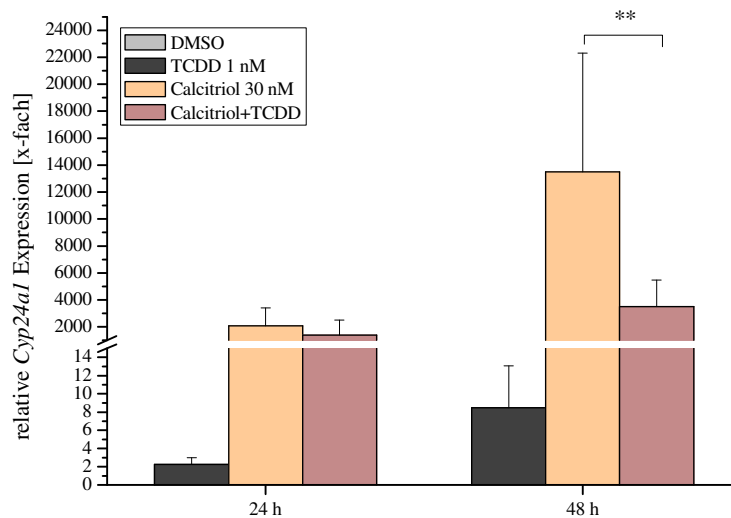


Abbildung 91: relative *Cyp24a1* Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. 24 h/48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (30 nM) und/oder TCDD (1 nM). MW \pm SD. $n \geq 4$. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$. Für Statistik einzelner Untersuchungen vgl. Abbildung 63 und Abbildung 62.

Weiterhin fällt auf, dass auch durch Inkubation mit TCDD die Expression des *Cyp24a1* steigt. In einer Konzentration von 10 nM TCDD wurde nach 48 h in murinen myeloiden Zellen eine $22,6 \pm 16,2$ -fache erhöhte *Cyp24a1*-Expression beobachtet. Diese befindet sich zwar verglichen mit Calcitriol in einem ganz anderen Größenordnungsbereich, ergibt sich jedoch bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO als statistisch hoch signifikant (vgl. Abbildung 63). Diesbezüglich gibt es bislang kaum Untersuchungen. Matsunawa *et al.* konnten nach Behandlung humaner Makrophagenzelllinien mit 10 nM TCDD keinen Effekt auf *Cyp24a1* feststellen (Matsunawa *et al.* 2009). Die bereits angesprochenen Unterschiede bezüglich Zellart und Spezies sollten hierbei auch nicht außer Acht gelassen werden. Da es sich bei den verwendeten murinen myeloiden Zellen nicht um eine immortalisierte Zelllinie, sondern um primäre Zellen handelt, bieten *in vivo* Untersuchungen zu dem beobachteten Ergebnis der

Cyp24a1-Induktion eine bessere Gegenüberstellung. So stellten Nishimura *et al.* bei 14-Tagealten C57BL/6-Mäusen, welche über Laktation mit TCDD exponiert wurden, signifikant erhöhte *Cyp27b1*- und *Cyp24a1*-mRNA-Expressionswerte in der Niere fest (Nishimura *et al.* 2009). Auch im Rahmen der Dissertation von Thomas Seibel wurden nach peroraler TCDD-Behandlung adulter AhR-defizienter C57BL/6-Mäuse in der Niere signifikant erhöhte Expressionen von *Cyp24a1* und *Cyp27b1* gefunden. Die Runterregulation des Gens *c-myc* deutet zusätzlich auf eine Beteiligung/Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptors (Seibel, Dissertation 2014). Diese Daten unterstreichen die Rolle des Ah-Rezeptors im Vitamin-D-Metabolismus sowie einen Zusammenhang zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren AhR und VDR.

Interessanterweise konnte zusätzlich beobachtet werden, dass durch das Blockieren des Dioxin-Rezeptors mit dem Antagonisten CH223191 auch die Expression des VDR-Targetgens *Cyp24a1* hoch signifikant gehemmt wurde. Diese betrug nach Vorbehandlung mit dem AhR-Antagonisten und anschließender 48 h-Inkubation mit 30 nM Calcitriol im Mittel nur noch 1 % verglichen mit der durchschnittlichen *Cyp24a1*-Expression ohne Hemmung des AhR (vgl. Abbildung 66). Diese Daten deuten stark auf eine AhR-Abhängigkeit des Vitamin-D-Rezeptors hin und lassen folgenden Zusammenhang vermuten: der VDR ist umso aktiver, wenn der „freie“ Ah-Rezeptor, ohne einen exogenen Liganden gebunden zu haben, vorliegt. Kommt ein AhR-Agonist – wie z.B. TCDD – ins Spiel, bindet dieser an den Ah-Rezeptor und aktiviert so die „klassische“ AhR-Signaltransduktion, darunter die Transkription von *Cyp1a1*. Folglich ist weniger des „freien“ AhR vorhanden, sodass die Aktivität des VDR und die nachgeschaltete *Cyp24a1*-Expression sinken. Wird der AhR durch einen Antagonisten – wie CH223191 – in seiner Funktion gehemmt, nimmt auch die Aktivität des VDR drastisch ab. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht schematisch den hypothetischen Zusammenhang von VDR und AhR in Bezug auf die *Cyp24a1*-Expression (Abbildung 92). Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass der AhR-Antagonist CH223191 in der Lage ist, auch den Vitamin-D-Rezeptor zu hemmen. Diesbezüglich gibt es jedoch bislang keine Untersuchungen.

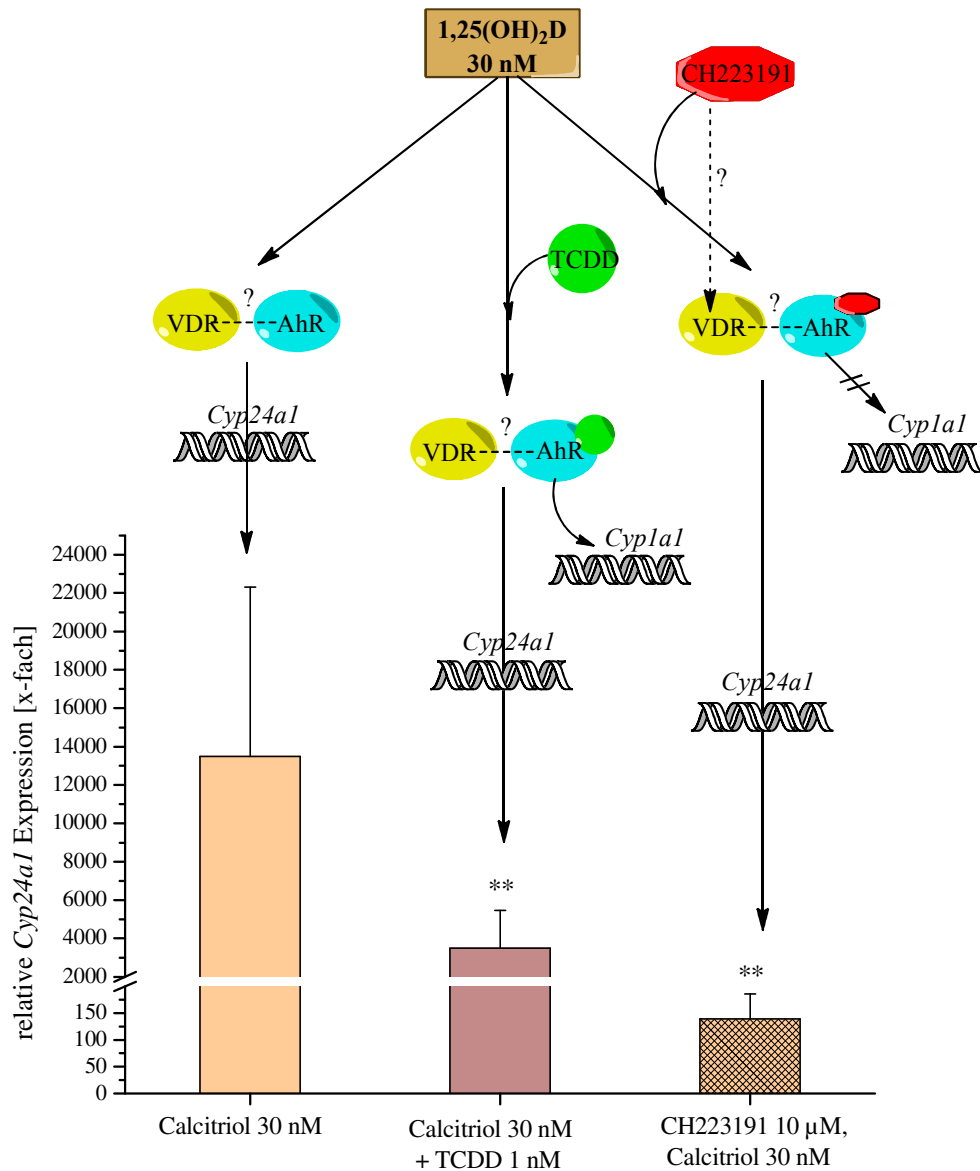


Abbildung 92: hypothetischer Zusammenhang der VDR-Aktivität vom AhR. Zum Diagramm: 48 h Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol (30 nM) / Calcitriol 30 nM + TCDD 1 nM / Vorbehandlung mit CH223191 für 4 h und anschließende Inkubation mit Calcitriol (30 nM). MW ± SD, n≥4. * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01; *** = p ≤ 0,001. Vgl. auch Abbildung 63, Abbildung 66.

Ob und wie die beiden Transkriptionsfaktoren hinsichtlich der *Cyp24a1*-Expression tatsächlich miteinander wechselwirken, muss weiter untersucht werden. Die Möglichkeit einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren sollte hierbei auch nicht ausgeschlossen werden, denn eine Wechselwirkung des AhR mit anderen Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene wurde bereits beobachtet. So wird beispielsweise für AhR eine Protein-Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RelB, einer Untereinheit des NF-κB,

beschrieben (Vogel *et al.* 2007). Dabei bindet der AhR/RelB-Komplex in einem ähnlichen Muster wie AhR/ARNT an die XRE-Konsensussequenz des CYP1A1-Promoters und erhöht so die Expression des AhR-Targetgens ohne Teilnahme des ARNT (Vogel *et al.* 2007). Untersuchungen mit beispielweise aufgereinigten Proteinen und anschließender elektrophoretischer Trennung, könnten Hinweise zur direkten Protein-Wechselwirkung von VDR und AhR liefern und sollten deshalb bei zukünftigen Analysen in Betracht gezogen werden.

Hinsichtlich VDR und AhR sollte nicht nur die Möglichkeit einer direkten Interaktion – zumal dazu bis dato nur wenige Untersuchungen durchgeführt wurden – sondern auch die Option einer indirekten Wechselwirkung berücksichtigt werden. Sowohl von VDR als auch von AhR ist bekannt, dass sie mit den Signalwegen einer Vielzahl anderer Rezeptoren bzw. Transkriptionsfaktoren interagieren und so ihre komplexen Rollen bei diversen biologischen Prozessen aufweisen. So wird für AhR eine Beziehung zu diversen Rezeptoren / Transkriptionsfaktoren wie z.B. Glucocorticoid-Rezeptor (GR), Östrogen-Rezeptor (ER), Retinoid-Rezeptoren (RAR, RXR), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) und nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NF- κ B), um hier nur einige Beispiele zu nennen, beschrieben (Monostory *et al.* 2009). Nicht weniger interaktiv ist der Vitamin-D-Rezeptor. Sein Mitwirken ist unter anderem bei den Signalwegen des Pregnan-X-Rezeptor (PXR), Constitutive androstane receptor (CAR), PPAR, wie auch NF- κ B beschrieben (Thummel *et al.* 2001; Drocourt *et al.* 2002; Moreau *et al.* 2007; Pascussi *et al.* 2008). Auffällig bei dieser Aufzählung ist es bereits, dass die Interaktionen teilweise gleiche Signalwege betreffen, die einen indirekten Bezug zwischen den beiden Rezeptoren vermuten lassen.

Hierbei fällt als erstes die Interaktion des Ah-Rezeptors mit dem Retinoid-Rezeptor (RXR bzw. RAR) auf. Da RXR als Dimerisierungspartner für die Funktion des VDR unerlässlich ist, könnte die Wechselwirkung zwischen AhR/RXR ein Hinweis zum möglichen AhR/VDR-Crosstalk sein. Frühere Studien zeigten eine inhibierende Wirkung auf *AhR*-mRNA in differenzierenden Keratinozyten durch Behandlung mit Retinsäure (Wanner *et al.* 1995; Wanner *et al.* 1996). Erst vor Kurzem wurde die Rolle des SMRT entdeckte (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid receptors*). AhR und SMRT bilden unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden einen Komplex durch Bindung des SMRT an die PAS-b-Domäne des AhR, wodurch die AhR-Signalvermittlung verstärkt wird, wie in murinen Hepa-1 als auch in humanen MCF-7 Zellen gezeigt werden konnte (Rushing *et al.* 2002). Fallone *et al.* hingegen machten den AhR/SMRT-Komplex für die Repression des AhR-Pathways durch Retinoide verantwortlich (Fallone *et al.* 2004). Schließlich schlussfolgerten Widerak *et al.*, dass SMRT einen antagonistischen Effekt gegenüber beiden Signalwegen – Retinoid und AhR – ausweist. Die Interaktion zwischen AhR und SMRT aktiviert möglicherweise den RAR α in Abwesenheit eines Liganden (Widerak *et al.* 2006). Auch für VDR ist eine Interaktion mit SMRT

nachgewiesen. Ohne Ligand liegt VDR bevorzugt als Homodimer vor, assoziiert mit SMRT. Bei Anwesenheit eines Liganden (1,25(OH)₂D) kommt es bevorzugt zur Bildung des VDR/RXR-Heterodimers, unter teilweiser Dissoziation des SMRT, wie in murinen als auch in humanen Zellen nachgewiesen werden konnte (Choi *et al.* 2011; Meyer *et al.* 2013; Pike *et al.* 2013). Es ist nicht auszuschließen, dass RXR bzw. SMRT bei einer Interaktion des AhR und VDR eine Rolle spielen, Untersuchungen zu diesem Aspekt fehlen aber bislang und sollten in Zukunft in Betracht gezogen werden.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit ist auch der NF-κB-Signalweg interessant, denn im lymphoiden Gewebe, wozu auch das Knochenmark gehört, ist NF-κB (RelB) besonders präsent und kann hier konstitutiv im Nukleus exprimiert werden (Hayden *et al.* 2004). NF-κB ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren und beinhaltet in Säugetieren fünf Untereinheiten – RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50) und NF-κB2 (p100/p52) (Moynagh, 2005; Hoffmann *et al.* 2006). Diese werden ubiquitär exprimiert und spielen unter anderem eine entscheidende Rolle im Rahmen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Die Transkriptionsfaktoren binden als Homo- oder Heterodimere an spezifische DNA-Sequenzen von Genpromotoren und regulieren so die Expression einer Vielzahl von Genen, darunter von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Apoptose-Inhibitoren und wirken so auch bei zellulärer Entwicklung und Differenzierung mit (Ghosh *et al.* 1998; Li *et al.* 2002b; Bonizzi *et al.* 2004). Weiterhin kann NF-κB durch direkte Bindung an die Promoter-Sequenz die Expression von Cytochrom P450-Enzymen regulieren, darunter auch *CYP1A1* sowie *CYP27B1*, aber auch durch Interaktion mit den regulierenden Rezeptoren (Zordoky *et al.* 2009). Der NF-κB-Signalweg unterteilt sich in einen klassischen und einen alternativen Weg, je nach Art des Stimulus. Die nachfolgende Abbildung 93 zeigt schematisch diese beiden Wege.

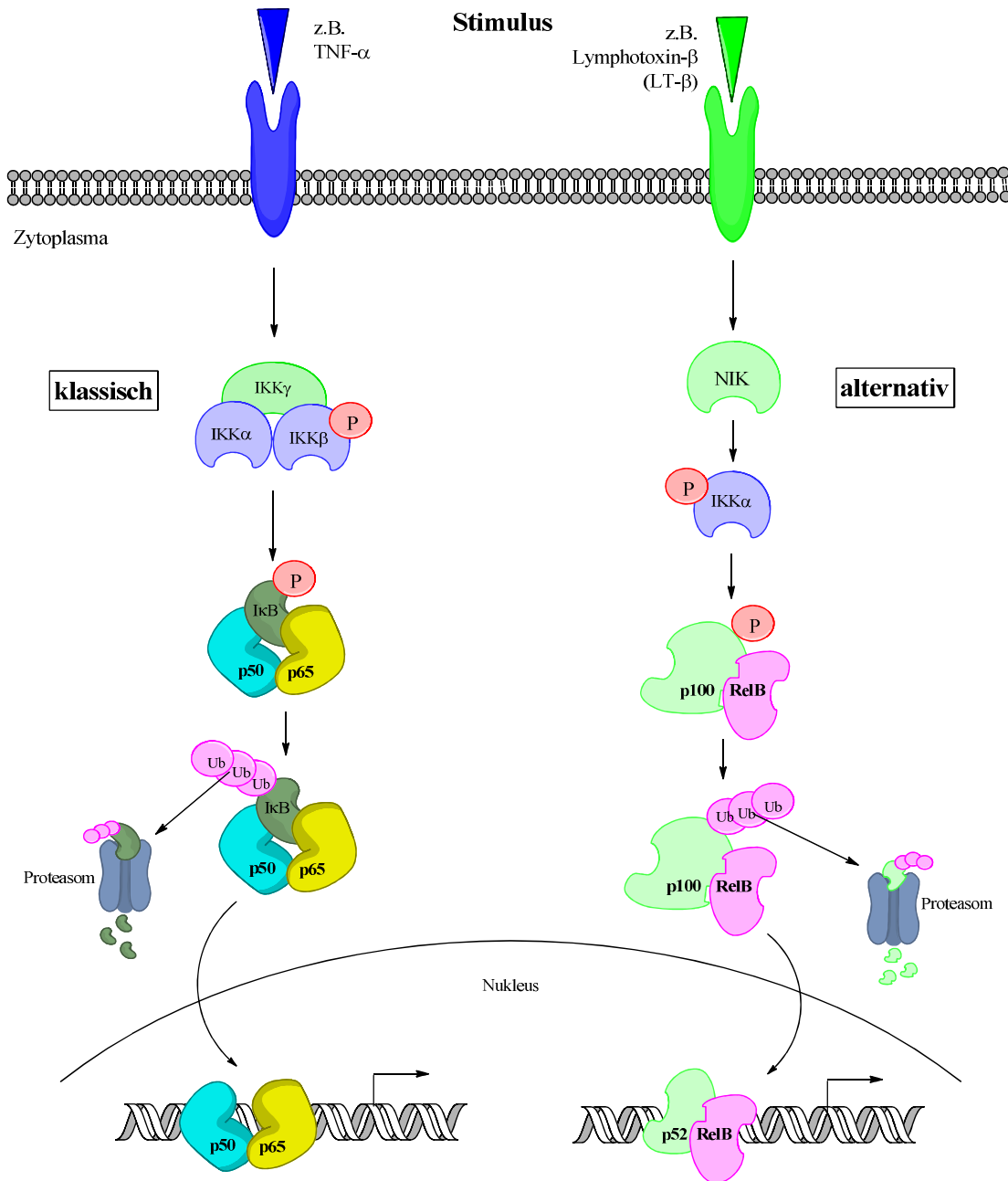


Abbildung 93: Schematische Darstellung des klassischen und alternativen NF-κB-Signalweges (modifiziert nach Hayden *et al.* 2004; Oeckinghaus *et al.* 2011). IκB = Inhibitor von NF-κB; IKK = IκB Kinase; NIK = NF-κB induzierende Kinase; p50/p65/p100/RelB = NF-κB Untereinheiten/Transkriptionsfaktoren; Ub = Ubiquitin.

In den letzten Jahren fand man heraus, dass beide Transkriptionsfaktoren – VDR und AhR – durch direkte Interaktion am NF-κB-Signalweg beteiligt sind. Christoph. F. Vogel und seine Mitarbeiter von der Universität von Kalifornien beschäftigen sich bereits seit Jahren mit dem Zusammenhang des Ah-Rezeptors und NF-κB. Sie fanden beispielsweise heraus, dass der TCDD-aktivierte AhR mit dem Transkriptionsfaktor RelB, einer Untereinheit des NF-κB,

einen Komplex bildet und durch Bindung an die *responsive elements*, die Expression von *IL-8* hochreguliert. Des Weiteren bindet der RelB/AhR-Komplex an XRE und verstärkt so auch die Expression des AhR-Targetgens *CYP1A1*, ohne Mitwirkung des ARNT, wie Vogel *et al.* in ihren Studien mit der humanen Makrophagen-Zelllinie U937 zeigten (Vogel *et al.* 2007a; Vogel *et al.* 2007b). Darüber hinaus konnten sie in einer aktuellen Studie nachweisen, dass die AhR-Aktivierung durch LPS von der NF- κ B Untereinheit RelA (p65) abhängig ist (Vogel *et al.* 2014). In Bezug auf VDR zeigte sich in zahlreichen Untersuchungen, dass dieser eine repressive Wirkung auf NF- κ B aufweist, worauf vermutlich auch seine immunsuppressive Wirkung beruht. Szeto *et al.* und Gonzalez-Pedro *et al.* vermuten die Inhibition auf Grund einer erhöhten I κ B-Synthese und I κ B-Stabilisierung durch VDR, während Chen *et al.* die Interaktion des VDR mit dem IKK α vermuten (Szeto *et al.* 2007; Gonzalez-Pedro *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013). Außerdem zeigten Dong *et al.* die Repression des *Relb* durch Bindung des Calcitriol-aktivierten VDR an den RelB-Promoter (Dong *et al.* 2005). Wu *et al.* konnten weiterhin die Bildung eines VDR-RelA(p65)-Komplexes nachweisen, welcher die Bindung an die Promoter verhindert und so die Aktivierung des NF- κ B inhibiert (Wu *et al.* 2010). Wie man sieht, ist auch VDR an mehreren Stellen des NF- κ B-Signalweges direkt beteiligt. Zusätzlich fand man heraus, dass die AhR/NF- κ B-Interaktion zur Hochregulation des VDR-abhängigen Gens *c-myc* führt (Tian *et al.* 2009; Salehi-Tabar *et al.* 2012). Diese Befunde lassen vermuten, dass der NF- κ B-Signalweg möglicherweise einen Link zwischen den beiden Rezeptoren VDR und AhR darstellt und sollte in diesem Zusammenhang in Zukunft genauer untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die beiden untersuchten Verbindungen – das prominente Umweltgift 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) und der Vitamin-D-Metabolit 1,25(OH) $_2$ D – in primären myeloiden Zellen der Maus ihre klassischen Signalwege in Gang setzten und die Expression der zugehörigen Targetgene *Cyp1a1* und *Cyp24a1* induzierten. Bei Co-Inkubation mit beiden Verbindungen konnte ein zeitabhängiger Effekt beobachtet werden. Nach Behandlung der Zellen mit TCDD und Calcitriol für 24 h konnte ein synergistischer Effekt und signifikant höhere *Cyp1a1*-Expression nachgewiesen werden. Nach verlängerter Inkubationszeit von 48 h war der Synergismus nicht mehr feststellbar, vermutlich durch verstärkte Metabolisierung des Calcitriols. Für *Cyp24a1* wurde weder nach 24 h-Behandlung noch nach längerer Inkubationszeit von 48 h ein Synergismus durch TCDD und 1,25(OH) $_2$ D festgestellt. Im Gegenteil, Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol führte zu signifikant niedrigeren *Cyp24a1*-Expression. Die Hemmung des AhR durch seinen Antagonisten CH223191 und anschließende Inkubation mit Calcitriol senkte *Cyp24a1*-Expression weiter und deutet auf eine Beziehung zwischen AhR und VDR und insbesondere auf eine Abhängigkeit des VDR vom AhR hin. Dieser Zusammenhang sollte weiter untersucht werden.

Des Weiteren konnte eine gegenseitige Aktivierung der Targetgene – Induktion des *Cyp24a1* durch TCDD und Induktion des *Cyp1a1* durch Calcitriol – und teilweise AhR-Abhängigkeit beobachtet werden. Dies lässt ebenfalls einen Crosstalk der beiden Transkriptionsfaktoren vermuten. Die Interaktion könnte dabei auf eine direkte Weise (Protein-Protein-Wechselwirkung) oder auf eine indirekte Weise über andere Signalwege (z.B. PXR, CAR, RXR/RAR, NF- κ B) erfolgen. Der Zusammenhang sollte deshalb auch unter Berücksichtigung anderer Signalwege weiter untersucht werden und könnte wichtige Informationen zu weiteren physiologischen Funktionen der beiden Rezeptoren, insbesondere AhR, aber auch essentielle Informationen für die Risikobewertung am Menschen liefern.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Isolierung von primären Knochenmarkzellen und deren *in vitro* Ausdifferenzierung zu unterschiedlichen Immunzellen, darunter dendritischen Zellen oder Makrophagen, bietet eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der Funktionen des Immunsystems auf zellulärer Ebene oder zur Untersuchung von Substanzen und Wirkstoffen, welche eine Relevanz für das Immunsystem haben könnten. Die Problematik besteht hierbei jedoch darin, dass ohne eine Markierung und anschließende durchflusszytometrische Sortierung die selektive Generierung nur einer Zellart schwierig, um nicht zu sagen kaum möglich ist, da bereits beim Isolieren eine Mischung verschiedener Zellarten mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden vorliegt. Die Verteilung dieser unterschiedlichen Zellen kann dabei abhängig von Gesundheits- und Stresszustand des Spenders stark variieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarkzellen (myeloide Zellen) adulter männlicher C57BL/6 Mäuse isoliert und in Gegenwart des Wachstumsfaktors GM-CSF für 12 Tage kultiviert, wobei hier das Interesse den adhären Zellen galt. Durchflusszytometrische Analysen haben ergeben, dass es sich bei der adhären Zellpopulation um antigenpräsentierende, MHC II⁺-Zellen handelt. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass es sich bei den ausdifferenzierten, adhären Zellen um eine Mischpopulation handelt: rund die Hälfte der Zellen wiesen den Charakter CD11c⁺-dendritischer Zellen auf, während die andere Hälfte den Charakter von F4/80⁺-Makrophagen zeigte. Bei fortschreitender Kultivierungsdauer, sowie nach Stimulation der Zellen mit bakteriellen Endotoxinen – Lipopolysacchariden (LPS) – sank die Präsentation der charakteristischen Oberflächenmarker, wobei nicht zwingend ein Verlust des spezifischen Zellcharakters, sondern eine Internalisierung der Marker von der Oberfläche ins Zellinnere der Grund dafür sein könnte (Singh-Jasuja *et al.* 2013).

Zur Untersuchung, ob zwischen Zellen des Immunsystems und Zellen anderer Gewebe, insbesondere im Zuge einer Abwehrreaktion nach einem Stimulus durch bakterielle Endotoxine, ein Crosstalk besteht, wurden Mediumüberstände LPS-stimulierter myeloider Zellen in Hepatomzelllinien der Spezies Maus, Ratte und Mensch getestet. Nach 48 h-Behandlung zeigten die Überstände in allen Zelllinien eine Reduktion der Vitalität. Dabei erwies sich die Rattenhepatomzelllinie H4IIE am empfindlichsten, während in humanen Hepatomzelllinie HepG2 der geringste Rückgang der Vitalität beobachtet wurde. Ob es sich hierbei um eine apoptotische oder um eine proliferationshemmende Wirkung handelt, sollte in Zukunft weiter untersucht werden. Weiterhin wurden Überstände LPS-stimulierter myeloider Zellen im EROD-Assay untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Anstieg der CYP1A1-Aktivität in humanen Hepatomzellen. Analysen mit dem AhR-Inhibitor CH223191 wiesen darauf hin, dass die beobachtete CYP1A1-Aktivität zumindest teilweise AhR-abhängig verläuft. Eine statistisch signifikante Expression des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms *CYP1A1* konnte auch auf mRNA-Ebene, aber nicht auf Proteinebene im Western Blot beobachtet werden. LPS konnte bei den Untersuchungen als Induktor ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Immunzellen bei einer Abwehrreaktion eine oder mehrere Substanzen sezernieren, welche zur erhöhten Aktivität und Genexpression des *CYP1A1* führen. Die erhöhte Aktivität des Enzyms verläuft dabei zumindest teilweise über den Ah-Rezeptor. Bei HPLC-Untersuchungen der Mediumüberstände konnten unter den verwendeten Bedingungen zwischen Überständen LPS-stimulierter myeloider Zellen und nicht stimulierter Zellen keine Unterschiede festgestellt werden. Zu einer besseren Aufklärung über sezernierte Substanzen sind weitere, sensitivere Analysemethoden, wie beispielsweise MALDI-TOF-MS notwendig.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der Literatur ist hierbei kaum möglich, da ähnliche Untersuchungen bislang fehlen. Es wurden aber Studien publiziert, in denen von einer Reduktion TCDD-induzierter CYP1A1-Aktivität durch konditionierte Mediumüberstände berichtet wird (Paton *et al.* 1998; Jeong, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch Co-Inkubation konditionierter Mediumüberstände mit TCDD in Hepatomzellen eine signifikante, konzentrationsabhängige Inhibition der EROD-Aktivität gezeigt werden. Die Inhibition wurde in einem schwächeren Ausmaß auch auf mRNA-Ebene bestätigt.

Auch wenn HPLC-Untersuchungen keine Anhaltspunkte bezüglich der Unterschiede in Mediumüberständen LPS-behandelter und nicht behandelter myeloider Zellen lieferten, konnten mittels weiterer Analysen andere Differenzen festgestellt werden. ELISA-Untersuchungen zeigten, dass die Stimulation adhärenter myeloider Zellen mit LPS in einer massiven Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, und TNF- α) sowie von Stickoxid (NO) ins Medium resultierte. Diese Befunde korrelieren auch mit der Literatur. In zahlreichen

Studien wurde die Ausschüttung von Zytokinen nach Behandlung von Makrophagen oder dendritischen Zellen mit Stimulanzen wie LPS, PHA oder PMA nachgewiesen und quantifiziert (Verhasselt *et al.* 1997; Labeur *et al.* 1999; Carmi *et al.* 2009; Xu *et al.* 2014). Die Ausschüttung der Zytokine erfolgt dabei über die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors an der Oberfläche von Immunzellen durch Bindung des Stimulans, wodurch ein unter anderem NF- κ B-abhängige Signalweg in Gang gesetzt wird und schließlich zur Produktion von proinflammatorischen Peptiden und Proteinen führt (Kaisho *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2003; Shi *et al.* 2006).

Die vier quantifizierten Zytokine hatten alleine keine Wirkung auf die CYP1A1-Aktivität im EROD-Assay. Doch bei Co-Inkubation dieser proinflammatorischen Proteine mit TCDD zeigte sich eine deutliche Inhibition der EROD-Aktivität. IL-1 β erwies sich im vergleichbaren Konzentrationsbereich gegenüber den restlichen untersuchten Zytokinen als potentester Inhibitor. In der Mischung zeigten die Zytokine einen synergistischen hemmenden Effekt, erreichten aber dennoch nicht das Inhibitionspotential der konditionierten Mediumüberstände. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ins Kulturmedium noch weitere Zytokine ausgeschüttet werden, wie beispielsweise IL-2 oder IFN- γ , die zur Inhibition der CYP1A1-Aktivität beitragen (Calleja *et al.* 1997). Die beobachteten inhibierenden Wirkungen der untersuchten Zytokine auf TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität stimmen mit den Berichten in der Literatur überein (Barker *et al.* 1992; Fukuda *et al.* 1994; Clark *et al.* 1995; Calleja *et al.* 1997; Paton *et al.* 1998; Bleau *et al.* 2000; Jeong, 2001; Bleau *et al.* 2003). Was den Mechanismus, der dieser Inhibition zugrunde liegt angeht, ist dieser nicht genau geklärt und in der Literatur werden unterschiedliche Vorschläge diskutiert, darunter beispielsweise Interaktionen mit anderen Signalwegen (NF- κ B) oder Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Morel *et al.* 1998; Tian *et al.* 1999; Ke *et al.* 2001).

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Stimulation von ausdifferenzierten, antigenpräsentierenden Zellen mit LPS zur Ausschüttung von verschiedenen Substanzen führt, die eine teilweise AhR-abhängige, aktivierende Wirkung auf die Enzymaktivität und mRNA-Expression von *CYP1A1* haben, aber auch Substanzen, die die TCDD-induzierte CYP1A1-Aktivität inhibieren. Unter den inhibierenden Verbindungen konnten proinflammatorische Zytokine, identifiziert werden. Die Identifizierung der aktivierenden Verbindungen ist insbesondere im Hinblick auf die physiologische Rolle des Ah-Rezeptors und mögliche endogene Liganden interessant. Mit den verwendeten Methoden war ein Nachweis/Identifikation der Substanz(en) nicht möglich und erfordert weitere, selektivere und sensitivere Analysemaßnahmen, beispielsweise durch Extraktion mit mehrschichtigen, magnetischen Mikropartikeln, anschließender HPLC-Auftrennung und MALDI-TOF-MS Analyse.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des prominenten Umweltgifts 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) sowie des biologisch aktiven Vitamin D₃ Metaboliten 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D (Calcitriol) in murinen myeloiden Zellen untersucht. Der Vitamin D Rezeptor wird in allen Zellen des Immunsystems exprimiert und spielt somit neben der Calcium- und Phosphathomöostase auch eine wichtige Rolle für das Immunsystem. Der Ah-Rezeptor ist aufgrund seiner starken Aktivierung durch polychlorierte/polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) und der damit verbundenen Toxizität bekannt geworden, doch seine physiologische Rolle ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Erst seit ein paar Jahren vermutet man eine Wechselwirkung zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren, doch nur wenige Untersuchungen wurden bislang diesbezüglich durchgeführt.

In murinen myeloiden Zellen konnte nach 48 h-Behandlung eine signifikante, konzentrationsabhängige, proliferationshemmende Wirkung des Calcitriols gezeigt werden. Diese war aber bei simultaner Behandlung der Zellen mit LPS nicht mehr feststellbar, da LPS selbst inhibierend auf die Proliferation der Zellen wirkte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur (Moore *et al.* 1980; Bhalla *et al.* 1984; Rigby *et al.* 1985; Yokishi *et al.* 1985; Nunn *et al.* 1986). Für TCDD ergab sich hingegen ein anderes Bild: ohne Stimulation mit LPS zeigte TCDD keine Wirkung auf die Proliferation oder Vitalität myeloider Zellen. Bei Co-Inkubation mit dem Endotoxin LPS nahm die Vitalität der Zellen signifikant ab. Dies deutet darauf hin, dass TCDD bei einer bestehenden oder nachfolgenden Infektion die Zellen des Immunsystems stärker schädigt. Die Daten stehen in Korrelation mit den Befunden von Ruby *et al.* und Park *et al.*, die einen apoptotischen Effekt von TCDD auf stimulierte Makrophagen und dendritische Zellen nachweisen konnten (Park *et al.* 2005; Ruby *et al.* 2005). Bezüglich der Zytokinsekretion zeigte Calcitriol eine konzentrationsabhängige und signifikante Erhöhung des IL-1 α -Levels und eine konzentrationsabhängige und signifikante Herabsenkung des TNF- α -Gehalts im Mediumüberstand myeloider Zellen, während die Gehalte von IL-6 und IL-1 β unbeeinflusst blieben. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen der erhöhten IL-1 α -Produktion und der proliferationshemmenden Wirkung des Calcitriols (Kong *et al.* 2006; Maund *et al.* 2011). TCDD hatte hingegen keine Auswirkung auf die Sekretion der vier genannten Zytokine. Bei Co-Stimulation der Zellen mit LPS zeigte keine der beiden Substanzen einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung. Hierbei sollten unterschiedliche Zeitpunkte der Inkubation weiter untersucht werden. Studien zeigen, dass TCDD und Calcitriol sich stärker auf die Sekretion der Zytokine auswirken, wenn keine simultane, sondern eine vor- oder nachgeschaltete Behandlung mit LPS erfolgt (Zarrabeitia *et al.* 1992; Moos *et al.* 1997; Panichi *et al.* 1998; Rier *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2005; Gambhir *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Pelletier *et al.* 2013; Jeong *et al.* 2014).

Neu waren die Ergebnisse zur Expression der Targetgene beider Transkriptionsfaktoren – *Cyp1a1* und *Cyp24a1*. Wie erwartet führte die Inkubation muriner myeloider Zellen mit TCDD zur konzentrationsabhängigen und signifikant erhöhten Expression des AhR-Targetgens *Cyp1a1*, während die Inkubation mit Calcitriol eine massiv erhöhte Expression des VDR-Targetgens *Cyp24a1* verursachte. Matsunawa *et al.* berichteten bislang als einzige von einem synergistischen, induktiven Effekt von Calcitriol und TCDD auf die Expressionen von *CYP1A1* und *CYP24A1* (Matsunawa *et al.* 2009; Matsunawa *et al.* 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der synergistische Effekt durch TCDD und Calcitriol hinsichtlich der Expression von *Cyp1a1* stark von der Inkubationsdauer abhängt. Während nach 24 h Behandlung die *Cyp1a1*-Expression durch Co-Inkubation mit TCDD und Calcitriol signifikant gesteigert wurde, konnte dieser Effekt nach 48 h nicht mehr beobachtet werden, vermutlich durch verstärkten Abbau des Calcitriols. Für *Cyp24a1* konnte weder nach 24 h- noch nach 48 h-Behandlung mit beiden Verbindungen keine Steigerung der Expression nachgewiesen werden. Im Gegenteil, nach 48 h-Inkubation mit Calcitriol und TCDD sank die Expression des VDR-Targetgens *Cyp24a1* signifikant verglichen mit der Expression mit Calcitriol alleine. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Ah-Rezeptors durch den Antagonisten CH223191 nicht nur die *Cyp1a1*-Expression senkte, sondern auch zur hoch signifikant verringerten *Cyp24a1*-Expression führte. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Funktion des VDR vom AhR abhängt.

Weiterhin konnte zum ersten Mal beobachtet werden, dass Calcitriol die Expression des AhR-Targetgens *Cyp1a1* in gleicher Größenordnung wie TCDD, signifikant steigerte, während TCDD zur erhöhten Expression von *Cyp24a1* führte. Diese Ergebnisse verleiten zu der Annahme, dass der AhR und VDR in einem starken Bezug zueinander stehen. Diese Resultate zum Zusammenhang zwischen AhR und VDR liefern einen interessanten Ansatz für weiterführende Forschungen. Es ist noch nicht geklärt ob beispielweise eine direkte, Interaktion/Bindung beider Transkriptionsfaktoren vorliegt? Oder ob der Crosstalk auch von anderen Signalwegen, wie beispielsweise dem NF- κ B-Signalweg, beeinflusst wird? Diese Fragen sollten in weiteren Untersuchungen, wie beispielsweise mit Hilfe von Microarray-Analysen, geklärt werden und würden einen besseren Einblick über die physiologische Rolle des „Dioxin-Rezeptors“ AhR liefern.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J. C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., Guillouzo, A. „Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture.“ *Molecular Pharmacology*, 1993: (44) 707-715.
- Adams, D. O., Hamilton, T. A. „The cell biology of macrophage activation.“ *Annual Review of Immunology*, 1984: (2) 283-318.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B. B. „Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.“ *Nature*, 1979: 280 (5739) 615-616.
- Aderem, A., Ulevitch, R. J. „Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.“ *Nature*, 2000: (406) 782-787.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. „Pathogen Recognition an Innate Immunity.“ *Cell*, 2006: (124) 783-801.
- Ashida, H., Nishiumi, S., Fukuda, I. „An update on the dietary ligands of the AhR.“ *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2008: (4) 1429-1447.
- Baeke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Methieu, C. „Vitamin D: modulator of the immune system.“ *Currens Opinion in Pharmacology*, 2010: (10) 482-496.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y-J., Pulendran, P., Paluck, K. „Immunobiology of Dendritic Cells.“ *Annual Review of Immunology*, 2000: (18) 767-811.
- Bank, P. A., Yao, E. F., Phelps, C. L., Harper, P. A., Denison, M. S. „Species-specific binding of transformed Ah receptor to a dioxin responsive transcriptional enhancer.“ *European Journal of Pharmacology*, 1992: (228) 85-94.
- Bankoti, J., Rase, B., Simones, T., Shepherd, D. M. „Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells.“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010: (246) 18-28.

- Bankoti, J., Rase, B., Simones, T., Shepherd, D. M. „Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells.“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010: (246) 18-28.
- Barker, C. W., Fagan, J. B., Pasco, D. S. „Interleukin-1 beta suppresses the induction of P4501A1 and P4501A2 mRNAs in isolated hepatocytes.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1992: (267) 8050-8055.
- Behnisch, P. A., Hosoe, K., Brouwer, A., Sakai, S. „Screening of dioxin-like toxic equivalents for various matrices with wildtype and recombinant rat hepatoma H4IIE cells.“ *Toxicological Sciences*, 2002: 69 (1) 125-130.
- Behnisch, P. A., Hosoe, K., Sakai, S. „Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology.“ *Environment International*, 2001: 27 (5) 413-439.
- Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., Perdew, G. H. „The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression.“ *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2008: (18) 207-250.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, 6. Auflage, 2008.
- Bernhardt, R. „Cytochrome P450: versatile Enzymsysteme mit Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin.“ *Magazin Forschung, Universität des Saarlandes*, 2004: (1) 10-16.
- Bhalla, A. K., Amento, E. P., Krane, S. M. „Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production.“ *Cellular Immunology*, 1986: (98) 311-322.
- Bhalla, A. K., Amento, E. P., Serog, B., Glimcher, L. H. „1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation.“ *Journal of Immunology*, 1984: (133) 1748-1754.
- Bi, J., Song, S., Fang, L., Wang, D., Jing, H., Gao, L., Cai, Y., Luo, R., Chen, H., Xiao, S. „Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces IL-1 β production depending on TLR4/MyD88 pathway and NLRP3 inflammasome in primary porcine alveolar macrophages.“ *Mediators of Inflammation*, 2014: 1-14.
- Bjeldanes, L. F., Kim, J.-L., Grose, K. R., Bartholomew, J. C., Bradfield, C. A. „Aromatic hydrocarbon responsiveness receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991: (88) 9543-9547.
- Bleau, A. M., Levitchi, M. C., Maurice, H., du Souich, P. „Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines.“ *British Journal of Pharmacology*, 2000: (130) 1777-1784.
- Bleau, A. M., Maurel, P., Pichette, V., Leblond, F., du Souich, P. „Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes.“ *European Journal of Pharmacology*, 2003: (473) 197-206.
- Bock, K. W. „Aryl Hydrocarbon or Dioxin Receptor: Biologic and Toxic Responses.“ *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 1993: (125) 1-32.

- Bogdan, C. „Nitric oxide and the regulation of gene expression.“ *Trends in Cell Biology*, 2001: (11) 66-75.
- Bonizzi, G. Karin, M. „The two NFκB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.“ *Trends in Immunology*, 2004: (25) 280-288.
- Bos, J. D. *Skin Immune System (SIS)*. CRC Press LLC, Second Edition, 1997.
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C., Demay, M. „Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice.“ *Endocrine Reviews*, 2008: (29) 726–776.
- Bouillon, R., Van Assche, F. A., Van Baelen, H., Heyns, W., De Moor, P. „Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1981: (67) 589-596.
- Bouillon, R., Van Assche, F. A., Van Baelen, H., Heyns, W., De Moor, P. „Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1981: (67) 589-596.
- Bradham, C. A., Plümpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A., Trautwein, C. „Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury.“ *American Journal of Physiology*, 1998: (275) 387-392.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. „Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.“ *Annual Review of Biochemistry*, 1994: (63) 175-195.
- Brennan, A., Katz, D. R., Nunn, J. D., Barker, S., Hewison, M., Fraher, L. J., O’Riordan, J. L. „Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol.“ *Immunology*, 1987: (61) 457-461.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. „Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria.“ *Science*, 2004: (303) 1532-1535.
- Burbach, K. M., Poland, A., Bradfield, C. A. „Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992: (89) 8185-8189.
- Calleja, C., Eeckhoutte, C., Larrieu, G., Dupuy, J., Pineau, T., Galtier, P. „Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997: (239) 273-278.
- Camman, K. *Instrumentelle Analytische Chemie*. Springer Akademischer Verlag, 1. Auflage, 2001.
- Campbell, F. C., Xu, H., El-Tanani, P., Crowe, P., Bingham, V. „The Yin and Yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: Operational networks and tissue-specific growth control.“ *Biochemical Pharmacology*, 2010: (79) 1-9.
- Carlson, T. J., Billings, R. E. „Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450.“ *Molecular Pharmacology*, 1996: (49) 796-801.

- Carmi, Y., Voronov, E., Dotan, S., Lahat, N., Rahat, M. A., Fogel, M., Huszar, M., White, M. R., Dinarello, C. A., Apte, R. N. „The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of angiogenesis.“ *Journal of Immunology*, 2009: (183) 4705-4714.
- Chahin, A., Peiffer, J., Olry, J. C., Crepeaux, G., Schroeder, H., Rychen, G., Guiavarc'h, Y. „EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats orally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons.“ *Food and Chemical Toxicology*, 2013: (56) 371-380.
- Chan, J. K. C., Ng, C. S., Hui, P. K. „A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies.“ *Histopathology*, 1988: (12) 461-480.
- Chang, H. J., Park, J. S., Lee, E. K., Kim, M. H., Baek, M. K., Kim, H. R., Jeong, H. G., Choi, S. Y., Jung, Y. D. „Ascorbic acid suppresses the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 expression in human HepG2 cells.“ *Toxicology In Vitro*, 2009: (23) 622-626.
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., Rock, K. L. „Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells.“ *Nature Medicine*, 2007a: (13) 851-856.
- Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., Chen, S., Lipsky, P. E. „Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation.“ *Journal of Immunology*, 2007b: (179) 1634-1647.
- Chen, Y. H., Riby, J., Srivastava, P., Bartholomew, J., Denison, M., Bjeldanes, L. „Regulation of CYP1A1 by indolo[3,2-b]carbazole in murine hepatoma cells.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1995: (270) 22548-22555.
- Chen, Y., Zhang, J., Ge, X., Du, J., Deb, D. K., Li, Y. C. „Vitamin D receptor inhibits nuclear factor κ B activation by interacting with I κ B kinase β protein.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2013: (288) 19450-19458.
- Cheon, H., Woo, Y. S., Lee, J. Y., Kim, H. S., Kim, H. J., Cho, S., Won, N. H., Sohn, J. „Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages.“ *Experimental and Molecular Medicine*, 2007: (39) 524-534.
- Chesney, R. W., Rosen, J. F., Hamstra, A. J., Smith, C., Mahaffey, K., DeLuca, H. F. „Absence of seasonal variation in serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D despite a rise in 25-hydroxyvitamin D in summer.“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1981: (53) 139-142.
- Chinen, T., Qureshi, M. H., Koguchi, Y., Kawakami, K. „Candida albicans suppresses nitric oxide (NO) production by interferon-gamma (IFN-gamma) and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine peritoneal macrophages.“ *Clinical and Experimental Immunology*, 1999: (115) 491-497.
- Choi, M., Yamada, S., Makishima, M. „Dynamic and ligand-selective interactions of vitamin D receptor with retinoid X receptor and cofactors in living cells.“ *Molecular Pharmacology*, 2011: (80) 1147-1155.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.“ *Analytical Biochemistry*, 1987: (162) 156-159.
- Chun, R. F., Liu, P. T., Modlin, R. L., Adams, J. S., Hewison, M. „Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis.“ *Frontiers in Physiology*, 2014: (5) 151.

- Ciolino, H. P., Daschner, P. J., Wang, T. T. Y., Yeh, G. C. „Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells.“ *Biochemical Pharmacology*, 1998: (56) 197-206.
- Cippitelli, M., Santoni, A. „Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon- γ gene.“ *European Journal of Immunology*, 1998: (28) 3017–3030.
- Clark, M. A., Bing, B. A., Gottschall, P. E., Williams, J. F. „Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes.“ *Biochemical Pharmacology*, 1995: (49) 97-104.
- Clark, R. A., Klebanoff, S. J. „Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system.“ *The Journal of Experimental Medicine*, 1975: (141) 1442-1447.
- Connor, M. J., Nanthur, J., Puhvel, S.M. „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*, 1994: (129) 12-15.
- Corbi, A. L., Lopez-Rodriguez, C. „CD11c Integrin Gene Promoter Activity During Myeloid Differentiation.“ *Leukaemia and Lymphoma*, 1997: (25) 415-425.
- Coumailleau, P., Poellinger, L., Gustafsson, J. A., Whitelaw, M. L. „Definition of a Minimal Domain of the Dioxin Receptor That Is Associated with Hsp90 and Maintains Wild Type Ligand Binding Affinity and Specificity.“ *Journal of Biochemical Chemistry*, 1995: (270) 25291-25300.
- D’Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M. G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F., Panina-Bordignon, P. „Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF κ B down-regulation in transcriptional repression of the p40 gene.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1998: (101) 252-262.
- Darlington, G. J., Bernhard, H. P., Miller, R. A., Ruddle, F.H. „Expression of liver phenotypes in mouse hepatoma cells.“ *Journal of the National Cancer Institute*, 1980: 64 (4) 809-19.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L. „Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles.“ *The Neuroscientist*, 1995: (1) 7-18.
- De Fries, R., Mitsuhashi, M. „Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-Thymidine incorporation assay.“ *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1995: (9) 89-95.
- DeBruyn, C., Delforge, A., Bernier, M., Bron, D. „Ex vivo expansion of neutrophil precursor cells from fresh and cryopreserved cord blood cells.“ *Cytotherapie*, 2003: (5) 87-98.
- Deeb, K. K., Trump, D. L., Johnson, C. S. „Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics.“ *Nature*, 2007: (7) 684-700.
- Dekaris, I., Zhu, S. N., Dana, M. R. „TNF- α regulates corneal Langerhans cell migration.“ *Journal of Immunology*, 1999: (162) 4235-4239.
- Deluca, H. F., Cantorna, M.T. „Vitamin D: its role and uses in immunology.“ *FASEB Journal*, 2001: (15) 2579-2585.

- Denison, M. S., Nagy, S. R. „Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2003: (43) 309-334.
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., Bonati, L. „Ligand binding and activation of the Ah receptor.“ *Chemico-Biological Interactions*, 2002: (141) 3-24.
- Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E., Zhao, B. „Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor.“ *Toxicological Sciences*, 2011: (124) 1-22.
- Depke, M., Breitbach, K., Dinh Hoang Dang, K., Brinkmann, L., Salazar, M. G., Dhople, V. M., Bast, A., Steil, L., Schmidt, F., Steinmetz, I., Völker U. „Bone marrow-derived macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice fundamentally differ in their respiratory chain complex proteins, lysosomal enzymes and components of antioxidant stress systems.“ *Journal of Proteomics*, 2014: 72-86.
- Dey, A., Parmar, D., Dayal, M., Dhawan, A., Seth, P. K. „Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in blood lymphocytes evidence for catalytic activity and mRNA expression.“ *Life Sciences*, 2001: (69) 383-393.
- Díaz, L., Martínez-Reza, I., García-Becerra, R., González, L., Larrea, F., Méndez, I. „Calcitriol stimulates prolactin expression in non-activated human peripheral blood mononuclear cells: breaking paradigms.“ *Cytokine*, 2011: (55) 188-194.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., Roeder, R. G. „Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.“ *Nucleic Acid Research*, 1983: 11 (5) 1475-1489.
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J., Perdew, G. H. „Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling.“ *Toxicological Sciences*, 2010: (115) 89-97.
- Ding, W. X., Yin, X. M. „Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury.“ *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2004: (8) 445-454.
- Do, J. E., Kwon, S. Y., Park, S., Lee, E. S. „Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behcet's disease.“ *Rheumatology*, 2008: (47) 840-848.
- Domen, J., Wagers, A., Weissman, I. L. „Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells.“ *National Health Information. Stem Cell Information [World Wide Website]*, 2011.
- Dong, X., Lutz, W., Schroeder, T. M., Bachman, L. A., Westendorf, J. J., Kumar, R., Griffin, M. D. „Regulation of reB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005: (102) 16007-16012.
- Drocourt, L., Ourlin, J. C., Pascussi, J. M., Maurel, P., Vilarem, M. J. „Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2002: (277) 25125–25132.
- Duan, X., Weinstock-Guttman, B., Wang, H., Bang, E., Li, J., Ramanathan, M., Qu, J. „Ultrasensitive quantification of serum vitamin D metabolites using selective solid-phase extraction coupled to

- microflow liquid chromatography and isotope-dilution mass spectrometry.“ *Analytical Chemistry*, 2010: (82) 2488-2497.
- Dumont, F., Marechal, P.-A., Gervais, P. „Involvement of two specific causes o cell mortality in freez-thaw cycles with freezing to -196°C.“ *Applied and Environmental Microbiology*, 2006: 72 (2) 1330-1335.
- Dusso, A. S., Brown, A. J., Slatopolsky, E. „Vitamin D.“ *American journal of physiology. Renal physiology*, 2005: (289): 8–28 .
- Dzeletovic, N., McGuire, J., Daujat, M., Tholander, J., Ema, M., Fujii-Kuriyama, Y., Bergman, J., Maurel, P., Poellinger, L. „Regulation of dioxin receptor function by omeprazole.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1997: (272) 12705-12713.
- El Gendy, M. A., El-Kadi, A. O. „Harman induces CYP1A1 enzyme through an aryl hydrocarbon receptor mechanism.“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010: (249) 55-64.
- El Gendya, M. A., Soshilov A. A., Denison M. S., El-Kadia, A. O. „Transcriptional and posttranslational inhibition of dioxin-mediated induction of CYP1A1 by harmine and harmol.“ *Toxicology Letters*, 2012: (208) 51-61.
- Elizondo, G., Medina-Díaz, I. M. „Induction of CYP3A4 by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in HepG2 cells.“ *Life Sciences*, 2003: (73) 141-149.
- El-Khoury, J. M., Wang, S. „Stability of 1,25-dihydroxyvitamin D(2) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in human serum.“ *Clinical Biochemistry*, 2012: (45) 707-708.
- Ellman, C., Corbett, J. A., Misko, T. P., McDaniel, M., Beckerman, K. P. „Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary. A potential role for nitric oxide in the ovulatory process.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1993: (92) 3053-3056.
- Engvall, E., Perlmann, P. „Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G.“ *Immunochemistry*, 1971: 8 (9) 871-874.
- Eppert, G. J. *Einführung in die schnelle Flüssigchromatographie*. Vieweg Verlag, 1979.
- Eske, K., Breitbach, K., Köhler, J., Wongprompitak, P., Steinmetz, I. „Generation of murine bone marrow derived macrophages in a standardised serum-free cell culture system.“ *Journal of Immunological Methods*, 2009: (342) 13-19.
- Esser, C., Rannug, A., Stockinger, B. „The aryl hydrocarbon receptor in immunity.“ *Trends in Immunology*, 2009: (30) 447-454.
- Evans, B. R., Karchner, S. I., Allan, L. L., Pollenz, R. S., Tanguay, R. L., Jenny, M. J., Sherr, D. H., Hahn, M. E. „Repression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Signaling by AHR Repressor: Role of DNA Binding and Competition for AHR Nuclear Translocator.“ *Molecular Pharmacology*, 2008: (73) 387-398.
- Fallone, F., Villard, P. H., Sérée, E., Rimet, O., Nguyen, Q. B., Bourgarel-Rey, V., Fouchier, F., Barra, Y., Durand, A., Lacarelle, B. „Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004: (322) 551-556.

- Fan, F., Yan, B., Wood, G., Viluksela, M., Rozman, K. K. „Cytokines (IL-1beta and TNFalpha) in relation to biochemical and immunological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats.“ *Toxicology*, 1997: (116) 9-16.
- Forgacs, A. L., Dere, E., Angrish, M. M., Zacharewski, T. R. „Comparative analysis of temporal and dose-dependent TCDD-elicited gene expression in human, mouse, and rat primary hepatocytes.“ *Toxicological Sciences*, 2013: (133) 54-66.
- Frericks, M., Meissner, M., Esser, C. „Microarray analysis of the AHR system: Tissue-specific flexibility in signal and target genes.“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007: (220) 320-332.
- Fujii-Kuriyama, Y., Kawajiri, K. „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, Series B, Physical and Biological Sciences*, 2010: (86) 40-53.
- Fukuda, Y., Sassa, S. „Suppression of cytochrome P450IA1 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells.“ *Biochemical Pharmacology*, 1994: (47) 1187-1195.
- Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., Hankinson, O. „Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1995: (270) 29270-29278.
- Gambhir, V., Kim, J., Siddiqui, S., Taylor, M., Byford, V., Petrof, E. O., Jones, G., Basta, S. „Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement.“ *Immunobiology*, 2011: (216) 988-996.
- Gao, B., Wang, Y., Tsan, M. F. „The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of lipopolysaccharide.“ *Journal of Leukocyte Biology*, 2006: (80) 359-366.
- Garner, M. M., Revzin, A. „A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system.“ *Nucleic Acids Research*, 1981: 9 (13) 3047-3060.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., Baumann, H. „Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cell.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987: (84) 7251-7255.
- Geller, D. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L., Billiar, T. R. „Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993: (90) 522-526.
- Gharavi, N., El-Kadi, A. O. „Down-regulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells.“ *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005: (94) 493-506.
- Gharavi, N., El-Kadi, A. O. „Measurement of nitric oxide in murine Hepatoma Hepa1c1c7 cells by reversed phase HPLC with fluorescence detection.“ *Journal of Pharmacy and pharmaceutical sciences*, 2003: (6) 302-307.
- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. „NFkB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses.“ *Annual Review of Immunology*, 1998: (16) 225-260.

- Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Alexandersson, M., Fernstro, B., Gustafsson, J. A. „Interactions of indolo[3,2-b]carbazoles and related polycyclic aromatic hydrocarbons with specific binding sites for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver.“ *Molecular Pharmacology*, 1993: (44) 336–45.
- Gordon, S. „The macrophage: past, present and future.“ *European Journal of Immunology*, 2007: (37) 9-17.
- Goryo, K., Suzuki, A., DelCarpio, C. A., Siizaki, K., Kuriyama, E., Mikami, Y., Kinoshita, K., Yasumoto, K., Rannug, A., Miyamoto, A., Fujii-Kuriyama, Y., Sogawa, K. „Identification of amino acid residues in the Ah receptor involved in ligand binding.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007: (354) 396-402.
- Gradelet, S., Leclerc, J., Siess, M.-H., Astorg, P. O. „B-Apo-80-carotenal, but not beta-carotene is a strong inducer of liver cytochromes P4501A1 and 1A2 in rat.“ *Xenobiotica*, 1996: (26) 909–919.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., Nairn, R. „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.“ *Journal of General Virology*, 1977: 36 (1) 59-74.
- Gries, P. „Bemerkungen zu der Abhandlung dr H. H. Weselky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen".“ *Chemische Berichte*, 1879: (12) 426-428.
- Griffin, M. D., Xing, N., Kumar, R. „Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation.“ *Annual Review of Nutrition*, 2003: (23) 117-145.
- Guengerich, F. P., Martin, M. V., McCormick, A., Nguyen, L. P., Glover, E., and Bradfield, C. A. „Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004: (423) 309–316.
- Guigal, N., Seree, E., Bourgarel-Rey, V., Barra, Y. „Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2000: (267) 572–576.
- Guillot, X., Semerano, L., Saidenberg-Kermanac'h, N., Falgarone, G., Boissier, M. C. „Vitamin D and inflammation.“ *Joint Bone Spine*, 2010: (7) 552-557.
- Guyton, K.Z., Kensler, T.W., Posner, G.H. „Cancer chemoprevention using natural vitamin D and synthetic analogs.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2001: (41) 421-442.
- Haarmann-Stemmann, T., Bothe, H., Abel, J. „Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways.“ *Biochemical Pharmacology*, 2009: (77) 508-520.
- Hakim, I., Bar-Shavit, Z. „Modulation of TNF- expression in bone marrow macrophages: involvement of vitamin D response element.“ *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003: (88) 986-998.
- Hanieh, H. „Toward understanding the role of aryl hydrocarbon receptor in the immune system: current progress and future trends.“ *BioMed Research International*, 2014: 520763.
- Hankinson, O. „The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1995: (35) 307-340.

- Hao, N., Whitelaw, M. L. „The emerging roles of AhR in physiology and immunity.“ *Biochemical Pharmacology*, 2013: (86) 561-570.
- Harant, H., Wolff, B., Lindley, I. J. *FEBS Letters*, 1998: (436) 329–334.
- Harper, P.A., Riddick, D. S., Okey, A. B. „Regulating the regulator: Factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor.“ *Biochemical Pharmacology*, 2006: (72) 267-279.
- Hayden, M. S., Ghosh, S. „Signaling to NF-kappaB.“ *Genes & Development*, 2004: (18) 2195-2224.
- He, M., Chen, G., Huang, X., Xu, R., Zeng, Z., Yang, J. „N-Phthaloyltranexamic Acid Ammonium Salt Derivatives as Photocaged Superbase for Redox Free Radical Photopolymerization.“ *The Royal Society of Chemistry*, 2013: <http://www.rsc.org/suppdata/py/c3/c3py01448g/c3py01448g.pdf>.
- Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D., Cenijn, P. H., Brouwer, A., and Denison, M. S. „Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites.“ *Biochemistry*, 1998: (37) 11508–11515.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. „Real time quantitative PCR.“ *Genome Research*, 1996: (6) 986-994.
- Hellman, L. M., Fried, M.G. „Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions.“ *Nature Protocols*, 2007: 2 (8) 1849-1861.
- Henry, H. L. „Regulation of vitamin D metabolism.“ *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011: (25) 531-541.
- Hodler, B., Evêquoz, V., Trechsel, U., Fleisch, H., Stadler, B. „Influence of vitamin D3 metabolites on the production of interleukins 1,2 and 3.“ *Immunobiology*, 1985: (170) 256-269.
- Hoffmann, A., Natoli, G., Ghosh, G. „Transcriptional regulation via the NFkB signaling module.“ *Oncogene*, 2006: (25) 6706-6716.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. B. „Phylogenic Perspectives in Innate Immunity.“ *Science*, 1999: (284) 1313-1318.
- Holick, M. F. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Application*. Springer, Humana Press, 2010.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. „Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' --> 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. “ *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1991: 88 (16) 7276-7280.
- Holsapple, M. P., Morris, D. L., Wood, S. C., Snyder, N. K. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1991: (31) 71-100.
- Houghton, L. A., Gray, A. R., Harper, M. J., Winichagoon, P., Pongcharoen, T., Gowachirapant, S., Gibson, R. S. „Vitamin D Status among Thai School Children and the Association with 1,25-Dihydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone Levels.“ *PLoS One*, 2014: 9 (8) e104825.

- Huang, J., DeGraves, F. J., Lenz, S. D., Gao, D., Feng, P., Li, D., Schlapp, T., Kaltenboeck, B. „The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates Chlamydia-induced disease.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002: (99) 3914-3919.
- Hundeiker, C., Pineau, T., Cassar, G., Betensky, R. A., Gleichmann, E., Esser, C. „Thymocyte development in Ah-receptor-deficient mice is refractory to TCDD-inducible changes.“ *International Journal of Immunopharmacology*, 1999: (21) 841-859.
- Hwang, J. A., Lee, J. A., Cheong, S. W., Youn, H. J., Park, J. H. „Benzo(a)pyrene inhibits growth and functional differentiation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. Downregulation of RelB and eIF3 p170 by benzo(a)pyrene.“ *Toxicology Letters*, 2007: (169) 82-90.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. „Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans.“ 1997: (69) 1-631.
- Ignarro, L. J. „Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.“ *Annual Review of Toxicology and Pharmacology*, 1990: (30) 535-560.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R. M. „Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocytes/macrophage colony stimulating factor.“ *Journal of Experimental Medicine*, 1992: (176) 1693-1702.
- Jeong, H. G. „Cytokine-mediated suppression of cytochrome P450 1A1 in Hepa-1c1c7 cells by pokeweed mitogen.“ *Toxicology Letters*, 2001: (119) 125-132.
- Jeong, M. S., Kim, J. Y., Lee, H. I., Seo, S. J. „Calcitriol May Down-Regulate mRNA Over-Expression of Toll-Like Receptor-2 and -4, LL-37 and Proinflammatory Cytokines in Cultured Human Keratinocytes.“ *Annals of Dermatology*, 2014: (26) 296-302.
- Jiang, J., Duan, Z., Nie, X., Xi, H., Li, A., Guo, A., Wu, Q., Jiang, S., Zhao, J., Chen, G. „Activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) signaling pathway in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced neurotoxicity.“ *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014: (38) 119-130.
- Johnson, E. E., Lum, H. D., Rakhmilevich, A. L., Schmidt, B. E., Furlong, M., Buhtoiarov, I. N., Hank, J. A., Raubitschek, A., Colcher, D., Reisfeld, R. A., Gillies, S. D., Sondel, P. M. „Intratumoral immunocytokine treatment results in enhanced antitumor effects.“ *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2008: (57) 1891-1902.
- Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K., Valentino, K. L., Czaja, M. J. „Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways.“ *Journal of Biochemical Chemistry*, 2000: (275) 705-712.
- Jones, G., Prosser, D. E., Kaufmann, M. „25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012: (523) 9-18.
- Jones, S. A. „Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6.“ *Journal of Immunology*, 2005: (175) 3463-3468.
- Jones, S. „An overview of the basic helix-loop-helix proteins.“ *Genome Biology*, 2004: (5) 226.

- Jurewicz, A., Matysiak, M., Tybor, K., Kilianek, L., Raine, C. S., Selmaj, K. „Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor.“ *Brain*, 2005: (128) 2675-2688.
- Kaisho, T., Akira, S. „Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice.“ *Trends in Immunology*, 2001: (2) 78-83.
- Kapitulnik, J., Gonzalez, F. J. „Marked endogenous activation of the CYP1A1 and CYP1A2 genes in the congenitally jaundiced Gunn rat.“ *Molecular Pharmacology*, 1993: (43) 722-725.
- Kawamoto, H., Minato, N. „Myeloid cells.“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004: (36) 1374-1379.
- Ke, S., Rabson, A. B., Germino, J. F., Gallo, M. A., Tian, Y. „Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2001: (276) 39638-39644.
- Ke, S., Rabson, A. B., Germino, J. F., Gallo, M. A., Tian, Y. „Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2001: (276) 39638-39644.
- Kennedy, S. W., Jones, S. P. „Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader.“ *Analytical Biochemistry*, 1994: (222) 217-223.
- Kerkvliet, N. I. „Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins.“ *Environmental Health Perspectives*, 1995: (103) 47-53.
- Khatsenko, O., Kikkawa, Y. „Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver.“ *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997: (280) 1463-1470.
- Kikuchi, H., Kato, H., Mizuno, M., Hossain, A., Ikawa, S., Miyazaki, J., Watanabe, M. „Differences in inducibility of CYP1A1-mRNA by benzimidazole compounds between human and mouse cells: evidences of a human-specific signal transduction pathway for CYP1A1 induction.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996: (334) 235-240.
- 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. „Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor.“ *Molecular Pharmacology*, 2006: (69) 1871-1878.
- Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T. „Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory response.“ *Journal of Experimental Medicine*, 2009: (206) 2027.
- Kishimoto, T. „The Biology of Interleukin 6.“ *Blood*, 1989: (74) 1-10.
- Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T. „Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines.“ *Science*, 1992: (258) 593-597.
- Kishimoto, T., Akira, T., Narazaki, M., Taga, T. „Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130.“ *Blood*, 1995: (89) 1243-1254.

- Klostermann, L. *Immune System*. New York: Marshall Cavendish Benchmark, 2009.
- Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P. „Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B virus surface antigen.“ *Science*, 1980: 209 (4455) 497-499.
- Koeffler, H. P., Amatruda, T., Ikekawa, N., Kobayashi, Y., DeLuca, H. F. „Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues.“ *Cancer Research*, 1984: (44) 5624-5628.
- Kong, J., Grando, S. A., Li, Y.C. „Regulation of IL-1 family cytokines IL-1 α , IL-1 receptor antagonist, and IL-18 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary keratinocytes.“ *Journal of Immunology*, 2006: (176) 3780-3787.
- Kongsbak, M., Levring, T. B., Geisler, C., Rode von Essen, M. „The vitamin D receptor and T cell function.“ *Frontiers in Immunology*, 2013: (4) 148: 1-10.
- Korashy, H. M., El-Kadi, A. O. „Modulation of TCDD-mediated induction of cytochrome P450 1A1 by mercury, lead, and copper in human HepG2 cell line.“ *Toxicology In Vitro*, 2008: (22) 154-158.
- Krieger-Brauer, H. I., Kather, H. „The stimulus-sensitive H₂O₂-generating system present in human fat-cell plasma membranes is multireceptor-linked and under antagonistic control by hormones and cytokines.“ *The Biochemical Journal*, 1995: (307) 543-548.
- Kroetz, D. L., and Zeldin, D. C. „Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism.“ *Current Opinion in Lipidology*, 2002: (13) 273–283.
- Kusudo, T., Sakaki, T., Abe, D., Fujishima, T., Kittaka, A., Takayama, H., Ohta, M., Inouye, K. „Metabolism of 20-epimer of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 by CYP24: species-based difference between humans and rats.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003: (309) 885-892.
- Labeur, M. S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T. A., Schwarz, T., Grabbe, S. „Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage.“ *Journal of Immunology*, 1999: (162) 168-175.
- Lacey, D. L., Grosso, L. E., Moser, S. A., Erdmann, J., Tan, H. L., Pacifici, R., Villareal, D. T. „IL-1-induced murine osteoblast IL-6 production is mediated by the type 1 IL-1 receptor and is increased by 1,25 dihydroxyvitamin D3.“ *Journal of Clinical Investigation*, 1993: (91) 1713-1742.
- Lachman, L. B., Dinarello, C. A., Llansa, N. D., Fidler, I. J. „Natural and recombinant human interleukin 1-beta is cytotoxic for human melanoma cells.“ *Journal of Immunology*, 1986: (136) 3098-3102.
- Lampiasi, N., Azzolina, A., Montalto, G., Cervello, M. „Histamine and spontaneously released mast cell granules affect the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells.“ *Experimental and Molecular Medicine*, 2007: (39) 284-294.
- Lang, D. S., Becker, S., Devlin, R. B., Koren, H. S. „Cell-specific differences in the susceptibility of potential cellular targets of human origin derived from blood and lung following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).“ *Cellular Biology and Toxicology*, 1998: (14) 23-38.
- Langerhans, P. „Ueber die Nerven der menschlichen Haut.“ *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 1868: (44) 325-337.

- Lee, S. K., Kalinowski, J., Jastrzebski, S., Lorenzo, J.A. „1,25(OH)₂ vitamin D₃-stimulated osteoclast formation in spleen-osteoblast cocultures is mediated in part by enhanced IL-1 alpha and receptor activator of NF-kappa B ligand production in osteoblasts.“ *Journal of Immunology*, 2002: (169) 2374-2380.
- Leenen, P. J. M., De Bruijn, M. F. T. R., Voerman, J. S. A., Campbell, P. A., Ewijk, W. „Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies.“ *Journal of Immunological Methods*, 1994: (174) 5-19.
- Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., Ganz, T. „Defensins: Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells.“ *Annual Reviews of Immunology*, 1993: (11) 105-128.
- Leitzmann C., Müller C., Michel P., Brehmel U., Triebel T. *Ernährung in Prävention und Therapie*. Stuttgart: Hippokrater Verlag, 2009.
- Li, G. B., Lu, G. X. „Adherent cells in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced bone marrow-derived dendritic cell culture system are qualified dendritic cells.“ *Cellular Immunology*, 2010: (264) 4-6.
- Li, Q., Verma, I. M. „NFkB regulation in the immune system.“ *Nature Reviews Immunology*, 2002 (b): (2) 725-734.
- Li, W., Vogel, C. F., Wu, D., Matsumura, F. „Non-genomic action of TCDD to induce inflammatory responses in HepG2 human hepatoma cells and in liver of C57BL/6J mice.“ *Biological Chemistry*, 2010b: (391) 1205-1219.
- Li, Y. H., Yan, Z. Q., Brauner, A., Tullus, K. „Activation of macrophage nuclear factor-kappa B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS.“ *Respiratory Research*, 2002: (3) 23.
- Li, Y., Chen, G., Zhao, J., Nie, X., Wan, C., Liu, J., Duan, Z., Xu, G. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces microglial nitric oxide production and subsequent rat primary cortical neuron apoptosis through p38/JNK MAPK pathway.“ *Toxicology*, 2013: (312) 132-141.
- Liu, K., Nussenzweig, M. C. „Origin and Development of Dendritic Cells.“ *Immunological Reviews*, 2010: (234) 45-54.
- Liu, N., Zhang, Q. Y., Vakharia, D., Dunbar, D., Kaminsky, L. S. „Induction of CYP1A by benzo[k]fluoranthene in human hepatocytes: CYP1A1 or CYP1A2?“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001: (389) 130-134.
- Liu, P. T., Schenk, M., Walker, V. P., Dempsey, P. W., Kanchanapoomi, M., Wheelwright, M., Vazirnia, A., Zhang, X., Steinmeyer, A., Zügel, U., Hollis, B. W., Cheng, G., Modlin, R. L. „Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses.“ *Public Library of Science*, 2009: (4) e5810.
- Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., Ochoa, M. T., Schaubert, J., Wu, K., Meinken C. „Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response.“ *Science*, 2006: (311) 1770-1773.
- Lode, H. N., Xiang, R., Becker, J. C., Gillies, S. D., Reisfeld, R. A. „Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy.“ *Pharmacology and Therapeutics*, 1998: (80) 277-292.

- Lohr, C. „Effects of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in Human Liver Cell Models (in vitro) and in Mice (in vivo).“ *Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern*, 2013.
- Lorick, K. L., Toscano, D. L., Toscano, W. A. Jr. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters retinoic acid receptor function in human keratinocytes.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998: (243) 749-752.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag. 1. Auflage, 1998.
- Lovett, D., Kozan, B., Hadam, M., Resch, K., Gemsa, D. „Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis.“ *Journal of Immunology*, 1986: (136) 340-346.
- Lucas, M., Stuart, L. M., Savill, J., Lacy-Hulbert, A. „Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion.“ *Journal of Immunology*, 2003: (171) 2610-2615.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. *Der Experimentator Immunologie*. Heidelberg: Elsevier, 2006.
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Röbner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. „An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.“ *Journal of Immunological Methods*, 1999: (223) 77-92.
- Lutz, M. B., Schuler, G. „Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?“ *Trends in Immunology*, 2002: (23) 445-449.
- Ma, Q., Lu, A. Y. H. „CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies.“ *Drug Metabolism and Disposition*, 2007: (35) 1009-1016.
- MacDonald C. J., Ciolino H. P., Yeh G. C. „Dibenzoylmethane modulates aryl hydrocarbon receptor function and expression of cytochromes P50 1A1, 1A2 and 1B1.“ *Cancer Research*, 2001: 613919-24.
- MacMicking, J., Xie, Q. W., Nathan, C. „Nitric oxide and macrophage function.“ *Annual Review of Immunology*, 1997: (15) 323-350.
- Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T., Kliewer, S. A. „Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification.“ *Molecular Pharmacology*, 2002: (62): 638-46.
- Makin, G., Lohnes, D., Byford, V., Ray, R., Jones, G. „Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving, 24-oxidation.“ *Biochemical Journal*, 1989: (262) 173-180.
- Marim, F. M., Silveira, T. N., Lima, D. S., Zamboni, D. S. „A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved bone marrow cells.“ *PLoS ONE*, 2010: 5 (12) 1-8.
- Marlowe, J. L., Puga, A. „Aryl Hydrocarbon Receptor, Cell Cycle Regulation, Toxicity, and Tumorigenesis.“ *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005: (96) 1174-1184.

- Marshall, G. T., Lee, R. E., Marshall, F. E. „Common angiotensin receptor blockers may directly modulate the immune system via VDR, PPAR and CCR2b.“ *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 2006: (3:1) 1-33.
- Masuda, K., Kimura, A., Hanieh, H., Nguyen, N. T., Nakahama, T., Chinen, I., Otoyoy, Y., Murotani, T., Yamatodani, A., Kishimoto, T. „Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages.“ *International Immunology*, 2011: (10) 637-45.
- Masuda, S., Byford, V., Arabian, A., Sakai, Y., Demay, M. B., St-Arnaud, R., Jones, G. „Altered pharmacokinetics of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in the blood and tissues of the 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (Cyp24a1) null mouse.“ *Endocrinology*, 2005: (146) 825-834.
- Matsunawa, M., Agaki, D., Uno, S., Endo-Umeda, K., Yamada, S., Ikeda, K., Makishima, M. „Vitamin D receptor activation enhances Benzo-a-pyren metabolism via CYP1A1 expression in macrophages.“ *Drug Metabolism and Disposition*, 2012: 40 (11) 2059-2066.
- Matsunawa, M., Amano, Y., Endo, K., Uno, S., Sakaki, T., Yamada, S., Makishima, M. „The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D₃ catabolism in macrophages.“ *Toxicological Sciences*, 2009: (109) 50-58.
- Matthews J., Gustafsson J.-A. „Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways.“ *Nuclear Receptor Signaling*, 2006: (4) 1-4.
- Maund, S. L., Barclay, W. W., Hover, L. D., Axanova, L. S., Sui, G., Hipp, J. D., Fleet, J. C., Thorburn, A., Cramer, S. D. „Interleukin-1 α mediates the antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in prostate progenitor/stem cells.“ *Cancer Research*, 2011: (71) 5276-5286.
- Messer, A. „Trennung von Aminosäuren mittels HPLC.“ *Forschungsarbeit, AG Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Wintersemester 2009/2010*.
- Metcalf, D., Burgess, A.W., Johnson, G. R., Nicola, N. A., Nice, E. C., DeLamararter, J., Thatcher, D. R., Mermod, J.-J. „In Vitro Actions on Hemopoietic Cells of Recombinant Murine GM-CSF Purified After Production in Escherichia coli: Comparison With Purified Native GM-CSF.“ *Journal of Cellular Physiology*, 1986: (138) 421-431.
- Meyer, M. B., Pike, J. W. „Corepressors (NCoR and SMRT) as well as coactivators are recruited to positively regulated 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-responsive genes.“ *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013: (136) 120-124.
- Meyer, V. R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*. Wiley VCH, 2004.
- Miller, K.P., Ramos, K.S. „Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzopyrene and related hydrocarbons.“ *Drug Metabolism Reviews*, 2001: (33) 1-35 .
- Miller, N. M., Shriver, L. P., Bodiga, V. L., Ray, A., Basu, S., Ahuja, R., Jana, A., Pahan, K., Dittel, B. N. „Lymphocytes with cytotoxic activity induce rapid microtubule axonal destabilization independently and before signs of neuronal death.“ *ASN Neuro*, 2013: (5) 13-26.

- Monostory, K., Pascussi, J.-M., Kobori, L., Dvorak, Z. „Hormonal regulation of CYP1A expression.“ *Drug Metabolism Reviews*, 2009: (41) 547-572.
- Moore, D. D., Shigeaki, K., Xie, W., Mangelsdorf, D. J., Schmidt, D. R., Xiao, R., Kliewer, S. A. „International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor.“ *Pharmacological Reviews*, 2006: (58) 742-759.
- Moore, R. N., Steeg, P. S., Männel, D. N., Mergenhagen, S. E. „Role of lipopolysaccharide in regulating colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation in vitro.“ *Infection and Immunity*, 1980: (30) 797-804.
- Moos, A. B., Oughton, J. A., Kerkvliet, N. I. „The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on tumor necrosis factor (TNF) production by peritoneal cells.“ *Toxicological Letters*, 1997: (90) 145-153.
- Moreau, A., Maurel, P., Vilarem, M. J., Pascussi J.-M. „Constitutive androstane receptor-vitamin D receptor crosstalk: consequence on CYP24 gene expression.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007: (360) 76–82.
- Morel, Y., Barouki, R. „Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1.“ *Journal of Biological Chemistry*, 1998: (273) 26969-26976.
- Morgan, E. T. „Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?“ *Drug Metabolism and Disposition*, 2000: (29) 207-212.
- Morgan, E. T. „Regulation of Cytochromes P450 during Inflammation and Infection.“ *Drug Metabolism Reviews*, 1997: (29) 1129-1188.
- Mosser, D. M., Edwards, J. P. „Exploring th full spectrum of macrophage activation .“ *Nature Reviews Immunology*, 2008: (8) 958-969.
- Moya, M., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V., Jover, R. „Enhanced steatosis by nuclear receptor ligands: a study in cultured human hepatocytes and hepatoma cells with a characterized nuclear receptor expression profile.“ *Chemico-biological Interactions*, 2010: (184) 376-387.
- Moynagh, P. N. „The NFκB pathway.“ *Journal of Cell Science*, 2005: (118) 4389-4392.
- Munger, K.L., Zhang, S.M., O'Reilly, E., Hernan, M.A., Olek, M.J., Willett, W.C., Ascherio, A. „Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis.“ *Neurology*, 2004: (62) 60-65.
- Muntané-Relat, J., Ourlin, J. C., Domergue, J., Maurel, P. „Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture.“ *Hepatology*, 1995: (22) 1143-1153.
- Murayama A., Takeyama K., Kitanaka S., Kodera Y., Hosoya T., Kato S. „The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 a-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1,25(OH)2D3.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998: (249) 11-16.
- Murphy, K. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, 2012.

- Murray, G. I., Barnes, T. S., Sewell, H. F., Ewen, S. W. B., Melvin, W. T., Burke, M. D. „The immunocytochemical localisation and distribution of the cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with monoclonal antibody to human cytochrome P-450.“ *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1988: (25) 465-475.
- Nathan, C. „Metchnikoff's Legacy in 2008.“ *Nature Immunology*, 2008: (9) 695-698.
- Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., Karin, M. „Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production.“ *Science*, 2007: (317) 121-124.
- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., Gonzalez F. J. „Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2004: (279) 23487-23850.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., Dalton, T. P. „Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis.“ *Biochemical Pharmacology*, 2000: (59) 65-85.
- Nguyen, L. P., Bradfield, C. A. „The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor.“ *Chemical Research in Toxicology*, 2008: (21) 102-116.
- Nguyen, N. T., Hanieh, H., Nakahama, T., Kishimoto, T. „The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses.“ *International Immunology*, 2013: (25) 335-343.
- Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., Kishimoto, T. „Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010: (107) 19961-19966.
- Nilsson, C. B., Hakansson, H. „The Retinoid Signaling System — A Target in Dioxin Toxicity.“ *Critical Reviews in Toxicology*, 2002: (32) 211-232.
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S., Satoh, T. „Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reversed Transcription PCR.“ *The Pharmaceutical Society of Japan*, 2003: (123) 369-375.
- Nishimura, N., Nishimura, H., Ito, T., Miyata, C., Izumi, K., Fujimaki, H., Matsumura, F. „Dioxin-induced up-regulation of the active form of vitamin D is the main cause for its inhibitory action on osteoblast activities, leading to developmental bone toxicity.“ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009: (236) 301-309.
- Nohara, K., Pan, X., Tsukumo, S., Hida, A., Ito, T., Nagai, H., Inouye, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., Tohyama, C. „Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes.“ *Journal of Immunology*, 2005: (174) 2770-2777.
- North, C. M., Crawford, R. B., Lu, H., Kaminski, N. E. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Mediated Suppression of Toll-Like Receptor Stimulated B-Lymphocyte Activation and Initiation of Plasmacytic Differentiation.“ *Toxicological Sciences*, 2010: (116) 99-112.

- Nunn, J. D., Katz, D. R., Barker, S., Fraher, L. J., Hewison, M., Hendy, G. N., O'Riordan, J. L. „Regulation of human tonsillar T-cell proliferation by the active metabolite of vitamin D3.“ *Immunology*, 1986: (59) 479-484.
- Nussler, A. K., Di Silvio, M., Billiar, T. R., Hoffman, R. A., Geller, D. A., Selby, R., Madariaga, J., Simmons, R. L. „Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin.“ *Journal of Experimental Medicine*, 1992: (176) 261-264.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. „Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.“ *European Journal of Biochemistry*, 2000: (267) 5421-5426.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., Ghosh, S. „Crosstalk in NF- κ B signaling pathways.“ *Nature Immunology*, 2011: (12) 695-708.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambo, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. „Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.“ *Nature*, 2003: (423) 545-50.
- Okey, A. B., Bondy, G. P., Mason, M. E., Kahl, G. F., Eisen, H. J., Guenther, T. M., Nebert, D. W. „Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation.“ *Journal of Biochemical Chemistry*, 1979: (254) 11636-11648.
- Olszewski, M. B., Groot, A. J., Dastych, J., Knol, E. F. „TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis.“ *Journal of Immunology*, 2007: (178) 5701-5709.
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, CL., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick W., Platten M. „An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor.“ *Nature*, 2011: (478) 197-203.
- Opp, M. R., Smith, E. M., Hughes, T. K. Jr. „Interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) acts in the central nervous system of rats to reduce sleep.“ *Journal of Neuroimmunology*, 1995: (60) 165-168.
- Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., Campisi, J. „Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009: (106) 17031-17036.
- Ortiz de Montellano, P. R. „Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes.“ *Chemical Reviews*, 2010: (110) 932-948.
- Panich, i V., De Pietro, S., Andreini, B., Bianchi, A. M., Migliori, M., Taccola, D., Giovannini, L., Tetta, C., Palla, R. „Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium.“ *Kidney International*, 1998: (54) 1463-1469.
- Parashar, B., Thakur, A., Prashar, D., Chauhan, A. „Stabilization of Calcitriol in Tablet Dosage Form.“ *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 2012: (2) 103-111.
- Park, S. J., Yoon, W. K., Kim, H. J., Son, H. Y., Cho, S. W., Jeong, K. S., Kim, T. H., Kim, S. H., Kim, S. R., Ryu, S. Y. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in RAW 264.7 cells.“ *Anticancer Research*, 2005: (25) 2831-2836.

- Pascussi, J.-M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J., Maurel, P. „The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2008: (48) 1-32.
- Paton, T. E., Renton, K. W. „Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepa1 cells.“ *Biochemical Pharmacology*, 1998: (55) 1791-1796.
- Pegg, D. E. „Principles of cryopreservation.“ *Methods in Molecular Biology*, 2007: (368) 39-57.
- Peltier, M. R., Arita, Y., Klimova, N. G., Gurzenda, E. M., Koo, H. C., Murthy, A., Lerner, V., Hanna, N. „2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) enhances placental inflammation.“ *Journal of Reproductive Immunology*, 2013: (98) 10-20.
- Penn, P.E., Jiang, D-Z., Fei, R-G., Sitnicka, E., Wolf, N. S. „Dissecting the hematopoietic microenvironment. IX. Further characterization of murine bone marrow stromal cells.“ *Blood*, 1993: (81) 1205.
- Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K.C., Vulcano, M., Sozzani, S., Adorini, L. „1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells.“ *Journal of Immunology*, 2007: (178) 145-153.
- Péron, J. M., Bureau, C., Gourdy, P., Lulka, H., Souque, A., Calippe, B., Selves, J., Al Saati, T., Bernad, J., Cordelier, P., Couderc, B., Pradayrol, L., Pipy, B., Buscail, L., Vinel, J. P. „Treatment of experimental murine pancreatic peritoneal carcinomatosis with fibroblasts genetically modified to express IL12: a role for peritoneal innate immunity.“ *Gut*, 2007: (56) 107-114.
- Peter, J. F., Otto, A. M., Szabados, I., Wolf, B. „Sekretionsmustererkennung von Tumorzellen.“ *BIOspektrum*, 2007: (04/07), 376-379.
- Peters, A. K., van Londen, K., Bergman, A., Bohonowych, J., Denison, M. S., van den Berg, M., Sanderson, J.T. „Effects of polybrominated diphenyl ethers on basal and TCDD-induced ethoxyresorufin activity and cytochrome P450-1A1 expression in MCF-7, HepG2, and H4IIE cells.“ *Toxicological Sciences*, 2004: (82) 488-496.
- Petkovich, M., Jones, G. „CYP24A1 and kidney disease.“ *Current Opinion in Nephrology & Hypertension*, 2011: (20) 337-344.
- Petrulis, J. R., Chen, G., Benn, S., LaMarre, J., Bunce, N. J. „Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds.“ *Environmental Toxicology*, 2001: (16) 177-184.
- Pfaffl, M. W. „A new mathematical model for relative quantification in real-time T-PCR.“ *Nucleic Acids Research*, 2001: 29 (9) 2002-2007.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal, C., Allavena, P., Di, C. V. „Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells.“ *Journal of Immunology*, 2000: (164) 4443-4451.
- Pierre, S., Chevallier, A., Teixeira-Clerc, F., Ambolet-Camoit, A., Bui, L. C., Bats, A. S., Fournet, J. C., Fernandez-Salguero, P., Aggerbeck, M., Lotersztajn, S., Barouki, R., Coumoul, X. „Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin.“ *Toxicological Sciences*, 2014: (137) 114-124.

- Pike, J. W., Meyer, M. B. „Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression.“ *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013: 10.1016/j.jsbmb.2013.11.004. [Epub ahead of print].
- Pizarro, G., Ríos, E. „How source content determines intracellular Ca²⁺ release kinetics. Simultaneous measurement of [Ca²⁺] transients and [H⁺] displacement in skeletal muscle.“ *Journal of General Physiology*, 2004: (124) 239-258.
- Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. „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.“ *Journal of Biochemical Chemistry*, 1976: (251) 4936-4946.
- Poland, A., Knutson, J. C.. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin and Related Halogenated Aromatic Hydrocarbons: Examination of The Mechanism of Toxicity.“ *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1982: (22) 517-554.
- Price, D. A., Klenerman, P., Booth, B. L., Phillips, R. E., Sewell, A. K. „Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity.“ *Immunology Today*, 1999: (20) 212-216.
- Prigent, L., Robineau, M., Jouneau, S., Morzadec, C., Louarn, L., Vernhet, L., Fardel, O., Sparfel, L. „The aryl hydrocarbon receptor is functionally upregulated early in the course of human T-cell activation.“ *European Journal of Immunology*, 2014: (44) 1330-1340.
- Prosser, D. E., Jones, G. „Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D.“ *Trends in Biological Sciences*, 2004: (29) 665-673.
- Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Defetos, L. J., Manolagas, S. C. „1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes.“ *Science*, 1983: (221) 1181-1183.
- Puga, A., Tomlinson, C. R., Xia, Y. „Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways.“ *Biochemical Pharmacology*, 2005: (69) 199-207.
- Ramnath N., Nadal E., Jeon C. K., Sandoval J., Colacino J., Rozek L. S., Christensen P.J., Esteller M., Beer D.G., Kim S. H. „Epigenetic regulation of vitamin D metabolism in human lung adenocarcinoma.“ *Journal of Thoracic Oncology*, 2014: (9) 473-482.
- Reisz-Porszasz, S., Reyes, H., DeLuca, H. F., Prah, J. M., Hankinson, O. „Investigation on the potential role of the Ah receptor nuclear translocator protein in vitamin D receptor action.“ *Journal of Receptor Research*, 1993: (13) 1147-1159.
- Resch, K., Martin, M. U., Kaefer, V. *Immunopharmakologie*. Ulmer UTB, 2010.
- Rier, S. E., Coe, C. L., Lemieux, A. M., Martin, D. C., Morris, R., Lucier, G. W., Clark, G. C. „Increased tumor necrosis factor- α production by peripheral blood leukocytes from TCDD-exposed rhesus monkeys.“ *Toxicological Sciences*, 2001: (60) 327-337.
- Rigby, W. F., Noelle, R. J., Krause, K., Fanger, M. W. „The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human T lymphocyte activation and proliferation: a cell cycle analysis.“ *Journal of Immunology*, 1985: (135) 2279-2286.
- Rink, L., Kruse, A., Haase, H. *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, 2012.

- Ronca, R., Sozzani, S., Presta, M., Alessi, P. „Delivering cytokines at tumor site: The immunocytokine-conjugated anti-EDB-fibronectin antibody case.“ *Immunobiology*, 2009: (214) 800-810.
- Rook, G. A., Taverne, J., Leveton, C., Steele, J. „The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis.“ *Immunology*, 1987: (62) 229-234.
- Rowlands, J. G., Gustafsson, J. A. „Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction.“ *Critical Reviews in Toxicology*, 1997: (27) 109-134.
- Ruby, C. E., Funatake, C. J., Kerkvliet, N. I. „2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) Directly Enhances the Maturation and Apoptosis of Dendritic Cells In Vitro.“ *Journal of Immunotoxicology*, 2005: (1) 159-166.
- Ruco, L. P., Meltzer, M. S. „Macrophage activation for tumor cytotoxicity: development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions.“ *Journal of Immunology*, 1978: (121) 2035-2042.
- Rushing, S. R., Denison, M. S. „The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002: (403) 189-201.
- Sadeghi, K., Wessner, B., Laggner, U., Ploder, M., Tamandl, D., Friedl, J., Zügel, U., Steinmeyer, A., Pollak, A., Roth, E., Boltz-Nitulescu, G., Spittler, A. „Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns.“ *European Journal of Immunology*, 2006: (36) 361-370.
- Safe, S. H. „Modulation of Gene Expression and Endocrine Response Pathways by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Related Compounds.“ *Pharmacology & Therapeutics*, 1995: (67) 247-281.
- Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G. Y., Maeda, S., Hardiman, G., Karin, M. „Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis.“ *Cancer Cell*, 2008: (14) 156-165.
- Schaldach, C. M., Riby, J., Bjeldanes, L. F. „Lipoxin A4: A New Class of Ligand for the Ah Receptor.“ *Biochemistry*, 1999: (38) 7594-7600.
- Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R., Reske, K. „Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor.“ *Journal of Immunological Methods*, 1992: (154) 253-264.
- Schindler, L. *Understanding the Immune System*. National Institute of Health, 1991.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., Dinarello, C. A. „Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF.“ *Blood*, 1990: (75) 40-47.
- Schmiedlin-Ren, P., Thummel, K. E., Fisher, J. M., Paine, M. F., Lown, K. S., Watkins, P. B. „Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3.“ *Molecular Pharmacology*, 1997: (51) 741-754.

- Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J., Reed, M. W. „Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods.“ *Analytical Biochemistry*, 2000: (285) 194-204.
- Schrenk, D. „Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics.“ *Biochemical Pharmacology*, 1998: (55) 1155-1162.
- Schrenk, D., Stuken, T., Gohl, G., Viebahn, R., Bock, K.W. „Induction of CYP1A and glutathione S-transferase activities by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatocyte cultures.“ *Carcinogenesis*, 1995: (16) 943-946.
- Schrödel, A. „Kryokonservierung von eukaryotischen Zellkulturzellen.“ *Biologie in unserer Zeit*, 2009: 39 (5) 308.
- Schuetze, N., Schoeneberger, S., Mueller, U., Freudenberg, M. A., Albert, G., Staubinger, R. K. „IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by Salmonella Enteritidis and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages.“ *International Immunology*, 2005: (17) 649-659.
- Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G., Fiers, W. „Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF.“ *EMBO Journal*, 1993: (12) 3095-3104.
- Schütt, C., Bröker, B. *Grundwissen Immunologie*. Elsevier, 1. Auflage, 2006.
- Seeds, M. C., Bass, D. A. „Regulation and metabolism of arachidonic acid.“ *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 1999: (17) 5–26.
- Seglen, P. O. „Preparation of isolated rat liver cells.“ *Methods in Cell Biology*, 1976: (13) 29-83.
- Seibel, T. „Metabolitenmuster im Blut und Genexpressionsmuster in Arylhydrocarbon-Rezeptor-defizienten und wildtyp Mäusen.“ *unveröffentlichte Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern*, 2014.
- Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M. „Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide induced septic shock.“ *Molecular Cell Biology*, 2009: (29) 6391.
- Semenkova, L. N., Dudich, E. I., Dudich, I. V., Shingarova, L. N., Korobko, V. G. „Alpha-fetoprotein as a TNF resistance factor for the human hepatocarcinoma cell line HepG2.“ *Tumour Biology*, 1997: (18) 30-40.
- Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M., Pamer, E. G. „Monocyte-mediated Defense Against Microbial Pathogens.“ *Annual Reviews in Immunology*, 2008: (26) 421-452.
- Shalaby, M. R., Waage, A., Aarden, L., Espevik, T. „Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo.“ *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1989: (53) 488-498.
- Shapiro, H. M. *Practical Flow Cytometry*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2003.
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., Flier, J. S. „TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.“ *Journal of Clinical Investigation*, 2006: (116) 3015-3025.

- Siegemund, S., Schütze, N., Freudenberg, M. A., Lutz, M. B., Straubinger, R. K., Alber, G. „Production of IL-12, IL-23 and IL-27p28 by bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than macrophages after LPS/TLR4-dependent induction by Salmonella Enteritidis.“ *Immunobiology*, 2008: (212) 739-750.
- Siewert, E., Bort, R., Kluge, R., Heinrich, P. C., Castell, J., Jover, R. „Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent.“ *Hepatology*, 2000: (32) 49-55.
- Silkworth, J. B., Koganti, A., Illouz, K., Possolo, A., Zhao, M., Hamilton, S. B. „Comparison of TCDD and PCB CYP1A induction sensitivities in fresh hepatocytes from human donors, sprague-dawley rats, and rhesus monkeys and HepG2 cells.“ *Toxicological Sciences*, 2005: (87) 508-519.
- Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier M. C., Bessis, N., Rammensee, H-G., Decker, P. „The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering.“ *Immunobiology*, 2013: (218) 28-39.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. K., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. „Measurement of protein using bicinchoninic acid.“ *Analytical Biochemistry*, 1985: (150) 76-85.
- Sonneveld, E., Jonas, A., Meijer, O. C., Brouwer, A., van der Burg, B. „Glucocorticoid-enhanced expression of dioxin target genes through regulation of the rat aryl hydrocarbon receptor.“ *Toxicological Sciences*, 2007: (99) 455-469.
- Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W. A., Brill, T., Siewert, J. R., Greim, H., Doehmer, J. „Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994: (91) 3559-3563.
- Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., Loscalzo, J. „S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992: (89) 444-448.
- Steinman, R., Cohn, Z. A. „Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice.“ *J. Exp. Med.*, 1973: (137) 1142-1162.
- Stephen, F. D., Draushuk, A. T., Olson, J. R. „Cytochrome P450 1A1 induction in rat lymphoid tissues following in vivo and in vitro exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires protein kinase C.“ *Toxicology*, 1997: (124) 39-51.
- Stevens, E. A., Mezrich, J. D., Bradfield, C.A. „The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system.“ *Immunology*, 2009: (127) 299-311.
- Stewart, M., Thiel, M., Hogg, N. „Leukocyte Integrins.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 1995: (7) 690-696.
- Stockinger, B. „Beyond toxicity: aryl hydrocarbon receptor-mediated functions in the immune system.“ *Journal of Biology*, 2009: (8) 61.
- Stockinger, B., DiMeglio, P., Gialitakis, M., Duarte, J. H. „The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System.“ *Annual Review of Immunology*, 2014: (32) 403-432.

- Stockinger, B., Hirote, K., Duarte, J., Veldhoen, M. „External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor.“ *Seminars in Immunology*, 2011: (23) 99-105.
- Stuehr, D. J., Nathan, C. F. „Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells.“ *Journal of Experimental Medicine*, 1989: (169) 1543-1555.
- Sulentic, C. E. W., Kaminski, N. E. „The Long Winding Road toward Understanding the Molecular Mechanisms for B-Cell Suppression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.“ *Toxicological Sciences*, 2011: (120) 171-191 .
- Sun Y. V., Boverhof D. R., Burgoon L. D., Fielden M. R., Zacharewski T. R. „Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences.“ *Nucleic Acids Research*, 2004: (32) 4512-4523.
- Szeto, F. L., Sun, J., Kong, J., Duan, Y., Liao, A., Madara, J. L., Li, Y. C. „Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts.“ *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2007: (103) 563-566.
- Tatro, E. T., Soontornniyomkij, B., Letendre, S. L., Achim, C. L. „Cytokine secretion from brain macrophages infected with human immunodeficiency virus in vitro and treated with raltegravir.“ *BMC Infectious Diseases*, 2014: (14) 386.
- Teske S., Bohn A. A., Regal J. F., Neumiller J. J., Lawrence B. P. „Activation of the aryl hydrocarbon receptor increases pulmonary neutrophilia and diminishes host resistance to influenza A virus.“ *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005: (289) 111-124.
- Thomsen, J. S., Wang, X., Hines, R. N., Safe, S. „Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor.“ *Carcinogenesis*, 1994: (15) 933-937.
- Thummel, K. E., Brimer, C., Yasuda, K., Thottassery, J., Senn, T., Lin, Y., Ishizuka, H., Kharasch, E., Schuetz, J., Schuetz, E. „Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3.“ *Molecular Pharmacology*, 2001: (60) 1399-1406.
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M. S. „Ah Receptor and NF-kB Interactions, a Potential Mechanism for Dioxin Toxicity.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 1999: (274) 510-515.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M. W. „Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reactions set-up.“ *Nucleic Acid Research*, 2003: 31 (20) 6688.
- Ting, J. P-Y., Trowsdale, J. „Genetic Control of MHC Class II Expression.“ *Cell*, 2002: (109) S21-S33.
- Tsoukas, C. D., Watry, D., Escobar, S. S., Provvedini, D. M., Dinarello, C. A., Hustmyer, F. G., Manolagas, S. C. „Inhibition of interleukin-1 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3.“ *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1989: (69) 127-133.
- Tuohimaa, P., Lyakhovich, A., Aksenov, N., Pennanen, P., Syvala, H., Lou, Y.R., Ahonen, M., Hasan, T., Pasanen, P., Blauer, M., Manninen, T., Miettinen, S., Vilja, P., Ylikomi, T. „Vitamin D and prostate cancer.“ *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2001: (76) 125-134.

- Uno, S., Dragin, N., Miller, M. L., Dalton, T. P., Gonzalez, F. J., Nebert, D. W. „Basal and inducible CYP1 mRNA quantitation and protein localization throughout the mouse gastrointestinal tract.“ *Free Radical Biology & Medicine*, 2008: (44) 570-583.
- Van de Laar, L., Coffey, P. J., Woltman, A. M. „Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy.“ *Blood*, 2012: (119) 3383-3393.
- van den Hove, M. F., Stoenoiu, M. S., Croizet, K., Couvreur, M., Courtoy, P. J., Devuyst, O., Colin, I. M. „Nitric oxide is involved in interleukin-1 α -induced cytotoxicity in polarised human thyrocytes.“ *Journal of Endocrinology*, 2002: (173) 177-185.
- van Duursen, M. B., Sanderson, J. T., van den Berg, M. „Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility.“ *Toxicological Sciences*, 2005: (85) 703-712.
- van Ede, K. I., Gaisch, K. P., van den Berg, M., van Duursen, M. B. „Differential relative effect potencies of some dioxin-like compounds in human peripheral blood lymphocytes and murine splenic cells.“ *Toxicology Letters*, 2014: (226) 43-52.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Bauer, J., Dumoutier, L., Renault, J.-C., Stockinger, B. „The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins.“ *Nature*, 2008: (453) 106-110.
- Veldman, C. M., Cantorna, M. T., DeLuca, H. F. „Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000: (374) 334-338.
- Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N., Goldman, M. „Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway.“ *Journal of Immunology*, 1997: (158) 2919-2925.
- Verschoor, C. P., Puchta, A., Bowdish, D. M. E. „The Macrophage.“ *Methods in Molecular Biology*, 2012: (844) 139-156.
- Vogel, C. F., Khan, E. M., Leung, P. S., Gershwin, M. E., Chang, W. L., Wu, D., Haarmann-Stemmann, T., Hoffmann, A., Denison, M. S. „Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- κ B.“ *Journal of Biological Chemistry*, 2014: (289) 1866-1875.
- Vogel, C. F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G., Matsumura, F. „RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription.“ *Molecular Endocrinology*, 2007a: (21) 2941-2155.
- Vogel, C. F., Sciallo, E., Matsumura, F. „Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007b: (363) 722-726.
- Vogel, C. F., Sciallo, E., Wong, P., Kuzmicky, P., Kado, N., Matsumura, F. „Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates.“ *Environmental Health Perspectives*, 2005: (113) 1536-1541.
- Vogel, C., Donat, S., Döhr, O., Kremer, J., Esser, C., Roller, M., Abel, J. „Effect of subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on immune system and target gene responses in mice: calculation

- of benchmark doses for CYP1A1 and CYP1A2 related enzyme activities.“ *Archives of Toxicology*, 1997: (71) 372-382.
- Vorderstrasse, B. A., Dearstyne, E. A., Kerkvliet, N. I. „Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells.“ *Toxicological Sciences*, 2003: (72) 103-112.
- Wahlström, D., Hakansson, H., Pettersson, K. „Transcription crosstalk between RAR and AhR signalling pathways in murine P19 embryonic carcinoma cells.“ *Submitted to Toxicology in vitro*.
- Wang, B., Zhou, S. F. „Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development.“ *Current Medicinal Chemistry*, 2009: (16) 4066-4218.
- Wang, Q., Zhang, W., Li, H., Aprecio, R., Wu, W., Lin, Y., Li, Y. „Effects of 25-hydroxyvitamin D3 on cathelicidin production and antibacterial function of human oral keratinocytes.“ *Cellular Immunology*, 2013: (283) 45-50.
- Wanner, R., Brömmer, S., Czarnetzki, B. M., Rosenbach, T. „The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995: (209) 706-711.
- Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. M., Rosenbach, T. „Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only.“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996: (1317) 105-111.
- Warncke, M., Doderio, A., Dierbach, H., Follo, M., Veelken, H. „Murine dendritic cells generated under serum-free conditions have a mature phenotype and efficiently induce primary immune responses.“ *Journal of Immunological Methods*, 2006: (310) 1-11.
- Westerink, W. M. A., Schoonen, W. G. E. J. „Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells.“ *Toxicology in Vitro*, 2007: (21) 1592-1602.
- Weston, W. M., Nugent, P., Greene, R. M. „Inhibition of Retinoic-Acid-Induced Gene Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995: (207) 690-694.
- Widerak, M., Ghoneim, C., Dumontier, M. F., Quesne, M., Corvol, M. T., Savouret, J. F. „The aryl hydrocarbon receptor activates the retinoic acid receptoralpha through SMRT antagonism.“ *Biochimie*, 2006: (88) 387-397.
- Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A. „Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties.“ *Drug Metabolism and Disposition*, 2003: (31) 1035-1042.
- Wolters, M., Stöhle, A., Hahn, A. „Qualifizierte Ernährungsberatung in der Apotheke: Neue Erkenntnisse zu Vitamin D und Vitamin B12.“ *Deutsche Apotheker Zeitung*, 2005: (145) Nr. 2, S. 1-8.
- Wu, S., Liao, A. P., Xia, Y., Li, Y. C., Li, J. D., Sartor, R. B., Sun, J. „Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF-kappaB activity in intestine.“ *The American Journal of Pathology*, 2010: (177) 686-697.

- Xu, H., Soruri, A., Gieseler, R. K., Peters, J. H. „1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigenexpression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes.“ *Scandinavian Journal of Immunology*, 1993: (38) 535-540.
- Xu, L., Li A. P., Kaminski, D. L., Ruh, M. F. „2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes.“ *Chemico-Biological Interactions*, 2000: (124) 173-189.
- Xu, Y., Jin, H., Yang, X., Wang, L., Su, L., Liu, K., Gu, Q., Xu, X. „MicroRNA-93 inhibits inflammatory cytokine production in LPS-stimulated murine macrophages by targeting IRAK4.“ *FEBS Letters*, 2014: (588) 1692-1698.
- Yang, C. Y., Leung, P. S. C., Adamopoulos, I. E., Gershwin, M. E. „The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: A Comprehensive Review.“ *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2013: (45) 217-226.
- Yokochi, T., Nakashima, I., Kato, N., Miyadai, T., Yoshida, K., Kimura, Y. „In vivo effects of bacterial lipopolysaccharide on proliferation of macrophage colony-forming cells in bone marrow and peripheral lymphoid tissues.“ *Infection and Immunity*, 1985: (47) 496-501.
- Yousefi, S., Vu, D., Carandang, G., Yamamoto, R., Granger, G., Vaziri, N., Ocariz, J., Cesario, T. „The effect of vitamin D3 on the production of cytotoxic factors by human peripheral blood mononuclear cells.“ *Cancer Research*, 1989: (49) 5083-5086.
- Yuhas, Y., Berent, E., Ashkenazi, S. „Effect of rifampin on production of inflammatory mediators in HepG2 liver epithelial cells.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011: (55) 5541-5546.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Granucci, F. „Generation of mouse bone marrow-derived macrophages (BM-MFs).“ *Protocol Exchange*, 2009.
- Zarrabeitia, M. T., Riancho, J. A., Amado, J. A., Olmos, J. M., Gonzalez-Macias, J. „Effect of calcitriol on the secretion of prostaglandin E2, interleukin 1, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes.“ *Bone*, 1992: (13) 185-189.
- Zeiger, M., Haag, R., Höckel, J., Schrenk, D., Schmitz, H.-J. „Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies.“ *Toxicological Sciences*, 2001: (63) 65-73.
- Zhang, B., Shan, H., Li, D., Li, Z. R., Zhu, K. S., Jiang, Z. B., Huang, M. S. „Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of TRAIL receptors.“ *Tumori*, 2012b: (98) 800-803.
- Zhang, Y., Leung, D. Y., Richers, B. N., Liu, Y., Remigio, L. K., Riches, D. W., Goleva, E. „Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1.“ *Journal of Immunology*, 2012: (188) 2127-2135.
- Zhang, Z. Y., Pelletier, R. D., Wong, Y. N., Sugawara, M., Zhao, N., Littlefield, B. A. „Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006: (341) 399-407.

Zhao, B., Degroot, D. E., Hayashi, A., He, G., Denison, M. S. „CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor.“ *Toxicological Sciences*, 2010: (117) 393-403.

Zhu, Y., Mahon, B. D., Froicu, M., Cantorna, M. T. „Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease.“ *European Journal of Immunology*, 2005: (35) 217-224.

Ziegler, V. „Master's Thesis. Crosstalk between Bone Marrow Derived Immune Cells and Liver Cells.“ *TU Kaiserslautern. AG Prof. Dr. Dr. D. Schrenk*, 2013.

Zordoky, B. N., El-Kadi, A. O. „Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes.“ *Current Drug Metabolism*, 2009: (10) 164-178.

ANHANG

9.1 Weitere Daten

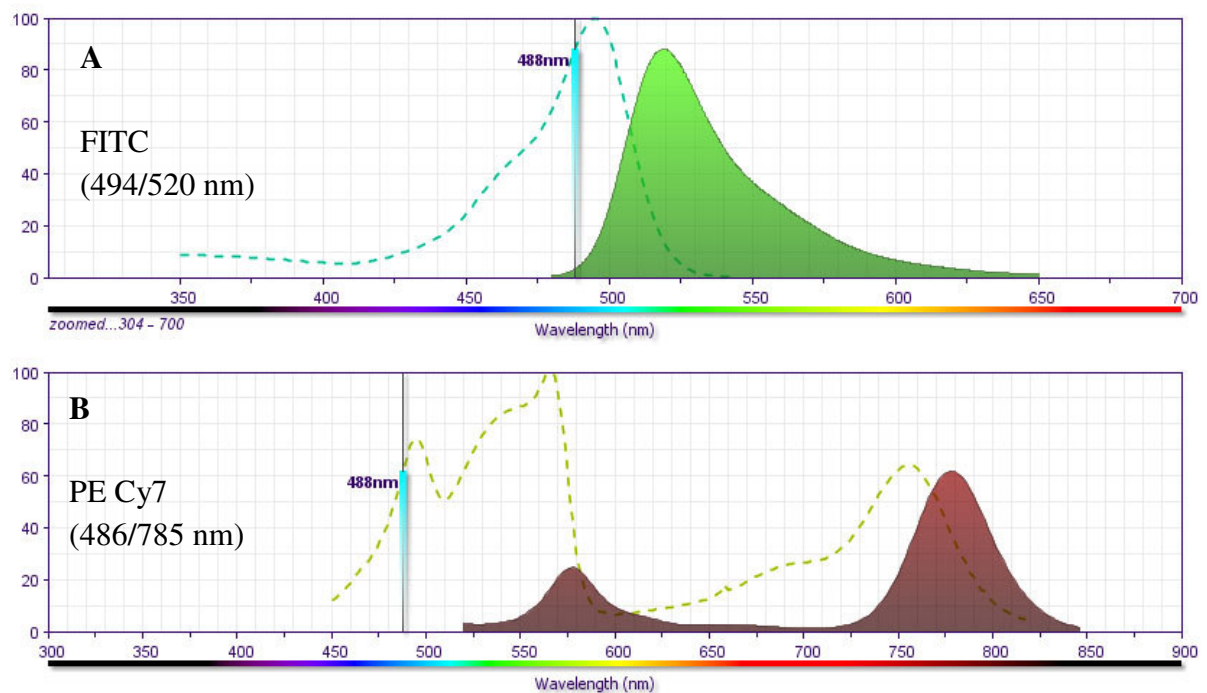


Abbildung 94: Anregungs- und Emissionswellenlängen von FITC (A) und PE-Cy7 (B) für Durchflusssy-
tometrie. (<http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrumguide>).

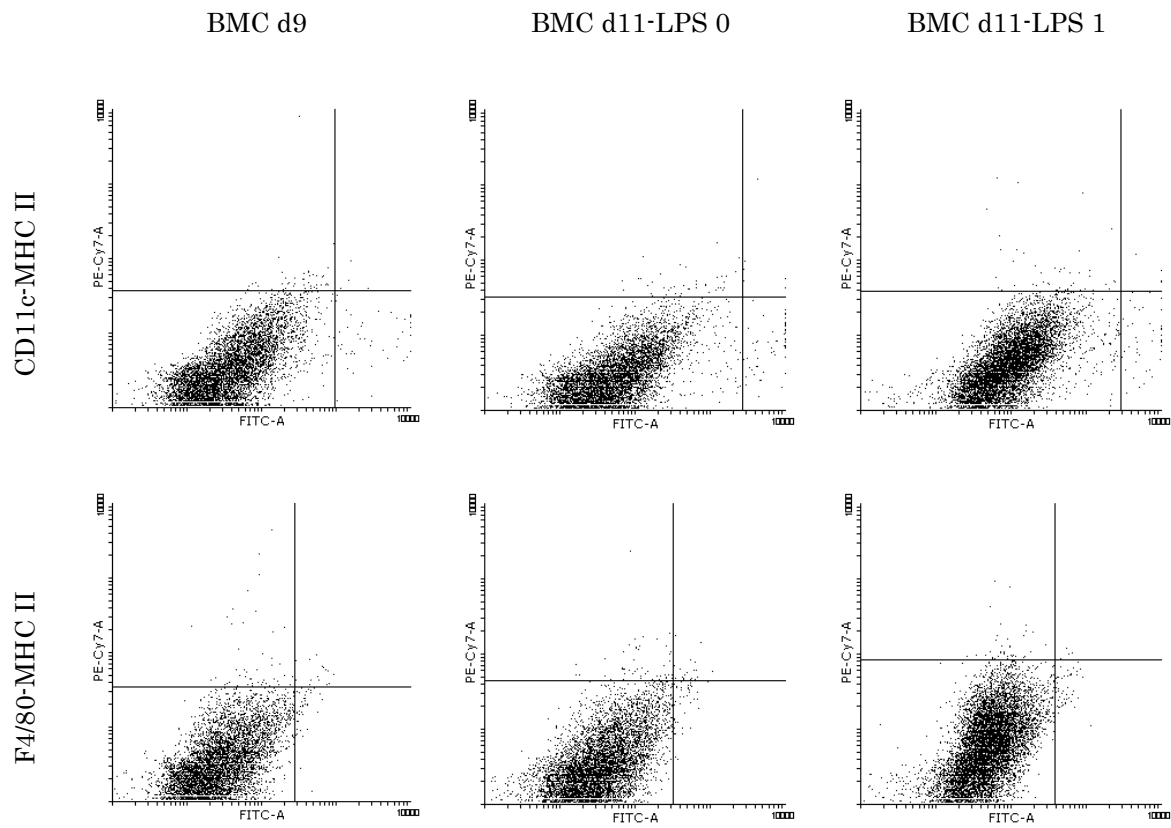


Abbildung 95: Isotyp-Kontrollen durchflusszytometrischer Analysen muriner myeloider Zellen. (entnommen aus der Masterarbeit von Verena Ziegler (TU Kaiserslautern, Masterstudiengang Toxikologie, AG Prof. Dr. Dr. D. Schrenk, März 2013).

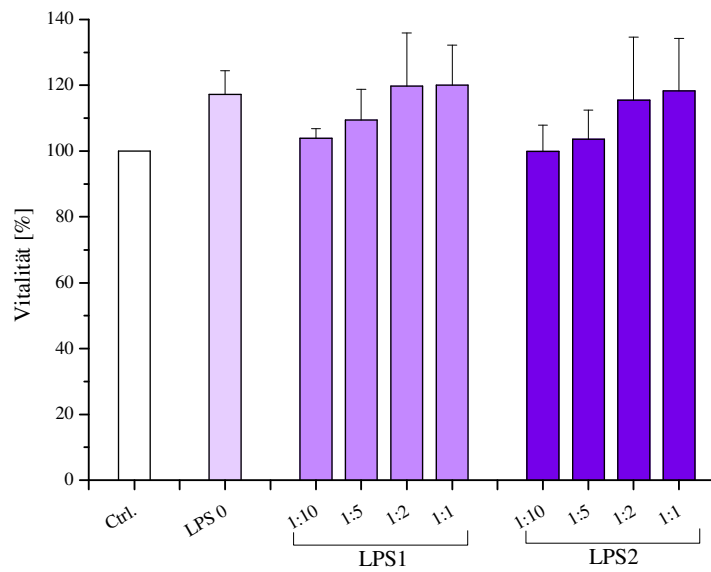


Abbildung 96: Zytotoxizität von Mediumüberständen myeloider Zellen in primären Rattenhepatozyten. Primäre Rattenhepatozyten (isoliert nach Seglen *et al.* 1976). 24 h-Inkubation mit LPS-stimulierten (0; 1 bzw. 2 µg/ml) Überständen muriner myeloider Zellen in Verdünnungen 1:10; 1:5; 1:2 und unverdünnt. n=4.

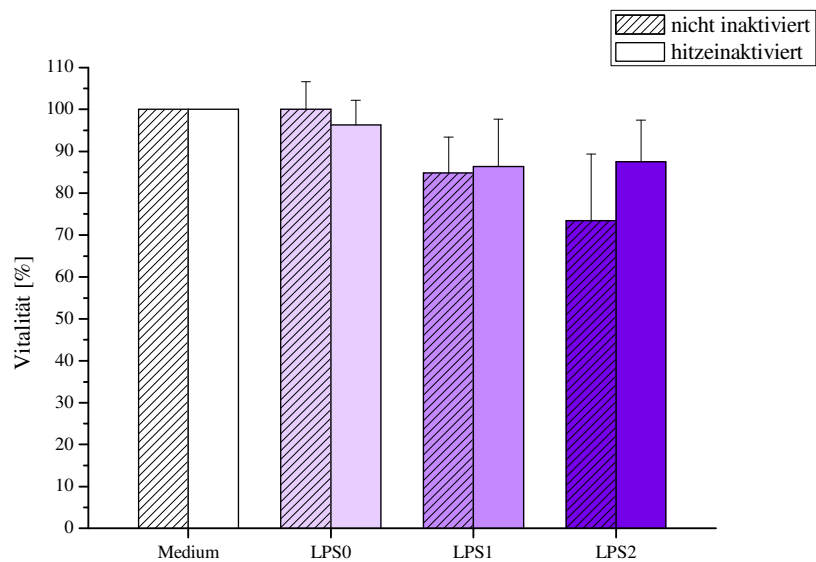


Abbildung 97: Zytotoxizität von Mediumüberständen muriner myeloider Zellen in HepG2-Zellen hitzeinaktiviert vs. nicht hitzeinaktiviert (schraffiert). Mediumüberstände muriner myeloider Zellen wurden zur Hitzeinaktivierung für 30 min auf 95°C erhitzt. Anschließend 48 h-Inkubation in HepG2, n=6

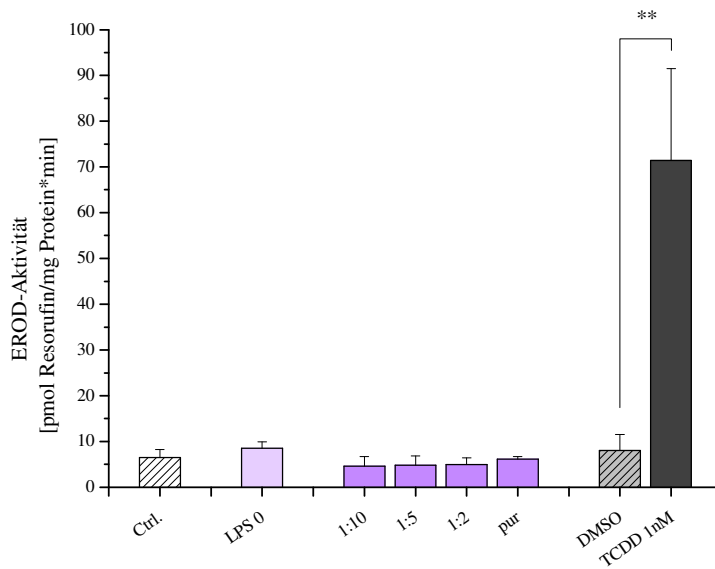


Abbildung 98: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in Hepa-1. 48 h-Inkubation mit LPS-stimulierten (0; 1 µg/ml) Überständen muriner myeloider Zellen in Verdünnungen 1:10; 1:5; 1:2 und unverdünnt (pur). n≥2. *=p≤0,05; **=p≤0,01; *=p≤0,001.**

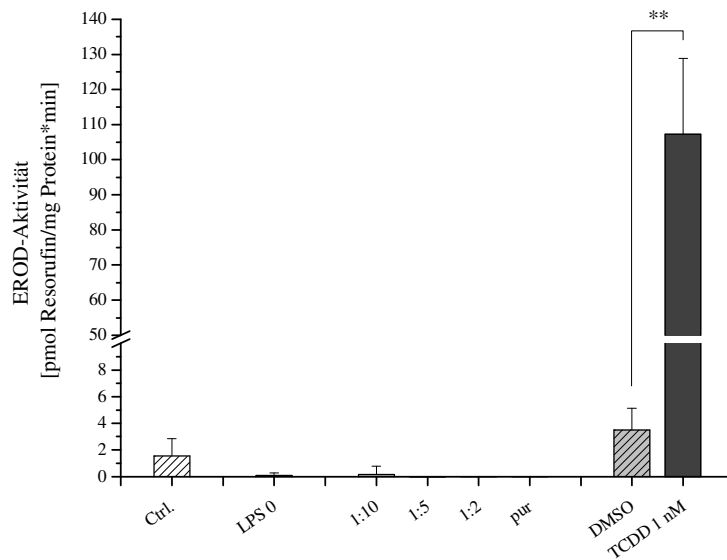


Abbildung 99: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in H4IIE. 48 h-Inkubation mit LPS-stimulierten (0; 1 µg/ml) Überständen muriner myeloider Zellen in Verdünnungen 1:10; 1:5; 1:2 und unverdünnt (pur). n=4. *=p≤0,05; **=p≤0,01; *=p≤0,001.**

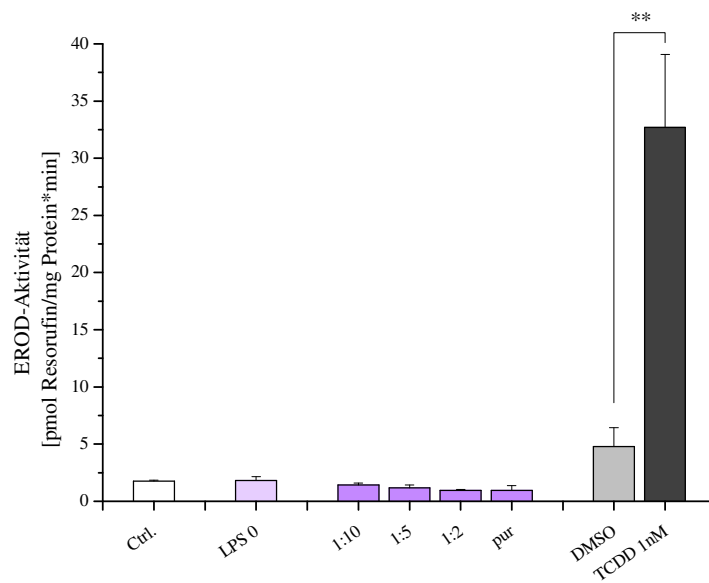


Abbildung 100: EROD-Aktivität von Mediumüberständen myeloider Zellen in primären Rattenhepatozyten. Primäre Rattenhepatozyten (isoliert nach Seglen *et al.* 1976). 24 h-Inkubation mit LPS-stimulierten (0; 1 µg/ml) Überständen muriner myeloider Zellen in Verdünnungen 1:10; 1:5; 1:2 und unverdünnt (pur). n=3. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$.

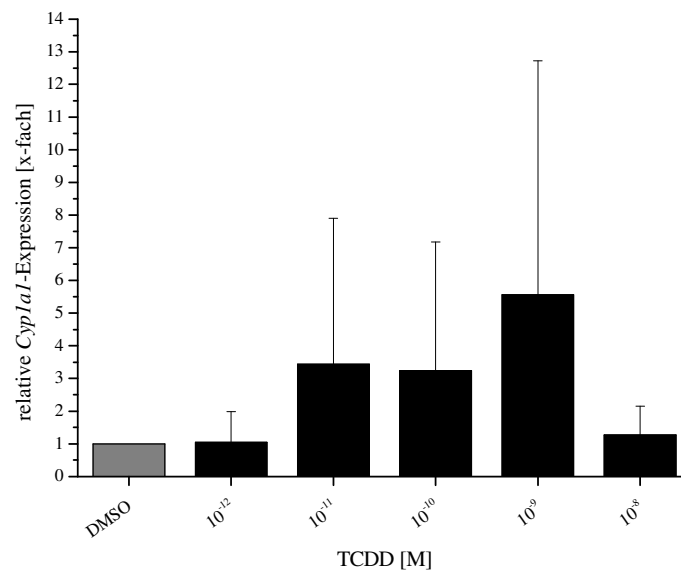


Abbildung 101: relative Cyp1a1-Expression. TCDD und LPS. 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit TCDD und LPS (1 µg/ml). x-fache mRNA-Expression von Cyp1a1. MW ± SD, n=2.

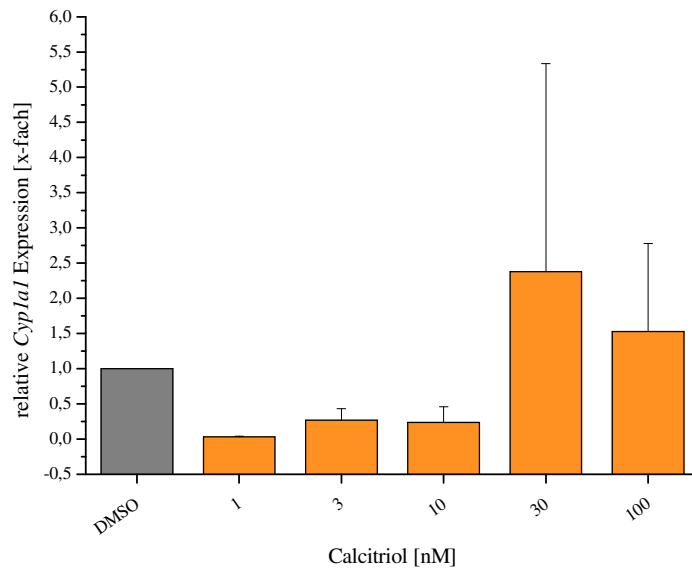


Abbildung 102: relative *Cyp1a1*-Expression. Calcitriol und LPS. 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und LPS (1 µg/ml). x-fache mRNA-Expression von *Cyp1a1*. MW ± SD, n=2.

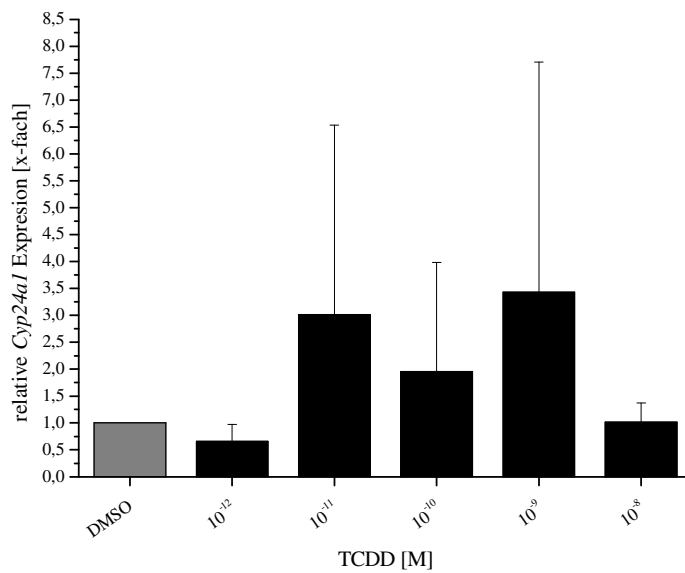


Abbildung 103: relative *Cyp24a1*-Expression. TCDD und LPS. 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und LPS (1 µg/ml). x-fache mRNA-Expression von *Cyp24a1*. MW ± SD, n=2

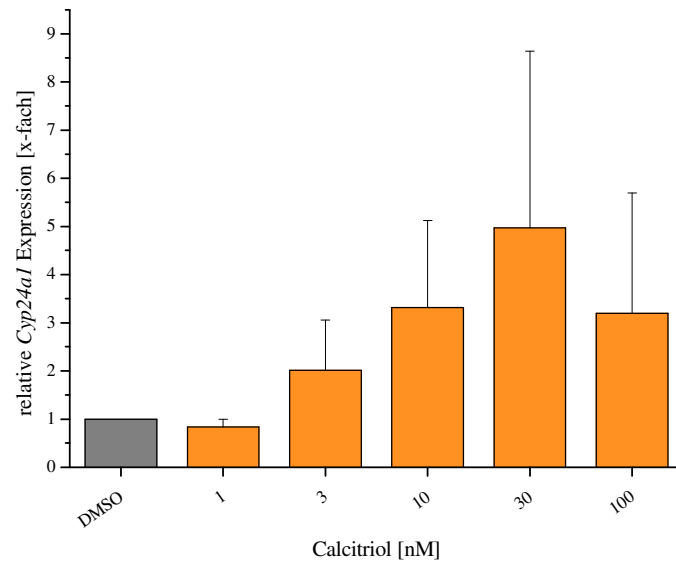


Abbildung 104: relative *Cyp24a1*-Expression. Calcitriol und LPS. 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit Calcitriol und LPS (1 µg/ml). x-fache mRNA-Expression von *Cyp24a1*. MW ± SD, n=2.

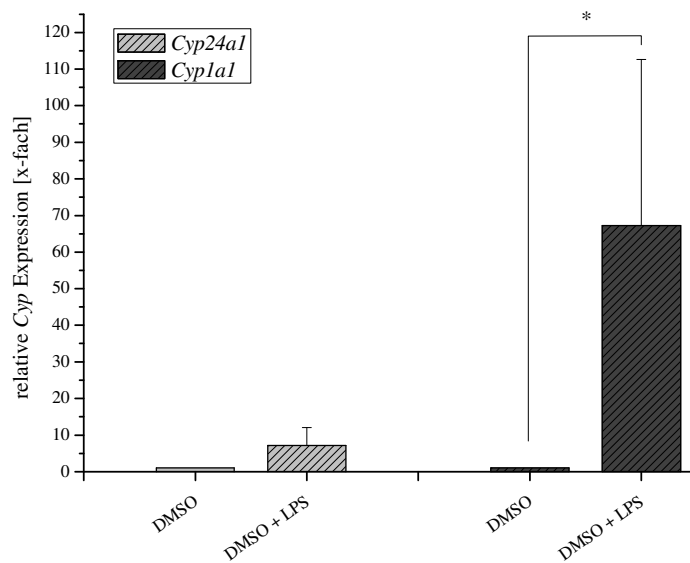


Abbildung 105: relative *Cyp1a1* und *Cyp24a1* Expression durch LPS. 48 h-Inkubation muriner myeloider Zellen mit DMSO, mit und ohne LPS (1 µg/ml). x-fache mRNA-Expression von *Cyp1a1* und *Cyp24a1*. MW ± SD, n≥2. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; *= $p \leq 0,001$.**

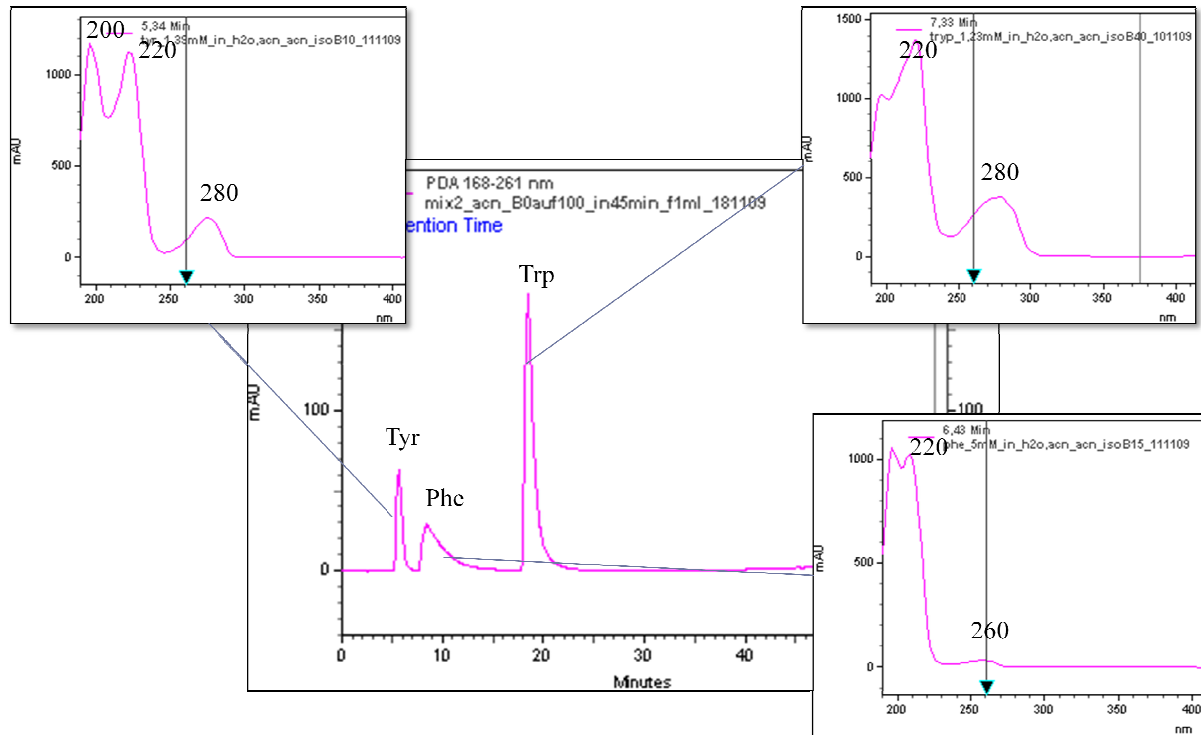


Abbildung 106: Chromatographische Trennung von Aminosäuren inkl. UV-Spektren. Tyr (5,53 min, $c=1,39$ mM); Phe (8,26 min, $c=9,6$ mM); Trp (18,27 min, $c=0,98$ mM). Methode: Gradient 45 min, $H_2O \rightarrow ACN$ 0 auf 100%, flow =1 ml/min; Säule: Merck, LiChroCART® RP-18, 250-4 mm, 5 μ m. (Forschungsarbeit A. Messer, WS 2009/2010, AG Prof. Dr. Dr. Schrenk).

9.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

9.2.1 Chemikalien

Tabelle 41: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton p.a.	Fisher Chemicals, Schwerte, Deutschland
Acetonitril (HPLC Grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calcitriol/Calcitriol	Biomol, Hamburg, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BD FACSClean™ solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSTflow™ sheath solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACST™ shutdown solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Butanol p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
CellWASH	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CH223191	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dicumarol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM High Glucose w/o Phenolrot	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
DNA, biotin labeled	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
DTT	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
7-Ethoxyresorufin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Fluorescamin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
GIBCO® DNase/RNase freies Wasser	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Interleukin IL-1α, Maus	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Interleukin IL-1β, Maus	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Interleukin IL-6, Maus	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)sulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i>	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol (HPLC-grade)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NADPH-Na₄	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
α-Naphthoflavin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Naphthylethylendiamin dihydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nonidet P40	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<i>p</i>-Dimethylaminobenzaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>p</i>-Cumarsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphorsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
PMSF	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Primer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinstandard, Precision Plus Protein Kaleidoscope™ standard	Bio-Rad, München, Deutschland
Resazurin-Natriumsalz	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Resorufin-Natriumsalz	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
RiboZol® RNA Extraktion Reagenz	VWR International, Darmstadt, Deutschland
rm GM-CSF	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
RNase AWAY	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 w L-Glutamin, w Phenolrot	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure, 32% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Sulfanilamid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TCDD	Wellington Laboratories, Ontario, Kanada
Telmisartan	VWR International, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
TNF-α	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris Pufferan[®]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween[®] 20	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Zelllinien	DSMZ, Heidelberg, Deutschland

9.2.2 Antikörper

Tabelle 42: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
<i>Antikörper für Durchflusszytometrie</i>	
FITC Hamster Anti-Mouse CD11c	BD Pharmigen [™] , Heidelberg, Deutschland
FITC Hamster IgG1 λ1 Isotype Ctrl.	BD Pharmigen [™] , Heidelberg, Deutschland
FITC Rat IgG2a κ Isotype Ctrl	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
FITC Anti-Mouse F4/80 Antigen	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
<i>Antikörper für Western Blot</i>	
AhR (H-211) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
β-Aktin rabbit monoclonal IgG	Cell Signaling, Denver, USA
CYP1A1 rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
CYP24A1 rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
VDR rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

9.2.3 Kits

Tabelle 43: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCATM Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
iScript cDNA synthesis Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, Deutschland
LightShift Chemiluminescent EMSA Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ready-Set-Go![®] ELISA Kit	eBioscience, San Diego, CA, USA

9.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 44: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Braunglasgefäße	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Braunülen (26 G x 1)	Braun, Melsungen, Deutschland
Cryo.sTM tubes 2 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Eppendorfggefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturschalen (60 mm, 100 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
HPLC-Vials	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Inserts	Buddenberg, Mannheim, Deutschland
Multiwellplatten (6, 12, 24 & 96 well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nylon Membran, positiv geladen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Pipettenspitzen (mit Filter)	PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf, Deutschland
PCR optische Deckel	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D.
PVDF Membran	Bio-Rad, München, Deutschland
Schwämme, Tankblotting	Bio-Rad, München, Deutschland
Spritzen (1 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm PTFE)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Whatman Chromatographie Filterpapier	GE Healthcare, München, Deutschland
Zellkulturflaschen (250 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland

9.2.5 Geräte

Tabelle 45: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
<i>Autoklaven</i>	
- Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, München, Deutschland
- UNOLD Elektro	UNOLD, Hockenheim, Deutschland
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biofreezer MDF-U6086S	Sanyo, München, Deutschland
Biofreezer Skadi®	MS-L GmbH, Dielheim, Deutschland
Blotting Apparatur, semi-dry	Hoefler, Holliston, USA
<i>Brutschränke</i>	
- BBD6220 Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
- Cytosperm	Heraeus, Hanau, Deutschland
- Heracell 240i	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
CFX96 Realtime PCR	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophoresekammer Mini Protean III Apparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese Netzteil, Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Glasgeräte (Bechergläser, Pipetten, Messzylinder, Schraubverschlussflaschen)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Anlage, Agilent Series 1200	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Inkubator Heraeus B15	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Kühlschränke, Gefrierschränke	Liebherr, Karlsruhe, Deutschland
<i>Lichtmikroskope</i>	
- Axioskop	Zeiss, Jena, Deutschland
- Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
- Zeiss IM	Zeiss, Jena, Deutschland
- Leica DM IRB	Leica, Bonn, Deutschland
Lumi Imager	Roche, Mannheim, Deutschland
Magnetrührer M3001	Heidolph Electro, Kelheim, Deutschland
Microplate Strip Washer, ELx50	Bio-Tek, Winooski, USA
Mini Tank Blotter	Bio-Rad, München, Deutschland
MyCycler™ Thermocycler	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop® (ND-1000 Spektrophotometer)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Neubauer Improved Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter	Eutech Instruments Europe B.V. AG Nijkerk, Niederlande

Pipetten

- **Eppendorf Research** VWR International, Frickenhausen, Deutschland
- **Pipetman Gilson** VWR International, Frickenhausen, D.
- **Pipetus ® accu-jet pro** Brand GmbH, Wertheim, Deutschland

Plattenlesegeräte

- **Fluoroskan Ascent FL** Labsystems, Dreieich, Deutschland
- **Microplate Reader Synergy HAT Multi Detection** Bio-Tek, Winooski, USA

Rotationsverdampfer, Laborota 4000

Heidolph, Schwabach, Deutschland

Sterilbänke

- **BSB 4A** Gelaire Flow, Meckenheim, Deutschland
- **Hera Safe** Heraeus, Hanau, Deutschland
- **Steag MRF-B** Steag Laminarflow Prozesstechnik, Pfullingen, Deutschland
- **BDR** BDR Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland

Thermomixer

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschallsonde

Braun, Melsungen, Deutschland

Vortexer, Agitateur Top Mix 11118

Bioblock Scientific, Freckendorf, Deutschland

Waagen

- **Sartorius BP 2105** Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- **Sartorius CP64-OCE** Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- **Sartorius CPA 2245** Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Wasserbäder

- **GFL 1083** GFL, Burgwedel, Deutschland
- **Julabo 13** Julabo, Seelbach, Deutschland

Zähler

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifugen

- **Megafuge 1.0 R** Heraeus, Hanau, Deutschland
 - **Microfuge R** Heraeus, Hanau, Deutschland
 - **Rotina 35** Beckman, Krefeld, Deutschland
 - **Sigma 1-13** Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
 - **Sigma 1 L-12** Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Deutschland
-

9.2.6 Software

Tabelle 46: Verwendete Software

Software	Hersteller
Ascent Software für Fluoroskan 2.6 FL	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
BD FACSDiva Software 6.1.2	BD Biosciences, San Jose, USA
ChemBioOffice 2010	Perkin Elmer Informatics, Waltham, USA
CFX Manager Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Flowing Software 2.4.1	Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Finnland
Gen5 1.02.8	Bio Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, San Diego, USA
LumiAnalyst 3.0	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporations, Redmond, USA
OriginPro 8.0	OriginLab, Northampton, USA

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation eigenständig verfasst, die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen genannt und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Kaiserslautern, den 24.10.2014



Anastasia Messer

LEBENS LAUF

Promotion

12/2010 – 10/2014

Technische Universität Kaiserslautern

Fachbereich Chemie

Lebensmittelchemie und Toxikologie

Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Thema der Dissertation: „*Crosstalk zwischen murinen myeloiden Zellen und fremdstoffmetabolisierenden Hepatomzellen durch Liganden des AhR-Signalweges.*“

(Gesamturteil: „Sehr gut“)

Studium

10/2005 – 10/2010

Technische Universität Kaiserslautern

Fachbereich Chemie

Studium der Chemie, Vertiefung Life Science

Diplomarbeit: „*Analytik von Furocumarinen und deren Metaboliten im Urin nach Verzehr von Grapefruitsaft*“

(Note: 1,0)

30.09.2010

Abschluss: Diplom-Chemikerin (Dipl.-Chem.)

(Note: 1,2)

04/2009 – 07/2009

University of Glasgow, Scotland, UK

Department of Chemistry

Forschungsarbeit: „*Light MPEG-Support for Organic Synthesis*“

Weiterbildungen

- 10/2011 – heute Weiterbildungsprogramm „Fachtoxikologe/-in DGPT“
- 06/2013 Klinikum der FSU Jena, Bereich Erfurt
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Erfurt
Kurs: **Grundlagen Organtoxikologie und –pathologie II**
- 03/2013 Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
Charité Universitätsmedizin Berlin
Kurs: **Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie**
- 06/2012 Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Institut für
Versuchstierkunde, Jena
Kurs: **Versuchstierkunde II – praktischer Teil**
- 03/2012 Universität des Saarlandes, Homburg
Kurs: **Klinische Toxikologie**
- 01/2012 Helmholtz Zentrum München
Kurs: **Molekulare Zelltoxikologie**
- 10/2011 Klinikum der FSU Jena, Bereich Erfurt
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Erfurt
Kurs: **Versuchstierkunde I / Biostatistik**
- 10/2011 Technische Universität Kaiserslautern
Kurs: **Lebensmitteltoxikologie**

Publikationen

- Messer, A., Raquet, N., Lohr, C., Schrenk, D. „Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity.“ *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50 (3-4): 756-60
- Messer, A., Nieborowski, A., Strasser, C., Lohr, C., Schrenk, D. „Major furocoumarins in grapefruit juice I: levels and urinary metabolite(s).“ *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49 (12): 3224-31
- Figlus, M., Tarruella A. C., Messer, A., Sollis, S. L., Hartley, R. C. „Low molecular weight MPEG-assisted organic synthesis.“ *Chemical Communication (Cambridge)*, 2010, 46 (24) 4405-7

Posterbeiträge

A. Messer, C. Strasser, A. Nieborowski, N. Raquet, C. Lohr, D. Schrenk. „*Im Grapefruitsaft vorkommende Furocumarine – Metabolismus, Phototoxizität, Photogentoxizität und Inhibition des Cytochrom P450 3A4*“. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Münster, 2012

A. Messer, C. Lohr, N. Raquet, D. Schrenk. „*Phototoxizität, Photogentoxizität und Metabolismus im Grapefruitsaft vorkommender Furocumarine*“. 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Halle (Saale), 2011

Kaiserslautern, 24. Oktober 2014



Anastasia Messer